



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA Y ANTROPOLOGÍA FÍSICA

El gusano de seda, *Bombyx mori* (Linneo, 1758)
(Lepidoptera: Bombycidae) como plataforma de producción
de proteínas naturales y recombinantes. Aplicaciones en
Biotecnología e Ingeniería de Tejidos

Salvador D. Aznar Cervantes

2013



El gusano de seda, *Bombyx mori* (Linneo, 1758)
(Lepidoptera: Bombycidae) como plataforma de producción
de proteínas naturales y recombinantes. Aplicaciones en
Biotecnología e Ingeniería de Tejidos

*Memoria presentada por Salvador
D. Aznar Cervantes para optar al
Grado de Doctor en Biología por la
Universidad de Murcia*

Director: Jose Luis Cenis Anadón

Tutora académica: Elena Romera Lozano



D^a. Mar Torralva Forero, Profesora Titular de Universidad del Área de Zoología y **Director del Departamento*** Zoología y Antropología Física,

INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "El gusano de seda, producción de proteínas naturales y recombinantes. Aplicaciones en biotecnología e ingeniería de tejidos", realizada por D. Salvador David Aznar Cervantes, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. José Luis Cenis Anadón, este Consejo de Departamento, en sesión celebrada en fecha 29/11/2012, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.



Mar Torralva Forero
Murcia, a 29 de noviembre de 2012

Doctorando: D. Salvador David Aznar Cervantes

**Informe del Departamento para alumnos del RD 778/1998.*

**Informe de La Comisión Académica del Programa para alumnos del RD 56/2005 y RD 1393/2007.*



D^a. Elena Romera Lozano, profesora titular de la Universidad de Murcia del Área de Zoología, del Departamento de Zoología y Antropología Física

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada **"El gusano de seda, *Bombyx mori* (Linneo, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae), como plataforma de producción de proteínas naturales y recombinantes. Aplicaciones en biotecnología e ingeniería de tejidos"**, realizada por D. Salvador Aznar Cervantes, bajo mi tutela académica, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia a 23 de Noviembre de 2012.



Región de Murcia



Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario

Calle Mayor s/n 30150 La Alberca (Murcia)

Telf. 968 366716 Fax 968 366 792

www.imida.es

D. Jose Luis Cenis Anadón, Investigador Jefe del Departamento de Biotecnología del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**El gusano de seda, *Bombyx mori* (Linneo, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae), como plataforma de producción de proteínas naturales y recombinantes. Aplicaciones en Biotecnología e Ingeniería de Tejidos**”, realizada por D. Salvador D. Aznar Cervantes, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia a 23 de Noviembre de 2012.

Jose Luis Cenis Anadón
Jefe del Grupo de Biotecnología

A mi hermana Dori, presente de una forma u otra en mi día a día, puesto que su amor incondicional, alegría y enseñanza en valores fundamentales forman y formarán parte por siempre de mi persona.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

A mi director de tesis, Jose Luis Cenis Anadón, por brindarme la oportunidad de trabajar en esta motivadora línea de investigación, así como por su apoyo y comprensión a lo largo de los últimos 5 años.

A mi tutora académica, Elena Romera Lozano, por sus enseñanzas, de valor incalculable, durante mis primeros pasos como científico.

A los investigadores que me han acogido en sus laboratorios y transmitido sus conocimientos: Luis Meseguer Olmo (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia), José Ángel Martínez Escribano (INIA, Madrid), Toribio Fernández Otero (Departamento de Materiales Inteligentes, UPCT, Cartagena), José Neptuno Rodríguez (Departamento de Bioquímica, UMU, Murcia), Pilar de la Rúa Tarín (Departamento de Zoología y Antropología Física, UMU, Murcia), Marcos García Fuentes (Facultad de Farmacia, USC, Santiago de Compostela), Ignacio González Loscertales (Departamento de Ingeniería Mecánica y Mecánica de Fluidos, Universidad de Málaga), Gregory Rutledge (Departamento de Ingeniería Química, MIT, Cambridge, Massachusetts, EE.UU), Robert Redmond (Hospital General de Massachusetts, Boston, Massachusetts, EE.UU) y David L. Kaplan (Departamento de Ingeniería Biomédica, Universidad de Tufts, Medford, Massachusetts, EE.UU). Así como a los miembros de sus respectivos equipos de investigación y también al personal del SACE (UMU), siempre dispuesto a brindarme su ayuda de forma desinteresada.

Al IMIDA, en la persona de su Director, Adrián Martínez Cutillas, por poner a mi disposición la infraestructura adecuada y todos los elementos necesarios para trabajar.

A todos los compañeros del centro, desde los más cercanos (sabéis quienes sois), hasta los que sin apenas conocerme me han regalado un amable saludo cada mañana. Todos en conjunto habéis hecho que mi día a

día transcurriese en un ambiente que desearía pudiese compartir mucha más gente, especialmente en estos tiempos en que la frialdad humana suele ser la tónica general. Muchas gracias a becarios, contratados, personal de administración, técnicos de laboratorio, limpiadoras y mis chicas de la cantina... gracias por vuestra compañía, amistad y amabilidad.

A mis amigos, puesto que a lo largo de estos años siempre me han animado y motivado con gran ilusión, incluso en los momentos más difíciles. Así que, amigos del colegio, del instituto o de la Universidad, amigos del IMIDA y "amigos de la calle y del azar" este trabajo también es vuestro. Intentaré no defraudaros en las buenas expectativas que tenéis puestas en mi carrera científica.

Y por último, a toda mi familia, por su apoyo incondicional, su confianza en el camino que a día de hoy he escogido y la comprensión demostrada ante la vida, eventualmente "nómada", que he tenido y tendré que adoptar. Ellos saben que aunque no esté aquí permanentemente pueden contar conmigo en todo momento.

FINANCIACIÓN

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a la financiación recibida a través de una Beca-Contrato FPI Predoctoral (BOE 27 de febrero de 2008), concedida por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, de cuatro años de duración (2009-2012). Dicha convocatoria ha incluido también financiación para la realización de 3 estancias trimestrales en Boston (EE.UU) muy provechosas para el desarrollo de la presente tesis. Mi reconocimiento al INIA por esta ayuda, en la persona de D. Julián Barrera Vega, Jefe de Servicio de Seguimiento y Control de la Promoción Científica

La financiación de los experimentos de este trabajo procede del proyecto PO-009 del IMIDA, titulado: "Valorización de la cría del gusano de seda para aplicaciones en biotecnología y biomedicina" cofinanciado al 80% por fondos del Plan Operativo FEDER 2007-2013 de la UE.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Aspectos biológicos de <i>Bombyx mori</i>	3
1.2 Aspectos históricos y económicos de la sericultura.....	12
1.2.1 Origen y expansión de la sericultura.....	13
1.2.2 La sericultura durante la historia contemporánea española.....	17
1.3 Bioproductos derivados del gusano de la seda.....	23
1.3.1 Naturaleza química de la seda.....	23
1.3.1.1 Aplicaciones en biomedicina de la fibroína.....	28
1.3.1.2 Aplicaciones en biomedicina de la sericina.....	30
1.3.1.3 Aplicaciones en biomedicina de los flavonoides y carotenoides de la seda.....	33
1.3.2 Crisálidas.....	35
1.4 Utilización de la fibroína de seda como biomaterial.....	36
1.4.1 Propiedades de la fibroína como biomaterial.....	37
1.4.2 Presentaciones de la fibroína como biomaterial.....	41
1.4.2.1 Mallas obtenidas mediante electrohilatura (<i>electrospinning</i>).....	41
1.4.2.1.1 Procesamiento de mallas electrohiladas.....	44
1.4.2.1.2 Funcionalización de mallas electrohiladas.....	47
1.4.2.1.3 Aplicaciones en Ingeniería de Tejidos.....	49
1.4.2.2 Películas transparentes (<i>films</i>).....	53
1.4.2.3 Hidrogeles.....	58
1.4.2.4 Esponjas porosas.....	60
1.4.2.5 Micro y nanopartículas.....	62
1.5 El gusano de la seda como biorreactor para la producción de proteína recombinante.....	63
2. Objetivos	71
3. Producción de dihidrofolato reductasa humana (hDHFR) en crisálidas y larvas de <i>B. mori</i>	75
3.1 Introducción.....	77
3.2 Material y métodos.....	81
3.2.1 Cría del insecto.....	81
3.2.1.1 Cría con dieta natural.....	83
3.2.1.2 Cría con dieta artificial.....	84

3.2.2	Expresión y purificación de hDHFR-ec.....	90
3.2.3	Preparación del vector de expresión baculovirus.....	91
3.2.4	Expresión de hDHFR en preimagos de <i>B.mori</i>	93
3.2.5	Purificación e identificación de hDHFR.....	95
3.2.6	Evaluación de la actividad enzimática DHFR.....	96
3.2.7	Inmunotinción de hDHFR en secciones de crisálida.....	97
3.3	Resultados y discusión.....	98
3.3.1	Diseño del vector viral para la expresión de hDHFR en <i>B.mori</i>	98
3.3.2	Expresión de hDHFR en <i>B.mori</i>	99
3.3.3	Purificación de hDHFR-bm.....	102
3.3.4	Caracterización cinética de hDHFR-bm.....	105
3.4	Conclusiones.....	106

4. Influencia de la metodología de disolución de fibroína en las propiedades

	físicas de las mallas electrohiladas.....	109
4.1	Introducción.....	111
4.2	Material y métodos.....	114
4.2.1	Cría del insecto y procesado de la seda.....	114
4.2.2	Determinación de la solubilidad en agua de la fibroína liofilizada.....	116
4.2.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y tinción de Coomassie.....	116
4.2.4	Fabricación de materiales mediante electrohilado.....	121
4.2.5	Caracterización de los materiales.....	123
4.2.5.1	Microscopía electrónica de barrido y cálculo del tamaño de las fibras.....	123
4.2.5.2	Propiedades mecánicas de las mallas electrohiladas.....	124
4.2.5.3	Espectroscopía de infrarrojos.....	128
4.3	Resultados y discusión.....	129
4.3.1	Peso molecular de los péptidos resultantes.....	129
4.3.2	Solubilidad en agua de la proteína purificada.....	134
4.3.3	Espectroscopía de infrarrojos de la fibroína liofilizada.....	136
4.3.4	Tamaño de las fibras.....	137
4.3.5	Propiedades mecánicas.....	142
4.4	Conclusiones.....	150

5. Fabricación de mallas de fibroína de seda electroconductoras para aplicaciones biomédicas	153
5.1 Introducción.....	155
5.2 Material y métodos.....	156
5.2.1 Cría del insecto y procesado de la seda.....	156
5.2.2 Fabricación de materiales mediante electrohilado.....	157
5.2.3 Caracterización de los materiales, previa al cultivo celular.....	160
5.2.3.1 Microscopía electrónica de barrido y cálculo del tamaño de las fibras.....	160
5.2.3.2 Propiedades mecánicas de las mallas electrohiladas.....	160
5.2.3.3 Espectroscopía de infrarrojos.....	160
5.2.3.4 Caracterización electroquímica de las mallas conductoras.....	160
5.2.4 Biocompatibilidad de los materiales.....	161
5.2.4.1 Cultivo celular.....	161
5.2.4.1.1 Aislamiento de fibroblastos humanos.....	161
5.2.4.1.2 Aislamiento de células madre mesenquimales de médula ósea.....	163
5.2.4.1.3 Esterilización de las mallas.....	164
5.2.4.1.4 Siembra de los biomateriales.....	164
5.2.4.2 Microscopía electrónica de barrido para muestras biológicas.....	165
5.2.4.3 Ensayo de proliferación celular (MTT).....	166
5.3 Resultados y discusión.....	167
5.3.1 Tamaño de las fibras.....	167
5.3.2 Cubierta de polipirrol.....	169
5.3.3 Voltamograma.....	169
5.3.4 Caracterización de propiedades físico-químicas.....	172
5.3.5 Ensayos de adhesión y proliferación celular.....	174
5.4 Conclusiones.....	176
6. Conclusiones generales	179
7. Anexo: Curvas y tablas de crecimiento larvario	183
8. Bibliografía	189

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1 Aspectos biológicos de *Bombyx mori*
- 1.2 Aspectos históricos y económicos de la sericultura
 - 1.2.1 Origen y expansión de la sericultura
 - 1.2.2 La sericultura durante la historia contemporánea española
- 1.3 Bioproductos derivados del gusano de la seda
 - 1.3.1 Naturaleza química de la seda
 - 1.3.1.1 Aplicaciones en biomedicina de la fibroína
 - 1.3.1.2 Aplicaciones en biomedicina de la sericina
 - 1.3.1.3 Aplicaciones en biomedicina de los flavonoides y carotenoides de la seda
 - 1.3.2 Crisálidas
- 1.4 Utilización de la fibroína de seda como biomaterial
 - 1.4.1 Propiedades de la fibroína como biomaterial
 - 1.4.2 Presentaciones de la fibroína como biomaterial
 - 1.4.2.1 Mallas obtenidas mediante electrohilatura (*electrospinning*)
 - 1.4.2.1.1 Procesamiento de mallas electrohiladas
 - 1.4.2.1.2 Funcionalización de mallas electrohiladas
 - 1.4.2.1.3 Aplicaciones en Ingeniería de Tejidos
 - 1.4.2.2 Películas transparentes (*films*)
 - 1.4.2.3 Hidrogeles
 - 1.4.2.4 Esponjas porosas
 - 1.4.2.5 Micro y nanopartículas
- 1.5 El gusano de la seda como biorreactor para la producción de proteína recombinante

1.1. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Bombyx mori*

Bombyx mori (Linnaeus, 1758) es una especie de insecto perteneciente al orden de los Lepidópteros y a la familia Bombycidae (figura 1.1). El nombre del género al que pertenece procede del latín *bombus* que significa zumbido (por el que produce la mariposa al aletear) y su especie es denominada *mori* (moral) por la planta cuyas hojas le sirven de alimento (De Federico, 1940). Se trata de un insecto holometábolo cuyo ciclo vital completo (figura 1.2) comprende 4 estados bien diferenciados: huevo, larva, crisálida (pupa) y adulto (mariposa). El mismo se completa entre 65 y 75 días, según las temperaturas y alimentación a las que se vean sometidos los ejemplares durante su cría (Fernández y Tricio, 2003) y cada mariposa hembra puede depositar de 300 a 500 huevos.



Figura 1.1. Ejemplar adulto de *B. mori*

Este insecto, denominado comúnmente “gusano de seda”, atraviesa 5 fases larvarias (con 4 mudas) antes de llevar a cabo la pupación, para la cual se prepara produciendo una envuelta protectora de seda denominada capullo. De esta envuelta protectora, formada por un hilo de seda continuo de hasta 1.500 m, emerge el adulto una vez completada la metamorfosis.

Los **huevos** miden en torno a 1 mm de diámetro, su forma es lenticular y presentan una cubierta quitinosa. Su coloración se torna

grisácea cuando están fecundados, transcurridos 4 o 5 días desde la ovoposición, y permanecen de color amarillo pálido cuando no lo están.

Las **larvas**, como se citó anteriormente, atraviesan 4 mudas y son de forma cilíndrica, incrementan su tamaño exponencialmente a lo largo de su vida, alimentándose de hojas de morera (*Morus alba* o *Morus nigra*). El primer estado mide tan solo unos 2 mm al nacer y presenta pelos negros a lo largo de todo su cuerpo, que desaparecen tras la primera muda. El quinto estado puede alcanzar los 8 cm de longitud en el momento previo a la pupación.

El cuerpo de las larvas consta de cabeza, tórax (3 anillos siguientes a la cabeza) y abdomen (9 anillos posteriores).

La cabeza de la larva es pequeña en relación al cuerpo y su color es más oscuro, se pueden observar en ella las mandíbulas, cuya apariencia es la de dos piezas quitinosas, dentadas y que se mueven lateralmente, encontrándose ubicadas entre los dos labios (superior e inferior). El orificio que queda entre estas cuatro piezas es la boca. A ambos lados de esta estructura, y sobre la misma, se ubican las antenas articuladas, formadas por 5 segmentos y cubiertas de pelos sensoriales. En su base, a ambos lados, se encuentra los ojos u ocelos, su apariencia es la de 6 pares de abultamientos lenticulares. También son fácilmente apreciables en la cabeza otras cuatro estructuras o apéndices denominados palpos maxilares (las dos mayores) y palpos labiales (los dos de menor tamaño). Entre éstos se localiza la hilera, formada por un mamelón de forma cónica y que tiene un orificio a través del cual expulsa la seda.

El tórax presenta 3 pares de patas verdaderas provistas de uñas en sus extremos. En los segmentos segundo y tercero, dorsalmente, aparecen arrugas del tegumento que constituyen una especie de joroba característica.

El abdomen, formado por los 9 segmentos finales del cuerpo del gusano, presenta pseudopatas en los segmentos corporales sexto, séptimo, octavo, noveno y doceavo. Éstas ayudan durante la locomoción al insecto y también lo fijan durante el proceso de hilado del capullo. En el onceavo anillo se hace patente la presencia de un espolón encorvado y, a lo largo de su cuerpo, presenta estigmas respiratorios, visibles en los segmentos primero y del cuarto al onceavo, incluido. Habría que decir que son

realmente 11 los segmentos que componen el abdomen de la larva pero los 3 últimos se encuentran fusionados dando la apariencia de uno solo (portador del último par de pseudopatas)

El cuerpo de la larva, a grandes rasgos, alberga en su interior el tubo digestivo, con esófago, estómago e intestinos diferenciados. La excreción de los productos tóxicos y desechos metabólicos se da gracias a los tubos de Malpigio que vierten al intestino delgado. Dorsalmente al mismo, se encuentra el sistema circulatorio, siendo clara la presencia de un gran vaso sanguíneo. Bajo el tubo digestivo, a ambos lados, se localizan las glándulas sericígenas, de color ambarino o blancas y con varios pliegues. Éstas conectan con la hilera ubicada bajo la boca del gusano y son las encargadas de la producción de la seda.

La metamorfosis conlleva un periodo en el cual la larva, ubicada ya en el interior del capullo y tras sufrir una última muda, contrae su cuerpo y endurece el tegumento a la misma vez que este se emparedece adoptando el color marrón anaranjado típico de la **crisálida**. En la cutícula de la pupa, se intuyen pronto las estructuras que constituirán el cuerpo del insecto adulto (antenas, ojos, alas plegadas, patas, etc)

En cuanto al **adulto**, presenta también cabeza, tórax y abdomen bien diferenciados. En la cabeza se hace patente la presencia de grandes antenas y ojos compuestos y el aparato bucal es ahora rudimentario, puesto que el adulto no se alimenta. El tórax tiene los 3 pares de patas característicos de los insectos y dos pares de alas ubicadas en posición dorsal.

Es importante citar que estas mariposas presentan un claro dimorfismo sexual. Las hembras son de mayor tamaño, con un abdomen más engrosado, antenas pequeñas (filiformes) y de comportamiento menos activo. Los machos se mueven mucho más y aletean buscando a las hembras para copular, presentan antenas plumosas (pectinadas) de mayor tamaño y su abdomen es más afinado (Fernandez y Tricio, 2003). Ambos poseen un cuerpo pubescente de color blanco y las alas anteriores con tonalidades marrones o blanco "sucio". Las mariposas de esta especie han perdido la capacidad de vuelo dada su domesticación desde hace al menos unos 5.000 años.

No existen poblaciones de *B. mori* en estado salvaje y se cree que *Bombyx mandarina* (Moore, 1872) es su ancestro silvestre más cercano evolutivamente (Yukuhiro y col. 2002).



Figura 1.2. Imagen ilustrativa del ciclo vital completo del gusano de seda. *LI,LII,LIII,LIV y LV son las larvas de primer, segundo, tercer, cuarto y quinto estado, respectivamente.

Muchos son los ecotipos y más de 3.000 las líneas autocruzadas de *B. mori* que se distribuyen, según Gaviria y col. (2006), en regiones templadas y tropicales. Presentando las primeras diapausa y las segundas no. Las variedades de gusano de seda sin diapausa son polivoltinas y presentan muchas crías al año, siendo los tamaños de los gusanos menores, más corto su ciclo vital y generando éstos una seda de peor calidad. Por otro lado, son más resistentes a las enfermedades producidas dadas las condiciones de alta humedad y temperatura de climas tropicales.

Por el contrario, las variedades uni- o bivoltinas típicas de climas templados generan más seda, de mejor calidad y los ejemplares alcanzan tamaños mayores, siendo, eso sí, más sensibles a todo tipo de infecciones y no aptos para la cría en climas tropicales.

A modo de ejemplo, citaremos algunas de las razas de gusano de seda tradicionalmente empleadas en la producción de esta valiosa fibra natural. La clasificación de éstas atiende a caracteres secundarios, entre los que destacan color, forma o tamaño de los capullos, así como al rendimiento y calidad de las fibras. También existen diferentes razas que aun produciendo capullos de similar apariencia presentan en sus fases larvarias diversos fenotipos.

Los capullos pueden presentar formas muy variadas, desde los que son casi esféricos hasta los más ovalados o con estrechamientos en su zona ecuatorial ("acinturados"). También hay una gran variedad en la coloración de los mismos pudiendo ser blancos, amarillos, rosados o verdes, dependiendo de la raza de la que hablemos.

En cuanto a los fenotipos de los gusanos, encontramos larvas blancas, grises, negras, jaspeadas o acebradas y con diversos dibujos y ornamentaciones sobre su piel.

González Marín (2001) en su libro "*El gusano de seda y la morera*", describe una clasificación tradicional de razas de *B. mori* sencilla basada en la procedencia de la raza, fenotipo del capullo y la calidad de la fibra. A continuación se citan las mismas, la numeración entre paréntesis hace referencia a la clasificación de la figura 1.3.

- Razas de China: China oro (1); China blanca oval (2); China rosada Hankow (3)
- Razas de Japón: Japonesa verde (4); Japonesa blanca Kokusan (5)
- Razas de España: Amarilla española nº 1 (6); Amarilla Sierra Morena o nº 2 (7); Española Minano (8); Española Galera (9)
- Razas turcas: Gran Bagdad (10)
- Razas de Francia: Var (11); Gubbio (12); Francesa Blanca; Cevennes
- Razas de Italia: Abruzzo (13); Amarilla Sala (14); Blanca Novi Ligure
- Razas de Grecia: Edessa Montaña (15)

Sin embargo, estas descripciones tienen un valor puramente histórico. La sericultura industrial moderna durante todo el siglo XX se basó en el uso de polihíbridos. Cada población resultaba del cruce de cuatro razas distintas, buscando la mejor aptitud y rendimiento industrial en el proceso

de hilatura. Estos cruzamientos para la obtención de híbridos eran realizados por empresas especializadas que vendían la semilla a los criadores. En España, la Estación Sericícola de Murcia importaba y distribuía dicha semilla, y también realizó sus propios híbridos, tales como:

- China Blanca x Sierra Morena (16)
- China oro x Amarilla española nº 1 (17)
- Sierra Morena x Italiana blanca (18)

Esta actividad de producción de híbridos ha desaparecido totalmente en Europa, y las poblaciones polihíbridas adecuadas para producción de seda sólo pueden obtenerse de los centros especializados de los grandes países productores.



Figura 1.3. Ilustración del libro *El Gusano de Seda y la Morera* (González Marín, 2001) mostrando la clasificación de razas de *B. mori* según la morfología del capullo.

Los bancos genéticos de *B. mori*, conservados en todo el mundo, comprenden muchísimas razas geográficas y líneas endogámicas, así como mutantes portadores de rasgos morfológicos, bioquímicos, comportamentales y de desarrollo propios. Se estima en más de 3.000 el número de genotipos de gusano de seda mantenidos entre Asia y Europa (Nagaraju, 2000).

Estudios filogenéticos basados en hibridación interespecífica (Aratake y Kayamura, 1973), emparejamiento de cromosomas (Murakami e Imai, 1974) y comparación estructural de genes (Shimada y col, 1995) muestran, tal y como citamos anteriormente, la estrecha relación evolutiva existente entre *B. mori* y *B. mandarina*, teniendo el primero una dotación genética distribuida en 28 pares de cromosomas y el segundo en 27. Existen investigaciones citológicas realizadas a híbridos de ambas especies en las que se muestran apareamientos cromosómicos, formados por un cromosoma de *B. mandarina* y dos de *B. mori*. Ello podría deberse a la división de un cromosoma ancestral (de *B. mandarina*) en dos nuevos, a lo largo del proceso de domesticación de *B. mori* (Murakami e Imai, 1974).

En el gusano de seda la sexualidad está determinada por los cromosomas W y Z, siendo los machos homogaméticos (ZZ) y las hembras heterogaméticas (WZ). Todo apunta a que los condicionantes de sexo femenino se encuentran en el cromosoma W (Tazima, 1964).

El genoma haploide de esta especie está formado por 560 Mb en una sola célula de la glándula sericígena (Gage, 1974), lo que supone 3,5 veces el genoma de la mosca del vinagre (140 Mb). Sus cromosomas son, como en la mayoría de lepidópteros, holocéntricos, presentando centrómeros dispersos a lo largo de los mismos (Murakami e Imai, 1974), además se encuentran altamente empaquetados y son muy difíciles de identificar individualmente. A pesar de esta dificultad, la larva de gusano de seda ha sido empleada como modelo para estudios genéticos desde el descubrimiento de la herencia Mendeliana, pues su gran tamaño, fácil cría en laboratorio e importancia económica, la hacen un modelo muy adecuado a tal efecto (Nagaraju, 2000). Así, por ejemplo, se conocen 400 mutaciones, mapeadas en 28 grupos de ligamiento o cromosomas, además de existir centenares de razas geográficas y variedades mejoradas genéticamente, no solo con diferencias en caracteres mendelianos, sino también con diferentes características cuantitativas complejas como serían los tiempos de cría, tamaño corporal, tolerancia a enfermedades, etc. (Nagaraju, 1999)

La investigación genética en *B. mori* surgió muy pronto, en torno al año 1900, dadas las buenas características del insecto como modelo para estudios fundamentales. En 1906, Toyama cita ya la utilización de los

principios de vigor híbrido para incrementar el rendimiento y viabilidad del gusano de seda mediante el cruzamiento de distintos genotipos. El ligamiento sexual fue descrito por Tanaka (1916) en *B. mori*, tras su descripción en *Drosophila melanogaster*, y a principios de los años 30, se describieron en esta especie interesantes fenómenos genéticos tales como la herencia materna, la partenogénesis, poliploidogénesis, la inducción de translocaciones cromosómicas por radiación, etc (Tazima, 1964). Ello junto a los 3.000 genotipos existentes dentro de esta especie, hacen del gusano de seda el segundo insecto en importancia de los empleados como modelo para estudios genéticos, tras *D. melanogaster*.

B. mori fue el primer insecto en mostrar la presencia de un patrón de secuencias genéticas repetitivas y no repetitivas intercaladas, típico del genomas de mamíferos (Gage, 1974). La caracterización molecular de las secuencias repetidas ha revelado la presencia de elementos transponibles típicos del genoma de *D. melanogaster*, así como de retrotransposones, comunes en mamíferos.

Existe también un gran número de genes actualmente secuenciados en *B. mori* que codifican proteínas con diversas funciones ya descritas (Nagaraju, 2000) y la glándula de la seda se ha convertido en un importante modelo de estudio para dilucidar los mecanismos de expresión y regulación genética, así como los de diferenciación celular (Hui y Suzuki, 1995). Esto es así dada la bien conocida estructura de esta glándula, con un número concreto de células y un patrón de expresión genética claramente compartimentalizado, ya que cada una de las proteínas de la seda se produce en una región determinada de la misma. Una sola célula de la glándula sericígena puede acumular entre 400.000 y 800.000 genomas haploides por endomitosis, lo cual supone el mayor caso de poliploidía documentado (Nagaraju, 2000).

Respecto a las relaciones filogenéticas entre poblaciones, hay infinitud de trabajos que indagan en la filogenia del gusano de seda empleando por ejemplo las secuencias ITS1 (Mahendran y col., 2006). Otros trabajos describen marcadores microsatélites para identificación de razas concretas (Kim y col., 2010). El genoma de *B. mori* ha sido secuenciado y existe una

base de datos en la red (SilkDB) destinada a compartir los conocimientos genéticos y genómicos acumulados hasta ahora (Wang y col., 2005).

También se ha intentado la transformación genética de *B. mori*. Los primeros intentos en este sentido resultaron fallidos, debido a fenómenos de expresión transitoria (Coulon y col., 1993) o degradación y rápida reorganización de las secuencias a insertar en el genoma (Nagaraju y col., 1996). También se ha empleado como vector de transformación el virus recombinante de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* a tal efecto sin mucha efectividad (Yamao y col., 1999). Finalmente, en 2000 se consiguió por primera vez una transformación genética eficiente y estable (Toshiki y col., 2000). Para ello se utilizó el transposón *piggyBac*, específico de Lepidópteros y procedente de *Trichoplusia ni* (Fraser y col., 1996). La transformación se realizó con una construcción consistente en una fusión del promotor *BmA3* del gen de la actina citoplásmica de *B. mori* y la proteína verde fluorescente, *GFP*. Esta fusión fue flanqueada por las repeticiones terminales invertidas de *piggyBac*. Un plásmido no autónomo codificó la transposasa de *piggyBac*. La construcción fue inyectada en los huevos en fase de preblastodermo de dos razas de *B. mori*. Se comprobó que aproximadamente el 2% de los individuos de la G1 expresaron la GFP. A partir de esta primera transformación eficiente y estable surgieron otros muchos trabajos basados en esta plataforma para expresar proteínas de interés biomédico como proteínas de fusión con los genes implicados en la expresión de la seda: gen de la cadena ligera de la fibroína, de la cadena pesada, de la fibrohexamerina, o de la sericina. Se expresaron proteínas tales como el procolágeno humano tipo III (Tomita y col., 2003), factor de crecimiento humano similar a insulina (hIGF-I) (Zhao y col., 2009), anticuerpos monoclonales de ratón (Iizuka y col., 2009) y seroalbúmina humana (Ogawa y col., 2007). Un concepto interesante fue el propuesto por Hino y col. (2006) que expresaron una proteína de fusión entre la cadena pesada de la fibroína y el factor de crecimiento de fibroblastos humano, lo cual llevaría a la producción por el insecto de una fibroína ya funcionalizada para cultivo celular. La transformación genética de *B. mori* es un área de investigación muy activa en la actualidad debido al interés económico de las proteínas que pueden obtenerse.

Respecto a las enfermedades que afectan a *B. mori*, influyendo negativamente en el proceso de crianza, existe una gran variedad de las mismas. Las cuatro a continuación expuestas son las más frecuentes y pueden implicar infecciones secundarias por multitud de microorganismos que, fácilmente aniquilan toda una población de gusanos en cuestión de días:

- Pebrina, producida por el protozoo *Nosema bombycis*.
- Flacidez, la cual aparece cuando los gusanos son expuestos a condiciones ambientales adversas (altas temperaturas o humedades relativas no adecuadas).
- Amarillez, provocada por el virus de la poliedrosis nuclear específico de algunos lepidópteros.
- Muscardina, cuyo agente patógeno principal es el hongo *Botrytis bassiana*.

En los siguientes apartados de la introducción se explora en mayor medida la importancia histórica de este insecto así como las nuevas aplicaciones no textiles, tanto del insecto en sí mismo, como de la seda que produce.

1.2. ASPECTOS HISTÓRICOS Y ECONÓMICOS DE LA SERICICULTURA

Mucho se ha escrito y conjeturado sobre el origen de la seda y el desarrollo de la sericicultura en la historia de la humanidad, procediendo gran parte del conocimiento acerca de este tema del saber popular, difícilmente contrastable.

Los datos más rigurosos sobre la industria de la seda y su impacto en la economía contemporánea son más ampliamente descritos en la literatura del siglo XX. Existe un gran número de fuentes bibliográficas a consultar, procedentes, por ejemplo, de los archivos de las diferentes estaciones sericícolas europeas, que intentaron evitar infructuosamente, el declive de esta actividad.

En el presente apartado se exponen, de forma general, algunos de los aspectos históricos y económicos más relevantes acerca del origen y desarrollo de la sericicultura a nivel mundial y especialmente en España.

Basándose casi la totalidad del contenido expuesto en la disertación sobre este tema que aparece en el libro "El Gusano de Seda y la Morera" de Gonzalez Marín (2001), salvo en casos en que se indique lo contrario.

1.2.1. Origen y expansión de la sericultura

El origen chino de la sericultura es ampliamente aceptado y la mayoría de autores lo datan en torno al año 2650 a.C., momento en que la emperatriz china Xi-Ling-Shi da a conocer a su pueblo las técnicas de cría de *B. mori* y el procesado de la seda, según citas encontradas en escritos de Confucio.

Existe, no obstante, un libro árabe que hace mención a un envío de telas de seda por parte del Rey de India al Rey de Persia en torno al 3870 a.C., lo cual supondría una antigüedad mucho mayor de esta industria.

Además hay también otros datos que, según la profesora García-Ormaechea, en su conferencia de 2003, "*La Ruta de la Seda*" en la Universidad Complutense de Madrid, dejan claro el origen de la sericultura en el Neolítico Chino, a diferencia del telar y la tela de seda (que no el fieltro) que aparecen en la Edad del Bronce. Así, los primeros restos de hilado y tejido de seda aparecieron en excavaciones de las dinastías Shang (siglos XVIII al XII a.C) y Zhou (XII al III a.C). Por otro lado, ya existe una pieza de fieltro de seda datada en el 2800 a.C. y una escultura de un gusano de seda en jade en torno al 3000 a.C., ambas de origen chino.

El conocimiento de la sericultura se mantuvo en secreto durante 3.000 años debido al deseo de los emperadores de preservar la exclusividad de esta industria en China. En principio, las técnicas de crianza del gusano y el tejido de la seda sólo eran conocidas por la nobleza y posteriormente este privilegio se amplió al pueblo, imponiéndose duros castigos a los sospechosos de divulgar tan preciado legado.

Se atribuye a Nearco, almirante de Alejandro Magno, la introducción de la seda en Europa alrededor del año 50 a.C. a su regreso de un viaje procedente de Asia. Otra leyenda habla de cómo se desveló el secreto de la cría del gusano de seda gracias a una princesa china, prometida a un rey de Khotan, en torno al siglo V d.C. que consiguió sacar huevos de esta especie escondidos en su cabello y, en consecuencia, comenzar la expansión de la sericultura más allá de las fronteras chinas.

Poco a poco, la seda fue perdiendo exclusividad y se pudo extender a más países. El comercio de este tejido adquirió una gran importancia, gracias a las caravanas que cruzaban las rutas del desierto, y se llegó incluso al monopolio esta actividad por parte de los mercaderes persas y sirios, que, a su vez, vendían a bizantinos, griegos y romanos. Se estableció así la Ruta de la Seda (figura 1.4), con el consiguiente estímulo económico de muchos centros comerciales estratégicos y el crecimiento de las grandes ciudades. Lo más importante es que esta "autopista" del comercio se convirtió en una vía de intercambio cultural sin igual, que, por primera vez en la historia, pone en contacto de forma cotidiana al mundo oriental y occidental con el flujo de conocimientos e ideas que ello conllevó.



Figura 1.4. Ilustración mostrando comerciantes a lo largo de la ruta de la seda

La sericultura en Japón parece encontrarse instaurada ya en torno al año 472 d.C., momento en que el emperador Juliak redacta órdenes de siembra y protección de moreras a fin de fomentar el "cultivo de la seda".

No será hasta el año 552 de nuestra Era cuando comience en Europa la producción sericícola. Este hecho se dió gracias al emperador bizantino Justiniano, el cual recibió huevos de gusano en Constantinopla, traídos por dos monjes de la Orden de San Basilio, tras un viaje para predicar la fé cristiana en Asia. Éstos transportaron los huevos ocultos en sus bastones según relata Procopio en su relato *De Bello Gothico IV-17*.

Más difíciles y controvertidas son las explicaciones sobre el momento en que se comercializa la seda y aparece la sericultura en España, siendo

claro, el hecho de que la seda fue conocida antes que la metodología de su producción en nuestro país.

Durante la dominación visigoda entre los siglos V y VIII encontramos numerosos textos que relatan la importación de tejidos de seda de otros países, pero también se hace patente la ignorancia en la metodología de la producción de esta fibra natural. Por ejemplo, en las Etimologías de San Isidoro, que recogen el saber de la época (hacia el año 620) se pueden leer en bastantes ocasiones referencias a la importación de seda llevada a cabo por los habitantes de Seres (de ahí el nombre de la seda, del latín *sericum*). Otras citas dejan ver la ignorancia sobre el modo real de producción de la misma. Se menciona que los gusanos "*bombyces*" son originarios de Seres y producen hilos alrededor de los árboles, así como que "*se vacian hasta que en su interior solo queda aire*" durante la producción de la fibra. Parece ser, por tanto, que el desconocimiento sobre las técnicas sericícolas fue una realidad hasta la invasión de los árabes y su asentamiento en Al-Andalus, y que sólo se comenzaba entonces a tener nociones muy básicas sobre esta actividad.

A partir del año 756, coincidiendo con el comienzo de la dominación árabe, la manufactura de tejidos de seda cobra importancia; relatan los historiadores la confección de bellos mantos reales de seda ya en tiempos de Abd-El-Rahman I. Sin embargo, no se encuentran pruebas de que se diese aún en España la cría del gusano de seda de forma extensiva. Lo cual tiene lógica si pensamos que se trataba de una época de luchas, poco adecuada para la instauración de una nueva actividad económica compleja. Ésta, a su vez, requería de grandes extensiones de morerales, aún no cultivados en España.

Algunos historiadores, afirman que la crianza del gusano de seda es ya bien conocida en la España de los siglos IX y X, justificando este hecho con la existencia de poemas que hablan, por ejemplo, de la alta producción de sericícola del llano de Elvira (Granada). Sin embargo, es entre los siglos XI y XIV cuando se desarrolla la crianza del gusano y la confección de tejidos de seda en España. Durante el reinado de Alfonso VII (1126-1157) se habla de la existencia de unos 8.000 telares en nuestra geografía, destacando las regiones de Almería, Málaga, Murcia, Granada, Sevilla, Jaén, Córdoba, Valencia y Toledo.

Cuando el Papa Clemente V estableció la Santa Sede de Avignon, la manufactura de la seda comienza a extenderse también por Francia, y adquiere, según Jesus De Federico (1940), una gran importancia en Lyon, a pesar de tener muchos detractores esta labor de fomento, que continuó el rey Enrique IV de Francia.

En los siglos XIV y XV se extiende el conocimiento de la sericultura a Inglaterra y América y se intenta aclimatar el cultivo de *B. mori* a las condiciones ambientales de Bélgica, Alemania, algunas regiones rusas y hasta Suecia.

En torno a 1530 según De Federico (1940) había en la provincia de Sevilla unos 16.000 telares que daban trabajo a 130.000 empleados. Toledo, Granada, Valencia, Murcia, Barcelona, Almería, Córdoba y otras provincias también experimentaron este auge en la industria de la seda.

Acontecimientos como la expulsión de los moriscos, emigraciones a América, los privilegios de la Mesta y los abusos de los gremios sederos en la compra de la seda a los productores, entre otros, hacen que desde mediados del siglo XVII comience a oscilar la producción en España. Ésta revive de un notable decaimiento gracias al empeño de reyes como Felipe V, en cuyo reinado se crea la Real Fábrica de la Seda (en Talavera de la Reina), o Carlos III, que incluso llega a eximir a tintoreros y torcedores de la seda del servicio militar.

A modo de ejemplo, para demostrar la importancia que esta industria llegó a tener entre los siglos XIV y XVIII en España, podemos decir que la producción de seda a principios del siglo XVIII ascendió a 12.500.000 kg de capullos, repartidos de la siguiente forma:

- Valencia, 6.000.000 kg.
- Andalucía, 4.000.000 kg.
- Murcia, 2.000.000 kg.
- Castilla, 200.000 kg.
- Aragón, 100.000 kg.
- Cataluña, 50.000 kg
- Resto de España, 50.000 Kg.

1.2.2. La sericicultura durante la historia contemporánea española

La actividad sericícola en la España del siglo XIX se vió negativamente afectada por la Guerra de Independencia y las guerras civiles, pero es a mediados del siglo XIX cuando la industria de la seda en Europa se comienza a tambalear peligrosamente por la aparición de enfermedades propias del gusano, las cuales se tornaron epidemias rápidamente. La "pebrina", producida por el microsporidio *Nosema bombycis*, fue la que afectó más intensamente, pudiendo aniquilar toda una crianza de forma fulminante. Se trata de una enfermedad contagiosa y que se puede transferir a la progenie cuyo origen fue confirmado por Emilio Cornalia en 1856.

Otra enfermedad que se convirtió en una auténtica epidemia fue la "flacidez", la cual ataca al gusano en su quinto estado, siendo la misma aun más grave, puesto que la inversión de tiempo y medios económicos en la cría están ya hechos cuando se manifiesta.

La epidemia de pebrina de los años cincuenta afectó a toda Europa, y se tradujo en una reducción radical y permanente de la producción europea de seda. En Francia, Louis Pasteur se encargó de determinar el origen de la enfermedad, que resultó ser *Nosema bombycis*, pero para cuando se pusieron a punto métodos de profilaxis, en muchas de las áreas sederas fue demasiado tarde. Toda o gran parte del material de propagación estaba ya infectado o en malas condiciones y se habían eliminado grandes extensiones de terreno destinadas a morerales para sustituirlas por otros cultivos, ante un catastrófico abandono de la actividad sericícola. Sin embargo, la cría del gusano de seda, de alguna forma, consiguió sobrevivir en en Murcia y Orihuela. La catástrofe que supuso la epidemia de pebrina llevó a las autoridades correspondientes a tomar conciencia de la necesidad de incorporar nueva tecnología a la producción y sobre todo, de realizar un control sanitario estricto del material de propagación. Por ello, en 1892, la Dirección General de Agricultura, Industria y Comercio, del Ministerio de Fomento, gestionó la instauración de una Estación Sericícola en Murcia. Ésta se organizó según el modelo de la Estación Sericícola de Padua (Italia),

creada en 1871, y que fue la referencia de la tecnología sericícola de Europa, incluso hasta la actualidad.

La Estación Sericícola de Murcia se instaló primeramente en una finca arrendada en la carretera de El Palmar, para posteriormente ser trasladada a su ubicación definitiva en La Alberca de las Torres (ambas pedanías del municipio de Murcia). Este traslado se hizo efectivo en 1912, contando la nueva ubicación con unas 11 ha de terreno (figura 1.5).

La misión de la Estación Sericícola de Murcia, se podría dividir en 3 grandes bloques de actuación (González, 2001):

- Enseñanza y divulgación de nuevas técnicas de cría y prevención de enfermedades (figura 1.6).
- Servicios de sericultura, por ejemplo: donación de huevos y plantas de morera a los criadores, préstamo de incubadoras para avivar huevos, servicios de conservación de los mismos, ahogado y secado de capullos, etc.
- Aplicación de la Ley de Protección de la Industria Sedera (inscripción de la semilla producida, pesado de capullos, pago a cosecheros, etc).



Figura 1.5. Fotografía tomada en la Estación Sericícola de La Alberca (Murcia), en funcionamiento como tal desde 1912 a 1976, actual IMIDA (Fuente: González Marín, 2001).

Se llegaron a establecer incluso los llamados "cotos de semillación", que no eran sino lugares específicos destinados a la producción de huevos para su distribución posterior entre los cosecheros, evitando la consanguinidad que se podría dar si se dejaba esta labor a los mismos (figura 1.7).

Al final de toda esta compleja y organizada cadena de producción se encontraban 3 empresas que compraban los capullos de seda nacionales y se encargaban de su hilatura. Además, también se realizaban pruebas en la Estación Sericícola, con máquinas de hilar propias, a fin de determinar la calidad de la fibra producida. Las empresas en cuestión eran: "Sedas Orihuela S.A.", "L. Payen y Cia" y "Lombard S.A."

A modo demostrativo del renacimiento de la industria sericícola murciana en los primeros años de trabajo de esta nueva institución, a continuación, se exponen algunos datos sobre producción de capullos de 1891 a 1910 (tabla 1.1).

Año	Producción (kg)
1891	482.000
1892	495.000
1893	520.000
1900	600.000
1907	635.000
1910	886.000

Tabla 1.1. Producción de capullos de seda durante los primeros años de funcionamiento de la Estación Sericícola de Murcia. (Fuente: González Marín, 2001).

Sin embargo la crisis mundial de 1929 supone un duro golpe para la industria sedera española. Japón, máximo productor de seda a nivel mundial, producía por entonces 400.000.000 kg de capullos y encontraba en América del Norte su mercado principal. Este mercado demandaba unos 240.000.000 kg de los mismos, pero debido a la crisis, América dejó de comprar la seda japonesa y el mercado europeo se vió invadido y saturado por la misma. Bajaron los precios a cifras tan ridículas que la industria de la seda en España no pudo competir y fue condenada a una fase de recesión inevitable por el abandono de la actividad. La caída del sector hizo que

disminuyese la producción de 1.189.000 kg de capullos documentados en 1925 a 367.000 kg en 1934.

Incluso la creación por decreto del Fomento de la Sericicultura Nacional no pudo evitar que se continuase reduciendo la producción y quedó totalmente paralizada durante la Guerra Civil. La actividad se retomó tras ésta, y en 1939, gracias a una gran labor por parte de la Estación Sericícola, la producción fue de 129.000 kg y aumentó paulatinamente de nuevo.



Figura 1.6. Ilustración de las labores formativas en la Estación Sericícola de La Alberca (1944). (Fuente: González Marín, 2001).

El Fomento de la Sericicultura Nacional pasó en 1941 a incorporarse al Instituto de la Producción de Fibras Textiles denominándose ahora Servicio de Sericicultura. Las medidas aplicadas promovieron un lento resurgir de la industria de la seda, sumamente dañada por la guerra y la competencia japonesa. Éste se hizo patente en un aumento de la producción hasta los 628.346 kg de capullo fresco en 1956.

Sin embargo, en 1967 se suprime el Servicio de Sericicultura y la actividad queda desprotegida, siendo eventualmente atendida por el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas en el aspecto de desarrollo y apoyo tecnológico y económicamente por el Fondo de Ordenación y Regulación de Producciones y Precios Agrarios (F.O.R.P.P.A). Así, desde 1967 hasta 1975 se produce un continuo descenso en la producción de capullos (tabla 1.2) que termina por hacer desaparecer este recurso económico en España.

Año	Producción (kg)
1968	344.727
1970	293.490
1972	303.779
1974	152.258
1976	31.960

Tabla 1.2. Producción de capullos de seda durante los últimos años de funcionamiento de la Estación Sericícola de Murcia. (Fuente: González Marín, 2001).

A partir de 1976 las instalaciones de la Estación Sericícola de la Alberca se convirtieron en edificios y parcelas de investigación agraria en los campos de la horticultura, fruticultura y ganadería que fueron adscritas al CRIDA 06, cuya sede estaba en Moncada (Valencia) y dentro de la red de centros regionales (CRIDAS) del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Posteriormente, con el desarrollo de las autonomías, pasó a denominarse Centro de Investigación y Desarrollo Agrario (CIDA), adscrito a la Consejería de Agricultura de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. En 2002, el Instituto se dio una nueva organización como Organismo Autónomo adscrito a la misma Consejería, con el nombre de Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA).



Figura 1.7. Grupos de criadores efectuando la inscripción de los huevos de gusano de seda. (Fuente: González Marín, 2001).

La cría de los gusanos de seda quedó relegada al ámbito doméstico, como mascotas, o empleándolos como soporte didáctico para explicar la metamorfosis de lepidópteros en colegios. Dicha actividad dejó de tener el menor valor económico. Sin embargo, a partir de los años 90, las crecientes publicaciones relacionadas con la aplicación de *B. mori* y la seda en biotecnología y biomedicina han despertado un gran interés por la sericultura en la comunidad científica. Si bien el nuevo enfoque que se le está dando a la misma es muy distinto al tradicional, éste supone la apertura de una gama de nuevas aplicaciones de alto valor añadido. Recogiendo este renovado interés, y motivado por la larga tradición del Instituto en el campo de la sericultura, el Equipo de Biotecnología del IMIDA inició en 2006 una línea de trabajo dedicada al desarrollo de estas aplicaciones del gusano de seda a la biotecnología y la biomedicina. El desarrollo de esta línea ha llevado a poner a punto las tecnologías existentes en el campo y ha culminado en la creación en el IMIDA de un nuevo laboratorio específico para la investigación en seda, el "Centro de I+D para Aplicaciones del Gusano de Seda en Biotecnología y Biomedicina" (figura 1.8). Este laboratorio ha sido cofinanciado (80%) por fondos FEDER del Plan Operativo 2007-2013 de la Unión Europea.



Figura 1.8. Fotografía efectuada durante las labores de construcción del "Centro de I+D para Aplicaciones del Gusano de Seda en Biotecnología y Biomedicina" (Murcia, 2012).

1.3. BIOPRODUCTOS DERIVADOS DEL GUSANO DE SEDA

El gusano de seda fue domesticado con el objetivo de producir fibras para aplicaciones textiles, cuyas propiedades son únicas y diferentes a las procedentes de otras fuentes. Pero aparte de esta aplicación básica, la estrecha y larga convivencia con el insecto ha llevado al desarrollo de otros aprovechamientos del mismo, formando parte de la tradición cultural asiática. En este aspecto, podemos citar el uso como alimento de las crisálidas (asadas en China, en conserva en Corea). También existen numerosas aplicaciones en el campo de la medicina tradicional asiática, como por ejemplo, infusiones de larvas de *B. mori* colonizadas por el hongo *Cordyceps sinensis* y secas, a la que se le atribuyen propiedades reconstituyentes.

Pero existe también una nueva gama de aplicaciones para salud humana, derivadas de investigaciones llevadas a cabo a partir de la década de los años 80, mediante nuevas técnicas analíticas y fruto del interés por las propiedades de los productos naturales. En este sentido, el gusano de seda genera una serie de bioproductos cuyo aprovechamiento tiene un valor económico potencial de gran interés. Como bioproductos del gusano, los más directos en su aplicación práctica son, lógicamente, la seda del capullo y la crisálida de su interior, que son el resultado final del proceso de cría. A su vez, la seda se compone de sericina y fibroína. Ésta tiene una importante aplicación como biomaterial, mientras que la sericina tiene utilidad en el campo de la cosmética, como lo tiene también la fracción lipídica de la crisálida. Pero también la larva del insecto tiene aplicación como biorreactor para la producción de proteína recombinante con vectores baculovirus, como se expondrá más adelante.

1.3.1. Naturaleza química de la seda

La seda es un nombre genérico que engloba un grupo de proteínas poliméricas naturales, de carácter fibroso e insolubles en agua. Son producidas por un amplia variedad de insectos y arácnidos que exhiben diversas estructuras y funciones. En el caso de la seda de araña, la función es la de atrapar presas, mientras que la seda de los insectos lepidópteros

tiene una función protectora durante el proceso de pupación. La seda de las arañas presenta propiedades muy interesantes y es objeto de una activa investigación. Sin embargo, la seda por antonomasia es la producida por *B. mori*, la única con un aprovechamiento económico de gran tradición, y a ella nos referiremos siempre en esta revisión.

La seda, tal como es segregada por el insecto en su forma natural, es un filamento continuo de longitud variable, que puede llegar hasta 1,5 km. Tiene un diámetro comprendido entre 10 y 25 μm y esta consistida por dos proteínas: fibroína y sericina. La fibroína es una proteína de carácter fibroso, formando un polímero lineal que constituye el núcleo de la fibra y supone el 70% del peso del capullo. Ésta constituye propiamente la fibra de seda que se aprovecha con fines textiles y también para fabricar biomateriales. Pero un monofilamento de fibroína no podría formar una estructura cerrada y compacta. Por ello, la fibra de fibroína está recubierta en su parte externa por otra proteína, la sericina, de conformación globular y propiedades adhesivas, que permite que la fibra se conforme en una estructura sólida, hueca y mecánicamente resistente. A su vez, la fibroína está compuesta por dos componentes proteicos: una cadena pesada de 390 kDa y una cadena ligera, de 26 kDa, presentes en una proporción 1:1 y que están unidas por un puente disulfuro. El puente se establece entre la cisteína c20 (el aminoácido número 20 del extremo carboxilo terminal de la cadena pesada) y la cisteína c172 de la cadena ligera. A su vez, 6 de estos bloques se mantienen unidos a través de su interacción con la glicoproteína P25 (fibrohexamerina), de 25 kDa (Wang y col., 2006). Cada una de estas proteínas está codificada por un gen.

Los aminoácidos predominantes en la composición de la fibroína son la glicina (43%), alanina (30%) y serina (12%). La cadena pesada contiene 12 dominios de motivos aminoacídicos repetidos, que constituyen la región cristalina de la fibra. Estas regiones cristalinas alternan con otras secuencias primarias no repetitivas, y por tanto, menos organizadas. Los dominios cristalinos están compuestos por subdominios de hexapéptidos tales como GAGAGS, GAGAGY, GAGAGA o GAGYGA, donde G es glicina, A es alanina, S es serina e Y es tirosina (Murphy y Kaplan, 2009). Las regiones no cristalinas de la cadena pesada de fibroína tienen entre 42 y 44 aminoácidos

que no se encuentran en los dominios repetidos. En conjunto, la secuencia primaria de la fibroína comprende un co-bloque polimérico que combina regiones cristalinas hidrófobas con otras hidrófilas de plegamiento al azar. Esta estructura molecular, común con variaciones a numerosas sedas, es la que proporciona al material una combinación única de resistencia mecánica y elasticidad (figura 1.9).

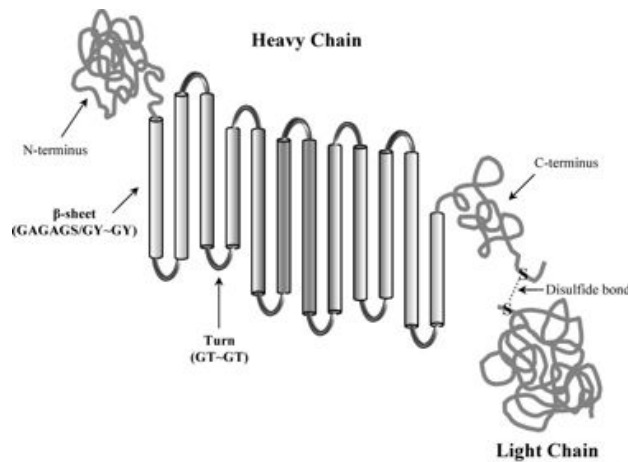


Figura 1.9. Esquema ilustrativo de la organización molecular de la fibroína (Murphy y Kaplan, 2009).

Una de las propiedades más notables de la seda es la existencia de varios estados moleculares de la misma y estados de transición entre ellos. Antes de ser segregada por el insecto, la fibroína es producida por las células que cubren la parte interior de las secciones distal y medial de la glándula sericígena. En el interior de la glándula, la fibroína presenta una conformación denominada Seda I. Es un estado soluble y micelar, con un contenido en agua del 30% (Sprague, 1975). Cuando el insecto comienza el proceso de deposición de la seda para la fabricación del capullo, la fibroína va avanzando a través de la glándula sericígena y en la parte final de ésta, se recubre con la sericina que es producida por las células situadas en dicho punto. El proceso de secreción del hilo va acompañado de una pérdida de agua y una tensión mecánica inducida por el movimiento de la cabeza de la larva. Esta desecación y tensión inducen un cambio de fase en la solución metaestable de fibroína globular que pasa a una configuración de estructura secundaria en lámina beta, conocida como seda II, que es la que se encuentra en la fibra de seda una vez que el insecto la "hila" en el capullo.

Esta estructura secundaria de la fibroína es arquetípica y fue la primera proteína donde se caracterizó (Marsh y col., 1955). La cadena polipeptídica se encuentra extendida en forma de zigzag, formando hebras beta, que se organizan a su vez en láminas beta (u hojas plegadas) mantenidas por puentes de hidrógeno ($N-H \cdots O=C$) entre residuos enfrentados. Las hebras beta antiparalelas se disponen formando esta lámina beta de manera que los radicales hidrógeno (de las glicinas) y metilo (de las alaninas) se alternan a un lado y otro de la hojas plegadas y, dado su pequeño volumen, permiten el apilamiento de las mismas en bloques que quedan estabilizados por fuerzas de Van der Waals entre ambos grupos.

