



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Medicina

Departamento de Histología

**EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES
BIOMECÁNICAS DE TEJIDOS ARTIFICIALES
ELABORADOS CON BIOPOLÍMEROS PARA SU
UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR**

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

Giuseppe Scionti

Universidad de Granada

Facultad de Medicina

2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Giuseppe Scinti
D.L.: GR 2029-2014
ISBN: 978-84-9083-219-6

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Ingeniería Tisular	7
1.2 Biomateriales.....	9
1.2.1 Tipos de Biomateriales.....	10
1.2.2 Biomateriales sintéticos.....	10
1.2.3 Biomateriales naturales.....	11
1.3 Hidrogeles en la ingeniería tisular	12
1.4 Fibrina	13
1.5 La fibrina-agarosa y sus aplicaciones en ingeniería tisular	14
1.6 La importancia de la evaluación de las propiedades biomecánicas de los biomateriales utilizados en ingeniería tisular	16
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Fabricación de los hidrogeles.....	20
3.2 Evaluación microscópica de los hidrogeles	28
3.3 Determinación de las propiedades biomecánicas de los tejidos artificiales sometidos a esfuerzos de cizalla	29
3.4 Determinación de las propiedades biomecánicas de los tejidos artificiales sometidos a esfuerzos de tracción y compresión	31
3.5 Análisis estadístico	33
4. RESULTADOS	35
4.1 Elaboración de un modelo de tejido artificial generado con biopolímeros de fibrina-agarosa	35
4.2 Evaluación de los tejidos artificiales nanoestructurados generados con biopolímeros de fibrina-agarosa mediante microscopía electrónica de barrido...39	

4.3	Determinación de propiedades biomecánicas mediante medición reológica bajo esfuerzos de cizalla	44
4.4	Determinación de propiedades biomecánicas de los tejidos artificiales mediante ensayos de tracción y compresión	49
4.4.1	Módulo de Young.....	49
4.4.2	Esfuerzo y deformación a fractura bajo tracción.....	52
4.4.3	Módulo elástico bajo compresión.....	57
4.5	Selección de los modelos de tejidos artificiales generados con biopolímeros de fibrina-agarosa nanoestructurados con propiedades biomecánicas semejantes a los tejidos nativos, para su inclusión en protocolos de ingeniería tisular	59
5.	DISCUSIÓN	63
5.1	Efecto de la hidratación.....	65
5.2	Efecto del contenido de agarosa.....	66
5.3	Efecto del tiempo de evolución en cultivo.....	69
5.4	Demostración de la anisotropía	70
5.5	Comportamiento de los hidrogeles de fibrina-agarosa bajo esfuerzos de tracción.....	71
5.6	Comportamiento de los hidrogeles de fibrina-agarosa bajo esfuerzos de compresión.....	73
5.7	Comportamiento de los hidrogeles de fibrina-agarosa bajo esfuerzos de cizalla (análisis reológico)	74
5.8	Aplicaciones potenciales de hidrogeles de fibrina-agarosa en ingeniería tisular	75
6.	CONCLUSIONES	78
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

RESUMEN

La ingeniería tisular es una ciencia que tiene como objetivo la generación de tejidos biológicos artificiales para sustituir o reparar tejidos y órganos dañados, gracias a la combinación de biomateriales, células y señales moleculares (Campos 2004).

Los hidrogeles de fibrina-agarosa con 0.1% de agarosa desarrollados por nuestro grupo de investigación, han sido utilizados con buenos resultados como biomateriales para la fabricación de varios tejidos artificiales, como córnea, mucosa oral, piel y nervio periférico (Alaminos et al. 2006; Sanchez-Quevedo et al. 2007; Garzón et al. 2013; Carriel et al. 2013). Recientemente, un método de nanoestructuración basado en la aplicación de compresión plástica ha resultado en la posibilidad de modular las propiedades biomecánicas de los geles de fibrina-agarosa (Ionescu et al. 2011).

El objetivo general de esta Tesis Doctoral consiste en analizar los efectos del contenido de agarosa, del grado de hidratación y del tiempo de evolución sobre las propiedades biomecánicas de los biomateriales de fibrina-agarosa para contribuir a su caracterización biomecánica y determinar su potencial en ingeniería tisular.

Para este trabajo de Tesis Doctoral, se elaboraron varios hidrogeles de fibrina-agarosa con diferentes contenidos de agarosa, los cuales fueron sometidos a diferentes grados de nanoestructuración. El comportamiento biomecánico de los hidrogeles obtenidos se midió mediante ensayos de resistencia a esfuerzos de tracción, compresión y cizalla.

La metodología desarrollada en esta Tesis Doctoral permitió el diseño y la elaboración de un modelo de tejido artificial nanoestructurado generado con biopolímeros de fibrina-agarosa, en el que resulta posible controlar el grado de hidratación y la concentración de agarosa. El control de ambos parámetros permite la obtención de tejidos artificiales nanoestructurados específicos en relación con la terapia tisular a utilizar.

La concentración de agarosa, en el modelo de tejido artificial diseñado, presenta una relación directa con los módulos biomecánicos bajo esfuerzos de compresión y cizalla, y una relación inversa con el módulo de resistencia a la tracción. Ello implica que el incremento de la concentración de agarosa en el biomaterial permite generar tejidos con mayor capacidad de resistencia a las fuerzas rotatorias y a las fuerzas compresivas. Por

el contrario, un tejido con mayor resistencia a las fuerzas de tracción paralelas al eje mayor del tejido puede lograrse disminuyendo la concentración de agarosa.

El grado de hidratación, en el modelo de tejido artificial diseñado, presenta una relación inversa con el conjunto de módulos biomecánicos evaluados en esta Tesis Doctoral. De este modo, la disminución del grado de hidratación en el biomaterial, permite generar tejidos con mayor resistencia tanto a las fuerzas rotatorias de cizalla, como a las fuerzas de compresión y de tracción que se ejercen en dirección perpendicular o paralela al eje mayor del tejido.

El análisis de las propiedades biomecánicas de los modelos de tejidos artificiales generados con biopolímeros de fibrina-agarosa nanoestructurados permite seleccionar formulaciones del biomaterial con propiedades biomecánicas semejantes a los tejidos humanos. La formulación del biomaterial a seleccionar, deberá estar en relación con las propiedades biomecánicas del tejido artificial a generar.

ABSTRACT

The aim of tissue engineering is to generate bioartificial tissues to restore or replace damaged native tissues or organs, with the use of a combination of biomaterials, cells and molecular signals (Campos 2004).

Fibrin-agarose hydrogels with 0.1% of agarose, developed by our research group, have been used with good results for the fabrication of several artificial tissues, including cornea, oral mucosa, skin and peripheral nerves. (Alaminos et al. 2006; Sanchez-Quevedo et al. 2007; Garzón et al. 2013; Carriel et al. 2013). Recently, a nanostructuring method based on the application of plastic compression proved to be an efficient way to modulate the biomechanical properties of fibrin-agarose hydrogels (Ionescu et al. 2011).

The general aim of this doctoral thesis is to evaluate the effects of agarose concentration, hydration grade and development time on the mechanical properties of fibrin-agarose biomaterials, to achieve their complete biomechanical characterization and to study their potential for tissue engineering applications.

Several fibrin-agarose hydrogels with different agarose concentrations were generated and subjected to different grades of nanostructuring. The biomechanical behavior of the hydrogels was evaluated under tensile, compression and shear stresses.

The methods developed in this doctoral thesis permitted to design and generate an accurate nanostructured fibrin-agarose tissue-like model, with defined hydration grade and agarose concentration. The ability to control both parameters allows the production of different nanostructured artificial tissues, which can be specifically designed depending on the tissue-engineering application needed.

The biomechanical tests show a direct relationship between the agarose concentration and the biomechanical moduli under compression and shear stresses, and an inverse relationship under tensile stresses. Thus, increasing the agarose concentration allows the generation of artificial tissues with higher resistance to rotational and compressive forces. On the other hand, it is possible to achieve an artificial tissue with better response to tensile stresses by reducing the agarose concentration.

The results show an inverse relationship between the hydration grade and all the biomechanical moduli evaluated in this doctoral thesis. Thus, decreasing the hydration grade can improve the resistance of the biomaterials to tensile, compression and shear stresses.

The evaluation of the biomechanical properties of the nanostructured fibrin-agarose tissue-like models permits to select formulations of the biomaterial with similar properties to human native tissues. The specific formulation of the biomaterial will depend on the biomechanical properties of the artificial tissue to generate.

El doctorando **GIUSEPPE SCIONTI** y los directores de la tesis **ANTONIO CAMPOS MUÑOZ** y **MIGUEL ALAMINOS MINGORANCE** Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 15 de Mayo de 2014

Directores de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ingeniería Tisular

Cada año, millones de personas sufren pérdidas de función de órganos y tejidos por diversas causas. Una estrategia novedosa para tratar estos pacientes es el uso de tejidos generados mediante técnicas de ingeniería tisular, una ciencia que permite la producción de tejidos biológicos artificiales para sustituir o reparar tejidos y órganos dañados, gracias a la combinación de biomateriales, células y señales moleculares (Figura 1) (Langer & Vacanti 1993; Campos 2004).

Ya en los años 1970-1980, los pioneros de la ingeniería tisular empezaron a investigar sobre la construcción de tejidos y órganos artificiales para trasplantarlos en pacientes. Aunque diseñar sustitutos biológicos para uso clínico sigue siendo el objetivo principal de la ingeniería tisular, la investigación en este campo se está centrando también en crear tejidos que puedan ser utilizados en laboratorio como modelos de patologías humanas y para probar nuevos potenciales fármacos. El interés en la ingeniería tisular ha crecido exponencialmente en la última década debido a grandes progresos recientes en cinco diferentes temas claves de la investigación en este campo: (1) el cultivo de nuevas fuentes celulares, incluidas las células madre pluripotentes inducidas (Diekman et al. 2012; Garzón et al. 2013), (2) la construcción de nuevos biomateriales, cada vez más complejos y avanzados como los tejidos descellularizados (Gonzalez-Andrades et al. 2011; Gonfiotti et al. 2014), (3) la mejor capacidad de controlar el fenotipo celular, utilizando factores de crecimiento y señales moleculares (Marklein & Burdick 2010; Kim et al. 2011), (4) el continuo desarrollo de novedosas técnicas de caracterización en laboratorio (Al et al. 2014) y (5) la aprobación y el seguimiento de ensayos clínicos en los diferentes campos de la ingeniería tisular (Jaklenec et al. 2012; Fisher & Mauck 2013).

La aplicación de novedosas técnicas de impresión 3D a la ingeniería tisular, y los avances en la formación de vasos sanguíneos inducidos en el interior de los biomateriales, son ejemplos de retos futuros que podrían dar un gran impulso al desarrollo de la ingeniería tisular (Miller et al. 2012; Villar et al. 2013).

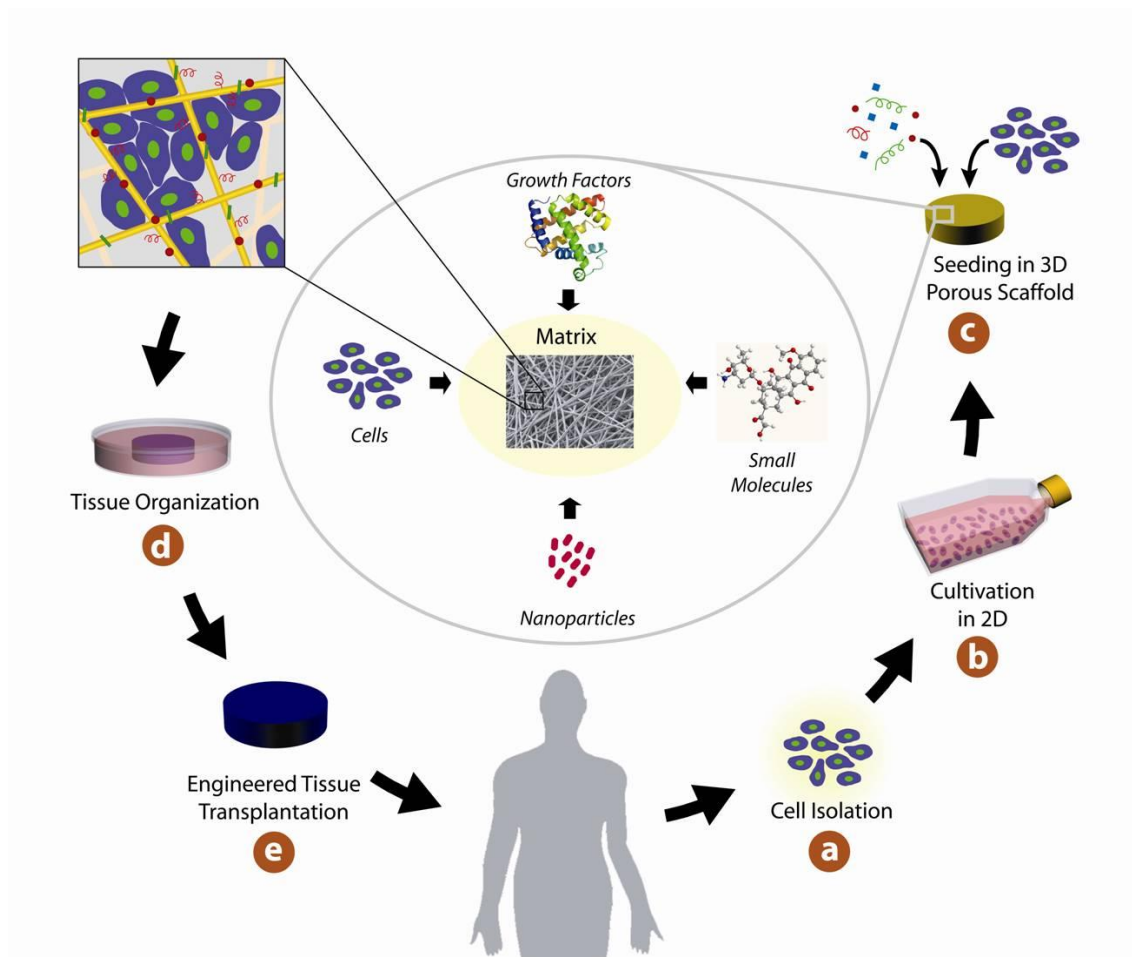


Figura 1: Esquema que representa el concepto general de ingeniería tisular (Dvir et al. 2011).

- (a) Las células del paciente son aisladas y cultivadas.
- (b) Las células se cultivan in vitro sobre superficies 2D para una expansión eficiente.
- (c) Las células se incorporan a un biomaterial, junto con factores de crecimiento, biomoléculas y micro- / nano- partículas.
- (d) Los biomateriales con las células pueden ser cultivados en incubadores y biorreactores para aportar las condiciones óptimas para que el biomaterial adquiera las propiedades de un tejido funcional.
- (e) El tejido artificial se trasplanta al paciente para reparar o sustituir el tejido dañado.

1.2 Biomateriales

Los biomateriales son un componente fundamental para la construcción de sustitutos biológicos por ingeniería tisular, ya que su función es la de ser un soporte estructural para el conjunto de células, factores de crecimiento, y señales moleculares.

Los biomateriales se definieron en 1987 como “materiales inorgánicos u orgánicos utilizados en productos sanitarios, destinados a interactuar con los sistemas biológicos” (Williams 1987).

Los biomateriales, al tener que interactuar con los sistemas biológicos, tienen que poseer unas propiedades fundamentales, entre las cuales, las principales son (Dee et al. 2003):

- 1- Ser biocompatibles.
- 2- No ser tóxicos.
- 3- Ser estables químicamente.
- 4- Poseer adecuadas propiedades físicas (biomecánicas, ópticas, de superficie).
- 5- Poseer una morfología adecuada para interactuar con las células.
- 6- Poseer un diseño que imite el tejido nativo a reparar.
- 7- Estar sujeto a un proceso de degradación controlada.

1.2.1 Tipos de Biomateriales

Los biomateriales se diferencian en sintéticos, naturales y biosintéticos (una mezcla de los dos). Generalmente, los biomateriales sintéticos son más fáciles de diseñar y fabricar en laboratorio, mientras los biomateriales naturales se caracterizan por una mejor biocompatibilidad.

1.2.2 Biomateriales sintéticos

Los biomateriales sintéticos utilizados para implantes pueden ser metales, cerámicas, polímeros o compuestos de estos tipos, según la función del órgano que se quiera restaurar (Figura 2). En general, los biomateriales metálicos y cerámicos poseen propiedades mecánicas adecuadas para reemplazar tejidos duros, mientras que los biomateriales poliméricos se pueden utilizar para sustituir una gran variedad de tejidos, gracias a la posibilidad de modular fácilmente sus propiedades físicas (Ratner et al. 2004).

