

Uso de biomateriales a partir de la fibroína de la seda de gusano de seda (*Bombyx mori* L.) Para procesos de medicina regenerativa basada en ingeniería de tejidos

Duverney Gaviria Arias¹; Lyda Cenobia Caballero Mendez²

¹ Facultad de Ciencias de la Salud/Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Libre

² Centro de Biología Molecular y Biotecnología (CENBIOTEP)/Facultad de Ciencias de la Salud/Universidad Tecnológica de Pereira

correo electrónico: duverney.gaviria@gmail.com

Fecha de Recepción: 6/09/2014

Fecha de Solicitud de Correcciones: 10/12/2014

Fecha de Aceptación: 02/05/2015

Resumen

La regeneración de tejidos usando células, andamios y factores de crecimiento apropiados es un enfoque clave en las terapias de regeneración de tejido o de órganos. La fibroína de la seda, ha demostrado que puede ser utilizada eficazmente como un material de andamiaje en estos tratamientos. Las fibras de seda se obtienen de diversas fuentes animales, tales como arañas, gusanos de seda, escorpiones, ácaros y las moscas. La seda extraída a partir de capullos del gusano de seda (*Bombyx mori* L.), se caracteriza por sus excelentes propiedades mecánicas, biocompatibilidad y biodegradabilidad que le permiten ser una fuente adecuada para el desarrollo de dispositivos biomédicos. La combinación única de elasticidad, resistencia y compatibilidad con células de mamíferos hace de la fibroína de la seda un material atractivo para la ingeniería de tejidos. Esta revisión aborda el procesamiento de fibroína de la seda en diferentes formas de biomateriales, sus aplicaciones, ventajas y limitaciones como biomaterial de andamiaje en la ingeniería ósea, vascular, de piel, cartilagos, ligamentos, tendones y de tejidos cardíaco, nervioso, ocular y vesical.

Palabras clave: Biomaterial, Fibroína, Ingeniería de tejidos, Medicina regenerativa

Fibroin from silkworm (*Bombyx mori* L.) as biomaterial used in regenerative medicine process based on tissue engineering

Abstract

Tissue regeneration using cells, scaffolds and appropriate growth factors is a key approach in therapy for tissue or organs regeneration. The fibroin from silk has been shown to be effectively used as a scaffold material in these treatments. Silk fibers are obtained from various animal sources, such as spiders, silkworms, scorpions, mites and flies. The silk extracted from silkworm's (*Bombyx mori* L.) cocoons, is characterized by its excellent mechanical properties, biocompatibility and biodegradability this characteristics makes silk be a suitable source for the development of biomedical devices. The unique combination of elasticity, strength and compatibility with mammalian cells made of silk fibroin attractive for tissue engineering material. This review addresses the processing of silk fibroin in different forms of biomaterials, applications, advantages and limitations as a biomaterial scaffold in tissue engineering for bone, vascular tissues, skin, cartilage, ligaments, tendons, heart tissue, nervous, eye and bladder.

Keywords: Biomaterial, Fibroin, Tissue engineering, Regenerative medicine

Introducción

La baja disponibilidad de donantes y el aumento en la morbilidad debida a los procesos de trasplantes han establecido nuevas demandas en las tecnologías de ingeniería de tejidos (IT) como estrategia de tratamiento en fallos orgánicos (1). El enfoque de IT implica la regeneración del tejido en un soporte adecuado con el objetivo de implantarlo en el sitio objetivo. La regeneración del tejido funcional requiere un adecuado microambiente que imita el sitio original, con el fin de obtener una respuesta celular adecuada (1). Dicho entorno es proporcionado por una matriz 3-D de ingeniería de tejidos o andamio, el cual proporciona las condiciones adecuadas para el crecimiento celular a la vez que orienta la forma del órgano o tejido a reparar (2). Además de la biocompatibilidad, requisito previo esencial para cualquier biomaterial, la capacidad de coincidir con el tiempo de degradación normal del tejido u órgano en el cual este va a ser implantado, es un requisito crítico para un material celular de andamiaje. Tales características mantienen las propiedades mecánicas y la integridad estructural del andamio en todas las etapas de su proceso de regeneración. Además, los productos de degradación del biomaterial se deberían metabolizar de forma segura y ser entonces eliminados del organismo. Materiales como polímeros, metales y cerámicas se utilizan ampliamente como andamios para el crecimiento celular en la ingeniería de tejidos. Se han ensayado polímeros sintéticos y naturales cada uno de los cuales tiene sus propias ventajas y limitaciones, por ejemplo, mientras que los materiales sintéticos permiten un fácil procesamiento y maleabilidad, los polímeros naturales poseen mejor cito y biocompatibilidad (3). No existe un biomaterial universal que cumpla con los requisitos de los andamios para todos los tejidos, es por lo tanto necesaria la obtención de diferentes construcciones con características físicas, propiedades mecánicas y de degradación específicas para los diferentes tejidos. Por tanto, la investigación de un biomaterial universal es una línea de trabajo muy importante en medicina regenerativa. Diferentes tipos de proteínas tales como: colágeno, elastina, péptidos similares a la elastina, la albúmina y la fibrina se utilizan como material de suturas, andamios de tejidos, agentes hemostáticos y de distribución de medicamentos (4). La fibroína del gusano de seda es un biopolímero natural con una larga historia de aplicaciones en el cuerpo humano como suturas. Actualmente las suturas de seda se utilizan en los labios, los ojos, boca y en el tratamiento de heridas de la piel (5). La fibroína de la seda se usa cada vez más en otras áreas de la ciencia biomédica, como resultado de los nuevos conocimientos en la manera en cómo esta puede ser procesada y como propiedades tales como la resistencia mecánica, elasticidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad pueden ser controladas (5). Estas propiedades de la fibroína de la seda son particularmente útiles para la ingeniería de tejidos. Además, estudios recientes evalúan la seda como parte de un dispositivo electrónico flexible para el registro fisiológico y funcional en tiempo real, y el desarrollo de sistemas ópticos que pueden ser usados en el diagnóstico y tratamientos de diferentes patologías (6, 7). La seda posee una excelente transparencia óptica (ca. 95%), una superficie con una notable suavidad y procesamiento en soluciones acuosas, todo lo cual facilita su aplicación como biosensores en óptica y fotónica (6, 8). Los sistemas basados en seda son implantables y tienen la funcionalidad y sensibilidad necesaria para aplicaciones avanzadas (2, 5, 9, 10). Esta revisión se centra en la investigación basada en el uso de la fibroína de la seda en el campo de la regeneración de tejidos y se evalúan sus perspectivas para un mayor desarrollo en las aplicaciones terapéuticas relacionadas.

Seda de gusano de seda. Las proteínas de seda están presentes en las glándulas productoras de seda de artrópodos (gusanos de seda, arañas, escorpiones, ácaros y abejas) y se enrollan en forma de fibras durante su metamorfosis. La fibra de seda del gusano de seda es ampliamente utilizada

en la industria textil desde hace más de 5000 años. A diferencia del gusano de seda, las arañas no pueden ser mantenidas juntas en grandes cantidades dada su naturaleza caníbal (5). Adicionalmente, mientras que un capullo de gusano de seda puede tener entre 800-1500m de seda, la glándula ampollacea de la araña produce 137m y su red solamente contiene 12m (11). Por estas razones la seda del gusano de seda es preferida como biomaterial. Sin embargo, la familia Bombycidae no es la única que la produce, ya que la familia Saturniidae en este mismo orden, también lo hacen. La seda tiene varias ventajas sobre otros biomateriales a base de proteínas, que se derivan de tejidos de origen alogénico o xenogénico, ya que con estos existe el riesgo de infección, adicionalmente el procesamiento de tales materiales es costoso debido a los protocolos necesarios para su aislamiento y purificación. La seda a diferencia de estos materiales es una fibra textil con una producción anual de 1000 toneladas métricas, y la obtención de la fibra de fibroína se realiza rutinariamente ya sea mediante un tratamiento alcalino o enzimático, que deja la fibra libre de sericina la cual es muy inmunogénica. La seda posee gran peso molecular (200-350 kDa o más) con grandes dominios repetitivos hidrófobos modulares interrumpidos por pequeños grupos hidrófilos (12). Los extremos N y C de la fibroína de la seda son altamente conservados (5). La fibroína de la seda de *B. mori* se compone de una cadena pesada (H), una cadena ligera (L) unidas entre sí por un enlace disulfuro (13) y una glicoproteína con un peso molecular de 25 kDa llamada P25, la cual se encuentra unida de manera no covalente a las cadenas L y H (14). La cadena H contiene dominios hidrófobos constituidos por residuos de G-X (X= A, S, T o V) los cuales se repiten y forman hojas β antiparalelas. La cadena L en cambio es de naturaleza hidrófila y relativamente elástica. P25 por su parte desempeña un importante papel al mantener la integridad del complejo (15, 16). En el gusano de seda la fibroína, la sericina y la proteína P25 se ensamblan manteniendo una relación de 6:6:1 (17). Algunos lepidópteros producen seda en la cual no hay cadena ligera ni tampoco P25, en lugar de esta producen un homodimero de cadena pesada con un peso de 330 kDa (18). La seda de la familia Saturniidae exhiben una mayor relación A/G y bloques poli-alanina, que forman hojas β (19). Estas también tienen una mayor proporción de aminoácidos con características base/ácido, polar/no polar, voluminosos/no voluminosos y hidrófilo/hidrófobo (20, 21). Como resultado de estas variaciones, hay diferencias significativas en las propiedades mecánicas, bioactividad y el comportamiento de degradación con relación a la seda de la familia Bombycidae (22). Aparte de la organización en la estructura primaria, secundaria y jerárquica de la fibroína de la seda que determina muchas de sus propiedades como biomaterial, los dominios hidrófobos de las cadenas poliméricas de la seda se ensamblan en forma de nano-cristales (β -hoja). Estos dominios hidrófobos consisten de cadenas laterales polares y voluminosas que forman la parte amorfa de la estructura secundaria (23, 24). La conformación de la cadena en bloques amorfos es una espiral aleatoria es lo que da la elasticidad a la seda (25, 26). Los factores críticos que determinan las propiedades mecánicas de cualquier seda particular son debidos al preciso control de tamaño, el número, la distribución, orientación y disposición espacial de los dominios cristalinos y no cristalinos a escala nanométrica entre los tipos de seda, todas las fibras de seda de gusanos de seda siguen arreglos jerárquicos estructurales semejantes. (5, 27). Los nano-cristales contribuyen a las propiedades mecánicas sobresalientes de la seda, a pesar de los defectos en la microestructura en forma de vacuolas y micro-huecos (23, 28). Aparte de la estructura secundaria, una organización jerárquica supra molecular es también evidente en las fibras de seda (24). Las sedas de araña y gusanos de seda se componen de paquetes de microfilamentos (0.5-2 micras), cada uno de los cuales está hecho de nano-cristales y / o semi dominios cristalinos (29-31).