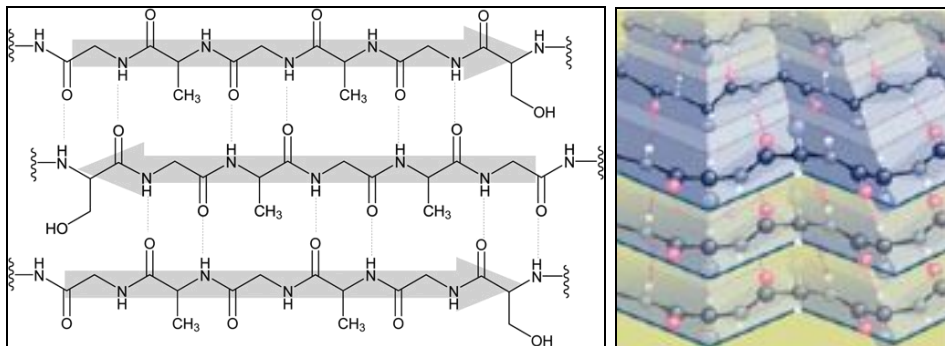


Figura 1.10. Esquema de la organización de tres hebras beta antiparalelas para formar una lámina beta de fibroína (izquierda). Las repeticiones de seis aminoácidos permanecen unidas por puentes de hidrógeno. (Murphy y Kaplan, 2009). Apilamiento de láminas beta (derecha). (Elices, 2011).

Estos enlaces, dentro y entre las cadenas, se forman entre aminoácidos perpendiculares a lo ejes de las cadenas y las fibras. Esta configuración molecular es química y termodinámicamente muy estable. La seda II no contiene agua y es insoluble en la mayoría de los disolventes.

El disolvente más habitual de la fibroína nativa es el bromuro de litio en solución acuosa 9M, y en caliente. Otros disolventes comunmente empleados son el cloruro cálcico disuelto en agua, o una mezcla de etanol, cloruro cálcico y agua. Por otro lado, hay otros disolventes como el metil tiocianato que son menos utilizados.

La fibroína disuelta en agua es el punto de partida para la fabricación de la mayoría de los biomateriales. Para su conservación se puede eliminar el agua mediante liofilización, obteniéndose lo que se conoce como "fibroína regenerada". Ésta mantiene las propiedades de solubilidad y puede

disolverse en agua y en otros disolventes tales como el ácido fórmico y el hexafluoroisopropanol (HFIP) que son incapaces de disolver la fibroína nativa. La fibroína regenerada tiene menor resistencia mecánica que la fibroína nativa, debido a que los enlaces que forman la estructura en lámina beta se rompen en el proceso de disolución. Por ello, los biomateriales consistentes en seda regenerada han de ser sometidos a un tratamiento que incremente el contenido en estructura de lámina beta para insolubilizarlos e incrementar su resistencia. Este proceso se conoce como "cristalización" de la fibroína. El tratamiento más utilizado para incrementar el porcentaje de lámina beta es la inmersión del material en una solución de metanol. La inmersión en metanol hace que el material resultante sea más quebradizo. Se puede utilizar un tratamiento menos agresivo que consiste en exponer el material de seda regenerada a vapores de metanol en caliente. Un procedimiento alternativo de cristalización se basa en tratar el material con vapor de agua en vacío. El porcentaje de lámina beta así obtenido es menor, lo que implica una menor resistencia mecánica que en el caso del tratamiento con metanol. Sin embargo, las propiedades del material resultante en términos de elasticidad, transparencia y biocompatibilidad son mejores (Min y col., 2006).

Tanto en el procesamiento textil como en la fabricación de biomateriales, la sericina es separada de la fibroína, en el proceso conocido como "desgomado". Este proceso se realiza en solución acuosa en caliente, dado que la sericina es hidrosoluble. En las máquinas de hilar para la industria textil, el desgomado se realiza poniendo los capullos en cazos con agua en ebullición, mientras que para la fabricación de biomateriales, se incuban los trozos de capullo en una solución de carbonato sódico 0,01N y se ponen en ebullición durante 1 hora. Se obtiene así una solución acuosa de sericina de un 2%, que habitualmente se desecha, aunque tiene numerosas aplicaciones que se describirán más adelante.

A diferencia de la fibroína, la sericina es en realidad un grupo de proteínas de diferentes pesos moleculares y composición aminoacídica, predominantemente hidrofílicas. Estas proteínas son secretadas por la glándula sericígena media, envolviendo la fibroína. No hay un consenso acerca del tamaño exacto y composición de este complejo proteico. Cuando la sericina se extrae directamente de la glándula sericígena, se detectan

tres proteínas grandes (130, 210 y 220 kDa) en una mezcla que va de 20 a 220 kDa (Sprague, 1975). Con posterioridad, Takasu y col. (2002) fraccionaron las proteínas de la sericina según su solubilidad en etanol y las designaron como Sericina A (250 kDa), Sericina M (400 kDa) y Sericina P (150 kDa), cada una procedente de puntos diferentes de la glándula sericígena. Los polipéptidos se componen sobre todo de serina (40%), así como de glicina (16%) y ácido aspártico (Kundu y col., 2008). La estructura secundaria de la sericina se encuentra básicamente en estado desplegado, con un 35% de lámina beta y 63% de plegamiento al azar sin contenido de estructura en hélice alfa. La lámina beta no se forma como consecuencia de la presencia de dominios repetidos similares a los de la fibroína, sino de puentes de hidrógeno en las zonas ricas en aminoácidos polares dotadas de abundantes repeticiones de serina. Como en el caso de la fibroína, se puede incrementar el contenido en lámina beta mediante reacción con disolventes orgánicos como el etanol. Las proteínas de la sericina están codificadas por tres genes: *Ser1*, *Ser2*, y *Ser3*. El más conocido es el *Ser1*, de 24 kb, que ha sido parcialmente clonado y secuenciado y que codifica 4 mRNAs. Los genes que codifican la expresión de sericina están regulados espacial y temporalmente, según pautas de expresión bastante complejas que han sido revisadas por Kundu y col. (2008).

Además de la fracción proteica del capullo, formada por fibroína y sericina, hay que mencionar un tercer componente no proteico, constituido por gran variedad de carotenoides y flavonoides. Estos compuestos tienen un papel protector de los capullos frente a radiación solar y le prestan su color característico a la seda de las diferentes razas de gusanos. Éstos tienen un interés potencial como activos cosméticos. A continuación se exponen los aprovechamientos potenciales de estos tres bioproductos derivados del capullo de *B. mori*.

1.3.1.1. Aplicaciones en biomedicina de la fibroína

El aprovechamiento más importante de la fibroína en biomedicina es, con diferencia, su uso como biomaterial para la fabricación de armazones para crecimiento celular (*scaffolds*). Pero además, sus propiedades la hacen adecuada para su aplicación directa en solución acuosa como componente

terapéutico en diversos modelos, y más concretamente en dos: cicatrización y diabetes.

La observación del efecto positivo de la fibroína en la cicatrización de heridas comenzó por la constatación de que la adición de una solución de fibroína al medio de cultivo en la proporción de 125 $\mu\text{g/ml}$ producía un incremento de la proliferación de fibroblastos de piel del 150% frente al control sin fibroína (Tsubouchi y col., 2003). Estudios *in vivo* posteriores, realizados en heridas cutáneas de perro tratadas con polvo de fibroína, verificaron que con la adición de la misma se observa a nivel histológico una mejora significativa de la cicatrización, en términos de una superior reepitelización y formación de colágeno y fibras elásticas. No se observa ninguna citotoxicidad en los puntos de inyección de la fibroína, lo que es indicativo de su buena biocompatibilidad (Kimura y col., 2007). Este efecto cicatrizante de la fibroína ha llevado al desarrollo de biomateriales tales como *films*, esponjas y mallas específicamente diseñadas para tratar problemas de cicatrización, que serán descritos más adelante (Fini y col., 2005; Roh y col., 2006; Schneider y col., 2009; Sugihara y col., 2000). Algunos trabajos han estado dirigidos a dilucidar el mecanismo molecular a través del cual se ejerce el efecto cicatrizante de la fibroína.

Yamada y col. (2004) tras fraccionar la fibroína en péptidos mediante digestión con quimotripsina determinan que hay dos secuencias situadas en la región N-terminal de la molécula que parecen ser especialmente activas en la inducción de crecimiento de fibroblastos: VITDSDGNE y NINDFDED. Pero es el trabajo de Martínez-Mora y col. (2012) el que profundiza más en la explicación del mecanismo implicado, al demostrar que la fibroína en solución acuosa (y también la sericina) inducen la expresión y la fosforilación de la proteína c-Jun, implicada en la migración de los queratinocitos en el proceso de cierre de heridas cutáneas. Se deduce que las proteínas de la seda tienen un efecto de señalización en el programa de cicatrización cutánea.

En cuanto al efecto de la fibroína en el tratamiento de la diabetes, el trabajo de Park y col. (2011) describen el efecto protector de la misma frente a la apoptosis inducida en una línea de células beta pancreáticas (HIT-T15) por exposición a elevados niveles de glucosa. Se observa que la adición al medio de una solución de 50 mg/ml de fibroína consigue rescatar

la viabilidad del 50% de las células. En cuanto al mecanismo de este efecto positivo, los autores lo atribuyen a una disminución de las especies reactivas de oxígeno (ROS), y a la inducción de la expresión de IGF-1 (*Insulin Growth Factor-1*). En esta línea, Kim y col. (2011) identifican un hexapéptido de la secuencia de aminoácidos repetidos de la fibroína que tiene un efecto positivo en el transporte de glucosa y en el metabolismo lipídico de adipocitos de la línea celular 3T3-L1. Este hexapéptido, GAGVGY (Gly-Ala-Gly-Val-Gly-Tyr), una vez sintetizado y administrado al cultivo celular, incrementa la captación de glucosa a través de la inducción de la expresión de GLUT1 y translocación de GLUT4.

El efecto positivo de los péptidos de las secuencias repetidas de la fibroína se manifiesta también *in vivo*. Tal como demuestran Young y col. (2010), el suministro oral de hidrolizados de fibroína (mediante la acción de proteasas) a ratones C57BL/KsJ-db/db, a la dosis de 0,2 g/kg produce una reducción del 60% en el nivel de glucosa en plasma a las 4 semanas de tratamiento, así como en el nivel de colesterol, LDL y el índice aterogénico.

De la breve descripción realizada, se deduce que la fibroína y los péptidos derivados de la misma, tienen un gran potencial terapéutico ante diversas situaciones, aun cuando el análisis de este potencial no ha llegado todavía a la fase de pruebas clínicas.

1.3.1.2. Aplicaciones en biomedicina de la sericina

La sericina ha sido considerada habitualmente un subproducto de la industria textil. Dada su naturaleza adhesiva, su presencia en las máquinas de hilar seda es un inconveniente para su adecuado funcionamiento. También se considera perjudicial su presencia en el proceso de fabricación de biomateriales, dado que algunas reacciones alérgicas producidas por suturas de seda se han atribuido a la presencia de sericina en las mismas (revisado por Altman y col., 2003). Sin embargo, a pesar de esta baja consideración en comparación con la fibroína, la sericina ha mostrado recientemente una serie de propiedades biológicas muy variadas y sorprendentes que requieren una evaluación más cuidadosa de esta proteína.

La aplicación más antigua y difundida de la sericina es como agente activo en el campo de la cosmética. En principio se valoraron sus buenas propiedades hidratantes, atribuidas a su alto contenido en serina (Voegeli y col., 1993). Con el tiempo se han desarrollado también usos como acondicionador para el cuidado capilar, uñas y filtro solar. No menos de 12 empresas de cosmética a nivel mundial la incorporan en sus productos, y existen además numerosas patentes que protegen su uso. Estas aplicaciones han sido revisadas por Kundu y col. (2008).

En el campo más estrictamente biomédico, la aplicación más interesante de la sericina es como antioxidante y antitumoral. Se ha demostrado que la sericina inhibe significativamente la peroxidación lipídica y la actividad enzimática de la tirosinasa (Kato y col., 1998). Este efecto inhibidor de tirosinasa, es confirmado posteriormente en un trabajo de Aramwit y col. (2010).

El notable efecto antioxidante de la sericina se atribuye a su alto contenido (40%) en aminoácidos con grupos hidroxilo (serina y treonina), que ejercerían un efecto quelante de elementos traza, tales como el cobre y el hierro (Kato y col., 1998). La sericina tiene un efecto protector contra los tumores inducidos por la exposición a rayos UVB en piel de ratón (Zhaorigetu y col., 2003a). Este efecto se detecta a través de la reducción significativa de varios marcadores, entre ellos la expresión de COX-2, tras una aplicación tópica de 5 mg sericina por ratón, diariamente durante una semana. Esta aplicación tópica de sericina también protege del efecto tumorigénico del DMBA-TPA en piel de ratón, a través de una acción antioxidante y antiinflamatoria que se detecta en la reducción de la expresión de TNF- α (Zhaorigetu y col., 2003b). El mismo grupo ha descrito también cómo una dieta de sericina reduce la oncogénesis inducida en colon de ratón tras la aplicación de 1,2-dimethylhydrazina (Zhaorigetu y col., 2001) atribuyendo este efecto asimismo a una acción antioxidante de la sericina.

El efecto antitumoral en colon de la sericina ha sido confirmado recientemente desde otra aproximación. Kaewkorn y col. (2012), describen el efecto de la sericina en la proliferación y apoptosis de células de colon. La sericina disminuyó la viabilidad de células de la línea SW480 de cáncer colorectal humano, así como de células FHC de la mucosa de colon normal.

Se comprueba cómo el efecto antiproliferativo de la sericina en la línea SW480 va asociado a una apoptosis celular a través de una activación de caspasa-3 y una disminución de la activación de Bcl-2.

La sericina tiene también un cierto efecto cicatrizante. Aramwit y Sangcakul (2007) realizan un ensayo *in vivo* en rata, generando heridas profundas en el dorso y aplicando tópicamente una crema base con un contenido del 8% de sericina. El tiempo necesario para alcanzar una cicatrización del 90% se logra en 11 días con la aplicación de crema con sericina, frente a los 15 días necesarios en el control. Por otra parte, la observación histológica revela una significativa reducción de la ulceración y la inflamación con la adición de sericina. También se observa un efecto cicatrizante en un modelo de herida en el epitelio corneal de rata (Nagai y col., 2009). Tras una abrasión mecánica de dicho epitelio, se observa que la adición de un colirio con un 10% de sericina consigue una cicatrización total de la lesión en 28 horas frente a las 36 horas necesarias en el tratamiento control con solución salina. Los autores atribuyen el efecto a una mejora de la proliferación y adhesión de las células epiteliales promovidas por la sericina. También sugieren una mejora en la migración de las células en el cierre de la lesión. Esta hipótesis ha sido confirmada por un trabajo posterior de Martínez-Mora y col. (2012), en el que se comprueba que la sericina, al igual que la fibroína, estimula la expresión y fosforilación de la proteína c-Jun, implicada en la migración celular en el cierre de heridas.

Además de los efectos descritos, que pueden desembocar en un aplicación terapéutica, la sericina ha mostrado un interesante efecto positivo como aditivo a medios de cultivo celulares. Cuando se añade sericina (0,1%) al cultivo de líneas celulares de mamífero, tales como el hibridoma murino 2E3-O, el hepatoblastoma humano HepG2, la humana epitelial HeLa, y la humana embrional de riñón, se observa una aceleración en la tasa de proliferación de todos los tipos celulares (Terada y col., 2005).

Se puede utilizar también en cultivos de islotes pancreáticos de rata en sustitución del suero fetal bovino (SFB) (Morikawa y col., 2009; Ogawa y col., 2004), así como en la criopreservación de los mismos (Ohnishi y col., 2012). Se comprueba también que la sericina y el SFB, suplemento ampliamente utilizado en medios libres de suero, tienen el mismo efecto en

la proliferación de hibridomas. Por tanto, la sericina es un excelente sustituto del SFB, que puede actuar de la misma forma y suprime el riesgo de contaminación biológica asociado a los medios de cultivo con componentes de origen animal. Toda la evidencia anterior ha llevado al desarrollo de un producto comercial, "Pure Sericin", (Wako Chemicals, 2005), comercializado como componente de medios de cultivo y de criopreservación de numerosos tipos de líneas celulares.

Aparte de todas estas aplicaciones, existen otras relacionadas con la fabricación de *films* y estructuras de soporte celular, de sericina pura o combinada con otros biomateriales, así como la fabricación de bioconjugados para la liberación de fármacos. En este sentido es interesante el trabajo de Zhan y col. (2006b) en el que describen la fabricación de un bioconjugado de nanopartículas de sericina con insulina. Los resultados en suero humano *in vitro* indican que la vida media de este conjugado es 2,7 veces superior a la de la insulina no conjugada. Una revisión completa y exhaustiva de todas las aplicaciones biomédicas y biotecnológicas de la sericina no descritas aquí, puede encontrarse en los trabajos de Padamwar y Pawar (2004), Zhang (2002) y sobre todo en Kundu y col (2008).

1.3.1.3. Aplicaciones en biomedicina de los flavonoides y carotenoides de la seda

Además de sus dos componentes proteicos ya descritos, la seda acumula otra serie de compuestos en cantidad muy reducida, pero que tienen también un efecto biológico. Estos compuestos consisten básicamente en carotenoides, de color amarillo y solubles en etanol, y flavonoides, de color verdoso y solubles en agua (Tamura y col., 2002). Estos compuestos tienen un papel en la determinación de la coloración del capullo, con una función protectora frente a la radiación solar del mismo. Se han identificado hasta 15 genes implicados en la regulación de los pigmentos que determinan el color, de los cuales se ha clonado el que aparece como más importante, el gen *Y* (*Yellow blood gene*) (Sakudoh y col., 2007). La proteína expresada por este gen es la *CBP* (*Carotenoid-binding protein*). En cuanto al uso práctico de estos compuestos, Prommuak (2008) optimiza varios protocolos de extracción a partir del subproducto de

seda que producen las empresas de hilaturas. Mediante extracción con etanol a 80° durante 2 horas consiguen una cantidad de 0,7 mg/gramo de materia seca, y mediante extracción con agua subcrítica, obtienen 5,1 mg/gramo de materia seca de flavonoides. En la fibroína se localizan un 60% de los carotenoides y un 70% de los flavonoides. También comprueban que estos productos tienen un efecto antioxidante. Mediante el protocolo de reducción de ABTS, miden una concentración de 50% de inhibición comprendida entre 15,6 y 23,3 $\mu\text{g/ml}$.

En cuanto a la naturaleza de los flavonoides presentes en la seda, la mayoría son derivados glucosilados de la quercetina. Tamura y col. (2002) detectan la presencia de quercetina 5,4'-di-O- β -D-glucopiranosido y quercetina 5,7,4'-tri-O- β -D-glucopiranosido, junto con la más frecuente quercetina 5-O- β -D-glucopiranosido. Ninguno de estos flavonoides se encuentran en las hojas de la morera, por lo que son producidos por el metabolismo del propio insecto. Hirayama y col. (2006), detectan dos flavonoides que contienen una fracción con L-prolina, y que denominan prolinalina A y prolinalina B. Como en el caso anterior, son metabolitos que no se encuentran en la hoja de morera y además, son los primeros encontrados de forma natural con una fracción aminoacídica. El hecho de que el metabolismo del insecto pueda sintetizar flavonoides diferentes a los que están presentes en su dieta, confiriéndoles estructuras y posiblemente, propiedades diferentes, abre un interesante campo de aplicación de *B. mori* como biorreactor. Profundizando en el desarrollo de esta idea, Hirayama y col. (2007), alimentan larvas del insecto con quercetina y analizan las especies de quercetina presentes en la seda. Como especie predominante tras la dieta encuentran la quercetina 5-O-glucósido como predominante en el intestino y quercetina 5,4'-di-O-glucósido en la hemolinfa y glándulas sericígenas. La enzima UDP-glucosiltransferasa (UGT) intestinal podría transferir glucosa a los grupos hidroxilo de la quercetina. Los flavonoides 5-O-glucosilados retienen la actividad biológica en el insecto, dado que la actividad antirradicales libres de los diversos tejidos del insecto se incrementan tras la administración oral de la quercetina. De la exposición anterior se deduce que la cantidad de flavonoides y carotenoides en la seda es demasiado reducida como para constituir una fuente rentable de los

mismos. Sin embargo, la posibilidad de modificarlos a través del metabolismo del insecto y de que sean parte integrante de los biomateriales de fibroína indican que el desarrollo de estos bioproductos podría llevar a una aplicación biomédica viable en el futuro.

1.3.2. Crisálidas

La crisálida que se encuentra dentro del capullo una vez que el insecto ha terminado de formarlo y entra en la fase de pupación, es desechada en el aprovechamiento textil de la seda. De hecho, es necesario matarla todavía dentro del capullo mediante un tratamiento térmico para evitar que su salida corte el hilo continuo de seda e impida su hilatura. Para el aprovechamiento de la seda como fuente de biomateriales, el capullo se abre manualmente y la crisálida se desecha. Sin embargo, la crisálida tiene aplicaciones interesantes en la medicina tradicional asiática que merecen consideración. El uso más directo de la pupa desechada de la industria de la hilatura es la alimentación de animales domésticos, dado el elevado contenido proteico de aquella. Hay que mencionar también que la crisálida se emplea en alimentación humana en China y en Corea, pudiendo servirse frita en aceite, hervida, en polvo o enlatada. Sin embargo, este uso no es recomendable en general, por cuanto se han estimado hasta 1.000 casos anuales en China de choque anafiláctico desencadenado por una alergia a las proteínas ingeridas de la pupa (Ji y col., 2008).

De la pupa se pueden obtener básicamente dos tipos de bioproductos, que corresponden a su fracción lipídica y a su fracción acuosa. El bioproducto más conocido es el aceite de crisálida. La fracción lipídica llega al 25% del peso de la misma y puede extraerse mediante hexano (Kwon y col., 2012) o mediante la tecnología de dióxido de carbono supercrítico (Wei y col., 2009). El perfil de la composición de la fracción lipídica, según el análisis de Kwon y col. (2012), se caracteriza por un elevado contenido (41,6%) en ácido α -linolénico, que es un ácido graso omega-3 del que se citan efectos positivos en salud cardiovascular y neuroprotección. El resto de ácidos grasos son el oleico (19,9%), palmítico (19,7%), esteárico (8,6%), linoleico (7,4%), palmitoleico (2,5%) y eicosapentaenoico (0,3%). Los lípidos en general constituyen un componente de productos cosméticos. A la aplicación tópica de este aceite, se le atribuyen resultados positivos en

el cuidado de la piel, y en base a ello, se realiza un cierto aprovechamiento industrial del mismo. En la Región de Murcia, la empresa Crismur comercializa una gama de productos cosméticos que incorporan como activo fundamental el aceite extraído de la crisálida de *B. mori* (marca Serumdal).

Hay otro uso del extracto de crisálida que es propio exclusivamente de la medicina popular coreana. En este país se comercializa en herbolarios, con el nombre de "Nuegra" un preparado tradicional de plantas que incluye un extracto de crisálida macho y que se recomienda como tónico general y como terapia para aliviar los síntomas de la disfunción eréctil (Kim y col., 2002). Con posterioridad, un grupo de investigación coreano demostró que en la crisálida se encuentra un compuesto, la metil adenosina, que posee propiedades como vasodilatador e inhibidor de fosfodiesterasas, lo que explicaría el efecto positivo del extracto de crisálida frente a la disfunción eréctil (Young y col., 2008).

1.4. UTILIZACIÓN DE LA FIBROÍNA DE SEDA COMO BIOMATERIAL

La utilización de la seda como material de sutura en cirugía data de varios siglos. En este sentido, la seda tiene una amplia tradición como biomaterial en una aplicación muy delimitada. Sin embargo, el gran interés que ha despertado la seda como biomaterial ha surgido en la presente década. En el año 1998, Thomson y col. describieron la técnica para derivar células troncales embrionarias a partir de blastocistos humanos. A este trabajo siguieron otros muchos, dando forma al paradigma de la Medicina Regenerativa y la Ingeniería de Tejidos: Las células troncales son pluripotentes y se pueden diferenciar de forma controlada a tipos celulares específicos. Si estas células se siembran en soportes adecuados (*scaffolds*) y se tratan con factores de crecimiento específicos del tipo celular deseado, sería teóricamente posible generar nuevos tejidos y órganos completos que podrían sustituir a otros dañados o no funcionales. Esta posibilidad despertó un enorme interés por el gran atractivo del concepto, y ha atraído desde entonces una gran cantidad de recursos y esfuerzo investigador, hasta el punto de ser uno de los temas prioritarios en todos los planes estratégicos de investigación. Los conocimientos obtenidos han provocado una

revolución en el campo de la Biología Celular, pero también han producido una revolución equivalente en el campo de los biomateriales. La Ingeniería de Tejidos requiere la diferenciación y/o el crecimiento coordinados de células bajo el control de una serie de señales bioquímicas, suministradas por la adición de factores de crecimiento y señales espaciales, proporcionadas por el biomaterial. Éste además, tiene un papel fundamental como soporte físico que regula la forma y configuración de los nuevos tejidos. Los requerimientos que se exigen a los biomateriales para Ingeniería de Tejidos son muy estrictos, hasta el punto de que ha sido necesario desarrollar una nueva generación de los mismos. Frente a los biomateriales anteriores, cuya función era principalmente mecánica y protésica, los nuevos biomateriales han de ser biocompatibles, con velocidad de degradación controlada, resistencia mecánica adecuada y una configuración biomimética que imite al máximo las estructuras de sostén que encuentran las células en los tejidos, por ejemplo, la matriz extracelular. También es necesario que el biomaterial ofrezca en su superficie grupos reactivos que permitan la funcionalización del mismo con ligandos tales como factores de crecimiento y péptidos que al liberarse al medio activen procesos de señalización celular.

De forma sorprendente, en torno a los primeros años de la pasada década, una serie de trabajos del grupo de D.L. Kaplan, de la Universidad Tufts, en Boston, pusieron de manifiesto que una proteína de la seda, la fibroína, reúne las cualidades necesarias para constituir un biomaterial muy adecuado para su uso en aplicaciones relacionadas con la Ingeniería de Tejidos. A partir de estos primeros trabajos, la atención dedicada a la fibroína no ha dejado de crecer, desarrollándose continuamente nuevas aplicaciones (Vepari y Kaplan, 2007; Wang y col. col., 2006; Sobajo y col., 2008). La adecuación de la fibroína como biomaterial se basa en un conjunto de cualidades que se exponen a continuación.

1.4.1. Propiedades de la fibroína como biomaterial

a) Elevada biocompatibilidad con tejidos animales.

El requerimiento más importante que debe presentar un biomaterial es sin duda el de su biocompatibilidad. El material, una vez implantado, no debe desencadenar una reacción inflamatoria que anularía su función. En el

caso de la seda, existe una tradición de siglos en su uso como material de sutura. En esta aplicación, existe abundante información que indica la posibilidad de aparición de reacciones inflamatorias en los puntos de sutura (revisado por Altman y col., 2003). Sin embargo, estudios más recientes indican que estas reacciones son debidas en realidad a la sericina, y que una fibroína perfectamente limpia de la misma no induce ninguna respuesta inflamatoria (Panilaitis y col., 2003).

Santin y col. (1999), comprueban que las membranas de fibroína pura producen un nivel de activación de macrófagos inferior al observado con el poliestireno y el polimetacrilato. Panilaitis y col. (2003), en un estudio *in vitro*, comprueban que las fibras de seda sin sericina son inmunológicamente inertes en un cultivo de macrófagos de ratón RAW 264.7, mientras que partículas de fibroína insoluble sí que activan la producción de TNF. Curiosamente, la sericina soluble no activa la reacción de los macrófagos, sino que es la presencia conjunta de fibroína y sericina, la que resulta inmunogénica.

Meinel y col. (2005), en un estudio *in vivo* e *in vitro*, comparan la producción de citoquinas inflamatorias inducidas por membranas de fibroína, colágeno y ácido poliláctico (PLA), sembradas con células mesenquimales humanas e implantadas intramuscularmente en rata. La producción de citoquinas inflamatorias *in vitro* fue similar en fibroína, colágeno y el control de plástico, mientras que la tasa de proliferación celular fue superior en la membrana de fibroína. En el estudio *in vivo* se comprobó una leve respuesta inflamatoria producida por la fibroína a nivel de observación histológica, que fue menor que la observada en el implante de colágeno, y mucho menor que la observada en el implante de PLA. En conjunto los resultados de histología e inmunohistoquímica *in vivo* de este estudio exhaustivo indican que la fibroína es menos inmunogénica que cualquiera de los biomateriales habituales, cuando está purificada de sericina.

b) Posibilidad de funcionalizar la superficie con ligandos bioactivos.

La posibilidad de actuar sobre la química superficial de los biomateriales es un requerimiento fundamental de los mismos. Esta

actuación permite el enlace químico al armazón de ligandos que ejercen un efecto biológico positivo sobre las células que van a crecer en el mismo. Este efecto puede ir desde cambios físicos en la superficie, en términos de rugosidad e hidrofobicidad que modulan la adhesión celular, hasta la activación de cascadas bioquímicas complejas regulatorias de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular.

Cada biomaterial tiene sus propias peculiaridades en este aspecto, en función de su naturaleza química. Los grupos reactivos que presentan en superficie condicionan los tipos de enlace que se pueden establecer y los ligandos que se pueden unir. La fibroína es una proteína grande cuya molécula contiene unos 5.000 aminoácidos. La mayoría de éstos consisten en glicina (45,9%) y alanina (30,3%) que no son reactivos. Sin embargo, presenta cantidades significativas de serina (12,1%), y tirosina (5,3%), así como treonina, ácido glutámico y ácido aspártico, que sí son reactivos y pueden ser modificados con reacciones bien conocidas (Murphy y Kaplan, 2009).

La reacción más habitual para unir proteínas o péptidos a la fibroína mediante enlace covalente es la de carbodiimidas. El acoplamiento de carbodiimidas es un método estándar que se usa para obtener la reacción de los ácidos carboxílicos con las aminas primarias a través de un enlace amida. Este enlace puede hacerse a través de los aminoácidos que presentan grupos carboxilo libres, es decir, el ácido aspártico (25 residuos por molécula), el glutámico (30 residuos) y en, menor medida, la lisina (12 residuos). Diversos autores han unido de forma covalente a través de estos residuos de lisina moléculas tales como la proteína morfogenética de hueso (BMP-2), el péptido de adhesión RGD y la enzima peroxidasa (revisado por Murphy y Kaplan, 2009). Las condiciones para esta reacción consisten en activar los residuos de ácido carboxílico en la fibroína con una mezcla de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) en tampón fosfato a pH 6, todo ello seguido por la reacción con la biomolécula portadora de grupos amino. Otra estrategia para conseguir un enlace covalente de proteínas a la fibroína es la reacción con glutaraldehído. Este compuesto es usado generalmente como agente fijador de tejidos biológicos, dado que contiene dos grupos aldehído que puede entrecruzar biopolímeros que contienen aminas. Sin embargo, también puede ser

utilizado como agente de acoplamiento inespecífico entre polímeros y moléculas portadoras de grupos amino. En esta aplicación se ha utilizado para conjugar insulina a nanopartículas de fibroína para incrementar su estabilidad (Zhang y col., 2006a; Yan y col., 2008). Además de estas dos estrategias habituales de funcionalización de fibroína, con proteínas o péptidos, hay otras usadas para casos particulares, como son la reacción activada por cloruro de cianuro, la sulfatación de la tirosina o la modificación de la tirosina con grupos diazonio. Todas estas variantes son descritas en la revisión de Murphy y Kaplan (2009). Además de la posibilidad de realizar estas uniones covalentes, hay que mencionar otras posibilidades de unir moléculas a la fibroína, como es la adsorción a través de uniones de hidrógeno y uniones electrostáticas. También es posible que las moléculas de interés queden físicamente dentro de las estructuras de fibroína en el proceso de fabricación y se vayan liberando a medida que la misma vaya siendo degradada por la acción de las proteasas.

c) Degradación lenta y controlable.

La velocidad de degradación, la naturaleza de los productos de degradación y el metabolismo de los mismos es una consideración crítica a la hora de elegir y desarrollar un biomaterial. Éste debe degradarse y reabsorberse con el tiempo, pero a una tasa que permita que las células sembradas en el mismo tengan tiempo para diferenciarse y organizar una estructura tisular adecuada.

Según el reglamento de la Farmacopea USA, un biomaterial se considera absorbible cuando "pierde la mayor parte de su resistencia a tensión en un plazo de 60 días tras su implantación *in vivo*". De acuerdo con esta definición, la seda podría considerarse como no degradable. Sin embargo, se sabe que la seda es degradable a lo largo de períodos prolongados, debido a la proteólisis asociada a la reacción de cuerpo extraño. Además su grado de cristalización es modulable, empleando distintos tiempos de exposición a metanol.

Varios estudios indican tasas variables de absorción *in vivo* de la seda, dependiendo del modelo animal utilizado y el punto de implantación. En general, la seda procesada e implantada en forma en fibras (suturas),

pierde la mayor parte de su resistencia a la tensión en el período de un año y se convierten en irreconocibles en dos años (Altman et al., 2003).

Se ha demostrado que proteasas tales como quimotripsina (producida también por macrófagos) degradan la región menos cristalina de la proteína a péptidos que son entonces fagocitados. Otras proteasas adicionales, intervienen para producir una degradación completa. Por otra parte, se sabe que los péptidos de degradación de la fibroína tienen efectos biológicos favorables (Yamada, 2004). Esta situación contrasta con la observada con los productos de degradación de biomateriales poliméricos del ácido láctico, que pueden producir una acidificación localizada en el punto de implantación (Vepari y Kaplan, 2007).

1.4.2. Presentaciones de la fibroína como biomaterial

Una de las características más interesantes de la fibroína es la posibilidad de elaborarla y presentarla en una gran variedad de configuraciones, que permiten cubrir casi todas las necesidades que se presentan en la Ingeniería de Tejidos. Con las fibras de seda pueden elaborarse estructuras lineales resistentes a tracción aptas para la fabricación de ligamentos. A partir del polímero acuoso de fibroína regenerada se pueden fabricar mallas de fibras nanométricas obtenidas mediante electrohilatura, películas transparentes (*films*), hidrogeles, esponjas tridimensionales y nanopartículas. A su vez, la fibroína puede combinarse con otros biomateriales y formar estructuras compuestas, por lo que la versatilidad en el diseño de armazones es casi ilimitada. A continuación se enumeran las diversas presentaciones de los armazones de fibroína.

1.4.2.1. Mallas obtenidas mediante electrohilatura (electrospinning)

El proceso de electrohilatura (con el que traducimos el término inglés *electrospinning*) consiste básicamente en la proyección de un chorro de disolución polimérica en un campo eléctrico con una elevada diferencia de potencial. Este campo crea unas fuerzas electrohidrodinámicas que adelgazan el diámetro del chorro del polímero hasta una escala nanométrica. Dicho chorro, al depositarse sobre una superficie plana,

produce una malla plana de fibras superpuestas distribuidas al azar y de elevada porosidad.

La invención del proceso se atribuye a Formhals, que en 1934 consiguió en EE.UU. la primera patente sobre el mismo. En esta patente se hilaron microfibras de acetato de celulosa disueltas en acetona. A partir de este inicio, el proceso mostró ser factible con un rango amplísimo de polímeros (revisado por Zhang y col., 2009a). La realización de la técnica no ha cambiado significativamente desde esta primera descripción.

El equipo necesario consiste básicamente en tres elementos: una fuente de alto voltaje, una bomba que alimenta al inyector capilar o aguja conectado a la corriente y una placa o cilindro colector conectado a tierra.

Durante la electrohilatura, un potencial eléctrico es aplicado a una gota de la solución del polímero en la punta de la boquilla. Las fuerzas de repulsión producidas por la carga electrostática en la solución, combinadas con las fuerzas de atracción entre el líquido y el colector, ejercen una tensión hidrodinámica en la solución. La tensión superficial y las fuerzas viscoelásticas de la solución del polímero se equilibran en un punto con la fuerza electrostática, que tira del mismo hacia el colector. En tal punto, la gota adopta una forma cónica, el conocido como cono de Taylor (Taylor, 1969). A medida que el voltaje se incrementa a partir de este punto, se proyecta un chorro de polímero desde el cono, que debido a las fuerzas ejercidas sobre el mismo se adelgaza hasta un diámetro muy inferior al de la boquilla inyectora. En el trayecto recorrido entre la boquilla y el colector, el disolvente del polímero se evapora, por lo que lo que se recoge en aquel es el polímero puro, en forma de un fieltro (fibras desordenadas al azar) de rango nanométrico o micrométrico (figura 1.11).

La técnica de electrohilatura fue desarrollada para su uso en entornos industriales, principalmente para la fabricación de filtros y recubrimientos. Sin embargo, en la última década ha entrado con gran fuerza en el campo de la bioingeniería. La razón para ello es que la configuración tridimensional de las fibras de polímero producida por electrohilado es prácticamente idéntica a la que podemos observar en la matriz extracelular del tejido conjuntivo animal. En este sentido, la malla electrohilada es una estructura totalmente biomimética con la misma, y como tal, es lo más parecido que

podemos producir, con la excepción de la matriz extracelular descelularizada obtenida mediante eliminación química de la células de un tejido animal.

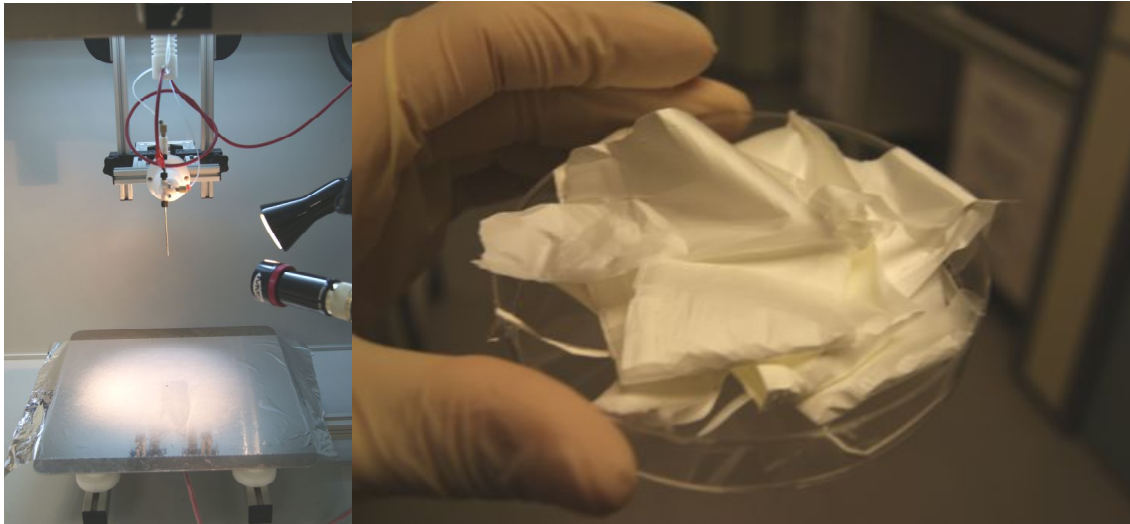


Figura 1.11. Figura ilustrativa del proceso de electrohilado (izquierda) y vista macroscópica de la malla de nanofibras generada (derecha).

Esta estructura es un medio muy adecuado para el cultivo y diferenciación celular, dado que su configuración proporciona a las células las señales topográficas que éstas necesitan para llevar a cabo su programa de diferenciación y organogénesis. Además, este proceso puede estimularse y modularse mediante la adición de señales químicas a las células, a través de la funcionalización del material con los factores de crecimiento o ligandos adecuados para ello.

Dados estos antecedentes, es explicable la gran cantidad de trabajos recientes relacionados con el desarrollo de la tecnología de electrohilado en Ingeniería Tisular. El enorme volumen de información generado puede consultarse en numerosas revisiones: Smith y Ma (2004); Zhang y col., (2005); Chew y col. (2006); Liao y col. (2006); Liang y col. (2007); Lim y Mao (2009); Nisbet y col. (2009). Una revisión específica del electrohilado de fibroína puede encontrarse en Zhang y col. (2009).

Una característica relevante de la técnica de electrohilado es su enorme versatilidad. Puede aplicarse con prácticamente todos los biomateriales habituales en Ingeniería Tisular. Estos pueden ser sintéticos, como el PLA, PGA, PLGA (Yang y col., 2005), PCL (Stitzel y col., 2006) o

bien de origen orgánico tales como el colágeno (Rho y col., 2006), la gelatina (Ma y col., 2005), el ácido hialurónico (Um y col., 2004), quitina, fibrinógeno (Zhang y col., 2009) y desde luego, fibroína (Zarkoob y col., 2004; Zhang y col., 2009), tal como se describirá más adelante. También se ha aplicado para distintos modelos y desarrollos en Ingeniería Tisular.

Las mallas electrohiladas son estructuras inherentemente bidimensionales y planas, por lo que su aplicación más intuitiva y directa es la generación de equivalentes cutáneos mediante siembra con células de piel (Choi y col., 2008; Chong y col., 2007; Min y col., 2004; Rho y col., 2006; Yang y col., 2011). Sin embargo, también es posible proyectar el chorro de disolución polimérica sobre un mandril giratorio, generando de esta forma un tubo cilíndrico de tamaño variable. Esta estructura es muy apta para la generación de tejido vascular (Lovett y col., 2007; Lu y col., 2009; Zhang y col., 2009b) y para la fabricación de guías tubulares de crecimiento axonal en regeneración de nervio periférico (Koh y col., 2008; Sangsanoh y col., 2007; Kalbermatten y col., 2008).

1.4.2.1.1. PROCESAMIENTO DE MALLAS ELECTROHILADAS

En la fabricación de una malla electrohilada intervienen diversas variables, muchas de ellas poco controladas a día de hoy. Aunque con la técnica se consiguen en la actualidad estructuras con una reproducibilidad aceptable para los usos requeridos, es casi imposible conseguir que ésta sea perfecta.

Hay tres categorías de factores que pueden influenciar el proceso de electrohilado: Los parámetros asociados a la disolución (concentración, viscosidad, elasticidad, conductividad, tensión superficial...), parámetros vinculados al procedimiento de electrohilado (flujo de la disolución, diferencia de potencial eléctrico aplicado, distancia entre aguja y colector) y parámetros ambientales (temperatura, humedad...) (Zhang y col., 2009).

Por lo que respecta a la naturaleza de la disolución polimérica, las variables más importantes parecen ser la concentración y peso molecular del polímero. Si la disolución está demasiado diluida, la fibra se rompe en microgotas antes de alcanzar el colector, obteniéndose nanopartículas en lugar de nanofibras en lo que se conoce como "*electrospray*". Ésta modalidad es una opción interesante para la fabricación de nanopartículas,

y se emplea ampliamente como tal en el campo de la encapsulación de fármacos (Xie y col., 2008). Sin embargo, cuando el electrospray no está controlado específicamente para tal fin, aparece como un defecto en el proceso de fabricación de nanofibras.

La naturaleza del disolvente empleado es también una variable importante. En el caso de la fibroína, la elección se reduce prácticamente a cinco: Hexafluoroisopropanol (HFIP), ácido fórmico, hexafluoroacetona (HFA), ácido trifluoroacético (TFA), y agua. Los dos primeros producen resultados favorables, aunque con una diferencia significativa en el diámetro de las fibras obtenidas. En un experimento comparativo Jeong y col. (2007), comprueban que la fibroína disuelta en HFIP produce fibras de 380 nm, frente a las fibras de 80 nm obtenidas mediante la disolución con ácido fórmico. Esta diferencia se atribuye a una evaporación más rápida del HFIP, lo que lleva a fibras más gruesas, y con menor contenido en estructura de lámina beta. Ambos disolventes son agresivos para las moléculas o ligandos proteicos que muchas veces se desea añadir a las mallas electrohiladas para conseguir un mejor crecimiento celular, por ello se ha intentado activamente hacer electrohilado con soluciones exclusivamente acuosas de fibroína. Ello no es fácil en principio, dada la baja conductividad de tal solución y la baja tasa de evaporación del agua. Sin embargo, Wang y col. (2006) consiguen un material de fibroína acuosa electrohilada, a partir de una solución muy concentrada (del orden del 28% p/v), rondando el tamaño de las fibras obtenidas los 700 nm de diámetro. El comportamiento reológico de esta disolución concentrada presenta problemas en cuanto a la reproducibilidad y morfología de las fibras.

Otra aproximación es la propuesta por Jin y col. (2002) que reducen la concentración de fibroína mezclándola con disoluciones de óxido de polietileno (PEO) de alto peso molecular (900 KDa) a fin de incrementar la viscosidad de la disolución y hacer posible el electrohilado. Los resultados son satisfactorios, pero es necesario lavar posteriormente el PEO de la malla y ello perjudica sus propiedades mecánicas, restándole resistencia y dejando las fibras cubiertas de poros.

En relación al grupo de los parámetros implicados en el procedimiento de electrohilado, uno de los más importantes es el voltaje aplicado. Por lo que respecta a la fibroína, disuelta en ácido fórmico, se observa una buena

formación de fibras cuando el potencial aplicado está por encima de 4.000 V/cm, mientras que no se observan fibras correctas cuando el mismo está por debajo de 3.000 V/cm. (Sukigara y col., 2004). Otro parámetro a considerar en el procesamiento es la distancia entre la boquilla inyectora y el colector. Esta distancia deber ser suficiente para permitir que el disolvente se evapore completamente, pero a su vez, la distancia influye en el grosor de las fibras obtenidas. Normalmente, la distancia óptima está comprendida entre 5 a 7 cm, pero ha de ajustarse cuidadosamente en relación al resto de los parámetros (Zhang y col., 2009).

En cuanto al postprocesado de las mallas de fibroína electrohiladas una vez obtenidas, hay que recordar que la fibroína regenerada, y los materiales derivados de la misma están en una conformación molecular de plegamiento al azar y hélice alfa. En esta conformación son solubles en agua, por lo que no pueden utilizarse para el cultivo celular. Para hacerlas insolubles es necesario inducir una transición a la conformación en lámina beta, y ello se puede conseguir mediante un tratamiento químico y/o térmico.

El tratamiento químico más efectivo y frecuente es la incubación durante 10 minutos de las mallas en metanol, a temperatura ambiente (Kim y col., 2003). Sin embargo, el tratamiento con metanol hace que la malla electrohilada se encoja, con un disminución de su porosidad, y adquiera además una textura quebradiza que dificulta su manejo. Como procesamiento alternativo, se ha propuesto la incubación de las mallas en vapor de agua, en vacío. Este tratamiento requiere de una duración de 1h para ser efectivo. De esta forma se consigue la transición a lámina beta de la fibroína, pero este contenido es menor tras el tratamiento con vapor de agua (47%) que con metanol (74%) (Min y col., 2006). Ello hace que las propiedades de ambos tipos de mallas no sean idénticas. Las tratadas con metanol presentan una mayor resistencia mecánica a tracción y módulo de tensión, mientras que las tratadas con vapor de agua presentan una superior elasticidad. Por otra parte, éstas últimas parecen presentar una mejor biocompatibilidad, con mejor adhesión y proliferación de queratinocitos y fibroblastos (Min y col., 2006). Sin embargo, en la práctica, se demuestra una cristalización poco eficiente con esta metodología si las

mallas producidas son de grosores suficientemente altos para la adecuada manipulación de las mismas. Por tanto, la elección del método de cristalización de la estructura de la fibroína de las mallas dependerá del tipo de aplicación que se desea.

Una interesante posibilidad que ofrece la tecnología de electrohilado es la combinación de diversos polímeros para fabricar estructuras híbridas y composites (Zhang y col., 2009). Ello se puede hacer a través de dos estrategias. Por una parte, es posible mezclar dos polímeros que compartan el mismo disolvente e inyectar la mezcla sobre el colector. O bien, puede utilizarse un inyector con una configuración coaxial, de forma que el chorro de un polímero es concéntrico al chorro de un segundo polímero. Esto permite la obtención de una fibra con cubierta y núcleo de distinta composición que ofrece diversas posibilidades.

1.4.2.1.2. FUNCIONALIZACIÓN DE MALLAS ELECTROHILADAS

Una característica muy interesante de las mallas de fibroína electrohilada es la posibilidad de funcionalizarlas con diferentes moléculas o combinaciones de las mismas. Como ya se vió en el apartado correspondiente, la fibroína presenta bioactividad en su superficie y se presta bien a la adhesión de ligandos. Esta propiedad se mantiene en las mallas electrohiladas fabricadas con la misma, y de esta forma, se posibilita el desarrollo de dos familias de aplicaciones:

- a) Funcionalización de las mallas con ligandos que actúan sobre la proliferación y diferenciación celular para aplicaciones en Ingeniería Tisular.
- b) Funcionalización de las mallas con moléculas para aplicaciones de liberación controlada de fármacos.

En principio, se dispone de tres estrategias para cargar las mallas con las moléculas que posteriormente se desea liberar. La más sencilla es la de mezclar la molécula con la solución polimérica que se va a electrohilar de forma que aquella queda embebida en el material y se va liberando a medida que éste se degrada. Sin embargo, esta aproximación sólo es posible con disolventes acuosos o poco agresivos. En el caso de la fibroína, los disolventes más utilizados, como el HFIP y el ácido fórmico, desnaturalizan o alteran la mayoría de las moléculas interesantes para

cargar. Por contra, la solución acuosa de fibroína es más difícil de electrohilar.

A pesar de ello, Li y col. (2006) incorporan proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) mediante adición directa a una disolución acuosa de fibroína antes del electrohilado y comprueban que la BMP-2 encapsulada incrementa la deposición de calcio de las células mesenquimales de médula ósea sembradas en las mallas en relación con el control. También aumenta la expresión de marcadores celulares específicos de hueso y una mejora general en el proceso de formación del mismo a nivel histológico.

Una segunda estrategia, mucho más habitual, es unir el ligando mediante enlace covalente a la superficie del material. Como se describió en un apartado anterior, en el caso de la fibroína es posible activar los grupos hidroxilo o bien los grupos amino, haciendo un tratamiento previo del material con glutaraldehído, o bien mediante carbodiimidas (Murphy y Kaplan, 2009). De esta forma, es posible unir al material enzimas, factores de crecimiento celular y citoquinas que son sensibles a la desnaturalización inducida por los disolventes.

Una tercera estrategia de carga sería la de realizar una unión no covalente de la molécula mediante la adsorción de la misma a la superficie del material electrohilado. En este caso la liberación es más rápida dado que la fuerza de los enlaces (hidrógeno, electrostáticos, hidrófobos) que posibilitan la adsorción es más débil, y no es necesario que se produzca la degradación del material para la liberación de las moléculas adsorbidas. Un ejemplo de esto se encuentra en el trabajo de Kang y col. (2007), en el que se procede a incorporar nanopartículas de plata en la superficie de mallas electrohiladas de fibroína para crear una venda de heridas con propiedades bactericidas. Para ello sumergen la malla en una solución acuosa de nitrato de plata, seguido de una fotoreducción.

Un caso especial de funcionalización es el realizado con nanotubos de carbono, con el objetivo de dotar a las mallas de conductividad eléctrica (Kang y Jin, 2007). Para ello realizan la adsorción de los nanotubos en una solución de los nanotubos de carbono durante un minuto al vacío, seguida de un aclarado. Tras este tratamiento, la conductividad de la malla alcanza los 2.4×10^{-4} S/cm, frente a los 4.4×10^{-15} S/cm de la malla nativa.

1.4.2.1.3. APLICACIONES EN INGENIERÍA DE TEJIDOS

Las mallas de nanofibras electrohiladas presentan unas características que las hacen especialmente interesantes para aplicaciones de Ingeniería de Tejidos. La configuración al azar de las nanofibras constituye la estructura más parecida a una matriz extracelular que puede obtenerse por métodos artificiales.

El papel de esta matriz es esencial en la formación de numerosos tejidos animales. Por una parte, la matriz extracelular aporta un sostén físico a las células que crecen en la misma, con una función en la que la resistencia mecánica es importante. Pero sobre todo, la configuración tridimensional de las fibras proporciona puntos de anclaje y adhesión a las células. La disposición y distribución de estos anclajes proporciona a las células unas claves topográficas y espaciales que tienen un papel señalizador de los diversos procesos biológicos implicados en el crecimiento y diferenciación de las mismas. De la crítica importancia de la configuración del soporte de la matriz da idea el conjunto de buenos resultados que se obtienen en la actualidad con el uso de la matriz extracelular descelularizada. Esta tecnología consiste en tomar un tejido animal y eliminar sus células mediante el tratamiento con detergentes para dejar únicamente la estructura de la matriz que posteriormente se siembra con células madre. Las mallas de nanofibras electrohiladas imitan esta estructura con menor coste, y por ello, se han realizado numerosos intentos para fabricarlas con los mismos materiales que constituyen la matriz natural, es decir, colágenos, elastina y ácido hialurónico entre otros. Los resultados obtenidos no son satisfactorios pues estos materiales, cuando se procesan en nanofibras, presentan poca resistencia mecánica y una rápida degradación (Yeo y col., 2008). Por el contrario, la fibroína permite generar nanofibras con una resistencia mecánica muy superior y una degradación mucho más lenta, que además se puede modular según el proceso de cristalización empleado (Zhang y col., 2009). Las mallas de fibroína electrohilada se han utilizado en diferentes aplicaciones:

Tejido vascular: La demanda de tejido de vascular para su trasplante es elevada, y ello ha llevado a un intenso esfuerzo para producir estructuras adecuadas para su reparación. Sin embargo, ha sido difícil

encontrar una solución satisfactoria debido a la complejidad estructural y exigencias mecánicas de este tejido.

Por una parte, está compuesto por dos tipos celulares, como son células endoteliales en la parte luminal y células de músculo liso en la parte externa. Por otra, el tejido debe soportar una presión pulsante elevada.

Se ha abordado la construcción de prótesis de vasos a través del electrohilado de diversos materiales, entre ellos, la fibroína. Bondar y col. (2008) investigan la respuesta de células endoteliales a fibras de fibroína de diámetro micro y nanométrico en relación a su morfología, proliferación y expresión de moléculas de adhesión. Los resultados indican una regulación positiva de la expresión de integrinas en las nanofibras, en comparación con las microfibras. Así mismo, se observa sobre aquellas, un aumento de los puntos de adhesión focal y un estado migratorio más intenso de las células endoteliales.

En estudios dirigidos a evaluar las propiedades mecánicas de los tubos de fibroína electrohilada, Soffer y col. (2008) fabrican estructuras tubulares mediante electrohilado de fibroína sobre un mandril giratorio para producir un tubo de 3 mm de diámetro y grosor de 0,15 mm. La presión interna de rotura se estima en 811 mmHg, muy superior a la de construcciones similares realizadas con colágeno y otros biomateriales, (71 mmHg), pero aún así, todavía inferior a la resistencia a presión que presenta la vena safena nativa, que es de 1800 mmHg.

Zhang y col. (2009b) desarrollan injertos de tejido vascular de pequeño diámetro (3,8 mm) que siembran secuencialmente con células de músculo liso de la arteria coronaria humana y con células endoteliales de aorta humana. Esta construcción es cultivada en un sistema de flujo dinámico del medio en un biorreactor de circulación pulsante. Los resultados demuestran que el crecimiento y adhesión de las células son mejores en condiciones de flujo dinámico que en estático, debido a una mejor distribución de oxígeno y nutrientes. Las células de ambos tipos se integran y crecen correctamente en las mallas de nanofibras.

La conclusión de los trabajos realizados es que los tubos elaborados mediante electrohilado de fibroína sobre un mandril giratorio permiten el crecimiento y adhesión adecuados de los tipos celulares requeridos para la

reparación de tejido vascular, con unas propiedades mecánicas superiores a las de cualquier otro biomaterial utilizado hasta la fecha.

Piel: La piel juega un papel esencial en la protección del cuerpo frente a las agresiones del ambiente. Las células de la piel se localizan en dos capas: una epidermis queratinizada y estratificada y una capa inferior más gruesa de tejido conectivo rico en colágeno. La piel está sometida a agresiones debidas a quemaduras, traumas y ulceraciones que pueden destruir porciones significativas de la misma con consecuencias graves. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar estructuras de soporte que permitan un crecimiento celular para la reparación de partes dañadas de la piel. Las mallas de nanofibras electrohiladas son un material especialmente adecuado para esta aplicación. Éstas son inherentemente bidimensionales, ya que al ir aumentando la deposición del polímero y el grosor de la malla esta también se vuelve más aislante y el proceso pierde eficiencia. Este grosor nunca suele superar los 0,5 mm.

En conjunto, la malla electrohilada tiene una apariencia muy similar a un papel o una tela fina. Por tanto, el concepto de sembrarla con queratinocitos para generar una lámina de piel implantable, o bien, el de funcionalizarla con factores de crecimiento o antibióticos y utilizarla como apósito en úlceras, surge de forma intuitiva.

Hay que tener en cuenta además, que la fibroína tiene propiedades cicatrizantes de la piel, observadas en modelos *in vivo*. Se ha comprobado una aceleración significativa en el proceso de cicatrización en heridas cutáneas producidas experimentalmente en perros lampiños mejicanos (Kimura y col., 2007) y en ratas (Sugihara y col., 2000). Ensayos *in vitro* indican que la fibroína estimula la proliferación de fibroblastos de piel en cultivo (Tsubouchi y col., 2003), e incluso se ha estudiado cuales son los motivos peptídicos de la molécula de fibroína que estimulan esta proliferación (Yamada, 2004).