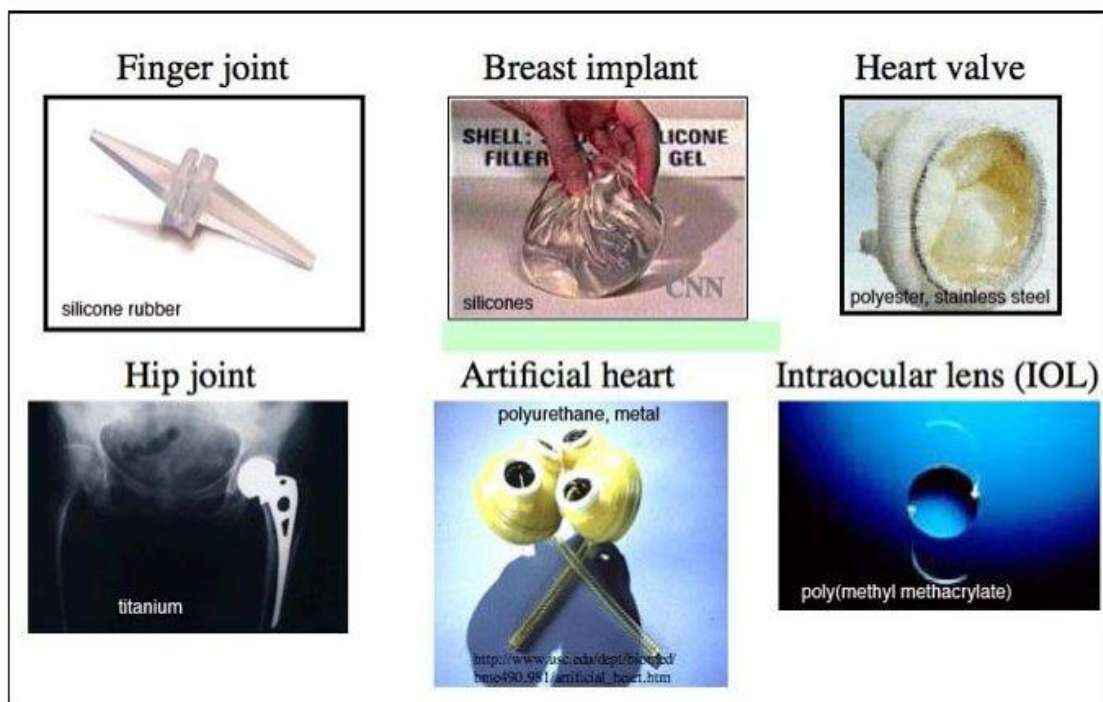


Figura 2: Ejemplos de algunos dispositivos médicos compuestos de biomateriales sintéticos (Ratner et al. 2012).

1.2.3 Biomateriales naturales

La mayoría de los biomateriales naturales son de naturaleza polimérica. Los polímeros naturales han sido utilizados con mucho éxito en la ingeniería tisular, porque poseen varias propiedades similares a las de la matriz extracelular nativa. Estos materiales están caracterizados por unas estructuras únicas y complejas y tienen varias funciones fisiológicas en los organismos donde se encuentran. Los polímeros naturales pueden servir para diferentes aplicaciones en el campo de la ingeniería tisular debido a: 1) sus propiedades biomecánicas viscoelásticas; 2) su capacidad de gelificación y de retención de agua; 3) la posibilidad de ser degradados por enzimas biológicos, lo que permite que estos biomateriales sean metabolizados más fácilmente por el organismo humano a través de mecanismos fisiológicos (Van Blitterswijk et al. 2008; Patterson et al. 2010).

Los polímeros naturales se pueden obtener de plantas, animales, algas o pueden ser sintetizados por microorganismos. Los biopolímeros más utilizados en ingeniería tisular son los hidrogeles, que se dividen en los polisacáridos y las proteínas. Entre los polisacáridos, destacan el quitosano, el alginato, la celulosa, la agarosa y el ácido hialurónico, mientras que las proteínas más comúnmente utilizadas en ingeniería tisular son el colágeno, la fibrina y la elastina (Van Blitterswijk et al. 2008).

1.3 Hidrogeles en la ingeniería tisular

Los hidrogeles son materiales poliméricos constituidos por cadenas hidrófilas, en los que el agua es el medio de dispersión. Estos materiales pueden ser diseñados para obtener propiedades mecánicas definidas. Además, muchos hidrogeles son biocompatibles, lo que hace posible su uso en una variedad de aplicaciones biomédicas (Drury & Mooney 2003; Slaughter et al. 2009).

Algunos hidrogeles poseen una microestructura fibrilar similar a la de la matriz extracelular de los tejidos naturales blandos, y en los últimos años ha crecido el interés en estos biomateriales como andamios para aplicaciones de ingeniería tisular (Lee & Mooney 2001; Drury & Mooney 2003; Shin et al. 2003).

Desafortunadamente, la mayoría de los hidrogeles son mucho más débiles que los tejidos nativos desde un punto de vista mecánico, lo que limita su uso práctico en ingeniería tisular (Orwin et al. 2003).

Las limitaciones mecánicas de estos hidrogeles se deben a varias razones, entre las que destacan la alineación aleatoria de las fibras de estos materiales y el alto contenido de agua en su estructura polimérica (Ahearne et al. 2008).

1.4 Fibrina

Uno de los polímeros naturales más utilizados es la fibrina, una proteína biodegradable que participa en el proceso natural de reparación de los tejidos nativos después de una lesión. La fibrina forma largas cadenas fibrilares muy flexibles que poseen gran resistencia mecánica (Mosesson et al. 2001). Además, la fibrina puede formar grandes estructuras tridimensionales mediante conexión de diferentes fibrillas de fibrina entre sí (Figura 3). Esta organización hace que las estructuras de fibrina esten entre las más resistentes dentro del mundo de la proteínas (Mosesson 2005). Las características naturales de la fibrina le confieren un gran potencial para varias aplicaciones en ingeniería tisular. La fibrina, sola o en combinación con otros materiales, ha sido utilizada como andamio biológico para la regeneración de tejido adiposo, óseo, cardíaco, cartilaginoso, nervioso, ocular y para la fabricación de sustitutos de piel, mucosa oral, tendones y ligamentos (Alaminos et al. 2006; Sanchez-Quevedo et al. 2007; Ahmed et al. 2008; Garzón et al. 2013; Carriel et al. 2013). Las aplicaciones de la fibrina en ingeniería tisular se centran en tres áreas principales: aplicaciones de ingeniería tisular utilizando matrices de fibrina sola, aplicaciones en las que se utilizan andamios de fibrina en combinación con otras matrices poliméricas y sistemas a base de fibrina para la liberación controlada de factores de crecimiento y fármacos (Fisher 2007).

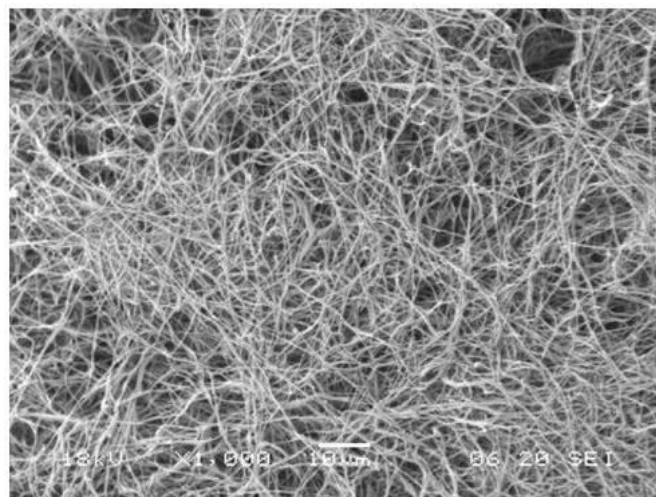


Figura 3: Imagen de microscopía electrónica de barrido de un gel de fibrina (Lisi et al. 2012).

1.5 La fibrina-agarosa y sus aplicaciones en ingeniería tisular

Aunque la fibrina posee muy buenas propiedades de biocompatibilidad, es necesario desarrollar nuevos métodos y técnicas para mejorar las propiedades mecánicas de los hidrogeles de fibrina. En este sentido, nuestro grupo de investigación describió la combinación de la fibrina con agarosa como un método sencillo y eficaz para mejorar las propiedades mecánicas de los hidrogeles de fibrina en ingeniería tisular (Alaminos et al. 2006; Ionescu et al. 2011).

La agarosa es un polisacárido extraído de algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*, que forma geles biocompatibles y térmicamente reversibles (Stellwagen & Stellwagen 1995). La agarosa ha demostrado ser un biomaterial interesante para varias aplicaciones de ingeniería tisular, incluyendo la ingeniería tisular de tejidos nerviosos y cartilaginoso (Mauck et al. 2006; Nisbet et al. 2008).

Los biomateriales de fibrina-agarosa permiten generar hidrogeles mezclando plasma humano y agarosa tipo VII al 0.1% con ácido tranexámico como agente antifibrinolítico y cloruro de calcio como activador de la reacción de polimerización de la fibrina. Las ventajas de este biomaterial son el bajo coste de producción y sus propiedades de elevada biocompatibilidad y biodegradabilidad.

Recientemente, un método de nanoestructuración basado en la aplicación de técnicas de compresión plástica (Abou Neel et al. 2006; Hadjipanayi et al. 2011), ha resultado en la posibilidad de modular las propiedades biomecánicas de los geles de fibrina-agarosa (FA) (Ionescu et al. 2011), permitiendo la fabricación de tejidos artificiales aptos para uso clínico.

Hasta el momento, los geles de fibrina-agarosa 0.1% desarrollados por nuestro grupo de investigación han sido utilizados con buenos resultados para la fabricación de varios tejidos artificiales, como córnea, piel, mucosa oral y nervio periférico (Figura 4) (Alaminos et al. 2006; Sanchez-Quevedo et al. 2007; Garzón et al. 2013; Carriel et al. 2013; Carriel et al. 2014). Sin embargo, aún no se ha realizado ningún estudio exhaustivo que permita correlacionar las principales propiedades biomecánicas de estos biomateriales con la concentración de agarosa, el grado de hidratación y el tiempo de incubación en laboratorio.

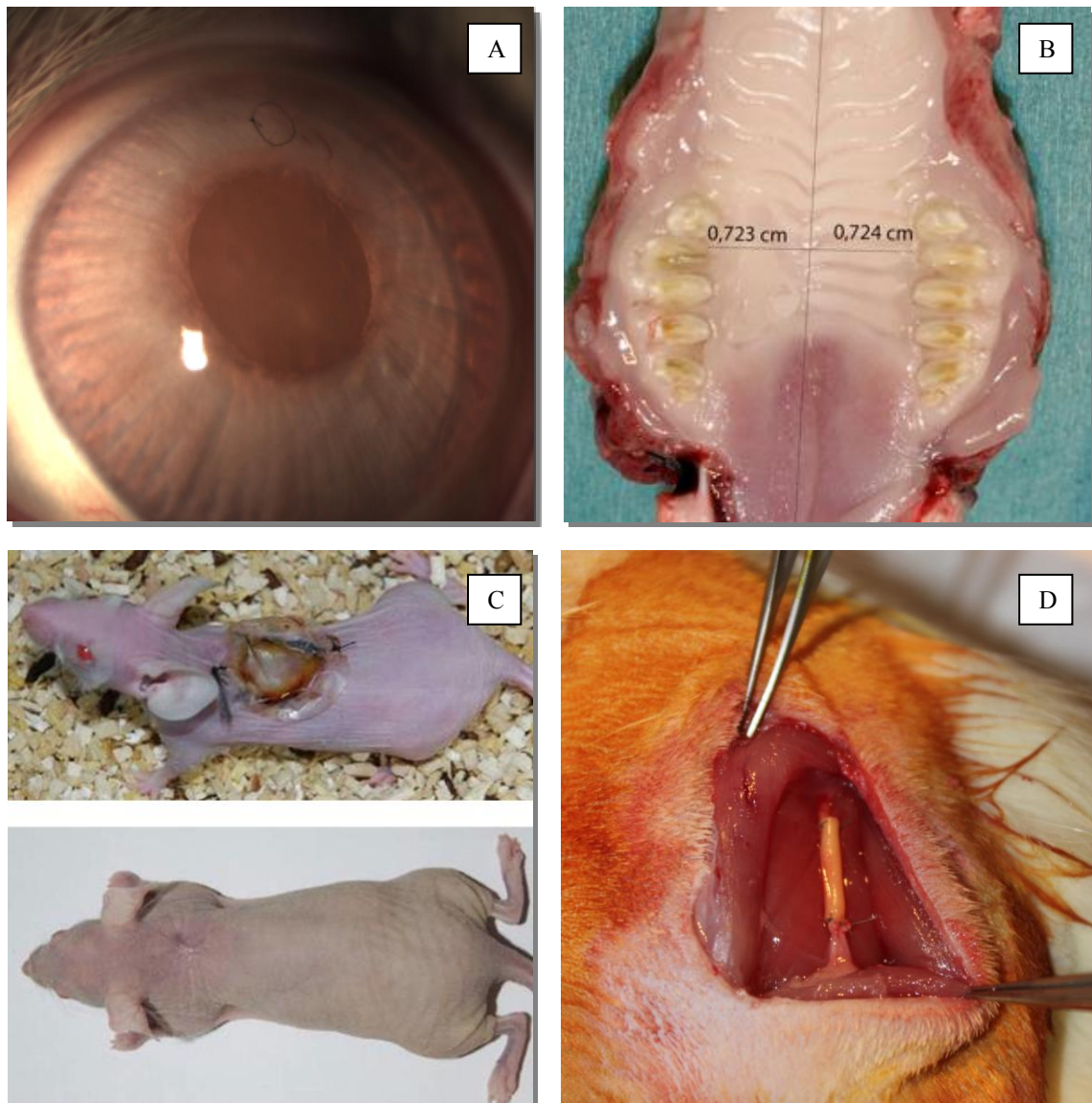


Figura 4: (A) Córnea artificial implantada en conejo, (B) mucosa oral artificial implantada en conejo, (C) piel artificial implantada en ratón atímico y (D) nervio periférico artificial implantado en rata.

1.6 La importancia de la evaluación de las propiedades biomecánicas de los biomateriales utilizados en ingeniería tisular

La evaluación de las propiedades mecánicas de los biomateriales utilizados en ingeniería tisular es un proceso necesario para el desarrollo de nuevos implantes, para garantizar que éstos puedan imitar y restaurar las funciones de los órganos y tejidos nativos que tienen que ser reemplazados (Ratner et al. 2004). En el caso de los hidrogeles, la evaluación biomecánica de estos biomateriales es especialmente importante, ya que la principal limitación del uso de hidrogeles en ingeniería tisular estriba en sus limitaciones desde el punto de vista biomecánico (Slaughter et al. 2009). Ello se debe a que los biomateriales, para que sirvan como remplazo funcional para un órgano o un tejido dañado, deben poseer cierta resistencia a los esfuerzos a los cuales se encuentran sometidos después del implante. El análisis del comportamiento biomecánico de los hidrogeles utilizados en ingeniería tisular se basa en la utilización de técnicas para evaluar su resistencia a diferentes tipos de esfuerzos impuestos desde el exterior. Las técnicas convencionales para evaluar la funcionalidad biomecánica de los hidrogeles incluyen ensayos de resistencia a esfuerzos de tracción, compresión y rotación o cizalla (Figura 5).

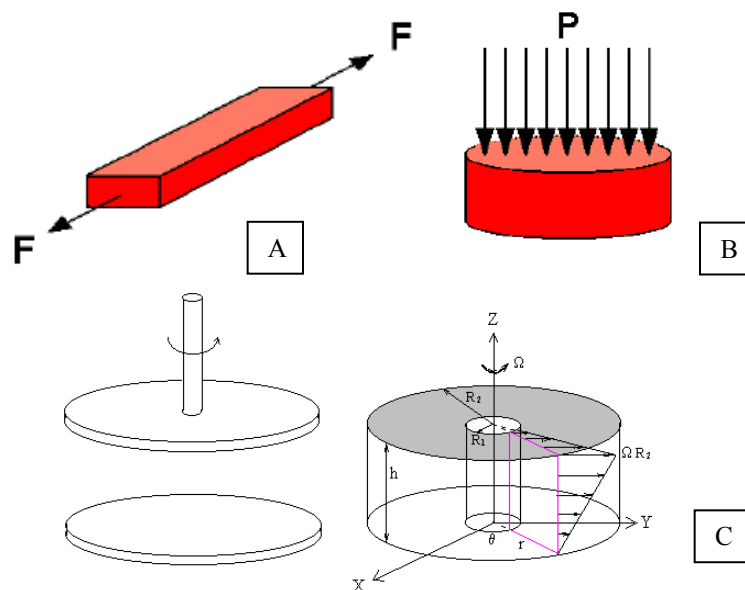


Figura 5: Representación esquemática de las técnicas de análisis biomecánico de: (a) tracción, (b) compresión y (c) rotación o cizalla (Ahearne et al. 2008).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral consiste en analizar los efectos del contenido de agarosa, del grado de hidratación y del tiempo sobre las propiedades biomecánicas de los biomateriales de fibrina-agarosa para contribuir a su caracterización biomecánica y determinar su potencial en ingeniería tisular.