Características de la fibroína como biomaterial. Las principales ventajas de la seda en comparación con otros biopolímeros naturales

son sus excelentes propiedades mecánicas, buena biocompatibilidad, la posibilidad de realizar su procesamiento en soluciones a base de agua, biodegradabilidad y la presencia de grupos químicos de fácil acceso para llevar a cabo modificaciones funcionales (32). La seda ofrece un equilibrio atractivo en el módulo de Young, resistencia a la rotura, y elongación, que contribuye a su buena tenacidad y ductilidad. Las fibras de seda son más duras que el Kevlar (poliparafenileno tereftalamida) (26, 33). La relación de resistencia a la densidad de la seda es hasta diez veces más alta que la del acero (34). Las fibras de seda de araña, en particular, tienen una alta extensibilidad y exhiben un comportamiento de endurecimiento por deformación marcada (35). Tal comportamiento es similar al presentado por las fibras producidas por el gusano de seda (23, 36). Teniendo en cuenta la buena resistencia y tenacidad de las fibras de seda, no es de extrañar que la seda haya sido explotada para desarrollar andamios para la ingeniería de tejidos. Sin embargo, en el diseño actual de los biomateriales basado en seda, la amplia propiedad mecánica de este material no se aprovecha plenamente. Un implante de biomaterial generalmente falla debido a sus malas propiedades mecánicas, por lo tanto, las variaciones en estas propiedades de diferentes tipos de seda proporcionan una buena elección orientada a ajustar estas al tipo de uso. Es importante señalar que a pesar de las excelentes propiedades mecánicas de las fibras de seda nativas, la mayoría de los materiales de seda desarrollados a partir solución de fibroína de seda son débiles y quebradizos. Por ejemplo, la tracción en seco, la fuerza de la película de seda es de aproximadamente 0,02 GPa y un alargamiento a la rotura es menos del 2% en comparación con fibras nativas que tienen una resistencia a la tracción de cerca de 0,5-0,6 GPa y un alargamiento a la rotura de 10-40% (23, 37). Tal diferencia se puede atribuir a la falta de una adecuada estructura secundaria en los materiales regenerados en comparación a las fibras nativas (38, 39). Los estudios recientes muestran que hay elementos para mejorar significativamente la resistencia de los productos de seda regenerados al nivel de las fibras nativas o incluso a niveles superiores a través de la manipulación de la estructura durante la regeneración (40-42). La fibroína de la seda es soluble en agua cuando se encuentra en su forma de α -hélice o de plegamientos aleatorios. La solubilidad puede mantenerse durante días e incluso semanas dependiendo de la temperatura de almacenamiento, pH y concentración de la solución de seda (43). Por lo tanto, los sistemas basados en seda se pueden preparar usando soluciones acuosas y en condiciones suaves, como temperatura ambiente, pH neutro y sin aplicación de la fuerza de alto cizallamiento. Tales condiciones son favorables para el uso de este material en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos sensibles (44, 45). Las condiciones de procesamiento suaves también son útiles para dispositivos como biosensores fotónicos o electrónicos, que pueden ser incorporados dentro de un sistema basado en seda o recubierto con seda para mejorar la bio-integración *in vivo*. La transición de α -hélice y plegamientos aleatorios hacia hojas- β , que son altamente estables, es necesaria en los productos de seda con el fin de proporcionar una buena resistencia a la disolución, la degradación térmica y enzimática. Esto se puede lograr a través de tratamientos con vapor de agua, estiramiento mecánico y ultrasonido, evitando de esta manera el uso de productos químicos nocivos. Estas ventajas de procesamiento y buena estabilidad estructural en los materiales fabricados de seda son prometedoras con relación a aplicaciones relacionadas con sistemas biológicos (46).

Manipulación de las características estructurales de la fibroína. La estructura de la seda puede ser ajustada adecuadamente durante el hilado o regeneración para obtener diferentes estructuras secundarias con el fin de manipular las propiedades del material. Por ejemplo, la extrusión de la proteína de glándula de seda forzada a través de hileras de gusanos de seda permite alcanzar la microestructura apropiada de la fibra, alterando significativamente la tenacidad de la fibra, mediante variaciones en el pH y las concentración de sales (47). Este tipo de

ajustes permiten modificar los materiales de seda, ofreciendo la ventaja de hacer coincidir sus propiedades de soporte de carga con la de los tejidos objetivo. Las técnicas de renaturalización por vapor de agua (water annealing) también se utilizan para inducir insolubilidad en productos de seda (48, 49), películas tratadas con estos métodos son más flexibles y se degradan más rápido que aquellas tratadas con metanol (48). Por otra parte, las variaciones en los procesos pueden afectar propiedades tales como la biodegradación (50), la interacción de células (51) y la cinética de liberación de fármacos (52, 53) etc. Estos resultados demuestran que son necesarios más estudios para entender las relaciones estructura-propiedad relacionada con el control de las propiedades del material. Dicho control será una clave para el éxito de la seda como un biopolímero natural para la regeneración de tejidos.

Diversificación morfológica de los biomateriales de seda usados en la regeneración de tejidos. El desgomado (eliminación de la sericina) es el primer paso en el procesamiento de la fibra de seda. En algunos casos en los cuales es difícil disolver las fibras de seda, la fibroína se puede extraer directamente de las glándulas de los gusanos de seda utilizando una solución tampón apropiada (54). Las fibras de seda desgomada se pueden utilizar para formar diversas estructuras como cuerdas, cables trenzados e hilados texturados (38). Además, los capullos también se utilizan para construir estructuras no tejidas disolviéndolos parcialmente y utilizándolos como un modelo de soporte para células, en el cual se mantiene la disposición de los filamentos en el capullo para mantener la estructura porosa del tejido (38, 55). Una forma alternativa de utilizar los filamentos de seda directamente en la ingeniería de tejidos es haciendo una estructura de tejido de seda para reforzar soportes 3-D. Dicho refuerzo mejora las propiedades mecánicas de los andamios para aplicaciones en las que se requiere soportar cargas como en el caso de los ligamentos (56, 57). Para preparar la solución de seda para la regeneración de diferentes formatos estructurales como películas, hidrogeles, esponjas de seda, los esfuerzos se han concentrado en el uso de soluciones acuosas de sales caotrópicas tales como LiBr, CaCl₂ / etanol / agua, LiSCN (58-62).

Películas

Las soluciones para la fabricación de películas de fibroína de seda se pueden producir mediante el uso de soluciones acuosas (63), soluciones ácidas (40, 63) y solventes iónicos (64). La fabricación de películas de seda se ha reportado también por procesos de recubrimiento por rotación y el proceso de Langmuir-Blodgett (LB) (64-66). Debido a que estas películas son inestables, se han desarrollado técnicas como el secado controlado (67), el *water annealing* (68), la extensión (69), y la inmersión en alcohol; todas ellas tienen como objeto el lograr mejorar la formación de estructuras secundarias de tipo hoja- β y de esta manera incrementar la cristalinidad.

Hidrogeles

Los hidrogeles de seda se forman a través de transición solución-gel (sol-gel) de una solución acuosa de fibroína de seda en presencia de ácidos, agentes deshidratantes, iones, sonicación o liofilización (70-73). La transición sol-gel puede ser acelerada por el aumento de la concentración de proteína, temperatura, y la adición de Ca₂⁺ (74). Los hidrogeles de seda pueden ser útiles como sistemas inyectables o sistemas de administración no inyectables. Las propiedades mecánicas de la seda en forma de hidrogeles han mostrado propiedades adecuadas para la preparación de andamios, que necesitan soportar carga, como en el caso de la regeneración de cartílago (75).

Espumas

Las esponjas porosas 3-D son estructuras ideales para ingeniería de tejidos, ya que imitan estrechamente el microambiente fisiológico *in vivo*. Los andamios de seda se preparan mediante secado por congelación, lixiviación de porógenos y técnicas de fabricación libres

de sólidos (76-78). El liofilizado de esponjas produce tamaños de poro por debajo de 100 micras aunque este se pueden controlar mediante el ajuste de la temperatura de congelación, pH de la solución y la cantidad de disolventes orgánicos (78). Adicionalmente la congelación repetida y los procesos de descongelación pueden aumentar tamaños de poro desde 60 hasta 250 micras (77). Un mejor control sobre la estructura de poros se puede lograr a partir de la fundición y posterior lixiviación de partículas o mediante métodos de generación de espumas con el uso de gases (76). Debido al control que se puede tener sobre la porosidad y tamaños de poro, este tipo de andamios se utilizan comúnmente en aplicaciones de ingeniería tisular, predominantemente para hueso y cartílago (79). La mala compatibilidad entre componentes da como resultado una mezcla no homogénea, separación de fases y reacciones adversas en los tejidos (80), para asegurar una buena compatibilidad, los andamios compuestos de seda estos se fabrican mediante la incorporación de partículas de seda molida, lo que resulta en una mejora significativa en el módulo de compresión de menos de 50 kPa a aproximadamente 2,2 MPa (81). Otras modificaciones incluyen el refuerzo de los andamios con el uso de fibras de seda para obtener una mejora adicional en el módulo de hasta aproximadamente 13 MPa (82). Tales propiedades mecánicas pueden ser suficientes para la regeneración de hueso esponjoso, pero todavía se encuentran en desarrollo con el fin de que cumplan con los requisitos prácticos de soporte de carga en procesos de ingeniería de tejidos para tejido óseo.