A pesar de estos datos parciales, no se conocía con precisión el mecanismo exacto del efecto cicatrizante de la fibroína hasta el estudio realizado al respecto por Martínez-Mora y col. (2012), que indica que la fibroína, así como la sericina, promueven la migración de los queratinocitos en el cierre de heridas a través de la estimulación de la expresión y la

fosforilación de la proteína c-Jun, que tiene un papel conocido y bien caracterizado en la señalización de la migración celular.

Por lo que respecta al desarrollo de mallas electrohiladas de fibroína para la reparación de piel, Min y col. (2004) estudian la adhesión y migración de queratinocitos y fibroblastos en dicho material, recubiertas o no con proteínas de la matriz extracelular (colágeno tipo I, fibronectina y laminina). El recubrimiento con colágeno promueve la adhesión y la proliferación de los queratinocitos, pero no así de los fibroblastos. El recubrimiento con fibronectina produce una adhesión celular similar a la observada tras un recubrimiento con BSA. En conjunto, los datos vienen a indicar la posibilidad de modular el comportamiento celular mediante la funcionalización de la estructura con proteínas nativas, y la buena compatibilidad de la fibroína con todas ellas.

Yeo y col. (2008) investigan el potencial de matrices electrohiladas mixtas de fibroína y colágeno como soportes de piel artificial. De forma sorprendente, las matrices de fibroína pura o de colágeno puro fueron más efectivas que las mixtas en términos de adhesión y expansión de queratinocitos. Sin embargo, todos los tipos de mallas funcionaron igual por lo que respecta a la adhesión de fibroblastos.

Hueso: El tejido óseo es una forma especializada de tejido conectivo compuesto de una matriz extracelular calcificada y una población de diversos tipos celulares que incluyen osteoprogenitores, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Hay muchas aproximaciones a la reparación del tejido óseo, la mayoría basadas en la siembra de células madre mesenquimales de médula ósea en armazones porosos de diversos biomateriales. Las mallas electrohiladas no son, en principio, una estructura adecuada para la reparación de huesos largos. La mayoría de los defectos óseos susceptibles de ser reparados tienen una configuración tridimensional en la que no encaja bien una estructura bidimensional como es la malla. A pesar de ello, se ha comprobado que las mallas de fibroína son un sustrato excelente para la adhesión y proliferación de células mesenquimales, así como para la deposición de matriz extracelular (Jin y col., 2004).

Una interesante aplicación *in vivo* de la malla electrohilada la constituye el trabajo de Kim y col. (2005), que la utilizan para el guiado de

crecimiento de nuevo tejido óseo en el cierre de un defecto calvario de 8 mm en cráneo de conejo. En este caso, la malla se coloca superficialmente en el defecto y las células de los bordes del mismo van creciendo en la malla hacia el interior consolidándose hasta que se consigue un cierre total con un nuevo hueso histológicamente correcto, a diferencia del cierre incompleto observado en el control.

1.4.2.2. Películas transparentes (*films*)

Los *films* son la estructura más simple que se puede elaborar con la fibroína regenerada en solución acuosa. Para su fabricación basta con verter la cantidad adecuada de dicha solución en una superficie o molde plano y dejar evaporar el agua. El resultado es una lámina transparente de una textura y aspecto similar al celofán (figura 1.12).



Figura 1.12. *Film* de fibroína de seda, moldeado en la superficie de una placa de Petri, que pone de manifiesto la transparencia del mismo.

A pesar de su simplicidad, el *film* de fibroína ofrece numerosas posibilidades como biomaterial. Los *films* se han empleado para estudiar la interacción de la seda con las células, ensayando diferentes tipos de microestructuras superficiales, diferentes funcionalizaciones y diferentes combinaciones con otros biomateriales (Vepari y Kaplan, 2007).

Se comprueba en general que la adhesión de fibroblastos, así como de otros tipos celulares de mamíferos o insectos a los *films* de seda es similar o superior a la observada en *films* de colágeno (Minoura y col., 1995).

En cuanto a las posibles aplicaciones clínicas, los *films* se comenzaron empleando en forma de apósito en la cicatrización de heridas de grosor total (retirada de dermis y epidermis) en un modelo de ratas. Las heridas cicatrizaron una semana antes, y con menor respuesta inflamatoria en aquellas heridas cubiertas con *film* de fibroína, en comparación con las cubiertas con un apósito comercial con base de colágeno (Suhigara y col., 2000). Pero con posterioridad han aparecido nuevas aplicaciones de los *films* en dos áreas de gran interés: reparación de membrana timpánica y reparación de tejido ocular.

a) Reparación de membrana timpánica

La perforación aguda de membrana timpánica es una causa frecuente de sordera y de infección crónica. Algunas de estas perforaciones se vuelven crónicas y la probabilidad de éxito en su reparación decrece con el tamaño de las mismas (Kim y col., 2010). Una de las técnicas usuales para el proceso de cierre de la perforación (miringoplastia) es la implantación en la zona afectada de una lámina de papel que sirve de soporte para el crecimiento de una capa de fibroblastos que regeneran la membrana. Sin embargo, Kim y col. (2010) proponen el uso de un *film* de fibroína con la misma finalidad. Tras realizar miringotomías en un grupo de ratas, comparan el proceso de cierre de la perforación entre un parche de papel (del grosor del papel de fumar) y un *film* de fibroína (de 25 μm de grosor). El tiempo medio de cierre es de 9,1 y 7,2 días respectivamente, por lo que concluyen que el uso del *film* de fibroína acorta significativamente el proceso de cicatrización de la membrana timpánica perforada. Otros autores, también han valorado positivamente el comportamiento de los *films* de fibroína en la realización de miringoplastias (Levin y col., 2009; 2012).

b) Reparación de tejido ocular

Los biomateriales de fibroína, especialmente los *films* transparentes, han atraído recientemente un gran interés en el campo de la reconstrucción ocular. De los tejidos oculares susceptibles de ser reparados mediante la Ingeniería de Tejidos, hay que señalar la córnea, el limbo corneoescleral, y el complejo de Ruysch.

-Córnea: Es una estructura de unas 500 micras de espesor y compuesta de tres tejidos distintos, que desde la parte exterior son el epitelio, el estroma y el endotelio corneales. El epitelio externo consiste en 3 a 5 capas de células epiteliales escamosas. El estroma es una capa avascular, poblada por un tipo celular de origen mesenquimal, los queratocitos. El endotelio constituye la capa basal y su papel es importante en el mantenimiento de la hidratación y configuración de la matriz extracelular corneal, que son esenciales para conferir la necesaria transparencia a la cornea.

En la práctica clínica se presentan situaciones, derivadas de procesos degenerativos, o bien traumas y quemaduras en las que se hace necesario proceder a una sustitución del epitelio o del endotelio. Aunque la práctica habitual sería la de hacer un trasplante de endotelio, o un crecimiento de epitelio autólogo a partir del limbo, un abordaje alternativo sería el de promover el crecimiento de células epiteliales o endoteliales autólogas en un soporte de tipo laminar e injertarlo una vez conseguida la confluencia celular. En este tipo de aplicación, la fibroína en formato de *film* ofrece unas posibilidades muy interesantes.

Madden y col. (2011) fabrican una lámina de fibroína de 5 micras que siembran con células de la línea B4G12 y células primarias de endotelio corneal humano. Se comprueba que el fenotipo celular se mantiene correctamente. La adhesión y el crecimiento celulares sobre la fibroína son algo menores que sobre plástico, pero mediante el recubrimiento de la fibroína con colágeno, los valores de ambas variables se igualan con los obtenidos sobre plástico, y sobre plástico con colágeno.

Bray y col. (2011), comparan el crecimiento de células epiteliales corneales humanas sobre una lámina de fibroína de 6 micras con el obtenido sobre membrana amniótica. Comprueban que el crecimiento celular sobre fibroína es una seis veces menor, pero el fenotipo celular corneal, determinado por la expresión de K3/K12 y el número y distribución de células progenitoras Np63, se mantiene adecuadamente.

Por lo que respecta a la reconstrucción del estroma corneal, los requerimientos son mucho más exigentes. El estroma está constituido por la superposición de 200 a 250 láminas de colágeno de 2 μm de espesor en las que crecen los queratocitos. Estas células se ubican en cada lámina en una

disposición caracterizada por un alineamiento de las mismas en una dirección. A su vez, las láminas se superponen en una configuración muy precisa para asegurar un alineamiento vertical de las capas celulares que permita la transparencia de la estructura. En base a esta singular configuración del estroma, Lawrence y col. (2009) desarrollan un concepto biomimético de construcción estromal en el cual cada una de las láminas de colágeno es sustituida por láminas de fibroína sembradas con queratocitos, superpuestas y prensadas para obtener una construcción tridimensional. El desarrollo de este concepto supone un reto considerable, por cuanto es necesario fabricar láminas de fibroína ultrafinas ($2\ \mu\text{m}$), porosas, y con un microtexturado en la superficie que permita el crecimiento alineado de los queratocitos. En el trabajo mencionado, los autores consiguen realizar una construcción con estos requerimientos, incorporando PEO a la fibroína para conferirle porosidad y moldeando el film sobre una plantilla de PDMS de 600 ranuras/mm (utilizado en la fabricación de superficies refractivas). Los *films* obtenidos son sembrados con $100.000\ \text{células}/\text{cm}^2$ e incubados 24 horas. Mediante la superposición y prensado de siete círculos de 12 mm extraídos de dichos *films* se llega a una construcción tridimensional sencilla en la que se observa un grado de transparencia satisfactorio y un adecuado crecimiento celular. Esta construcción es mejorada en el desarrollo de un trabajo posterior del mismo grupo (Gil y col., 2010a). La mejora consiste en que las láminas de fibroína son funcionalizadas con el dominio peptídico de adhesión celular RGD, lo que promueve un mejor alineamiento de los queratocitos y a su vez, una superior transparencia de la construcción. El mismo grupo, en otro trabajo, desarrolla un estudio muy detallado de cómo influye el proceso de microtexturización de la superficie del *film* de fibroína en el alineamiento de los fibroblastos corneales humanos que se cultivan sobre el mismo (Gil y. col, 2010b).

-Limbo corneoescleral: El limbo marca la transición entre la córnea y la esclera y es una fuente de células epiteliales progenitoras para mantener la integridad del epitelio corneal. Por tanto, una lesión de limbo puede derivar a una pérdida de epitelio corneal. Usualmente, este problema se aborda cultivando células progenitoras de epitelio corneal procedente del limbo en membrana amniótica que posteriormente se injerta en la córnea (Bray y

col., 2012). Sin embargo, las células epiteliales pierden sus características como progenitoras una vez que se separan de su nicho.

Bray y col. (2012) proponen resolver este problema mediante el cultivo celular en una construcción que permita el mantenimiento de parte del estroma subepitelial y por tanto, conserve al máximo el nicho de las células progenitoras. Para ello, diseñan una construcción dual realizada en fibroína: Una base constituida por una membrana de un fieltro de fibras de fibroína, destinada al crecimiento de células mesenquimales estromales limbares, y sobre esta malla, un *film* de fibroína donde se siembran las células de epitelio limbal humano. Esta construcción resulta ser satisfactoria, por cuanto permite el mantenimiento del fenotipo corneal en ambas capas.

- Complejo de Ruysch: Ésta es una zona donde se integra el epitelio retinal pigmentado, junto con otras estructuras de sostén y nutrición como la membrana de Bruch y el *coriocalillaris*. Shadforth y col. (2012), desarrollan un *film* de fibroína ultrafino (3 μm de grosor), conteniendo un 0,09% de PEO para conferirle porosidad. Mediante un recubrimiento adicional de vitronectina se consigue un adecuado desarrollo y adhesión de células de la línea ARPE-19 que es un modelo establecido de células epiteliales retinales pigmentadas. El fenotipo de estas células se mantiene adecuadamente durante el cultivo. Sin embargo, un cultivo primario de células retinales pigmentadas humanas, aun produciendo una morfología adecuada manifiesta un crecimiento excesivamente lento, lo que indica la necesidad de una posterior optimización de la construcción.

Además de su utilidad en la fabricación de soportes planos para crecimiento celular, los films de fibroína tienen un gran interés como sustrato para la liberación lenta y controlada de diversos tipos de moléculas terapéuticas (Numata y Kaplan, 2010). Por una parte, como ya se vió en un apartado anterior, la superficie de la fibroína ofrece grupos amino y carboxilo que pueden activarse mediante tratamiento con carbodiimidias o glutaraldehído para obtener un enlace covalente de diversas proteínas terapéuticas al material. Por otra parte, la fibroína presenta carga negativa, lo que permite la adsorción electrostática de moléculas catiónicas. Los films se han usado con éxito como sustrato de crecimiento celular para regeneración de hueso tras su funcionalización con BMP-2, RGD y hormona

paratiroide, mediante carbodiimidias (Sofia y col., 2001; Karageorgiu y col., 2004).

Las moléculas a cargar en la fibroína para su liberación pueden ir también mezcladas con el polímero antes de la fabricación del film. Esta posibilidad es especialmente interesante para la estabilización de enzimas, que pueden mantenerse atrapadas en el film y activas durante meses, a temperatura ambiente, tales como la glucosa oxidasa, la lipasa o la peroxidasa (Numata y Kaplan, 2010).

Otra posibilidad para utilizar la fibroína como sustrato de liberación de moléculas terapéuticas es a través de los recubrimientos de otros dispositivos. Mediante interacción electrostática o hidrofóbica, la fibroína, en la que previamente se ha disuelto un fármaco, queda unida a la superficie de un dispositivo metálico o plástico, simplemente por inmersión del mismo en la solución de fibroína y posterior secado. En estas condiciones, se pueden ir superponiendo capas del recubrimiento, cada una de las cuales puede tener un grosor de 10 nm a partir de una solución de fibroína de 1 mg/ml (Wang y col., 2005). El concepto de hacer un recubrimiento multicapa de fibroína se ha ensayado *in vivo* para la liberación de heparina, paclitaxel y clopidogrel a partir de un dispositivo metálico tipo estent, en aorta porcina con buenos resultados en la prevención de restenosis y en la proliferación excesiva de células endoteliales (Wang y col., 2008).

1.4.2.3. Hidrogeles

Los hidrogeles son estructuras tridimensionales de polímeros fuertemente entrelazados que absorben gran cantidad de agua pero no se disuelven en la misma (figura 1.13). Son una estructura muy adecuada para aplicaciones de encapsulación y liberación de células y citoquinas. La fibroína acuosa se presta bien a la fabricación de hidrogeles, dado que las nanofibrillas de lámina beta presentes en la solución se entrecruzan con facilidad cuando se dan las condiciones adecuadas. Estas condiciones están relacionadas principalmente con el pH de la solución. Cuando éste es de 3-4, se produce la gelificación de una solución acuosa al 3 % en dos días, en contraste con los 8 días necesarios cuando el pH es de 5-12 (Kim y col., 2004).

Otros factores importantes en el proceso de gelificación de la fibroína son la concentración de la solución, la concentración de calcio y la temperatura. La elevación de estas tres variables produce una gelificación más rápida (Kim y col., 2004), sin embargo la interacción entre estas variables es compleja y el proceso no es totalmente controlable. A menudo se producen gelificaciones espontáneas e indeseables en soluciones acuosas de fibroína almacenadas para su uso.



Figura 1.13. Hidrogel de fibroína de seda acuosa al 1.5%.

La gelificación también se induce mediante la mezcla con otros polímeros tales como poloxamer, y gelatina. Se ha comprobado que células osteoblásticas cultivadas en hidrogeles de fibroína al 2% muestran una adherencia y crecimiento similares a los obtenidos con otros biomateriales, y la proliferación de estas células mejora con la adición al hidrogel de glicerol al 30% (Motta y col., 2004). Cuando se inyecta un hidrogel en un defecto crítico de fémur en conejos, ello resulta en un mayor volumen y espesor de hueso trabecular y mayor contenido mineral que cuando se utiliza PLGA (Fini y col., 2005).

De las aplicaciones generadas a partir de hidrogeles, una de las más interesantes es la combinación de seda y elastina, para formar lo que se conoce como polímeros proteicos mixtos seda/elastina (SELPs). Estos polímeros se producen mediante técnicas de expresión en sistemas fermentativos y permiten un control muy definido de sus características. Los SELPs se han empleado sobre todo en la liberación controlada de pequeñas moléculas, tales como teofilina, vitamina B y citocromo c. También permiten

la liberación de ADN, con una eficiencia de transfección que es de 1-3 órdenes de magnitud superior a la liberación obtenida cuando no se emplea el hidrogel (Megeed y col., 2004).

1.4.2.4. Esponjas porosas

Los armazones constituidos por esponjas porosas tridimensionales son una estructura muy utilizada en el campo de la Ingeniería de Tejidos. Consisten en una pieza de biomaterial de forma adecuada a la aplicación deseada que se caracteriza por una estructura muy porosa, formada por macro y microporos interconectados. Esta característica permite una buena circulación de nutrientes y desechos y crea un entorno favorable al crecimiento, proliferación y migración de las células. La fibroína regenerada se presta con facilidad a este tipo de presentación, que ha sido ampliamente utilizada sobre todo en aplicaciones relacionadas con la reparación de tejido óseo (Hofmann y col., 2007; Jiang y col., 2009; Karageorgiu y col., 2006; Kim y col., 2005; Meinel y col., 2005; Sofia y col., 2001). La microestructura porosa se puede generar mediante liofilización de la solución acuosa, espumación inducida por gas o utilización de un porógeno.

El porógeno más habitual para las esponjas de fibroína es la sal común, NaCl, con una granulometría en torno a 500 μm . En combinación con este porógeno, la solución polimérica se prepara por disolución en HFIP o en agua. El proceso consiste en verter la solución de fibroína en un molde con la forma requerida y añadir NaCl de la granulometría adecuada, que no se disuelve en el HFIP. Una vez evaporado el solvente, se cristaliza la fibroína mediante inmersión en metanol (figura 1.14), y una vez insolubilizada se sumerge en agua para disolver la sal (Rockwood y col., 2011).

La estructura resultante es ya adecuada para su siembra con células de diversos tipos. Es posible generar un gradiente de tamaños de poro combinando porógenos de diversas granulometrías, con lo que la estructura resultante se asemeja más a la diversidad de la matriz extracelular ósea.

Dada la toxicidad del HFIP (si quedasen residuos), es deseable, y se ha intentado, fabricar la estructura con una disolución de fibroína totalmente acuosa y ello puede conseguirse actuando sobre la concentración de fibroína en la solución y el tamaño de los cristales de sal. Las esponjas realizadas a partir de polímero acuoso presentan una superficie más rugosa que las obtenidas a partir de la solución de HFIP. A su vez, posiblemente debido a esta rugosidad, se observa una mejor adhesión de las células, así como una mejor resistencia mecánica a compresión (Rockwood y col., 2011). Su degradación enzimática es, en cambio, más rápida.

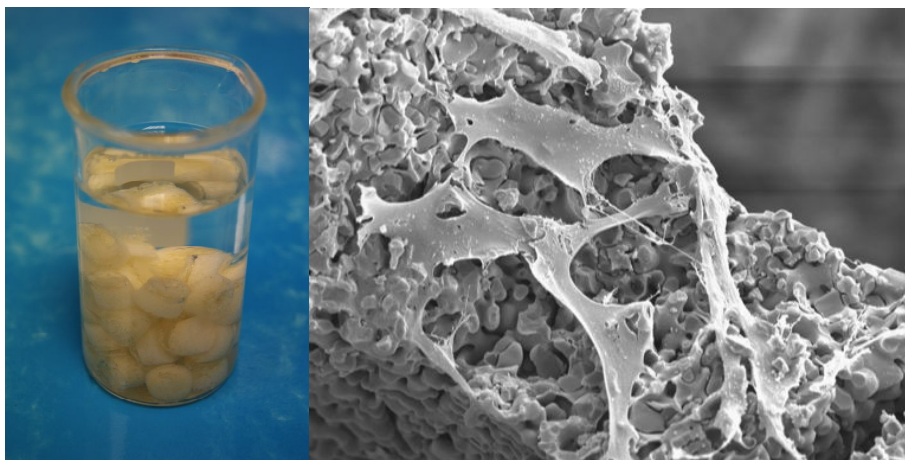


Figura 1.14. Esponjas porosas de fibroína durante la cristalización en metanol (izquierda) y ultraestructura de las mismas sembradas con células madre mesenquimales de médula ósea (derecha). Fotografías obtenidas durante un experimento piloto realizado en el IMIDA (Murcia)

Las esponjas de fibroína se han estudiado en diversos desarrollos y variantes para generar tejido conectivo. Esponjas funcionalizadas con el motivo peptídico RGD y sembradas con células mesenquimales humanas, y en presencia de medio de cultivo osteogénico, resultaron en la diferenciación de las células. Éstas hicieron depósitos de hidroxapatita y aumentaron la expresión de marcadores osteogénicos *in vitro*. (Meinel y col., 2004b). Este tipo de esponjas fueron útiles para la reparación de defectos críticos en mandíbula de ratas (Jiang y col., 2009). Se ha comprobado también, en un modelo de defecto crítico en mandíbula de perro, que los mejores resultados *in vivo* se obtienen cuando la esponja se premineraliza con hidroxapatito y se siembra con células mesenquimales 7 días antes de la implantación. En estas condiciones, el cierre del defecto

que se obtiene no difiere significativamente del obtenido mediante injerto de hueso autólogo (Zhao y col., 2009).

Las esponjas porosas de fibroína han demostrado también su buen funcionamiento como soportes de tejido de cartílago (Wang y col., 2006; Chlapanidas, 2010). Meinel y col. (2004a) mostraron que cuando se cultivaron células mesenquimales humanas en estas esponjas empleando medio condrogénico, los transcritos de colágeno tipo II y glicosaminoglicano se sobreexpresaron en comparación con el nivel observado cuando este mismo tipo celular se cultivó sobre esponjas de colágeno, o colágeno entrelazado.

Por otra parte, las esponjas de fibroína presentan una mayor integridad estructural y una degradación más lenta que las esponjas basadas en colágeno, lo que permite una mejor formación del nuevo tejido. En otro experimento, Aoki y col. (2003) mostraron que las esponjas de fibroína a partir de solución polimérica acuosa sembradas con condrocitos de conejo, soportan el crecimiento y formación de tejido cartilaginoso, con un mayor contenido en glicosaminoglicano que las esponjas similares fabricadas con colágeno.

1.4.2.5. Micro y Nanopartículas

Uno de los temas que reciben más atención investigadora en el campo de la biomedicina actual es el de la liberación controlada y dirigida de fármacos, antitumorales y componentes bioactivos. La meta que se persigue es la de hacer llegar las moléculas terapéuticas a sus dianas celulares, y de esta forma, evitar los problemas asociados a una distribución sistémica de estas moléculas en todo el organismo y a dosis elevadas, especialmente, en el caso de antitumorales. La fibroína es un material apto para este tipo de aplicaciones. Como ya se describió en el apartado correspondiente, presenta aminoácidos en su superficie que permiten el enlace covalente de numerosos tipos de ligandos. Ello permite la unión a la fibroína tanto de proteínas terapéuticas como de motivos peptídicos de direccionamiento celular. Por otra parte, su susceptibilidad a la degradación por proteasas permite la liberación lenta de los ligandos y moléculas cargadas.

Para las aplicaciones de liberación controlada de moléculas bioactivas es habitual la funcionalización de los diversos armazones y estructuras ya descritos: mallas de nanofibras, esponjas y films. Sin embargo, la forma de presentación y fabricación más habitual para ello es la de micro y nanopartículas (Hofmann y col., 2006; Mathur y Gupta, 2010). Las nanopartículas son inyectables, pueden circular por el sistema vascular hasta el tejido diana y presentan una elevada superficie en relación a su volumen.

En un primer trabajo de Wenk y col. (2008) se puso de manifiesto la aptitud de las partículas de fibroína para retener y posteriormente liberar IGF-I. La fibroína permite una gran versatilidad en cuanto a los métodos para su elaboración en forma de nanopartículas. Pueden ser fabricadas mediante pulsos ultrasónicos (Wenk y col., 2008), "spray drying" (Hino, 2003) y desolvatación (Zhang y col., 2007; Kundu y col., 2010).

Wang y col. (2010) también producen nanopartículas de seda mediante la elaboración de films con mezclas de fibroína y PVA disueltos en agua. Posteriormente redisuelven los films y separan las partículas generadas, con un control de tamaños muy preciso en función de las concentraciones de fibroína empleadas en la mezcla.

Las partículas de fibroína pueden ser cargadas con una gran diversidad de moléculas terapéuticas, bien sean proteínas, como la insulina (Yan y col., 2008), o antitumorales tales como la genipina (Imsombut y col., 2010), paclitaxel (Chen y col., 2011), curcumina (Gupta y col., 2009) y emodina (Cheema y col., 2007).

1.5. EL GUSANO DE SEDA COMO BIORREACTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

La larva de *B. mori* puede utilizarse de forma eficiente como biorreactor para la producción de proteína recombinante (Maeda, 1989; Maeda y col., 1985). En general, el sistema de expresión de proteína recombinante en células de insectos basado en un vector baculovirus (SEB) es uno de los más interesantes (figura 1.15) de los cuatro sistemas principales de producción de proteína existentes (procariotas, levaduras, insectos y mamíferos). Algunas de sus ventajas son:

- El SEB requiere menos tiempo para establecer un sistema de producción y es fácilmente escalable.
- El procesamiento post transcripcional de la proteína recombinante es más adecuado en las células de insectos que en las de bacterias o levaduras, garantizando la actividad biológica requerida.
- El SEB no plantea problemas desde el punto de vista de la bioseguridad y el riesgo biológico, dado que los baculovirus infectan únicamente células de algunos insectos y no son infecciosos para el hombre o para los animales.

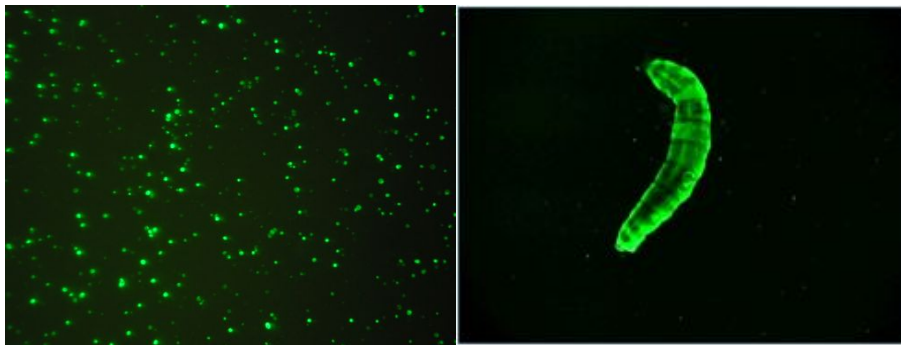


Figura 1.15. Cultivo de línea celular sf21 (izquierda) y larva de *B. mori* (derecha) inoculadas con baculovirus modificados genéticamente para la expresión de proteína verde fluorescente (GFP).

El sistema consta de dos componentes: un vector de expresión viral y un insecto o células del mismo.

a) Vectores: Existen básicamente dos tipos de expresión con vectores baculovirus. Uno de ellos se basa en el uso del *Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus* (BmNPV) y el otro en el *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV). El BmNPV es específico del gusano de seda (*B. mori*), que presenta muchas ventajas para su cría y manejo industrial. Actualmente es el sistema predominante en China y Japón, países con un gran dominio de la tecnología sericícola. Sin embargo, la especificidad de BmNPV plantea el inconveniente de que la construcción del virus recombinante sólo puede hacerse en cultivos celulares de *B. mori*, que crecen lentamente y hacen el proceso largo y lento.

Otro problema es que el BmNPV expresa proteasas que pueden reducir la eficiencia de la producción de proteína. El AcNPV, más utilizado en Europa

y EE.UU., es muy similar al anterior, teniendo ambos un genoma de 130 kb y una gran homología de secuencia. Pero a diferencia del anterior, el AcNPV presenta la ventaja de tener un amplio rango de huéspedes, siendo infeccioso para al menos 28 especies de insectos (Maeda y col. 1985; Wu y col., 2004a). Además crece muy bien en líneas celulares derivadas de otros lepidópteros como *Spodoptera frugiperda* (Sf21 y Sf9) y *Trichoplusia ni* (Tn-5). Estas líneas son muy adecuadas para la construcción de virus recombinantes y también para la producción de proteína en suspensiones celulares en medios de cultivo libres de suero. Sin embargo, el AcNPV tiene el problema de que su huésped *T. ni*, es mucho más pequeño que *B. mori*, lo que hace el sistema menos productivo a escala industrial. La evolución lógica para combinar las ventajas de ambos sistemas ha sido la de construir un baculovirus recombinante híbrido de BmNPV y AcNPV. Ello ha llevado a desarrollar dos de estos recombinantes; el "BacDuo", patentado por Katakura Industries (Japón) y el HyNPV, que tiene además inactivado un gen viral que codifica cisteinasa y cuya expresión reduce la eficiencia del proceso de producción (Wu y col., 2004a). Estos baculovirus recombinantes presentan un rango de huéspedes amplio y mayor versatilidad de utilización. Sin embargo, el uso de estos vectores y de los kits derivados de los mismos, todavía requieren un complejo proceso de elaboración. Un avance muy significativo para facilitar la construcción de vectores de expresión fue la incorporación al proceso de un transposón bacteriano, el Tn7, que actúa como donante del gen de interés a un báculo que se propaga en *E. coli* (Luckow y col., 1993). Este concepto llevó al desarrollo de un kit desarrollado por Monsanto y comercializado por Invitrogen, y que por su sencillez y eficiencia constituye un estándar en la construcción de vectores baculovirus: *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System* (Ciccarone y col., 1997). El sistema consta de un plásmido donante pFastBac en el que se clona el gen de interés, bajo el control de un promotor específico de baculovirus y flanqueado por las secuencias del transposón Tn7. Con este plásmido se transforma una cepa de *E. coli*, la DH10Bac, que contiene un báculo y un plásmido satélite que permite la generación de un báculo recombinante tras la transposición de la construcción clonada en pFastBac. El sistema está también dotado de un gen marcador para detectar la recombinación. El sistema Bac-to-Bac permite generar, identificar y purificar

un baculovirus recombinante en menos de 2 semanas frente a las 4 a 6 semanas que requerían los protocolos basados en recombinación homóloga. También reduce la necesidad de múltiples rondas de purificación en placa dado que el virus recombinante no está mezclado con los parentales. Sin embargo, una característica del Bac-to-Bac es que el báculo está hecho a partir del genoma del AcMNPV, y por tanto no es apto para la infección de *B. mori*. Este inconveniente fue resuelto por Cao y col. (2006), que realizaron una modificación en el sistema desarrollando un báculo a partir del genoma del BmNPV. Ello permite aplicar el Bac-to-Bac a la infección de larvas y crisálidas de *B. mori* y de sus líneas celulares.

b) Insectos: El sistema de expresión de baculovirus comenzó a desarrollarse básicamente sobre cultivos de células de insectos. Actualmente es una herramienta muy eficiente para expresar proteínas en laboratorio de investigación, comercializándose numerosos kits de expresión (Protein Sciences Corp., Invitrogen). Sin embargo, cuando se trata de producir proteína a escala industrial, la expresión *in vivo* en larva de insecto resulta mucho más conveniente al mostrar niveles de expresión que son de 50 a 1.000 veces superiores al nivel obtenido en cultivo celular (Yonfeng y col., 2002). Para la expresión *in vivo*, la elección se centra básicamente en los estados larvarios de dos insectos: *B. mori* y *T. ni*. El gusano de seda, *B. mori*, presenta grandes ventajas para su utilización como biorreactor:

- La larva puede criarse fácilmente en hojas de morera, con una tecnología de cría bien conocida, al ser el único insecto plenamente domesticado desde hace milenios. Algunas razas pueden desarrollarse también en dietas artificiales.
- Su cuerpo es grande y fácil de manejar (5 gramos/larva frente a 0.3 gr/larva de *T. ni*).
- Su ciclo vital es relativamente corto (7 semanas).
- Su genética y biología están muy bien documentadas.
- Los adultos domesticados no pueden volar, por lo que es sencillo mantener la cría en condiciones de estricto confinamiento sin riesgo biológico.

Frente a estas ventajas, *T. ni* presenta la característica de que su cría es fácil y barata en medios artificiales, lo que garantiza una producción

continua en el proceso industrial. Existen ya varias empresas a nivel mundial dedicadas a la producción de proteínas en larvas de insectos a partir de la plataforma Bac-to-Bac/*T. ni*. La más conocida es C-Pearl en EE.UU., y hay que citar también la existencia de una empresa española en el sector, Algenex, dedicada a la producción de vacunas animales.

En cualquier caso, la producción industrial basada en gusano de seda, requiere una tecnología específica, basada en el uso de razas especiales de *B. mori*, multivoltinas y/o capaces de desarrollarse bien en dietas artificiales durante todo el año. En estas condiciones, es posible criar de una vez hasta 10.000 gusanos por lote y persona en una instalación adecuada (Muneta y col., 2003).

El rendimiento que puede obtenerse de cada larva de *B. mori* es variable, dependiendo de la proteína producida. En el caso del interferón-tau bovino, una larva puede producir en torno a 40 µg (Nagaya y col., 2004a), mientras que puede llegar a 62 µg de interleuquina-18 porcina (Nagaya y col., 2004b). Producciones mucho más elevadas se han conseguido con el factor de crecimiento endotelial vascular humano (426 µg/larva) (Wu y col., 2004) y sobre todo, con el factor de crecimiento de fibroblastos humano (700 µg/larva) (Wu y col., 2001). Por tanto, una plataforma de expresión de proteína basada en el uso de un baculovirus híbrido recombinante y larvas de *B. mori*, ofrece un gran potencial. Para desarrollar esta plataforma en un sistema de producción industrial y comercial, quedarían por definir dos elementos: La elección de la proteína recombinante a expresar y el diseño de una purificación eficiente de esta proteína.

a) Proteínas expresables por el sistema.

Existe una bibliografía muy amplia describiendo la expresión eficiente de proteína recombinante en *B. mori* (tabla 1.3). A modo de ejemplo podemos mencionar la interleukina-3 de ratón (Miyajima y col., 1987), el interferón- α (Maeda y col., 1985), la endostatina humana (Yongfeng y col., 2002), el antígeno de superficie de la hepatitis B (Higashihashi y col., 1991), la hormona de crecimiento de la carpa (Ho y col., 1998), el factor de crecimiento endotelial vascular humano (Wu y col., 2004), la interleuquina-18 porcina (Muneta y col., 2003), la interleuquina-21 bovina (Muneta y col., 2004), el interferón- τ bovino (Nagaya y col., 2004a), y el factor de

crecimiento de fibroblastos humano (Wu y col., 2001). Dada la escala de producción del sistema, siempre en el rango de miligramos, la elección de proteína se ha centrado en aquellas que presentan un alto valor añadido. En este sentido, resultan interesantes las citoquinas, quimioquinas, neurotrofinas, hormonas, anticuerpos y factores de crecimiento, con un valor en el mercado del orden de decenas de euros por microgramo (www.biomyx.net). En la actualidad se comercializan más de 300 de estas proteínas de origen recombinante (Catálogo Peptidech en www.bionova.es), y dado el enorme crecimiento de la química de proteínas y la proteómica y sus continuas aplicaciones a la biomedicina, es fácil de imaginar el gran interés económico e industrial que ofrece una plataforma de producción tan barata, segura y sostenible.

b) Purificación de la proteína recombinante.

Uno de los puntos críticos en un sistema de producción industrial es la purificación de la proteína obtenida. En los sistemas basados en cultivos celulares en medios libres de suero, la proteína puede ser purificada sin dificultad, e incluso los extractos crudos muestran actividad biológica. Sin embargo, en la larva de *B. mori*, la proteína recombinante se segrega a la hemolinfa y aparece mezclada con una gran cantidad de proteínas de reserva inespecíficas que saturan las columnas cromatográficas y reducen el rendimiento de la purificación. De la eficiencia de este proceso depende la viabilidad económica global.

Varios trabajos describen protocolos de purificación sencillos. Nagaya y col. (2004b) indican que la purificación de interleuquina-18 porcina puede obtenerse mediante cromatografía en una columna de Sepharosa quelante saturada con Ni^{2+} eluyendo con tampón imidazol. La mayoría de las proteínas de la larva se precipitan previamente mediante un tratamiento con polietilén glicol al 8% y un centrifugado. La interleuquina-21 bovina se purifica en una columna de Sepharosa SP, eluida con un tampón de 500 mM NaCl (Muneta y col., 2004).

En todos los casos, la purificación siempre comienza por la recogida de la hemolinfa de las larvas de 5ª edad, previamente inoculadas por inyección con la construcción del baculovirus. La expresión máxima se consigue a los

5-7 días de la inoculación y la hemolinfa se colecta a partir de una punción o corte en las patas abdominales del insecto.

PROTEÍNA	APLICACIÓN	EXPRESIÓN	AUTORES
VEGF	CICATRIZACIÓN, ANGIOGÉNESIS	426 µg/larva	Wu y col. (2004b)
FGF	REGULACIÓN DE ANGIOGÉNESIS	700 µg/larva	Wu y col. (2001)
INTERFERÓN- τ BOVINO	ANTIVIRAL,	45,5 µg/larva	Nagaya y col. (2004a)
LACTOFERRINA PORCINA	ANTIMICROBIANO	205 µg/larva	Wang y col. (2005)
INTERLEUKINA-21 BOVINA	SISTEMA INMUNE	10 µg/larva	Muneta et al (2004)
INTERLEUKINA-18 PORCINA	SISTEMA INMUNE	53 µg/larva	Nagaya y col. (2004b)

Tabla 1.3. Ejemplos de proteínas recombinantes expresadas en larvas de gusano de seda con vectores virales baculovirus.

En base a la exposición anterior, se deduce que el uso de *B. mori* como biorreactor para la producción de proteínas recombinantes es plenamente viable y eficiente. Existe ya una empresa en Japón, Katakura Industries, dedicada a la producción por encargo de proteínas expresadas en *B. mori*, criado en grandes reactores, con un catálogo muy amplio de dichas proteínas.

2. OBJETIVOS

La investigación realizada a lo largo de la última década sobre la biología del gusano de seda *B. mori*, y sus bioproductos, indica que éstos pueden tener, además de la producción de fibra textil, una aplicación y una demanda en el mercado de productos biotecnológicos y biomédicos. Ofrecen por tanto una posibilidad cierta de crear valor. Esta posibilidad, que ya está en marcha en países asiáticos de larga tradición sericícola, no ha sido lo suficientemente aprovechada en el entorno europeo. Ello es así porque en los países europeos donde la actividad sericícola fue importante durante siglos (España, Italia, Francia), la cría de gusano de seda perdió su rentabilidad y su interés de forma súbita y total a mediados del siglo pasado. La producción de fibra de seda textil es una actividad de bajo valor añadido en la que Europa no puede competir. Sin embargo, en las aplicaciones biotecnológicas, de alto valor añadido y con un uso intensivo de tecnología biomédica, sí que existe la posibilidad de desarrollo y rentabilidad. Por otra parte, España, Murcia, y el IMIDA como heredero de la antigua Estación Sericícola de Murcia, pueden apoyarse en una tradición centenaria de producción sericícola que no existe en ningún otro país europeo a excepción de Italia.

En base a lo anterior, el objetivo básico y primario que motiva la realización de la presente tesis es el de explorar la posibilidad revalorizar la sericultura, a partir desarrollo de aplicaciones de los bioproductos del gusano de seda. Estas aplicaciones se centran en dos aspectos concretos, que constituyen dos objetivos de la tesis:

Objetivo 1: Desarrollo de una plataforma de producción de proteínas recombinantes con aplicación biomédica, a partir de la expresión de vectores baculovirus en larvas y crisálidas de *B. mori*.

La proteína modelo que se elige para dicho desarrollo es la dihidrofolato reductasa (DHFR), ampliamente utilizada en la investigación oncológica para la evaluación de eficacia de antitumorales. Este objetivo se plantea realizar un ciclo completo de producción de la proteína, lo que implica a su vez varios objetivos secundarios:

Objetivo 1.1: Puesta a punto de la cría de gusano de seda con dieta artificial en cámara climática, para su producción continua durante todo el año, en condiciones estandarizadas.

Objetivo 1.2: Puesta a punto del proceso de preparación del vector viral adecuado para la expresión de DHFR en *B. mori*, así como del mantenimiento, multiplicación y cuantificación del baculovirus, su inoculación en larvas y cultivos celulares y el procesamiento de los insectos infectados.

Objetivo 1.3: Puesta a punto de la purificación de la proteína recombinante expresada en larvas y crisálidas.

Objetivo 1.4: Control de calidad de la proteína producida y purificada mediante la evaluación de su actividad.

Objetivo 2: Desarrollo de protocolos para la obtención de biomateriales de fibroína de seda como soporte de crecimiento celular en el campo de la Ingeniería Tisular.

Dentro de este objetivo, el biomaterial que se elige como modelo es el de las mallas de micro y nanofibras de fibroína fabricadas mediante la técnica de electrohilatura (*electrospinning*), dado que es una de las presentaciones más interesantes por su versatilidad. Este objetivo se divide a su vez en dos objetivos secundarios:

Objetivo 2.1: Optimización de la fabricación de mallas de fibroína electrohiladas mediante el control del protocolo de procesamiento de la fibroína.

Objetivo 2.2: Fabricación de mallas de fibroína electrohiladas dotadas de características electroconductoras mediante su funcionalización con polipirrol y evaluación de su biocompatibilidad.

3. Producción de dihidrofolato reductasa humana (hDHFR) en crisálidas y larvas de *B. mori*

3.1 Introducción

3.2 Material y métodos

3.2.1 Cría del insecto

3.2.1.1 Cría con dieta natural

3.2.1.2 Cría con dieta artificial

3.2.2 Expresión y purificación de hDHFR-ec

3.2.3 Preparación del vector de expresión baculovirus

3.2.4 Expresión de hDHFR en preimagos de *B. mori*

3.2.5 Purificación e identificación de hDHFR

3.2.6 Evaluación de la actividad enzimática DHFR

3.2.7 Inmunotinción de hDHFR en secciones de crisálida

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Diseño del vector viral para la expresión de hDHFR en *B. mori*

3.3.2 Expresión de hDHFR en *B. mori*

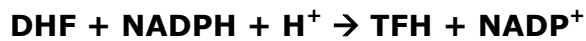
3.3.3 Purificación de hDHFR-bm

3.3.4 Caracterización cinética de hDHFR-bm

3.4 Conclusiones

3.1 INTRODUCCIÓN

La dihidrofolato reductasa (DHFR; E.C 1.5.1.3) (figura 3.1), es un enzima que cataliza la reducción de 7,8-dihidrofolato (DHF) a 5,6,7,8-tetrahidrofolato (THF) en presencia del coenzima NADPH de la siguiente manera:



Esta proteína (≈ 22 kDa) es necesaria para el mantenimiento intracelular de reservas de THF y sus derivados, los cuales son cofactores indispensables en la química de transferencia de un carbono. Junto a la timidilato sintasa (Lockshin y col. 1979), la DHFR se encuentra directamente vinculada a la síntesis *de novo* de timidilato (dTMP). Se trata por tanto de una molécula crucial en la producción de precursores de purinas y pirimidinas para la síntesis de ADN, ARN y aminoácidos. Además es la enzima diana en el análisis de compuestos antifolato (Blakley, 1969), como serían los fármacos antineoplásicos tipo metotrexato (MTX) y antibacterianos como el trimetoprim (TMP).

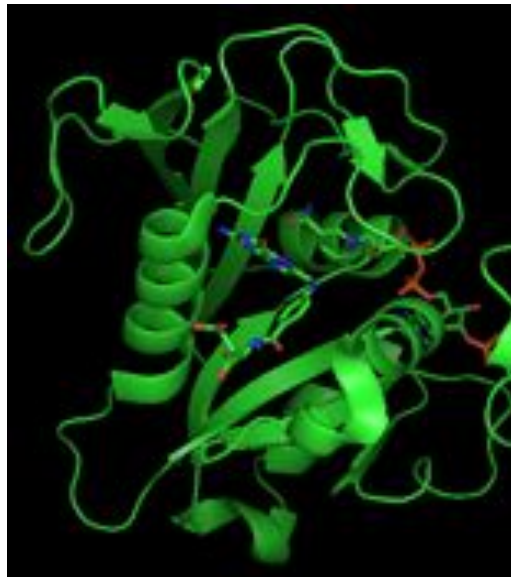


Figura 3.1. Reconstrucción 3D de DHFR con NADPH y DHF unidos. (Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org>)

Dada la gran importancia que presenta tanto a nivel biológico como farmacológico, esta molécula ha sido objeto de numerosos estudios estructurales y cinéticos durante los últimos 20 años (Appleman y col., 1990; Lewis y col., 1995; Schnell y col., 2004) y se requiere comercialmente en altas cantidades para tal efecto.

La tecnología del ADN recombinante ha permitido desde hace unos 30 años el desarrollo de diferentes plataformas de producción de proteína heteróloga, estando cada vez más encaminados a presentar una alta eficiencia, mayor permanencia temporal del sistema y un procesamiento post-transcripcional más adecuado. Se han logrado obtener a partir de microorganismos, cultivos celulares, plantas o animales grandes cantidades de proteínas totalmente ajenas a ellos (insulina en bacterias, vacunas en levaduras...), garantizándose la ausencia de patógenos, cuando el destino de las mismas ha sido la industria farmacéutica, y, generándose incluso moléculas que no existen en la naturaleza. Por ejemplo, los anticuerpos de cadena simple, muy empleados en tratamiento de algunas enfermedades y también en diagnóstico clínica.

A diferencia del empleo de cultivos de microorganismos modificados genéticamente, que conlleva el uso de costosas infraestructuras, soporte informático, personal cualificado y una puesta a punto dificultosa, el sistema que emplea insectos en la producción de proteína recombinante (Maeda, 1989) ofrece numerosas ventajas. Entre ellas se encuentran el poder establecerse en cortos plazos de tiempo, generar proteínas con un procesamiento post-transcripcional más adecuado (al tratarse de organismos eucariotas) y no plantear problema de bioseguridad dado que los baculovirus infectan solo células de algunos insectos y no son infecciosos para el hombre u otros animales.

Como se citó en la introducción general, el uso *in vivo* de estados preimaginales de *B. mori* en la producción de una proteína a escala industrial es muy interesante. Muestra niveles de expresión de 50 a 1.000 veces superiores a los logrados con cultivos celulares. Además, las larvas se crían fácilmente y en plazos cortos de tiempo, su genética y biología están bien documentadas, ya que es el único insecto plenamente domesticado desde

hace milenios, y los adultos no pueden volar con lo cual la cría se puede realizar en estricto confinamiento, sin riesgo biológico.

El genoma de los baculovirus consta de una molécula de ADN de entre 88 y 200 kb y se trata de virus infecciosos para determinados artrópodos (sobre todo insectos). Durante la infección, las partículas virales se empaquetan en lo que se conoce como cuerpos poliédricos, localizados mayoritariamente en el núcleo celular y compuestos casi totalmente por una proteína denominada poliedrina. La producción de baculovirus recombinantes precisa de las siguientes etapas (figura 3.2) (Luckow y col., 1993; Ciccarone y col., 1997):

1. Inserción del ADN heterólogo en un vector donante que lleva secuencias del transposón bacteriano Tn7. Este vector lleva el promotor de la poliedrina, aguas abajo al cual se inserta el gen de interés, garantizando una alta expresión del mismo.
2. Transformación de *E.coli* que lleva un báculo del virus AcMNPV (o BmNPV) y producción de recombinantes mediante trasposición.
3. Selección de recombinantes, extracción del báculo y transfección

Como se ha visto en el apartado de introducción, este sistema ha sido ya empleado con éxito en la producción de numerosas proteínas. En consecuencia, el uso de baculovirus de *B. mori* encaminado a la producción de proteínas recombinantes en las larvas de este insecto ha sido descrito como muy eficiente. Sin embargo, no se ha probado la infectividad y validez del método mediante la inoculación de crisálidas.

El uso de éstas, al tratarse de estados preimaginales aletargados e inmóviles, podrían plantear numerosas ventajas en la bioseguridad y escalado de la producción de la proteína de interés de cara a la mecanización del proceso.

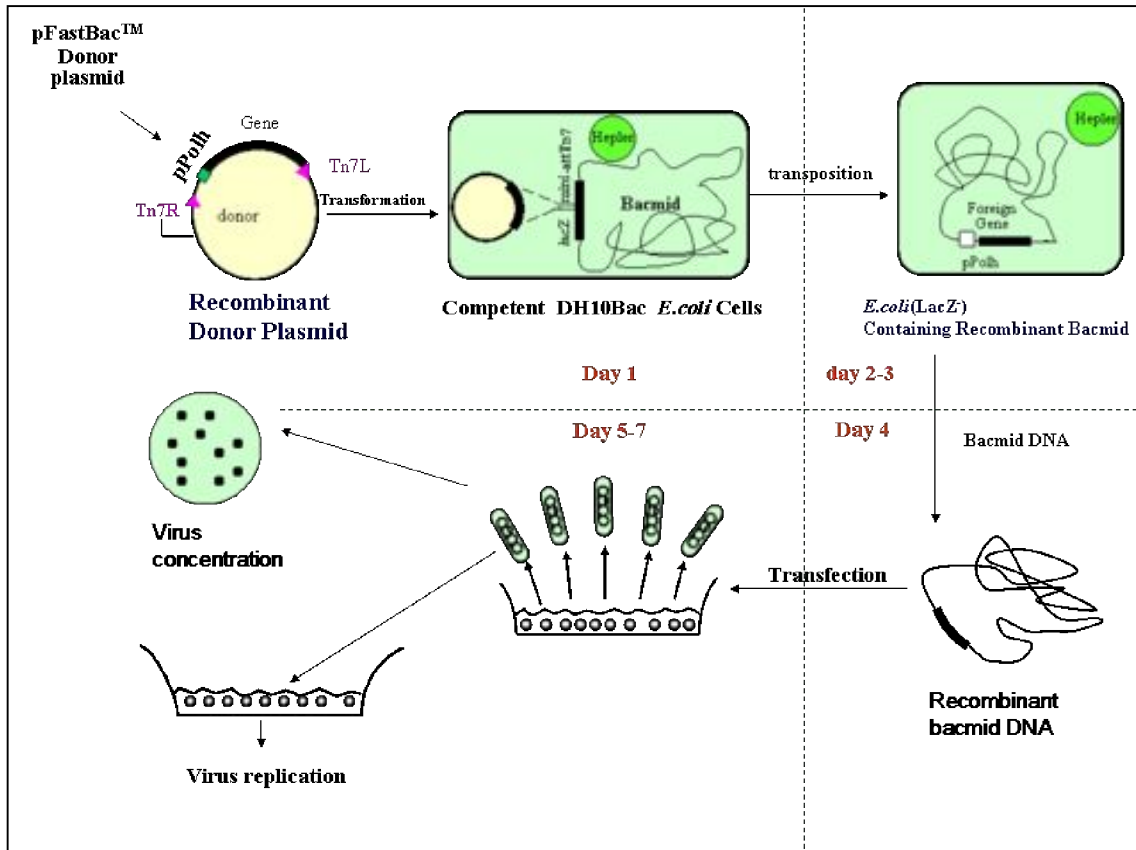


Figura 3.2. Mecanismo de producción de baculovirus recombinantes.

A pesar de que la expresión de hDHFR en sistemas bacterianos no presenta grandes problemas en términos de metodología, este experimento se planteó en colaboración con el Dr. José Neptuno Rodríguez (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, Universidad de Murcia) a fin de validar una plataforma fácil y barata de producción de la molécula para minimizar los costes en sus experimentos de inhibición de la misma con compuestos antitumorales de origen natural. Se buscó de este modo garantizar un autoabastecimiento de DHFR, explorando al mismo tiempo nuevas vías para poner este producto en el mercado.

En este capítulo se expone un estudio pormenorizado sobre la producción de hDHFR en crisálidas y larvas de *B. mori*, confirmando su integridad y funcionalidad mediante la comparación de su cinética enzimática con la hDHFR producida en *E. coli* (hDHFR-ec). El objetivo que se planteó en este experimento fue el del desarrollo y la puesta a punto de un ciclo completo de producción y validación de una proteína modelo, tal como la DHFR. Para ello se abordó la cría del insecto con dieta artificial (como

alternativa a la natural) para tener una producción continua en un entorno limpio de calidad biotecnológica, la fabricación del vector, la inoculación del insecto en larva y crisálida, la purificación de la proteína y la evaluación de su bioactividad.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Antes de describir paso a paso la metodología utilizada para este experimento, es importante aportar una serie de datos esenciales respecto al mismo. El gen de la DHFR conteniendo el marco abierto de lectura así como los medios de cultivo fueron suministrados por Invitrogen (España), la hDHFR-ec (enzima producida mediante expresión en *Escherichia coli*) fue una donación de la Dra. Berry Birdsall (Instituto Nacional de Investigación Biomédica, Reino Unido). Todos los medios cromatográficos fueron obtenidos de GE Healthcare (España).

Los sustratos de la DHFR, DHF (90%) y NADPH fueron obtenidos de Aldrich (España) y SIGMA, respectivamente. La concentración de DHF y del NADPH fueron determinados enzimáticamente a 340 nm usando DHFR y un coeficiente de extinción molar (ϵ) de $11.800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Stone y Morrison, 1982).

Las placas de cultivo se compraron a Nunc (Dinamarca) y el resto de reactivos a Sigma-Aldrich (EE.UU).

En el ensayo se utilizaron gusanos y crisálidas de la raza híbrida Baiyu x Qiufeng cuyos huevos fueron suministrados por el Dr. Xiaofeng Wu de la Facultad de Ciencias Animales (Universidad de Zhejiang, China). Estos se alimentaron con hoja de morera o dieta artificial según la época del año en que se desarrollaban los experimentos, aunque finalmente los ejemplares objeto de este estudio fueron criados empleando hoja de morera.

3.2.1. Cría del insecto

La cría de *B. mori*, tanto haciendo uso de alimentación natural como de dieta artificial (CRA-API Patente, Cappellozza y col., 2005), es un proceso bien conocido.

Durante la cría llevada a cabo de forma tradicional se siguieron los consejos de sericultores murcianos expertos desde marzo hasta los meses

de verano (incluidos) y para la cría en dieta artificial se recurrió al asesoramiento de criadores de la Estación Sericícola de Padua (Italia). Éstos nos cedieron el protocolo que vienen utilizando desde hace años en el mantenimiento de sus razas puras e híbridas de gusanos de seda durante cualquier época del año.

El mantenimiento de los huevos, para garantizar un stock de los mismos, se realizó en cámaras a 4°C, unidos al papel de filtro sobre el que se produjo la ovoposición. Se ubicaron en el interior de envoltorios de malla de muselina o sobres de papel que permitiesen el intercambio gaseoso, garantizando una correcta aireación.

Dependiendo del objetivo a lograr durante cada una de las épocas de cría, ésta se interrumpió en distintos momentos, total o parcialmente. Así, por ejemplo, se utilizaron larvas de distintos pesos para hacer pruebas de producción de proteína recombinante y también crisálidas. Otras veces, el interés se centró en la producción de seda de la que extraer fibroína para las aplicaciones en Ingeniería de Tejidos; en cuyo caso la cría se llevaba a término extrayendo las crisálidas antes de la emergencia de los adultos para garantizar la limpieza de la seda, ya que queda muy manchada si la mariposa perfora el capullo de forma natural.

Se realizó también un seguimiento para caracterizar el crecimiento larvario empleando ambas dietas (véase anexo final de la tesis). Evaluándose el mismo en cámaras climáticas, con temperatura y humedad relativa controladas, y también a temperatura ambiente en el caso de alimentación con hoja de morera. Para ello se hizo un estudio con 3 réplicas (jaulas de larvas) a las cuales se les hicieron fotos periódicamente (cada 4 días) para evaluar el crecimiento longitudinal mediante análisis de imagen (con el software ImageJ) y también se caracterizó el incremento de peso corporal (fig 3.3). Estas mediciones fueron realizadas a 10 gusanos por réplica de estudio cada 4 días (hasta completar el ciclo biológico de los estados preimaginales).

Se utilizó una balanza de precisión Mettler Toledo modelo AB204-s (0,1 mg de precisión) y una cámara fotográfica réflex Sony alfa-230 durante este experimento. Los resultados fueron analizados con el software SPSS 18 para Windows haciendo uso de tests paramétricos (ANOVA, $p < 0,05$) o no

paramétricos (Kruskal Wallis, $p < 0,05$) en función del cumplimiento de los requisitos de normalidad y homocedasticidad o no, respectivamente.



Figura 3.3. Imagen ilustrativa del procedimiento de muestreo durante el seguimiento de la cría.

3.2.1.1. Cría con dieta natural

La eclosión se produjo sin necesidad de cámaras climáticas, durante los meses de marzo y durante los meses de verano si los huevos se exponían a temperatura ambiente tras sacarlos de las cámaras a 4°C. La alimentación consistió en hojas de morera fresca, provenientes de la colección de estos árboles que se conserva en las instalaciones del IMIDA (Murcia, España).