En la presente Tesis Doctoral se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- 1. Elaborar un modelo de tejido artificial nanoestructurado con biopolímeros de fibrina-agarosa.**
- 2. Determinar los efectos de la concentración de agarosa sobre las propiedades biomecánicas del modelo de tejido artificial generado con biopolímeros de fibrina-agarosa nanoestructurados.**
- 3. Determinar los efectos de la hidratación sobre las propiedades biomecánicas del modelo de tejido artificial generado con biopolímeros de fibrina-agarosa nanoestructurados.**
- 4. Seleccionar los modelos de tejidos artificiales generados con biopolímeros de fibrina-agarosa nanoestructurados con propiedades biomecánicas semejantes a los tejidos nativos, para su inclusión en protocolos de ingeniería tisular.**

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo de Tesis Doctoral, se elaboraron varios hidrogeles de fibrina-agarosa con diferentes contenidos de agarosa, los cuales fueron sometidos a diferentes grados de nanoestructuración. El comportamiento biomecánico de los hidrogeles obtenidos se determinó mediante ensayos de resistencia a esfuerzos de tracción, compresión y cizalla.

3.1 Fabricación de los hidrogeles

Para la producción de los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa, primer objetivo de esta Tesis Doctoral, se utilizó una mezcla de fibrina humana y agarosa. Para este fin, se adaptó el método descrito en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Alaminos et al. 2006). Para producir un gel de fibrina, se mezclaron 3.8 ml de plasma humano procedente de donantes de sangre (proporcionado por el Doctor Fernández-Montoya, del Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada y Almería) y 75 μ l de ácido tranexámico (Amchafibrin®) en un tubo estéril. El ácido tranexámico es un agente anti-fibrinolítico que evita la degradación de los hidrogeles basados en fibrina. Después, se añadieron 0.25 ml de CaCl_2 al 2% a la solución, para activar el proceso de polimerización de la fibrina. Finalmente, se añadió una cantidad dada de agarosa tipo VII prediluida en PBS (0.02 g/ml de concentración) hasta alcanzar concentraciones finales de agarosa de 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, y 0.5%, y el volumen final se ajustó a 5 ml con medio de cultivo DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) (Figura 6, 7). Finalmente, la mezcla se alicuotó en placas de Petri y se mantuvo en incubadoras a 37 °C hasta la gelificación completa. Como control, se utilizó un gel que consistía sólo en agarosa tipo VII diluida en PBS (0.02 g/ml de concentración). Nos referiremos a este gel como gel de agarosa control.

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOMECÁNICAS DE TEJIDOS ARTIFICIALES
ELABORADOS CON BIOPOLÍMEROS PARA SU UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

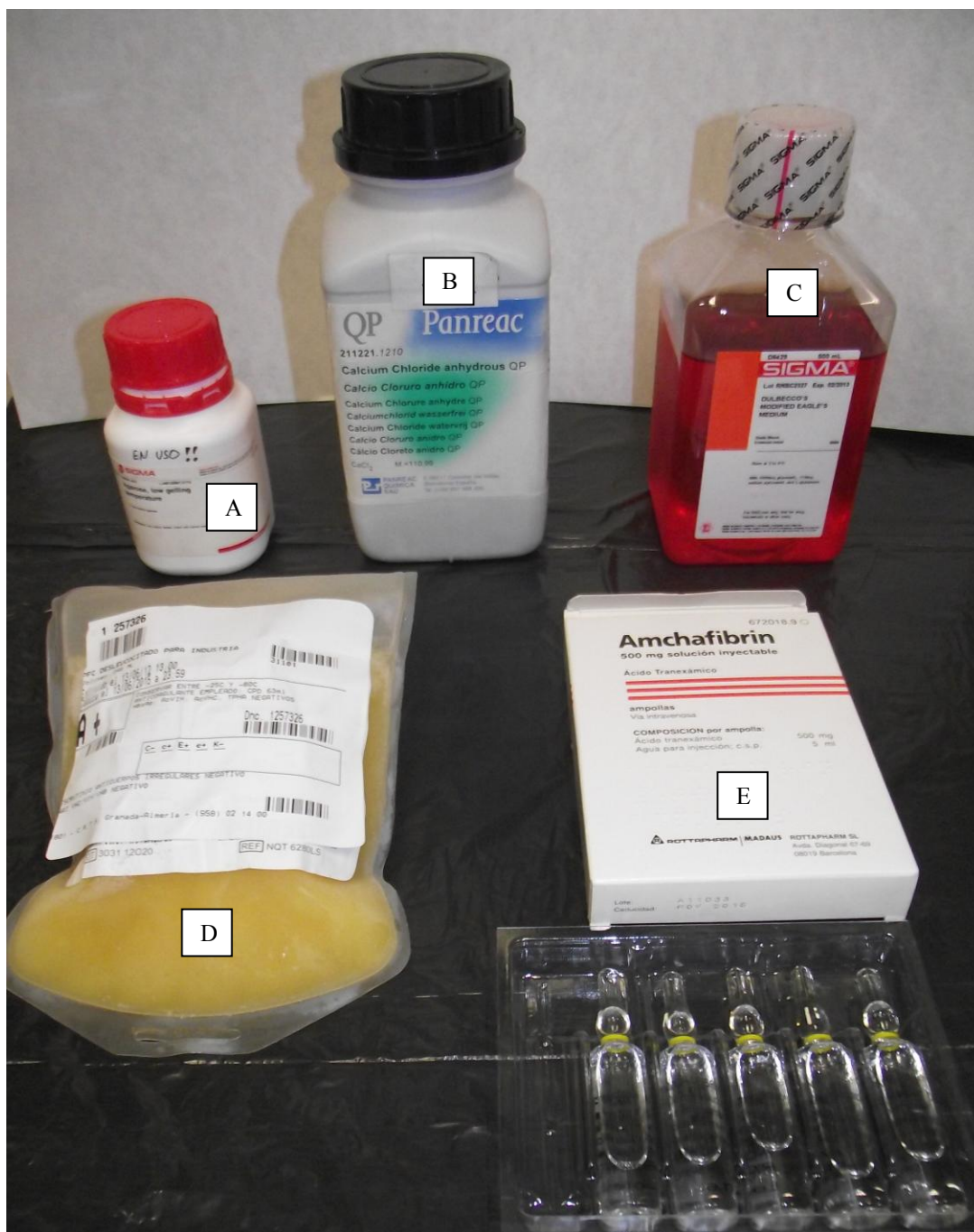


Figura 6: Materiales utilizados para producir los constructos de fibrina agarosa: (a) agarosa tipo VII, (b) cloruro de calcio, (c) medio de cultivo DMEM, (d) plasma humano y (e) ácido tranexámico.

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOMECÁNICAS DE TEJIDOS ARTIFICIALES
ELABORADOS CON BIOPOLÍMEROS PARA SU UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

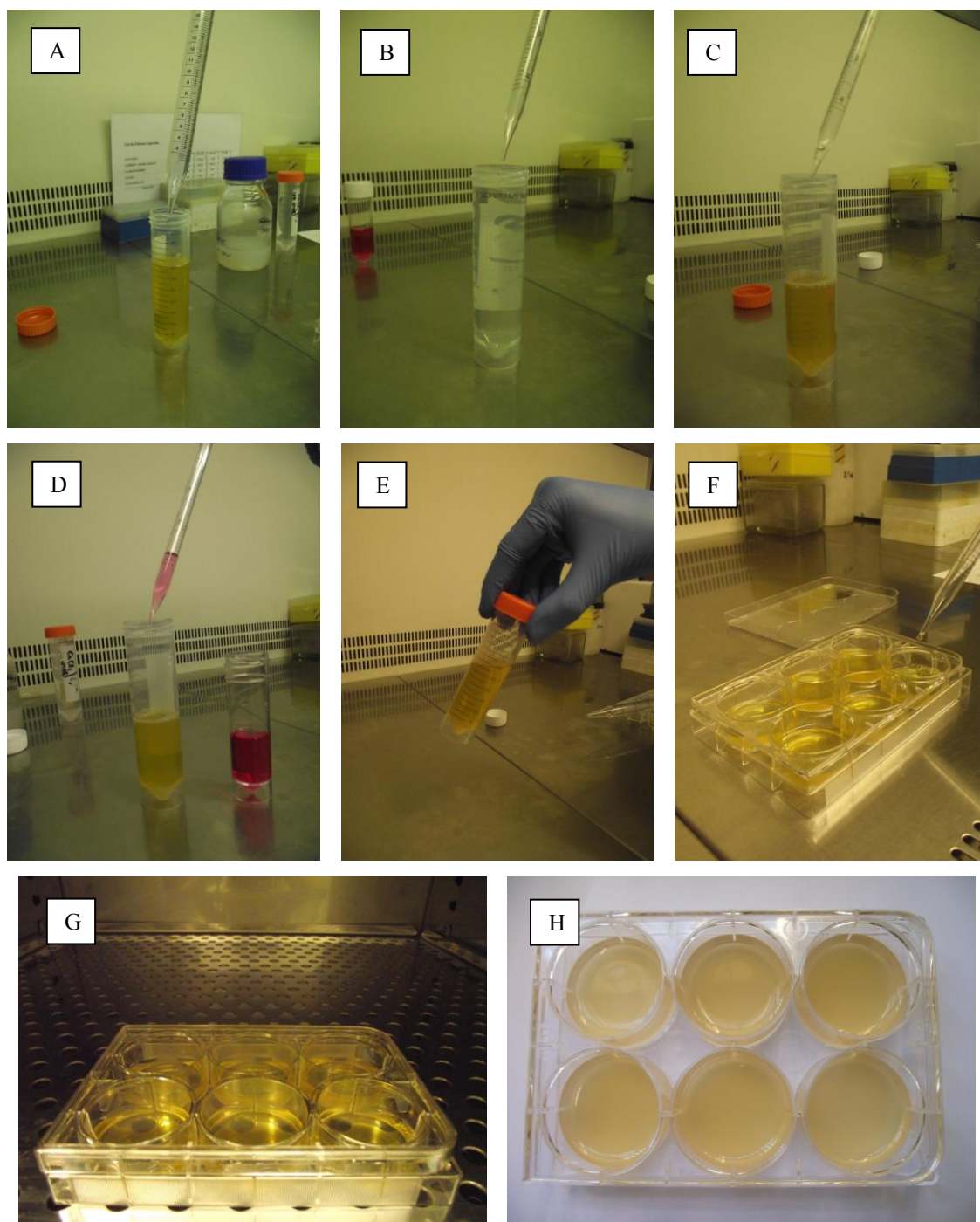


Figura 7: Ilustración de los pasos principales para la fabricación de biomateriales de fibrina-agarosa: (a) se prepara un tubo con plasma humano y ácido tranexámico, (b) se añade cloruro de calcio para activar la coagulación, (c) se añade una cantidad variable de agarosa, dependiendo del biomaterial a que producir, (d) se añade una cantidad definida de medio de cultivo DMEM, (f) se vierte la solución en placas de Petri y (g) se ponen las placas en una incubadora. La imagen (h) representa la forma final de los biomateriales fabricados.

Una vez generados, parte de los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa fueron sometidos a compresión plástica (nanoestructuración) de diferente presión para deshidratar parcialmente los geles y obtener constructos con diferentes niveles de hidratación, tal como se especificará más adelante. Para ello, se colocaron las muestras entre un par de membranas de filtro de nylon con un tamaño de poro de $0.22\ \mu\text{m}$, y se comprimieron entre un par de papeles absorbentes estériles Whatman de 3 mm de espesor, bajo una superficie plana de vidrio durante un tiempo determinado (Figura 8). Para determinar el espesor de las muestras, se utilizó un microscopio óptico Nikon E90i. Para ello, se colocó cada muestra en un portaobjetos, se enfocaron las superficies de la muestra y del portaobjetos, y se determinó la diferencia en el enfoque del eje Z entre las dos posiciones.

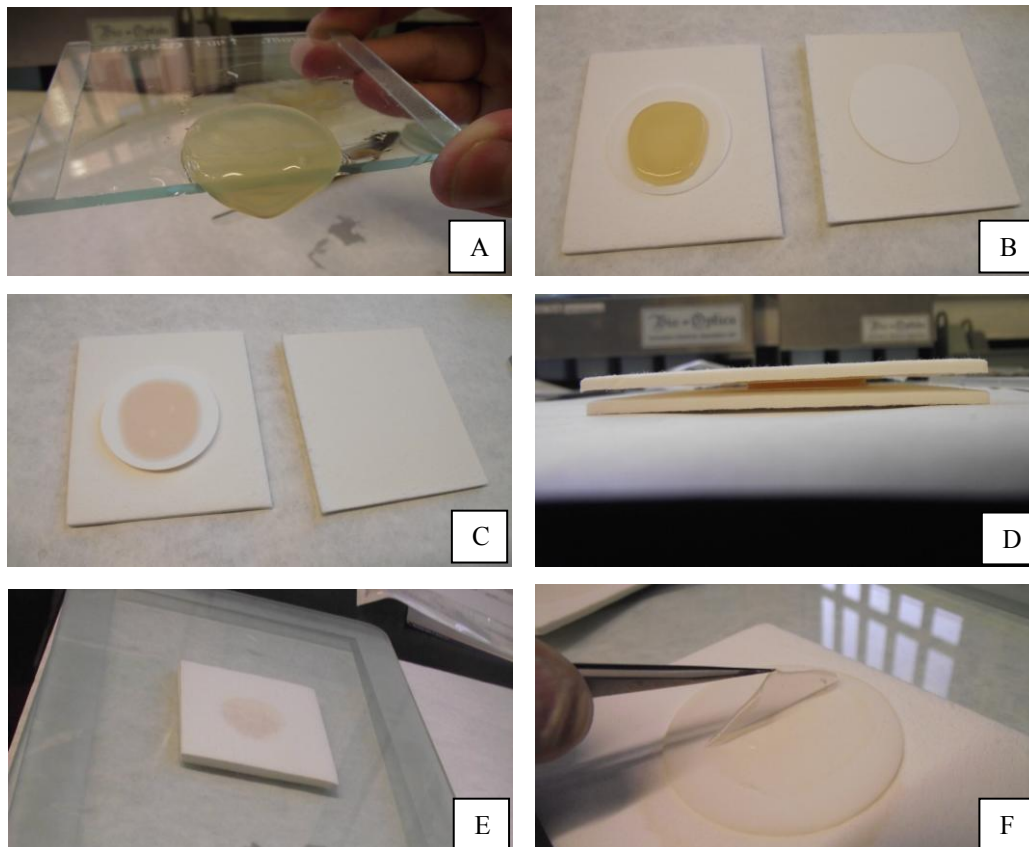


Figura 8: Ilustración de los pasos principales del proceso de nanoestructuración de los biomateriales. (a) El material no nanoestructurado posee baja consistencia física. (b, c, d) El constructo se coloca en un sistema de membranas de nylon y papel absorbente, y (e) es sometido a compresión plástica bajo una superficie de vidrio. De esta manera se obtiene un biomaterial más rígido y elástico (f).

Todos los hidrogeles preparados tenían una forma similar a un disco, y la dirección de nanoestructuración coincidió con el eje principal de la muestra en forma de disco. Finalmente, algunas muestras fueron recortadas para dotarles de una morfología concreta antes de proceder a los análisis biomecánicos. (Figura 9).

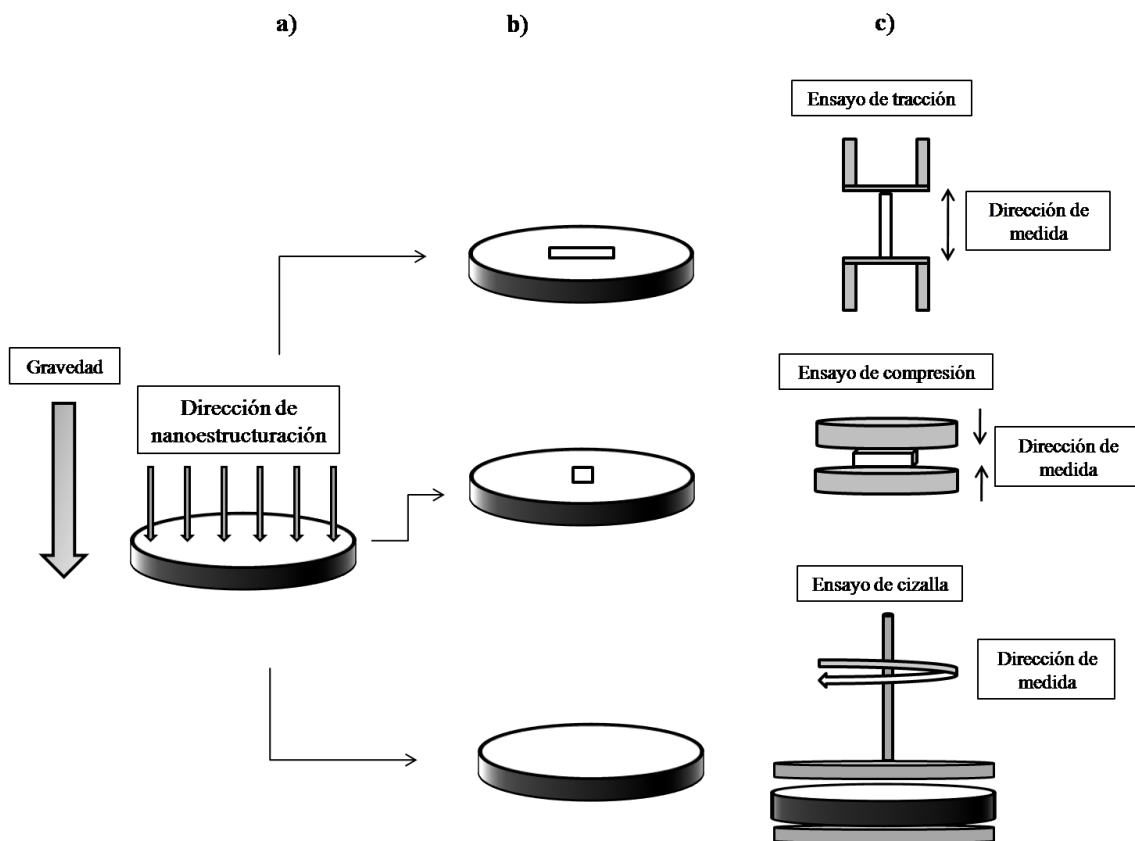


Figura 9. Representación esquemática de la evaluación biomecánica realizada en esta Tesis Doctoral. (a) Representación de la dirección de nanoestructuración con respecto a la forma de la muestra. (b) Para los ensayos de tracción y compresión, algunas muestras fueron recortadas, mientras que para los ensayos de cizalla fueron utilizadas en su totalidad. (c) Orientación de las muestras con respecto a la dirección de medida, en los diferentes ensayos.