Partículas

La generación de micro y nano partículas de seda se realiza a partir de la solución de seda por liofilización y posterior molienda (83), secado por aspersión (84), ruptura por aceleración (85), auto-ensamblaje (86, 87) y congelación/descongelación (88). Si bien las partículas de seda son utilizadas para el refuerzo de los andamios con el fin de mejorar las propiedades mecánicas y los resultados celulares, estas partículas de seda regenerada se utilizan principalmente como sistemas para el transporte de medicamentos y liberación controlada (32, 81, 88-90). Por lo tanto, será de interés ver si las partículas pueden desempeñar la doble función de mejorar las propiedades mecánicas de los andamios y al mismo tiempo actuar como un sistema portador de factores de crecimiento para la regeneración rápida del tejido afectado.

Biocompatibilidad

La larga historia del éxito de las suturas de seda ha hecho que esta sea conocida como un material biocompatible (29, 33, 91). Sin embargo, como cualquier otro biomaterial, no autólogo, este puede causar respuesta a cuerpo extraño sobre todo debido a su origen no mamífero. Algunos casos de hipersensibilidad retardada de suturas de seda puede ser ocasionada a la presencia de la proteína sericina (34, 35). Sin embargo, otros estudios que emplean sericina de seda aislada y biomateriales basados en sericina no han proporcionado clara evidencia para sugerir la sericina como fuente de efectos adversos (36). El uso de soportes basados en fibroína no han mostrado signos de infección durante la implantación subcutánea de esteras de fibras generadas mediante electro-hilado en ratas durante un máximo de 8 semanas, aunque en algunos casos se ha identificado la acumulación típica de los fagocitos y los linfocitos como respuesta a cuerpo extraño (92). Los soportes 3D de seda implantados subcutáneamente en ratas han mostrado una respuesta inmune mínima, inclusive después de un año de implantación, con niveles de TNF- α IFN- δ , IL-4, IL-6 e IL-13 muy bajos (70). En cerdo como modelo de ingeniería de tejido para ligamento no se observó evidencia de mal funcionamiento después de 24 semanas de cultivo *in vivo* (56). En general, estos estudios ofrecen datos que sugieren que los productos de seda tienen buena biocompatibilidad y se pueden comparar con otros biomateriales usados comúnmente, tales como ácido poliláctico y colágeno (91). Por ejemplo, las pruebas de Biocompatibilidad, ISO 10993 de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP), muestran que el material *Seri Fascia*, malla quirúrgica basada en seda cumple los requisitos

de biocompatibilidad (93). Sin embargo, a pesar de los alentadores resultados, todavía quedan algunas preguntas relacionadas con la seguridad a largo plazo de biomateriales de seda en el cuerpo humano. En primer lugar, las suturas de seda permanecen en el cuerpo sólo por un tiempo limitado hasta que se eliminen dependiendo del periodo de cicatrización de la herida. Como los productos de seda para ingeniería de tejidos están obligados a estar en contacto con los tejidos por un período de tiempo prolongado, las respuestas inmunes innata y adaptativa a largo plazo merecen una mayor investigación. En segundo lugar, puede haber preocupaciones sobre la reacción inmune en respuesta a los productos degradados de biomateriales de seda, dependiendo de su tamaño y morfología (36). Se reconoce que una de las principales causas de la insuficiencia de cualquier implante de biomaterial es la generación de desechos de partículas, que pueden activar el sistema inmune. El reporte muestra que las fracciones de fibras de seda son capaces de inducir una mínima producción de citocinas proinflamatorias y el aumento de la fagocitosis (39). Los productos degradados de fibroína de la seda, también pueden causar la amiloidogénesis según lo informado por Lundmark et al. (50). Su observación sugiere la potencialidad de soluciones de seda de *B. mori* para facilitar la acumulación de amiloide, lo que resulta en la degeneración del tejido. Por lo tanto, las investigaciones a largo plazo sobre los productos de degradación de los biomateriales de seda son necesarias con el fin de aliviar completamente cualquier inquietud para el uso de andamios de seda en aplicaciones clínicas.

Biodegradación

La biodegradación de seda se estudia con base a la pérdida de masa, cambio en la morfología y análisis de los productos degradados *in vitro*. Del mismo modo, la degradación se prueba en modelos animales mediante la evaluación de las propiedades mecánicas de la seda después de la implantación durante cierto tiempo y el estudio estructural de la integridad de los exámenes histológicos, tinción fluorescente y diversos ensayos bioquímicos. La fibroína regenerada se degrada mucho más rápido que las fibras y su velocidad de degradación depende de la estructura secundaria de la seda resultante de la preparación de los materiales de seda regeneradas (68). La termo biodegradabilidad se utiliza a menudo para tratar el tema de la desintegración de materiales de seda. De acuerdo con la definición de (94) la biodegradabilidad es la capacidad de descomposición de un polímero implantable por elementos biológicos dando fragmentos, que pueden moverse lejos del sitio a través de transferencia de fluido, pero no necesariamente del cuerpo (94). Por otra parte, la bio-sorción es la eliminación total del material extraño inicial a través de la filtración o la metabolización de los bio-productos de degradación. Con relación a estos procesos en seda Wang et al. (70) mostraron que los andamios 3D de seda preparados con soluciones acuosas se desintegraron en pocas semanas y desaparecieron completamente después de 1 año. Se ha observado que los biomateriales de seda no solamente son biodegradables sino también bio-reabsorbibles en procesos mediados por los macrófagos (70). En modelos *in vitro* se ha determinado que la proteasa XIV de *Streptomyces griseus* (95-99), y la α -quimotripsina de páncreas bovino (96, 97, 100) son capaces de promover la degradación de los materiales fabricados de seda, de igual manera se ha identificado que las células *in vitro*, osteoblastos y osteoclastos podrían erosionar películas de seda a través de la expresión de las metaloproteinasas (MMPs) e integrina (101). Estos resultados son alentadores en la medida que la matriz extracelular nativa se remodela continuamente *in vivo* por proteólisis de MMPs y la regeneración de la matriz (102). La seda tiene claras ventajas sobre otros biomateriales en varios aspectos de biodegradación. Por ejemplo con biomateriales sintéticos como poliglicólidos y poliláctidos, que son aprobados por las autoridades reguladoras ya que los productos degradados se reabsorben a través vías metabólicas, sin embargo, la liberación de subproductos ácidos es un tema de preocupación. Estos problemas no se presentan con la seda, además, los materiales

sintéticos pierden sus propiedades muy temprano después de la implantación (4, 103). Por otro lado, la conservación de la fuerza durante un largo tiempo por muchos sistemas de seda puede ser una ventaja particularmente en aquellos en donde la degradación lenta se requiere con el fin de mantener la capacidad de soporte de carga. A pesar de tales ventajas, un conocimiento profundo de los procesos de degradación y eliminación de seda necesita mayor investigación.

Aplicaciones de los biomateriales de fibroína de gusano de seda en ingeniería de tejidos. La sustitución de una parte del cuerpo humano por un biomaterial requiere de una buena comunicación entre el hospedero y el sistema implantado con el fin de lograr resultados exitosos. Con la intención de superar las posibles limitaciones, la fibroína de seda ha sido evaluada en múltiples modelos para ingeniería de tejidos como se describen a continuación.

Regeneración de tejido vascular.

Los tejidos vasculares basados en seda regenerada se utilizan clínicamente como dispositivos para la desviación de flujos y "stents" (104, 105). En el caso de un estudio relacionado con dispositivos para la desviación del flujo, dos de los tres pacientes mostraron resultados prometedores, lo que sugiere que la seda puede ser una opción atractiva para el tratamiento de aneurismas (46). Los "stents" de seda también se han empleado para la reconstrucción de un aneurisma intracraneal. Se han desarrollado intentos exitosos para fabricar elementos tubulares ~ 3 mm con un grosor de 0,15 mm y una resistencia media a la tracción de 2,42 MPa (106). La resistencia a la rotura de los vasos tubulares de seda está en el nivel de los 811 mm Hg en comparación con 1800 mm de Hg de la safena, estándar de oro para estudios en venas (107, 108). La implantación de injerto vascular fabricado de fibroína de seda en aorta abdominal de ratas resulto en excelente permeabilidad (ca. 85%) después de un año (109). De igual manera el uso de compuestos construidos con seda y colágeno o con compuestos sintéticos como etilenglicol, diglicoldiglicidil poli éter se han usado con éxito para desarrollar construcciones vasculares (110). Los requerimientos críticos para el diseño de los vasos sanguíneos incluyen la supervivencia en virtud de los cambios en la presión arterial, la capacidad de sostener la carga cíclica, compatibilidad con los vasos adyacentes y el revestimiento anti-trombótico (111). Se ha identificado que la fibroína de seda posee una superficie anti-trombótica con buena resistencia a la alta presión arterial y el estrés de flujo cortante (69, 112). El desafío en este tema se relaciona con la inclusión de las células correspondientes, como pueden ser células endoteliales humanas primarias y líneas celulares endoteliales (HPMEC-ST1.6R e ISO-HAS-1) (113).