Durante los dos primeros estadios larvarios fue de vital importancia la alimentación solamente con yemas y hojas pequeñas de morera, coincidiendo ésta con el periodo de brotación de los árboles. A medida que se avanzaba temporalmente en el ciclo vital, la selección del tamaño de las hojas no fue relevante, pudiendo alimentarse los gusanos con hojas de diversos tamaños.

Otro factor a tener en cuenta fue el "deslecho" o limpieza de las heces y restos de hojas en las cajas de alimentación. Éste se realizó frecuentemente para garantizar que la cría se llevase a cabo en las mejores condiciones de asepsia y evitar así la aparición de hongos y bacterias contaminantes.

El tamaño de las cajas de larvas fue variándose a lo largo del ciclo vital, puesto que éstas incrementan su longitud de forma muy rápida en

pocas semanas. Los contenedores siempre se encontraron abiertos para facilitar la aireación y evitar condiciones de humedad relativa elevada.

Durante el quinto estado larvario, una vez completado el periodo de alimentación, los gusanos se volvían ligeramente translúcidos, indicando esto el inminente comienzo de la pupación. En este momento se les retiró el alimento y se les proporcionaron ramas y estructuras cilíndricas de cartón para que elaborasen el capullo de seda.

Al cabo de unas 2 o 3 semanas se produjo la emergencia de las polillas adultas que fueron separadas por parejas y ubicadas bajo vasitos de plástico de 4 cm de diámetro y sobre papeles de filtro (fig 3.4).



Figura 3.4. Crisálidas de gusano de seda dispuestas por parejas de cara a la obtención de puestas de huevos independientes

De este modo se obtuvieron puestas de huevos aisladas de forma circular, fáciles de manipular y controlándose su origen.

3.2.1.2. Cría con dieta artificial

La preparación de la dieta artificial deshidratada, de fórmula patentada y suministrada por la Estación Sericícola de Padua, consistió básicamente en la mezcla del polvo con agua en ebullición en relación 1:3 (en peso), éste se preparó en cabina de flujo laminar (Telstar, BioStar Plus), realizando una mezcla homogénea y evitando la formación de burbujas para tener un bloque de pasta compacto. Se dejó enfriar 1 hora en la cabina de flujo

laminar y se ubicó ya cerrado en una caja de plástico a 4°C. El tiempo de uso del mismo nunca superó las 2 semanas, asegurándose así la disponibilidad de nutrientes en óptimas condiciones y evitando contaminaciones fúngicas o bacterianas.

La incubación de los huevos se realizó, en este caso, en cámaras climáticas (SANYO, MLR-350H®) a una temperatura de 25±1°C, valores de humedad relativa del 85 al 90% y bajo un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (12L:12O). La incubación se prolongó durante unos 10 días. El día previo a la eclosión, los huevos se tornaban blanquecinos, debido a que la larva devora la membrana serosa de los mismos. En este momento, en que los huevos son menos sensibles, se procedió al tratamiento de desinfección de estos por inmersión en formalina (SIGMA, EE.UU) al 2-3% v/v, durante 10 minutos. Posteriormente, se despegaron del papel de filtro viejo y fueron transferidos a uno nuevo y ubicados en cajas de plástico limpias en las cámaras climáticas (habiendo dejado evaporar antes la formalina que los mojaba).

La eclosión (figura 3.5) se produce en general en 2 días. Durante el primero tan solo un 10-20% de las larvas nacen. Este momento fue tomado como indicador para sincronizar esta fase, dejando en oscuridad toda la noche, previa al segundo día, tanto los huevos como las primeras larvas (aún sin alimento). El segundo día, tras encender la luz de las cámaras climáticas, todas las larvas eclosionaron masivamente a lo largo de unas 4 horas. Estos pasos aseguraron una cierta sincronización en el desarrollo posterior de la crianza.



Figura 3.5. Larvas de primer estado transcurridas 24 horas desde la eclosión de los huevos.

Tras esto, se colocó una red de plástico con una luz de malla de 2 mm sobre los huevos y, sobre ésta, el alimento cortado en forma de barritas rectangulares finas. Después de 3 horas los gusanos ya se encontraban sobre la comida y se pudieron transferir a una caja nueva previamente desinfectada con etanol al 70% (v/v) y fueron ubicados en la cámara climática.

Las larvas que no pudieron escalar al alimento se transfirieron cuidadosamente con un pincel a las barritas de dieta. Las condiciones en la cámara climática fueron ajustadas a 29°C y 85% de humedad relativa y las cajas de plástico se taparon, pero nunca de forma hermética, sino con un trozo de papel de aluminio ubicado en el borde de las tapaderas que permitiese un intercambio gaseoso efectivo y evitase la condensación en el interior de las mismas.

El segundo, tercer y cuarto día del primer estado larvario no se añadió más alimento, o en su caso un poco en los bordes si se encontraba muy reseco. En este último día se comienza a producir la primera muda y los gusanos no se deben de manipular. A lo largo del quinto día no se debe alimentar a los gusanos sino que se dejaron finalizar la muda, destapando completamente las cajas de plástico para desecar la dieta.



Figura 3.6. Larvas de segundo estado en dieta artificial transcurridos 6 días desde la eclosión.

El sexto día se reanudó la alimentación colocando de nuevo una malla de plástico sobre el alimento seco y sobre ésta la dieta. Posteriormente se transfirieron las larvas a una caja de plástico nueva (entreabiertas con el papel de aluminio). En este momento nos encontramos en el primer día del segundo estado (figura 3.6). La temperatura se bajó a 28°C y la humedad relativa al 80%. La alimentación fue continuada, cuando se estimó que la dieta estaba seca, hasta el cuarto día del segundo estado. En este momento comienzan a mudar al tercer estado larvario (figura 3.7) y se ha de secar el alimento viejo abriendo las tapaderas, para después esperar a que se complete la muda.



Figura 3.7. Larvas de tercer estado sobre dieta artificial transcurridos 10 días desde la eclosión.

Al día siguiente se suministró de nuevo la dieta sobre otra red de plástico y se dejaron hasta completar el escalado hacia la nueva dieta. A partir de este momento las condiciones en la cámara climática fueron ajustadas a 27°C y 75% de humedad relativa. Este sería el primer día del tercer estado larvario.

Durante los días 2 y 3 de esta fase se añadió alimento cuando el mismo se encontraba deshidratado, al igual que se hizo en fases previas. Llegado el cuarto día del tercer estado comienza la muda al cuarto estado y la alimentación ha de ser suspendida una vez más, destapando las cajas de plástico y secando el alimento remanente.

Al día siguiente, se repitió el procedimiento de colocación de alimento y las larvas fueron transferidas a cajas de mayor tamaño que garantizaran espacio y aireación suficientes. Las condiciones de la cámara climática fueron cambiadas a 26°C y 70% de humedad relativa.

Durante el cuarto estado larvario (figura 3.8) la producción de heces y el consumo de alimento se incrementan considerablemente, así que el uso de una red para eliminar excrementos y restos de dieta y añadir alimento fresco se hizo necesario durante los días siguientes.

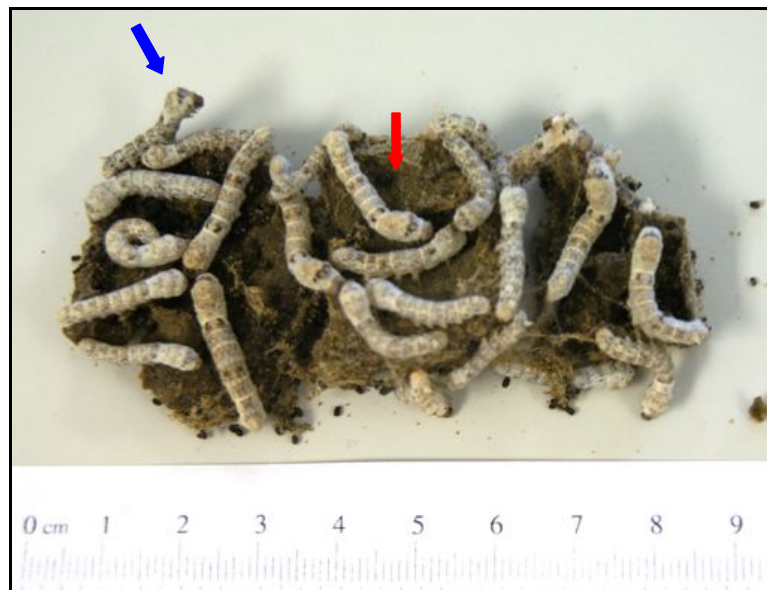


Figura 3.8. Larvas mudando del tercer al cuarto estado (flecha azul) y larvas de cuarto estado (flecha roja) sobre dieta artificial transcurridos 13 días desde la eclosión larvaria.

Al quinto día de la cuarta fase larvaria comienza la muda al quinto estado, momento en el que, una vez más, se abrieron las cajas de cría para deshidratar el alimento. Llegado este punto, es crítico bajar la humedad relativa al 60%.

Al día siguiente se realizó la operación de limpieza y suministro de alimento. Las larvas fueron transferidas a las cajas de cría definitivas y la temperatura se bajó a 25°C, subiendo la humedad relativa al 65%. Se trata del primer día del quinto y último estado larvario.

Es importante resaltar que la última muda puede llevar más tiempo de lo normal y algunas larvas deberán permanecer más tiempo sin ser alimentadas (24h aproximadamente). En esta fase los gusanos son muy

voraces y conviene optimizar la cantidad de dieta suministrada por larva, siendo la estima de: 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 2,5 y 1 g de dieta en polvo por gusano para los días 1, 2, 3, 4, 5 ,6 y 7 respectivamente, pudiéndose omitir la alimentación del día 7 si ya ha comenzado el "hilado" de los capullos.

La limpieza de excrementos, cadáveres y restos de comida durante todo el quinto estado (figura 3.9) es de vital importancia para el éxito de la cría, así como un suministro adecuado de la dieta. Las cajas pueden limpiarse y reutilizarse durante este periodo. Cuando algunas larvas comienzan a hilar, las tapas de las cajas han de quitarse y la humedad de la cámara debe ser de nuevo 60%. Este paso es necesario dado que, antes de la metamorfosis, se produce una purga durante la cual los gusanos expulsan ácido úrico de sus tractos digestivos y se produce un aumento de la humedad en el entorno pudiendo fomentarse las contaminaciones por agentes potencialmente patógenos.

Una vez están hilando, las cantidades de alimento nuevo que se aportan son mínimas, y sirven tan solo para completar el ciclo de los gusanos que se han ido retrasando en crecimiento durante la cría.



Figura 3.9. Larvas de quinto estado sobre dieta artificial transcurridos 20 desde la eclosión.

Para facilitar el "embojado" (hilado) de los gusanos se dotó a las jaulas de larvas con estructuras de cartón dobladas en forma de escalera y fijadas con cinta adhesiva a las paredes de las mismas (figura 3.10). Transcurrida

1 semana desde el hilado los capullos, se abrieron para extraer las crisálidas y ubicarlas por parejas como se describió anteriormente.



Figura 3.10. Larva de quinto estado transcurridos 25 días desde la eclosión.

3.2.2. Expresión y purificación de hDHFR-ec

La hDHFR-ec se expresó en *E. coli* HB101 transformadas con el plásmido pHD84. Éste contiene el ADNc de la DHFR humana. De cara a su obtención se siguió la metodología propuesta por Prendergast y col. (1988).

Las bacterias fueron cultivadas en presencia de ampicilina (50 µg/ml) y TMP (250 µg/ml), de modo que las que no expresaban la DHFR fueron sensibles a éste último compuesto. Tras alcanzar el cultivo una densidad óptica de 0,6 a 600 nm, se inició la expresión de la proteína de fusión añadiendo a éste 1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) e incubando las células con agitación a 37°C durante 4h (trabajo realizado por la Dra. Birdsall).

Tras esto se centrifugó el cultivo a 4°C y el pellet generado se resuspendió en una disolución que contenía EDTA (5 mM), PMSF (1 mM), leupeptina (2 mg/l), β-mercaptoetanol (10 mM), e imidazol (50 mM), pH 6,5. El proceso de homogeneización se hizo a 4°C con un homogeneizador Potter y sonicación.

Las muestras fueron centrifugadas a 35.000x g durante 30 min a 4°C y el sobrenadante se liofilizó y después fue resuspendido en tampón de

pegado, compuesto por fosfato potásico (50 mM), KCl (0.1 M), pH 6,5, inhibidores de proteases, EDTA (5 mM), PSMF (1 mM), leupeptina (2 mg/l) y β -mercaptoetanol (10 mM). Este paso fue previo a la cromatografía de afinidad en MTX.

Existen una gran afinidad entre la DHFR y el MTX que se encuentra enlazado covalentemente con la resina de sepharosa modificada y este es el fundamento de este paso. La resina de afinidad MTX-aminohexil-sepharosa fue equilibrada con tampón de pegado, se aplicó la muestra suspendida y la columna se lavó con tampón de lavado [fosfato potásico (50 mM) y KCl (2M), pH 6,5]. Por último se aplicó el tampón de elución compuesto por Tris-HCl (50 mM), pH 8,5, KCl (1M) y ácido fólico (2 mM). El cambio del pH a básico garantiza la disolución del ácido fólico cuya misión es desplazar al MTX en la interacción con la DHFR, haciendo que se separe de la resina de afinidad.

Las fracciones eluidas que presentaron actividad DHFR fueron concentradas con el sistema Centriprep YM-10 de Millipore (límite de peso molecular 10 kDa). La concentración del enzima de interés se determinó mediante valoración fluorimétrica con MTX (Smith y col., 1979).

3.2.3. Preparación del vector de expresión baculovirus

Esta etapa fue realizada por el Dr. Xiaofeng Wu. Para ello se empleó el sistema de expresión BmNPV/Bac to Bac desarrollado por su grupo de investigación (Cao y col., 2006). Este sistema, ya descrito en la introducción, puede generar baculovirus recombinantes en bacterias haciendo uso del transposón Tn7. Aunque diseñado a partir del AcMNPV, y por tanto, no infeccioso para *B. mori*, la modificación del mismo realizada por estos autores permite su uso para infectar larvas y crisálidas de *B. mori* con el protocolo Bac-to-Bac estándar.

El gen de la hDHFR se clonó en el sitio de restricción *BamHI/HindIII* del vector donador pFastBacHTb. Este último presenta un *cassette* de expresión a cuyos lados se encuentra la secuencia del transposón Tn7.

Con este vector resultante, ahora denominado pFastBacHTb-hDHFR, se transformaron células competentes DH10BmBacmid que contenían el genoma del BmNPV. Para ello 1 ng de plásmido donador se empleó en la

transformación de 100 μ l de células mediante una incubación de 4h a 37°C durante la cual se hizo efectiva la transposición. Tras esto se hicieron diluciones seriadas de las células empleando medio SOC. Este medio es conocido como *Super Optimal Broth* y se compone de bacto-triptona al 2% (p/v), extracto de levaduras al 0,5% (p/v), NaCl (8,56 mM), KCl (2,5 mM), MgCl₂ (10 mM), glucosa (20 mM) y presenta un pH 7. Las diluciones fueron repartidas en placas de 96 pocillos y el éxito de la transformación fue comprobado mediante el cultivo de las células en medio Luria-Bertani conteniendo kanamicina (50 μ g/ml), tetraciclina (7 μ g/ml), X-gal (100 μ g/ml) e IPTG (40 μ g/ml). Transcurridas 48h a 37°C las colonias blanquecinas fueron seleccionadas y subcultivadas en medio con kanamicina.

El DNA recombinante del báculo fue extraído y utilizado para transfectar la línea celular de insecto sf21 y así generar el virus recombinante a mayor titulación. Los pasos subsiguientes fueron llevados a cabo en los laboratorios del IMIDA. Estas células (sf21) fueron incubadas durante 5 días a 27-28°C en medio TNM-FH y el sobrenadante del cultivo fue utilizado para infectar las larvas o crisálidas de gusano de seda.

Para la separación de células y sobrenadante fue necesario despegar las mismas del frasco de cultivo de 75 cm² y centrifugar la suspensión a 2.000 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se guardó en oscuridad y a 4°C (hasta la inoculación de las larvas) y a -20°C para mantener un stock del baculovirus recombinante.

El título viral se calculó haciendo uso del ensayo de conteo en placa estándar. Éste se basa en la elaboración de diluciones seriadas del virus a titular y utilizarlas para infectar durante 1h cultivos de células *sf21* en placas de 6 pocillos a razón de 1 millón de células por pocillo. Posteriormente, estas diluciones, elaboradas con medio Grace sin suero, son eliminadas y las células se inmovilizan con medio de plaqueo, el cual contiene medio TNM-FH y agarosa de bajo punto de fusión al 1% en agua miliQ en proporción 1:1. Se añadieron lentamente (2 ml/pocillo) para evitar romper la capa de células adheridas al fondo del pocillo. Por último, tras esperar 10 min a que la agarosa solidifique se añaden 2 ml de medio

completo TNM-FH para garantizar que no se seque la agarosa durante la semana subsiguiente de incubación a 27-28°C en oscuridad.

El revelado de este ensayo consiste en la adición de 2 ml por pocillo de colorante rojo neutro (0,33%) diluido 1:10 en PBS 1X. Se incuba durante 2 horas para luego eliminarlo invirtiendo la posición de la placa durante 24h. El rojo neutro tiñe las zonas donde aún había células adheridas (vivas) pero no las que se han quedado vacías debido a la infección causada por 1 virus y expandida a las células circundantes durante la semana de incubación. Estas regiones se muestran, en cambio, como puntos no coloreados o halos de lisis.

Transcurridas 24h se procedió al conteo de halos de lisis ("placas") en la capa celular siendo éste fácil de efectuar en alguna de las diluciones (pocillos) utilizadas. El número de halos de lisis $\times 10^{\text{factor de dilución}}$ (factor de dilución del pocillo en el que es visualmente fácil contar) es la concentración del inóculo que tenemos de cara a la producción de proteína recombinante inyectándolo en insectos. Esta se expresa en unidades formadoras de placa (ufp) por ml.

Si el título viral era muy bajo, se repetía el experimento de inoculación en cultivos de células sf21 adicionando entre 0.1 y 0.01 ufp/célula a infectar. Es decir, si se tenían 20 millones de células a inocular habría que añadir el volumen de suspensión viral equivalente a entre $2 \cdot 10^6$ y $2 \cdot 10^5$ ufp e incubar al menos 3 días antes de rescatar el sobrenadante para retitularlo. En general, siguiendo esta regla conseguimos aumentar un orden logarítmico la titulación viral cada vez que se realizaba el procedimiento. El título del inóculo utilizado para inyectar las larvas y crisálidas fue del orden de 10^6 ufp/ml.

3.2.4. Expresión de hDHFR en preimagos de *B. mori*

La inoculación con el baculovirus recombinante se centró en dos fases del ciclo vital de *B. mori*, las larvas de quinto estado (nada más producirse la muda) y las crisálidas. Estas últimas fueron nuestro objeto central de estudio a la hora de comparar la eficiencia en la producción de la proteína de interés con las larvas, ya que su uso no estaba aún descrito en la bibliografía.

Las **larvas** fueron colocadas en una bandeja con hielo cubierta de papel de aluminio 10 min antes de realizarse la inoculación (figura 3.11). Este procedimiento garantizó el anestesiado de las mismas y una reducción considerable en sus movimientos que, ciertamente, dificultan este paso. El inóculo viral les fue inyectado, en la porción antero-dorsal de la cabeza, a una concentración de 10^6 ufp/ml, a razón de 20 μ l/larva. Para ello se hizo uso de microjeringas de 100 μ l de vidrio Hamilton (Suiza) provistas de agujas de insulina.



Figura 3.11. Procedimiento de inyección del baculovirus recombinante en gusanos de seda para producción de hDHFR recombinante.

Media hora tras la inyección las larvas se encontraban recuperadas y fueron alimentadas con hojas de morera a 25-27°C durante los 3 días siguientes.

Alrededor del 4º o 5º día post-inoculación las larvas perdían el apetito y comenzaban a mostrar síntomas de infección. El cuarto día no se les suministró alimento para que se limpiasen sus tractos digestivos y facilitar el proceso de purificación posterior de la DHFR. Posteriormente, éstas fueron sacrificadas mediante congelación a -80°C y se preservaron así hasta el procesado de las muestras.

Como se comentó previamente, también se realizaron experimentos de inoculación en **crisálidas** de gusano de seda para comprobar si existían diferencias en la eficiencia de producción de DHFR utilizando un estado preimaginal u otro. Éstas fueron extraídas de los capullos una semana después del embojado e inoculadas con el baculovirus recombinante a igual titulación.

El punto de inyección seleccionado fue la unión torácico-abdominal dorsalmente, por ser más accesible y causar menos daños en la cutícula de la pupa, al ser esta zona menos rígida.

Tras la inoculación, las crisálidas fueron ubicadas a 25°C durante 5 días y después se congelaron a -80 °C hasta su procesamiento.

3.2.5. Purificación e identificación de hDHFR

Con el fin de aumentar al máximo la eficiencia del sistema de producción de proteína recombinante, se homogeneizó todo el cuerpo de larvas o crisálidas en tampón de extracción proteica frío, compuesto por:

- Tampón Tris-HCl 50 mM a pH 7,9
- NaCl 1 M
- Ditioneitol 1 mM (DTT)
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1mM (PMSF)
- Mezcla de DNAsa e inhibidores de proteasas (0,1 µg/ml)

La mezcla se centrifugó a 10.000x g durante 30 min a 4°C para eliminar los restos sólidos y los lípidos. El sobrenadante se filtró para eliminar los sólidos remanentes y este filtrado fue centrifugado una vez más a 14.000x g durante 30 min a 4°C. Este sobrenadante se guardó y nombró como extracto crudo de DHFR recombinante.

Para eliminar las otras proteínas del insecto, fue posteriormente incubado en polietilenglicol (PEG) 6000 al 14% (p/v). Se mantuvo en agitación durante 1 h a 4°C y después se centrifugó a 12.000x g durante 20 min. Los sobrenadantes se pasaron por una columna MTX-agarosa equilibrada con tampón fosfato potásico 50 mM a pH 6,5, conteniendo este KCl 100 mM. Posteriormente la columna se lavó con 200 ml del mismo tampón, esta vez conteniendo KCl 2 M. La enzima se eluyó utilizando 10 ml de tampón Tris-HCl a pH 8,6 con KCl 1M y lactato de trimetoprim (TMP) 2 mM. Las fracciones que contenían actividad DHFR fueron mezcladas y concentradas en un concentrador Amicon (membrana YM-10 con un corte molecular de 10 kDa). Para separar el TMP de la enzima, las muestras se pasaron por una columna cromatográfica Sephadex G-25.

Las fracciones con actividad DHFR fueron concentradas y conservadas a -80°C con glicerol al 45%. La pureza de las muestras enzimáticas fue confirmada por la presencia de una sola banda tras la realización de

electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% (SDS-PAGE) y visualización con tinción de plata. La identidad de la proteína fue confirmada por *Western Blot*, para lo cual las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE al 12,5% (explicado con más detalle en el apartado 4.2.4). Después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y la DHFR fue visualizada por marcaje haciendo uso del anticuerpo específico de hDHFR (D0942) suministrado por Sigma que reconoce específicamente el extremo C-terminal de la hDHFR.

Paralelamente, también se llevó a cabo una digestión trípica y HPLC-MS de la banda correspondiente a 22 kDa del gel teñido con plata. Ésta fue cortada, desteñida y digerida con tripsina empleando procedimientos estándares (Shevchenko y col., 1996). La identificación de los fragmentos peptídicos se realizó usando la última versión de la base de datos de la NCBIInr.

3.2.6. Evaluación de la actividad enzimática DHFR

La actividad DHFR se determinó siguiendo la caída de NADPH y DHF mediante mediciones espectrofotométricas a 340 nm ($\epsilon = 11.800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), para lo cual se utilizó el espectrofotómetro modelo Perkin-Elmer Lambda-2 con cubetas de 1 cm de camino óptico.

El experimento se desarrolló a 25°C utilizando un baño Haake D1G con calentador y enfriador y este parámetro fue controlado mediante un termómetro digital Cole-Parmer (con una precisión de $\pm 0,1^\circ\text{C}$).

Una unidad de enzima (U) fue definida como la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de DHF y NADPH a THF y NADP por minuto a pH 7,5 y 25°C. Los experimentos se desarrollaron por ello en un tampón a este pH, conteniendo ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) (25 mM), acetato de sodio (25 mM), Tris (50 mM) y NaCl (100 mM). El pH de la reacción se midió antes y después de los experimentos.

Las mezclas de reacción contenían NADP y DHF como sustratos de la enzima, y la reacción fue iniciada por la adición de hDHFR-ec o hDHFR-bm (producidas en *E.coli* o *B.mori*, respectivamente). En ausencia de la enzima, la tasa de cambio de absorbancia era despreciable.

Se calcularon los valores de velocidad máxima de la reacción (V_{max}), así como la constante de Michaelis de hDHFR para DHF (K_m^{DHF}) y NADPH

(K_m^{NADPH}). Estos cálculos se llevaron a cabo en base a la curva generada al representar la desaparición de NADPH y DHF frente al tiempo. Para ello se hicieron 10 mediciones.

Para las determinaciones de la K_m^{DHF} y K_m^{NADPH} , la concentración inicial saturada de NADPH (100 μM) y DHF (200 μM) fue considerada constante durante el consumo total de 10 μM DHF o 20 μM de NADPH por la enzima. Es decir, que para la determinación de la K_m^{DHF} los ensayos se realizaron a $[\text{NADPH}] \gg [\text{DHF}]$ y el consumo de NADPH se consideró despreciable durante el transcurso de la reacción. De la misma manera, durante el cálculo de la K_m^{NADPH} los ensayos se realizaron a $[\text{DHF}] \gg [\text{NADPH}]$ y el consumo de DHF se asumió como despreciable durante la reacción.

Los datos se ajustaron mediante una regresión no lineal a la forma integrada de la ecuación de Michaelis (Cornish-Bowden, 1979) utilizando el algoritmo de Marquardt (Marquardt, 1963) aplicado con el software Sigma Plot (SPSS 2.01) para Windows (Sigma Plot SPSS Inc, Chicago, Illinois).

3.2.7. Inmuntinción de hDHFR en secciones de crisálida

Las crisálidas se cortaron en 2 partes y se fijaron en acetona fría durante 10 min (-20°C). Posteriormente, se lavaron en PBS frío 3 veces y fueron incubadas en BSA al 3% durante 30 min a modo de bloqueo para evitar marcajes inespecíficos de los anticuerpos. Tras esto, se lavaron de nuevo 3 veces en PBS.

Para visualizar las diferencias en contenido de hDHFR en el insecto, las muestras se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-hDHFR (D0942) en dilución 1:500 en PBS con BSA al 3%.

Al día siguiente se lavaron en PBS y se incubaron 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo: IgG Alexa fluor 633 (Invitrogen, España), diluido 1:1000 en disolución de BSA (1%) en PBS. Se realizaron controles negativos sin anticuerpo primario y/o secundario.

Finalmente las muestras fueron lavadas en PBS y examinadas con el equipo Typhoon 9410 laser scanner imager (GE healthcare, España).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Diseño del vector viral para la expresión de hDHFR en *B. mori*

La expresión de proteínas heterólogas en gusano de seda se realiza comúnmente infectando larvas de este insecto con baculovirus modificados genéticamente. Para ello, el gen de la poliedrina es sustituido por el que se quiere expresar.

Existen diversos kits de expresión cuyo mecanismo de acción es básicamente éste, pero emplean el baculovirus denominado AcNPV, solo infectivo para determinadas líneas celulares y para larvas de *Trichoplusia ni*. Para emplear *B. mori* como plataforma de producción de proteína recombinante es necesario emplear el baculovirus BmNPV, teniéndose que preparar un vector específico a tal efecto. Por este motivo se recurrió a la colaboración del Dr. Xiaofeng Wu, del *College of Animal Sciences*, de la Universidad de Zhejiang (Hangzhou, China). Este investigador dispone de un novedoso y altamente eficiente sistema de expresión que emplea un baculovirus híbrido con capacidad infectiva también en *B. mori* (Cao y col., 2006).

El gen de la hDHFR conteniendo la secuencia de lectura abierta (ORF) fue suministrado por Invitrogen e insertado en el plásmido pENTR221 (figura 3.12).

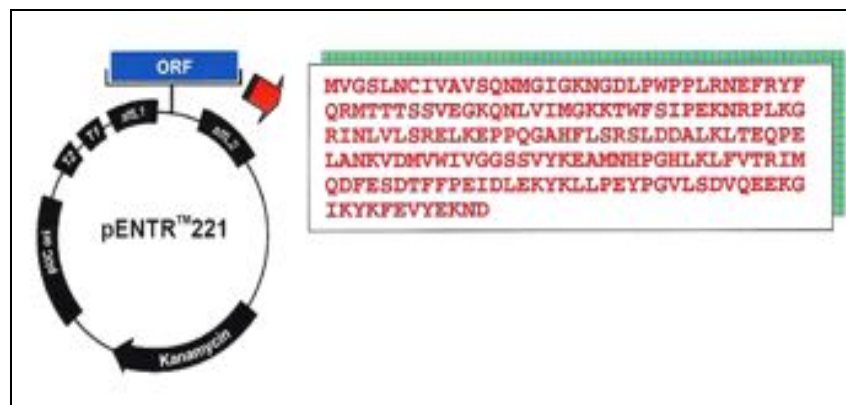


Figura 3.12. Estructura del plásmido pENTR221 conteniendo en su ORF el gen de la hDHFR

Este gen se clonó y, haciendo uso del sistema de expresión BmNPV/Bac-to-Bac, se generó un baculovirus recombinante, tal y como se detalla en el apartado de material y métodos. La inserción del gen de interés en el BmBacmid fue corroborada mediante PCR.

3.3.2. Expresión de hDHFR en *B. mori*

El virus recombinante con el gen de la hDHFR fue empleado para la inoculación de larvas y crisálidas de *B. mori*, así como cultivos de la línea celular sf21, tal y como se explica en el apartado de material y métodos. En todos los casos se mostró una alta eficiencia infectiva en torno al día 5 tras la inoculación (figura 3.13).



Figura 3.13. Síntomas de infección por baculovirus observados en cultivos celulares sf21 (A2), larvas de quinto estado (B2) y crisálidas (C2) de *B. mori*. Las fotografías A1, B1 y C1 corresponden a los controles negativos de experimentación (no infectados).

Los cultivos de células sf21, empleados para aumentar la titulación viral, mostraron cambios morfológicos como vacuolización y pérdida de la integridad estructural de sus membranas adoptando formas asimétricas y desaparición de la turgencia característica de las células sanas.

En el caso de los preimagos inoculados, se detectó pérdida de apetito, en los gusanos, y flacidez y empardecimiento tanto en gusanos como en crisálidas. Más allá de los 6 días post inoculación se comenzaba a producir la necrosis tisular de los ejemplares de estudio y sus consiguiente muerte, por tanto, se procuró no superar estos tiempos de incubación tras la infección a las dosis estudiadas.

Para confirmar la expresión de la proteína de interés, se realizaron extractos de los ejemplares inoculados y de controles negativos sin infectar. Estos fueron sometidos a SDS-PAGE, para, posteriormente, realizar un *Western Blot* (figura 3.14) transfiriendo las proteínas a membranas de nitrocelulosa e incubando las mismas con el anticuerpo específico que reconoce el extremo C-terminal de la hDHFR. Otros geles fueron teñidos directamente con plata para la visualización de todas las proteínas extractadas (figura 3.15).

Los controles negativos (CN) tanto de crisálidas como gusanos (no mostrados) no manifestaron expresión de hDHFR, por el contrario, la presencia de la misma fue clara tras el revelado del *Western Blot* en los ejemplares inoculados

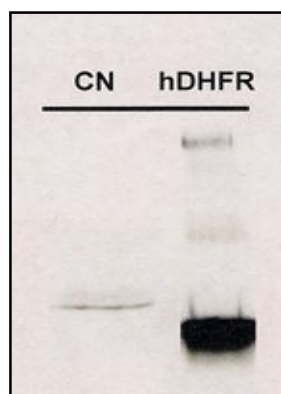


Figura 3.14. Resultados del *Western Blot* realizado a extractos crudos de crisálidas de *B. mori* no infectadas (CN) e infectadas por el baculovirus recombinante (hDHFR) a fin de detectar la expresión de hDHFR, siendo positiva en la segunda calle pero no en el caso de las crisálidas “control negativo”.

Las proteínas en el rango de 20-30 kDa fueron extraídas del gel, digeridas con tripsina y analizadas por HPLC-MS. Se encontraron hasta 9 fragmentos peptídicos correspondientes a la hDHFR (entrada AAH70280, base de datos NCBI nr), incluyendo los extremos N- y C-terminal de la enzima, ausentes en el control negativo.

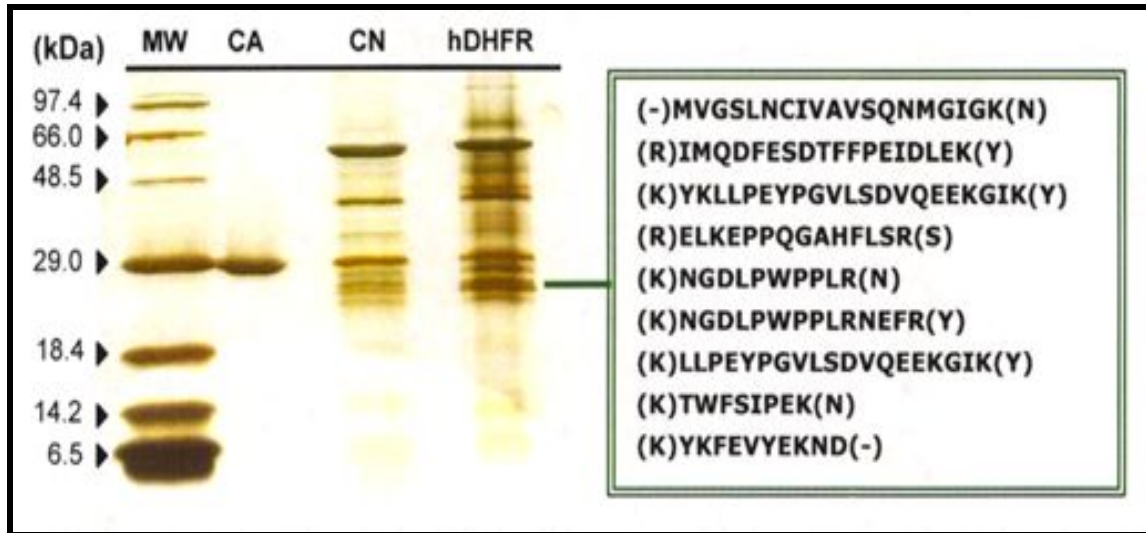


Figura 3.15. Tinción de plata de SDS-PAGE (12,5%) realizado a extractos crudos de crisálidas no inoculadas (CN) e inoculadas con el baculovirus recombinante conteniendo el gen de la hDHFR (hDHFR). En la primera calle se encuentra el marcador de peso molecular (MW) y en la segunda (CA) se cargó anhidrasa carbónica (29 kDa). El cuadro verde muestra las secuencias proteicas obtenidas por HPLC-MS tras la digestión de la banda en torno a 21,5 kDa, correspondientes a hDHFR.

Como prueba complementaria también se realizó una inmunotinción para detectar DHFR en secciones de crisálida, confirmándose una vez más la expresión de la enzima de forma contundente, la presencia de la proteína en cuestión (se visualiza en la figura 3.16 en rojo).

Se observó una infectividad de en torno al 95% de las larvas y crisálidas inoculadas y se realizó una estimación de la producción total de DHFR obtenida de extractos crudos de grupos de 50 larvas y 50 crisálidas. Ésta fue calculada en base a la actividad DHFR cuantificada como se planteó en el apartado de material y métodos (tabla 3.1).

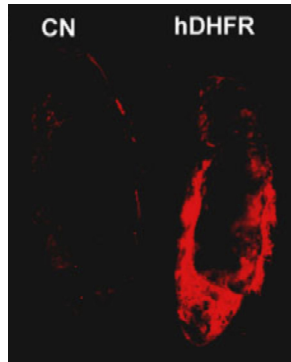


Figura 3.16. Prueba inmunohistoquímica de expresión de hDHFR en crisálidas

Se obtuvieron rendimientos muy elevados en el caso de la expresión en larvas, con valores medios de 582 $\mu\text{g}/\text{larva}$, esta producción es óptima comparada con la obtenida por otros autores que también emplearon el sistema de expresión de proteína heteróloga con baculovirus (Na y col., 2008).

Con las crisálidas se obtuvo un rendimiento medio de 190 $\mu\text{g}/\text{crisálida}$, casi 3 veces menor. Este dato, lejos de estar relacionado con una eficiencia menor en la infectividad, se encuentra vinculado al menor peso corporal de los ejemplares si lo comparamos con el de los gusanos de quinto estado. Este hecho queda claro al visualizar la tabla 3.1; en ésta se relativiza la producción relacionándola con la masa media de las dos fases larvarias y se pone de manifiesto que el rendimiento real en base a la misma es muy similar.

Estado preimaginal	Nº de ejemplares	Peso corporal del grupo (g)	Producción total de hDHFR (mg)	Producción media de hDHFR/ejemplar (μg)	Producción de hDHFR/peso corporal ($\mu\text{g}/\text{g}$)
Larvas	50	216,4	29,1	582	134,6
Crisálidas	50	74.4	9,5	190	127,8

Tabla 3.1. Rendimiento en la expresión de hDHFR en larvas y crisálidas de *B. mori*

3.3.3. Purificación de hDHFR-bm

La purificación de la proteína de interés presentó el problema de que los medios cromatográficos se saturaban debido a las uniones inespecíficas provocadas por otras proteínas de la hemolinfa del insecto. Tanto en el caso

de la expresión con larvas, como con las crisálidas, se salvó este inconveniente empleando la precipitación selectiva de estas proteínas con PEG 6000 para no saturar los medios cromatográficos empleados posteriormente (Nagaya y col., 2004).

Este método se puso a punto empleando concentraciones crecientes de PEG 6000 hasta conseguir la eliminación del mayor porcentaje de proteínas de la hemolinfa sin que se perdiese hDHFR. Para ello se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida de sobrenadantes y precipitados para cada una de las concentraciones estudiadas y se observó que PEG 6000 al 14% era la concentración óptima a tal fin, ya que se produjo la precipitación de muchas proteínas propias del gusano de seda sin precipitación de hDHFR (figura 3.17)

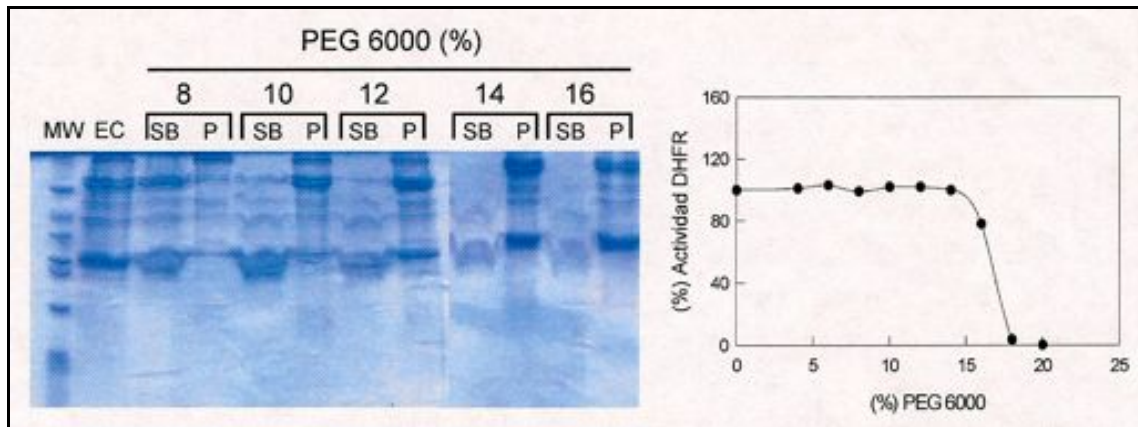


Figura 3.17. Precipitación con PEG 6000 del extracto crudo (EC) de crisálidas de gusano de seda inculadas con el baculovirus recombinante para la expresión de hDHFR. En la parte izquierda se presentan los resultados de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de los sobrenadantes (SB) y precipitados (P) obtenidos tras centrifugar los extractos tratados con PEG 6000 a distintas concentraciones. En la derecha se exponen los resultados de actividad DHFR obtenidos en los mismos sobrenadantes (similares resultados fueron obtenidos en el caso de las larvas).

El siguiente paso que se llevó a cabo fue una cromatografía de afinidad pasando las muestras a través de una resina que contenía MTX unido de forma covalente, que es un inhibidor de la hDHFR.

Para eluir las mismas muestras se empleó TMP (otro inhibidor competitivo de la DHFR). Esta elución dió lugar a muestras de alta pureza y ricas en hDHFR (figura 3.18). Para la posterior eliminación del TMP se empleó una columna de filtración Sephadex-G-25.

Como resultado de este protocolo de purificación se lograron muestras de hDHFR unas 200 veces más puras que el extracto crudo de partida (tabla 3.2) tanto en el caso de las larvas como en el de las crisálidas.

Las muestras se consideraron puras y homogéneas cuando se visualizó una sola banda en los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) revelados con tinción de plata (figura 3.18). La movilidad electroforética relativa de la proteína en cuestión, calculada a partir de los mismos, fue $22,5 \pm 1,5$ (valor medio \pm desviación estándar). Este resultado se aproxima al propuesto por otros autores (Prendergrat y col., 1988).



Estado preimaginal	Fase de la purificación	Proteína (mg)	Actividad (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Purificación (nº veces)
 Larvas	Extracto crudo	8099	73,5	$9,1 \times 10^{-3}$	100	1
	14% PEG 6000	2006	63,8	0,032	86,8	3,52
	MTX-agarosa ^a	7,53	-	-	-	-
	Sephadex G-25	5,96	11,53	1,93	15,7	212
 Crisálidas	Extracto crudo	2025	18,3	9×10^{-3}	100	1
	14% PEG 6000	501	15,9	0,032	83,9	3,56
	MTX-agarosa ^a	1,88	-	-	-	-
	Sephadex G-25	1,49	2,9	1,95	15,8	217

Tabla 3.2. Resumen de la purificación de hDHFR a partir de 50 ejemplares de larvas y crisálidas de *B. mori*. ^a actividad no medida por presencia del inhibidor, TMP

La pureza de las preparaciones de esta enzima tras el último paso del protocolo de purificación fue superior al 95%, siendo por tanto el método desarrollado adecuado para la obtención de proteína de interés con una gran calidad.

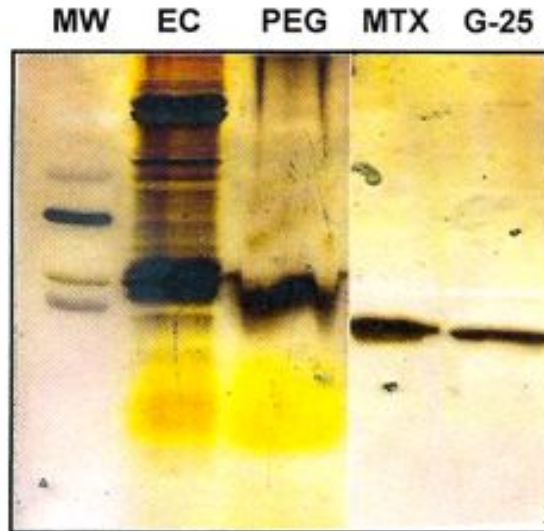


Figura 3.18. Resultados de SDS-PAGE revelado con tinción de plata para los extractos obtenidos en cada una de las fases de purificación de hDHFR producida en crisálidas de *B. mori* (similares resultados fueron obtenidos en el caso de las larvas). Siendo: MW, el marcador de peso molecular; EC, el extracto crudo; PEG, extracto tras la precipitación con PEG 6000 al 14%; MTX, proteína obtenida tras la purificación con MTX-agarosa y G-25, el resultado obtenido tras la filtración en sephadex G-25 para eliminar el TMP.

3.3.4. Caracterización cinética de hDHFR-bm

Dado que uno de los objetivos del presente trabajo era obtener un método de producción eficaz de hDHFR para estudios estructurales y de función de la misma, fue importante realizar una apropiada caracterización enzimática y su comparación con los mismos parámetros calculados para DHFR producida en *E. coli*, descritos por otros autores (hDHFR-ec^b) y también por nuestros colaboradores (hDHFR-ec^a). Éstos aparecen reflejados en la tabla 3.3.

Estos ensayos se realizaron utilizando los sustratos naturales del enzima (NADPH y DHF). La cinética se determinó mediante ajuste de la curva de progreso, en distintas situaciones, a la ecuación integrada de Michaelis. En la figura 3.19 se observa un ejemplo de este análisis en condiciones $[NADPH] \gg [DHF]$. La concentración de NADPH fue 100 μM y la de DHF 10 μM . De estos experimentos se obtuvieron los valores de K_m^{DHF} y V_{max} . La K_m^{NADPH} fue calculada en las condiciones totalmente opuestas, o lo que es lo mismo, $[DHF] \gg [NADPH]$.

Enzima	K_m^{DHF} (μM)	K_m^{NADPH} (μM)	k_{cat} (s^{-1})	Eficiencia catalítica ^c ($\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)
hDHFR-bm	$1,9 \pm 0,6$	$7,4 \pm 1,2$	51 ± 4	28
hDHFR-ec ^a	$1,6 \pm 0,5$	$7,2 \pm 1,0$	49 ± 4	31
hDHFR-ec ^b	$2,7 \pm 0,5$	$5,7 \pm 0,9$	40 ± 2	15

Tabla 3.3. Caracterización de la cinética enzimática de la hDHFR ^avalores obtenidos en este estudio; ^bvalores descritos por Cody y col., 2008; ^ceficiencia catalítica calculada respecto al DHF

Los valores calculados para la DHFR producida con *B.mori* y con *E.coli* fueron idénticos, lo cual indica un comportamiento igual sobre sus sustratos. Estos fueron también del mismo orden de magnitud a los calculados por Cody y col. en su trabajo de 2008 (tabla 3.3).

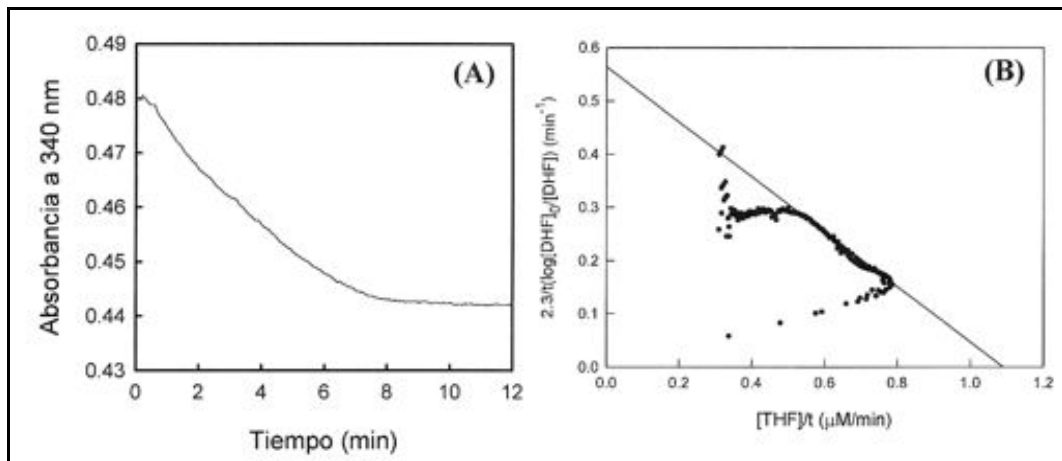


Figura 3.19. Ejemplo de determinación de la constantes cinéticas de hDHFR-bm para DHF empleando la integrada de la ecuación de Michaelis. La figura A representa el consumo de DHF en las condiciones $[\text{NADPH}] \gg [\text{DHF}]$ ($[\text{NADPH}] = 100 \mu\text{M}$ y $[\text{DHF}] = 10 \mu\text{M}$), con una concentración de hDHFR-bm de $1 \mu\text{M}$. La curva de progreso de esta (figura B) se analizó mediante la integrada de la ecuación de Michaelis. El corte en el eje X corresponde al valor de la V_{max} de la reacción, mientras que el corte en el eje Y es el valor de $V_{\text{max}}/K_m^{\text{DHF}}$ siendo la pendiente $-1/K_m^{\text{DHF}}$.

3.4 CONCLUSIONES

Los resultados mostrados a lo largo de este capítulo ponen de manifiesto la efectividad del sistema de producción de hDHFR empleando como biorreactor el gusano de seda (*B. mori*), siendo las características de esta enzima idénticas a las de la producida empleando *E.coli*.

Si bien el rendimiento en la purificación puede ser mejorable (en torno al 16%), el procedimiento desarrollado podría presentar un potencial interés comercial, ya que en la actualidad se podrían obtener unos 100 μg de proteína pura por larva y unos 30 μg por crisálida. Esto implica una producción de enzima, empleando "media" larva y tan sólo 2 crisálidas, del equivalente a 50 μg de proteína de interés; cantidad que la empresa ProSpec comercializa por un valor de mercado de 130 dólares (unos 100 euros).

A pesar de que el rendimiento por ejemplar es 3 veces superior cuando se emplean larvas de gusano, se ofrece un planteamiento novedoso, mediante la utilización de crisálidas de *B. mori* en la producción de proteína recombinante con el sistema BmNPV/Bac-to-Bac. Este podría plantear ventajas en términos económicos y de bioseguridad a la hipotética empresa encargada de su producción.

El empleo de larvas móviles en la generación de distintas proteínas recombinantes, simultáneamente, plantea riesgos por posibles contaminaciones cruzadas entre distintos lotes de gusanos. Además, éstos han de continuar siendo alimentados tras la inoculación de los baculovirus, lo cual requiere más personal encargado de ellos y un incremento en la posibilidad de que se den las citadas contaminaciones. En cambio, el uso de crisálidas reduce en gran medida estos riesgos, puesto que se trata de un estado preimaginal inmóvil, que no requiere alimentación y cuyo manejo es más sencillo, tanto para la inoculación como para su mantenimiento posterior, convirtiéndose incluso en un sistema de fácil mecanización.

Por otro lado las crisálidas, en nuestra experiencia, se pueden conservar en torno a un mes en refrigeración a unos 4°C siendo perfectamente viables para la expresión de la proteína recombinante tras estar expuestas a estas temperaturas. El empleo de gusanos requiere del mantenimiento de condiciones ambientales óptimas para que su desarrollo continúe de forma adecuada, siendo muy fácil que los mismos enfermen si se someten a regímenes térmicos cambiantes.

La utilización de las crisálidas supone también la generación de seda por parte del insecto de cara a la elaboración de los capullos, necesarios para completar la metamorfosis. Este subproducto, como se viene exponiendo a lo largo de la presente memoria de tesis, presenta un gran

valor por las posibles aplicaciones no textiles del mismo en el ámbito de la Ingeniería de Tejidos y la biomedicina en general. Por tanto, con el sistema de producción empleando crisálidas se podría cubrir, no solo el mercado de producción de proteínas recombinantes, sino también suplir de materia prima a otras empresas o laboratorios vinculados a la Ingeniería Tisular.

En la actualidad nos encontramos trabajando en la producción de otras proteínas recombinantes (factores de crecimiento, bFGF y VEGF) y en la mejora del proceso controlando parámetros como el momento óptimo de la inoculación tras la pupación o el tamaño corporal más adecuado para la misma, en el caso de los gusanos.

4. Influencia de la metodología de disolución de fibroína en las propiedades físicas de las mallas electrohiladas

4.1 Introducción

4.2 Material y métodos

4.2.1 Cría del insecto y procesado de la seda

4.2.2 Determinación de la solubilidad en agua de la fibroína liofilizada

4.2.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y tinción de Coomassie

4.2.4 Fabricación de materiales mediante electrohilado

4.2.5 Caracterización de los materiales

4.2.5.1 Microscopía electrónica de barrido y cálculo del tamaño de las fibras

4.2.5.2 Propiedades mecánicas de las mallas electrohiladas

4.2.5.3 Espectroscopía de infrarrojos

4.3 Resultados y discusión

4.3.1. Peso molecular de los péptidos resultantes

4.3.2. Solubilidad en agua de la proteína purificada

4.3.3. Espectroscopía de infrarrojos de la fibroína liofilizada

4.3.4. Tamaño de las fibras

4.3.5. Propiedades mecánicas

4.4 Conclusiones

4.1 INTRODUCCIÓN

Desde el surgimiento del primer equipo de electrohilado desarrollado por Formhals en 1934, han sido muy numerosos los estudios que han explorado las posibilidades de esta técnica aplicándola a disoluciones de multitud de polímeros. Pero fue a partir de 1998 cuando se incrementó exponencialmente el número de publicaciones al respecto (Huang y col., 2003). El creciente interés del “*electrospinning*” radica en la potencial aplicación de las micro y nanofibras elaboradas en diversos campos, pudiendo utilizarse como dispositivos de filtración (Nair y col., 2004), catalizadores, dispositivos electrónicos o en equipos militares y en multitud de aplicaciones biomédicas, tales como la Ingeniería Tisular y la liberación controlada de fármacos, entre otras (Megelsky y col. 2002). Este último aspecto es el que más atañe a la presente tesis y en el nos centraremos de aquí en adelante.

Una característica de la técnica de electrohilado es su dependencia de un gran número de variables, algunas de ellas, poco controlables. Esta variabilidad afecta a la consistencia de los materiales obtenidos. El problema se agrava con el electrohilado de fibroína de seda, pues al ser éste un material biológico presenta su propia variabilidad. Por otra parte, existen diversos protocolos de procesamiento de la fibroína que presentan diferentes características y que no han sido comparados entre sí. Por tanto, en esta parte del trabajo, el objetivo se centra en determinar como influye el protocolo de procesamiento en la resistencia mecánica y características de la malla electrohilada resultante.

Dada la posibilidad de electrohilar gran variedad de disoluciones de fibroína, se vienen realizando multitud de experimentos encaminados al uso de mallas electrohiladas de esta proteína de la seda en el ámbito de la medicina regenerativa (Zhang y col., 2009). A modo de ejemplo, se pueden citar las fibras electrohiladas de quitina y seda conseguidas por Park y col. (2004), las de colágeno y seda en HFIP elaboradas por Yeo y col. (2008) o las de fibroína electrohilada por Gandhi y col. (2009) con nanotubos de carbono.

Wang y col. (2006) encapsularon con éxito un núcleo de fibroína en una envuelta de polietilenglicol mediante electrohilado coaxial de ambas

disoluciones, Aznar y col. (2012) elaboraron mallas de fibroína de seda electrohilada cubierta de polipirrol y Li y col. (2006) añadieron proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) en nanofibras de seda, mezclando dicha proteína en la disolución de hilado.

Éstos, son solo unos cuantos ejemplos de las presentaciones potenciales de la fibroína de seda electrohilada que han sido elaboradas hasta el momento actual, sin embargo, queda un largo camino por explorar en cuanto a los diversos factores que afectan al electrohilado, ya que las características físicas, químicas y estructurales de las mallas generadas se verán notablemente condicionadas por los mismos.

Ohgo y col. (2003) relacionaron la concentración de fibroína de seda (SF) en hexafluoroacetona (HFA) con el tamaño de las nanofibras y Jeong y col. (2007) estudiaron los efectos del uso de distintos solventes en el electrohilado de la misma. El resultado de sus experimentos muestra que la mayor tasa de evaporación del hexafluoroisopropanol (HFIP) promueve un tamaño mayor de las fibras si lo comparamos con la elaboración de las fibras en ácido fórmico (FA).

Según Wang y col. (2006) se requiere el uso de fibroína acuosa concentrada para facilitar el electrohilado, si la viscosidad es menor de 40 mPa el electrohilado no se desarrolla bien. Por otro, lado la relación entre peso molecular y concentración mínima de la disolución está aun por determinar (Zhang y col 2009).

Sobre los parámetros relacionados con el proceso, esta descrito que, generalmente, un incremento en el voltaje genera un descenso en el diámetro de las fibras seguido de un incremento en el mismo a partir de un cierto nivel (Sill y von Recum, 2008). El flujo de la disolución es un parámetro muy importante en la estabilización de la forma del cono de Taylor para mantener un chorro continuo de fibras (Taylor, 1969). La distancia entre la punta de la aguja capilar (inyector) y el colector puede afectar también el tamaño y forma de las fibras, siendo este factor menos importante. La formación de cuentas ("*beads*") a lo largo de las fibras se incrementa cuando la distancia es demasiado corta o demasiado larga (Lee y col., 2004).

En cuanto a los métodos de cristalización de la fibroína se han descrito diversos protocolos, siendo las más utilizadas el vapor de agua o la inmersión en baños de metanol o etanol. Como se comenta en la introducción general, el tratamiento con metanol produce materiales con valores mayores de módulo de Young, mientras que el tratamiento con vapor de agua proporciona mejores propiedades elásticas (Zhang y col. 2009).