1. Hidrogeles de fibrina-agarosa sometidos a un proceso de nanoestructuración con concentraciones crecientes de agarosa

Para llevar a cabo el segundo objetivo de esta Tesis Doctoral se generaron hidrogeles con distintas concentraciones de agarosa, utilizándose un protocolo de nanoestructuración similar en todos los casos. En concreto, se aplicó a todos los hidrogeles una presión mecánica uniforme de 5100 Pa durante 3 minutos. El valor 5100 Pa es el valor de presión que corresponde a la aplicación de un peso de 500 gramos al área transversal de un constructo que tiene un diámetro de 3.5 cm.

Se fabricaron hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa con diferentes concentraciones de agarosa (0 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 %), y se calculó el contenido de agua en cada una de las 6 formulaciones del biomaterial, que resultó ser igual a 80,5%, 84,5%, 87,7%, 92,8%, 94,75% y 96,9% respectivamente.

Para cada una de las 6 formulaciones, se generaron 11 muestras, ensayándose cuatro de ellas bajo fuerzas de tracción, cuatro bajo fuerzas de compresión y tres bajo fuerzas de cizalla. Para evaluar el efecto del tiempo de cultivo sobre las propiedades biomecánicas de los hidrogeles de fibrina-agarosa, los hidrogeles se analizaron a los días 0, 7, 14, 21 y 28. Las muestras se mantuvieron en incubador a 37°C hasta el día de la medición, y fueron nanoestructuradas el mismo día del ensayo. En total, se han producido y evaluado 70 hidrogeles para el segundo objetivo de este estudio.

2. Hidrogeles de fibrina-agarosa sometidos a un proceso de nanoestructuración con niveles crecientes de hidratación

Para el tercer objetivo de esta Tesis Doctoral, se generaron hidrogeles de fibrina-agarosa que fueron nanoestructurados utilizando diferentes protocolos en cada caso. Para ello, se aplicó una presión mecánica uniforme hasta que los hidrogeles alcanzaron el peso correspondiente al porcentaje de contenido de agua deseado (80 ó 90%). Mediante la aplicación de estos métodos, se obtuvieron 3 grupos de biomateriales, con distinto grado de hidratación: (1) hidrogeles totalmente hidratados con un contenido de agua aproximado del 99.5%, (2) hidrogeles nanoestructurados con una concentración de agua del 90%, y (3) hidrogeles nanoestructurados con un 80% de contenido de agua.

La combinación de los dos parámetros (contenido de agarosa y grado de hidratación) dio lugar a la producción de 18 formulaciones diferentes de hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa. Para cada una de las 18 formulaciones, se generaron 11 muestras ensayándose cuatro de ellas bajo fuerzas de tracción, cuatro bajo fuerzas de compresión, y tres bajo fuerzas de cizalla. En total, se han fabricado y analizado 198 hidrogeles para el tercer objetivo de esta Tesis Doctoral.

3. Hidrogeles de fibrina-agarosa para estudios de anisotropía

Para investigar la anisotropía del biomaterial, se seleccionó un modelo de hidrogel de fibrina-agarosa con un 90% de hidratación y un 0.5% de agarosa, con dos modalidades morfológicas:

- 1- Muestras de geometría a – Hidrogeles de eje mayor paralelo al eje horizontal (similares a los anteriormente descritos).
- 2- Muestras de geometría b – Hidrogeles de eje mayor perpendicular al eje horizontal.

La generación de ambos tipos de hidrogeles permitió realizar un estudio comparado aplicando fuerzas de tracción sobre las muestras de eje mayor horizontal y vertical.

Para demostrar la anisotropía, se hicieron ensayos de tracción aplicando la fuerza de extensión de dos maneras diferentes: 1) en el mismo plano espacial de la presión aplicada durante el proceso de nanoestructuración, y 2) en la dirección perpendicular a la fuerza de nanoestructuración. La Figura 10 muestra las diferentes direcciones de nanoestructuración y de medición.

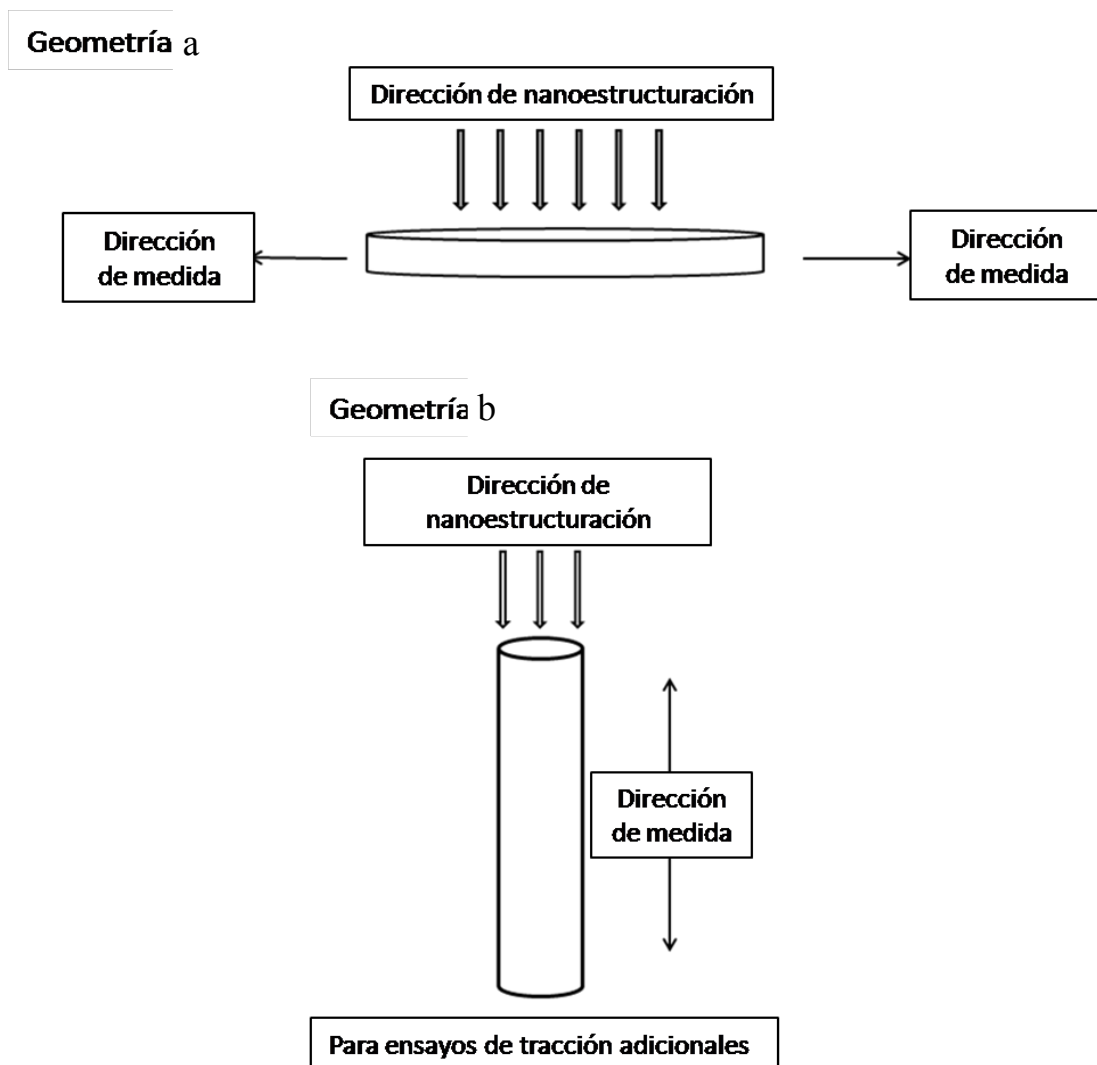


Figura 10: Diferentes formas de fabricar los biomateriales: en la geometría a) la dirección de nanoestructuración es perpendicular a la dirección de medición; en la geometría b) la dirección de nanoestructuración coincide con la dirección de medición.

3.2 Evaluación microscópica de los hidrogeles

A) Microscopía óptica. Para analizar histológicamente los tejidos artificiales generados en esta Tesis Doctoral, los hidrogeles se fijaron en solución de formalina al 10% en PBS 0.1M durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, se deshidrataron y se incluyeron en parafina utilizando un programa automático. A continuación, los bloques de parafina se cortaron en secciones de un grosor de 5 micrómetros con un micrótopo, y se tiñeron con eosina.

B) Microscopía electrónica de barrido. Para caracterizar la estructura de los hidrogeles a nivel microscópico, se utilizaron técnicas de microscopía electrónica de barrido. Para ello, los hidrogeles se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato durante 8 horas a 4°C. A continuación, se lavaron dos veces en tampón cacodilato a 4°C y se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona (30, 50, 70, 95 y 100%). Para deshidratar completamente las muestras, se utilizó el método del punto crítico (Fernández-Segura et al. 1999). Utilizando este método, la acetona contenida en las muestras es sustituida por CO₂ líquido a bajas temperaturas. Aumentando progresivamente la temperatura, el CO₂ se evapora, dejando la muestra deshidratada por completo. Por último, las muestras fueron recubiertas con oro/paladio, y visualizadas con un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 utilizando un voltaje de aceleración de 15KV en modo de alto vacío (Figura 11).



Figura 11: Microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 utilizado para el análisis morfológico de los biomateriales generados en esta Tesis Doctoral.

3.3 Determinación de las propiedades biomecánicas de los tejidos artificiales sometidos a esfuerzos de cizalla

Para evaluar las propiedades biomecánicas de los hidrogeles bajo esfuerzo de corte o cizalla se utilizó un reómetro Haake Mars III (Figura 12). La geometría de medición consistía en un par de platos paralelos con superficies rugosas, con el fin de evitar el deslizamiento entre las muestras y los platos. Al principio de cada medida, se ajustó la distancia entre los platos según el espesor de cada muestra. Todas las mediciones de reología se llevaron a cabo a 37.0 ± 0.1 °C en una atmósfera saturada de vapor de agua. Se analizaron las muestras en régimen de esfuerzo de corte de estado dinámico (oscilatorio).



Figura 12: Reómetro Haake Mars III utilizado para las mediciones reológicas de este trabajo de Tesis Doctoral.

Para las mediciones en estado dinámico, las muestras se sometieron a un esfuerzo de corte sinusoidal dado por $\sigma = \sigma_0 \sin(2\pi f t)$, y se analizó la correspondiente deformación de corte (oscilatoria), $\gamma = \gamma_0 \sin(2\pi f t + \delta)$. En estas ecuaciones, f (Hz) es la frecuencia, σ_0 y γ_0 son las amplitudes de tensión y deformación, respectivamente, y δ es un ángulo de desfase entre las fases de esfuerzo y deformación. Con estos experimentos se obtuvieron los módulos que caracterizan la viscoelasticidad de los materiales bajo fuerzas de cizalla: el módulo de almacenamiento (G'), y el módulo de pérdida (G'').

En todas las muestras, se realizó un tipo de prueba oscilatoria llamado barrido de amplitud. En este tipo de prueba, la frecuencia se fija en $f = 1$ Hz y la amplitud del esfuerzo aplicado, σ_0 , se va aumentando hasta un valor lo suficientemente alto como para llegar a la región viscoelástica no lineal (NLVR). La NLVR se caracteriza por una respuesta no lineal de los módulos viscoelásticos (G' y G''), para valores de σ_0 mayores que la amplitud crítica del esfuerzo de corte (σ_c). Para valores de σ_0 inferiores a σ_c , los módulos viscoelásticos son casi independientes de σ_0 (generalmente se observa un *pseudo-plateau* cuando G' y G'' se representan en función de σ_0). Esta región se conoce comúnmente como región viscoelástica lineal (VLR).

3.4 Determinación de las propiedades biomecánicas de los tejidos artificiales sometidos a esfuerzos de tracción y compresión

Para los ensayos de tracción, se utilizó un sistema electromecánico para ensayos de materiales Instron, Modelo 3345-K3327 (Figura 13). Para estas pruebas, los hidrogeles, que tienen forma de disco, se cortaron en muestras cuboides de una anchura de 10 mm, una longitud de 60 mm y una altura igual al espesor total de los hidrogeles en forma de disco (Figura 9). Las muestras se orientaron con su longitud mayor en dirección paralela a la fuerza de tracción (Figura 9). La distancia entre las mordazas del instrumento de ensayo se fijó en 15 mm. Por lo tanto, las muestras que se sometieron a esfuerzo de tracción tenían unas dimensiones de 10 mm × 15 mm × espesor de la muestra. Las partes restantes de las muestras estaban ancladas entre las mordazas. Las pruebas se realizaron a una velocidad de deformación constante de 5 mm/min a temperatura ambiente. El módulo de Young (E) se calculó como la tangente de la porción lineal inicial de la curva esfuerzo-deformación de cada prueba experimental, mientras que los valores del esfuerzo a rotura (σ) y de la deformación a rotura (ϵ) se determinaron mediante la selección del punto de la curva de esfuerzo-deformación donde se produjo la fractura.

Para los ensayos de compresión uniaxial, se utilizó el mismo sistema electromecánico de ensayo de materiales Instron, Modelo 3345-K3327. En este caso, los hidrogeles se cortaron en muestras cuboides de una anchura de 15 mm, una longitud de 15 mm y una altura igual al espesor de los hidrogeles en forma de disco (Figura 9). Las muestras se colocaron entre dos placas sin lubricación e impermeables, orientadas con su espesor paralelo a la dirección de compresión (Figura 9) y se sometieron a compresión no confinada a una velocidad de deformación constante de 1 mm/min a temperatura ambiente. El módulo de compresión elástica (E_c) se determinó a partir de la pendiente de la curva de esfuerzo-deformación a 15 % de deformación.



Figura 13: Instrumento de medición electromecánico Instron 3345-K3327 utilizado en este trabajo de Tesis Doctoral para las mediciones de tracción y compresión.

3.5 Análisis estadístico

Para el análisis de correlación entre el espesor de las muestras y las concentraciones de agarosa o el grado de hidratación de los tejidos artificiales, se utilizó la prueba de correlación τ de Kendall. Este mismo test se utilizó para los análisis de correlación entre los diferentes parámetros biomecánicos analizados en la presente Tesis Doctoral y los niveles de hidratación de los tejidos artificiales, las distintas concentraciones de agarosa de estos tejidos o el tiempo de evolución en cultivo. En todos los casos, se consideró un valor $p < 0.05$ como estadísticamente significativo para las pruebas de correlación.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Elaboración de un modelo de tejido artificial generado con biopolímeros de fibrina-agarosa

La aplicación de los métodos descritos en el apartado previo de esta Tesis Doctoral nos permitió elaborar eficientemente un modelo de tejido artificial generado con biopolímeros de fibrina-agarosa. Los tejidos artificiales nanoestructurados presentaron consistencia y elasticidad adecuadas para su manipulación en laboratorio (Figura 14).