Regeneración de tejido nervioso

El sistema nervioso humano se clasifica en (a) sistema nervioso central (SNC) y (b) sistema nervioso periférico (SNP). El SNP es capaz de lograr la recuperación de lesiones menores, mientras que las grandes deben ser tratadas quirúrgicamente con injertos de nervios de otras partes del cuerpo. Por lo tanto, en tales tratamientos, la ingeniería de tejidos es muy pertinente y la compatibilidad del material de andamiaje con células neuro-progenitoras toma una gran importancia. Por ejemplo, la fibroína de seda soporta la viabilidad de ganglios de la raíz dorsal y las células de Schwann sin afectar su fenotipo o funcionalidad (114). Compuestos de fibroína de seda con quitosano o poli (ácido L-láctico-cocaprolactona) son capaces de cubrir un defecto en el nervio ciático en un espacio de 10 mm de largo en ratas (115-117). En otros trabajos se identificó que la mezcla de fibroína de seda de *B. mori* y fibra Araña X[®] (a la seda de araña como la fibra) permitió tender un puente en un tramo de nervio de 13 mm en 12 semanas (118). Los avances en este tema se han orientado a la producción de poros y la adición de factores neurotróficos para el crecimiento neuronal, con el fin de mejorar el resultado de los injertos de nervio basados en seda.

Regeneración de piel

La piel es el órgano más grande en el ser humano y actúa como barrera para organismos infecciosos. Tiene una capacidad de auto-sanación limitada y en el caso de daños grandes la piel pierde su integridad, lo que puede llevar a la muerte. La piel humana adulta consta de dos capas principales: la epidermis (capa queratinizada) y la dermis (capa rica en colágeno). Estructuras como glándulas sebáceas, pelos y glándulas hormonales se generan desde la dermis. Esta complejidad estructural hace que los procesos de ingeniería de tejidos en la piel sean difíciles. Y aunque la fibroína de seda soporta fácilmente el crecimiento tanto de queratinocitos como fibroblastos humanos (69), la complejidad estructural del tejido nativo requiere un material de andamiaje compuesto. Se ha estudiado el uso de capas de fibroína con colágeno-I observándose que se mejora la fijación y la dispersión de los queratinocitos, mientras que el recubrimiento con fibronectina fomenta tanto la adhesión como la dispersión de los queratinocitos y fibroblastos dentro de la matriz (119). Estos hallazgos sugieren, por lo tanto, que mezclas de fibroína de seda puede tener una mejor perspectiva, que el uso de fibroína de seda pura para la regeneración de piel.

Regeneración de tejido óseo

El hueso es un tejido conectivo especializado compuesto por una matriz calcificada extracelular, que contiene colágeno tipo I e hidroxiapatita como componentes principales (120). Así, el material de andamiaje para ingeniería de tejidos en hueso debe asegurar la tenacidad de la matriz y la deposición de la misma. En este contexto, la fibroína de la seda es una elección racional por su alta resistencia a la fuerza mecánica junto con una buena bio-compatibilidad. La fibroína de seda usada en ingeniería de tejido óseo es una de las más estudiadas de la ingeniería de tejidos (10). Los andamios de fibroína porosa para la generación de constructos de hueso son capaces de estimular el desarrollo avanzado de tejidos óseos dentro de 5 semanas (79). Los andamios de fibroína de seda también promueven el proceso de curación basados en células madre mesenquimales humanas para defectos femorales en ratones desnudos (121). De igual manera el uso de compuestos de seda con armazones de polietileno adicionadas con proteína morfo genética de hueso tipo 2 y células madre mesenquimales han permitido la regeneración de hueso como tejido (122). La incorporación de nanopartículas de hidroxiapatita en la matriz de seda ha tenido como resultado mejorar la regeneración ósea en animales (90, 123). La incorporación de n-Hap (nanohidroxiapatita) dentro de la hoja de fibroína y el posterior cultivo de células madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSC) de rata, demostraron con éxito la diferenciación de BMMSCs (14) hacia tejido osteoblastico. Una de las estrategias a mejorar en la regeneración de hueso usando compuestos de seda, es la vascularización de los modelos *in vitro* (124). Por ejemplo, se ha identificado que los poros son necesarios para obtener el tejido óseo 3-D completamente vascularizado.

Regeneración de cartilago

El cartilago es un tejido conectivo no vascular y no inervado. Los procesos de ingeniería de tejidos para la generación de andamios 3-D para el crecimiento de condrocitos con el uso de fibroína porosa (125-128), han usado estrategias como electro-hilado de fibras de seda tratados con microondas inducida por plasma de argón (129), fibroína de seda mezclada con quitosano (130) o sistemas de esponjas generadas por reticulado de quitosano-fibroína(131). El factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-I) es una molécula reguladora en la condrogénesis (132), por lo tanto puede ser incorporado dentro de andamios para mejores resultados condrogénicos (132). El uso de biorreactores proporciona la estimulación mecánica y la maduración de construcciones cartilaginosas (133), identificándose que los factores hidrodinámicos generados en un bioreactor son importantes en el resultado condrogénico. Otros factores que deben tenerse en consideración para la regeneración de los tejidos cartilaginosos son

fuentes de células (134), arquitecturas de andamios, tamaños de poro y la distribución de los poros.

Regeneración de ligamentos tendones

La ingeniería de los ligamentos y tendones requiere andamios fabricados con materiales con una excelente combinación de resistencia mecánica, elasticidad, tenacidad e integridad estructural. El primer proceso exitoso para la generación de un ligamento cruzado anterior (LCA) utilizó como andamio un sistema tipo cable retorcido de fibras de seda que presento propiedades mecánicas comparables a LCA humano (38). La incorporación sinérgica de fibras de seda en matrices de colágeno (135), el recubrimiento de fibroína de seda generadas por electro-hilado de nano fibras con el uso del ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) (136), la adición de factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) han estimulado la bioquímica y vías mecánicas para la regeneración de tejido del ligamento (137). Los andamios de fibroína de seda también han sido capaces de reparar los defectos en el tendón de Aquiles en estudios realizados en conejos blancos de Nueva Zelanda (138).

Regeneración de tejido cardiaco

La pérdida de cardiomiocitos después de la lesión reduce la función cardíaca, lo que conduce a una mayor morbilidad y mortalidad. Un tratamiento posible es la ingeniería de un corazón artificial o parche cardíaco generado *in-vitro* seguido por la implantación de este. El quitosano, ácido hialurónico (HA) o soporte de fibroína de seda sembrados con células madre mesenquimales de rata han sido usados para la generación de parches cardíacos (139). Andamios 3-D de fibroína de seda de *A. mylitta* mostraron buenos resultados, sin el empleo de otro material como matriz extracelular, produciendo cardiomiocitos de rata *in vitro* (140). Los temas críticos que quedan por resolver son las características estructurales de seda o de compuestos que funcionen como biomateriales que soporten la fuerza mecánica de las válvulas del corazón.

Regeneración de tejido ocular

El enfoque de aloinjerto para la regeneración de los tejidos de la córnea tiene inconvenientes biológicos asociados (141) mientras que el uso de fibroína de seda ha mostrado mejores resultados. Características como la transparencia óptica de las películas de fibroína de seda y la estabilidad en solución acuosa a pH neutro son las características clave que la seda tiene a su favor para aplicaciones en bio-fotónica (6). Por ejemplo, películas de seda se pueden apilar en una estructura porosa 3-D imitando de cerca la organización helicoidal de la córnea *in vivo*. Cuando estas estructuras 3-D son cultivadas con fibroblastos corneales de humanos y de conejo, las células mostraron la morfología típica de los queratocitos de la córnea (142). Los implantes de fibroína de seda en la córnea del conejo adicionada con células epiteliales, se vuelven translúcidas a las 4 semanas, y forman nuevo limbo y vasos sanguíneos a las 8 semanas posteriores a la implantación. La regeneración completa de la córnea del conejo se produce a las 16 semanas, dejando atrás unas cuantas piezas opacas de andamios degradados (143). Se reporta que el recubrimiento de fibroína con colágeno IV, fibronectina, condroitina y mezclas de sulfato-laminina mejora el rendimiento de fibroína como biomaterial (144, 145), estas características abren nuevos caminos a los biomateriales basados en seda en la medicina regenerativa ocular.

Regeneración de tejido hepático

El hígado es un órgano que desempeña un papel crucial en el metabolismo de los carbohidratos, las proteínas, lípidos y vitaminas. El principal componente celular del tejido hepático son los hepatocitos, los cuales se han empleado en sistemas *in-vitro* para reconstruir el tejido 3-D del hígado. Los materiales compuestos de seda para la ingeniería de tejido hepático incluye seda funcionalizada con lactosa

y ácido cianúrico (146), películas de fibroína de seda mezcladas con colágeno (147), colágeno humano recombinante (148), colágeno-heparina (149), y micro-partículas de seda incrustadas en andamios de ácido poli láctico (PLA) (150). Sin embargo, como los hepatocitos llevan un grado de organización estructural, formando agregados celulares grandes a largo plazo en cultivo *in vitro*, estos complejos celulares agregados hacen que sea difícil la difusión de nutrientes y por lo tanto requieren investigación adicional en el diseño de andamios para la completa regeneración del tejido de seda.

Regeneración de tejido espinal e intervertebral

El injerto de células olfativas encapsuladas (OECS) es uno de los enfoques más comúnmente empleados para el tratamiento de lesiones de la médula espinal. La regeneración de la médula espinal basada en biomateriales de seda se encuentra actualmente en una etapa muy temprana. El cultivo de las OECS en fibroína de seda-nano fibrosa revela perspectivas de biomateriales de seda en este ámbito (151). El diámetro de las nano-fibras posee efectos reguladores sobre el crecimiento de las OECS (152); por ejemplo, los diámetros más pequeños dan como resultado mejores respuestas celulares que los más grandes. El tratamiento de la enfermedad degenerativa de disco implica la reparación del anillo fibroso, que es uno de los principales componentes del disco intervertebral. Los andamios porosos de fibroína de seda permiten un buen crecimiento de células del anillo fibroso bovino hasta por un periodo de 8 semanas en sistemas *in vitro* (153). El crecimiento de células del anillo fibroso de la especie bovina en fibroína de seda está muy influenciado por la condición del cultivo y el tamaño medio de los poros del material de andamiaje ($\geq 600 \mu\text{m}$) (154). Sin embargo, se necesitan más investigaciones para llegar a imitar completamente la alta resistencia, elasticidad y morfología de los tejidos intervertebrales naturales.