A pesar de los numerosos estudios que se pueden encontrar en la bibliografía sobre el electrohilado de fibroína de seda, aun es difícil predecir el resultado de del proceso debido al efecto interrelacionado de multitud de parámetros, como por ejemplo peso molecular y concentración de las disoluciones (Zhang y col., 2009).

Trabajos como el llevado a cabo por Yamada y col. (2001) dan un paso más en el análisis de la degradación de la fibroína según el protocolo de purificación, evaluándolo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, pero no comparan los tres protocolos más usados en la disolución de la "seda cocida" (fibroína sin sericina) sino otros parámetros también de interés. Wadbua y col. (2010) realizan un estudio similar al aquí propuesto, comparando la degradación proteica observada en fibroína disuelta con distintos protocolos (pero no el de CaCl_2) e incluso determinan la biocompatibilidad con fibroblastos NIH 3T3 de mallas electrohiladas con las dos cadenas proteicas y con cadenas ligeras y pesadas por separado. No evalúan, por el contrario, las propiedades mecánicas de las mallas elaboradas ni establecen diferencias directas entre fibroínas extraídas con los distintos procedimientos y las mallas generadas.

Por otro lado, Cao y col (2009) aportan una visión global de las propiedades mecánicas de las mallas de fibroína de seda electrohilada, comenzando a relacionar las mismas con los procesos de degradación sufridos por la proteína nativa, pero solo evalúan mallas de fibroína extraída con disolvente ternario y el electrohilado se realiza en disolución acuosa.

En este trabajo se describen las propiedades mecánicas y tamaño de las fibras de mallas electrohiladas (con HFIP) a partir de fibroína obtenida mediante distintos protocolos de procesamiento. Se ofrece una visión global de los pesos moleculares de los péptidos resultantes de cada procedimiento y se analizan también los espectros de infrarrojos obtenidos. Por último, se

determina el porcentaje de fibroína insoluble en agua que se genera con cada método, siendo este factor importante de cara al uso de disoluciones acuosas obtenidas a partir de fibroína liofilizada.

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Cría del insecto y procesado de la seda

La cría de los gusanos, en este caso, se llevó a cabo con el fin de producir seda para la elaboración de los materiales electrohilados. A tal efecto, se siguió la metodología descrita en el capítulo anterior (punto 3.2.1), llevando a término el ciclo vital de los insectos.

Los distintos métodos para el procesado de la seda (figura 4.1), de cara a la purificación de la fibroína, siempre llevan asociada una primera fase de eliminación de la sericina. Esta última es inmunógena y podría producir respuesta inflamatoria o rechazo de un implante elaborado con fibroína mal purificada.

Para la eliminación de la sericina los capullos se hirvieron dos veces durante 45 min en una disolución 0,02N de Na_2CO_3 (Panreac, España) y, posteriormente, fueron lavados con agua destilada para extraer la sericina. La fibroína, ahora en forma de "malla algodonosa", fue secada a temperatura ambiente durante 72h. Después se siguieron 3 protocolos distintos para disolver la fibroína nativa, según lo descrito por Zhang y col. en su revisión sobre materiales electrohilados de la seda de 2009:

- Protocolo basado en uso de CaCl_2 .

La fibroína fue disuelta en relación 5% (p/v) en una disolución de CaCl_2 (Sigma-Aldrich, EE.UU) 100% (p/v) a 70°C evitando la ebullición durante 6 h.

-Protocolo basado en uso del reactivo de Ajisawa.

Se trata de un disolvente ternario compuesto por CaCl_2 :Etanol:Agua en relación molar 1:2:8 respectivamente (Ajisawa, 1998). La fibroína fue disuelta al 10% (p/v) en este disolvente durante 4 a 6 h a 70°C evitando la ebullición. El etanol fue suministrado por Panreac, España.

- Protocolo basado en uso de LiBr

En este caso se utilizó una disolución acuosa 9,3 M de LiBr (Acros Organics, Bélgica) para disolver la fibroína en relación 20% (p/v) durante 3h a 60°C.

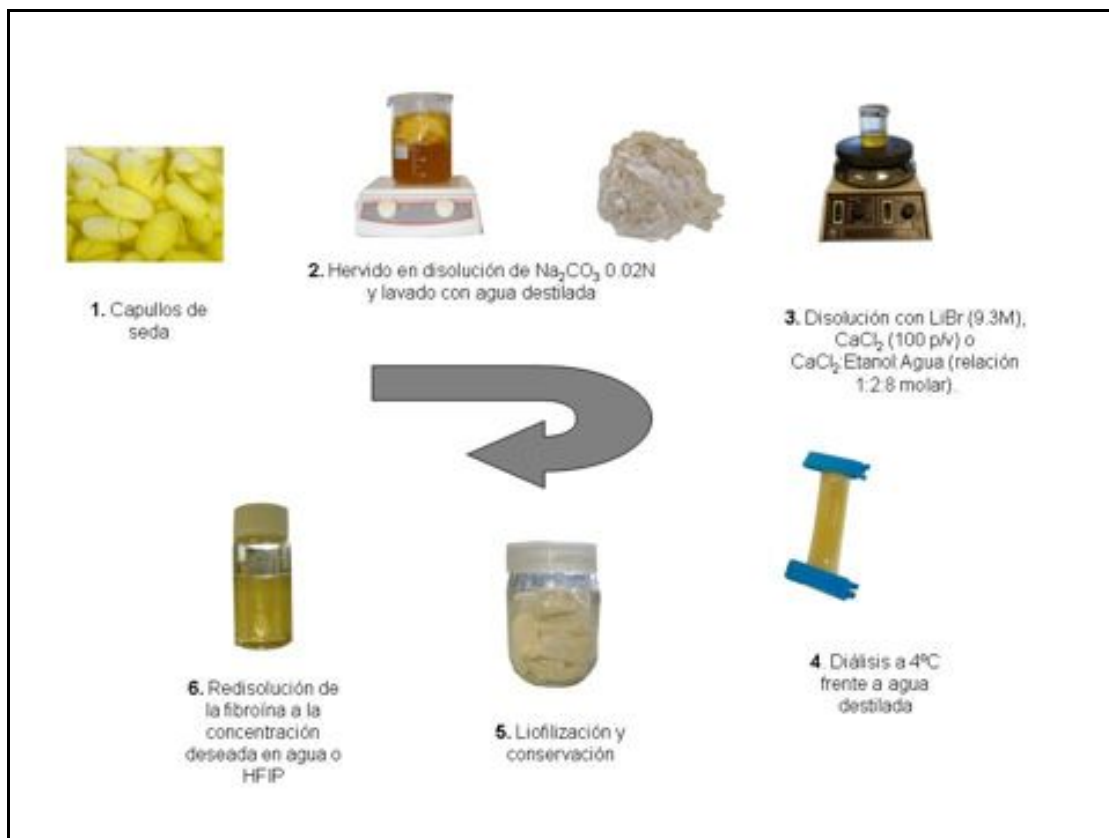


Figura 4.1. Procesado de la seda para la obtención de fibroína purificada.

El paso final, común a los 3 protocolos descritos, consistió en un proceso de diálisis frente a agua destilada durante 3 días (con dos cambios de agua por día), para eliminar las sales utilizadas en el proceso de disolución. Posteriormente se realizó un filtrado con papel Miracloth (Calbiochem, Alemania), liofilización de las disoluciones acuosas para la conservación de la fibroína y posterior redisolución en hexafluoroisopropanol (HFIP) (Sigma-Aldrich, EE.UU) o agua, a la concentración deseada, según el experimento a desarrollar.

Es importante resaltar que la diálisis ha de llevarse a cabo a 4°C para evitar la gelificación de la proteína en solución, sobre todo en verano. El tamaño de poro de las bolsas de diálisis de celulosa fue 11,8 Kda (Sigma-Aldrich, EE.UU).

La liofilización se realizó empleando el equipo Christ ® Alpha 1-2 LD Plus provisto de una bomba de vacío Vaccubrand 2.5.

4.2.2. Determinación de la solubilidad en agua de la fibroína liofilizada

A pesar de que las disoluciones de trabajo de la presente tesis se realizaron en su mayoría empleando como disolvente HFIP, durante determinados experimentos se puso de manifiesto el hecho de que la solubilidad en agua de la proteína liofilizada era distinta según el protocolo de extracción empleado.

Para determinar el porcentaje de solubilidad en agua de esta proteína teniendo en cuenta el factor previamente mencionado, se realizaron 3 disoluciones de fibroína acuosa al 4% (p/v) por cada protocolo y se mantuvieron en agitación suave durante 24h. Previamente, se pesaron los tubos de ensayo (liofilizados) para conocer su masa exacta.

Transcurridas 24h se realizó una centrifugación de 15 min a 4.000 rpm descartándose el sobrenadante de cada disolución. Los tubos fueron lavados 2 veces de esta manera.

Por último se liofilizaron los tubos con los residuos insolubles de cada protocolo y se realizaron los cálculos por diferencia de pesadas.

Los valores de porcentaje de proteína insoluble se estimaron en función de la fibroína liofilizada de partida y se analizaron estadísticamente con el software SPSS 18 a fin de conocer la existencia de diferencias significativas según el protocolo de disolución mediante el test de Kruskal-Wallis (valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos).

4.2.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y tinción de Coomassie

La visualización del tamaño de los péptidos de fibroína resultantes tras el procesamiento de la seda nativa se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% (Laemmli, 1970) y tinción con azul brillante de Coomassie.

Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas dado que son transparentes, elásticos, de

porosidad controlable y compatibles con muchos compuestos químicos. La poliacrilamida se forma por copolimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilen-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiléndiamina (TEMED) y el persulfato de amonio. El radical persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice. Las cadenas de acrilamida son entrecruzadas al azar por la bis-acrilamida, formándose una red de porosidad bastante uniforme, pudiéndose variar esta con las condiciones de la reacción y con la concentración de partida de los monómeros.

Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE por sus siglas en inglés "*polyacrylamide gel electrophoresis*"), la más utilizada es la que se lleva a cabo en presencia del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), tanto para analizar mezclas de proteínas, como para ser combinada con técnicas de inmunoelectrotransferencia (*Western Blot*). En la técnica SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados cargados negativamente. La cantidad de SDS unido a las proteínas es proporcional a su tamaño y se crean complejos de estructura elipsoide o de bastón, donde la cadena proteica es distendida y solubilizada por el detergente. Dado que la relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas (se anula su carga intrínseca), éstas son separadas a través del gel poroso en base a sus diferencias de peso molecular (P_m); a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína y viceversa.

Esta técnica permite por tanto estimar el P_m de una proteína comparando su movilidad con las proteínas de referencia de P_m conocido que van incluidas en el marcador comercial.

La tinción de Coomassie colorea de forma específica las proteínas y tiene una gran sensibilidad (0,5 μg), la disolución se prepara (para obtener 500 ml de la misma) con 0.25 g de colorante Coomassie blue R-250 (Across organics, Bélgica), 230 ml de agua desionizada, 225 ml de metanol (Scharlau, España) y 46 ml de ácido acético (Scharlau, ESPAÑA). Se disuelve el colorante en metanol, se añade después el ácido y, por último el agua. Luego se filtra y queda listo para su utilización. Se puede reutilizar teniendo en cuenta que va perdiendo sensibilidad en la detección proteica.

A continuación se enumeran el resto de reactivos necesarios, describiendo su composición si se elaboraron en nuestro laboratorio:

- Solución de monómeros de acrilamida y bis-acrilamida (Sigma-Aldrich, EE.UU).
- Tampón del gel separador (inferior): 18,5 g de Tris-(hidroximetil)-aminometano (Scharlau, España), 60 ml de agua desionizada, se ajusta pH con HCl a 8,8 y se afora a 100 ml (conservación a 4°C).
- Tampón del gel compactador (superior): 3,0 g de Tris, 60 ml de agua destilada, se ajusta pH a 6,8 con HCl y se afora a 100 ml (conservación a 4°C).
- Tampón de electroforesis ("running buffer"): 12 g de Tris, 57,6 g de glicina (Scharlau, España), 4 g de sodio laurilsulfato (SDS) (Scharlau, España), disolver en 300 ml de agua y aforar a 400 ml. Este tampón está al 10X (10 veces concentrado), con lo cual se ha de diluir hasta 1X en el momento de su utilización.
- Persulfato de amonio (Scharlau, España): Preparar disolución al 10% (p/v), alícuotar y congelar en tubitos de 200 microlitros.
- Disolución acuosa de SDS al 10% (p/v).
- Tampón de carga (reductor): 1,25 ml de tampón del gel compactador (pH 6,8), 4 ml de disolución de SDS al 10% (p/v), 0,2 ml de disolución de azul bromofenol (Merck, Alemania) al 0,1 % (p/v) en acuoso, 2 ml de glicerol (Sigma-Aldrich, EE.UU), 1 ml de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, EE.UU) y se enrasa hasta 10 ml con agua desionizada. Este tampón es 2X y quedara a 1X tras ser mezclado a partes iguales previamente a la electroforesis.
- Fijador: 500 ml de metanol, 70 ml de ácido acético glacial (Scharlau, España) y 430 ml de agua desionizada.
- Decolorador: 200 ml de metanol, 100 ml de etanol, 50 ml de ácido acético y 650 ml de agua.

El kit utilizado para la elaboración de minigeles y la electroforesis es el de Bio-Rad (Mini-Protean II) (figura 4.2). Los reactivos a mezclar están adaptados para elaborar estos geles de 0,75 mm de espesor (5 ml).

En primer lugar se elaboró la mezcla del gel separador al 12,5 % de acrilamida/bis-acrilamida compuesta por 1.683 μ l de agua destilada, 1.250

μ l de tampón de gel separador, 50 μ l de SDS al 10% (p/v) y 2 ml de mezcla de monómeros de acrilamida. La polimerización se desencadenó con la adición de 50 μ l de persulfato amónico y 4 μ l de N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Scharlau, España). Previamente se ha de tener listo el molde de vidrio sobre el que se vierte la mezcla y con la marca del nivel que queremos que alcance el mismo.



Figura 4.2. Kit de electroforesis empleado para SDS-PAGE

Tras verter el gel separador, se añade una capa de 1 o 2 mm de agua destilada que será descartada antes de añadir la mezcla del gel concentrador.

Transcurridos 20 min y una vez eliminada esta capa de agua se añade la mezcla que dará lugar al gel concentrador, constituida por 3,4 ml de agua, 630 μ l de tampón del gel compactador, 830 μ l de mezcla de acrilamida, 50 μ l de disolución de SDS, 50 μ l de la de persulfato amónico y 4 μ l de TEMED. Inmediatamente después, se coloca un peine de 15 pocillos en la parte superior que dará lugar a las distintas calles de carga del gel tras la polimerización del mismo.

Mientras el gel polimeriza se pueden preparar las muestras de proteína a cargar, mezclando a partes iguales tampón de carga y solución proteica acuosa. Para luego darles un choque térmico de 100 °C durante 5 minutos.

Los cálculos de concentración, estimados previamente mediante la tinción de Bradford, sirven para que todo el gel sea comparable si se estandariza la cantidad de proteína total a cargar en cada calle. Para ello se usó el reactivo de Bradford (Applichem, Alemania), un espectrofotómetro

para leer absorbancias a 595 nm (Fluostar Galaxy), diluciones de nuestras muestras y un patrón con cantidades conocidas de una proteína (albúmina por ejemplo) para hacer una recta de calibrado y poder calcular la concentraciones problema extrapolando los valores de absorbancia obtenidos.

Tras esto se llenó el tanque de electroforesis con el "running buffer" y se cargaron unos 20 µg de proteína por calle (5 µl de muestra redisuelta a la concentración calculada y 5 µl de tampón de carga). El gel fue sometido entonces a una corriente de 100V durante 2 horas (hasta que el frente de avance, marcado por el azul de bromofenol, llegó casi al final del gel).

Después de la electroforesis los geles fueron extraídos del molde, se sometieron a un baño de 15 minutos en fijador y se tiñeron durante 1 hora en la disolución de azul de Coomassie para, por último, decolorar el exceso de tinción (2 lavados de 15 minutos) y visualizar la distribución de los péptidos de fibroína a lo largo de las calles.

La información visual de los geles fue digitalizada haciendo uso de un escáner y, más adelante, las imágenes obtenidas fueron analizadas usando el software ImageJ y la función "analyze gel" que genera un perfil de picos cuya intensidad (área de la curva que engloban) está directamente relacionada con las zonas más teñidas de este y con la presencia de péptidos de esos pesos moleculares.

Se tuvo en cuenta que, en cada gel, el *background* (color de fondo) generado por el azul de Coomassie sobrante es distinto (en función del proceso de decoloración) y se tenía que restar esta señal de alguna calle vacía (control negativo) a la señal aportada por las calles cargadas con muestra.

Se establecieron distintas categorías de peso molecular para el estudio pormenorizado de los porcentajes de péptidos que había en ese rango. Estas categorías fueron definidas por los pesos moleculares de algunas de las proteínas marcadoras: >220, 220-120, 120-60 y <60 kDa.

Se usaron dos marcadores proteicos de peso molecular distinto para poder contrastarlos, marcador electroforético coloreado (Pm 8.000-220.000 Da) de Sigma-Aldrich y otro no coloreado, BenchMark de Invitrogen (Pm 10.000-220.000 Da), en la primera y última calle respectivamente.

Los resultados sobre porcentajes peptídicos para cada una de las categorías de estudio fueron analizados estadísticamente con el software SPSS 18 a fin de detectar diferencias significativas. El experimento se llevó a cabo 6 veces. Se empleó el test de ANOVA y valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

4.2.4. Fabricación de materiales mediante electrohilado

Los biomateriales de fibroína de seda elaborados para nuestros ensayos se hicieron mediante la técnica conocida como electrohilado ("*electrospinning*" en inglés), descrita por Formhals (patente de EE.UU 1.975.504, 1934).

El equipo de electrohilado consta básicamente de 3 componentes: una fuente de alto voltaje, una aguja capilar y un colector con una toma de tierra (figura 4.3). Durante el electrohilado se aplica una diferencia de potencial eléctrico a un flujo de disolución polimérica que procede de una aguja inyectora metálica o pipeta. Este flujo de disolución es mantenido por una bomba o mediante la fuerza de la gravedad (Hohman y col. 2001).

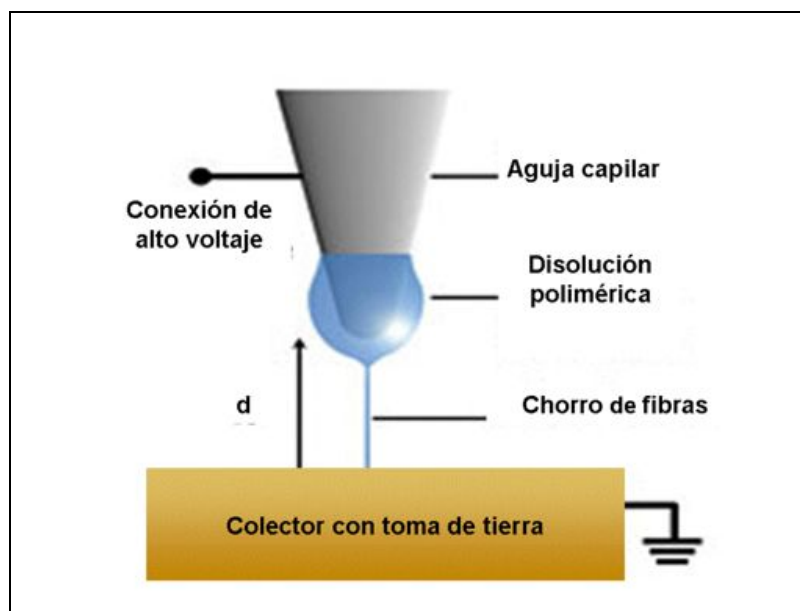


Figura 4.3. Diagrama ilustrativo de los elementos básicos del equipo de electrohilado.

La fuerza de repulsión de las cargas en disolución, así como la fuerza de atracción entre el líquido y el colector, trabajan juntas para vencer la

tensión superficial de la disolución polimérica. Esta fuerza junto a la fuerzas viscoelásticas de la disolución tienden a mantener la forma hemisférica de la gota, mientras que el campo eléctrico aplicado, empuja a la gotita alejándola de la aguja capilar (Fang y Reneker, 1997). A medida que se incrementa el voltaje hasta un valor crítico, en que las fuerzas electrostáticas se equilibran con la tensión superficial, se va formando el llamado cono de Taylor. Como resultado de ello, se genera un chorro de fibras que parten del extremo del cono y se dirigen hacia el colector (Fong y Reneker, 2001).

En todos los casos, la disolución de trabajo utilizada estuvo compuesta por fibroína de seda al 17% (p/v) en HFIP. Esta fue determinada como la óptima al trabajar con el protocolo de disolución que usa LiBr, tras numerosos intentos fallidos de electrohilarla en disolución acuosa o con concentraciones menores de fibroína.

Para el desarrollo de la presente tesis se han utilizado 2 tipos de equipos de electrohilado distintos. A continuación, se describe el empleado para elaborar las mallas electrohiladas de este capítulo (figura 4.4).



Figura 4.4. Equipo de electrohilado empleado para la elaboración de las mallas de fibroína de seda extraída con distintos protocolos, ubicado en las instalaciones del ISN (*Institute for Soldier Nanotechnologies*, Boston, EE.UU).

El diseño del equipo de electrohilado es el propuesto por Wang y col. (2006) y está compuesto por un disco metálico superior al que se conecta la

fuente de alto voltaje Gamma High Voltage Research ES-30P. Éste presenta un orificio central que alberga la aguja inyectora, a su vez conectada a la bomba inyectora Harvard Apparatus PHD 2000 que porta la jeringuilla cargada con la disolución de trabajo.

El colector utilizado fue una superficie cuadrada de cartón (de 15x15 cm) cubierta de papel de aluminio y dotada de una toma de tierra sobre la cual se depositaron las fibras. El caudal aplicado en la bomba inyectora fue 0,05 ml/min la distancia entre inyector y colector 20 cm, el voltaje aplicado +23 kV y la cantidad de disolución depositada 5 ml ($22 \mu\text{l}/\text{cm}^2$).

El tratamiento posterior al electrohilado consistió en el baño con metanol de los materiales elaborados durante 40 min, para promover así el cambio de conformación molecular de seda I (*random coil*) a seda II (lamina beta) Éstos son los estados soluble e insoluble en agua respectivamente.

Se elaboraron 3 mallas para cada protocolo de disolución de fibroína (figura 4.5) a fin de disponer de datos con los que hacer un análisis estadístico.



Figura 4.5. Imagen macroscópica de fibroína de seda extraída con distintos protocolos.

4.2.5. Caracterización de los materiales

4.2.5.1. Microscopía electrónica de barrido y cálculo del tamaño de las fibras

El microscopio electrónico de barrido (MEB o SEM por sus siglas en inglés "*Scanning Electron Microscope*") es aquel que utiliza un haz de electrones para formar una imagen. Aporta una gran profundidad de campo y permite trabajar a altas resoluciones, lo cual conlleva la posibilidad de examinar las muestras a alta magnificación. Se pueden observar por tanto detalles del orden de nanómetros. Éste, a diferencia del microscopio óptico,

sustituye la luz por el haz de electrones que barre la muestra y las lentes por electroimanes.

Las muestras han de ser conductoras para poder visualizarse al MEB, y, para ello, fueron cubiertas con una delgada capa de oro-paladio mediante un metalizador (Polaron SC7640). Previamente a este paso se dejaron secar totalmente para permitir la evaporación del HFIP. La observación de las mismas se llevó a cabo utilizando el microscopio Jeol-JSM-6060 (figura 4.6).



Figura 4.6. Microscopio electrónico de barrido Jeol-JSM-6060 ubicado en las instalaciones del ISN ("Institute for Soldier Nanotechnologies", Boston, EE.UU)

El haz de electrones fue acelerado a una diferencia de potencial de 10.000 V y se tomaron fotografías a distintas magnificaciones y en distintos ángulos para calcular los tamaños de las fibras, visualizar su morfología y corroborar los grosores de las mallas calculados con el microcalibre.

El diámetro de las fibras y el grosor de las mallas fue determinado usando el programa ImageJ. Se midieron 25 fibras para cada malla usando al menos 3 fotografías por malla, habiendo 3 mallas por tratamiento de estudio (protocolo de disolución de fibroína de seda)

Las comparaciones se llevaron a cabo utilizando la prueba ANOVA de un factor ($p < 0,05$ fue considerado significativo) con el programa SPSS 18 para Windows.

4.2.5.2. Propiedades mecánicas de las mallas electrohiladas

Una de las características que tiene que presentar un buen biomaterial ha de ser la de garantizar el mantenimiento de la integridad estructural del

lugar en que se pretenda implantar, hasta que el propio organismo o las células cultivadas sobre él asuman esta misión de forma efectiva.

Dado que el fin último de las mallas de fibroína de seda es ser utilizadas como biomateriales o andamiajes para el crecimiento y regeneración de tejidos dañados, fue imperativa la descripción y optimización de las propiedades mecánicas de las mismas, teniendo en cuenta el modo en que afecta el protocolo de disolución de la fibroína de seda a éstas.

Para la caracterización de estas propiedades mecánicas se hicieron tests de resistencia a la tracción utilizando el aparato Zwick-Roel Z010 ubicado en las instalaciones del ISN (*"Institute for Soldier Nanotechnologies"*, Boston, EE.UU) (figura 4.7).

Este ensayo estudia el comportamiento de un material sometido a un esfuerzo de tracción progresivamente creciente, ejercido por una máquina hasta conseguir la rotura del mismo. A partir de las gráficas de tensión-deformación (o de tensión-fatiga) generadas, se pudieron calcular parámetros como el Modulo de Young (MPa), la resistencia última (MPa) y la elongación (%) de los materiales.

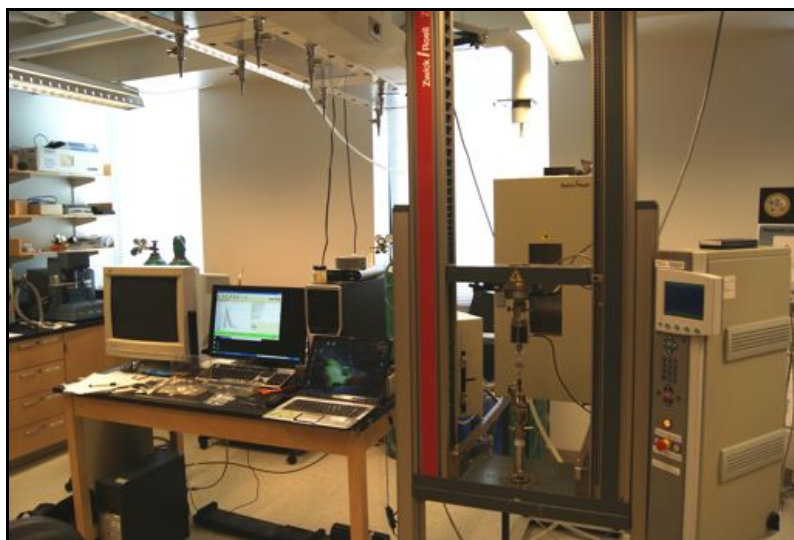


Figura 4.7. Equipo Zwick-Roel Z010 para análisis de propiedades mecánicas ubicado en las instalaciones del ISN (*"Institute for Soldier Nanotechnologies"*, Boston, EE.UU).

Los ejemplares de estudio fueron fragmentos de mallas de 10x30x0,5 mm y la colocación de éstos fue siempre en la dirección del lado mayor del fragmento (figura 4.8). Se empleó una célula de carga de 10 N y la

velocidad a la que trabajó la máquina fue de 0,25 mm/seg. Cada test se llevó a cabo con, al menos, 4 o 5 fragmentos de malla y se hicieron 3 mallas por protocolo de disolución.

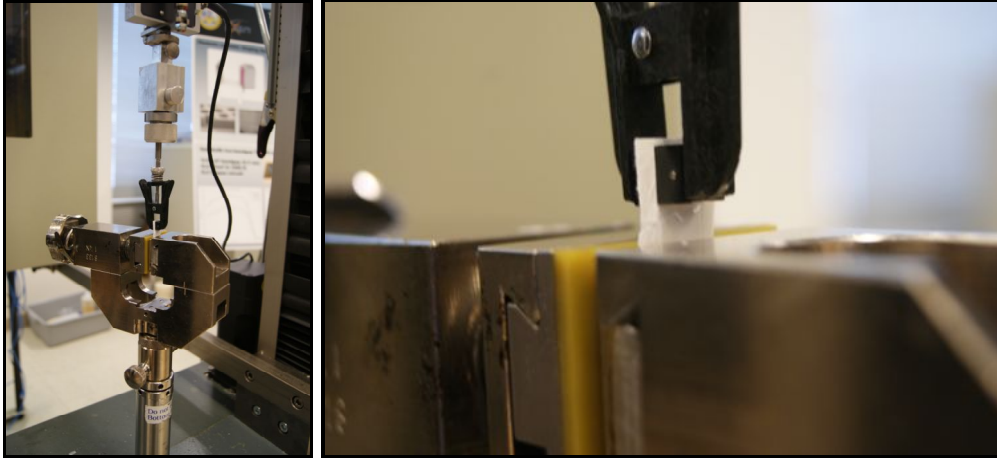


Figura 4.8. Disposición de los fragmentos de las mallas electrohiladas en el equipo Zwick-Roel Z010 durante los experimentos de evaluación de propiedades mecánicas.

Los datos generados mostraban el movimiento de separación de los forceps que sujetaban la malla (en mm en el eje X) y la fuerza (en N en el eje Y) que ejercía la malla ante la tracción vertical generada por el movimiento.

El **Módulo de Young** (E) viene determinado por la siguiente fórmula:

$$E = \frac{\text{Esfuerzo}}{\text{Deformación}} = \frac{F/S}{\Delta L/L}$$

Donde " F " es la fuerza (N), S el area de la sección (m^2), " ΔL " el incremento de la longitud y " L " la longitud inicial de la muestra.

Este parámetro mide por tanto la rigidez, o, lo que es lo mismo, la resistencia a la deformación elástica, siendo característico de cada material. Podemos definir el módulo de elasticidad, o de Young, como la pendiente de la curva de tensión-deformación en la zona elástica (lineal).

A modo de inciso, es importante comentar que en las curvas de tensión-deformación podemos distinguir 4 zonas (figura 4.9): zona de deformación elástica (1), fluencia (2), deformación plástica (3) y estricción (4), siendo esto así para un material dúctil considerado como modelo explicativo.

Para su cálculo, lo primero que se hizo, fue transformar las unidades de fuerza de N a Pa dividiendo la fuerza (N) por el área seccional (m^2). La longitud de deformación de la malla (incremento de longitud) se relativizó dividiendo por la distancia distancia inicial existente entre las pinzas que la sostenían (quedando en tanto por 1). Posteriormente, en la zona de deformación elástica (1), se escogieron dos puntos del eje Y (ahora en Pa) correlacionándolos a través del perfil de la curva con sus correspondientes en el eje X (relativizados) y el cálculo se efectuó de la siguiente forma:

$$(Y_2 - Y_1) / (X_2 - X_1)$$

Así se obtuvo el valor de la pendiente de la curva de tensión deformación en la zona lineal (o elástica) o lo que es lo mismo el Módulo de Young en Pa. Para convertir a MPa se dividió por 10^6 .

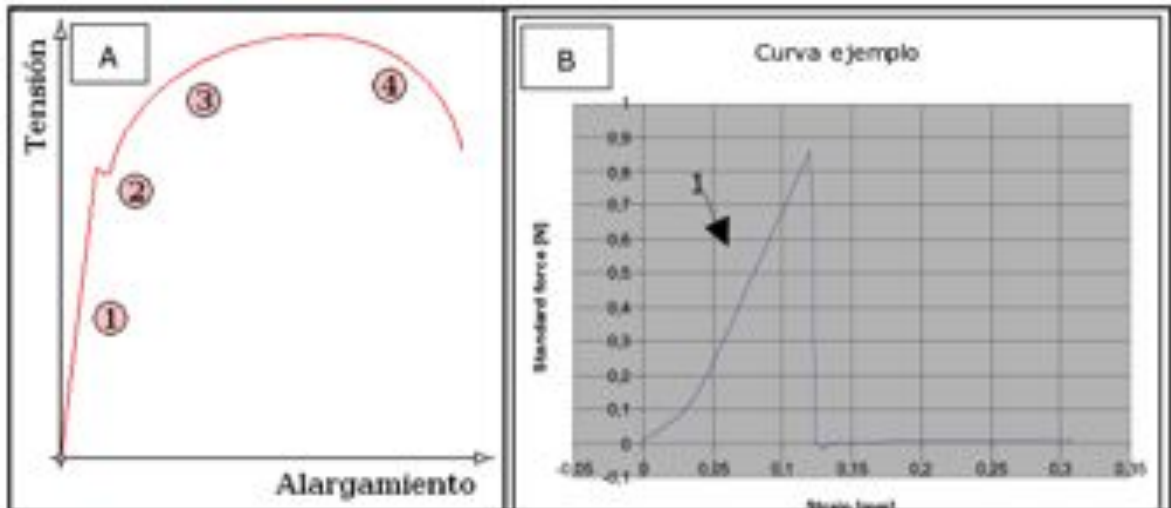


Figura 4.9. A) Curva de tensión-deformación de un material dúctil considerado como modelo explicativo, mostrando las zonas de: deformación elástica (1), fluencia (2), deformación plástica (3) y estricción (4). B) Curva de tensión-deformación de una malla electrohilada de fibroína.

La **resistencia a la tracción, carga última, o carga de rotura** es el esfuerzo máximo, basado en la sección transversal original, que puede resistir un material antes de producirse la ruptura. Esta fue calculada simplemente en base a los datos aportados por el aparato que detectó de forma precisa el momento en que los ejemplares de estudio se rompían. El único cálculo realizado fue la transformación de unidades de N a MPa dividiendo el valor máximo obtenido antes de la ruptura (en N), por el área seccional de la muestra (m^2) y dividiéndolo a su vez por 10^6 .

La **elongación o alargamiento** (%) mide la capacidad de deformación longitudinal de un material sometido a un esfuerzo de tracción hasta que se alcanza la carga última. Este valor fue calculado observando el incremento, en porcentaje, de longitud que admitían los materiales desde el momento del inicio del ensayo de resistencia a la tracción hasta la ruptura o lo que es lo mismo:

$$((L-L_0)/ L_0)\times 100$$

Donde "L" es la distancia a la que se encuentran las pinzas del aparato en el momento inmediatamente previo la ruptura (deformación admitida por el material) y "L₀" la distancia original entre las mismas.

Los grosores de las secciones de las mallas a evaluar fueron medidos haciendo uso de un microcalibre Mitutoyo™ con precisión de 1 μm y corroborados mediante microscopía electrónica de barrido.

Los datos obtenidos fueron comparados usando los tests estadísticos ANOVA (p<0,05) o Mann-Withney (p<0,05) dependiendo de si cumplían o no los requisitos estadísticos de normalidad y homocedasticidad (respectivamente). Para ello, una vez más se empleó el software SPSS 18 para Windows.

4.2.5.3. Espectroscopía de infrarrojos

Como indica su nombre, la espectroscopía infrarroja es la rama de la espectroscopía que estudia la parte infrarroja (IR) del espectro electromagnético. Ésta se basa en el hecho de que las moléculas tienen frecuencias a las que vibran y rotan. Así pues, las moléculas complejas tienen muchos enlaces, y las vibraciones pueden ser conjugadas, implicando esto absorciones en el infrarrojo a determinadas frecuencias que pueden relacionarse con grupos químicos presentes en su composición. Por tanto, esta técnica puede utilizarse para identificar compuestos e investigar su estructura química.

Los espectroscopios de infrarrojos hacen incidir un rayo de luz IR que atraviesa la muestra, y, cuando la frecuencia de un determinado enlace coincide con alguna de las incluidas en las ondas que forman el rayo, se produce absorción. Se registra así la cantidad de energía absorbida a cada longitud de onda mediante el escaneo con un rayo monocromático o, más

comúnmente usando una "transformada de Fourier" (FTIR por sus siglas en inglés "*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*"), que mide todas las longitudes de onda a la vez.

Esta técnica funciona solamente con enlaces covalentes, y permite la elaboración de espectros de transmitancia o absorbancia que reflejan las longitudes de onda a las que nuestra muestra absorbe en el IR, pudiéndose interpretar los enlaces presentes en la misma.

En este experimento, fue utilizada para comparar los espectros típicos de fibroínas purificadas mediante distintos protocolos. Se empleó un espectroscopio modelo "PerkinElmer Spectrum 100", la resolución seleccionada fue de 4 cm^{-1} y se hicieron 20 escaneos por muestra. La preparación del material consistió en la mezcla en un mortero de agata de nuestra muestra de interés (unos 2 mg) con unos 200 mg de KBr (Sigma-Aldrich, EE.UU) en polvo. La mezcla fue homogeneizada y, posteriormente, se obtuvo un disco cristalino (mezcla de la sal y la fibroína) tras el uso de una prensa hidráulica (Perkin Elmer 15.011) a 10 kPa/cm^2 de presión durante 10 minutos. Por último, se colocó en la cámara del aparato y se efectuaron las lecturas pertinentes en el rango de longitudes de onda comprendido entre 2.000 y 400 cm^{-1} , ya que éste engloba los picos amida I, II, III y IV, cuyas pequeñas variaciones indican el estado químico en que se encuentra la fibroína de seda ("*random coil*", lámina β , etc.)

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Peso molecular de los péptidos resultantes

A fin de evaluar la degradación asociada al protocolo de disolución de fibroína de seda, se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5 % a disoluciones acuosas de ésta proteína obtenidas por los protocolos cuyo uso se encuentra más extendido en la bibliografía.

El procedimiento de disolución de la fibroína una vez eliminada la sericina requiere el uso de reactivos capaces de desnaturalizar la proteína rompiendo los fuertes puentes de hidrógeno de las láminas β . Para ello, se utilizan a menudo disoluciones concentradas de sales orgánicas e inorgánicas (por ejemplo LiBr o CaCl_2), disolventes fluorados, líquidos iónicos o ácidos fuertes.

En el presente estudio se comparó la disolución con los tres protocolos descritos en el apartado de material y métodos que utilizan LiBr 9.3M, CaCl₂ 100% (p/v) o CaCl₂:Etanol:Agua en relación molar 1:2:8. De aquí en adelante nombrados como protocolos "LiBr", "CaCl₂" o "ternario" respectivamente.

Hardy y Scheibel (2010) explican que las nanofibrillas de fibroína están compuestas por tres componentes proteicos; la cadena pesada (con un peso molecular de 350 kDa) unida mediante puentes disulfuro a la cadena ligera (25 kDa) y una glicoproteína pequeña llamada P25 (30 kDa). Esta última interacciona mediante enlaces hidrofóbicos no covalentes y se le asigna un papel importante en el mantenimiento de la cohesión estructural del complejo. La relación molar de estos tres componentes es 6:6:1 respectivamente, siendo la cadena pesada muy hidrofóbica y la ligera más hidrofílica.

En la fotografía realizada a los geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie (fig.4.10) no se apreciaron claramente bandas discretas correspondientes a los componentes de la seda ya que se trata de un degradado peptídico, pero si se intuye, en los protocolos que usan CaCl₂, la banda correspondiente a la cadena ligera (25 kDa). Este resultado es coincidente con el propuesto por Wadbuu y col. en 2010, pero no lo es, en cambio, en el caso del protocolo que utiliza LiBr. Este hecho se debe, probablemente, a que en nuestro caso se emplearon tiempos más elevados de ebullición para eliminar la sericina y ello implica degradación en la fibroína (Yamada y col., 2001) y también durante la disolución con la sal de litio.

Las fracciones menos degradadas de la cadena pesada quedaron en la parte superior del gel y, a lo largo del mismo, se distribuyen péptidos de diferentes tamaños dando una visión global del grado en que afecta el protocolo de disolución a la degradación de la proteína nativa.

En la tabla 4.1 se especifican los porcentajes de proteína dentro de cada categoría, que tiene la fibroína extraída y redisuelta en agua con los 3 protocolos propuestos. Como comentario general, es importante resaltar el hecho de que el protocolo LiBr presenta una degradación mayor de las cadenas ligeras. Aunque la presencia de fracciones intactas de cadenas

pesadas hidrosolubles se hace más patente en el mismo y se refleja en un porcentaje elevado de péptidos de más de 220 kDa (ANOVA, $p < 0,05$).

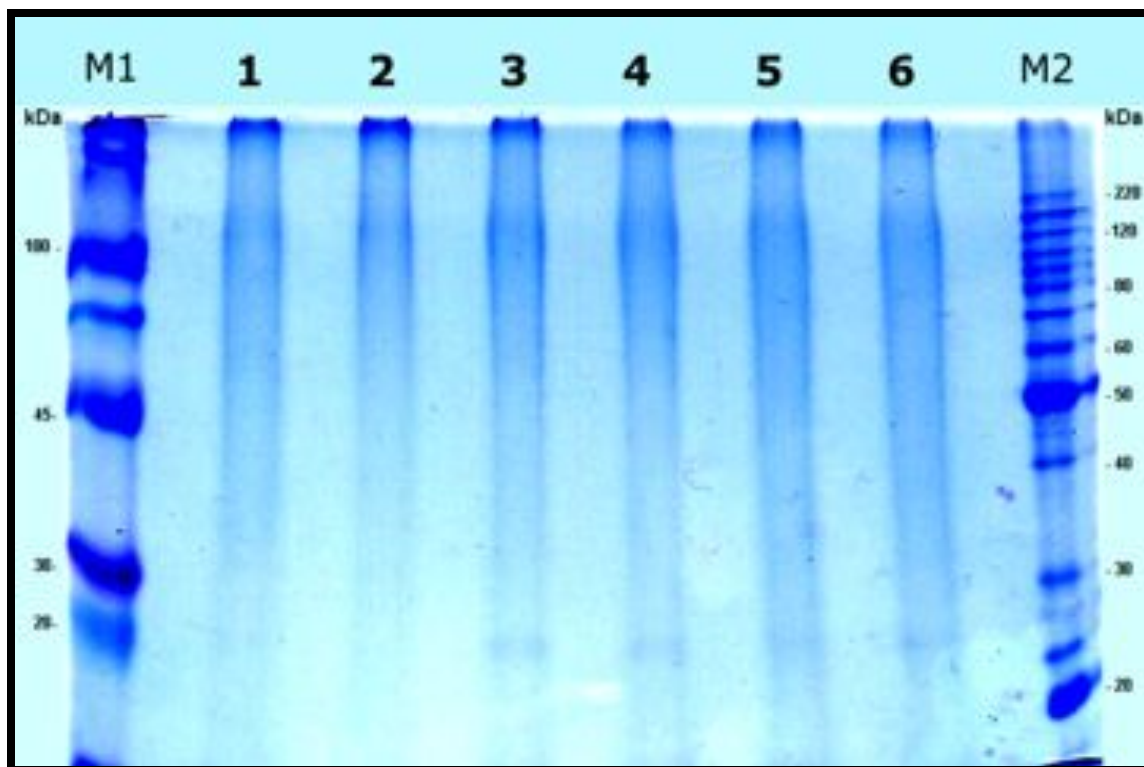


Figura 4.10. Electroforesis en gel de poliacrilamida con tinción de Coomassie ilustrativa de la degradación a la que se ve sometida la fibroína según el protocolo de disolución empleado. Cada metodología se encuentra representada por duplicado, siendo 1 y 2 fibroína extraída con el protocolo *LiBr*, 3 y 4 con *ternario* y 5 y 6 empleando *CaCl₂*. M1 y M2 son marcadores de peso molecular de referencia.

El contenido en péptidos de tamaño menor a 60 kDa es significativamente mayor en la disolución con CaCl_2 (ANOVA $p < 0,05$) lo cual indica una mayor degradación proteica. Esto también es debido a la presencia de cadenas ligeras de fibroína.

En el rango de 60 a 120 kDa (pesos moleculares "intermedios") las diferencias fueron significativas entre el protocolo *LiBr* y el *ternario* (ANOVA, $p < 0,05$), detectándose una fracción proteica mayor en este rango para el último.

Para la categoría comprendida entre 120 y 220 kDa, el tratamiento con CaCl_2 mostró una menor proporción de péptidos (ANOVA, $p < 0,05$) y fue exactamente el mismo valor el obtenido en el caso de los protocolos *LiBr* y

ternario. Todas estas diferencias se visualizan de forma más clara en la figura 4.11.

Protocolo empleado	Categorías de peso molecular (kDa)			
	< 60	60-120	120-220	>220
LiBr	36,9 ± 6,7	22,6 ± 3,8	13,1 ± 2,6	29,5 ± 5,3
Ternario	39,0 ± 4,5	28,4 ± 3,5	13,1 ± 2,5	20,5 ± 3,5
CaCl ₂	51,8 ± 7,2	24,3 ± 2,6	9,2 ± 1,6	16,8 ± 3,6

Tabla 4.1. Porcentaje de péptidos respecto a la proteína total extraída y redisuelta en agua con cada uno de los protocolos de disolución de fibroína de seda nativa descritos en el apartado de material y métodos. En negrita se resaltan los puntos en que se detectaron diferencias estadísticamente significativas dentro de cada categoría de estudio (ANOVA $p < 0,05$).

El método que implicaría una mayor degradación proteica en términos generales es, aparentemente, el de CaCl₂, pudiéndose deber este hecho a la exposición, más prolongada en el tiempo, a altas temperaturas durante la disolución. Sin embargo ello no invalida su uso, puesto que en nuestra línea de investigación, hemos observado empíricamente aplicaciones para las cuales solo se puede emplear fibroína extraída con disolvente ternario o CaCl₂. A modo de ejemplo, cabría citar que en la elaboración de nanopartículas de fibroína de seda por precipitación química, solo son efectivos estos últimos protocolos y no el que emplea LiBr. Probablemente debido a la presencia de cadenas ligeras de esta proteína, necesarias para que se de un autoensamblado efectivo (no se profundizará más en este aspecto por ser un trabajo que será incluido en otra tesis doctoral del grupo).

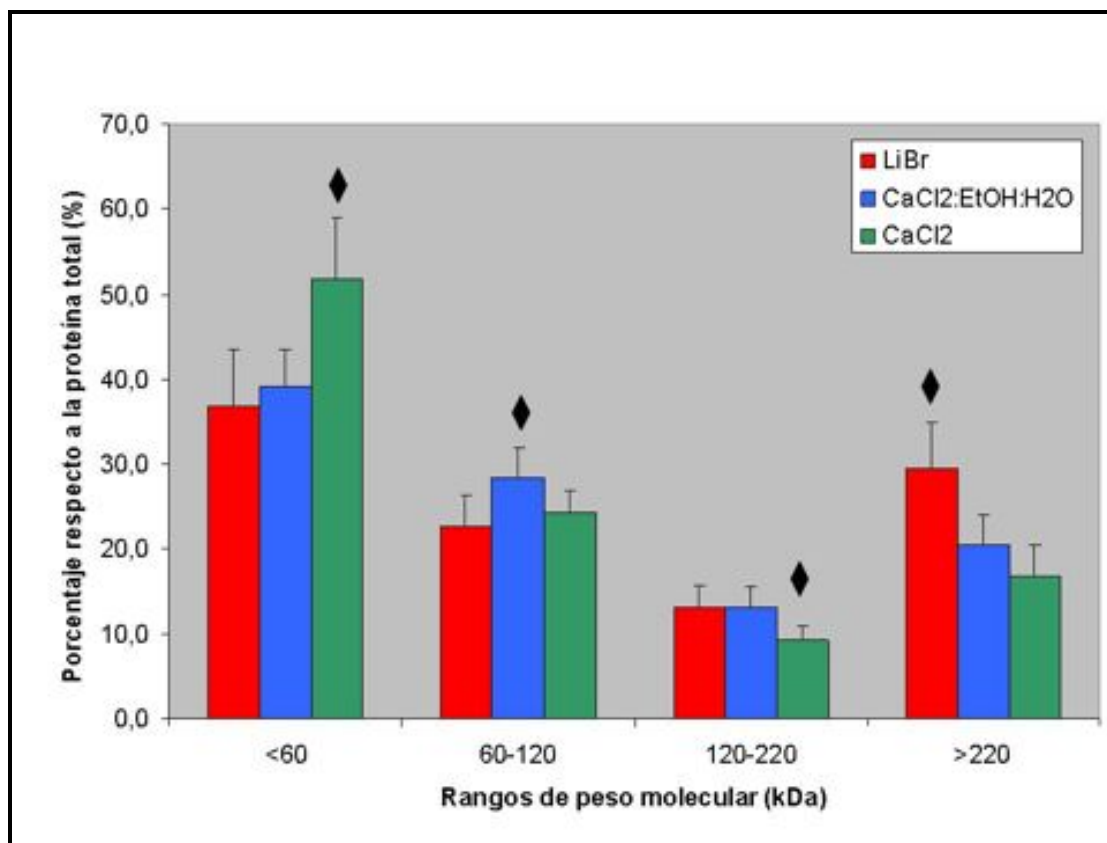


Figura 4.11. Gráfico de barras ilustrativo de los porcentajes proteicos que se detectan para cada categoría de estudio en fibroína disuelta con distintos protocolos. Los rombos indican valores significativamente diferentes (ANOVA, $p < 0,05$).

A modo de conclusión se puede decir que el protocolo de disolución con **LiBr** genera una solución de fibroína acuosa con una presencia muy baja de cadenas ligeras, casi indetectable en la tinción de Coomassie, pero, en cambio, la degradación de la cadena pesada es bajísima dada la rapidez con que se disuelve la fibroína y, por consiguiente, el poco tiempo de exposición a alta temperatura al que es sometida la proteína nativa (Yamada y col., 2001).

El protocolo que emplea disolvente **ternario** conlleva una presencia más acentuada de cadenas ligeras de fibroína y no implica una degradación excesiva de las cadenas pesadas, ya que el tiempo de exposición a altas temperaturas no es excesivo (3-6h), haciendo del mismo un procedimiento muy adecuado para aplicaciones que requieran fibroína similar a la proteína nativa, o al menos, con presencia de los dos tipos de cadenas peptídicas.

El protocolo que emplea **CaCl₂** parece ser el que más degrada la cadena pesada por el largo tiempo de disolución a alta temperatura que es

necesario. Sin embargo, preserva algo mejor que el de LiBr las cadenas ligeras de fibroína a costa de una mayor degradación proteica que se hace patente en la visualización del Coomassie, ya que se detectan gran cantidad de péptidos en la región que comprende de 60 a 30 kDa.

4.3.2. Solubilidad en agua de la proteína purificada

Paralelamente a los experimentos que atañen a este estudio, nos percatamos de cómo la fibroína liofilizada, en función del protocolo empleado en la disolución de la proteína nativa, variaba notablemente su solubilidad en agua. Por lo tanto, se decidió caracterizar este comportamiento de cara a la optimización de sus aplicaciones en medio acuoso (figura 4.12).

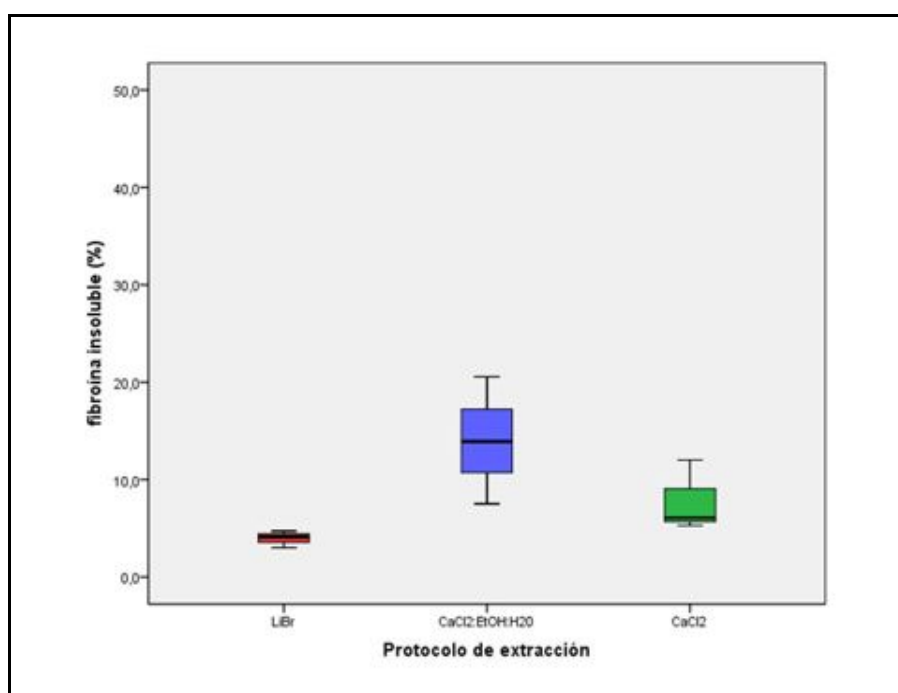


Figura 4.12. Diagrama de cajas mostrando los valores de proteína insoluble en agua observados según el protocolo de disolución de fibroína empleado en la disolución. Se muestran valores máximos, mínimos, intervalos de confianza al 95% y valores de la mediana.

En la tabla 4.2 podemos ver que los valores máximos de proteína insoluble fueron alcanzados en el protocolo que emplea disolvente ternario y valores también elevados fueron observados en el que emplea CaCl₂. Llama la atención el hecho de que en ambos protocolos exista gran variación de

este parámetro. Lo cual se manifiesta en desviaciones estándar mayores a las observadas en el protocolo que emplea LiBr, más reproducible y constante según nuestra experiencia. Estas variaciones según el protocolo empleado podrían deberse a las diferencias en los tiempos de disolución empleados en los protocolos que usan CaCl₂ y disolvente ternario; y, por consiguiente, a la presencia de algunas moléculas de fibroína en forma de lamina beta conllevando esto la "no disolución efectiva" de parte de la proteína nativa.

Quizás la exposición prolongada a altas temperaturas y agitación durante la disolución, así como la presencia de etanol en el reactivo ternario sean responsables en parte de la presencia de proteína insoluble tras la liofilización. Esta hipótesis es apoyada por el trabajo de Kim y col. (2004), los cuales describen una aceleración en los procesos de gelificación de la fibroína (incremento de láminas beta) con el incremento de la temperatura.

Por otro lado Yucel y col. (2009) descubren que la transición a lámina beta de disoluciones de fibroína acuosa puede ser favorecida mediante vortexado, lo cual es, al fin y al cabo, una agitación mecánica fuerte.

Queda claro, por tanto, que las altas temperaturas y la agitación mecánica continuada, así como la presencia de disolventes orgánicos, podrían estar favoreciendo en parte la presencia de láminas beta en la disolución acuosa, quedando éstas en las muestras de trabajo una vez dializadas y liofilizadas.

Protocolo	Porcentaje de proteína insoluble			
	Valor medio	Desviación estándar	Valor máximo	Valor mínimo
LiBr	3,96	0,88	4,7	3,0
Ternario	14,00	6,52	20,6	7,5
CaCl ₂	7,80	3,68	12,0	5,3

Tabla 4.2. Valores de fibroína liofilizada insoluble en agua (en porcentaje) calculados para cada metodología de disolución. (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

Otra hipótesis más simple, sería que los disolventes de los protocolos CaCl₂ y ternario no son los suficientemente efectivos como para romper todos los puentes de hidrógeno intermoleculares de las láminas beta dejando parte de la fibroína nativa en estado insoluble.

A fin de determinar el origen de estas variaciones se analizó el espectro de infrarrojos de las muestras de fibroína purificada procedente de las distintas metodologías de estudio.

4.3.3. Espectroscopía de infrarrojos de la fibroína liofilizada

Como queda descrito en el apartado de material y métodos, se realizaron lecturas del espectro de infrarrojos en modo de transmitancia a muestras de fibroína liofilizada procesada mediante las tres metodologías. Estos espectros se muestran en la figura 4.13 centrándose la misma en la región que abarca desde 2000 hasta 400 cm^{-1} .

En esta figura podemos ver los picos típicos de las regiones amida I, II, III y IV de la fibroína de seda de *B. mori*.