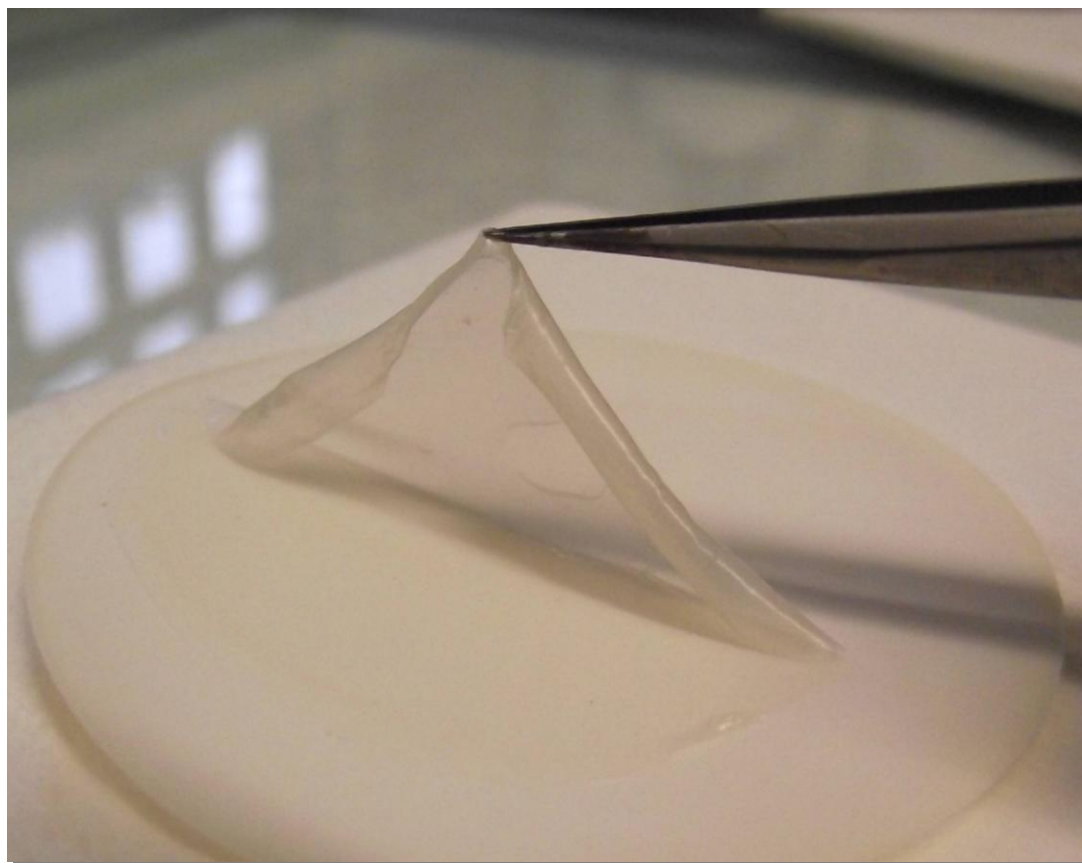


Figura 14: Imagen macroscópica de un tejido artificial de fibrina-agarosa nanoestructurado.

El análisis histológico de estos tejidos artificiales mostró una red de fibras homogénea y regular constituida por un conjunto homogéneo de fibras en las que no era posible distinguir la fibrina de la agarosa (Figura 15).

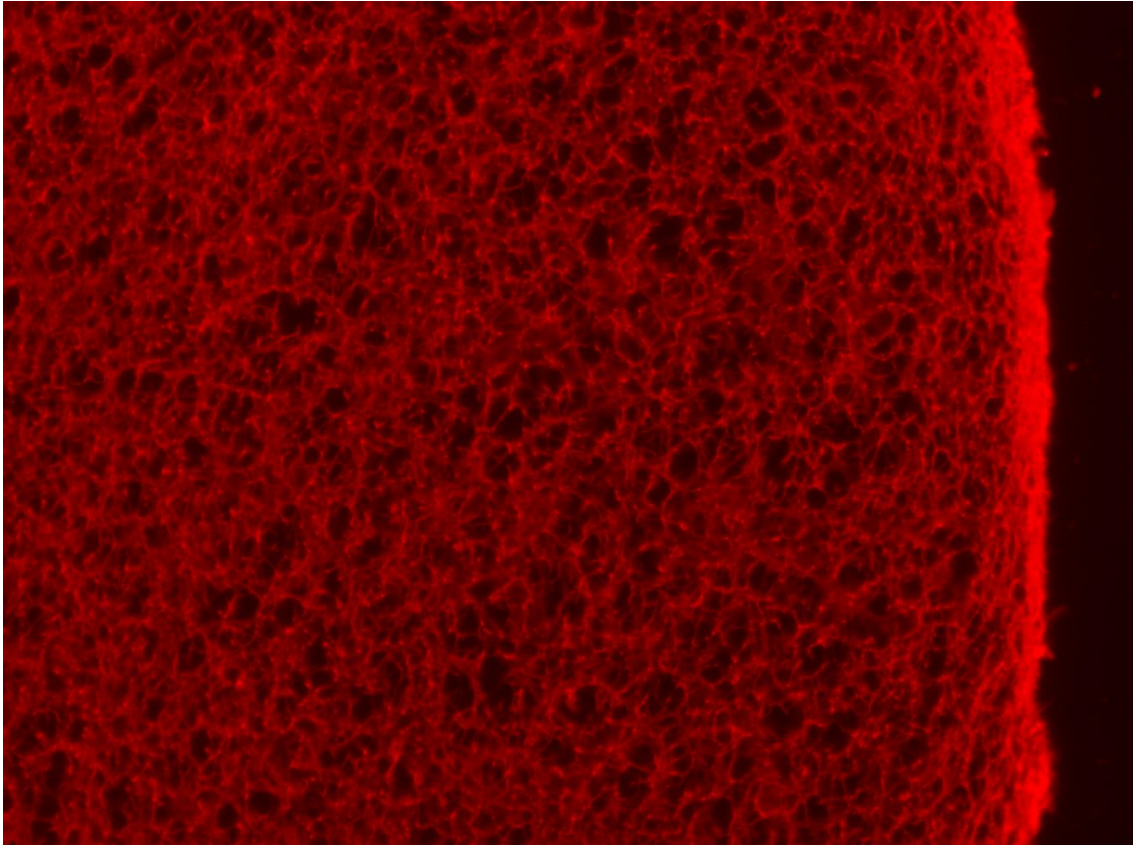


Figura 15: Imagen histológica de un tejido artificial de fibrina-agarosa teñido con eosina.

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOMECÁNICAS DE TEJIDOS ARTIFICIALES
ELABORADOS CON BIOPOLÍMEROS PARA SU UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

En cuanto al espesor de las diferentes muestras de tejido artificial, nuestros resultados demuestran que tanto el contenido de agua como la concentración de agarosa se correlacionaron con el espesor de dichos tejidos.

En concreto, el análisis del modelo de tejido artificial generado con biopolímeros de fibrina-agarosa nanoestructurados con concentraciones crecientes de agarosa mostró un aumento exponencial del espesor dependiente de la concentración de agarosa ($p < 0.001$; $r = 1$ para el test de correlación τ de Kendall), y que este se mantenía constante a lo largo de las 4 semanas del estudio (Tabla 1).

Tabla 1. Espesor en μm de los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa, sometidos a un proceso de nanoestructuración con concentraciones crecientes de agarosa.

	Fibrina	FA 0.1%	FA 0.2%	FA 0.3%	FA 0.4%	FA 0.5%
Hidrogel nanoestructurado: 3 minutos * 500 gramos	60	65	120	300	550	950

Asimismo, cuando se analizó el modelo de tejido artificial generado con biopolímeros de fibrina-agarosa nanoestructurados con niveles crecientes de hidratación, se observó una disminución estadísticamente significativa del espesor cuando disminuía la hidratación del tejido ($p < 0.001$; $r = 0.854$ para el test de correlación τ de Kendall) (Tabla 2). Sin embargo, el efecto de la concentración de agarosa sobre el espesor no fue significativo en los biomateriales en los que se controló el nivel de hidratación. Concretamente, nuestros resultados indican que el espesor aumentó moderadamente cuando aumentaba la concentración de agarosa, tanto en los hidrogeles con altos niveles de hidratación como en los tejidos con bajo contenido en agua, no alcanzando significación estadística ($p > 0.05$) (Tabla 2).

Tabla 2. Espesor en μm de los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa sometidos a un proceso de nanoestructuración, con niveles crecientes de hidratación y concentraciones crecientes de agarosa.

	Fibrina	FA 0.1%	FA 0.2%	FA 0.3%	FA 0.4%	FA 0.5%
Hidrogel no nanoestructurado ($\approx 99\%$ de hidratación)	2000	3000	3500	3700	3700	3800
Hidrogel nanoestructurado (90% de hidratación)	150	150	175	230	230	250
Hidrogel nanoestructurado (80% de hidratación)	60	60	100	100	110	115

4.2 Evaluación de los tejidos artificiales nanoestructurados generados con biopolímeros de fibrina-agarosa mediante microscopía electrónica de barrido

a) Evaluación del modelo de tejido artificial generado con biopolímeros de fibrina-agarosa sometidos a un proceso de nanoestructuración con concentraciones crecientes de agarosa

El análisis de los distintos tejidos artificiales utilizando microscopía electrónica de barrido mostró un patrón fibrilar diferente en cada tipo de muestra, el cual fue altamente dependiente de la composición del tejido. En concreto, las muestras de fibrina (0% de agarosa) presentaron una red fibrilar homogénea, mientras que las muestras de fibrina-agarosa al 0.3% y, especialmente, las muestras con un 0.5% de agarosa, presentaron una red fibrilar heterogénea debida a la presencia de fragmentos de agarosa en todo el hidrogel. Comparando las imágenes de barrido en las diferentes semanas de evaluación, no se evidenciaron modificaciones morfológicas dependientes del tiempo de evolución en cultivo (Figura 16, Figura 17).

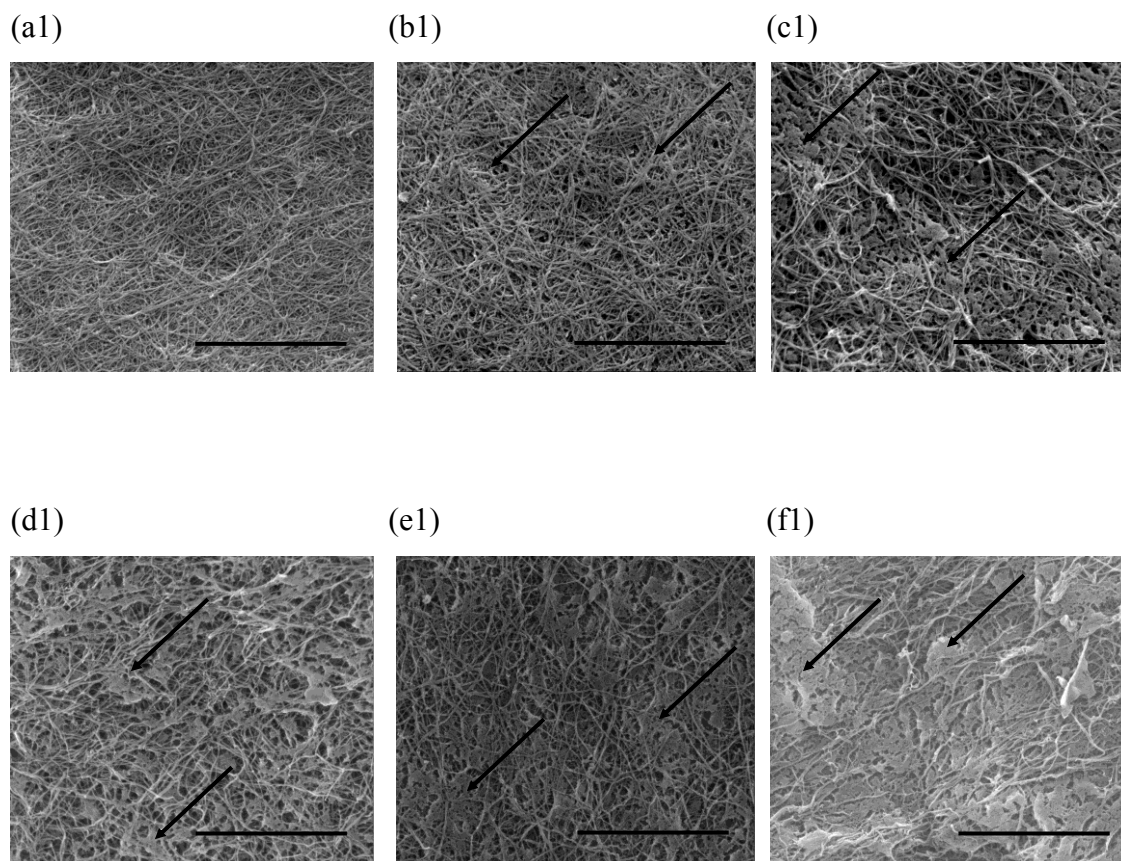


Figura 16: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa nanoestructurados, analizados al día 0 de su la producción. Concentración de agarosa: (a1) 0%, (b1) 0.1%, (c1) 0.2%, (d1) 0.3%, (e1) 0.4%, (f1) 0.5%. Se han destacado algunas áreas de agarosa con flechas. Escala: 20 μm .

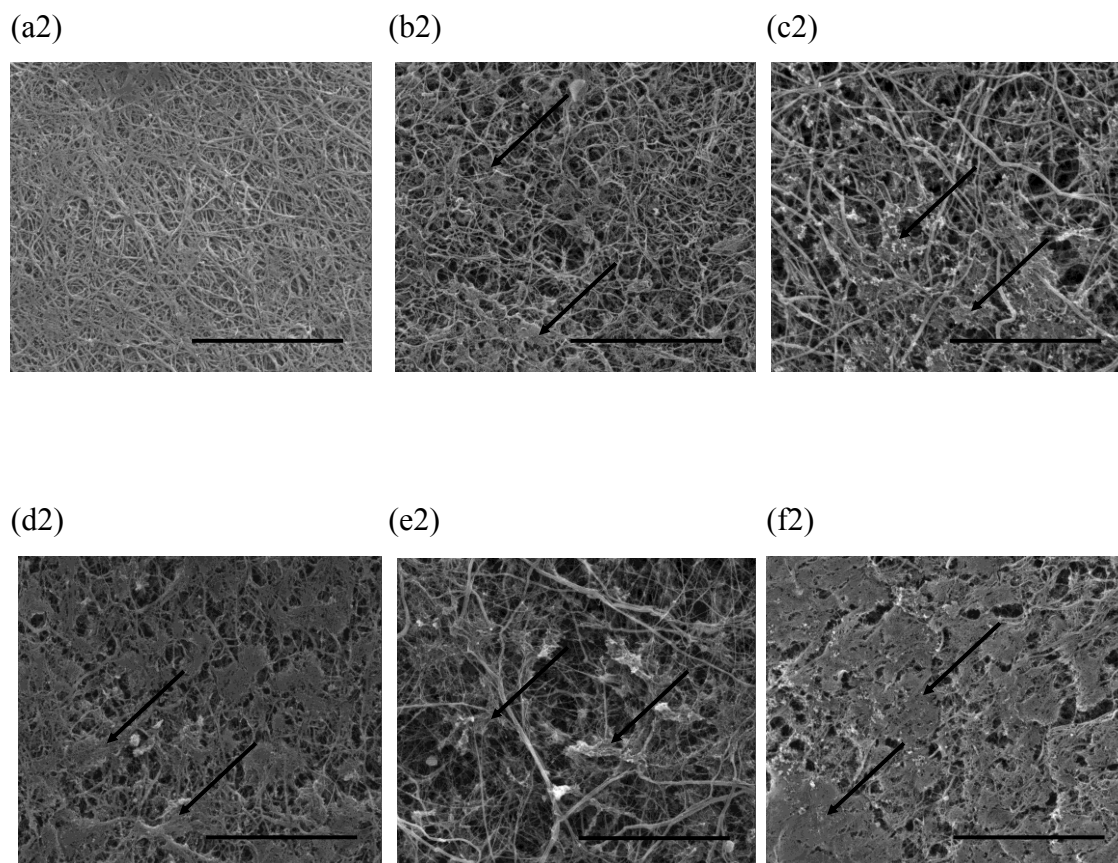


Figura 17: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa nanoestructurados, analizados después de 28 días de su la fabricación. Concentración de agarosa: (a2) 0%, (b2) 0.1%, (c2) 0.2%, (d2) 0.3%, (e2) 0.4%, (f2) 0.5%. Se han destacado algunas áreas de agarosa con flechas. Escala: 20 μ m.

b) Evaluación del modelo de tejido artificial generado con biopolímeros de fibrina-agarosa sometidos a un proceso de nanoestructuración, con niveles crecientes de hidratación

Cuando se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido las muestras con contenidos crecientes de hidratación, se observó una disminución cualitativa de la porosidad y, por lo tanto, un aumento de la densidad de fibras en los hidrogeles, al disminuir el contenido de agua de las muestras, como efecto del proceso de nanoestructuración (Figura 18). Además, en los hidrogeles con un 99%-100% de agua, se observó una alineación aleatoria de las fibras, mientras que los tejidos con menos nivel de hidratación presentaron una distribución de fibras en capas paralelas, especialmente en los hidrogeles con 80% de contenido de agua (Figura 18). En cuanto al contenido de agarosa, y en comparación con la red homogénea de fibras observadas en geles de fibrina, esta red se observó interrumpida por la presencia de áreas de agarosa en todo el hidrogel, disminuyendo por tanto la porosidad de los tejidos artificiales (Figura 19).

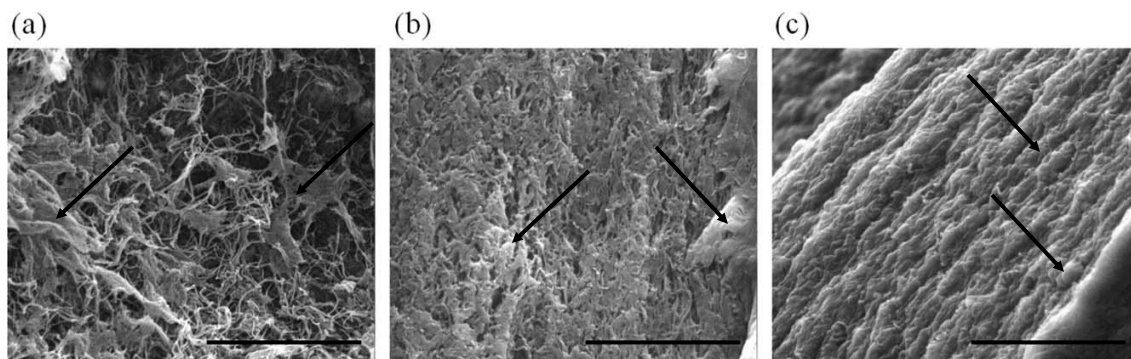


Figura 18: Análisis mediante microscopía electrónica de barrido de hidrogeles de fibrina-agarosa con un 0.3% de agarosa (sección transversal). (a) Hidrogel no-nanoestructurado, con un 99.48% de contenido de agua. (b) Hidrogel nanoestructurado hasta el 90% de hidratación. (c) Hidrogel nanoestructurado hasta el 80% de hidratación. Se han destacado algunas áreas de agarosa con flechas. Escala: 20 μm .