Regeneración de vejiga

En el tratamiento de la incontinencia urinaria, se requieren andamios en forma de vejiga los cuales se han logrado con el uso de células musculares lisas autólogas (155). Las películas de fibroína de seda proporcionan un buen soporte a las células epiteliales de transición de las vejigas urinarias en conejos de Nueva Zelanda (156). El uso de las películas de seda en conejos ha tenido como resultado el éxito en la reparación de defectos de longitud (1,5 cm) (157). El uso de soportes basados en seda adicionados con células madre mesenquimales de médula ósea han mostrado un buen control sobre la presión y fugas, comparable a la del control negativo (158), estos resultados sugieren un tratamiento esperanzador para la incontinencia urinaria.

Regeneración de tráquea

La incidencia del desarrollo de estenosis traqueal en los recién nacidos prematuros está en aumento como resultado de la necesidad de llevar a cabo procesos prolongados de incubación. En conejos se ha logrado la reconstrucción exitosa de defectos traqueales con el uso de biomateriales basados en seda, los resultados muestran la generación de capas de fibroblastos de grosores entre 240 a 302 micras, sin granuloma de cuerpo extraño e infiltración de macrófagos (159). Estos resultados sugieren la idoneidad de los dispositivos basados en seda para la generación de revestimientos epiteliales en los trasplantes de tráquea (160).

Regeneración de tímpano

Alteraciones o daños en el tímpano tienen como resultado la generación de un intenso dolor, la posibilidad de infección e incluso la pérdida de la audición. El tratamiento quirúrgico para restaurar las perforaciones crónicas es la miringoplastia, en donde injertos autólogos, aloinjertos, y el injerto de materiales sintéticos se han utilizado comúnmente (161). Los ensayos recientes con el uso de membranas de fibroína de la seda han dado como resultado una buena adhesión y cinética de crecimiento de los queratinocitos de

la membrana timpánica humana (162-164). Las membranas de seda proporcionan una mejor cicatrización en comparación con el parche de papel convencional (165). Estos hallazgos sugieren la idoneidad para la fabricación de parches de tímpano de los materiales basados en seda.

Perspectivas futuras

La regeneración tisular para terapéutica es uno de los objetivos específicos más críticos orientados a lograr la funcionalidad de los sistemas vivos. El tejido construido debe interactuar de manera exitosa con el sistema inmunológico de los organismos en los cuales se implanta. Los diseños basados en seda permiten un fácil control de la morfología de la matriz, una tasa de degradación y adhesión conforme a los tejidos subyacentes con baja toxicidad inmunológica y una buena biocompatibilidad. Los avances recientes en la comprensión de la estructura de la seda y el procesamiento de esta abren nuevas oportunidades en el uso de diversas formas de seda en la regeneración de tejidos. Los sistemas de seda serán particularmente útiles para aplicaciones que requieren procesos lentos de biodegradación y buenas propiedades mecánicas, tales como el hueso, los ligamentos y los tejidos musculoesqueléticos. La exitosa aplicación de materiales basados en seda en la ingeniería de tejidos depende de lograr una mayor comprensión a largo plazo de la biocompatibilidad, biodegradabilidad, productos de degradación, junto con la capacidad de generar morfologías de seda para los requisitos específicos del tejido. La implementación de biomateriales basados en seda requerirán del fortalecimiento de redes de trabajo que implican disciplinas de las Ciencias Biológicas, Médicas y de Ingenierías para estudiar y adecuar en forma exitosa las propiedades de estos materiales en Ingeniería de Tejidos.

Conflictos de interés

Los autores declaramos que no tenemos ningún conflicto de interés.

Referencia

1. Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. *Science*. 1993;260:920-6.
2. Kundu B, Kundu SC. Osteogenesis of human stem cells in silk biomaterial for regenerative therapy. *Prog Polym Sci*. 2010;35:1116-27.
3. Seal BL, Otero TC, Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Mater Sci Eng R*. 2001;34:147-230.
4. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci*. 2007;32:762-98.
5. Omenetto FG, Kaplan DL. New opportunities for an ancient material. *Science*. 2010;528-31.
6. Omenetto FG, Kaplan DL. A new route for silk. *Nat Photonics* 2008;2:641-3.
7. Hota MK, Bera MK, Kundu B, Kundu SC, Maiti CK. A natural silk fibroin protein-based transparent bio-membrane. *Adv Funct Mater*. 2012;22:4493-9.
8. Tao H, Kaplan DL, F.G. O. Silk Materials — a road to sustainable high technology. *Adv Mater*. 2012;24:2824-37.
9. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*. 2003;24:401-16.
10. Kasoju N, Bora U. Silk fibroin in tissue engineering. *Adv Healthc Mater*. 2012;1:393-412.
11. Lewis R. Unraveling the weave of spider silk. *Bioscience*. 1996;46:636-8.
12. Ayoub NA, Garb JE, Tinghitella RM, Collin MA, Hayashi CY. Blueprint for a high-performance biomaterial: Full-length spider dragline silk genes. *PLoS One*. 2007;2:e514.

13. Shimura K, Kikuchi A, Ohtomo K, Katagata Y, Hyodo A. Studies on silk fibroin of *Bombyx mori*. L. Fractionation of fibroin prepared from the posterior silk gland. *J Biochem.* 1976;80:693–702.
14. Tanaka K, Kajiyama N, Ishikura K, Waga S, Kikuchi A, Ohtomo K, et al. Determination of the site of disulfide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Biochim Biophys Acta, Protein Struct Mol Enzymol.* 1999;1432:92–103.
15. Zhou CZ, Confalonieri F, Jacquet M, Perasso R, Li ZG, Janin J. Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins Struct Funct Bioinf* 2001;44:119–22.
16. Sehnal F, Žurovec M. Construction of silk fiber core in lepidoptera. *Biomacromolecules* 2004;5:666–74.
17. Inoue S, Tanaka K, Arisaka F, Kimura S, Ohtomo K, Mizuno S. Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J Biol Chem.* 2000;275:40517–28.
18. Inoue Si, Tsuda H, Tanaka T, Kobayashi M, Magoshi Y, Magoshi J. Nanostructure of natural fibrous protein: In vitro nanofabric formation of *Samia cynthia ricini* wild silk fibroin by self-assembling. *Nano Lett.* 2003;3:1329–32.
19. Lucas F, Shaw JTB, S.G. S. Comparative studies of fibroins: I. The amino acid composition of various fibroins and its significance in relation to their crystal structure and taxonomy. *J Mol Biol.* 1960;2:339–49.
20. Freddi G, Gotoh Y, Mori T, Tsutsui I, Tsukada M. Chemical structure and physical properties of *Antheraea assama* silk. *J Appl Polym Sci.* 1994;52:775–81.
21. Sen K, Babu MK. Studies on Indian silk. I. Macrocharacterization and analysis of amino acid composition. *J Appl Polym Sci* 2004;92:1080–97.
22. Rajkhowa R, Gupta VB, Kothari VK. Tensile stress–strain and recovery behavior of Indian silk fibers and their structural dependence. *J Appl Polym Sci.* 2000;77:2418–29.
23. Vollrath F, Porter D. Spider silk as a model biomaterial. *Appl Phys A: Mater Sci Process.* 2006;82:205–12.
24. Lefèvre T, Rousseau ME, Pézolet M. Protein secondary structure and orientation in silk as revealed by raman spectromicroscopy. *Biophys J.* 2007;92:2885–95.
25. Vollrath F. Strength and structure of spiders' silks. *J Biotechnol.* 2000;74:67–83.
26. Vollrath F, Knight DP. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature.* 2001;410:541–8.
27. Keten S, Xu Z, Ihle B, Buehler MJ. Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of [beta]-sheet crystals in silk. *Nat Mater.* 2010;9:359–67.
28. Frische, Maunsbach, Vollrath. Elongate cavities and skin-core structure in *Nephila* spider silk observed by electron microscopy. *J Microsc.* 1998;189:64–70.
29. Akai H, Nagashima T, Aoyagi S. Ultrastructure of posterior silk gland cells and liquid silk in Indian tasar silkworm, *Antheraea mylitta drury* (Lepidoptera: Saturniidae). *Int J Insect Morphol Embryol.* 1993;22:497–506.
30. Poza P, Pérez-Rigueiro J, Elices M, Llorca J. Fractographic analysis of silkworm and spider silk. *Eng Fract Mech.* 2002;69:1035–48.
31. Putthanarat S, Stribeck N, Fossey SA, Eby RK, Adams WW. Investigation of the nanofibrils of silk fibers. *Polymer.* 2000;41:7735–47.
32. Kundu J, Chung YI, Kim YH, Tae G, Kundu SC. Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release. *Int J Pharm.* 2010;388: 242–50.
33. Vollrath F. Spiders' webs. *Curr Biol.* 2005;R364–R5.
34. Giesa T, Arslan M, Pugno NM, Buehler MJ. Nanoconfinement of spider silk fibrils begets superior strength, extensibility, and toughness. *Nano Lett.* 2011;11:5038–46.
35. Du N, Yang Z, Liu XY, Li Y, Xu HY. Structural origin of strain-hardening of spider silk. *Adv Funct Mater.* 2011:772–8.
36. Zhang Y, Yang H, Shao H, Hu X. *Antheraea pernyi* silk fiber: a potential resource for artificially biospinning spider dragline silk. *J Biomed Biotechnol.* 2010.
37. Rajkhowa R, Levin B, Redmond SL, Wang L, Kanwar R, Atlas MD, et al. Structure and properties of biomedical films prepared from aqueous and acidic silk fibroin solutions. *J Biomed Mater Res.* 2011; 97A:37–45.
38. Altman GH, Horan RL, Lu HH, Moreau J, Martin I, Richmond JC, et al. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials.* 2002;23:4131–41.
39. Gellynck K, Verdonk P, Van Nimmen E, Almqvist K, Gheysens T, Schoukens G, et al. Silkworm and spider silk scaffolds for chondrocyte support. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19:3399–409.
40. Ha SW, Tonelli AE, Hudson S.M. Structural studies of *Bombyx mori* silk fibroin during regeneration from solutions and wet fiber spinning. *Biomacromolecules.* 2005;6:1722–31.
41. Jiang C, Wang X, Gunawidjaja R, H-Lin Y, Gupta MK, Kaplan DL, et al. Mechanical properties of robust ultrathin silk fibroin films. *Adv Funct Mater.* 2007;17:2229–37.
42. Zuo B, Dai L, Wu Z. Analysis of structure and properties of biodegradable regenerated silk fibroin fibers. *J Mater Sci.* 2006;41:3357–61.
43. Le Zainuddin TT, Park Y, Chirila TV, Halley PJ, Whittaker AK. The behavior of aged regenerated *Bombyx mori* silk fibroin solutions studied by ¹H NMR and rheology. *Biomaterials.* 2008;29:4268–74.
44. Karageorgiou V, Meinel L, Hofmann S, Malhotra A, Volloch V, Kaplan D. Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res.* 2004;71A:528–37.
45. Karageorgiou V, Tomkins M, Fajardo R, Meinel L, Snyder B, Wade K, et al. Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res.* 2006; 78A.
46. Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, Wang X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Advanced drug delivery reviews.* 2013;65:457–70.
47. Shao Z, Vollrath F. Materials: Surprising strength of silkworm silk. *Nature.* 2002;418:741.
48. Jin HJ, Park J, Karageorgiou V, Kim UJ, Valluzzi R, Cebe P, et al. Water-atable silk films with reduced β -sheet content. *Adv Funct Mater.* 2005;15:1241–7.
49. Kawahara Y, Furukawa K, Yamamoto T. Self-expansion behaviour of silk fibroin film. *Macromol Mater Eng.* 2006;291:458–62.
50. Lundmark K, Westermark GT, Olsén A, Westermark P. Protein fibrils in nature can enhance amyloid protein A amyloidosis in mice: cross-seeding as a disease mechanism. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102:6098–102.
51. Servoli E, Maniglio D, Motta A, Predazzer R, Migliaresi C. Surface properties of silk fibroin films and their interaction with fibroblasts. *Macromol Biosci.* 2005;5:1175–83.
52. Lu S, Wang X, Lu Q, Hu X, Uppal N, Omenetto FG, et al. Stabilization of enzymes in silk films. *Biomacromolecules.* 2009;10:1032–42.