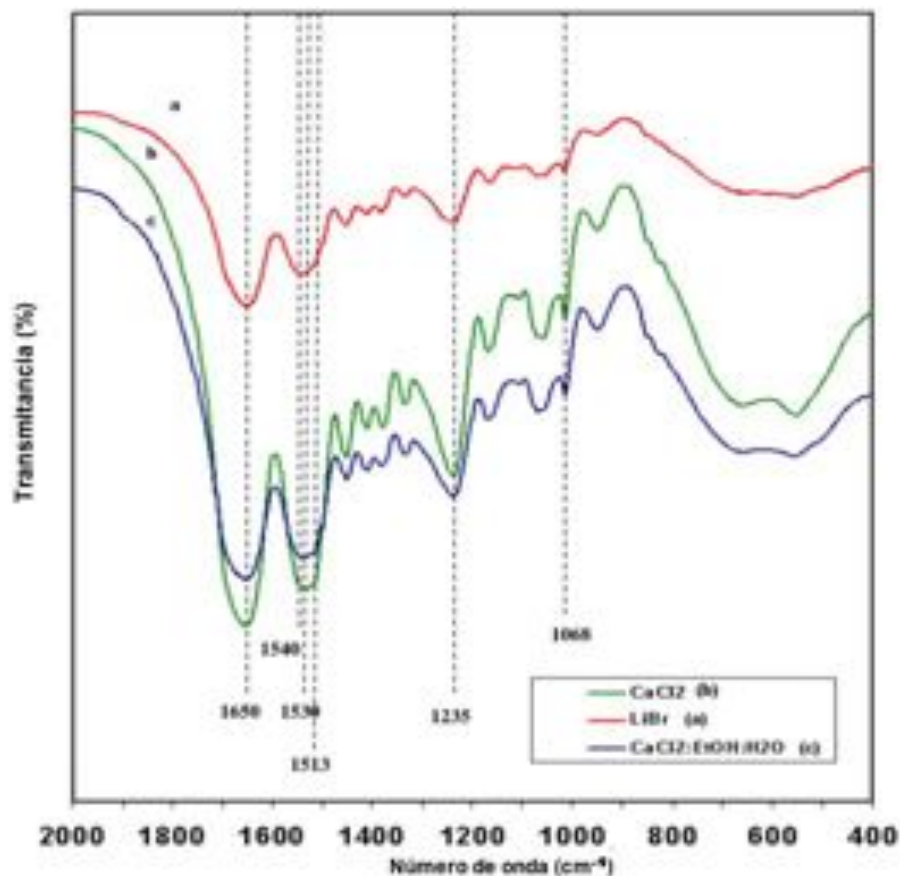


Figura 4.13. Espectro de infrarrojos de fibroína de seda de *B. mori* extraída con los protocolos que emplean LiBr (rojo), CaCl_2 (verde) y disolvente ternario (azul).

Se aprecian globalmente los picos correspondientes a la conformación proteica "random coil" (hidrosoluble) a 1650 cm^{-1} (amida I) y 1540 cm^{-1} (amida II) según Zhang y col. (2009). Existe una pequeña variación en el caso de la fibroína extraída con CaCl_2 la cual muestra un desplazamiento en el pico amida II observándose dos pequeños hombros a 1530 cm^{-1} y 1513 cm^{-1} más propios (sobre todo el último) de la conformación lamina beta (insoluble) según Wang y col. (2004).

A lo largo de la interpretación de los espectros de infrarrojos también encontramos que los protocolos de disolución en ternario y CaCl_2 presentan picos más pronunciados que el de LiBr a 1235 cm^{-1} (amida III) y a 1068 cm^{-1} (amida IV) lo cual se relaciona también con presencia de láminas beta según Zhang y col. (2009), pero el dato referente al pico de 1235 cm^{-1} entra en contradicción con lo propuesto por Wadbu y col. (2010) ya que ellos afirman que este es propio de la conformación proteica "random coil" y pasa a ser 1270 cm^{-1} cuando se transforma a lámina beta.

En cualquier caso, habría que decir que, dada la elevada proporción de fibroína en estado soluble, en las muestras liofilizadas para los 3 protocolos la presencia de cadenas peptídicas en estado lámina beta puede quedar enmascarada. Se han detectado datos suficientes, eso sí, para apuntar a que esta hipótesis de trabajo es acertada, y existe un porcentaje de proteína liofilizada cuya solubilidad en agua es limitada debido a la existencia de una fracción proteica en forma de lámina beta y, en consecuencia, insoluble.

4.3.4. Tamaño de las fibras

Los diámetros de las fibras electrohiladas para cada metodología de disolución fueron calculados mediante análisis de imagen de fotografías obtenidas al microscopio electrónico de barrido. A modo de ejemplo se puede visualizar el aspecto final de las mismas en la figura 4.14.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los tamaños de las fibras de las réplicas experimentales dentro de cada protocolo de estudio (ANOVA, $p > 0,05$), lo cual garantizó la reproducibilidad de la técnica. Este hecho permitió juntar los datos de las 3 réplicas de cada tratamiento (25 fibras por réplica) aumentando así el tamaño muestral de los grupos y, en consecuencia, la representatividad y fiabilidad de los test

empleados en la comparación en función de los distintos tratamientos de disolución de la fibroína de seda nativa.

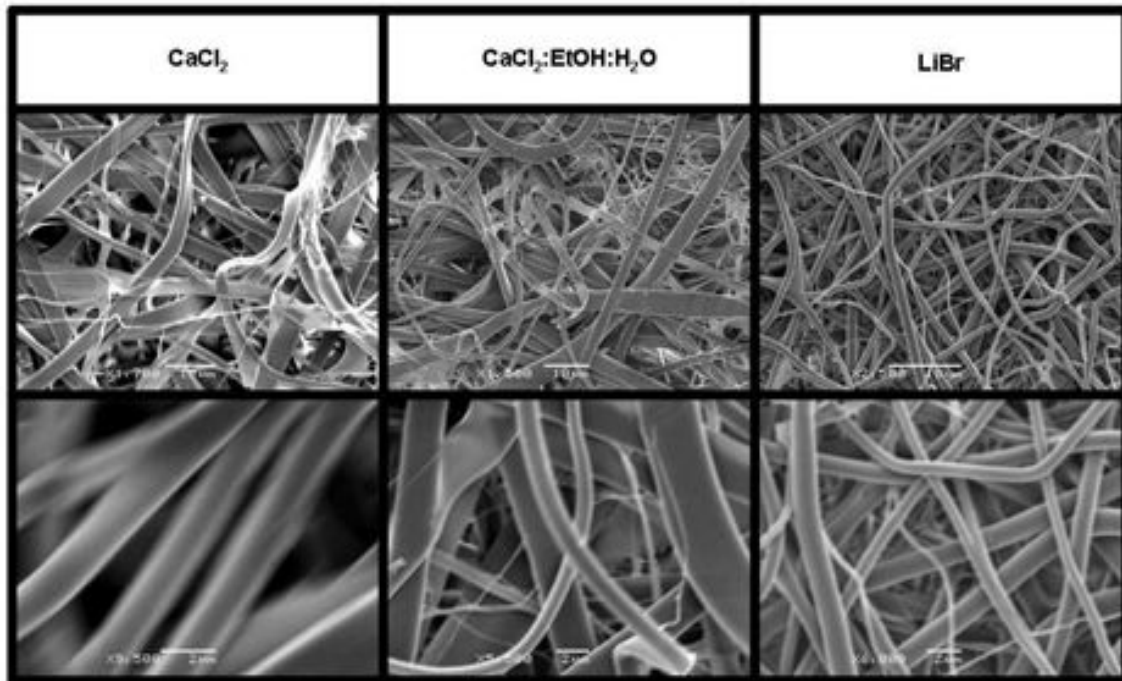


Figura 4.14. Fotografías obtenidas al SEM de mallas electrohiladas de fibroína al 17% (p/v) en HFIP elaboradas a partir de proteína solubilizada mediante 3 procedimientos distintos.

Dado que no se cumplió el requisito de homogeneidad de varianzas (Levenne, $p < 0,05$), en la comparativa para las 3 metodologías, se tuvo que recurrir a tests no paramétricos para llevarla a cabo, obteniendo como resultado que el diámetro de las fibras electrohiladas era distinto para cada protocolo (Mann-Whitney, $p < 0,05$). Ello se visualiza de forma clara en los diagramas de cajas elaborados para este parámetro (figura 4.15).

Se aprecia como el rango en el que se mueven los tamaños de las fibras en el caso del protocolo que emplea LiBr es más estrecho, mientras que en los protocolos CaCl_2 y ternario existe más variabilidad para este factor.

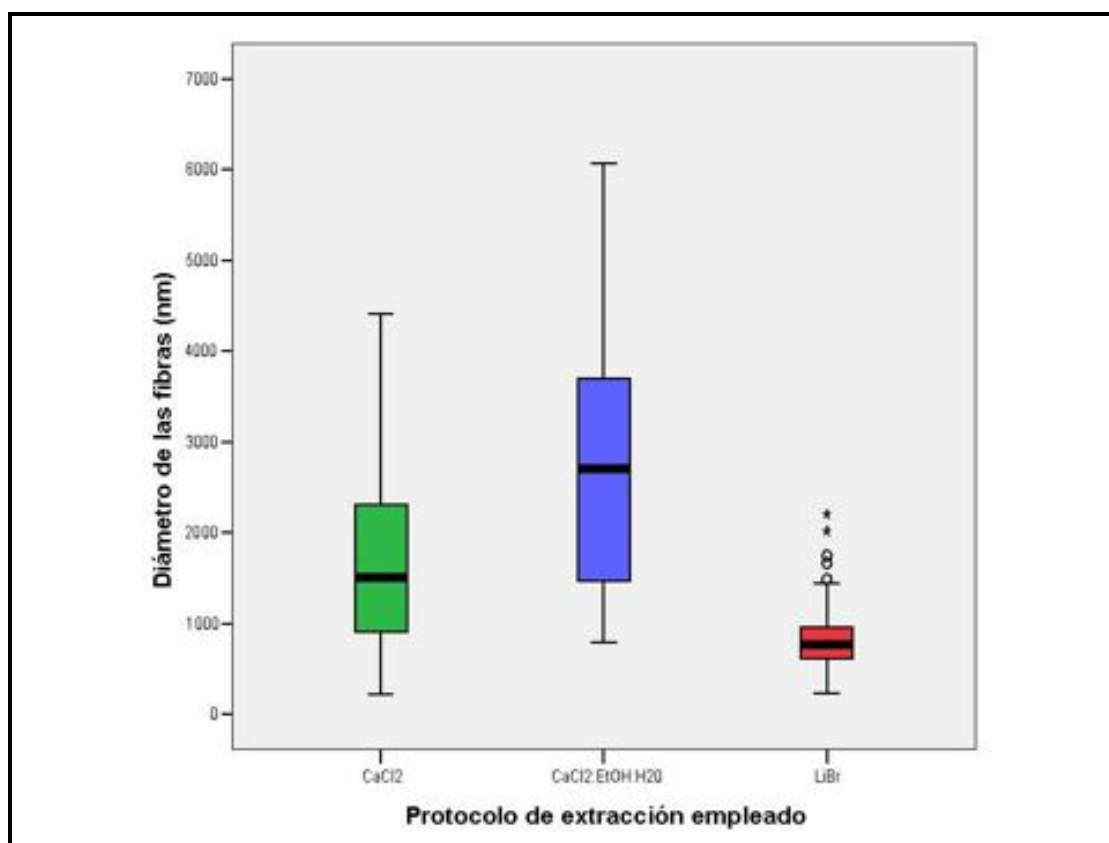


Figura 4.15. Gráfico de cajas mostrando los diámetros de fibra de mallas electrohiladas de fibroína de seda al 17% (p/v) en HFIP elaboradas con tres metodologías distintas de disolución de la proteína.

Si observamos los histogramas de frecuencias correspondientes a los tamaños de las fibras electrohiladas (figura 4.16), se interpreta de una forma más visual la proporción de fibras de tamaño menor a $1 \mu\text{m}$ que se obtuvieron en cada protocolo. Así, por ejemplo, es importante puntualizar que el 77% de las fibras elaboradas a partir del método que emplea LiBr fueron menores a $1 \mu\text{m}$, el 28% de las elaboradas con el protocolo CaCl_2 cumplieron este requisito y tan solo el 13% de las mismas en el protocolo que emplea disolvente ternario. Este dato será relevante en aplicaciones de las mallas como biomateriales en los casos en que se requiera mimetizar las fibras de la matriz extracelular cuyos tamaños oscilan entre 50 y 500 nm (Rho y col., 2006).

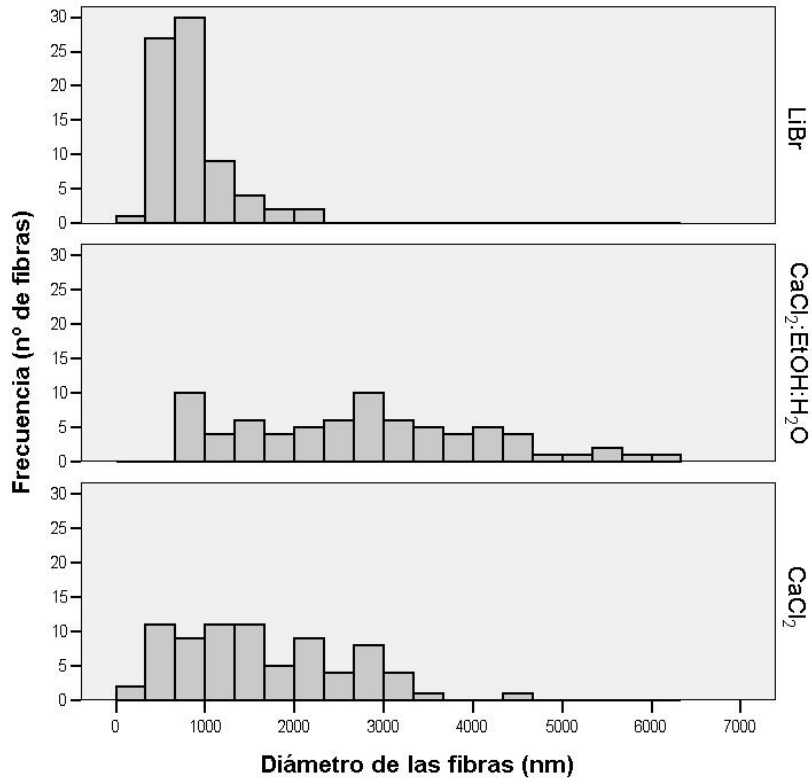


Figura 4.16. Histograma de frecuencias mostrando los diámetros de fibra de mallas electrohiladas de fibroína de seda al 17% (p/v) en HFIP elaboradas con tres metodologías distintas de disolución de la proteína.

El diámetro medio de las fibras obtenidas con los protocolos LiBr, CaCl₂ y ternario fue de 847, 1672 y 2771 nm respectivamente, datos más descriptivos como valores máximos y mínimos y desviaciones estándar aparecen adjuntados en la tabla 4.3.

Como aparece descrito en el apartado de introducción, a lo largo de la última década, se han elaborado multitud de matrices electrohiladas conteniendo fibroína de seda pura o mezclada con otros polímeros. Éstas vienen empleando gran variedad de disolventes durante el procedimiento de electrohilado, lo cual es fundamental en el tamaño de las fibras resultantes, ya que la tasa de evaporación del mismo hará que sus diámetros varíen (Zhang y col., 2009). Los disolventes más comúnmente empleados en estas aplicaciones son: agua (con o sin PEO para aumentar la viscosidad), HFIP, ácido fórmico (AF), hexafluoroacetona (HFA) o disoluciones de sosa con ácidos cítrico y clorhídrico (NaOH/AC/HCl). En la tabla número 4.4 aparecen reflejados algunos ejemplos recogidos en la bibliografía con los tamaños de

fibra resultantes, las concentraciones y el disolvente empleado por otros autores. Como se puede observar, en la mayoría de los casos, los tamaños de las fibras obtenidas fueron mucho menores, ya que sus concentraciones de trabajo fueron sensiblemente más bajas, siendo este factor un condicionante de la viscosidad y en consecuencia del diámetro de las fibras generadas.

Protocolo	Diámetros de las fibras (nm)			
	Valor medio	Desviación estándar	Valor mínimo	Valor máximo
LiBr	847	363	230	2203
Ternario	2771	1343	792	6071
CaCl ₂	1672	935	223	4413

Tabla 4.3. Tabla mostrando los estadísticos descriptivos calculados para los diámetros de las fibras de seda electrohilada al 17% (p/v) en HFIP elaboradas con tres metodologías distintas de disolución de fibroína.

Nuestra metodología de trabajo propone un electrohilado a mayores concentraciones incrementando exponencialmente el rendimiento de la técnica dada la posibilidad de aumentar mucho el caudal (hasta 6 ml/h). Si bien es cierto que aparecen fibras del orden de algunas micras, éstas aportan resistencia mecánica a la malla, y, además, presentan (sobre todo las elaboradas con LiBr) una gran proporción de nanofibras que puedan mimetizar la matriz extracelular del tejido conectivo y favorecer adhesión y proliferación celulares.

Es importante incidir en el hecho de que la viscosidad de las disoluciones es fundamental para que se puedan electrohilar y solo conseguimos viscosidad suficiente y un cono de Taylor relativamente estable con el uso de disoluciones de, al menos, un 17% (p/v) en el caso de la fibroína extraída con LiBr. En cambio a menores concentraciones de fibroína derivada de los protocolos de CaCl₂ y ternario se logra una viscosidad equivalente a la del 17% (p/v) en LiBr (por ejemplo hemos electrohilado con éxito fibroína de ternario al 13% p/v). Queda justificado así que en nuestro caso se utilizasen disoluciones al 17% (p/v) como concentración de estudio, ya que es adecuada para producir mallas con los 3 protocolos de experimentación, y poder visualizar diferencias

directamente relacionadas con la metodología de disolución de la fibroína de seda nativa (tras la eliminación de la sericina).

Autores	Disolvente empleado	Concentración (% p/v)	Diámetro de fibras (nm)
Zarkoob y col. (2004)	HFIP	0,74	8-200
Jin y col. (2004)	PEO/H ₂ O	8	700±50
Ohgo y col. (2003)	HFA	3; 5; 7	100-1000
Sugikara y col. (2004)	AF	10; 12; 15; 20	-----
Kim y col. (2003)	AF	6-15	30-120
Min y col. (2006)	HFIP	7	250-530
Wang y col. (2006)	H ₂ O	17; 28; 39	100-1000
Ayutsede y col. (2005)	AF	9; 15	2-400
Jeong y col. (2006)	HFIP	7	250-550
Kang y Jin (2007)	PEO/H ₂ O	8	460±40
Zhu y col. (2007)	NaOH/AC/HCl	30; 33; 38	1500-2500
Baek y col. (2008)	AF	12	170-250
Silva y col. (2008)	AF	12	140-590
Meinel y col. (2009)	PEO/H ₂ O	12,5	530±100
Cao y col. (2009)	H ₂ O	11; 17	210±30, 490±60
Wadbua y col. (2010)	AF	20	747±244
Aznar y col (2012)	HFIP	17	2300±1295

Tabla 4.4. Revisión de los diámetros de las fibras obtenidos en otros trabajos sobre mallas electrohiladas de fibroína, incluyendo información sobre autores de la publicación, concentración de fibroína y disolventes empleados. Siendo: HFIP, hexafluoroisopropanol; HFA, hexafluoroacetona; AF, ácido fórmico; PEO, polietileno óxido; AC, ácido cítrico; H₂O, agua; NaOH, sosa; HCl, ácido clorhídrico.

A modo de conclusión es importante comentar que, dependiendo de las aplicaciones para las que se pretenda emplear la malla electrohilada de seda, se tendrá que decidir el protocolo de disolución de fibroína a seguir, ya que este condicionará el tamaño de las fibras y en consecuencia las propiedades de la malla electrohilada como biomaterial.

4.3.5. Propiedades mecánicas

A fin de determinar posibles diferencias en las propiedades mecánicas de las mallas electrohiladas de seda dependiendo del protocolo de disolución de la fibroína nativa, se elaboraron los tests descritos en el apartado de

material y métodos. A partir de las curvas de estrés-deformación generadas se calcularon valores de módulo de Young, resistencia a la tracción y elongación de los materiales producidos con cada una de las metodologías.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p > 0,05$) dentro de las réplicas de cada tratamiento de estudio (protocolo de disolución de fibroína de seda). Este hecho garantiza la reproducibilidad de la técnica de elaboración de las mallas.

Tras la realización de esta comprobación se procedió a la evaluación de posibles diferencias para los parámetros de estudio según la metodología empleada durante la disolución de la fibroína de seda.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de modulo de Young para ninguna de las mallas electrohiladas (ANOVA, $p > 0,05$). Este hecho se puede visualizar de forma más clara en la figura 4.17 y en la tabla 4.5. De los valores obtenidos para este parámetro, se calculó el valor medio para el módulo de Young de mallas de seda generadas a partir del electrohilado de disoluciones de fibroína al 17% (p/v) en HFIP, siendo este valor 262 ± 58 MPa.

A pesar de que no existan diferencias estadísticamente significativas para esta característica, habría que decir que se detectó un valor medio de módulo de Young más elevado en el caso de mallas elaboradas con fibroína extraída a partir del protocolo que emplea LiBr. Este hecho implica una mayor rigidez en el material, lo cual podría ir vinculado a la ausencia de cadenas ligeras de fibroína en su composición. Esto significaría que esta fracción proteica aporta una cierta flexibilidad al material electrohilado, dada la ausencia de dominios cristalinos en la misma.

Módulo de Young (MPa)				
Protocolo	Valor medio	Desviación estándar	Valor mínimo	Valor máximo
LiBr	270	44	205	336
Ternario	252	41	194	333
CaCl ₂	252	75	107	370

Tabla 4.5. Estadísticos descriptivos calculados para los valores de módulo de Young de mallas de seda electrohilada al 17% (p/v) en HFIP, elaboradas con tres metodologías distintas de disolución de fibroína.

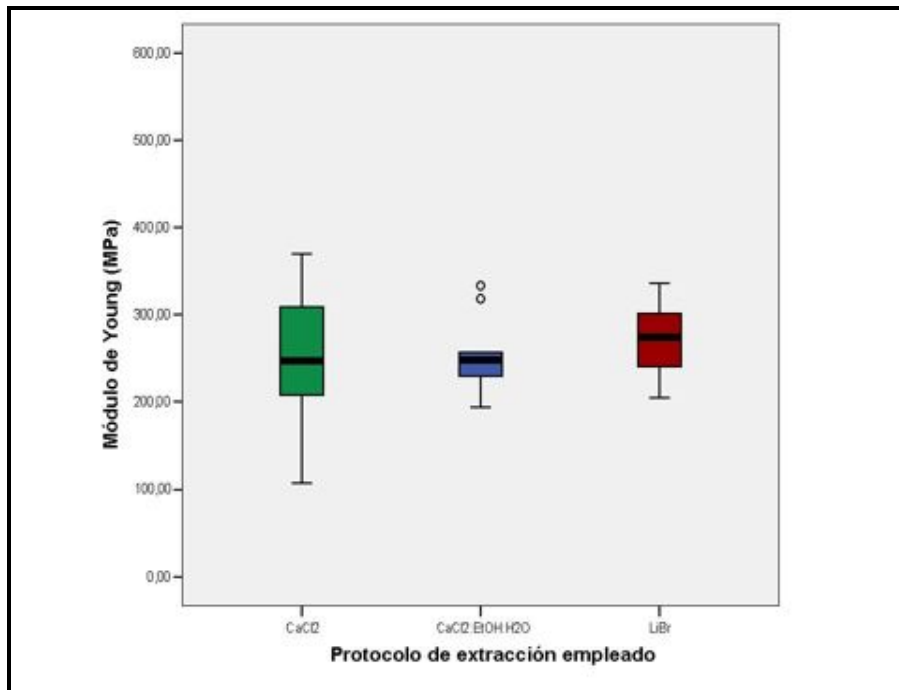


Figura 4.17. Gráfico de cajas mostrando los valores de módulo de Young calculados para mallas electrohiladas de fibroína de seda al 17% (p/v) en HFIP, elaboradas con tres metodologías distintas de disolución de la proteína.

En cuanto a la elongación de las mallas hay que decir que los valores calculados a partir de las curvas de estrés deformación no cumplieron el requisito de homogeneidad de varianzas (Levene, $p < 0,05$) y por tanto se recurrió al test no paramétrico de Mann-Whitney para llevar a cabo la comparación. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 protocolos de estudio ($p < 0,05$). Este hecho se puede visualizar en la figura 4.18.

Como se puede ver en la tabla 4.6 los valores medios de elongación fueron 5,03% para el protocolo que emplea CaCl₂, 3,90% para el de ternario y 2,78% para el de LiBr; coincidiendo una vez más la mayor rigidez con el protocolo de LiBr y la mayor flexibilidad con el de CaCl₂, siendo este último el que más degradada tiene la fracción proteica correspondiente a la cadena pesada.

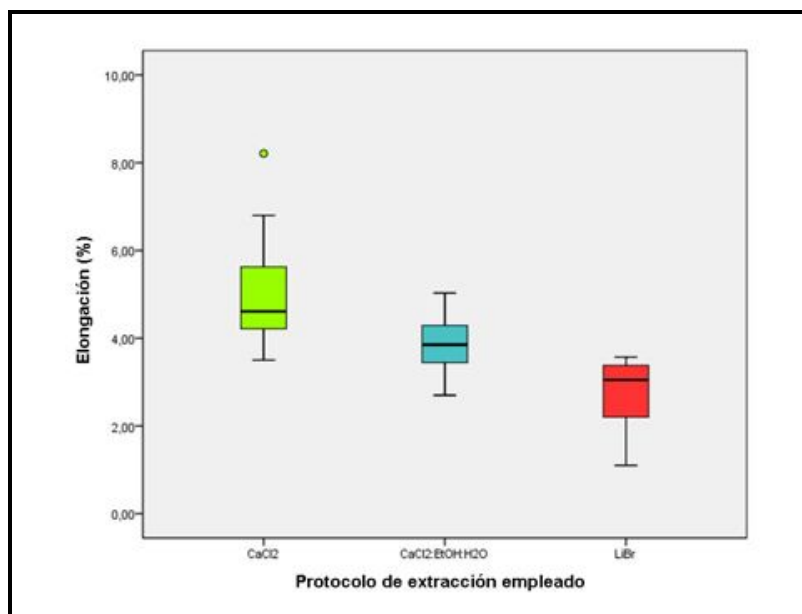


Figura 4.18. Gráfico de cajas mostrando los valores de elongación calculados para mallas electrohiladas de fibroína de seda al 17% (p/v) en HFIP, elaboradas con tres metodologías distintas de disolución de la proteína.

Protocolo	Elongación (%)			
	Valor medio	Desviación estándar	Valor mínimo	Valor máximo
LiBr	2,78	0,78	1,10	3,57
Ternario	3,90	0,67	2,70	5,03
CaCl ₂	5,03	1,32	3,50	8,21

Tabla 4.6. Estadísticos descriptivos calculados para los valores de elongación de mallas de seda electrohilada al 17% (p/v) en HFIP, elaboradas con tres metodologías distintas de disolución de fibroína.

La elongación del material será un factor importante a tener en cuenta de cara al uso de la malla como biomaterial, puesto que, dependiendo del tejido a mimetizar se requerirá o no una cierta flexibilidad que garantice que el mismo no se rompa de forma prematura.

Al igual que en la comparativa de la elongación, los valores de resistencia última no cumplieron el requisito de homogeneidad de varianzas y se tuvieron que analizar con el test de Mann-Whitney, siendo los mismos estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) para cada protocolo de disolución de fibroína de seda (véase figura 4.19).

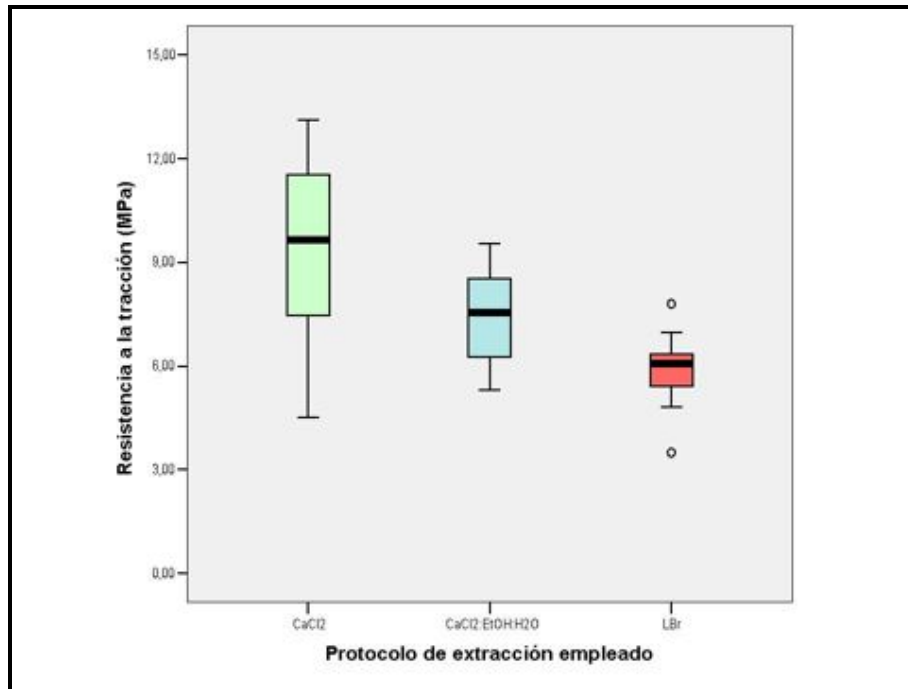


Figura 4.19. Gráfico de cajas mostrando los valores de resistencia a la tracción calculados para mallas electrohiladas de fibroína de seda al 17% (p/v) en HFIP elaboradas con tres metodologías distintas de disolución de la proteína

Los valores medios de resistencia a la tracción fueron: 9,33 MPa para el protocolo CaCl₂, 7,45 MPa para el protocolo ternario y 5,92 MPa para el que emplea LiBr. Como se puede ver en la tabla 4.7, valores máximos de resistencia a la tracción no tienen porque ir vinculados a mayor rigidez del material, ya que éstos fueron alcanzados en el caso de mallas electrohiladas derivadas del protocolo que emplea CaCl₂ y ternario y no de las de LiBr, con un valor medio considerablemente menor. Este hecho es debido a la presencia de un mayor número de fibras de tamaño micrométrico (de mayor tamaño) en los 2 primeros casos citados, aportando una resistencia mayor a la malla. Éste será un factor a evaluar antes de diseñar el biomaterial, para decidir así entre la importancia del biomimetismo con la matriz extracelular (más adecuado con los tamaños de fibra resultantes del protocolo LiBr) o de la mayor resistencia y flexibilidad (aportados de forma más certera con las otras dos metodologías).

También se analizó el grosor de las mallas en 10 regiones escogidas aleatoriamente, como dato complementario e informativo de la homogeneidad durante el proceso de deposición de las fibras en el colector del equipo de electrohilado.

Resistencia a la tracción (MPa)				
Protocolo	Valor medio	Desviación estándar	Valor mínimo	Valor máximo
LiBr	5,92	1,08	3,50	7,80
Ternario	7,45	1,34	5,30	9,53
CaCl ₂	9,33	2,62	4,30	13,1

Tabla 4.7. Estadísticos descriptivos calculados para los valores de resistencia a la tracción de mallas de seda electrohilada al 17% (p/v) en HFIP, elaboradas con tres metodologías distintas de disolución de fibroína

Se encontró que el grosor, a pesar de utilizar la misma cantidad de fibroína y la misma superficie colectora (de iguales dimensiones), era un parámetro más homogéneo en el caso de mallas elaboradas con fibroína disuelta con LiBr que en las de ternario y CaCl₂. Durante el análisis estadístico se detectaron diferencias significativas entre los 3 protocolos (ANOVA, $p < 0,05$).

Las desviaciones estándar detectadas en el caso de las metodologías que usan ternario y CaCl₂ fueron mayores (tabla 4.8) debido, probablemente, a la deposición diferencial de fibras de mayor tamaño en las regiones centrales del colector por efecto de la gravedad, la cual juega un papel muy importante durante el electrohilado.

Grosor (μm)				
Protocolo	Valor medio	Desviación estándar	Valor mínimo	Valor máximo
LiBr	49	14	20	70
Ternario	62	20	30	110
CaCl ₂	74	22	40	120

Tabla 4.8. Estadísticos descriptivos calculados para el grosor de mallas de seda electrohilada al 17% (p/v) en HFIP, elaboradas con tres metodologías distintas de disolución de fibroína.

A modo de resumen de los datos sobre propiedades mecánicas generados a partir de nuestro estudio se elaboró un cuadro concluyendo los valores medios de las mismas (tabla 4.9).

Altman y col. en su revisión de 2003 sobre biomateriales derivados de la seda, describen las propiedades mecánicas de la fibroína nativa (tras

extraerle la sericina), citando valores de módulo de Young de aproximadamente 500 MPa, resistencia a la tracción de 5 a 12 GPa y valores de elongación del 19%. Éstos son muy superiores a los descritos en nuestro trabajo y también por el resto de autores en la bibliografía sobre mallas electrohiladas de fibroína de seda (ejemplos en tabla 4.10). Sin embargo la elaboración de estas mallas es mucho más interesante que el uso de la seda directamente como biomaterial, ya que con el electrohilado se generan matrices porosas (que garantizan la difusión de nutrientes), con tasas de degradación más adecuadas, miméticas con la estructura de la matriz extracelular y con una superficie bioactiva mucho mayor, dada la escala en la que se mueven los tamaños de sus fibras, mucho menores que las de la fibroína nativa.

Protocolo	Diámetros de las fibras (nm)	Módulo de Young (MPa)	Elongación (%)	Resistencia a la tracción (MPa)
LiBr	847±363	270±44	2,78±0,78	5,92±1,08
Ternario	2771±1343	252±41	3,90±0,67	7,45±1,34
CaCl₂	1672±935	252±75	5,03±1,32	9,33±2,62

Tabla 4.9. Valores medios de diámetro de fibras, módulo de Young, elongación y resistencia a la tracción de mallas de seda electrohilada al 17% (p/v) en HFIP, elaboradas con tres metodologías distintas de disolución de fibroína.

Las comparaciones con los resultados obtenidos por otros autores en la bibliografía (tabla 4.10) dejan ver que los valores de elongación y resistencia a la tracción obtenidos por Jin y col. (2004), Min y col. (2006), Cao y col. (2009) y Gandhi y col. (2009) fueron similares a los obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, en el caso del estudio propuesto por Gandhi y col. (2009) se observa una resistencia a la tracción sensiblemente mayor, probablemente debida a la orientación de las fibras en una sola

dirección con el consiguiente incremento de este valor en el eje longitudinal de alineación. En el trabajo de Jin y col. (2004) la presencia de PEO en la disolución polimérica puede ser responsable del incremento de resistencia.

Autores	Protocolo	Concentración y disolvente empleados	Módulo de Young (MPa)	Elongación (%)	Resistencia a tracción (MPa)
Jin y col. (2004)	LiBr	7,5% (p/v) PEO/H ₂ O	624,9±0,9	4,0±2,0	13,6±1,4
Wang y col. (2004)	LiBr	7,1% (p/v) PEO/H ₂ O	8,0±2,98 (Gpa)	----	----
Chen y col. (2006)	Ternario	28-37% (p/v) H ₂ O	----	1,63	1,49
Min y col. (2006)	Ternario	7% (p/v) HFIP	104,3±13,7	4,4±0,7	4,6±0,5
Cao y col. (2009)	LiBr	11-17% (p/v) H ₂ O	----	11,1±0,7	10,2±1,6
Gandhi y col. (2009)	CaCl ₂	15% (p/v) AF (fibras alineadas)	506±10,23	4,82±0,38	18,53±1,21
Meinel y col. (2009)	LiBr	8,9% (p/v) PEO/ H ₂ O (mediciones a fibras individuales y en húmedo)	----	77-229	----
Kim y col. (2010)	Ternario	<i>Films</i> de fibroína (no electrohilados)	----	6	9,7

Tabla 4.10. Tabla ilustrativa de los valores de módulo de Young, elongación y resistencia a la tracción obtenidos para mallas electrohiladas de fibroína de seda descritas en la bibliografía, incluyendo información sobre autores de la publicación, concentración de fibroína, protocolo de disolución y disolventes empleados (HFIP, hexafluoroiso-propanol; AF, ácido fórmico; PEO, polietilen óxido; H₂O, agua).

Dada la gran variedad de parámetros que afectan el electrohilado modificados por cada autor en sus respectivos experimentos, el más similar al nuestro sería el propuesto por Min y col. en 2006, ya que emplean HFIP como disolvente y generan mallas de propiedades mecánicas similares.

También obtuvieron valores de elongación (6%) y resistencia a la tracción (9,7 MPa) parecidos Kim y col. (2010) al evaluar las propiedades mecánicas de *films* de fibroína de aplicación en reparación de tímpano.

La gran disparidad observada en los valores de módulo de Young propuestos en la literatura deja ver el grado de afectación del mismo dependiendo del disolvente empleado. La presencia de PEO en las disoluciones de electrohilado, así como el uso del ácido fórmico, parecen aumentar la rigidez de los materiales producidos, mientras que se obtienen valores más bajos con el uso de HFIP (Min y col., 2006).

Es importante comentar que el método empleado en la evaluación de las propiedades mecánicas puede alterar mucho los resultados obtenidos, así, por ejemplo, Meinel y col. (2009) sugieren datos de elongación entre 77 y 229 %, justificando estos altos valores con el hecho de que las mediciones fueron realizadas en húmedo y a fibras individuales, lo cual evita interferencias provocadas por la orientación de otras fibras adyacentes y por los puntos de ramificación.

A modo de resumen, en relación a los resultados descritos, se puede decir que mediante las tres metodologías empleadas se han obtenido mallas electrohiladas con valores de módulo de Young similares. Los valores de elongación y resistencia a la tracción fueron mayores en las derivadas de los protocolos de ternario y CaCl_2 comparándolos con las de LiBr. Éste hecho es debido, probablemente, a la mayor integridad estructural aportada por las fibras de tamaño micrométrico (de mayor tamaño), cuya presencia esta relacionada con los pesos moleculares de los péptidos generados según el protocolo de disolución de fibroína nativa empleado.

4.4. CONCLUSIONES

La disolución de fibroína nativa con el protocolo que emplea LiBr es la que menos degrada la cadena pesada de la fibroína de seda, ocurriendo todo lo contrario con la cadena ligera. Las metodologías que utilizan los reactivos ternario y CaCl_2 producen una degradación proteica mayor en términos generales, pero no destruyen la cadena ligera, siendo este último, el protocolo más agresivo dado el largo tiempo de disolución necesario, con exposición a altas temperaturas. Estas diferencias han sido visualizadas a partir de disoluciones acuosas de fibroína liofilizada mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie.

El método de disolución de la proteína nativa afecta a la solubilidad en agua de la fibroína liofilizada. Se obtienen porcentajes más elevados de proteína insoluble en el caso de los protocolos que emplean CaCl_2 o reactivo ternario que en el caso del que emplea LiBr. Este hecho se explica por la mayor presencia de láminas beta (proteína insoluble) en los dos primeros, comprobada mediante espectroscopía de infrarrojos.

Los métodos empleados en la elaboración de las mallas de fibroína de seda electrohilada generan materiales de propiedades mecánicas constantes y reproducibles, lo cual se hace patente en la no detección de diferencias estadísticamente significativas dentro de las réplicas de estudio de cada tratamiento.

Mediante el electrohilado de fibroína de seda extraída con el protocolo que emplea LiBr se generan fibras de 847 ± 363 nm, más adecuadas para mimetizar la matriz extracelular de los tejidos. Las obtenidas mediante los protocolos CaCl_2 y ternario presentan unos diámetros de 1672 ± 935 nm y 2771 ± 1343 nm respectivamente. El mayor diámetro de estas últimas aporta propiedades mecánicas más adecuadas en detrimento del biomimetismo del material.

Los valores de módulo de Young obtenidos para las mallas electrohiladas de fibroína de seda fueron similares (ANOVA, $p > 0,05$), aunque parece apreciarse una ligera tendencia a que sean más rígidas las elaboradas mediante el protocolo LiBr. Se detectaron, también con el protocolo LiBr, los menores valores de elongación y resistencia a la tracción (diferentes estadísticamente, Mann-Whitney, $p < 0,05$). Este hecho podría estar vinculado a la mayor presencia de cadenas ligeras de fibroína, aportando elasticidad al material, en los protocolos CaCl_2 y ternario.

El grosor de las mallas electrohiladas es más homogéneo y menor en el caso del protocolo que emplea LiBr que en las otras dos metodologías, incluso usando el mismo equipo de electrohilado, superficie colectora y cantidad de fibroína. Ello es consecuencia de una deposición diferencial de fibras de mayor tamaño en las regiones centrales de la malla en los casos de CaCl_2 y ternario, debida a simple gravedad.

El uso que se vaya a dar al material electrohilado debería determinar el protocolo de disolución de fibroína nativa a emplear, ya que éste afectará las propiedades mecánicas y diámetro de las fibras generadas.

5. Fabricación de mallas de fibroína de seda electroconductoras para aplicaciones biomédicas

5.1 Introducción

5.2 Material y métodos

5.2.1 Cría del insecto y procesado de la seda

5.2.2 Fabricación de materiales mediante electrohilado

5.2.3 Caracterización de los materiales, previa al cultivo celular

5.2.3.1 Microscopía electrónica de barrido y cálculo del tamaño de las fibras

5.2.3.2 Propiedades mecánicas de las mallas electrohiladas

5.2.3.3 Espectroscopía de infrarrojos

5.2.3.4 Caracterización electroquímica de las mallas conductoras

5.2.4 Biocompatibilidad de los materiales

5.2.4.1 Cultivo celular

5.2.4.1.1 Aislamiento de fibroblastos humanos

5.2.4.1.2 Aislamiento de células madre mesenquimales de médula ósea

5.2.4.1.3 Esterilización de las mallas

5.2.4.1.4 Siembra de los biomateriales

5.2.4.2 Microscopía electrónica de barrido para muestras biológicas

5.2.4.3 Ensayo de proliferación celular (MTT)

5.3 Resultados y discusión

5.3.1. Tamaño de las fibras

5.3.2. Cubierta de polipirrol

5.3.3. Voltamograma

5.3.4. Caracterización de propiedades físico-químicas

5.3.5. Ensayos de adhesión y proliferación celular

5.4 Conclusiones

5.1 INTRODUCCIÓN

En el apartado anterior del presente trabajo se expusieron algunos de los numerosos ejemplos descritos en la bibliografía sobre matrices electrohiladas de fibroína de seda. Siendo estos estudios cada vez más numerosos y complejos, al emplear mezclas de diferentes polímeros para mejorar las propiedades físicas de la malla, o integrar en sus composiciones factores de crecimiento o proteínas que estimulan la proliferación celular o la diferenciación de las células madre hacia diversos linajes celulares.

El campo de aplicaciones de las matrices de seda electrohilada podría expandirse en gran manera confiriéndoles propiedades conductoras de la corriente eléctrica. Los *scaffolds* compuestos de polímeros conductores tienen utilidad en la producción de biosensores, liberación controlada de fármacos e Ingeniería de Tejidos, mejorando el crecimiento celular (Chronakis y col., 2006; Ravichandran y col., 2010).

Las nanofibras electrohiladas conductoras pueden ser construidas empleando dos aproximaciones distintas. La primera es el electrohilado directo del polímero conductor o mezclas del mismo con otros polímeros, lo cual fue realizado por Chronakis y col. (2006). Sin embargo, es aún bastante desconocido el efecto que la reabsorción del material puede producir cuando se emplea en dispositivos implantables.

La segunda aproximación sería el electrohilado de un material biocompatible y reabsorbible y después el recubrimiento del mismo con un polímero conductor. Esta opción fue estudiada por Lee y col. (2009), que cubrieron mallas de PLGA con polipirrol. Los resultados denotan un mayor crecimiento en número y longitud de neuritas de células PC12 cultivadas sobre este material cuando se aplicaban corrientes eléctricas.

Los materiales híbridos entre fibroína de seda y un polímero conductor podrían permitir la aplicación de campos eléctricos de baja intensidad durante el crecimiento celular. Además estos materiales biocompatibles pueden ser oxidados y reducidos, intercambiando iones con el medio de cultivo y generar así corrientes eléctricas controladas (Collazos-Castro y col., 2010), ello abriría nuevos campos experimentales empleando biomateriales conductores en estudios de proliferación y diferenciación celular.

Mediante la aplicación de corrientes anódicas bajas, el material se oxida y por tanto se extraen aniones del electrolito y son “almacenados” en el film (Akieh y col., 2009; Otero, 2009). Por el contrario, frente al flujo de corrientes catódicas de baja intensidad, el material se reduce y se liberan iones al medio. También existen polímeros conductores que intercambian cationes, permitiendo transducciones electrón/catión (Wang y col. 2001).

Dadas las buenas propiedades de la fibroína de seda electrohilada en términos de biocompatibilidad y reabsorción, podría ser interesante conferir a estas fibras propiedades conductoras de la corriente eléctrica. El presente trabajo ofrece la metodología de producción de un material híbrido hecho de fibroína electrohilada y cubierto de polipirrol. Se estudian sus propiedades electroquímicas y mecánicas, así como la biocompatibilidad frente a cultivos primarios de fibroblastos y células madre mesenquimales de médula ósea humanas. Todos estos factores se comparan con mallas electrohiladas de la misma proteína pero sin cubrir de polipirrol. Queda abierto, de este modo, un nuevo frente experimental, en el cual estamos trabajando a día de hoy; consistente en la aplicación de campos eléctricos y corrientes iónicas locales a distintos cultivos celulares sembrados sobre este novedoso biomaterial.

5.2 MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. Cría del insecto y procesamiento de la seda

La cría de los gusanos, al igual que en el capítulo 4, se llevó a cabo con el fin de producir seda para la elaboración de los materiales electrohilados. Se siguió la metodología propuesta en el capítulo 3 (punto 3.2.1), llevando a término el ciclo vital de los insectos.

El protocolo empleado para la obtención de la fibroína de seda purificada aparece descrito en el apartado de material y métodos del capítulo 4 (punto 4.2.2). En este caso solo se utilizó fibroína nativa disuelta con LiBr (tras su diálisis y liofilización), ya que fue ésta la que dió lugar a fibras de menor tamaño. Éstas son más adecuadas para el mimetismo de las proteínas de matriz extracelular, sobre las cuales se ha postulado que la adhesión y proliferación celulares son óptimas.

5.2.2. Fabricación de materiales mediante electrohilado

Para la elaboración de las mallas utilizadas en este capítulo se utilizó el equipo de electrohilatura Yflow™ 2.2.S-300 Electrospinner (Yflow, Málaga, España) (figura 5.1). Éste sigue los principios básicos de la técnica, ya descritos en el apartado de material y métodos del capítulo 4 (punto 4.2.5), e incorpora la posibilidad de realizar fibras de estructura coaxial. Dispone para ello de dos agujas metálicas concéntricas a través de las cuales pueden fluir 2 disoluciones poliméricas distintas que entran en contacto en el extremo final de las agujas. En nuestro caso solo se utilizó una de las agujas (la central) de 0,45 mm de diámetro y una de las bombas, puesto que se elaboraron fibras sencillas.



Figura 5.1. Equipo de electrohilatura Yflow™ 2.2.S-300 Electrospinner.

Además, este equipo presenta una mejora para aumentar la eficiencia en la recolección de las fibras. A tal efecto dispone de un colector de acero inoxidable aislado eléctricamente mediante patas de teflón del resto de la estructura y que se encuentra conectado a una fuente de alto voltaje (esta vez de carga negativa).

Las fibras, a las que se está aplicando un campo eléctrico positivo en la aguja capilar, se dirigen de una forma más selectiva hacia este colector mejorado, disminuyendo la cantidad de material que se pierde en estructuras anejas de la máquina y maximizando la protección del operador, que ve sensiblemente disminuida su exposición a partículas en suspensión derivadas del electrohilado.

Se emplearon disoluciones de fibroína de seda elaboradas con el protocolo de disolución que usa LiBr en la disolución de la fibroína nativa, y la concentración escogida fue, de nuevo, 17% (p/v) en HFIP. La distancia entre inyector y colector fue 10 cm y el voltaje aplicado en ambas estructuras +6 kV y -5 kV, respectivamente. El caudal seleccionado en la bomba inyectora fue 6 ml/h y el tamaño del papel de aluminio utilizado como colector 10x10 cm. En este caso se depositaron 3 ml de disolución por malla elaborada ($30 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) y el tratamiento de cristalización con metanol se aplicó durante 15 min.

Parte de las mallas de fibroína de seda fueron empleadas sin cubrir de polipirrol (figura 5.2) a modo de control respecto a las conductoras. Otras se cubrieron con polipirrol por polimerización química, tal como se describe a continuación.

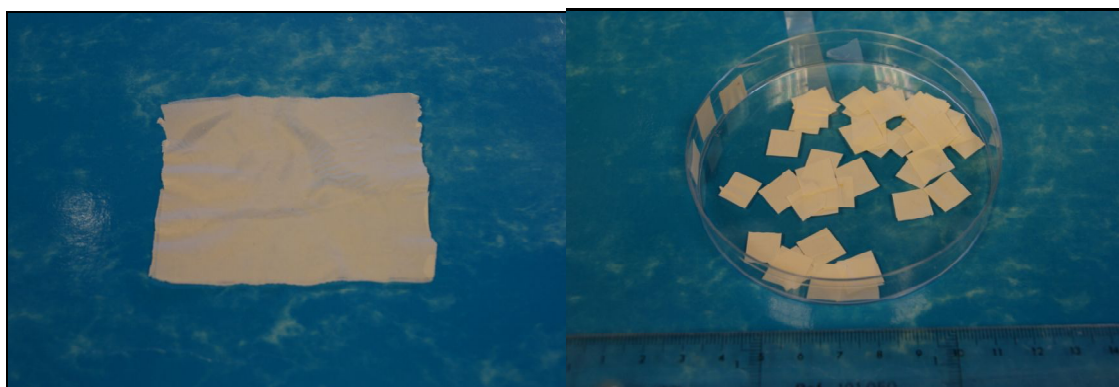


Figura 5.2. Malla electrohilada de fibroína de seda sin cubrir de polipirrol antes y después de ser troceada para el experimento de cultivo celular.

El pirrol (Fluka, EE.UU) con una pureza del 97% fue destilado en condiciones de vacío a 20 mBar, usando para ello una bomba MZ 2C SHOOT. Porciones de las mallas de fibroína de 16x7x0,085 mm se pusieron en 30 ml de disolución acuosa de pirrol (0,3 M) y NaCl (0,3 M) (Panreac,

España) en un vaso de precipitados de 250 ml. El sistema fue sometido a ultrasonidos durante 30 s para saturar la malla de pirrol. Después las mallas fueron incubadas en un criostato a 4 ± 1 °C (Julabo F25) durante 1 h. Tras esto, y manteniendo el sistema a 4°C se añadieron 20 ml de disolución acuosa de cloruro ferrico 0,75 M (Sigma-Aldrich, EE.UU). La polimerización se llevó a cabo durante 24 h, y las mallas cubiertas de polipirrol (figura 5.3) (nombradas en adelante como pPy-SF, por su nomenclatura en inglés "*polypyrrole-silk fibroin*") se lavaron varias veces en agua ultrapura y se secaron a temperatura ambiente.

El contenido en polipirrol fue determinado por diferencia de masas entre mallas cubiertas y no cubiertas, utilizando una balanza Sartorius SC2 con una precisión de 10^{-7} g.

En cuanto a los grosores de las mallas se realizaron mediciones usando un microcalibre Comecta (1 μ m de precisión). Estos fragmentos de 1,12 cm² de area geométrica, fueron utilizados como electrodos de trabajo para las caracterizaciones electroquímicas y para la medición de las propiedades mecánicas.

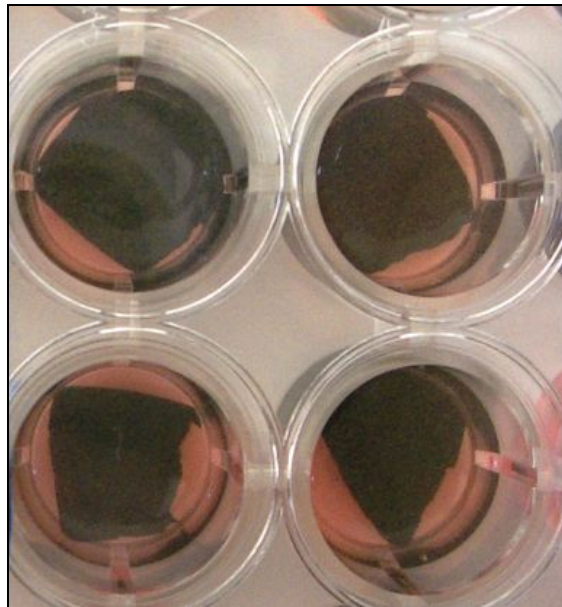


Figura 5.3. Fragmentos de malla electrohilada de fibroína de seda cubiertos de polipirrol.

5.2.3. Caracterización de los materiales, previa al cultivo celular

5.2.3.1. MEB y cálculo del tamaño de las fibras

La metodología empleada para la visualización de los biomateriales antes de su siembra y la determinación de los diámetros de sus fibras aparece descrita en el punto 4.1.6.1 del capítulo 4.

5.2.3.2. Propiedades mecánicas de las mallas electrohiladas

Las propiedades mecánicas, tanto de mallas electroconductoras como de las de fibroína pura, fueron analizadas según se propone en el punto 4.1.6.2 del capítulo 4.

5.2.3.3. Espectroscopía de infrarrojos

El análisis del espectro de infrarrojos se llevó a cabo según la metodología descrita en el capítulo 4 (punto 4.2.6.3), pero en este caso el rango de estudio fue de 1800 a 800 cm^{-1} . Esto se hizo así para visualizar de forma clara los picos de absorbancia correspondientes al polipirrol incorporado en las mallas, siendo este rango también adecuado para detectar los picos correspondientes a las amida I, II y III de la fibroína de seda y confirmar así su insolubilidad en agua tras el tratamiento con metanol.

5.2.3.4. Caracterización electroquímica de las mallas conductoras

Para la caracterización electroquímica de las mallas conductoras, mediante la elaboración de voltamogramas, se emplearon celdas electroquímicas convencionales de un solo compartimento (Metrohm), conectadas a un potencióstato-galvanostato PAR M273A controlado por un ordenador con el software ECHEM.

El electrolito escogido para los experimentos fue NaCl en disolución 0,1 M, ya que proporciona un comportamiento electroquímico similar al del entorno biológico.

Como contraelectrodo se utilizó una placa de acero de 4 cm^2 de superficie. Tras ser pulida y lavada en un baño de acetona con ultrasonidos

durante 15 min y lavada con agua Mili-Q antes de cada caracterización. El electrodo de trabajo fue la malla cubierta de polipirrol (pPy-SF). Se utilizaron fragmentos de 15-17 mm de longitud, 6-8 mm de anchura y 80-90 μm de espesor, cuyas masas eran de 4 a 5 mg. Como electrodo de referencia se utilizó un electrodo Crison Ag/AgCl (3M KCl).

Todos los experimentos se llevaron a cabo a 22°C (temperatura ambiente) y, antes de cada experimento, las disoluciones de trabajo fueron desgasificadas burbujeando N_2 durante 20 min.

5.2.4. Biocompatibilidad de los materiales

Con el fin de evaluar la biocompatibilidad de los materiales de fibroína de seda electrohilada se procedió a su cultivo con células madre mesenquimales de médula ósea (hMSCs) y fibroblastos humanos. Su crecimiento, adhesión y proliferación se estudió mediante microscopía electrónica de barrido y ensayos espectrofotométricos de proliferación celular con sales de tetrazolio (MTT).

Los cultivos de fibroblastos fueron escogidos por su potencial uso en el desarrollo de sustitutos cutáneos o implantes para acelerar el proceso de cicatrización de heridas de piel.

Las células madre mesenquimales de médula ósea se seleccionaron por ser multipotenciales y poder diferenciarse hacia gran variedad de linajes celulares (músculo, tejido nervioso, óseo, cartílago...). A continuación se exponen cada una de las técnicas utilizadas para el aislamiento celular, cultivo y seguimiento de estos ensayos *in vitro*.

5.2.4.1. Cultivo celular

Todos los reactivos empleados fueron suministrados por Sigma-Aldrich (EE.UU) y las placas y frascos de cultivo por Nunc (Dinamarca).

5.2.4.1.1. AISLAMIENTO DE FIBROBLASTOS HUMANOS

Para el establecimiento de los cultivos de fibroblastos humanos se obtuvieron muestras de piel de donantes jóvenes (27-35 años) tras firmar los consentimientos informados.

Los cultivos fueron iniciados haciendo uso de explantes de piel, para lo cual, previamente, las biopsias fueron lavadas en tampón fosfato (PBS) con estreptomycin (100 µg/mL) y penicilina (100 U/mL).

Haciendo uso de unas tijeras quirúrgicas estériles, se procedió a la separación del tejido subcutáneo de la piel, se cortó en fragmentos de 1-2 mm y se ubicaron fijados en placas de cultivo celular de 6 pocillos. Se añadió una disolución 0,1% (p/v) de colagenasa en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) y se mantuvieron así durante 1 h a 37°C y atmósfera al 5% de CO₂.

Posteriormente se añadió al medio de cultivo suero fetal bovino (SFB) (10% v/v), glutamina (1mM) y antibióticos habituales (penicilina y estreptomycin a la misma concentración antes aportada en el PBS).