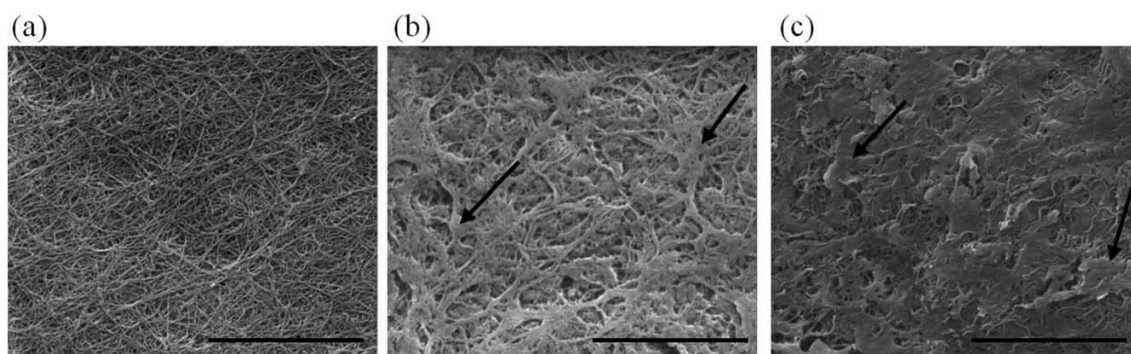


Figura 19: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa con un 90% de hidratación. Concentración de agarosa: (a) 0%, (b) 0.3%, (c) 0.5%. Se han destacado algunas áreas de agarosa con flechas. Escala: 20 μm .

4.3 Determinación de propiedades biomecánicas mediante medición reológica bajo esfuerzos de cizalla

Para determinar la región viscoelástica lineal (VLR) de los diferentes tejidos artificiales para el posterior análisis de los mismos en esta región, en primer lugar se llevaron a cabo ensayos de barrido de amplitud de esfuerzo de cizalla. El análisis de los modelos de tejido artificial generados en esta Tesis Doctoral sometidos a esfuerzos de cizalla a una frecuencia de 1Hz mostró la presencia de un *pseudo-plateau* inicial en las curvas de G' y G'' , seguido de una fuerte caída, como se muestra en la Figura 20. El *pseudo-plateau* inicial se asocia al VLR, como se mencionó anteriormente. Como se observa, en la figura, G' es casi un orden de magnitud mayor que G'' en esta región, siendo esto válido para cualquiera de los hidrogeles estudiados en este trabajo.

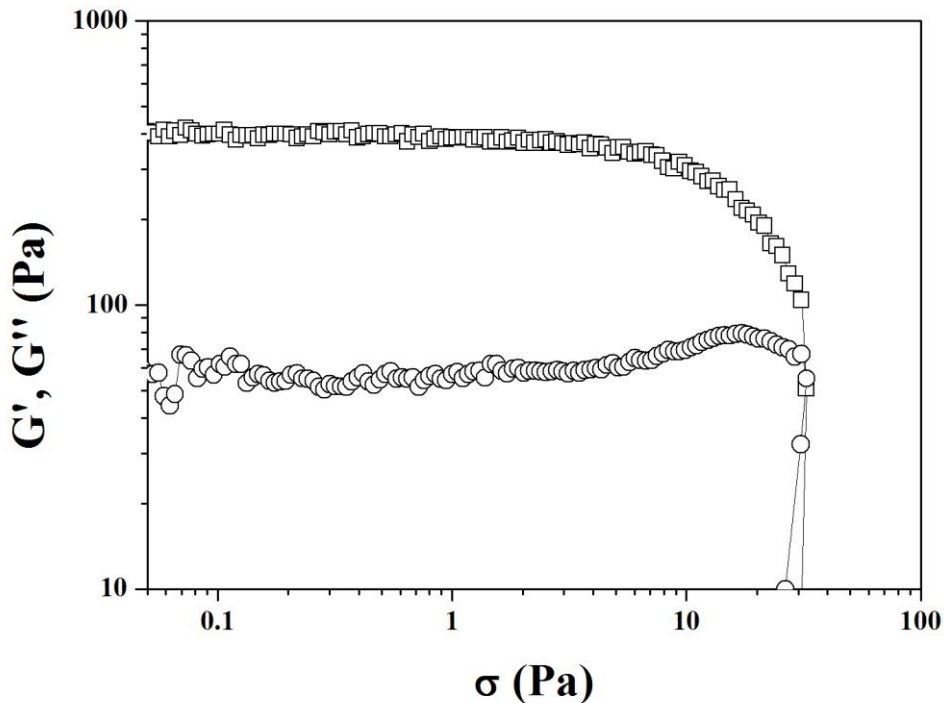


Figura 20: Determinación de los módulos viscoelásticos (G' y G'') en función de la amplitud del esfuerzo (σ), para los hidrogeles de fibrina-agarosa 0.5% con un nivel de hidratación superior al 99%. Las medidas fueron realizadas sometiendo las muestras a un esfuerzo de cizalla sinusoidal a una frecuencia de 1 Hz. \square : Módulo de almacenamiento (G'); \circ : Módulo de pérdida (G'').

a) Determinación de propiedades biomecánicas mediante medición reológica bajo esfuerzos de cizalla en el modelo de tejido artificial nanoestructurado con concentraciones crecientes de agarosa

Una vez determinada la zona viscoelástica lineal (VLR) del biomaterial, se obtuvieron los valores medios de los módulos viscoelásticos (G' y G'') de los diferentes tejidos artificiales analizados en esta Tesis Doctoral.

Como se puede observar en la Figura 21A, para los biomateriales con concentración de agarosa hasta 0.2%, los valores de G' se incrementaron de forma casi lineal a medida que aumentaba el contenido de agarosa. Para concentraciones de agarosa superiores al 0.2%, el valor de G' tiende a disminuir linealmente conforme aumenta la concentración de agarosa. Por ello, los valores menores de G' se asociaron a los biomateriales de fibrina sin agarosa, mientras que los valores mayores se asociaron a los constructos de fibrina-agarosa con un 0.2% de agarosa.

En el caso del módulo de pérdida G'' (Figura 21B), se observó la misma tendencia que para G' , con un aumento lineal hasta concentraciones de agarosa de 0.2%, y una disminución lineal a partir de este valor.

Los valores de G' y G'' se mantuvieron constantes a lo largo de las cuatro semanas de evaluación, y en todos los casos, el valor del módulo de almacenamiento G' fue mayor que el valor del módulo de pérdida G'' para el mismo biomaterial, con una diferencia de aproximadamente un orden de magnitud.

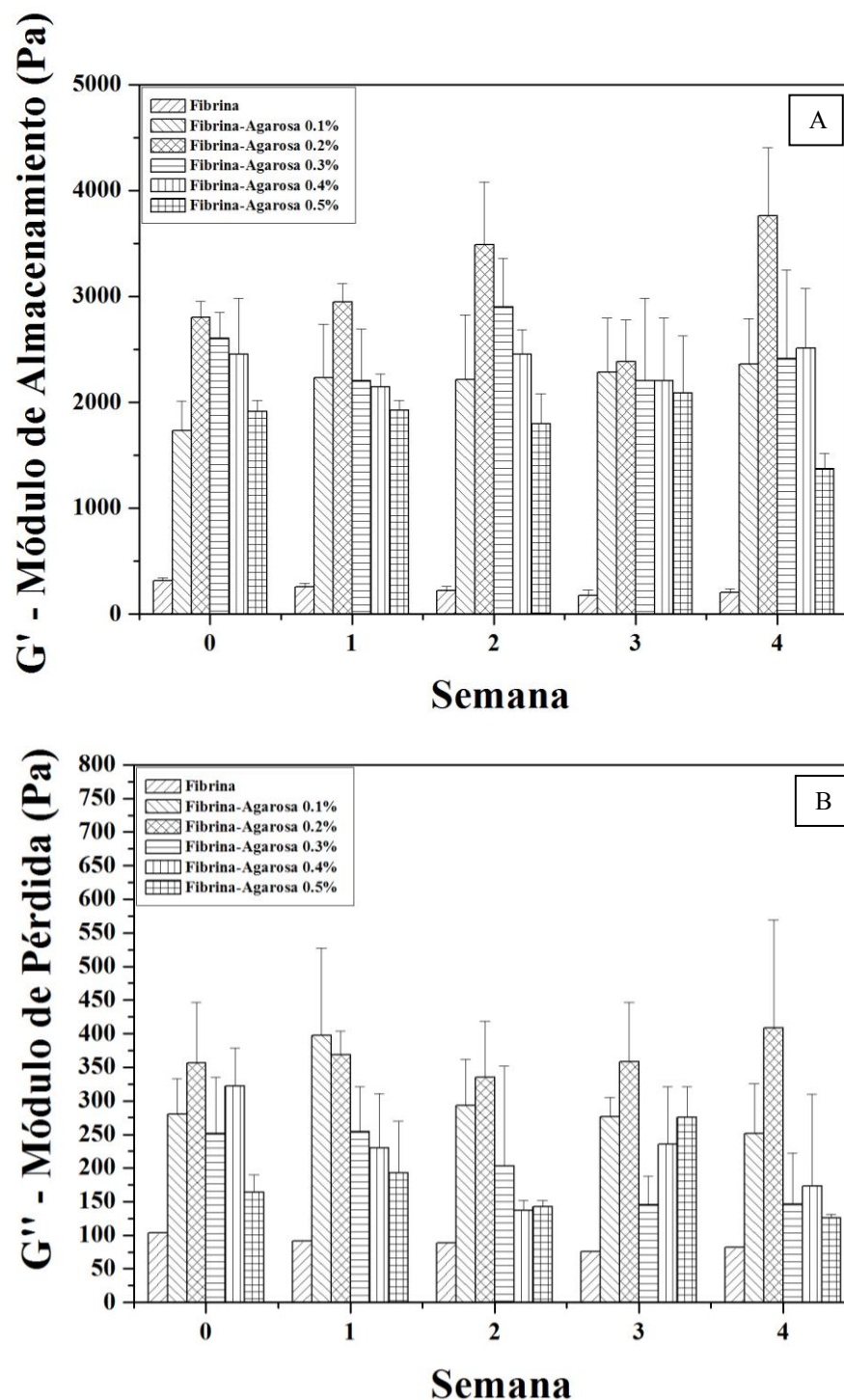


Figura 21: Valores medios de los módulos viscoelásticos de los hidrogel de fibrina y fibrina-agarosa, calculados dentro de la región viscoelástica lineal, para las distintas concentraciones de agarosa y tiempos de evolución en cultivo (0, 1, 2, 3, 4).

(A) Módulo de almacenamiento (G'); (B) Módulo de pérdida (G''). Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

b) Determinación de propiedades biomecánicas mediante medición reológica bajo esfuerzos de cizalla en el modelo de tejido artificial nanoestructurado con niveles crecientes de hidratación

El análisis del valor medio de los módulos viscoelásticos en tejidos artificiales con niveles crecientes de hidratación demostró un aumento significativo de los valores de G' ($p < 0.05$, $r = 0.53577$) y G'' ($p < 0.05$, $r = 0.45227$) al aumentar el contenido de agarosa en los hidrogeles, para todos los grados de hidratación. Con respecto al efecto de la hidratación, se observó una tendencia significativa de los módulos viscoelásticos G' ($p < 0.05$, $r = -0.59123$) y G'' ($p < 0.05$, $r = -0.66902$) a aumentar cuando disminuía el contenido de agua en los hidrogeles (Figuras 22A, 22B). De esta manera, los valores más elevados de G' y G'' se asociaron a los biomateriales de fibrina-agarosa con un 0.5% de agarosa, y un 80% de hidratación.

En todos los casos analizados, los valores de G' son de alrededor de un orden de magnitud mayores que sus respectivos valores de G'' .

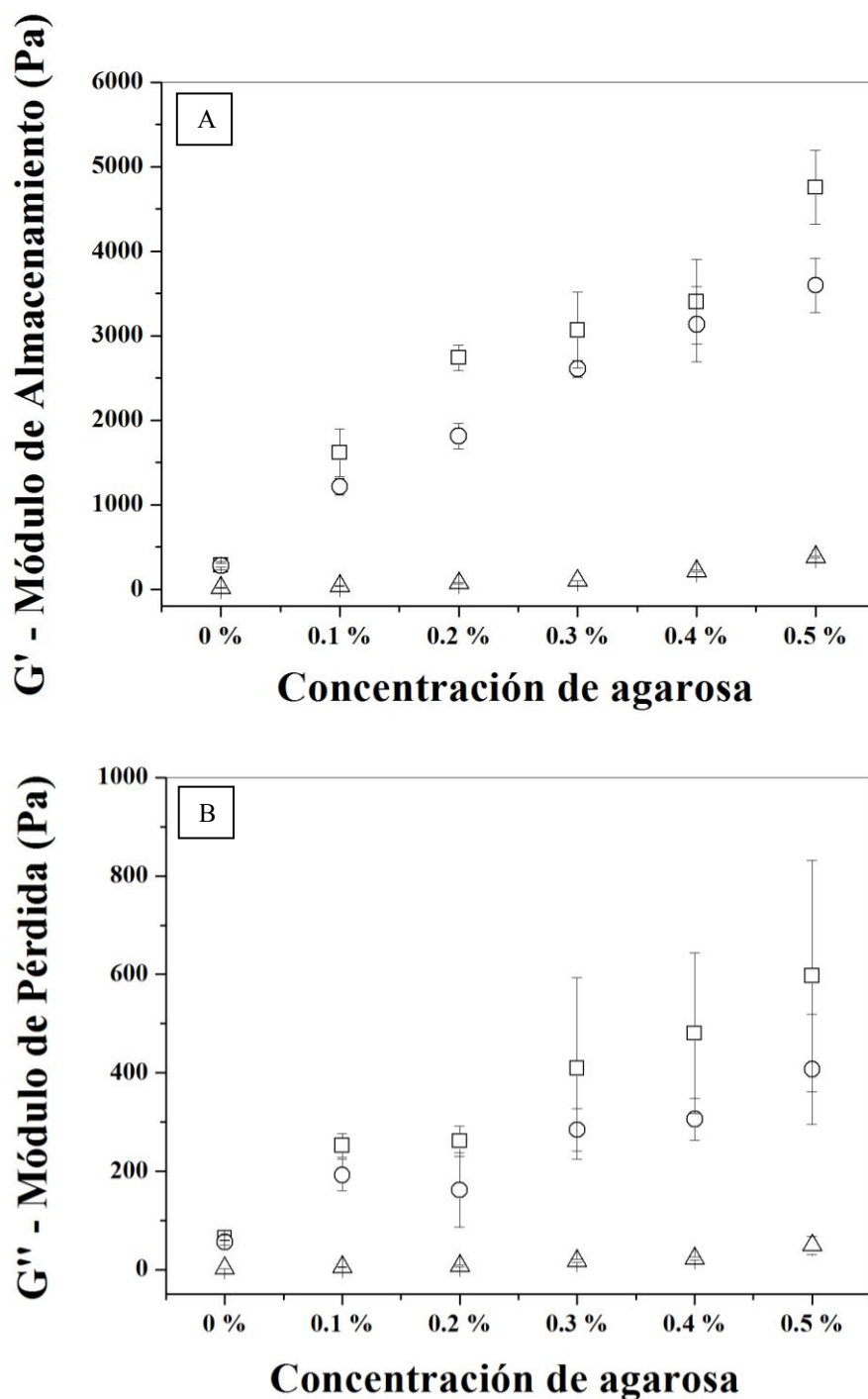


Figura 22: Valores medios de los módulos viscoelásticos de los hidrogel de fibrina y fibrina-agarosa calculados dentro de la región viscoelástica lineal para las distintas concentraciones de agarosa. \triangle : Hidrogel no nanoestructurados (hidratación > 99%); \circ : Hidrogel nanoestructurados con un 90% de hidratación; \square : Hidrogel nanoestructurados con un 80% de hidratación. (A) Módulo de almacenamiento (G'); (B) Módulo de pérdida (G''). Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

4.4 Determinación de propiedades biomecánicas de los tejidos artificiales mediante ensayos de tracción y compresión

4.4.1 Módulo de Young

a) Determinación de propiedades biomecánicas mediante ensayos de tracción en el modelo de tejido artificial nanoestructurado con concentraciones crecientes de agarosa

En este caso, los resultados mostraron que el módulo de Young era altamente dependiente de la concentración de agarosa en los hidrogeles. Concretamente, el valor del módulo de Young tendía a disminuir significativamente ($p < 0.0001$, $r = -0.89877$) al aumentar la concentración de agarosa (Figura 23). Los hidrogeles de fibrina sin agarosa mostraron los valores más elevados de módulo de Young, mientras que los valores menores del módulo de Young se asociaron a los hidrogeles de fibrina-agarosa con un 0.5% de agarosa. Con respecto a la influencia del tiempo de cultivo sobre los valores de módulo de Young de los hidrogeles, no se observó una variación significativa de este módulo, durante las diferentes semanas de evaluación ($p > 0.05$) (Figura 23).