53. Wang JN, Liu-W Z, Yang-X Y, Huang-Y H. Enzymatic degradation behavior of silk fibroin fiber treated by γ -irradiation. *Textile Res J.* 2012;82:1799–805.
54. Mandal BB, Kundu SC. A novel method for dissolution and stabilization of non-mulberry silk gland protein fibroin using anionic surfactant sodium dodecyl sulfate. *Biotechnol Bioeng.* 2008;99:1482–9.
55. Rathbone S, Furrer P, Lübben J, Zinn M, Cartmell S. Biocompatibility of polyhydroxyalkanoate as a potential material for ligament and tendon scaffold material. *J Biomed Mater Res* 2010;93A:1391–403.
56. Fan H, Liu H, Toh SL, Goh JCH. Anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold in large animal model. *Biomaterials.* 2009;30:4967–77.
57. Fan H, Liu H, Wong EJW, Toh SL, Goh JCH. In vivo study of anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold. *Biomaterials.* 2008;29:3324–37.
58. Acharya C, Hinz B, Kundu SC. The effect of lactose-conjugated silk biomaterials on the development of fibrogenic fibroblast. *Biomaterials.* 2008;29:4665–75.
59. Ahmad R, Kamra A, Hasnain SE. Fibroin silk proteins from the nonmulberry silkworm *Philosamia ricini* are biochemically and immunologically distinct from those of the mulberry silkworm *Bombyx mori*. *DNA Cell Biol.* 2004;23:149–54.
60. Bhat NV, Ahirrao SM. Investigation of the structure of silk film regenerated with lithium thiocyanate solution. *J Polym Sci Part A: Polym Chem.* 1983;21:1273–80.
61. Phillips DM, Drummy LF, Naik RR, Long HCD, Fox DM, Trulove PC, et al. Regenerated silk fiber wet spinning from an ionic liquid solution. *J Mater Chem.* 2005;15: 4206–8.
62. Goujon N, Wang X, Rajkhowa R, Byrne N. Regenerated silk fibroin using protic ionic liquids solvents : towards an all-ionic-liquid process for producing silk with tunable properties,. *Chem Commun.* 2012;48:1278–80.
63. Um IC, Kweon H, Park YH, Hudson S. Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. *Int J Biol Macromol.* 2001;29:91–7.
64. Gupta MK, Khokhar SK, Phillips DM, Sowards LA, Drummy LF, Kadakia MP, et al. Patterned silk films cast from ionic liquid solubilized fibroin as scaffolds for cell growth,. *Langmuir.* 2006;23:1315–9.
65. Higuchi A, Yoshida M, Ohno T, Asakura T, Hara M. Production of interferon- β in a culture of fibroblast cells on some polymeric films. *Cytotechnology.* 2000;34:165–73.
66. Wang X, Kim HJ, Xu P, Matsumoto A, Kaplan DL. Biomaterial coatings by stepwise deposition of silk fibroin. *Langmuir* 2005;21:11335–41.
67. Lu Q, Hu X, Wang X, Kluge JA, Lu S, Cebe P, et al. Water-insoluble silk films with silk I structure. *Acta Biomater.* 2010;6:1380–7.
68. Hu Y, Zhang Q, You R, Wang L, Li M. The relationship between secondary structure and biodegradation behavior of silk fibroin scaffolds. *Adv Mater Sci Eng.* 2012.
69. Zhang X, Reagan MR, Kaplan DL. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine,. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61:988–1006.
70. Wang Y, Rudym DD, Walsh A, Abrahamsen L, J-Kim H, Kim HS, et al. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials.* 2008;29:3415–28.
71. Chen X, Li W, Zhong W, Lu Y, Yu T. pH sensitivity and ion sensitivity of hydrogels based on complex-forming chitosan/silk fibroin interpenetrating polymer network. *J Appl Polym Sci.* 1997;65:2257–62.
72. Guziewicz N, Best A, Perez-Ramirez B, Kaplan DL. Lyophilized silk fibroin hydrogels for the sustained local delivery of therapeutic monoclonal antibodies,. *Biomaterials.* 2011;32:2642–50.
73. Motta A, Migliaresi C, Faccioni F, Torricelli P, Fini M, Giardino R. Fibroin hydrogels for biomedical applications: preparation, characterization and in vitro cell culture studies,. *J Biomater Sci Polym.* 2004;15:851–64.
74. Kim UJ, Park J, Li C, Jin-J H, Valluzzi R, Kaplan DL. Structure and properties of silk hydrogels. *Biomacromolecules.* 2004;5:786–92.
75. Chao PH, Yodmuang S, Wang X, Sun L, Kaplan DL. Silk hydrogel for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010:84-90.
76. Harris LD, Kim BS, Mooney DJ. Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *J Biomed Mater Res.* 1998;42:396–402.
77. Li M, Wu Z, Zhang C, Lu S, Yan H, Huang D, et al. Study on porous silk fibroin materials. II. Preparation and characteristics of spongy porous silk fibroin materials, . *J Appl Polym Sci.* 2001;79:2192–9.
78. Tsukada M, Freddi G, Minoura N, Allara G. Preparation and application of porous silk fibroin materials. *Appl Polym Sci.* 1994;54:507–14.
79. Meinel L, Fajardo R, Hofmann S, Langer R, Chen J, Snyder B, et al. Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone.* 2005;37:688–98.
80. Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials.* 2003;24:2133–51.
81. Rajkhowa R, Gil ES, Kluge JA, Numata K, Wang L, Wang X, et al. Reinforcing silk scaffolds with silk particles. *Macromol Biosci.* 2010;10:599–611.
82. Mandal BB, Grinberg A, Seok Gil E, Panilaitis B, Kaplan DL. High-strength silk protein scaffolds for bone repair. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109:7699–704.
83. Yoshimizu H, Asakura T. Preparation and characterisation of silk fibroin powder and its application to enzyme immobilization. *J Appl Polym Sci.* 1990;40:127–34.
84. Yeo JH, Lee KG, Lee YW, Kim SY. Simple preparation and characteristics of silk fibroin microsphere. *Eur Polym J.* 2003;39:1195–9.
85. Wenk E, Wandrey AJ, Merkle HP, Meinel L. Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery. *J Control Release.* 2008;132:26–34.
86. Lammel AS, Hu X, Park SH, Kaplan DL, Scheibel TR. Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials.* 2010;31:4583–91.
87. Zhang YQ, Wei-De S, Ru-Li X, Zhuge LJ, Gao WJ, Wang WB. Formation of silk nanoparticles in water-miscible organic solvent and their characterization. *J Nanopart Res.* 2007;9:885–900.
88. Rockwood DN, Gil ES, Park SH, Kluge JA, Grayson W, Bhumiratana S, et al. Ingrowth of human mesenchymal stem cells into porous silk particle reinforced silk composite scaffolds: an in vitro study. *Acta Biomater.* 2011;7:44–151
89. Mathur AB, Gupta V. Silk fibroin-derived nanoparticles for biomedical applications. *Nanomedicine.* 2010;5:807–20.
90. Wang X, Yucel T, Lu Q, Hu X, Kaplan DL. Silk nanospheres and microspheres from silk/PVA blend films for drug delivery. *Biomaterials.* 2010;31:1025–35.
91. Meinel L, Kaplan DL. Silk constructs for delivery of musculoskeletal therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64:1111–22.