Cuando la confluencia celular fue del 80% se procedió a su subcultivo en frascos de 75 cm². Las células se despegaron con una disolución de tripsina (0,25%)/ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (1mM). Su acción proteolítica, aplicada durante no más de 5 minutos a 37°C, produce una ruptura de los "anclajes" celulares al plástico especial de cultivo y permite que sean subcultivadas en nuevos frascos. La densidad de siembra en los frascos de 75 cm² fue 5.000 células/cm².

Tras la siembra se añadieron 15 ml de medio de crecimiento (DMEM, SFB al 10% v/v, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/mL y glutamina 0.1 mM) y los frascos fueron ubicados en incubadores de cultivo (Memmert IFE550) a 37°C y 5% de CO₂. El medio se cambió transcurridos 4 días permitiendo así la eliminación de las células no adherentes (en su mayoría muertas).

En adelante los cambios de medio de cultivo se efectuaron 2 veces por semana y se subcultivaron los frascos cuando la densidad de crecimiento o confluencia fue del 80%. Se congelaron parte de las células del primer pase a -196°C en medio de congelación, compuesto por suero fetal bovino con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% (v/v), para así disponer de una reserva de células "jóvenes" viables de cara a futuros experimentos.

Los pasos seguidos en el protocolo de congelación fueron: despegar células con tripsina/EDTA (5 ml), neutralizar la tripsina añadiendo medio de cultivo suplementado con suero (10 ml), centrifugar a 1.000 rpm durante 2

min, eliminar medio, añadir el volumen deseado de medio de congelación y meter en contenedor con isopropanol a -80°C durante 2 días antes de pasar los viales al tanque de nitrógeno líquido a -196°C . Esto permite un descenso paulatino de la temperatura que, junto con la adición del DMSO como agente criopreservador, evitan la formación de cristales y garantizan una alta viabilidad celular cuando se requiera el uso de estos viales.

Previamente a cada subcultivo y congelación de células, se procedía al conteo de éstas haciendo uso de la cámara Neubauer y se estimaba la viabilidad mediante el colorante azul tripán, que tiñe específicamente células muertas.

En los ensayos de siembra de biomateriales se utilizaron células de los pases (subcultivos) segundo o tercero, ya que se trata de cultivos primarios y las células podrían parar o retrasar su proliferación *in vitro* a medida que se subcultivan sucesivamente.

5.2.4.1.2. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA

Las células madre mesenquimales fueron obtenidas igualmente de donantes voluntarios jóvenes (27-35 años) mediante la obtención de aspirados de médula ósea de la cresta iliaca, tras la firma del consentimiento informado. Estos aspirados se ubicaron en tubos heparinizados para transportarlos de la sala de operaciones al laboratorio. Las células mononucleadas se obtuvieron en gradientes de ficoll de la capa leucocitaria (más conocida como "*buffy coat*" en inglés) utilizando el equipo SEPAX™ (Biosafe, Suiza).

Tras estimar la viabilidad de las células y contarlas, se cultivaron directamente en los frascos de 75 cm^2 , dejándolas así durante 7 días. Se utilizaron los mismos reactivos para el medio de crecimiento y el subcultivo, así como los mismos procedimientos descritos anteriormente para la expansión de los fibroblastos humanos. Una parte del pase primero también fue congelada.

Con los cambios de medio siguientes se fueron eliminando las células no adherentes hematopoyéticas y, posteriormente, se corroboró la identificación de este cultivo como células madre mesenquimales de médula ósea (figura 5.4) mediante citometría de flujo, por ser positivas para los marcadores de membrana CD73, CD90 y CD105 y negativas para los

marcadores CD34 y CD45, propios de células hematopoyéticas (de acuerdo con los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular).

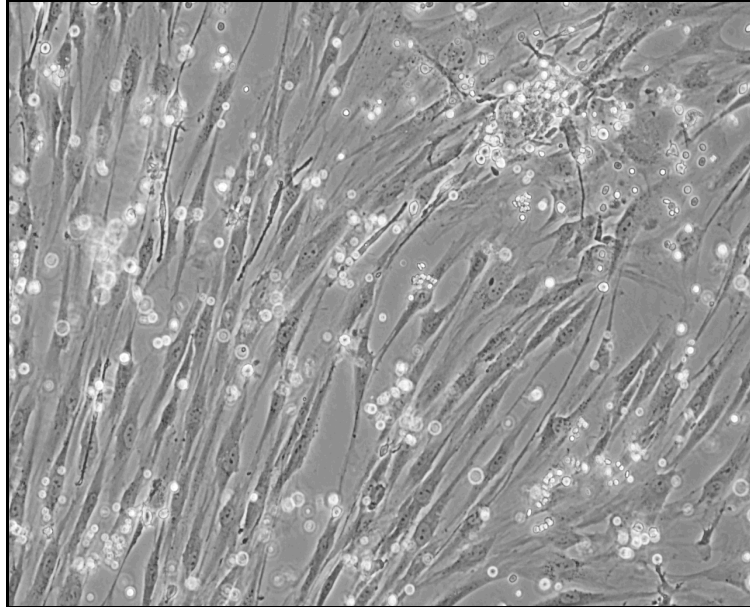


Figura 5.4. Células madre mesenquimales de médula ósea creciendo en frascos de cultivo observadas mediante microscopía de contraste de fases.

5.2.4.1.3. ESTERILIZACIÓN DE LAS MALLAS

El sistema de esterilización de las muestras, previo al cultivo celular, se llevó a cabo mediante gas plasma de peróxido de hidrógeno (LTHPGP de sus siglas en inglés "*Low Temperature Hydrogen Peroxide Gas Plasma*").

El tratamiento se prolongó durante 60 min usando el equipo STERRAD NXTM (Johnson & Johnson). Los productos generados tras este método de esterilización fueron agua y oxígeno y las fibras no sufrieron ningún cambio en su morfología tras su aplicación.

Se trata de un método que inactiva un amplio espectro de microorganismos , incluyendo endosporas bacterianas resistentes.

5.2.4.1.4. SIEMBRA DE LOS BIOMATERIALES

La siembra de los materiales (mallas electrohiladas conductoras y no conductoras) se realizó partiendo de cultivos de ambos tipos celulares que se encontraban a un 75-80% de confluencia.

Los fragmentos de malla de, aproximadamente, 1 cm² fueron ubicados en placas de 24 pocillos y pretratados con la adición de 3 gotas de SFB puro. Se dejaron 1 hora a 37°C y, posteriormente, en el momento previo a la siembra se eliminó el exceso de suero.

Se despegaron las células con 5 ml de disolución de tripsina 0.25%/EDTA 1mM (incubando durante 3 minutos a 37°C) y, tras neutralizar la acción de la tripsina, adicionando unos 10 ml de medio completo (con suero), se ajustó la concentración de las suspensiones a 10⁶ células/ml.

Se sembraron 40 µl de la suspensión celular (unas 40.000 células/material). Teniendo cuidado de que la entrada de éstas en el material fuese lenta y paulatina para evitar que las células se saliesen al pocillo de la placa donde se ubicaba.

Tras esto se dejó a las células adherirse durante 1 h en el incubador de CO₂ con las condiciones descritas previamente (37°C y 5% de CO₂)

Por último se adicionó 1 ml de medio de cultivo completo en cada pocillo y se ubicaron en el incubador. Cambiándose éste 2 veces por semana durante el crecimiento de las células en las mallas electrohiladas.

5.2.4.2. Microscopía electrónica de barrido para muestras biológicas

Para la microscopía electrónica de barrido efectuada con muestras de biomateriales ya sembrados se recurrió al Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales de la Universidad de Murcia (SACE).

El protocolo a seguir fue distinto al de visualización de las mallas electrohiladas sin cultivar. En este caso, se empleó para caracterizar el crecimiento y morfología celulares a lo largo del experimento de cultivo.

En primer lugar, las muestras se lavaron con PBS, tras esto se procedió a su fijación con glutaraldehído (Sigma-Aldrich, EE.UU) al 3% en tampón cacodilato 0,1 M (Sigma-Aldrich, EE.UU) durante 1,5 h a 4°C. Después se post-fijaron haciendo uso de tetróxido de osmio (Sigma-Aldrich, EE.UU) durante 1 h, antes de ser deshidratadas en baños con concentraciones crecientes de etanol (30, 50, 70, 90% v/v) hasta completarla en etanol absoluto. Por último, fueron sometidas a un secado mediante el método del punto crítico y cubiertas de oro. El microscopio utilizado en este experimento fue el modelo Jeol T-6100 a 15 kV.

5.2.4.3. Ensayo de proliferación celular (MTT)

El ensayo de MTT se utilizó para evaluar la proliferación celular a lo largo del experimento de biocompatibilidad de las mallas electrohiladas de fibroína de seda. Éste se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en un compuesto de color azul (formazán), el cual es detectable midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro. Esta reducción la llevan a cabo las enzimas mitocondriales y, por tanto, su actividad está directamente correlacionada con el número de células vivas que haya en el material.

Se trata de un ensayo muy utilizado para medir proliferación y supervivencia celular, fue descrito por primera vez por Mosmann en 1983 y modificado por Francois Denizot y Rita Lang en 1986.

En nuestro caso se utilizó MTT (Sigma-Aldrich, EE.UU) a una concentración de 1 mg/ml en medio DMEM (sin rojo neutro). Los materiales se incubaron en las placas de 24 pocillos con esta disolución (y en oscuridad) durante 4 h a 37°C y 5% CO₂, durante este tiempo la sal de tetrazolio es metabolizada.

El siguiente paso fue la eliminación del medio con restos de MTT y la adición de DMSO a cada pocillo, para romper las células (por choque osmótico) y disolver el formazán haciéndolo detectable en el espectrofotómetro. Éste fue transferido a placas de 96 pocillos de fondo plano y se leyó la absorbancia a 570 nm (tomando como longitud de onda de referencia 690 nm).

Las mediciones se efectuaron transcurridos 1, 7, 14 y 21 días tras la siembra empleando el equipo BMG Fluostar Galaxy. El experimento se realizó por triplicado para cada biomaterial (mallas cubiertas y no cubiertas de polipirrol) y también para cada periodo de estudio. Se realizaron controles negativos en plástico y en mallas sin sembrar, teniéndose que sustraer los valores de absorbancia generados por la fibroína cubierta y sin cubrir de polipirrol *per se*, ya que ésta daba algo de señal incluso sin estar sembrada.

El software de análisis estadístico utilizado en todos los experimentos fue SPSS 18 para Windows. Los datos sobre el experimento de

biocompatibilidad (ensayo MTT), se representaron como los valores medios de absorbancia \pm el error estándar de la media (SEM).

Cuando los requisitos de normalidad y homocedasticidad se cumplieron los datos se compararon haciendo uso del test de la t de Student ($p < 0,05$) o ANOVA ($p < 0,05$) de un factor, para 2 o mas grupos respectivamente. Si alguna de estas dos condiciones no se cumplía se procedió al uso del test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) para determinar si existían diferencias significativas en los tratamientos de estudio.

5.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Tamaño de las fibras

Las fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido sirvieron para caracterizar la estructura de las mallas electrohiladas. Se calcularon los tamaños de las fibras haciendo uso del software ImageJ, midiendo su anchura (figura 5.5).

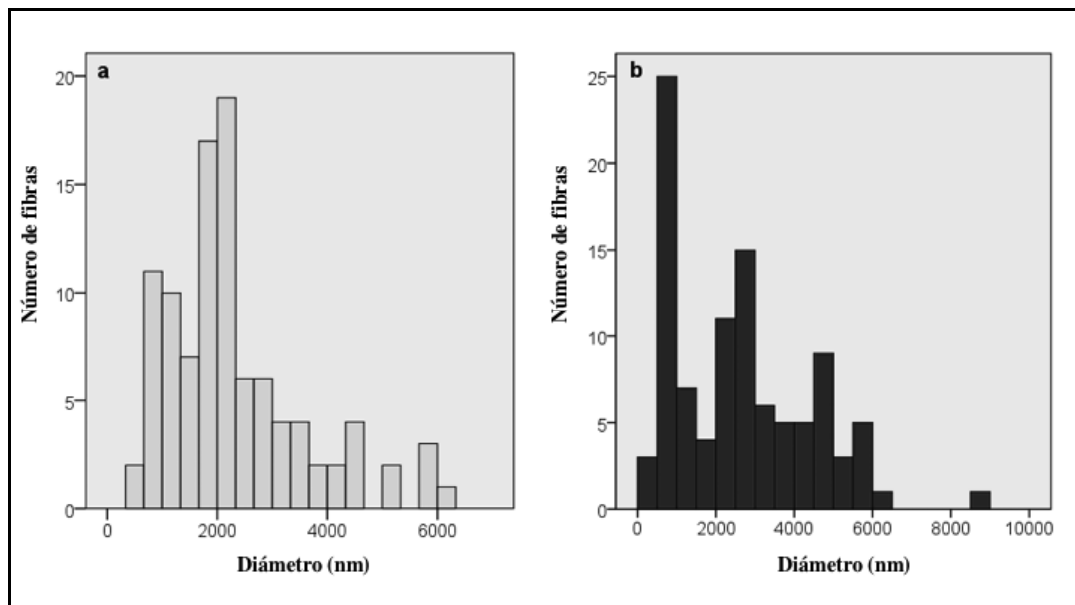


Figura 5.5. Histograma de frecuencias mostrando las anchuras de las fibras de mallas electrohiladas de fibroína de seda pura (a) y cubierta de polipirrol (b) tras ser cristalizadas en metanol absoluto.

Las fibras presentaron una forma aplanada muy peculiar (figura 5.6), similar a la de una cinta y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas para los valores de anchura antes y después de ser cubiertas

de polipirrol (test de la t, $p > 0,05$). La cubierta con el polímero conductor tampoco disminuyó el espacio libre entre las fibras en la malla, siendo este suficiente para fomentar una buena adhesión y proliferación celulares.

El valor medio para el tamaño de las fibras electrohiladas de fibroína pura fue 2.300 (± 1.295) nm, oscilando entre 600 y 6.081 nm. Se obtuvieron valores muy similares para las mallas cubiertas de polipirrol. Siendo el valor medio en este caso 2.630 (± 1.722) nm y oscilando los valores mínimo y máximo entre 472 y 8.670 nm respectivamente (figura 5.6).

De este modo las fibras más pequeñas podrían estar ejerciendo la misión de mimetizar la matriz extracelular (Rho y col., 2006) y la presencia de las de mayor grosor mejoraría las propiedades mecánicas del biomaterial.

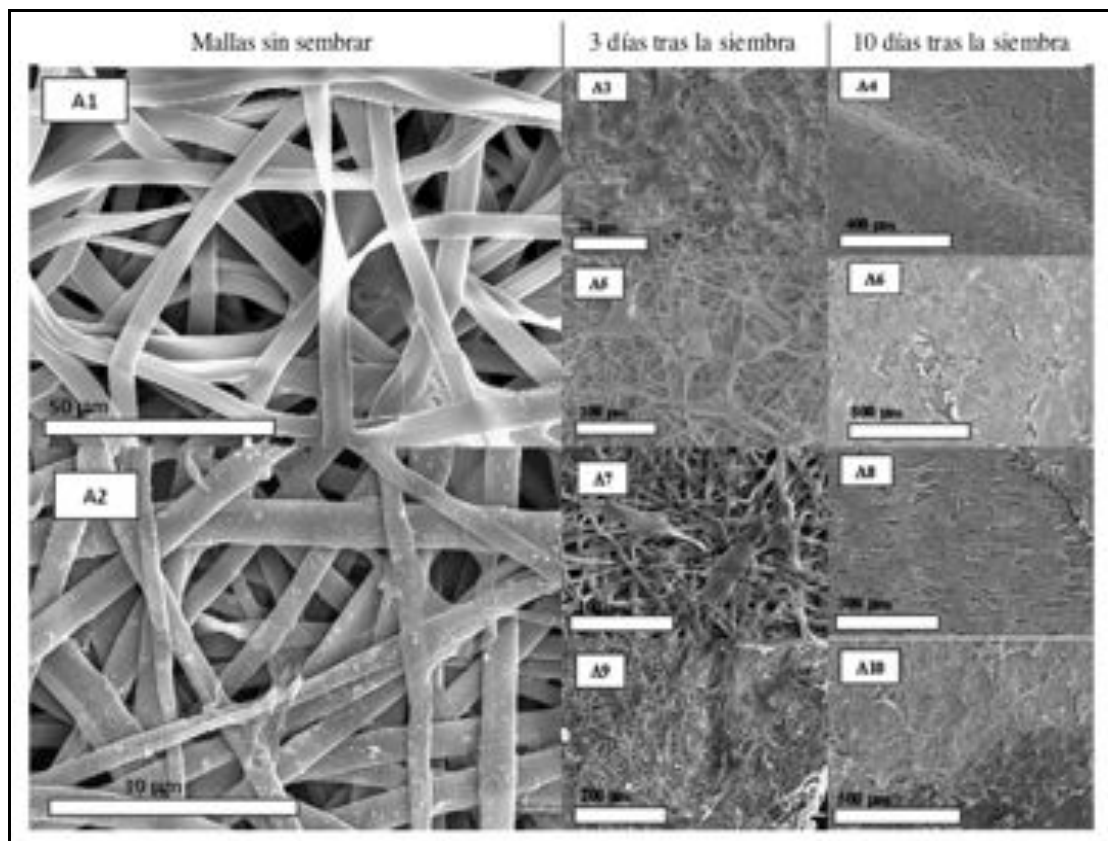


Figura 5.6. Micrografías obtenidas al SEM de mallas electrohiladas de fibroína antes (A1) y después de cubrir con polipirrol (A2). También se muestran fotografías de dos periodos de tiempo (3 y 10 días tras la siembra) del crecimiento de fibroblastos y hMSCs sobre mallas de fibroína pura (A3,A4 y A5,A6, respectivamente) y de los mismos cultivos primarios de fibroblastos y hMSCs sobre mallas con polipirrol (A7,A8 y A9,A10, respectivamente).

5.3.2 Cubierta de polipirrol

La polimerización del pirrol generó mallas de color negro uniformemente cubiertas de este compuesto. El porcentaje de masa del polipirrol que quedó en la malla fue calculado en base al peso inicial y final de los fragmentos tras la polimerización, lavado y secado de los mismos, según la siguiente fórmula:

$$P (\%) = ((P_f - P_i) / P_i) \cdot 100$$

Donde "P" es el porcentaje de masa de polipirrol " P_f " es el peso final del fragmento de malla tras cubrir de polipirrol y " P_i " es el peso inicial de la misma, antes de efectuar la polimerización.

En la tabla 5.1 se muestran los porcentajes de masa aportados por la cubierta conductora para 6 muestras distintas, apreciándose un incremento de masa en las muestras de en torno al 50%.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
m_i (mg)	5.450	5.295	4.880	4.252	4.180	4.028
m_f (mg)	10.104	9.819	9.286	8.553	8.620	8.500
m (%)	46.06	46.08	47.45	50.29	51.50	52.61

Tabla 5.1. Valores de masa inicial (m_i) de seis muestras de fibroína electrohilada antes de cubrir de polipirrol y después (m_f) así como los porcentajes (m) de polímero conductor incorporado de forma efectiva en los materiales.

5.3.3 Voltamograma

Las mallas cubiertas de polipirrol fueron estudiadas mediante tres voltamogramas cíclicos consecutivos entre (-0,5) V y (+0,5) V a diferentes tasas de escaneo (periodos de cambio lineal de potencial en relación al tiempo). Estos se llevaron a cabo en disoluciones acuosas de NaCl 0,1M.

Los dos primeros voltamogramas se realizaron a cada tasa de escaneo para eliminar cualquier efecto "memoria" del material y conseguir voltamogramas estacionarios.

El tercer voltamograma (figura 5.7) muestra las respuestas para tasas de escaneo de entre 10 y 0,5 $mV \cdot s^{-1}$. La forma del mismo es similar a la descrita previamente en el trabajo de Otero y Ariza (2003) para electrodos

de polipirrol y para electrodos de platino cubiertos de polipirrol por Ren y Pickup (1993) en disoluciones acuosas. La figura 5.7 indica que las mallas cubiertas de polipirrol pueden mantener un amplio rango de corrientes catódicas y anódicas (± 8 mA) en el medio de proliferación celular a bajos potenciales y antes de alcanzar potenciales de disociación del agua. El incremento en peso de las mallas y la reproducibilidad mostrada en la elaboración de los voltamogramas ponen de manifiesto una cobertura uniforme de polipirrol con algunas formaciones dendríticas en la superficie de las mismas.

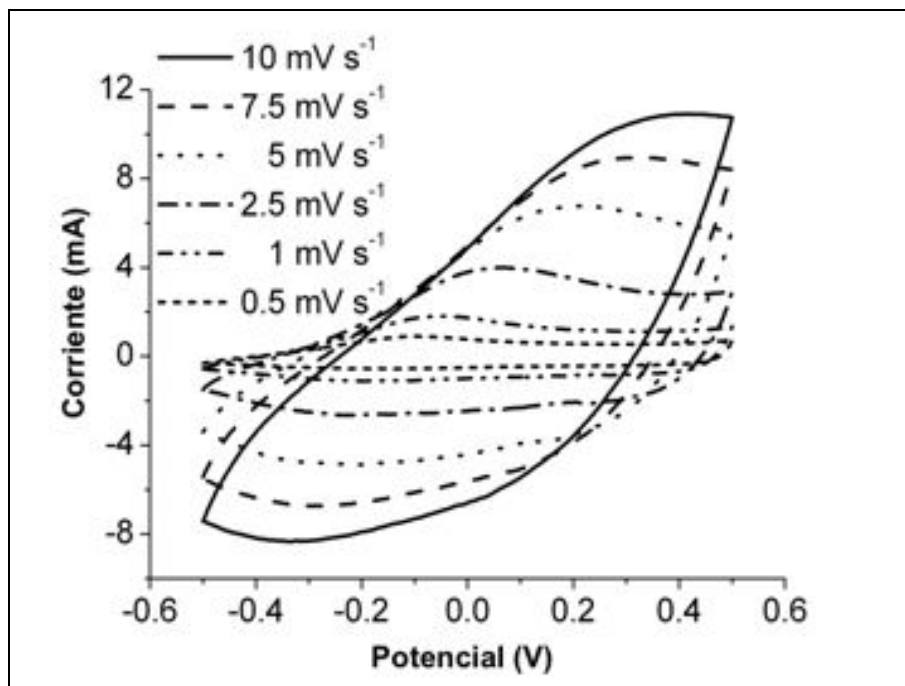


Figura 5.7. Gráfico de respuestas voltamétricas de mallas electrohiladas de fibroína ($1,12 \text{ cm}^2$ de área) cubiertas de polipirrol a diferentes tasas de escaneo desarrollado frente a disoluciones acuosas de NaCl 0,1M, en el rango de potenciales entre (-0,5) y (+0,5) mV. Las corrientes positivas promueven almacenaje de iones Cl^- y las negativas liberación de los mismos al medio.

De la integración de los voltamogramas descritos anteriormente (figura 5.3), se puede describir la evolución de las cargas almacenadas o liberadas de la cubierta de polipirrol (figura 5.8). La evolución de las cargas (Q) puede transformarse, utilizando la constante de Faraday ($F=96485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$) y el area geométrica de la malla en el número de moles ($Q/F=n$) de contraiones (iones Cl^-) almacenados o liberados por centímetro cuadrado en la interfaz que constituye el material y la disolución (n/S), o lo que sería lo

mismo el flujo iónico en la interfaz (Otero y Abadías, 2007; Otero y Santos, 2008; Otero y De Otazo, 2009).

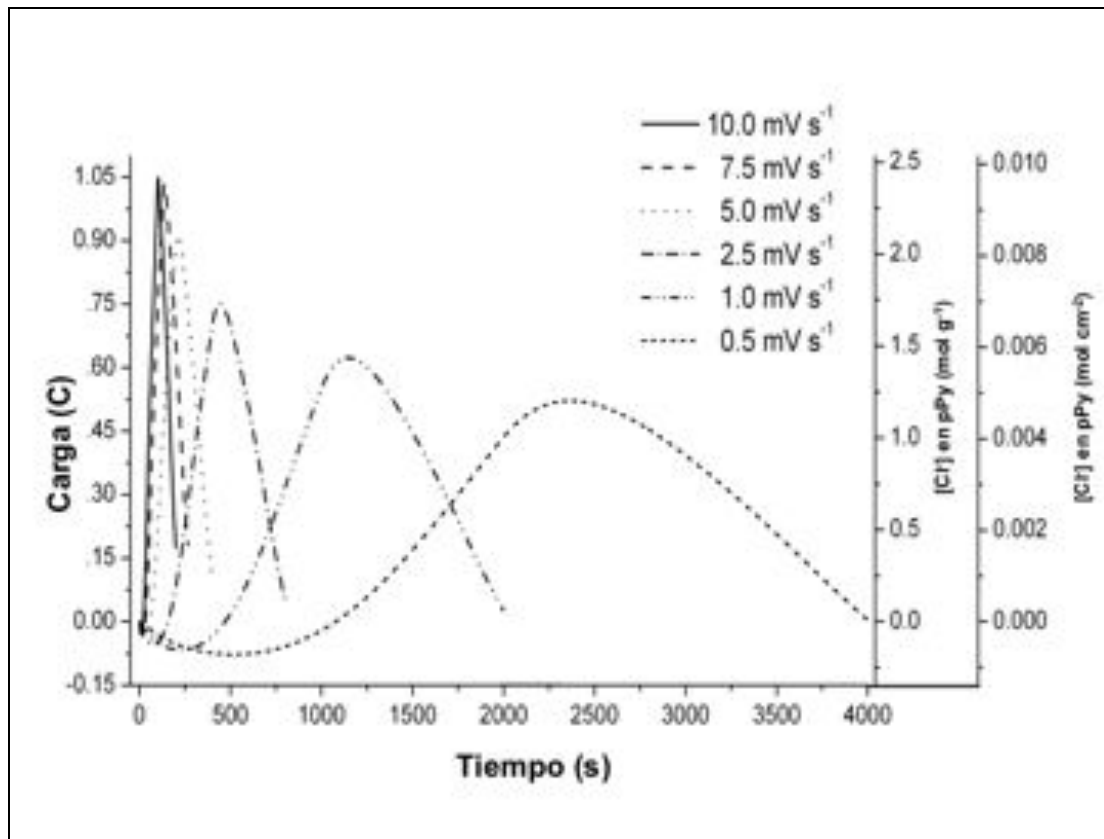


Figura 5.8. Determinación coulombimétrica mostrando la evolución de las cargas, obtenida por integración de los voltamogramas de la figura 5.7 ($Q = \int I dt$). La evolución de las cargas es transformada en concentraciones específicas de ion Cl^- ($\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) en la cubierta conductora de la malla empleando la masa conocida de polipirrol contenido en la misma. Se calculó también la densidad de iones Cl^- ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$) que fluyen en la interfase material/disolución de trabajo considerando el área geométrica de la malla analizada.

Teniendo en cuenta el contenido en polipirrol en la malla electrohilada cubierta, este flujo se puede transformar en una concentración específica de iones Cl^- ($\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) contenidos en la fracción conductora del material.

A partir de las figuras 5.7 y 5.8 se puede decir que, bajo las condiciones experimentales descritas (concentraciones, rangos de potenciales, etc), no se produce degradación del polipirrol por sobreoxidación. Los registros indican los límites de potencial para la polarización del material durante la proliferación de las células que evitarían reacciones químicas colaterales.

5.3.4 Caracterización de propiedades fisico-químicas

La estructura molecular de los materiales de seda electrohilados fue analizada antes y después del recubrimiento con polipirrol mediante espectroscopía de infrarrojos para demostrar la presencia e interacción del polímero con el biomaterial, tal como se encuentra ilustrado en la figura 5.9. La información más representativa aportada por éste análisis se detalla a continuación.

Las mallas electrohiladas de fibroína pura mostraron los picos de absorción correspondientes a las amida I (1640 cm^{-1}), amida II (1520 cm^{-1}) y amida III (1228 cm^{-1}). La ausencia del pico a 1660 cm^{-1} corroboró la cristalización de las mallas después de ser tratadas con metanol, debido al cambio de conformación química de la proteína de *random coil* (soluble) a lámina- β , según lo propuesto por Wang y col. (2006). Ello garantizó el mantenimiento de la integridad de las mallas durante el cultivo celular en medio acuoso.

El espectro de infrarrojos descrito en las mallas cubiertas de polipirrol fue similar a las de fibroína pura, con la salvedad de que éstas últimas presentaron el pico característico de vibración fundamental del anillo pirrólico a 1544 cm^{-1} , así como un segundo pico en torno a 1038 cm^{-1} correspondiente a la vibración de los enlaces $=\text{C-H}$ en el plano. Nuestros resultados en este aspecto fueron similares a los propuestos por Xia y Lu en 2008; ellos cubrieron fibras naturales de seda con polipirrol haciendo uso de un proceso similar al descrito en el apartado de material y métodos de nuestro trabajo.

Los cambios descritos en el espectro de infrarrojos tras realizar la polimerización química sobre los materiales electrohilados indican una interacción efectiva entre el polímero y los enlaces peptídicos de la fibroína, afectando a las cadenas macromoleculares de la misma. Estas interacciones son principalmente debidas a enlaces covalentes, puentes de hidrógeno y fuerzas de atracción electrostática.

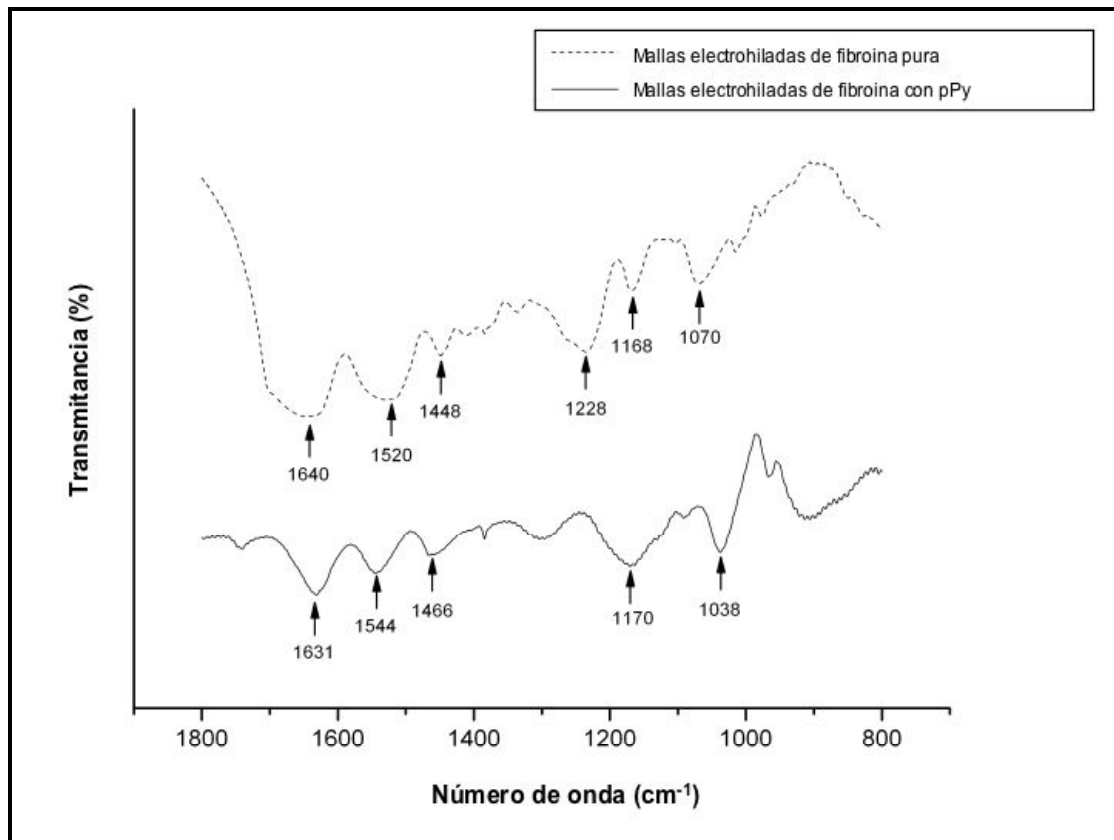


Figura 5.9. Espectro de infrarrojos registrado en mallas de fibroína de seda electrohilada antes (línea discontinua) y después de cubrir con polipirrol (línea continua).

Se realizaron tests de resistencia a la tracción mecánica de los materiales cubiertos y no cubiertos. En la figura 5.10 se muestran los perfiles obtenidos para las curvas de estrés-deformación en ambos casos. Las mallas de fibroína de seda pura se rompían ante fuerzas externas de tracción comprendidas entre 2 y 4 N y extensiones de entre 0,12 y 0,25 mm, viéndose incrementada la resistencia tras el cubrimiento con polipirrol. En este caso se resistieron tensiones superiores a 5 N y extensiones de más de 0,3 mm. Los valores de módulo de Young obtenidos fueron $266,7 \pm 17,3$ MPa y $310,5 \pm 37,6$ MPa para las mallas no conductoras y conductoras, respectivamente.

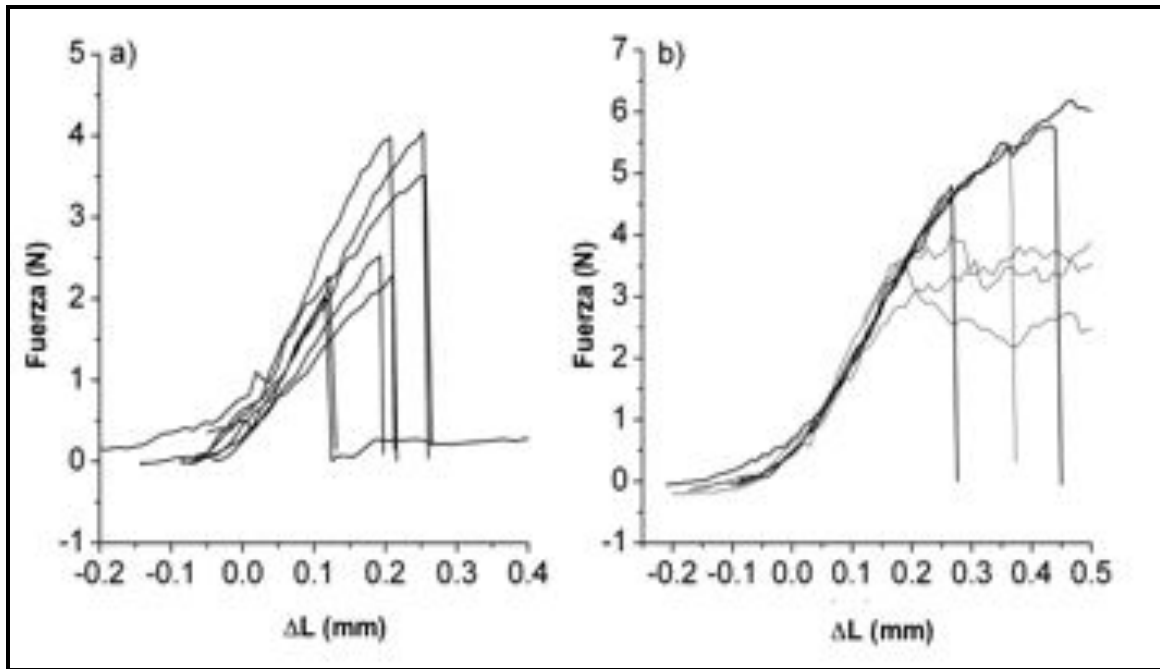


Figura 5.10. Curvas de estrés-deformación obtenidas durante la evaluación de las propiedades mecánicas de los fragmentos de mallas electrohiladas sin (a) y con cubierta de polipirrol (b). Se muestra la fuerza de tracción aplicada en N y el incremento longitudinal que admitieron los ejemplares de estudio hasta la pérdida de su integridad estructural en mm.

5.3.5. Ensayos de adhesión y proliferación celular

Durante este trabajo se realizaron ensayos de cultivo celular sobre las mallas electrohiladas, tanto conductoras como no conductoras, de cara a estudiar el uso potencial de este novedoso material en el ámbito de la Ingeniería de Tejidos. Para ello se realizaron ensayos de adhesión y proliferación celular con cultivos de fibroblastos de piel y células madre mesenquimales de médula ósea (hMSCs) procedentes de donantes voluntarios humanos. Este experimento constituyó el primer paso, previo a la aplicación de estimulación eléctrica durante el cultivo de los mismos. Esta es la línea en la que nos encontramos trabajando en el momento actual.

La adhesión y proliferación celular fueron visualizadas mediante el uso de microscopía electrónica de barrido transcurridos 3 y 10 días desde la siembra de los biomateriales (figura 5.6).

El crecimiento celular fue cuantificado empleando medidas espectrofotométricas de absorbancia mediante el ensayo MTT.

Respecto al crecimiento de los **fibroblastos humanos (figura 5.11a)**, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las

absorbancias a lo largo de los distintos periodos de estudio para ambos tipos de materiales (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) lo cual indica que se dió crecimiento celular a lo largo del experimento. Cuando comparamos los dos materiales en cada periodo de muestreo se observaron diferencias significativas entre el material no cubierto y el conductor transcurridos 1 y 21 días desde la siembra (test de la t, $p < 0,05$), no siendo así a los 7 y 14 días (test de la t, $p > 0,05$), posiblemente por las elevadas desviaciones estándar registradas en estos tiempos de estudio. Como comentario general es importante resaltar que la adhesión y proliferación celulares fueron adecuados en ambos materiales siendo el crecimiento de los fibroblastos ligeramente más lento sobre las mallas conductoras.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas a lo largo de los distintos periodos temporales en el caso de las **MSCs (figura 5.11b)** en ninguno de los dos biomateriales (ANOVA, $p > 0,05$), probablemente debido a la alta densidad de siembra ensayada y el mayor tamaño celular si se compara con los fibroblastos. Este hecho fue responsable del cubrimiento de casi toda la superficie libre de las mallas en un periodo de tiempo menor al ensayado, con la consiguiente estabilización del crecimiento en fases tempranas del estudio. Sin embargo si se observó una cierta tendencia al incremento de las absorbancias desde el día 1 al 21 tras la siembra. Al comparar las absorbancias entre ambos tipos de materiales en cada tiempo de muestreo se detectaron diferencias estadísticamente significativas a los 7, 14 y 21 días (test de la t, $p < 0,05$) indicando este hecho una mayor bioactividad para este tipo celular en las mallas de fibroína de seda pura, ya que las absorbancias fueron mayores en este caso. Este resultado implica que la cobertura con polipirrol reduce en cierta manera la bioactividad de la fibroína de seda, lo cual es de esperar si se piensa que se trata de un polímero artificial químicamente vinculado a otro natural, cuyas óptimas propiedades en el estímulo de la proliferación celular han sido ya descritas por otros autores a lo largo de los últimos años.

Sin embargo, la bioactividad de este novedoso material conductor es suficientemente buena como para continuar trabajando sobre él. Habiéndose demostrado la capacidad de permitir adhesión y proliferación celulares, el siguiente paso, consiste en la aplicación a los cultivos de campos eléctricos locales y/o corrientes iónicas a bajos potenciales para

describir el comportamiento de las células en base a su proliferación y/o diferenciación hacia otros linajes celulares.

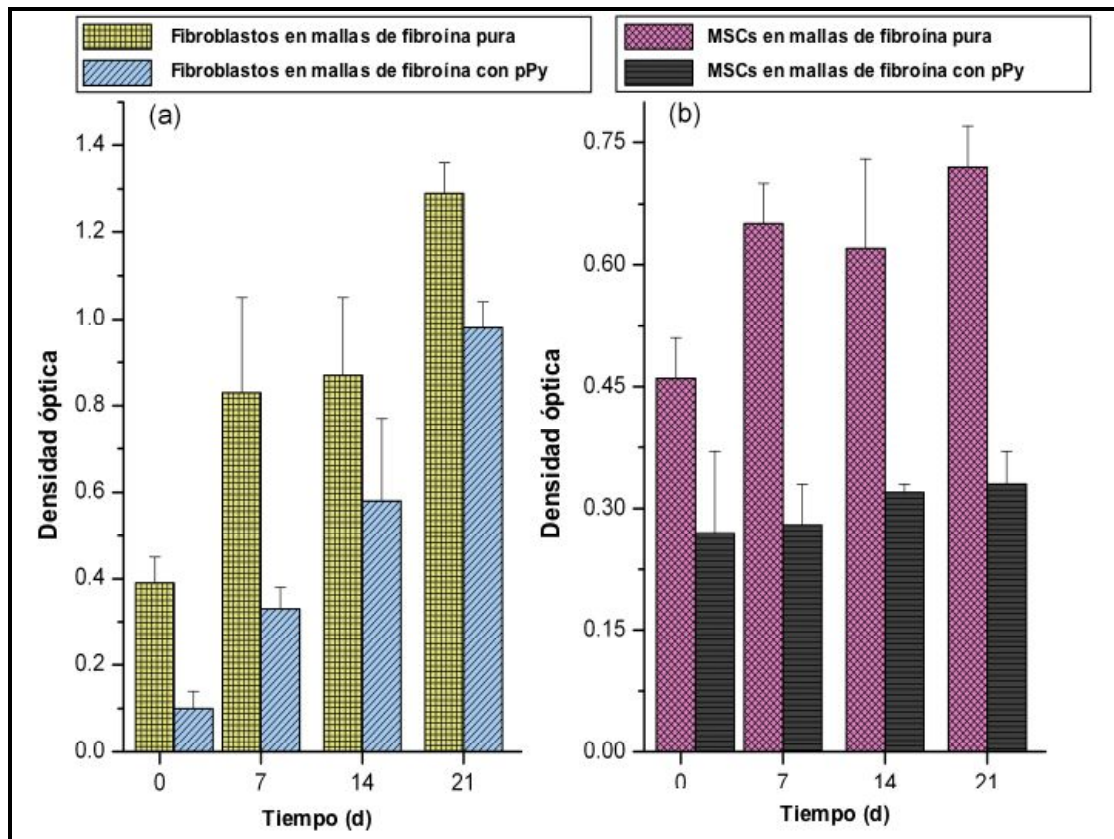


Figura 5.11. Resultados para el ensayo de proliferación celular (MTT) de fibroblastos (a) y MSCs (b) creciendo sobre mallas de fibroína de seda electrohilada con y sin cobertura de polipirrol. (Datos expresados como el valor medio ± SEM).

5.4 CONCLUSIONES

Se ha logrado la elaboración de un biomaterial conductor híbrido de fibroína de seda electrohilada mediante polimerización química, generando sobre las micro- y nanofibras que lo constituyen, una cubierta continua y uniforme de polipirrol.

El material cubierto presenta una alta electroactividad y permite la oxidación y reducción del polipirrol en disoluciones acuosas de cloruro a potenciales menores de los requeridos para que se genere Cl_2 o se dé disociación de las moléculas de agua.

La oxidación del material conlleva almacenamiento de iones Cl^- que pueden ser liberados al medio en los experimentos de cultivo celular, generando flujos iónicos locales durante los ensayos de proliferación. El

flujo iónico estará bajo control de las corrientes catiónicas que pasen a través del material oxidado.

Nuestros resultados confirman la capacidad de las mallas electrohiladas de fibroína de seda pura de permitir la adhesión, expansión y crecimiento *in vitro* de MSCs y fibroblastos humanos.

Las mallas de fibroína pura y las cubiertas de polipirrol muestran una bioactividad adecuada en cultivos primarios de fibroblastos humanos, siendo menor siempre la bioactividad de las mallas conductoras. Este resultado es parecido en el caso de los cultivos de MSCs.

Además de la posible línea de trabajo llevando a cabo experimentos *in vivo*, la adecuada bioactividad de las fibras conductoras abre otras dos vías de investigación *in vitro*. Por un lado se encontraría el sometimiento de los cultivos celulares a campos eléctricos locales, y por otro, la aplicación de corrientes iónicas locales sin disociación de las moléculas de agua.

En la actualidad, se continúa trabajando en esta dirección para clarificar los efectos de ambos tratamientos en diversos cultivos celulares, de cara al uso de este novedoso biomaterial en el ámbito de la medicina reparadora.

6. CONCLUSIONES GENERALES

A la luz de los objetivos de la tesis que se exponen en el apartado correspondiente, el trabajo realizado permite las siguientes conclusiones generales:

- 1) Se ha demostrado la viabilidad de realizar un ciclo completo de producción de una proteína de interés biomédico, la dihidrofolato reductasa (DHFR), mediante expresión de un vector baculovirus en larvas y crisálidas de *B. mori*. Esta proteína no ha sido expresada con anterioridad en este insecto. Se han desarrollado los protocolos adecuados para criar el insecto en condiciones de producción continua, para realizar la expresión del vector viral en el mismo y para purificar y validar la actividad de la proteína expresada.
- 2) Se ha llevado a cabo la expresión en crisálidas, no descrita con anterioridad, lo que presenta ventajas en cuanto a la bioseguridad del proceso y a su programación temporal, dado que se amplía la ventana disponible para la inoculación de tres días a treinta.
- 3) Se ha conseguido un nivel de producción de DHFR en extracto crudo de 582 $\mu\text{g/larva}$ (135 $\mu\text{g/g}$) y 190 $\mu\text{g/crisálida}$ (128 $\mu\text{g/g}$), quedando claro el rendimiento económico potencial del proceso.
- 4) Se ha puesto a punto la fabricación de mallas de micro y nanofibras de fibroína para crecimiento celular mediante la técnica de electrohilatura, por primera vez en nuestro país.
- 5) Se han detectado diferencias en los pesos moleculares de los péptidos de fibroína resultantes de las tres metodologías más comunmente empleadas para el procesado de la seda de cara a la obtención de biomateriales.
- 6) Se han comparado los protocolos de procesamiento de fibroína en relación a la calidad de las mallas electrohiladas derivadas de la misma, optimizando así su proceso de fabricación
- 7) Se ha comprobado que la disolución de la fibroína empleando LiBr permite la fabricación de mallas electrohiladas con mayor porcentaje de fibras de menos de 1 μm de diámetro, más adecuadas para el biomimetismo de las matriz extracelular, aunque con la inconveniencia de presentar valores más bajos de elongación y resistencia a la tracción.

- 8) Se ha comprobado que las mallas electrohiladas obtenidas de disoluciones de fibroína procesada con los reactivos ternario o CaCl_2 presentan fibras de mayor tamaño (micrométricas), con la ventaja de mostrar valores más elevados de resistencia a la tracción y elongación.
- 9) Se ha fabricado, por primera vez, un tipo de malla electrohilada híbrida de fibroína y polipirrol que permite obtener armazones de crecimiento celular electroconductores. Estos armazones permitirían estimular la proliferación de diversos tipos celulares sensibles a campos eléctricos, además de controlar la señalización celular mediante la aplicación de corrientes iónicas locales.
- 10) Se ha evaluado la biocompatibilidad de las mallas electroconductoras mediante el cultivo en ellas de fibroblastos y células madre mesenquimales de médula ósea. Aunque inferior a la biocompatibilidad de las mallas de fibroína pura, las mallas conductoras presentan una biocompatibilidad suficiente para un crecimiento celular adecuado en su aplicación como armazones celulares.
- 11) Se pone de manifiesto la posibilidad de un desarrollo combinado de los bioproductos del gusano de seda que puede llevar a un sistema de explotación de los mismos. Este sistema consistiría en criar el insecto hasta la formación del capullo y extraer del mismo la crisálida para la producción de proteína recombinante. La seda obtenida como subproducto se utilizaría para procesar la fibroína con el fin de fabricar biomateriales. Con la definición de esta posibilidad se cumple el objetivo central de esta tesis, que es explorar nuevas vías para la revalorización de la cría del gusano de seda.

7. Anexo: CURVAS Y TABLAS DE CRECIMIENTO LARVARIO

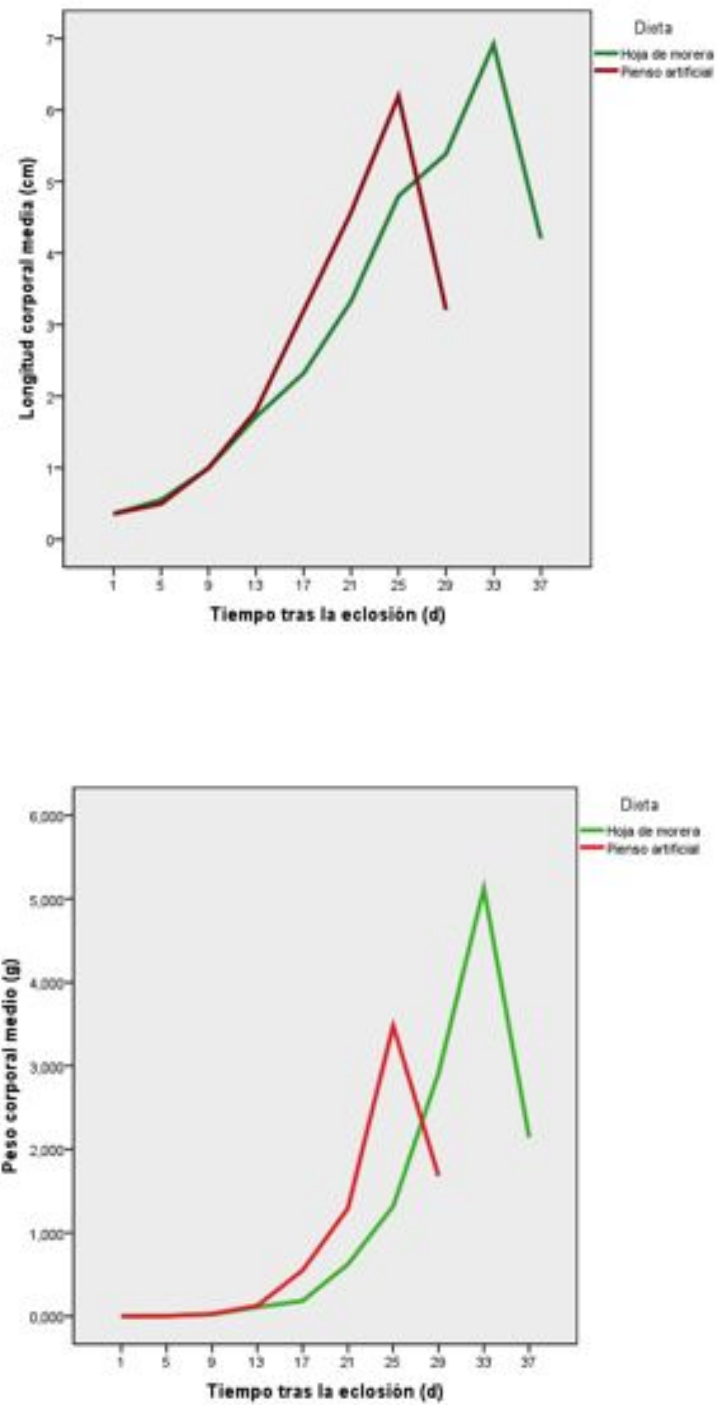
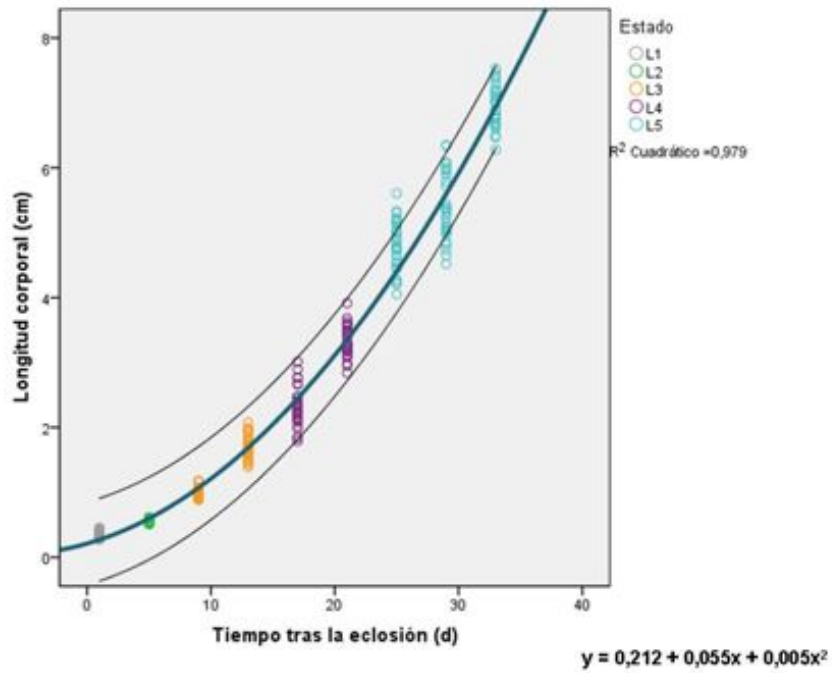


Figura 6.1. Evolución temporal de los valores medios de longitud y peso corporal en estados preimaginales de gusano de seda alimentados con hoja de morera (línea verde) y dieta artificial (línea roja).

Estado		Valor medio	Desviación estándar	Valor mínimo	Valor máximo
L1 	Peso (g)	0,001	-----	-----	-----
	Longitud (cm)	0,355	0,0451	0,271	0,457
	Peso (g)	0,001	-----	-----	-----
	Longitud (cm)	0,359	0,0588	0,248	0,503
L2 	Peso (g)	0,004	0,0006	0,003	0,006
	Longitud (cm)	0,551	0,0299	0,507	0,617
	Peso (g)	0,003	0,0007	0,002	0,005
	Longitud (cm)	0,497	0,0579	0,404	0,637
L3 	Peso (g)	0,066	0,0439	0,015	0,132
	Longitud (cm)	1,355	0,3880	0,884	2,078
	Peso (g)	0,026	0,0080	0,012	0,047
	Longitud (cm)	0,998	0,1267	0,683	1,252
L4 	Peso (g)	0,404	0,2349	0,123	0,861
	Longitud (cm)	2,824	0,5761	1,790	3,914
	Peso (g)	0,127	0,0204	0,083	0,167
	Longitud (cm)	1,803	0,2473	1,237	2,260
L5 	Peso (g)	3,118	1,6062	0,919	5,977
	Longitud (cm)	5,702	0,9877	4,052	7,528
	Peso (g)	1,773	1,3050	0,166	4,800
	Longitud (cm)	4,652	1,3162	2,381	7,124
L6 	Peso (g)	1,749	0,3373	1,120	2,322
	Longitud (cm)	2,662	0,2142	2,127	3,022
	Peso (g)	1,161	0,1875	0,852	1,638
	Longitud (cm)	2,497	0,1848	2,180	2,875
C 	Peso (g)	2,141	0,4556	1,297	3,181
	Longitud (cm)	4,203	0,4248	3,239	4,829
	Peso (g)	1,679	0,3250	1,046	2,287
	Longitud (cm)	3,207	0,1958	2,804	3,570

Tabla 6.2. Valores de los estadísticos descriptivos para el peso y lo longitud corporal calculados en las distintas fases larvarias de gusanos de seda alimentados con hoja de morera (celdas verdes) o dieta artificial (celdas rojas).

a



b

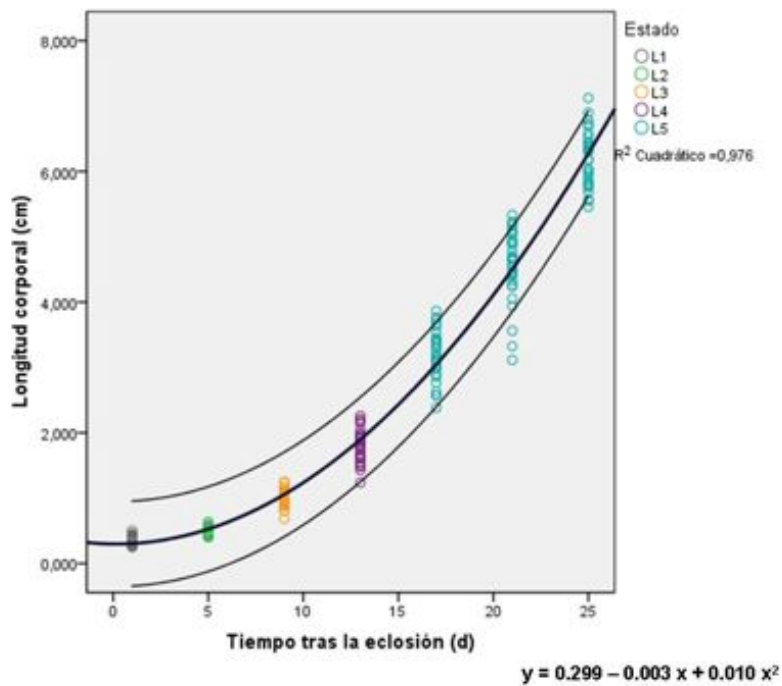
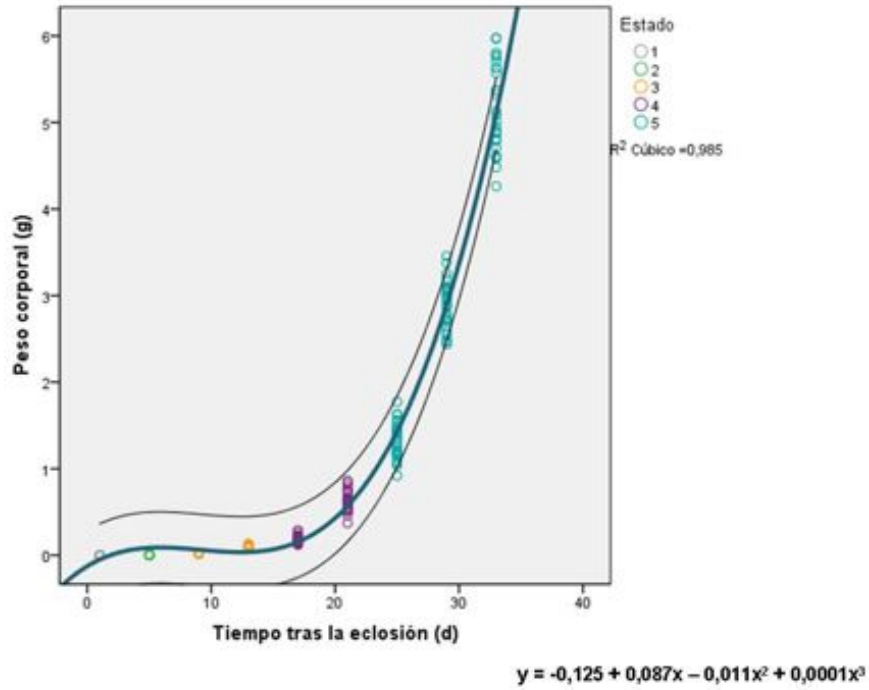


Figura 6.3. Diagramas de dispersión de puntos y curvas de crecimiento (modelos matemáticos ajustados) calculados en base a la evolución temporal de la longitud corporal en estados preimaginales de *B. mori* alimentados con hoja de morera (a) o dieta artificial (b) hasta el final de la quinta fase larvaria.

a



b

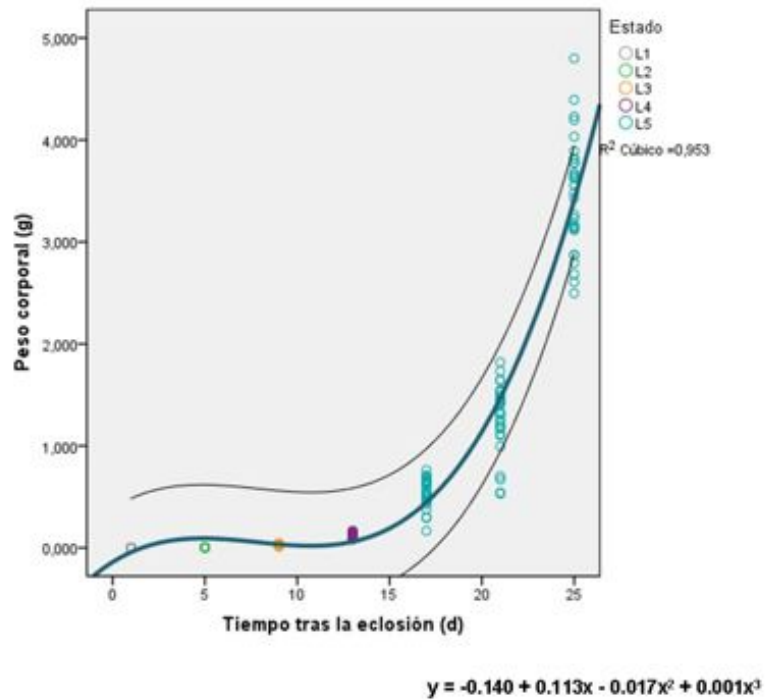


Figura 6.4. Diagramas de dispersión de puntos y curvas de crecimiento (modelos matemáticos ajustados) calculados en base a la evolución temporal del peso corporal en estados preimaginales de *B. mori* alimentados con hoja de morera (a) o dieta artificial (b) hasta el final de la quinta fase larvaria.