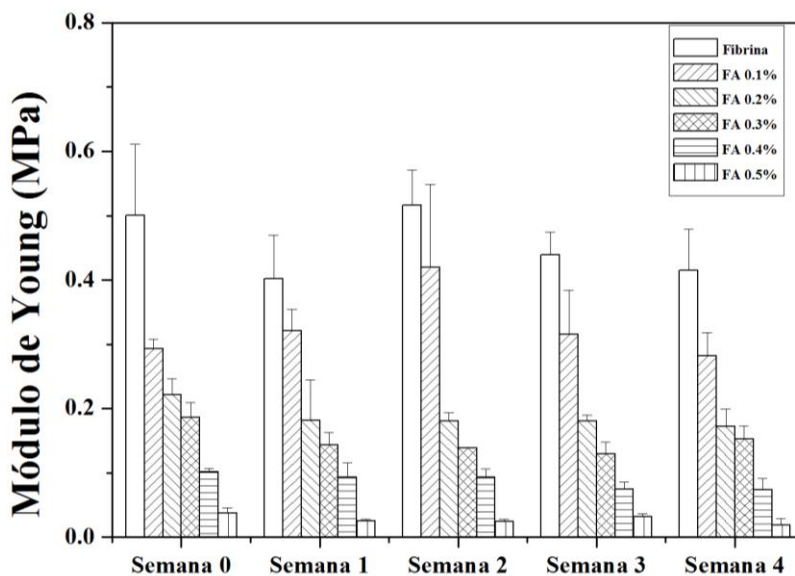


Figura 23: Valores medios del módulo de Young de los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa para las distintas concentraciones de agarosa y tiempos de evolución (0, 1, 2, 3, 4 semanas). La barras de error corresponden a la desviación estándar.

b) Determinación de propiedades biomecánicas mediante ensayos de tracción en el modelo de tejido artificial nanoestructurado con niveles crecientes de hidratación

Al analizar los tejidos artificiales con niveles crecientes de hidratación, nuestros resultados mostraron una importante influencia del contenido de agua y de agarosa sobre los módulos de Young de los diferentes tejidos artificiales (Figura 24). Para todos los contenidos de agarosa, el valor del módulo de Young aumentaba significativamente ($p < 0.0001$, $r = -0.82461$) a medida que disminuía el grado de hidratación. En particular, los valores de módulo de Young de las muestras con un 80% de hidratación eran más de 2 veces mayores que los valores de las muestras con un 90% de hidratación, y hasta 40 veces mayores que los valores asociados a los hidrogeles con un contenido de agua mayor de 99%. En cuanto al efecto del contenido de agarosa, el módulo de Young disminuía, aunque no significativamente ($p > 0.05$, $r = -0.21570$), cuando aumentaba el contenido de agarosa, para todos los grados de hidratación. En consecuencia, el valor más alto de módulo de Young (0.46 ± 0.05 MPa) se asoció al hidrogel de fibrina (0% de agarosa) con el 80% de hidratación. El análisis del gel de agarosa control reveló que su valor de módulo de Young era igual a 0.03 MPa.

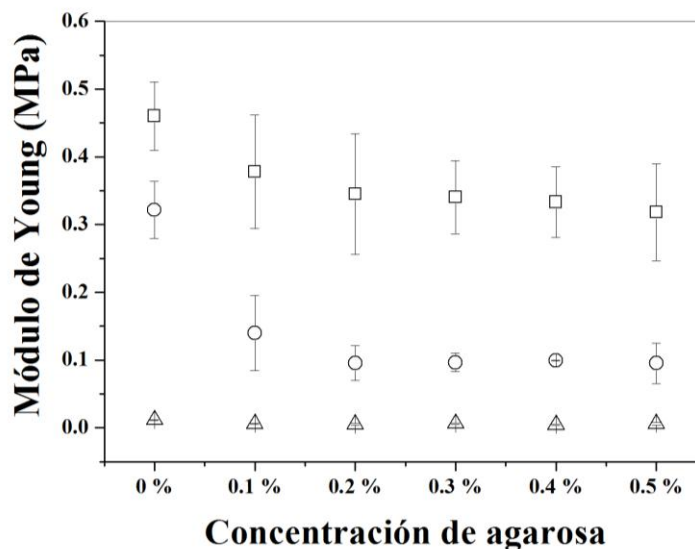


Figura 24: Módulo de Young (E) de los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa respecto de la concentración de agarosa. Δ : Hidrogeles con hidratación mayor de 99%; \circ : Hidrogeles con un 90% de hidratación; \square : Hidrogeles con 80% de hidratación. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

c) Determinación de la anisotropía mediante ensayos de tracción en el modelo de tejido artificial nanoestructurado con 90% de hidratación y 0.5% de agarosa

Para estudiar la anisotropía del biomaterial generado en esta Tesis Doctoral, se fabricaron hidrogeles de fibrina-agarosa al 90% de hidratación y 0.5% de concentración de agarosa, y estos constructos fueron evaluados bajo esfuerzos de tracción en forma de geometría b, y comparados con los mismos biomateriales, ensayados en forma de geometría a, tal como se detalla en la metodología de esta Tesis Doctoral. Como se muestra en la Figura 25, nuestros resultados revelaron que el valor medio del módulo de Young ($E=0.00784$ MPa) para los constructos en forma de geometría b, es muy inferior que el valor medio de los biomateriales producidos en forma de geometría a ($E=0.09536$ MPa).

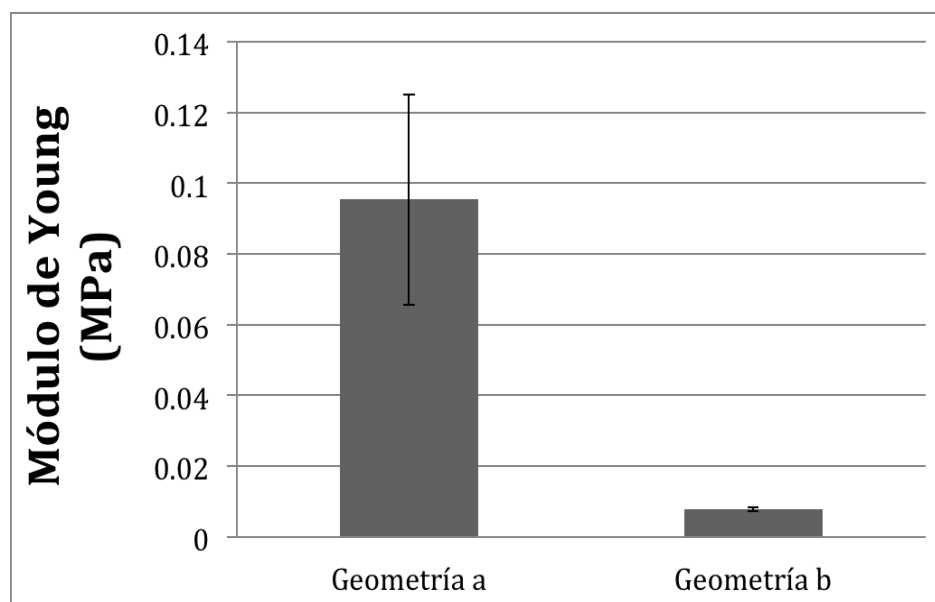


Figura 25: Valores medios del módulo de Young de los hidrogeles de fibrina-agarosa con un 90% de hidratación y 0.5% de agarosa, para las distintas geometrías del biomaterial. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

4.4.2 Esfuerzo y deformación a fractura bajo tracción

a) Determinación de propiedades biomecánicas mediante ensayos de tracción en el modelo de tejido artificial nanoestructurado con concentraciones crecientes de agarosa.

Los resultados de los análisis de esfuerzo a fractura bajo tracción mostraron que los valores de este parámetro disminuían significativamente ($p < 0.0001$, $r = -0.91362$) a medida que aumentaba la concentración de agarosa (Figura 26A). Al igual que se observó en el módulo de Young, los valores más elevados de esfuerzo a rotura se obtuvieron para los hidrogeles de fibrina (0% de agarosa) y los menores se asociaron a los hidrogeles de fibrina-agarosa con un 0.5% de agarosa. Los valores de deformación a fractura siguieron la misma tendencia que los valores de esfuerzo a fractura, apreciándose una disminución significativa ($p < 0.0001$, $r = -0.70564$) del valor de este parámetro al aumentar la concentración de agarosa (Figura 26B). La tendencia a disminuir al aumentar el contenido de agarosa no fue tan clara como en el caso de esfuerzo a fractura, y las desviaciones estándar asociadas a los valores de deformación a fractura fueron más elevadas.

En cuanto al efecto del tiempo, no se evidenció una variación significativa de los valores de esfuerzo a fractura ($p > 0.05$) y deformación a fractura ($p > 0.05$) a lo largo de las 4 semanas.

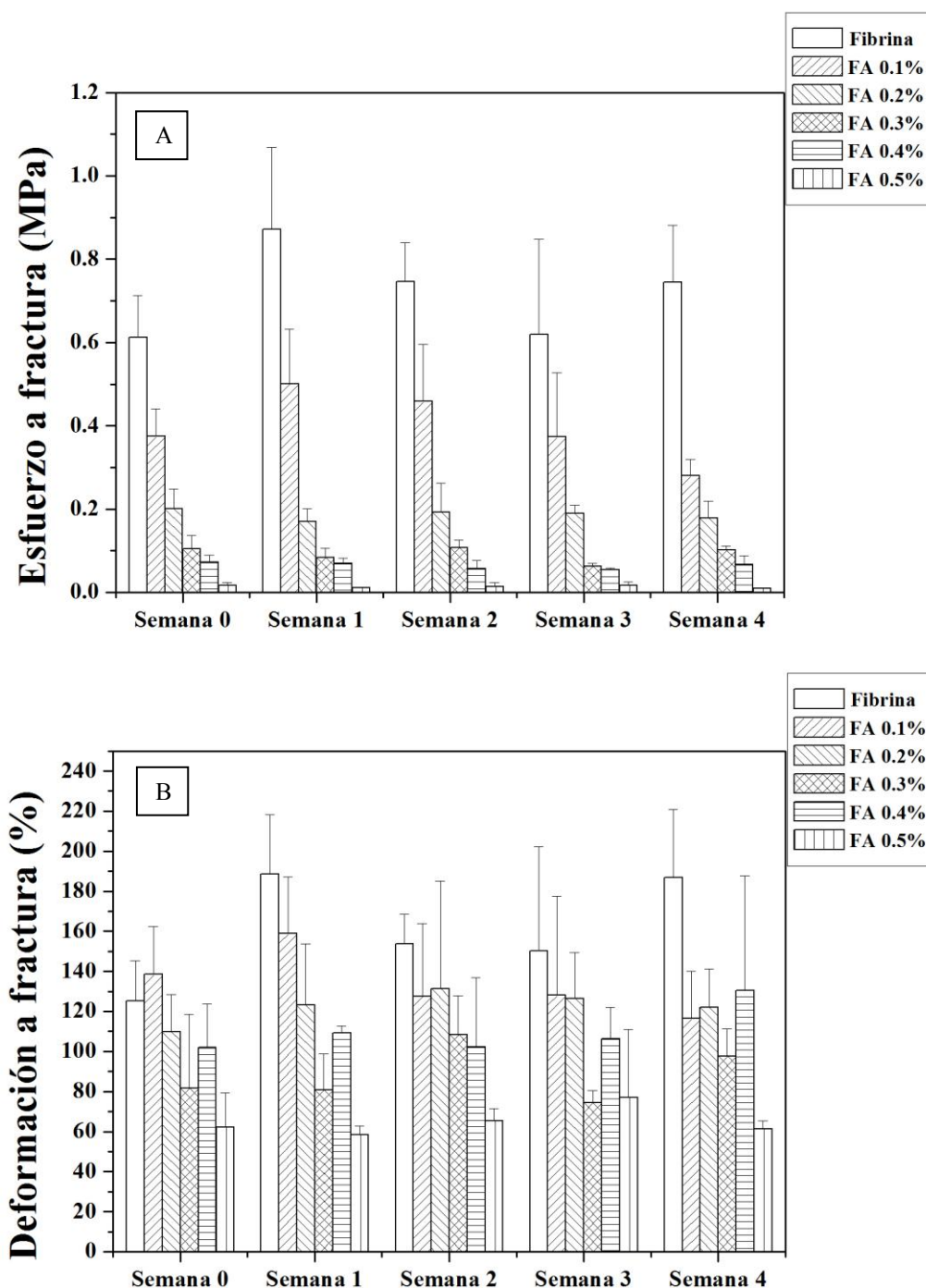


Figura 26: Valores medios de esfuerzo y deformación a fractura de los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa, calculados dentro de la región viscoelástica lineal, según la concentración de agarosa, y agrupados según la semana de la evaluación (0, 1, 2, 3, 4). (A) Esfuerzo a fractura (σ); (B) Deformación a fractura (ϵ). Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

b) Determinación de propiedades biomecánicas mediante ensayos de tracción en el modelo de tejido artificial nanoestructurado con niveles crecientes de hidratación

El análisis de los resultados de esfuerzo a rotura mostró que la fractura de las muestras con un 80% de hidratación se produjo a valores de esfuerzos de tracción más altos, en comparación con las muestras con un mayor contenido de agua, independientemente del contenido de agarosa, lo cual indica que los valores de este parámetro aumentaban significativamente ($p < 0.0001$, $r = -0.76237$) a medida que disminuía el grado de hidratación (Figura 27A). En particular, los valores de las muestras con un 90% de hidratación correspondían a menos de la mitad de los valores de las muestras con un 80% de hidratación, para las mismas concentraciones de agarosa. En cuanto a las muestras totalmente hidratadas, éstas tendían a fracturarse a esfuerzos muy bajos en comparación con las muestras con porcentajes más bajos de agua. Con respecto al efecto del contenido de agarosa, el esfuerzo a rotura mostró una tendencia no significativa ($p > 0.05$) a disminuir a medida que aumentaba la concentración de agarosa. Al igual que ocurría con el módulo de Young, el valor más alto de esfuerzo a rotura se obtuvo para el hidrogel de fibrina (0% de agarosa) al 80% de hidratación (0.61 ± 0.13 MPa). El análisis del gel de agarosa control reveló que el valor del esfuerzo a rotura de estos geles era igual a 0.007 MPa.

Para la deformación a fractura, se encontró una tendencia significativa ($p < 0.05$, $r = -0.53577$) a disminuir con el aumento de la concentración de agarosa, como en el caso del esfuerzo a fractura. Con respecto al efecto del grado de hidratación, los resultados mostraron una tendencia significativa ($p < 0.05$, $r = -0.46676$) de los valores de deformación a fractura a disminuir a medida que aumentaba la concentración de agarosa. En los casos de las muestras con 0.1, 0.2 y 0.3% de agarosa, los valores medios asociados a los biomateriales al 90% de hidratación fueron ligeramente más elevados que los valores de las respectivas muestras al 80% de hidratación (Figura 27B), y la desviación estándar asociada a los valores de la deformación a fractura resultó más elevada que en el caso del esfuerzo a fractura.