92. Zhou JA, Cao CB, Ma XL, Hu L, Chen LA, Wang CR. In vitro and in vivo degradation behavior of aqueous-derived electrospun silk fibroin scaffolds. *Polym Degrad Stab.* 2010;95:1679–85.
93. Horan R, Bramono D, Stanley J, Simmons Q, Chen J, Boepple H, et al. Biological and biomechanical assessment of a long-term bioresorbable silk-derived surgical mesh in an abdominal body wall defect model. *Hernia.* 2009;13:189–99.
94. Vert M, Li SM, Spenlehauer G, Guerin P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J Mater Sci Mater Med.* 1992;3:432–46.
95. Pritchard EM, Valentin T, Boison D, Kaplan DL. Incorporation of proteinase inhibitors into silk-based delivery devices for enhanced control of degradation and drug release. *Biomaterials* 2011;32:909–18.
96. Horan RL, Antle K, Collette AL, Wang Y, Huang J, Moreau JE, et al. In vitro degradation of silk fibroin. *Biomaterials.* 2005;26:3385–93.
97. Li M, Ogiso M, Minoura N. Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets. *Biomaterials.* 2003;24:357–65.
98. Lu Q, Zhang B, Li M, Zuo B, Kaplan DL, Huang Y, et al. Degradation mechanism and control of silk fibroin. *Biomacromolecules* 2011;12:1080–6.
99. Numata K, Cebe P, Kaplan DL. Mechanism of enzymatic degradation of beta-sheet crystals. *Biomaterials.* 2010;31:2926–33.
100. Arai T, Freddi G, Innocenti R, Tsukada M. Biodegradation of Bombyx mori silk fibroin fibers and films. *J Appl Polym Sci.* 2004;91:2383–90.
101. Sengupta S, Park-H S, Seok GE, Patel A, Numata K, Lu-L C, et al. Quantifying osteogenic cell degradation of silk biomaterials. *Biomacromolecules.* 2010;11:3592–9.
102. Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci.* 2008;121:255–64.
103. Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymer for tissue engineering. *Eur Cells Mater.* 2003;5:1–16.
104. Causin F, Pascarella R, Pavesi G, Marasco R, Zambon G, Battaglia R, et al. Acute endovascular treatment (b48 hours) of uncoilable ruptured aneurysms at non-branching sites using silk flow-diverting devices. *Interv Neuroradiol.* 2011;17(3):357–64.
105. Leonardi M, Cirillo L, Toni F, Dall'Olio M, Princiotta C, Stafa A, et al. Treatment of intracranial aneurysms using flow-diverting silk stents (BALT): a single centre experience. *Interv Neuroradiol.* 2011;17(3):306–15.
106. Soffer L, Wang X, Zhang X, Kluge J, Dorfmann L, Kaplan DL, et al. Silk-based electrospun tubular scaffolds for tissue-engineered vascular grafts. *J Biomater Sci Polym.* 2008;19:653–64.
107. Nishibe T, Kondo Y, Muto A, Dardik A. Optimal prosthetic graft design for small diameter vascular grafts. *Vascular.* 2007;15:356–60.
108. Orban JM, Wilson LB, Kofroth JA, El-Kurdi MS, Maul T, M, Vorp DA. Crosslinking of collagen gels by transglutaminase. *J Biomed Mater Res* 2004;68A:756–62.
109. Nakazawa Y, Sato M, Takahashi R, Aytemiz D, Takabayashi C, Tamura T, et al. Development of small-diameter vascular grafts based on silk fibroin fibers from bombyx mori for vascular regeneration. *J Biomater Sci Polym.* 2011;22:195–206.
110. Yagi T, Sato M, Nakazawa Y, Tanaka K, Sata M, Itoh K, et al. Preparation of double-raschel knitted silk vascular grafts and evaluation of short-term function in a rat abdominal aorta. *J Artif Organs.* 2011;14:89–99.
111. Ratcliffe A. Tissue engineering of vascular grafts. *Matrix Biol.* 2000;19:353–7.
112. Enomoto S, Sumi M, Kajimoto K, Nakazawa Y, Nakahashi R, Takabayashi C, et al. Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material. *J Vasc Surg.* 2010;51:155–64.
113. Unger RE, Peters K, Wolf M, Motta A, Migliaresi C, Kirkpatrick CJ. Endothelialization of a non-woven silk fibroin net for use in tissue engineering: growth and gene regulation of human endothelial cells. *Biomaterials.* 2004;25:5137–46.
114. Yang Y, Chen X, Ding F, Zhang P, Liu J, Gu X. Biocompatibility evaluation of silk fibroin with peripheral nerve tissues and cells in vitro. *Biomaterials.* 2007;28:1643–52.
115. Wei Y, Gong K, Zheng Z, Wang A, Ao Q, Gong Y, et al. Chitosan/silk fibroin-based tissue-engineered graft seeded with adipose-derived stem cells enhances nerve regeneration in a rat model. *J Mater Sci Mater Med.* 2011;22:1947–64.
116. Yang Y, Ding F, Wu J, Hu W, Liu W, Liu J, et al. Development and evaluation of silk fibroin-based nerve grafts used for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2007;28:5526–35.
117. Wang CY, Zhang-H K, Fan CY, Mo XM, Ruan HJ, Li FF. Aligned natural–synthetic polyblend nanofibers for peripheral nerve regeneration. *Acta Biomater.* 2011;7: 634–43.
118. Huang W, Begum R, Barber T, Ibba V, Tee NCH, Hussain M, et al. Regenerative potential of silk conduits in repair of peripheral nerve injury in adult rats. *Biomaterials.* 2012;33:59–71.
119. Min BM, Jeong L, Lee KY, Park WH. Regenerated silk fibroin nanofibers: water vapor-induced structural changes and their effects on the behavior of normal human cells. *Macromol Biosci.* 2006;6:285–92.
120. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002; 295: 1009–14.
121. Meinel L, Betz O, Fajardo R, Hofmann S, Nazarian A, Cory E, et al. Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. *Bone.* 2006;39:922–31.
122. Li C, Vepari C, Jin HJ, Kim HJ, D.L. K. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006;27:3115–24.
123. Kweon H, Lee-G K, Chae-H C, Balázs C, Min-K S, Kim JY, et al. Development of nano-hydroxyapatite graft with silk fibroin scaffold as a new bone substitute. *J Oral Maxillofac Surg* 2011;69:1578–86.
124. Ghanaati S, Unger RE, Webber MJ, Barbeck M, Orth C, Kirkpatrick JA, et al. Scaffold vascularization in vivo driven by primary human osteoblasts in concert with host inflammatory cells. *Biomaterials.* 2011;32:8150–60.
125. Morita Y, Tomita N, Aoki H, Sonobe M, Wakitani S, Tamada Y, et al. Frictional properties of regenerated cartilage in vitro. *J Biomech.* 2006;39:103–9.
126. Wang Y, Blasioli DJ, Kim HJ, Kim HS, Kaplan DL. Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials* 2006;27:4434–42.
127. Gellynck K, Verdonk PCM, Nimmen EV, Almqvist KF, Gheysens T, Shokens G, et al. Silkworm and spider silk scaffolds for chondrocyte support. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19:3399–409.
128. Wang Y, Kim UJ, Blasioli DJ, Kim HJ, Kaplan DL. In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2005;26:7082–94.