8. BIBLIOGRAFÍA

- AJISAWA, A. (1998) Dissolution of silk fibroin with calcium chloride/ethanol aqueous solution. *J. Seric. Sci. Jpn.* 67: 91–94.
- ARATAKE, Y., KAYAMURA, T. (1973) *J. Seric. Sci. Jpn.* 42: 331–339.
- AKIEH, M.N., PRICE, W.E., BOBACKA, J., IVASKA, A., RALPH, S.F. (2009) Ion exchange behaviour and charge compensation mechanism of polypyrrole in electrolytes containing mono-, di- and trivalent metal ions. *Synth. Met.* 159: 2590–2598.
- ALTMAN, G.H., DÍAZ, F., JAKUBA, C., CALABRO, T., HORAN, R.L., CHEN, J., LU, H., RICHMOND, J., KAPLAN, D.L. (2003) Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24: 401-416.
- AOKI, H., TOMITA, N., MORITA, Y., HATTORI, K., HARADA, Y., SONOBE, M. (2003) Culture of chondrocytes in fibroin-hydrogel sponge. *Biomed. Mater. Eng.* 13(4): 309-316.
- APPLEMAN, J.R., BEARD, W.A., DELCAMP, T.J., PRENDERGAST, N.J., FREISHEIM, J.H., BLAKLEY, R.L. (1990) Unusual transient- and steady-state kinetic behavior is predicted by the kinetic scheme operational for recombinant human dihydrofolate reductase. *J. Biol. Chem.* 265: 2740-2748.
- ARAMWIT, P., DAMRONGSAKKUL, S., KANOKPANONT, S., SRICHANA, T. (2010) Properties and antityrosinase activity of sericin from various extraction methods. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 55(2): 91-8.
- ARAMWIT, P., SANGCAKUL, A. (2007) The Effects of Sericin Cream on Wound Healing in Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(10): 2473-2477.
- AYUTSEDE, J., GANDHI, M., SUKIGARA, S., MICKLUS, M., CHEN, H.E., KO, F.E. (2005) Regeneration of *Bombyx mori* silk by electrospinning. Part 3: characterization of electrospun nonwoven mat. *Polymer* 46:1625–1634.
- AZNAR-CERVANTES, S., ROCA, M.I., MARTINEZ, J.G., MESEGUER-OLMO, L., CENIS J.L., MORALEDA J.M., OTERO T.F. (2012) Fabrication of conductive electrospun silk fibroin scaffolds by coating with polypyrrole for biomedical applications. *Bioelectrochemistry* 85: 36-43.

- BAEK, H.S., PARK, Y.H., KI, C.S., PARK, J.C., RAHD, D.K. (2008) Enhanced chondrogenic responses of articular chondrocytes onto porous silk fibroin scaffolds treated with microwave-induced argon plasma. *Surf. Coat. Technol.* 202: 5794–5797.
- BLAKLEY, R. L. (1969) The biochemistry of folic acid and related pteridines. Wiley, New York.
- BONDAR, B., FUCHS, S., MOTTA, A., MIGLIARESI, C., KIRKPATRICK, C.J. (2008) Functionality of endothelial cells on silk fibroin nets: comparative study of micro- and nanometric fibre size. *Biomaterials* 29: 561-572.
- BRAY, L. J., GEORGE, K. A, AINSCOUGH, S.L., HUTMACHER, D.W., CHIRILA, T. V., HARKIN, D.G. (2011) Human corneal epithelial equivalents constructed on *Bombyx mori* silk fibroin membranes. *Biomaterials* 32(22): 5086-91.
- BRAY, L.J., GEORGE, K.A., HUTMACHER, D.W., CHIRILA, T.V., HARKIN, D.G. (2012) A dual-layer silk fibroin scaffold for reconstructing the human corneal limbus. *Biomaterials* 33(13): 3529-3538.
- CAO, C., WU, X., ZHAO, N., YAO, H., LU, X., TAN, Y. (2006) Development of a rapid and efficient BmNPV baculovirus expression system for application in mulberry silkworm, *Bombyx mori*. *Curr. Sci.* 91: 1692–1697.
- CAO, H., CHEN, X., HUANG, L., SHAO, Z. (2009) Electrospinning of reconstituted silk fiber from aqueous silk fibroin solution. *Mater. Sci. Eng. C* 7:2270-2274.
- CAPELLOZZA, L., CAPELLOZZA, S., SAVIANE, A., SBRENNNA, G. (2005) Artificial diet rearing system for the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae): effect of vitamin C deprivation on larval growth and cocoon production. *Appl. Entomol. Zool.* 40: 405-412.
- CHEEMA, S.K., GOBIN, A.S., RHEA, R., LOPEZ-BERESTEIN, G., NEWMAN, R.A., MATHUR, A.B. (2007) Silk fibroin mediated delivery of liposomal emodin to breast cancer cells. *Int. J. Pharm.* 341(1-2): 221-9.

- CHEN, C. CHUANBAO, C., XILAN, M., YIN, T., HESUN, Z. (2006) Preparation of non-woven mats from all-aqueous silk fibroin solution with electrospinning method. *Polymer* 47: 6322-6327.
- CHEN, M., SHAO, Z., CHEN, X. (2011) Paclitaxel-loaded silk fibroin nanospheres. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 100A: 203-210.
- CHEW, S.Y., WEN, Y., DZENIS, Y., LEONG, K.W. (2006) The role of electrospinning in the emerging field of nanomedicine. *Curr. Pharm. Des.* 12(36): 4751-4770.
- CHLAPANIDAS, T. (2010) Cartilage tissue engineering: intraarticular adipose stromal cells promote chondrocyte attachment on silk fibroin scaffold. *Knee ThE.* 7(1): 3-7.
- CHOI, J.S., LEONG, K.W., YOO, H.S. (2008) In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). *Biomaterials* 29(5): 587-96.
- CHONG, E.J., PHAN, T.T., LIM, I.J., ZHANG, Y.Z., BAY, B.H., RAMAKRISHNA, S. LIM, C.T. (2007) Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta. biomater.* 3(3): 321-30.
- CHRONAKIS, I.S., GRAPENSON, S., JAKOB, A. (2006) Conductive polypyrrole nanofibers via electrospinning: electrical and morphological properties. *Polymer* 47: 1597-1603.
- CICCARONE, V.C., POLAYES, D., LUCKOW, V.A. (1997) Generation of recombinant baculovirus DNA in *E.coli* using baculovirus shuttle vector. (ed. Reischt, U). Humana Press, Totowa, NJ, Vol 13.
- COLLAZOS-CASTRO, J.E., POLO, J.L., HERNANDEZ-LABRADO, G.R., PADIAL-CANETE, V., GARCIA-RAMA, C. (2010) Bioelectrochemical control of neural cell development on conducting polymers. *Biomaterials* 31: 9244-9255.
- CORNISH-BOWDEN, A. (1979) Fundamentals of Enzyme Kinetics. Butterworth and Co. London, pp. 34-37.

- COULON, M., MOUNIER, N., COUBLE, P., PRUDHOMME, J.C. (1993) Cytoplasmic actin A3-gene promoter injected as supercoiled plasmid is transiently active in *Bombyx mori* embryonic vitellophages. *Roux Arch. Dev. Biol.* 202:123-127.
- DENIZOT, F., LANG, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89 (2): 271-277.
- DE FEDERICO, J. (1940) El Gusano de Seda y su Industria (Producción sencilla y lucrativa de la seda). Ediciones Ibéricas. Colección Pequeña Enciclopedia Practica nº59. Madrid.
- ELICES, M., PÉREZ-RIGUEIRO, J., PLAZA, G., GUINEA, G. (2011) Usos médicos de la seda. *Investigación y ciencia* 419: 28-35.
- FANG, X., RENEKER, D.H. (1997) DNA fibers by electrospinning. *J. Macromol. Sci. Phys.* B36: 169-173.
- FERNÁNDEZ DÍAZ, C. I., TRICIO, A.E. (1993) Gusanos de seda: Biología y manejo. Editorial Universitaria, Univ. Nacional de Misiones. Argentina.
- FINI, M., MOTTA, A., TORRICELLI, P., GIAVARESI, G., NICOLI, N., TSCHON, M. (2005) The healing of confined critical size cancellous defects in the presence of silk fibroin hydrogel. *Biomaterials* 26(17): 3527-3536.
- FONG, H., RENEKER, D.H. (2001) Electrospinning and formation of nanofibers, in: D.R. Salem (Ed.). *Structure Formation in Polymeric Fibers*, Hanser, Munich. pp. 225-246.
- FORMHALS A. US patent 1.975.504, 1934.
- FRASER, M., CISZCZON, T., ELICH, T., BAUSER, C. (1996) Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. *Insect. Mol. Biol.* 5: 141- 151.
- GAGE, L.P. (1974) The *Bombyx mori* genome: analysis by DNA reassociation kinetics. *Chromosoma* 45(1):27-42.

- GANDHI, M., YANG, H., SHOR, L., KO, F. (2009) Post-spinning modification of electrospun nanofiber nanocomposite from *Bombyx mori* silk and carbon nanotubes. *Polymer* 50: 1918–1924.
- GARCÍA-ORMAECHEA QUERO, C. (2003) La Ruta de la Seda. Conferencia. Universidad Complutense de Madrid.
- GAVIRIA, D., AGUILAR, F., RAMÍREZ, L., ALEGRÍA, A. (2006) Molecular characterization of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) strains by AFLP. *Rev. Colomb. Entomol.* 32 (2): 221-226.
- GENTILOMI, G., LELLI, R., D'ANGELO, M., LANGELLA, V., MONACO, F., PORTANTI, O. (2006) Expression of bioactive recombinant bovine interferon-gamma using baculovirus. *New Microbiol.* 29: 19–24.
- GIL, E.S., MANDAL, B.B., PARK, S.H., MARCHANT, J.K., OMENETTO, F.G., KAPLAN, D.L. (2010a) Helicoidal multi-lamellar features of RGD-functionalized silk biomaterials for corneal tissue engineering. *Biomaterials* 31(34): 8953-8963.
- GIL, E.S.; PARK, S.H., MARCHANT, J.; OMENETTO, F.; KAPLAN, D.L. (2010b) Response of human corneal fibroblasts on silk surface patterns. *Macromol. Biosci.* 10(6): 664-673.
- GONZÁLEZ, F. (2001) El Gusano de Seda y la Morera. Quinta edición. Imprenta Regional. Murcia
- GONZÁLEZ, F. (2001) La Estación Sericícola de Murcia (1892-1976). Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Murcia.
- GUPTA, V., ASEH, A., RÍOS, C.N., AGGARWAL, B.B., Y MATHUR, A.B. (2009) Fabrication and characterization of silk fibroin-derived curcumin nanoparticles for cancer therapy. *Int. J. Nanomedicine* 4: 115-22.
- HARDY, J.G, SCHEIBEL, T.R. (2010) Composite materials based on silk proteins. *Prog. Polym. Sci.* 35: 1093-1115.

- HIGASHIHASHI, N., ARAI, Y., ENJO, T., HORIUCHI, T., SAEKI, Y., SAKANO, K., SATO, Y., TAKEDA, K., TAKASHINA, S., TAKAHASHI, T. (1991) High-level expression and characterization of hepatitis B virus surface antigen in silkworm using a baculovirus vector. *J. Virol. Methods* 35: 159-167.
- HINO, R., TOMITA, M., YOSHIZATO, K. (2006) The generation of germline transgenic silkworms for the production of biologically active recombinant fusion proteins of fibroin and human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* 27: 5715-5724.
- HINO, T. (2003) Change in secondary structure of silk fibroin during preparation of its microspheres by spray-drying and exposure to humid atmosphere. *J. Colloid Interface Sci.* 266(1): 68-73
- HIRAYAMA, C., ONO, H., TAMURA, Y., NAKAMURA, M. (2006) C-prolinylquercetins from the yellow cocoon shell of the silkworm, *Bombyx mori*. *Phytochemistry* 67: 579-583.
- HIRAYAMA, C., ONO, H., TAMURA, Y., KONNO, K. (2007) Regioselective formation of quercetin 5-O-glucoside from orally administered quercetin in the silkworm, *Bombyx mori*. *Phytochemistry* 69: 1141-1149.
- HO, W.K.K., MENG, Z.Q., LIN, H.R., POON, C.T., LEUNG, Y.K., YAN, K.T., DIAS, N., CHE, A.P., LIU, J., ZHENG, W.M., SUN, Y., WONG, A.O. (1998) Expression of grass carp growth hormone by baculovirus in silkworm larvae. *Biochim. Biophys. Acta* 1381: 331-339.
- HOFMANN, S., FOO, C.T.W.P., ROSSETTI, F., TEXTOR, M., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., KAPLAN, D.L., MERKLE, H.P., MEINEL, L. (2006) Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery. *J. Contr. Release* 111(1-2): 219-27.
- HOFMANN, S., HAGENMÜLLER, H., KOCH, A.M., MÜLLER, R., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., KAPLAN, DAVID D.L., MERKLE, H.P., MEINEL, L. (2007) Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials* 28(6): 1152-62.
- HOHMAN, M.M, SHIN, M., RUTLEDGE, G., BRENNER, M.P. (2001) Electrospinning and electrically forced jets I. Stability theory. *Phys. Fluids* 13: 2201-2220.

- HUANG, Z.M., ZHANG, Y.Z., KOTAKI, M., RAMAKRISHNA, S. (2003) A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* 63: 2223–2253.
- HUI, C., SUZUKI, Y. (1995) *Molecular Model Systems in the Lepidoptera* (eds Goldsmith, M. R. and Wilkins, A. S.). Cambridge University Press.
- IIZUKA, M., OGAWA, S., TAKEUCHI, A., NAKAKITA, S., KUBO, Y., MIYAWAKI, Y., HIRABAYASHI, J., TOMITA, M. (2009) Production of a recombinant mouse monoclonal antibody in transgenic silkworm cocoons. *FEBS J.* 276(20):5806–20.
- IMSOMBUT, T., SRISUWAN, Y., SRIHANAM, P., Y BAIMARK, Y. (2010) Genipin-cross-linked silk fibroin microspheres prepared by the simple water-in-oil emulsion solvent diffusion method. *Powder Technol.* 203(3): 603–608.
- JEEFREY, L.C., CHARLES, S.C. (1996) Protein engineering. Chapter 7. Insect cell expression technology. Wiley, New York, pp. 183–218.
- JEONG, L., LEE, K.Y., LIU, J.W., PARK W.H. (2006) Time-resolved structural investigation of regenerated silk fibroin nanofibers treated with solvent vapor. *Int. J. Biol. Macromol.* 38: 140–144.
- JEONG, L., LEE, K.Y., PARK, W.H. (2007) Effect of solvent on the characteristics of electrospun regenerated silk fibroin nanofibers. *Key Eng. Mater.* 342–343: 813–816.
- JI, K.M., ZHAN, Z.K., CHEN, J.J., LIU, Z.G. (2008) Anaphylactic shock caused by silkworm pupa consumption in China. *Allergy* 63:1405–1410.
- JIANG, X., ZHAO, J., WANG, S., SUN, X., ZHANG, X., CHEN, J., KAPLAN, D.L., ZHANG, Z. (2009) Mandibular repair in rats with premineralized silk scaffolds and BMP-2-modified bMSCs. *Biomaterials*, 30(27): 4522–32.
- JIN, H.J., CHEN, J., KARAGEORGIU, V., ALTMAN, G.H., KAPLAN, D.L. (2004) Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats. *Biomaterials* 25: 1039–1047.

- JIN, H.J., FRIDRIKH, S.V., RUTLEDGE, G.C., KAPLAN, D.L. (2002) Electrospinning *Bombyx mori* silk with poly(ethyleneoxide). *Biomacromolecules* 3(6): 1233-9.
- KAEWKORN, W., LIMPEANCHOB, N., TIYABOONCHAI, W., PONGCHAROEN, S. (2012) Effects of silk sericin on the proliferation and apoptosis of colon cancer cells. *Biol. Res.* 1:45-50.
- KALBERMATTEN, D.F., KINGHAM, P.J., MAHAY, D., MANTOVANI, C., PETTERSSON, J., RAFFOUL, W., BALCIN, H., PIERER, G., TERENCEHI, G. (2008) Fibrin matrix for suspension of regenerative cells in an artificial nerve conduit. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 61(6): 669-75.
- KANG, M., JIN, H.J. (2007) Electrically conducting electrospun silk membranes fabricated by adsorption of carbon nanotubes. *Colloid. Polym. Sci.* 285: 1163-1167.
- KANG, M., JUNG, S., KIM, H.S., YOUK, J.H., JIN, H.J. (2007) Silver nanoparticles incorporated in electrospun silk fibers. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 3888-3891.
- KARAGEORGIU, V., MEINEL, L., HOFMANN, S., MALHOTRA, A., VOLLOCH, V., KAPLAN, D. (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.
- KARAGEORGIU, V., TOMKINS, M., FAJARDO, R., MEINEL, L., KAPLAN, D. (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.
- KATO, N., SATO, S., YAMANAKA, A., YAMADA, H., FUWA, N., NOMURA, M. (1998) Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Bioscience* 1(62): 145-147
- KIM, D., KIM, Y., PARK, M., SUH, J., LEE, D., LEE, S., CHUN, B., JUN, Y., JEONG, B., RYU, K. (2002) Effects of the Nuegra from male silkworm extract on enhancement of masculine function and activation of overall physical function. *Int. J. Indust. Entomol.* 5(1): 109-122.

- KIM, E.D., KIM, E., LEE, J.H, HYUN, C.K. (2011) Gly-Ala-Gly-Val-Gly-Tyr, a novel synthetic peptide, improves glucose transport and exerts beneficial lipid metabolic effects in 3T3-L1 adipocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 650(1): 479-485.
- KIM, H.J., KIM, U.J., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., MIN, B.H., KAPLAN, D.L. (2005) Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. *Biomaterials* 26(21): 4442-52.
- KIM J., KIM, C.H., PARK, C.H., SEO, J.N., KWEON, H., KANG, S.W., LEE K.G. (2010) Comparison of methods for the repair of acute tympanic membrane perforations: Silk patch vs. paper patch. *Wound Repair Regen.* 18: 132-138.
- KIM, K., JEONG, L., PARK, H., SHIN, S., PARK, W., LEE, S., KIM, T., PARK, Y., SEOL, Y., LEE, Y., KU, Y., RHIU, I., HAN, S. CHUN, C. (2005) Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. *J. Biotechnol.* 120(3): 327-39.
- KIM, K.Y., KANG, P.D., LEE, K.G., OH, H.K., KIM, M.J., KIM, K.H., PARK, S.W., LEE, S.J., JIN, B.R., KIM, I. (2010) Microsatellite analysis of the silkworm strains (*Bombyx mori*): high variability and potential markers for strain identification. *Genes Genomics* 32. 532-543.
- KIM, S.H., NAM, Y.S., LEE, T.S., PARK, W.H. (2003) Silk fibroin nanofiber. Electrospinning, properties, and structure. *Polym. J.* 35: 185-190.
- KIM, U.J., PARK, J., LI, C., JIN, H.J., VALLUZZI, R., KAPLAN, D.L. (2004) Structure and Properties of Silk Hydrogels. *Biomacromolecules* 5: 786-792.
- KIMURA, T., YAMADA, H., TSUBOUCHI, K., DOI, K. (2007) Accelerating Effects of Silk Fibroin on Wound Healing in Hairless Descendants of Mexican Hairless Dogs. *J. Appl. Sci. Res.* 3(11): 1306-1314.
- KOH, H.S., YONG, T., CHAN, C.K., RAMAKRISHNA, S. (2008) Enhancement of neurite outgrowth using nano-structured scaffolds coupled with laminin. *Biomaterials* 29(26): 3574-82.

- KUNDU, J., CHUNG, Y.I., KIM, Y.H., TAE, G., KUNDU, S.C. (2010) Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release. *Int. J. Pharm.* 388 (1-2): 242-50.
- KUNDU, S., DASH, B., DASH, R., KAPLAN, D.L. (2008) Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications. *Prog. Polym. Sci.* 33 (10): 998-1012.
- KWON, M., KIM, D., LEE, J., PARK, S., CHOO, Y., HAN, Y., KIM, J., HWANG, K., KO, K. (2012) Isolation and analysis of natural compounds from silkworm pupae and effect of its extracts on alcohol detoxification. *Entomol. Res.* 42: 55-62.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LAWRENCE, B.D., MARCHANT, J.K., PINDRUS, M.A, OMENETTO, F.G., KAPLAN, D.L. (2009) Silk film biomaterials for cornea tissue engineering. *Biomaterials* 30(7): 1299-308.
- LEE, J.S., CHOI, K.H., DO, H., GHIM, S., KIM, S., CHUN, D.H., KIM, H.Y., LYOO W.S. (2004) Role of molecular weight of atactic poly(vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning. *J. Appl. Polym. Sci.* 93: 1638-1646.
- LEE, J.Y., BASHUR, C.A., GOLDSTEIN, A.S., SCHMIDT, C.E. (2009) Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials* 30: 4325-4335.
- LEVIN, B., RAJKHOWA, R., REDMOND, S.L., ATLAS, M.D. (2009) Grafts in myringoplasty: utilizing a silk fibroin scaffold as a novel device. *Expert Rev. Med. Devices* 6(6): 653-64.
- LEVIN, B., REDMOND, S.L., RAJKHOWA, R., EIKELBOOM, R.H., ATLAS, M.D., MARANO, R.J. (2012) Utilising silk fibroin membranes as scaffolds for the growth of tympanic membrane keratinocytes, and application to myringoplasty surgery. *J. Laryngol. Otol.* 15: 1-8.

- LEWIS, W.S., CODY, V., GALITSKY, N., LUFT, J.R., PANGBORN, W., CHUNDURU, S.K. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 5057–5064.
- LI, C., VEPARI C., JIN H.J., KIM H.J., KAPLAN D.L. (2006) Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27: 3115–3124.
- LIANG, D., HSIAO, B., CHU, B. (2007) Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59(14): 1392-412.
- LIAO, S., LI, B., ZUWEI, M., WEI, H., CHAN, C., RAMAKRISHNA, S. (2006) Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. *Biomed. Mater.* 1: 45-53.
- LIM, S., MAO, H. (2009) Electrospun scaffolds for stem cell engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61(12): 1084-96.
- LOCKSHIN, A., MORAN, R.G., DANENBERG, P.V. (1979) Thymidylate synthetase purified to homogeneity from human leukemic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(2): 750–754.
- LOVETT, M., CANNIZZARO, C., DAHERON, L., MESSMER, B., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., KAPLAN, D.L. (2007) Silk fibroin microtubes for blood vessel engineering. *Biomaterials* 28(35): 5271-9.
- LU, Q., HU, K., FENG, Q., CUI, F. (2009) Growth of fibroblast and vascular smooth muscle cells in fibroin/collagen scaffold. *Mater. Sci. Eng. C* 29(7): 2239-2245.
- LUCKOW, V.A., LEE, C.S., BARRY, G.F., OLINS, P.O. (1993) Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 67: 4566-4579.
- MA, Z., HE, W., YONG, T., RAMAKRISHNA, S. (2005) Grafting of gelatin on electrospun poly(caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation. *Tissue Eng.* 11: 1149-1158.

- MADDEN, P.W., LAI, J., GEORGE, K.A., GIOVENCO, T., HARKIN, D.G., CHIRILA, T.V. (2011) Human corneal endothelial cell growth on a silk fibroin membrane. *Biomaterials* 32(17): 4076-4084.
- MAEDA, S. (1989) Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Annu. Rev. Entomol.* 34: 351-371.
- MAEDA, S., KAWAI, T., OBINATA, M., FUJIWARA, H., HORIUCHI, T., SAEKI, Y., SATO, Y., FURUSAWA, M. (1985) Production of human alfa-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* 315: 592-594.
- MAHEDNRAN, B., GHOSH, S.K., KUNDU, S.C. (2006) Molecular phylogeny of silk producing insects based on internal transcribed spacer DNA1. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39(5):522-529.
- MARQUARDT, D.W. (1963) An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math* 11:431-441.
- MARSH, R.E., COREY, R.B., PAULING, L. (1955) An investigation of the structure of silk fibroin. *Biochem. Biophys. Acta* 16(1):1-34.
- MARTINEZ-MORA, C., MROWIEC, A., GARCÍA-VIZCAÍNO, E.M., ALCARAZ, A., CENIS, J.L., NICOLÁS, F.J. (2012) Fibroin and sericin from *Bombyx mori* silk stimulate cell migration through upregulation and phosphorylation of c-Jun. *PLoS One* 7(7): e42271.
- MATHUR, A.B., GUPTA, V. (2010) Silk fibroin-derived nanoparticles for biomedical applications. *Nanomedicine* 5(5): 807-820.
- MEGEED, Z., HAIDER, M., LI, D., O'MALLEY JR., B.W., CAPPELLO, J., GHANDEHARI, H. (2004) In vitro and in vivo evaluation of recombinant silk-elastinlike hydrogels for cancer gene therapy. *J. Contr. Rel.* 94: 433-445.
- MEGELSKI, S., STEPHENS J.S., RABOLT, J.F., BRUCE, C.D. (2002) Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers, *Macromolecules* 35: 8456-8466.

- MEINEL, A.J., KUBOW, K.E., KLOTZSCH, E., GARCIA-FUENTES, M., SMITH, M.L., VOGEL, V., MERKLE, H.P., MEINEL, L. (2009) Optimization strategies for electrospun silk fibroin tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 30: 3058-3067.
- MEINEL, L., FAJARDO, R., HOFMANN, S., LANGER, R., CHEN, J., SNYDER, B., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., KAPLAN, D.L. (2005) Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone* 37(5): 688-98.
- MEINEL, L., HOFMANN, S., KARAGEORGIU, V., KIRKER-HEAD, C., McCOOL, J., GRONOWICZ, G., ZICHNER, L., LANGER, R., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., KAPLAN, D.L. (2005) The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials* 26(2): 147-55.
- MEINEL, L., HOFMANN, S., KARAGEORGIU, V., ZICHNER, L., LANGER, R., KAPLAN, D.L., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. (2004a) Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds. *Biotechnol. Bioeng.* 88(3): 379-91.
- MEINEL, L., KARAGEORGIU, V., HOFMANN, S., FAJARDO, R., SNYDER, B., LI, C., ZICHNER, L., LANGER, R., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., KAPLAN, D.L. (2004b) Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 71(1): 25-34.
- MIN, B.M., LEE, G., KIM, S.H., NAM, Y.S., LEE, T.S., PARK, W.H. (2004) Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 25: 1289–1297.
- MIN, M., JEONG, L., LEE, K.Y., PARK, W.H. (2006) Regenerated silk fibroin nanofibers: water vapor-induced structural changes and their effects on the behavior of normal human cells. *Macromol. Biosci.* 6: 285–292.
- MINOURA, N., AIBA, S., HIGUCHI, M., GOTOH, Y., TSUKADA, M., IMAI, Y. (1995) Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208(2): 511-516.

- MIYAJIMA, A., SCHREURS, J., OTSUA, K., KONDOB, A., ARALA, K., MAEDAB, S. (1987) Use of the silkworm, *Bombyx mori*, and an insect baculovirus vector for high-level expression and secretion of biologically active mouse interleukin-3. *Gene* 58: 273-281
- MORIKAWA, M., KIMURA, T., MURAKAMI, M., KATAYAMA, K., TERADA, S., YAMAGUCHI, A. (2009) Rat islet culture in serum-free medium containing silk protein sericin. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 16:223-228
- MOSSMAN, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
- MOTTA, A., MIGLIARESI, C., FACCIONI, F., TORRICELLI, P., FINI, M., GIARDINO, R. (2004) Fibroin hydrogels for biomedical applications: preparation, characterization and in vitro cell culture studies. *J. Biomater Sci. Polym. Ed.* 15(7): 851-864.
- MUNETTA, Y., ZHAO, H.K., INUMARU, S., MORI, Y. (2003) Large-scale production of porcine mature interleukin-18 (IL-18) in silkworms using a hybrid baculovirus expression system. *J. Vet. Med. Sci.* 65:219-223.
- MUNETTA, Y., NAGAYA, H., MINAGAWA, Y., ENAMOTO, C., MATSUMOTO, S., MORI, Y. (2004) Expression and one-step purification of bovine Interleukin-21 (IL-21) in silkworms using a hybrid baculovirus expression system. *Biotechnol. Lett.* 26(18): 1453-1458.
- MURAKAMI, A., IMAI, H.T. (1974) Cytological evidence for holocentric chromosomes of the silkworms, *Bombyx mori* and *B. mandarina*, (Bombycidae, Lepidoptera). *Chromosoma* 47(2):167-178.
- MURPHY, A.R., KAPLAN, D.L. (2009) Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. *J. Mater. Chem.* 19(36): 6443-6450.
- NA, Z., HUIPENG, Y., LIPAN, L., CUIPING, C., UMASHANKAR, M. L., XINGMENG, L., XIAOFENG, W., BING, W., WEIZHENG, C., CENIS, J.L. (2008) Efficient production of canine interferon-alpha in silkworm *Bombyx mori* by use of a

- BmNPV/Bac-to-Bac expression system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78(2):221–226.
- NAGAI, N., MURAO, T., ITO, Y., OKAMOTO, N., SASAKI, M. (2009) Enhancing effects of sericin on corneal wound healing in rat debrided corneal epithelium. *Biol. Pharm. Bull.* 32(5): 933-6.
- NAGARAJU, J., KANDA, T., YUKUHIRO, K., CHAVANCY, G., TAMURA, T., COUBLE, P. (1996) Attempt at transgenesis of the silkworm (*Bombyx mori* L.) by egg-injection of foreign DNA. *Appl. Entomol. Zool.* 31: 587–596.
- NAGARAJU, J., KLEMINKOB, V., COUBLE, P. (1999) Encyclopedia of Genetics (ed. Reeve, E. C. R.). Fitzcoy Dearbon Publishers, London.
- NAGARAJU, J. (2000) Recent advances in molecular genetics of the silk moth *Bombyx mori*. *Curr. Sci.* 78(2): 151-161.
- NAGAYA, H., KANAYA, T., KAKI, H., TOBITA, Y., TAKAHASHI, M., TAKAHASHI, H., YOKOMIZO, Y., INUMARU, S. (2004a) Establishment of a large-scale purification procedure for purified recombinant bovine Interferon-t produced by a silkworm-baculovirus gene expression system. *J. Vet. Med. Sci.* 66(11): 1395-1401.
- NAGAYA, H., MUNETA, Y., ENOMOTO, C., MATSUMOTO, S., YOKOMIZO, Y., MORI, Y. (2004b) Method for purifying porcine mature interleukin-18 from silkworm haemolymph. *Biotechnol. Lett.* 26:869-873
- NAIR, L.S., BHATTACHARYYA, S, LAURENCIN, C.T. (2004) Development of novel tissue engineering scaffolds via electrospinning. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 4: 659–668.
- NISBET, D.R., FORSYTHE, J.S., SHEN, W., FINKELSTEIN, D.I., HORNE, M.K. (2009) A review of the cellular response on electrospun nanofibers for tissue engineering. *J. Biomat. App.* 24: 7-29.
- NUMATA, K., KAPLAN, D.L. (2010) Silk-based delivery systems of bioactive molecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (15): 1497–1508.

- OHGO, K., ZHAO, C., KOBAYASHI, M., ASAKURA, T. (2003) Preparation of non-woven nanofibers of *Bombyx mori* silk, *Samia Cynthia ricini* silk and recombinant hybrid silk with electrospinning method. *Polymer* 44: 841–846.
- OKANO, F., SATOH, M., IDO, T., OKAMOTO, N., YAMADA, K. (2000) Production of canine IFN-gamma in silkworm by recombinant baculovirus and characterization of the product. *J. Interferon Cytokine Res.* 20: 1015–1022.
- OHNISHI, K., MURAKAMI, M., MORIKAWA, M., YAMAGUCHI, A. (2012) Effect of the silk protein sericin on cryopreserved rat islets. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* 19(4):354-360.
- OTERO, T.F. (2009) Soft, wet, and reactive polymers. Sensing artificial muscles and conformational energy. *J. Mater. Chem.* 19: 681–689.
- OTERO, T.F., ABADIAS, R. (2007) Poly(3-methylthiophene) oxidation under chemical control. Rate coefficients change with prepolarization potentials of reduction. *J. Electroanal. Chem.* 610: 96-101.
- OTERO, T.F., ARIZA, M.J. (2003) Revisiting the electrochemical and polymeric behavior of a polypyrrole free-standing electrode in aqueous solution, *J. Phys. Chem. B* 107: 13954–13961.
- OTERO, T.F., DE OTAZO, J.M.G. (2009) Polypyrrole oxidation: kinetic coefficients, activation energy and conformational energy. *Synth. Met.* 159: 681–688.
- OTERO, T.F., SANTOS, F. (2008) Polythiophene oxidation: rate coefficients, activation energy and conformational energies. *Electrochem. Acta.* 53: 3166–3174.
- OGAWA, A., TERADA, S., KANAYAMA, T., MIKI, M., MORIKAWA, M., KIMURA, T. (2004) Improvement of islet culture with sericin. *J. Biosci. Bioeng.* 98(3): 217-219.
- OGAWA, S., TOMITA, M., SHIMIZU, K., YOSHIZATO, K. (2007) Generation of transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon: Production of recombinant human serum albumin. *J. Biotechnol.* 128: 531–544.

- PADAMWAR, M., PAWAR, A. (2004) Silk sericin and its applications: A review. *J. Sci. Ind. Res.* 63: 323-329.
- PANILAITIS, B., ALTMAN, G.H., CHEN, J., JIN, H.J., KARAGEORGIU, V., KAPLAN, D.L. (2003) Macrophage responses to silk. *Biomaterials* 24(18): 3079-3085.
- PARK, W.H., JEONG, L., YOO, D.I., HUDSON, S.D. (2004) Biomimetic nanofibrous scaffolds: preparation and characterization of chitin/silk fibroin blend nanofibers. *Polymer* 45: 7151-7157.
- PARK, J. H., NAM, Y., PARK, S.Y., KIM, J.K., CHOE, N.H., LEE, J.Y., OH, Y.S., SUH, J.G. (2011) Silk Fibroin Has a Protective Effect against High Glucose Induced Apoptosis in HIT-T15 Cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 25(4): 238-243.
- PRENDERGAST, N.J., DELCAMP, T.J., SMITH, P.L., FREISHEIM, J.H. (1988) Expression and site-directed mutagenesis of human dihydrofolate reductase. *Biochemistry* 27: 3664-3671.
- PROMMUAK, A. (2008) Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts. *Sep. Purif. Technol.* 62: 445-449.
- RAVICHANDRAN, R., SUNDARRAJAN, S., VENUGOPAL, J.N., MUKHERJEE, S., RAMAKRISHNA, S. (2010) Applications of conducting polymers and their issues in biomedical engineering, *J. R. Soc. Interface* 7: S559-S579.
- REN, X.M., PICKUP, P.G. (1993) Ion transport in polypyrrole and a polypyrrole polyanion composite. *J. Phys. Chem.* 97: 5356-5362.
- RHO, K.S., JEONG, J., LEE, G., SEO, B.M., PARK, Y.J., HONG, S.D., ROH, S., CHO, J.J., PARK, W.H., MIN, B.M. (2006) Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials* 27: 1452-1461.
- RHO, D.H., KANG, S.Y., KIM, J.Y., KWON, Y.B., YOUNG KWEON, H., LEE, K.G. (2006) Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat. *J. Mater. Sci: Mater. Med.* 17(6): 547-52.

- ROCKWOOD, D., RUCSANDA C., YÜCEL, T., WANG, X., LOVETT, M., KAPLAN, D.L. (2011) Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nat. Protoc.* 6: 1612–1631.
- SAKUDOH, T., SEZUTSU, H., NAKASHIMA, T., KOBAYASHI, I., FUJIMOTO, H., UCHINO, K., BANNO, IWANO, H., MAEKAWA, H., TAMURA, T., KATAOKA, H., TSUCHIDA, K. (2007) Carotenoid silk coloration is controlled by a carotenoid-binding protein, a product of the Yellow blood gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(21): 8941–8946.
- SANGSANOH, P., WALEETORNCHEEPSAWAT, S., SUWANTONG, O., WUTTICHAROENMONGKOL, P., WEERANANTANAPAN, O., CHUENJITBUNTAORN, B., CHEEPSUNTHORN, P., PAVASANT, P., SUPAPHOL, P. (2007) In vitro biocompatibility of Schwann cells on surfaces of biocompatible polymeric electrospun fibrous and solution-cast film scaffolds. *Biomacromolecules* 8(5): 1587-94.
- SANTIN, M., MOTTA, A., FREDDI, G., CANNAS, M. (1999) In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *J. Biomed. Mater. Res.* 46: 382–389.
- SCHNEIDER, A., WANG, X.Y., KAPLAN, D.L., GARLICK, J.A., EGLES, C. (2009) Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing. *Acta Biomater.* 5: 2570–2578.
- SCHNELL, J. R., DYSON, H. J., & WRIGHT, P. E. (2004) Structure, dynamics, and catalytic function of dihydrofolate reductase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33: 119–140.
- SHADFORTH, A.M.A., GEORGE, K.A., KWAN, A.S., CHIRILA, T.V., HARKIN, D.G. (2012) The cultivation of human retinal pigment epithelial cells on *Bombyx mori* silk fibroin. *Biomaterials* 33(16): 4110-4117.
- SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O., MANN, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68:850–858.

- SHIMADA, T., KURIMOTO, Y., KOBAYASHI, M. (1995) Phylogenetic Relationship of Silkmoths Inferred from Sequence Data of the Arylphorin Gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* 4: 223–234
- SILL, T.J., VON RECUM H.A. (2008) Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 29: 1989–2006.
- SILVA, S.S., MANIGLIO, D., MOTTA, A., MANO, J.F., REIS, R.L., MIGLIARESI, L. (2008) Genipin- modified silk-fibroin nanometric nets. *Macromol. Biosci.* 8: 766–774.
- SMITH, L., MA, P. (2004) Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. *Colloid. Surface. B.* 39(3): 125-31.
- SMITH, S.L., PATRICK, P., STONE, D., PHILLIPS, A.W., BURCHALL, J.J. (1979) Porcine liver dihydrofolate reductase. Purification, properties, and amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 254: 11475-1 1484.
- SOBAJO, C., BEHZAD, F., YUAN, X.F., BAYAT, A. (2008) Silk: A potential medium for tissue engineering. *Eplasty* 8: e47.
- SOFFER, L., WANG, X., ZHANG, X., KLUGE, J., DORFMANN, L., KAPLAN, D.L., LEISK G. (2008) Silk-Based Electrospun Tubular Scaffolds for Tissue-Engineered Vascular Grafts. *J. Biomat. Sci-Polym. E.* 19: 653-664.
- SOFIA, S., MCCARTHY, M.B., GRONOWICZ, G., KAPLAN D. L. (2001) Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J. Biomed. Mater. Res.* 54:139-148.
- SPRAGUE, K.U. (1975) The *Bombyx mori* silk proteins: characterization of large polypeptides. *Biochemistry* 14:925-931.
- STITZEL, J., LIU, J., LEE, S.J., KOMURA, M., BERRY, J., SOKER, S., LIM, G., DYKE, M.V., CZERW, R., YOO, J.J., ATALAC, A. (2006) Controlled fabrication of a biological vascular substitute. *Biomaterials* 27: 1088-1094.

- STONE, S.R., MORRISON, J.F. (1982) Kinetic mechanism of the reaction catalyzed by dihydrofolate reductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 21(16): 3757-3165.
- SUGIHARA, A., SUGIURA, K., MORITA, H., NINAGAWA, T., TOBE, R., IKEHARA, S. (2000) Promotive effects of a silk film on epidermal recovery from full-thickness skin wounds. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 225: 58-64.
- SUKIGARA, S., GANDHI, M., AYUTSEDE, J., MICKLUS, M., KO, F. (2004) Regeneration of *Bombyx mori* silk by electrospinning. Part 2. Process optimization and empirical modeling using response surface methodology. *Polymer* 45: 3701-3708.
- TAKASU, Y., YAMADA, H., TSUBOUCHI, K. (2002) Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(12): 2715-8.
- TAMURA, Y., NAKAJIMA, K., NAGAYASU, K., TAKABAYASHI, C. (2002) Flavonoid 5-glucosides from the cocoon shell of the silkworm, *Bombyx mori*. *Phytochemistry* 59(3): 275-278.
- TAMURA, T., THIBERT, C., ROYER, C., KANDA, T., ABRAHAM, E., KAMBA, M., KOMOTO, N., THOMAS, J.L., MAUCHAMP, B., CHAVANCY, G., SHIRK, P., FRASER, M., PRUDHOMME, J.C., COUBLE, P. (2000) Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.* 18:81-84.
- TANAKA, Y. (1916) Genetic studies in silkworm. *J. Coll. Assoc. Sapporo.* 7: 129-255.
- TAYLOR, G.I. (1969) Electrically driven jets. *Proc. R. Soc. London* 313A: 453-475.
- TAZIMA, Y. (1964) *The Genetics of the Silkworm*, Logos Press, London and Englewood Cliffs, N.J.
- TERADA, S., SASAKI, M., YANAGIHARA, K., YAMADA, H. (2005) Preparation of silk protein sericin as mitogenic factor for better mammalian cell culture. *J. Biosci. Bioeng.* 100(6): 667-671.

- THOMSON, J.A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S.S., WAKNITZ, M.A., SWIERGIEL, J.J., MARSHALL, V.S., JONES, J.M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 (5391): 1145-1147.
- TOMITA, M., MUNETSUNA, H., SATO, T., ADACHI, T., HINO, R., HAYASHI, M., SHIZIMU, K., NAKAMURA, N., TAMURA, T., YOSHIZATO, K. (2003) Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat. Biotechnol.* 21:52-56.
- TSUBOUCHI, K., NAKAO, H., IGARASHI, Y., TAKASU, Y., YAMADA, H. (2003) *Bombyx mori* fibroin enhanced the proliferation of cultured human skin fibroblasts. *J Insect Biotechnol. Sericol.* 72: 65-69.
- UM, I.C., FANG, D., HSIAO, B.S., OKAMOTO, A., CHU, B. (2004) Electro-spinning and electro-blowing of hyaluronic acid. *Biomacromolecules* 5: 1428-1436.
- VEPARI, C., KAPLAN, D.L. (2007) Silk as a Biomaterial. *Prog. Polym. Sci.* 32(8-9): 991-1007
- VOEGELI, R., MEIER, J., BLUST, R. (1993) Sericin silk protein: unique structure and properties. *Cosmet. Toilet.* 108:101-108.
- WADBUA, P., PROMDONKOY, B., MAENSIRIC, S., SIRI, S. (2010) Different properties of electrospun fibrous scaffolds of separated heavy-chain and light-chain fibroins of *Bombyx mori*. *Int. J. Biol. Macromol.* 46: 493–501.
- WAKO CHEMICALS. (2005) Pure Sericin Technical Brochure. BioScience.
- WANG, H., SHAO, H., HU, X. (2006) Structure of silk fibroin fibers made by an electrospun process from a silk fibroin aqueous solution. *J. Appl. Polym. Sci.* 101: 961– 968.
- WANG, L.X., LI, X.G., YANG, Y.L. (2001) Preparation, properties and applications of polypyrroles. *React. Funct. Polym.* 47: 125–139.
- WANG, M., JIN, H.J., KAPLAN, D.L., RUTLEDGE, G.C. (2004) Mechanical properties of electrospun silk fibers. *Macromolecules* 37:6856-6864.

- WANG, M., YU, J., KAPLAN, D.L., RUTLEDGE, G. (2006) Production of submicron diameter silk fibers under benign processing conditions by two-fluid electrospinning. *Macromolecules* 39: 1102–1107.
- WANG, X., KIM, H.J., XU, P., MATSUMOTO, A., KAPLAN, D.L. (2005) Biomaterial coatings by stepwise deposition of silk fibroin. *Langmuir* 21: 11335-11341.
- WANG, X., YUCEL, T., LU, Q., HU, X., KAPLAN, D.L. (2010) Silk nanospheres and microspheres from silk/pva blend films for drug delivery. *Biomaterials* 31(6): 1025-35.
- WANG, X., ZHANG, X., CASTELLOT, J., HERMAN, I., IAFRATI, M., KAPLAN, D.L. (2008) Controlled release from multilayer silk biomaterial coatings to modulate vascular cell responses. *Biomaterials* 29(7): 894-903.
- WANG, Y.Z., KIM, H.J., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., KAPLAN, D.L. (2006) Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials* 27: 6064–6082.
- WANG, Y., BLASIOLI, D.J., KIM, H.J., KIM, H. S., KAPLAN, D.L. (2006) Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials* 27(25): 4434-42.
- WANG, J., XIA, Q., HE, X., DAI, M., RUAN, J., CHEN, J., YU, G., YUAN, H., HU, Y., LI, R., et al. (2005) SilkDB: a knowledgebase for silkworm biology and genomics. *Nucleic Acids Res.* 33: D399-D402.
- WEI, Z., LIAO, A., ZHANG, H., LIU, J., JIANG, S. (2009) Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of silkworm pupal oil applying the response surface methodology. *Bioresource Technol.* 100: 4214-4219.
- WENK, E., WANDREY, A.J., MERKLE, H.P., MEINEL, L. (2008) Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery. *J. Control. Release* 132(1): 26-34.
- WU, X.F., KAMEI, K., TAKANO, R., HARA, S. (2001) High-level expression of human acidic and basic fibroblast growth factors in the silkworm, *Bombyx mori* L. using recombinant baculovirus. *Protein. Expr. Purif.* 21(1):192–200.

- WU, X.F., CAO, C.P., XU, Y.X., LU, X.M. (2004a) Construction of a host range-expanded hybrid baculovirus of BmNPV and AcNPV, and knockout of cysteinase gene for more efficient expression. *Sci. China C: Life Sci.* 47(5): 406–415.
- WU, X., YIN, Z., CAO, C.P., HUANG, L., LU, X., LIU, J. (2004b) Expression of human VEGF165 in silkworm (*Bombyx mori* L.) by using a recombinant baculovirus and its bioactivity assay. *J. Biotechnol.* 111: 253–261.
- XIA, Y.Y., LU, Y. (2008) Fabrication and properties of conductive conjugated polymers/silk fibroin composite fibers. *Compos. Sci. Technol.* 68: 1471–1479.
- XIE, J., NG, W., LEE, L., WANG, C. (2008) Encapsulation of protein drugs in biodegradable microparticles by co-axial electrospray. *J. Colloid Interf. Sci.* 317(2): 469-76.
- YAMADA, H., NAKAO, H., TAKASU, Y., TSUBOUCHI, K. (2001) Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons. *Mater. Sci. Eng. C* 14: 41-46.
- YAMADA, H. (2004) Identification of fibroin-derived peptides enhancing the proliferation of cultured human skin fibroblasts. *Biomaterials* 25(3): 467-472.
- YAMAO, M., KATAYAMA, N., NAKAZAWA, H., YAMAKAWA, M., HAYASHI, Y., HARA, S., KAMEI, K., MORI, H. (1999) Gene targeting in the silkworm by the use of a baculovirus. *Genes Dev.* 13: 511–516.
- YAN, H., ZHANG, Y., MA, Y., ZHOU, L. (2008) Biosynthesis of insulin-silk fibroin nanoparticles conjugates and in vitro evaluation of a drug delivery system. *J. Nano. Res.* 11(8): 1937-1946.
- YANG, F., MURUGAN, S., WANG, S., RAMAKRISHNA, S. (2005) Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials* 26: 2603-2610.
- YANG, Y., CHEN, X., DING, F., ZHANG, P., LIU, J., GU, X. (2007) Biocompatibility evaluation of silk fibroin with peripheral nerve tissues and cells in vitro. *Biomaterials* 28: 1643–1652.

- YANG, Y., XIA, T., ZHI, W., WEI, L., WENG, J., ZHANG, C., LI, X. (2011) Core-sheath fibers loaded with basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* 32(18): 4243-4254.
- YEO, I.S., OH, J.E., JEONG, L., LEE, T.S., LEE, S.J., PARK, W.H., MIN, B.M. (2008) Collagen-based biomimetic nanofibrous scaffolds: preparation and characterization of collagen/silk fibroin bicomponent nanofibrous structures. *Biomacromolecules* 9: 1106–1116.
- YOUNG, M., HEE, S., KYOUNG, H., SUN, K. (2008) Purification of a dimethyladenosine compound from silkworm pupae as a vasorelaxation substance. *J. Ethnopharmacol.* 117: 115-122.
- YOUNG, E., LEE, H.S, JUNG, H., KIM, J.M., LEE, K.W., JOO, H.S. (2010) Feeding silk protein hydrolysates to C57BL/KsJ-db/db mice improves blood glucose and lipid profiles. *Nutr. Res.* 30(11): 783-790.
- YONGFENG, J., YINGFEI, W., ZHENHONG, Z., YAOZHOU, Z. (2002) Expression of human endostatin in larvae of silkworm (*Bombyx mori*) and in vitro activity assays. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 6(4): 293-299.
- YUCEL, T., CEBE, P., KAPLAN D.L. (2009) Vortex-Induced Injectable Silk Fibroin Hydrogels. *Biophys. J.* 97: 2044–2050.
- YUKUHIRO, K., SEZUTSU, H., MASANOBU, I., SHIMIZU, K., BANNO, Y. (2002) Significant Levels of Sequence Divergence and Gene Rearrangements have Occurred Between the Mitochondrial Genomes of the Wild Mulberry Silkworm, *Bombyx mandarina*, and its Close Relative, the Domesticated Silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Biol. Evol.* 19 (8): 1385-1389.
- ZARKOUB, S., EBY, R.K., RENEKER, D.H., HUDSON, S.D., ERTLEY, D., ADAMS, W.W. (2004) Structure and morphology of electrospun silk nanofibers. *Polymer* 45: 3973–3977.
- ZHANG, F., ZUO, B.Q., BAI, L. (2009) Study on the structure of SF fiber mats electrospun with HFIP and FA and cells behavior. *J. Mater. Sci.* 44: 5682–5687.

- ZHANG, X., BAUGHMAN, C.B., KAPLAN, D.L. (2008) In vitro evaluation of electrospun silk fibroin scaffolds for vascular cell growth. *Biomaterials* 29: 2217-2227.
- ZHANG, X., REAGAN, M.R., KAPLAN, D.L. (2009a) Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 61: 988-1006.
- ZHANG, X., WANG, X., KESHAV, V., WANG, X., JOHANAS, J., LEISK, G., KAPLAN, D.L. (2009b) Dynamic culture conditions to generate silk-based tissue-engineered vascular grafts. *Biomaterials* 30(19): 3213-23.
- ZHANG Y. (2002) Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotechnol. Adv.* 20: 91-100.
- ZHANG, Y., LIM, C., RAMAKRISHNA, S., HUANG, Z. (2005) Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* (10): 933-946.
- ZHANG, Y., MA, Y., XIA, Y., SHEN, W., MAO, J., ZHA, X., SHIRAI, K., KIGUCHI, K. (2006a) Synthesis of Silk Fibroin-Insulin Bioconjugates and Their Characterization and Activities In Vivo. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl Biomater.* 79(2): 275 – 283.
- ZHANG, Y., MA, Y., XIA, Y., SHEN, W., MAO, J., XUE, R. (2006b) Silk sericin-insulin bioconjugates: Synthesis, characterization and biological activity. *J. Control. Release* 115: 307-315.
- ZHANG, Y., SHEN, W., XIANG, R., ZHUGE, L., GAO, W., WANG, W. (2007) Formation of silk fibroin nanoparticles in water-miscible organic solvent and their characterization. *J. Nanopart. Res.* 9: 885-900.
- ZHAO, Y., LI, X., CAO, G., XUE, R., GONG, C. (2009) Expression of hIGF-I in the silk glands of transgenic silkworms and in transformed silkworm cells. *Sci. China C Life Sci.* 52 (12): 1131-1139.
- ZHAO, J., ZHANG, Z., WANG, S., SUN, X., CHEN, J., KAPLAN, D.L., JIANG, X. (2009) Apatite-coated silk fibroin scaffolds to healing mandibular border defects in canines. *Bone* 45(3): 517-27.

- ZHAORIGETU, S., SASAKI, M., WATANABE, H., KATO, N. (2001) Supplemental silk protein, sericin, suppresses colon tumorigenesis in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice by reducing oxidative stress and cell proliferation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 10(65): 2181-2186.
- ZHAORIGETU, S., YANAKA, N., SASAKI, M., WATANABE, H., KATO, N. (2003a) Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 71(1-3): 11-17.
- ZHAORIGETU, S., YANAKA, N., SASAKI, M., WATANABE, H., KATO, N. (2003b) Silk protein, sericin, suppresses DMBA-TPA-induced mouse skin tumorigenesis by reducing oxidative stress, inflammatory responses and endogenous tumor promoter TNF- α . *Oncol. Rep.* 10: 537-543.
- ZHU, J., SHAO, H., HU, X. (2007) Morphology and structure of electrospun mats from regenerated silk fibroin aqueous solutions with adjusting pH. *Int. J. Biol. Macromol.* 41: 469-474