129. Baek HS, Park YH, Ki CS, Park JC, Rah DK. Enhanced chondrogenic responses of articular chondrocytes onto porous silk fibroin scaffolds treated with microwave-induced argon plasma. *Surf Coat Technol.* 2008;202:5794–7.
130. Bhardwaj N, Nguyen QT, Chen AC, Kaplan DL, Sah RL, Kundu SC. Potential of 3-D tissue constructs engineered from bovine chondrocytes/silk fibroin-chitosan for in vitro cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2011;32:5773–81.
131. Silva SS, Motta A, Rodrigues MRT, Pinheiro AFM, Gomes ME, Mano JOF, et al. Novel Genipin-cross-linked chitosan/silk fibroin sponges for cartilage engineering strategies. *Biomacromolecules.* 2008;9:2764–74.
132. Uebersax L, Merkle HP, Meinel L. Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Control Release.* 2008;127:12–21.
133. Shangkai C, Naohide T, Koji Y, Yasuji H, Masaaki N, Tomohiro T, et al. Transplantation of allogeneic chondrocytes cultured in fibroin sponge and stirring chamber to promote cartilage regeneration. *Tissue Eng C Methods.* 2007;13:483–92.
134. Seda Tigli R, Ghosh S, Laha MM, Shevde NK, Daheron L, Gimble J, et al. Comparative chondrogenesis of human cell sources in 3D scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med.* 2009;3:348–60.
135. Chen X, Qi YY, Wang LL, Yin Z, Yin GL, Zou XH, et al. Ligament regeneration using a knitted silk scaffold combined with collagen matrix. *Biomaterials.* 2008;29:3683–92.
136. Sahoo S, Lok Toh S, Hong Goh JC. PLGA nanofiber-coated silk microfibrillar scaffold for connective tissue engineering. *Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;95B:19–28.
137. Moreau JE, Chen J, Horan RL, Kaplan DL, Altman GH. Sequential growth factor application in bone marrow stromal cell ligament engineering. *Tissue Eng.* 2005;11:1887–97.
138. Fang Q, Chen D, Yang Z, Li M. In vitro and in vivo research on using antheraea pernyi silk fibroin as tissue engineering tendon scaffolds. *Mater Sci Eng.* 2009; C 29:1527–34.
139. Yang MC, Wang SS, Chou NK, Chi NH, Huang YY, Chang YL, et al. The cardiomyogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells on silk fibroin. *Biomaterials* 2009;30:3757–65.
140. Patra C, Talukdar S, Novoyatleva T, Velagala SR, Mühlfeld C, Kundu B, et al. Silk protein fibroin from *Antheraea mylitta* for cardiac tissue engineering. *Biomaterials* 2012;33:2673–80.
141. Liu W, Merrett K, Griffith M, Fagerholm P, Dravida S, Heyne B, et al. Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes. *Biomaterials.* 2008;29:1147–58.
142. Lawrence BD, Cronin-Golomb M, Georgakoudi I, Kaplan DL, Omenetto FG. Bioactive silk protein biomaterial systems for optical devices. *Biomacromolecules.* 2008;9:1214–20.
143. Yang T, Zhang M. Biocompatibility of silk fibroin membrane as tissue engineering corneal scaffold. *Int J Ophthalmol.* 2008;8:1557–9.
144. Madden PW, Lai JNX, George KA, Giovenco T, Harkin DG, Chirila TV. Human corneal endothelial cell growth on a silk fibroin membrane. *Biomaterials.* 2011;32:4076–84.
145. Bray LJ, George KA, Ainscough SL, Hutmacher DW, Chirila TV, Harkin DG. Human corneal epithelial equivalents constructed on *Bombyx mori* silk fibroin membranes. *Biomaterials.* 2011; 32 5086–91.
146. Gotoh Y, Niimi S, Hayakawa T, Miyashita T. Preparation of lactose-silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocyte attachment. *Biomaterials.* 2004;25:1131–40.
147. Cirillo B, Morra M, Catapano G. Adhesion and function of rat liver cells adherent to silk fibroin/collagen blend films. *Int J Artif Organs* 2004: 60–8.
148. Hu K, Lv Q, Cui FZ, Feng QL, Kong XD, Wang HL, et al. Biocompatible blended films with recombinant human-like collagen for hepatic tissue engineering. *J Bioact Compat Polym.* 2006;21:23–37.
149. Lu Q, Zhang S, Hu K, Feng Q, Cao C, Cui F. Cytocompatibility and blood compatibility of multifunctional fibroin/collagen/heparin scaffolds. *Biomaterials* 2007;28:2306–13.
150. Lv Q, Hu K, Feng Q, Cui F, Cao C. Preparation and characterization of PLA/fibroin composite and culture of HepG2 (human hepatocellular liver carcinoma cell line) cells. *Compos Sci Technol.* 2007;67:3023–30.
151. Qian Y, Shen Y, Lu Z, Fan Z, Liu T, Zhang J, et al. Biocompatibility of silk fibroin nanofibers scaffold with olfactory ensheathing cells. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2009;23:1365–70.
152. Shen Y, Qian Y, Zhang H, Zuo B, Lu Z, Fan Z, et al. Guidance of olfactory ensheathing cell growth and migration on electrospun silk fibroin scaffolds. *Cell Transplant.* 2010;19:147–57.
153. Chang G, Kim HJ, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G, Kandel R. Porous silk scaffolds can be used for tissue engineering annulus fibrosus. *Eur Spine J.* 2007;16:1848–57.
154. Chang G, Kim HJ, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL, Kandel R. Enhancing annulus fibrosus tissue formation in porous silk scaffolds. *J Biomed Mater Res.* 2010;92A:43–51.
155. Atala A. Tissue engineering of human bladder. *Br Med Bull.* 2011;97:81–104.
156. Liu CX, Liao YF, Li HL, Zheng SB. Cytocompatibility of silk fibroin film with rabbit urinary bladder transitional epithelial cells in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2008;28:216–8.
157. Liu CX, Lin YY, Li HL, Zheng SB. Application of silk fibroin film for repairing rabbit urethral defect. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2007;27:184–7.
158. Zou XH, Zhi YL, Chen X, Jin HM, Wang LL, Jiang YZ, et al. Mesenchymal stem cell seeded knitted silk sling for the treatment of stress urinary incontinence. *Biomaterials.* 2010;31:4872–9.
159. Ni Y, Zhao X, Zhou L, Shao Z, Yan W, Chen X, et al. Radiologic and histologic characterization of silk fibroin as scaffold coating for rabbit tracheal defect repair. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;139:256–61.
160. Zang M, Zhang Q, Davis G, Huang G, Jaffari M, Ríos CN, et al. Perichondrium directed cartilage formation in silk fibroin and chitosan blend scaffolds for tracheal transplantation. *Acta Biomater.* 2011;7:3422–31.
161. Levin B, Rajkhowa R, Redmond SL, Atlas MD. Grafts in myringoplasty utilizing a silk fibroin scaffold as a novel device. *Expert Rev Med Devices.* 2009;6:653–64.
162. Ghassemifar R, Redmond S, Chirila Z, T.V. Advancing towards a tissue-engineered tympanic membrane: Silk fibroin as a substratum for growing human eardrum keratinocytes. *J Biomater Appl.* 2010;24:591–606.
163. Levin B, Redmond SL, Rajkhowa R, Eikelboom RH, Marano RJ, Atlas MD. Preliminary results of the application of a silk fibroin scaffold to otology. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;142:S33–S5.
164. Levin B, Redmond SL, Rajkhowa R, Eikelboom RH, Atlas MD. Utilising silk fibroin membranes as scaffolds for the growth of tympanic membrane keratinocytes, and application to myringoplasty surgery. *J Laryngol Otol.* 2012.
165. Reddy N, Yang Y. Morphology and tensile properties of silk fibers produced by uncommon saturniidae. *Int J Biol Macromol.* 2010;46:419–24.

Guía práctica para el diagnóstico y tratamiento de las neumonías atípicas en la infancia.

Melissa Piedrahita-Agudelo^{1*}, Jaime Ramírez-Granada²

¹ Estudiante Internado de Medicina, Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Risaralda, Colombia.

² Profesor Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia.

Correo electrónico: melipie710@hotmail.com

Fecha de Recepción: 15/12/2014

Fecha de Solicitud de Correcciones: 09/01/2015

Fecha de Aceptación: 05/05/2015

Resumen:

Las enfermedades infecciosas del tracto respiratorio inferior son la principal causa de muerte de niños menores de 5 años en los países en vía de desarrollo. En la edad pediátrica existen diferentes agentes etiológicos que podrían comprometer la vía aérea. El conocimiento de estos agentes con sus principales manifestaciones clínicas es de vital importancia para que el personal médico pueda realizar un adecuado diagnóstico y finalmente un tratamiento específico. En el presente artículo, a partir de una búsqueda sistemática de la información sobre las neumonías, especialmente aquellas causadas por gérmenes atípicos y sumando recomendaciones dadas por los autores con base en algoritmos diagnósticos se muestran una serie de pasos que se proponen como una herramienta de acercamiento clínico y diagnóstico de estas entidades.

Palabras clave: Neumonía, Niño, Diagnóstico, Tratamiento de Urgencia, Guía.

Abstract:

Lower respiratory tract infections are the leading cause of death for children under five years old in developing countries. In the pediatric age there are several etiologic agents that could compromise the lower respiratory tract. Know about these agents and their CLÍNICAL manifestations it is essential for medical staff can make a proper diagnosis and finally specific treatment. In this article, based on a systematic search for information on pneumonias, especially those caused by atypical pathogens and adding recommendations given by the authors in diagnosis algorithms, a series of steps are displayed as a tool of CLÍNICAL approach and diagnosis of this entities.

Key words: Pneumonia, Child, Diagnosis, Emergency Treatment, Guideline.

Las guías de manejo para enfermedades infecciosas respiratorias en la infancia tienen como objetivo mostrar al personal de salud una serie de pasos sencillos para abordar a los pacientes que consultan al servicio por tos o dificultad para respirar.

La presente guía tiene como base aprovechar la metodología de Atención Integral de Enfermedades Prevalentes de la Infancia (AIEPI) y los algoritmos diagnósticos utilizados en el libro de *Bremner Pediatric Decision Making*, para que de una forma ordenada, secuencial y lógica podamos fácilmente llegar al diagnóstico presuntivo de una infección respiratoria aguda baja, tipo neumonía de características atípicas. Una vez obtenida esta presunción, utilizar todos los procedimientos diagnósticos e Iniciar una adecuada terapéutica, realizar un adecuado seguimiento y prevención de futuros contagios. A continuación se explica la metodología propuesta.

FASES DE APROXIMACIÓN DIAGNÓSTICA

Se propone dividir el proceso en tres fases, en donde cada paso es fundamental para tener una impresión diagnóstica e instaurar así un tratamiento adecuado.

- FASE CLÍNICA:** Esta fase se compone a su vez por:
 - Historia clínica completa:** En este apartado es de vital importancia seguir el orden establecido para realizar una buena anamnesis. Tomar en cuenta los datos de filiación del paciente, su motivo de consulta, enfermedad actual, antecedentes personales, familiares, historia psicosocial y revisión por sistemas.
 - Examen físico:** Tener un ambiente en donde el paciente se sienta seguro, conservar las normas de bioseguridad tanto médicas como del paciente, seguir un orden cefalocaudal, tomando como referencia los hallazgos que se pueden encontrar en cada una de las patologías en cuestión ayudarán al clínico a tener una impresión diagnóstica, que en la mayoría de los casos a este nivel ya debe estar muy consolidada.
 - Impresión diagnóstica:** Una vez terminada la anamnesis y el examen físico el siguiente paso a realizar es hacer una impresión diagnóstica sindromático, topográfico y etiológico, el siguiente paso.
 - Paraclínicos:** Las ayudas diagnósticas deben ser usadas de manera racional para usar adecuadamente los recursos del sistema. Se proponen unos paraclínicos iniciales que bien pueden ser cuadro hemático, radiografía de tórax y proteína C reactiva y se brinda información sobre los hallazgos que van a orientar para realizar los segundos paraclínicos confirmatorios.
- FASE DE DECISIÓN:** Asegurar el grado de enfermedad utilizando los criterios de severidad descritos en la estrategia AIEPI lo que permite la ubicación inicial del paciente, que puede ser en casa, nivel 1, nivel 2 o nivel 3. E iniciar un abordaje de acuerdo a las guías propuestas en AIEPI.
- FASE DE RESOLUCIÓN:** Seguimiento y criterios de remisión o salida.

NEUMONÍAS ATÍPICAS

• INTRODUCCIÓN

Las infecciones del tracto respiratorio inferior como neumonía y bronquiolitis, son la principal causa de muerte en niños en los países en vía de desarrollado. (1). Siendo la neumonía asociada a factores como desnutrición, la entidad a la que se le puede atribuir la mayoría de estos casos. (2-3). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta entidad es una de las principales causas de muerte a nivel mundial con un estimado de 1,2 millones de muertes en niños menores de 5 años. Esto representa el 18% de todas las muertes de este grupo de edad a nivel mundial. (4)