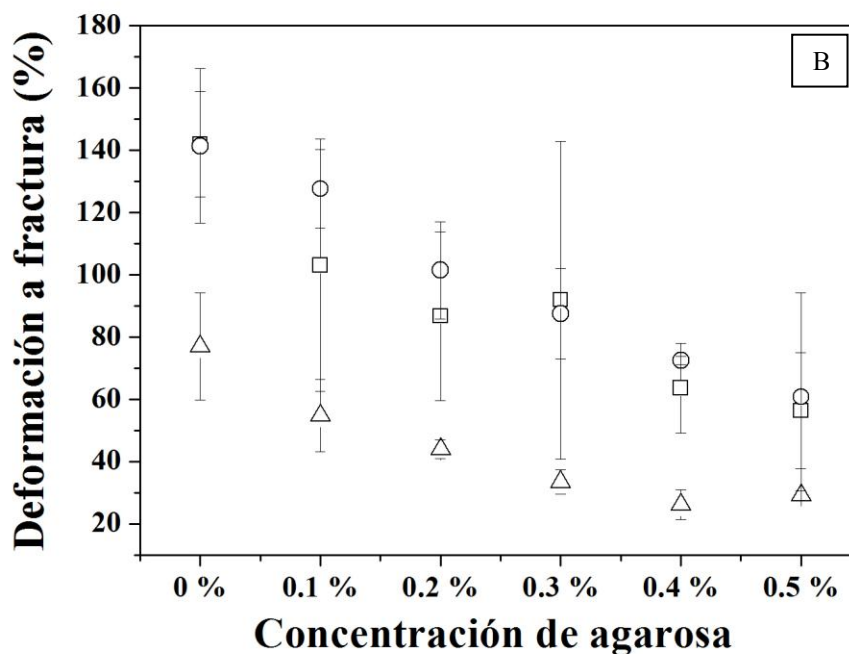
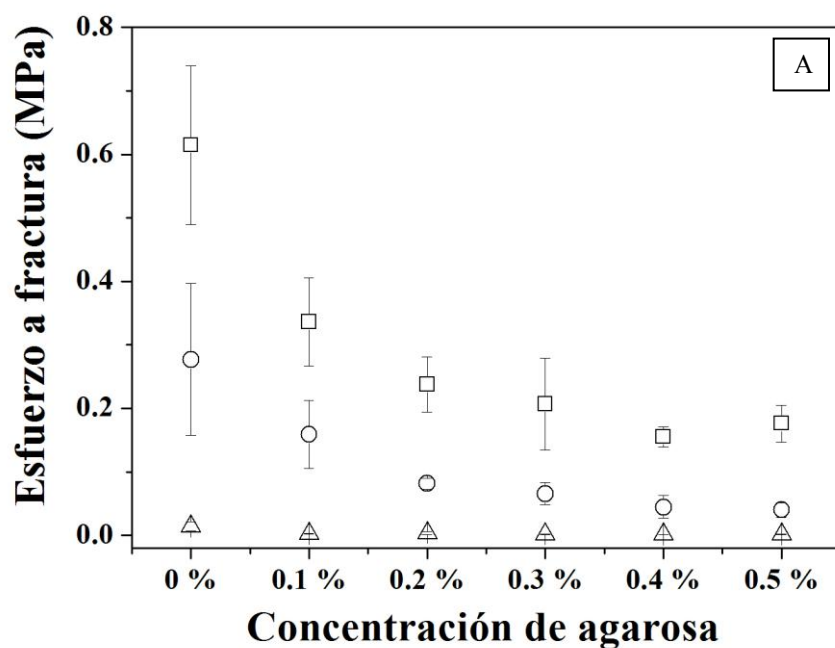


Figura 27: Gráficos de esfuerzo a fractura (A) y deformación a fractura (B) en tracción para los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa, en función de la concentración de agarosa.

△: Hidrogeles no nanoestructurados; ○: Hidrogeles nanoestructurados con un 90 % de hidratación; □: Hidrogeles nanoestructurados con un 80 % de hidratación. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

c) **Determinación de la anisotropía mediante ensayos de tracción en el modelo de tejido artificial nanoestructurado con 90% de hidratación y 0.5% de agarosa**

Para investigar la anisotropía, se evaluaron los hidrogeles de fibrina-agarosa al 90% de hidratación y 0.5% de concentración de agarosa, ensayados bajo esfuerzos de tracción en forma de geometría b. Los resultados de este análisis mostraron un valor medio de esfuerzo a fractura ($\sigma=0.00326$ MPa) muy inferior al de los biomateriales producidos en forma de geometría a ($\sigma=0.04004$ MPa) (Figura 28A). Los valores medios de deformación a fractura no mostraron diferencias entre las muestras fabricadas en forma de geometría a ($\epsilon=0.60853$) y b ($\epsilon=0.59439$) (Figura 28B).

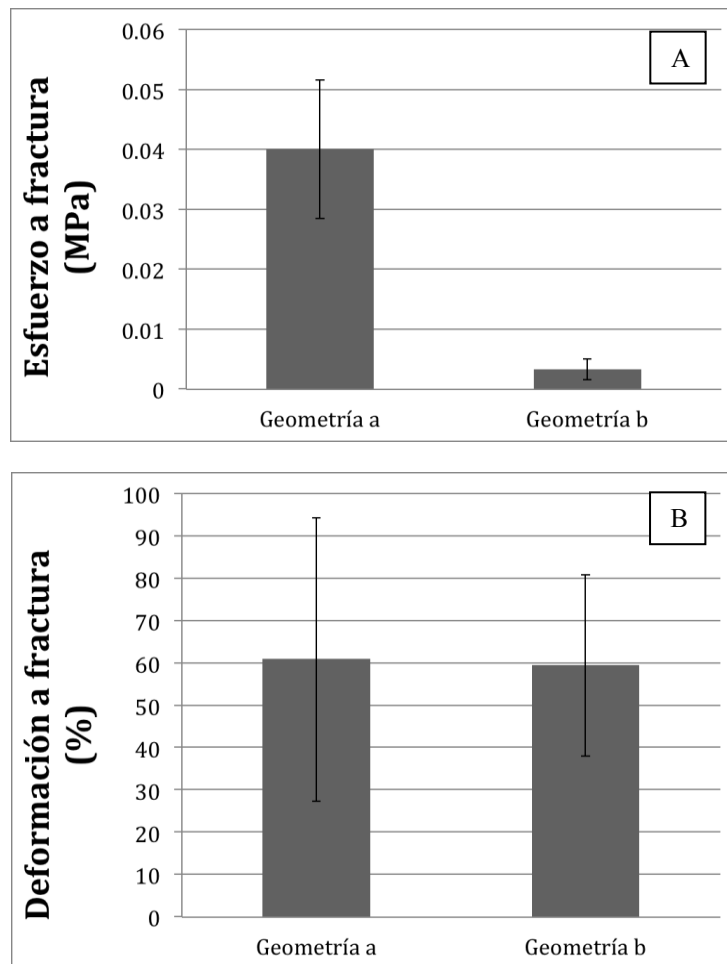


Figura 28: Valores medios de esfuerzo a fractura (A) y deformación a fractura (B) de los hidrogeles de fibrina-agarosa con un 90% de hidratación y un 0.5% de agarosa, para distintas geometrías de fabricación. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

4.4.3 Módulo elástico bajo compresión

a) Determinación de propiedades biomecánicas mediante ensayos de compresión en el modelo de tejido artificial nanoestructurado con concentraciones crecientes de agarosa

Los resultados del análisis del módulo elástico bajo compresión mostraron una gran influencia del contenido de agarosa sobre el módulo de elasticidad, con un aumento significativo de este módulo ($p < 0.0001$, $r = 0.75021$) a medida que aumentó la concentración de agarosa (Figura 29). El valor del módulo de elasticidad a compresión fue mínimo para las muestras de fibrina (0% de agarosa), y fue máximo para las muestras de fibrina-agarosa con un 0.5% de agarosa. Con respecto a la influencia del tiempo de evolución sobre las propiedades del biomaterial, la elevada desviación estándar y la falta de una tendencia clara entre los valores de módulo de compresión no permiten demostrar la existencia de ningún efecto significativo ($p > 0.05$) que se pueda atribuir al tiempo de evolución de las muestras.

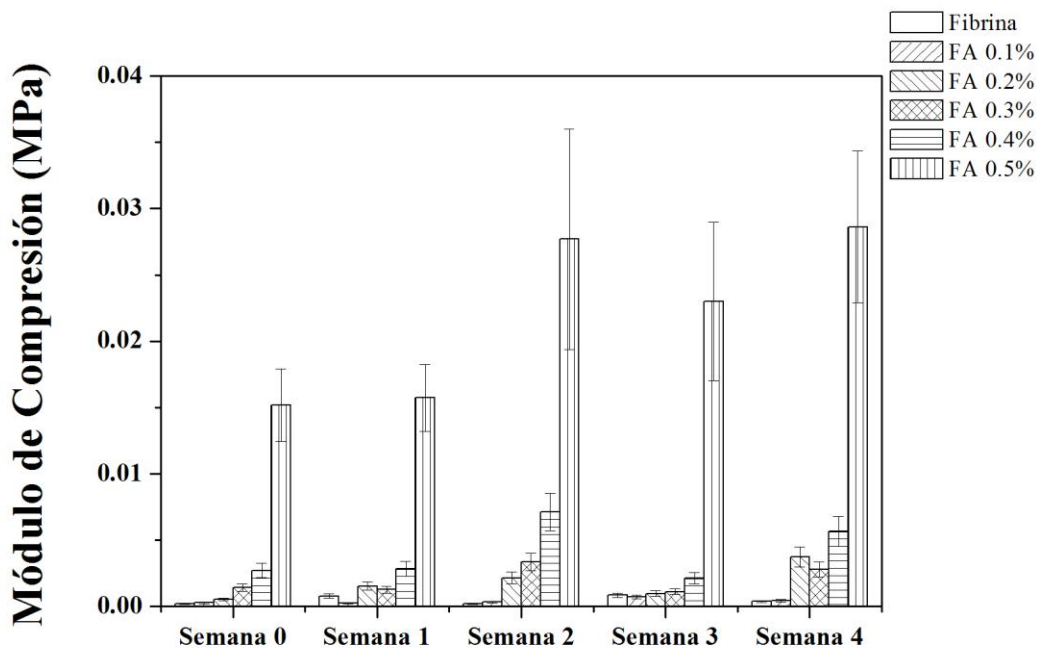


Figura 29: Valores medios del módulo elástico bajo compresión de los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa, según la concentración de agarosa, y según el tiempo de evolución (0, 1, 2, 3, 4 semanas). Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

b) Determinación de propiedades biomecánicas mediante ensayos de compresión en el modelo de tejido artificial nanoestructurado con niveles crecientes de hidratación

De manera similar a los ensayos de tracción, los ensayos de compresión mostraron una influencia significativa del grado de hidratación ($p < 0.05$, $r = -0,64763$) sobre el comportamiento biomecánico de los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa. Los resultados demostraron que los hidrogeles con un 80% de hidratación tenían los valores de módulo elástico de compresión más altos (Figura 30). En cuanto al efecto del contenido de agarosa, el módulo de elasticidad a compresión aumentó, aunque no significativamente ($p > 0.05$), cuando se incrementó la concentración de agarosa, contrariamente al caso del módulo de Young. No fue posible medir el módulo elástico de compresión de las muestras de fibrina-agarosa con un 0.5% de agarosa, al 80% de hidratación, porque no se pudo aplicar el mismo procedimiento estándar de ensayo. El análisis del gel de agarosa control reveló que el valor del módulo de elasticidad a la compresión de este gel era igual a 0.08 MPa.

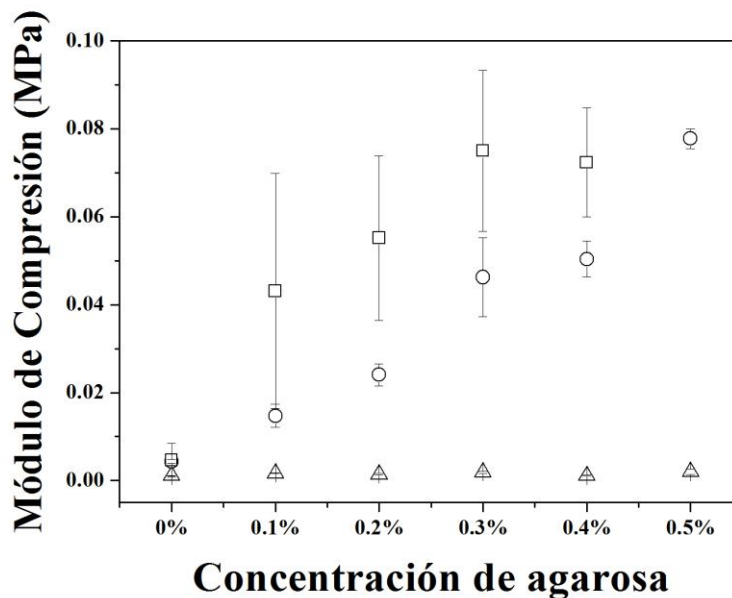


Figura 30: Módulo elástico de compresión calculado al 15% de deformación para los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa, en función de la concentración de agarosa. \triangle : Hidrogeles con un nivel de hidratación mayor de 99%; \circ : Hidrogeles con un 90% de hidratación; \square : Hidrogeles con un 80% de hidratación. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

4.5 Selección de los modelos de tejidos artificiales generados con biopolímeros de fibrina-agarosa nanoestructurados con propiedades biomecánicas semejantes a los tejidos nativos, para su inclusión en protocolos de ingeniería tisular

Una vez analizados los modelos de tejido artificial de fibrina-agarosa nanoestructurados con concentraciones crecientes de agarosa y grado de hidratación, procedimos a comparar los parámetros biomecánicos de estos tejidos artificiales con los de los tejidos nativos previamente estudiados en la literatura.

Como se muestra en la Figura 31 y la tabla 3, los valores de G' y G'' de los tejidos artificiales fueron similares a los descritos para la córnea, mucosa oral e hígado, siendo G' comparable a los tejidos del cerebro y al riñón, pero no G'' .

Por otro lado, la Figura 32 y la tabla 3 muestra cómo los valores del módulo de compresión se encontraban en el mismo rango de los valores descritos por el hígado, la glándula tiroidea y la mama humana, mientras que los valores del módulo de Young fueron similares a los descritos para el hígado, los músculos, el riñón, la mama, el pulmón, el cuello uterino, la medula espinal y la córnea.

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOMECÁNICAS DE TEJIDOS ARTIFICIALES
ELABORADOS CON BIOPOLÍMEROS PARA SU UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

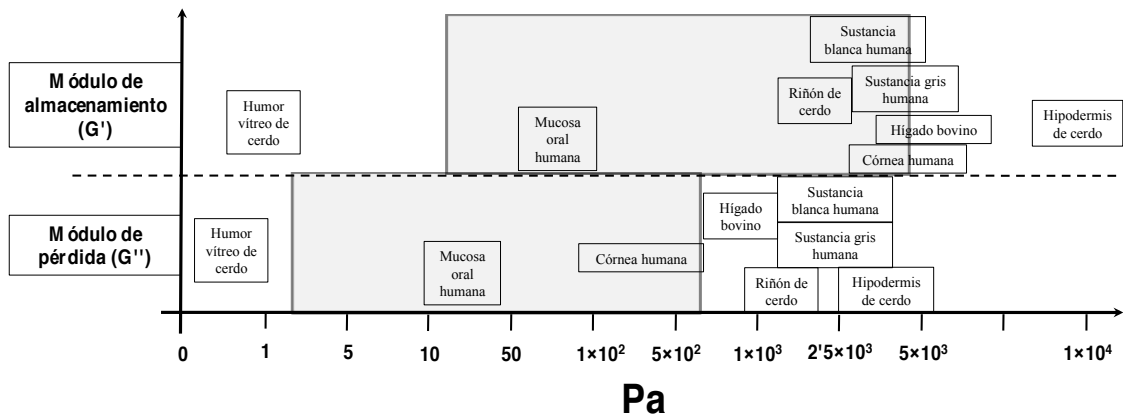


Figura 31: Valores de los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') de diferentes tejidos nativos. Los rectángulos grises representan los rangos cubiertos por los geles de fibrina y fibrina-agarosa producidos en este trabajo de Tesis Doctoral. Los datos de los tejidos nativos fueron tomados de las referencias siguientes: Chan & Titze 1999; Liu & Bilston 2000; Sharif-Nasseri et al. 2002; Geerligts & Peters 2008; Green et al. 2008; Kashani et al. 2011; Hatami-Marbini 2014.

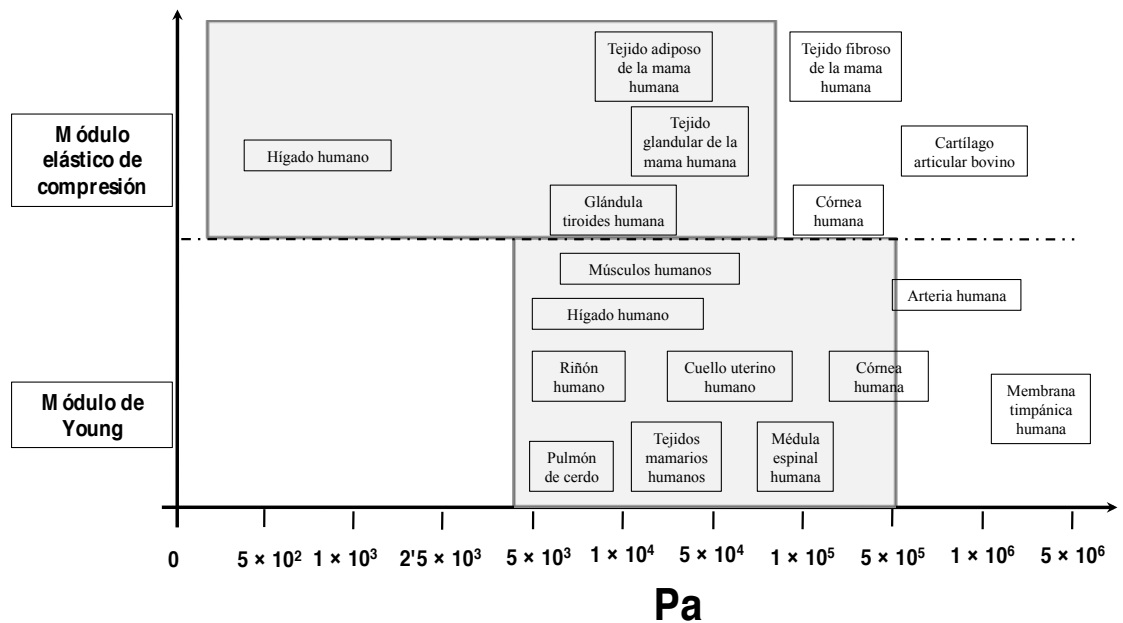


Figura 32: Valores del módulo elástico de compresión y del módulo de Young de diferentes tejidos nativos. Los rectángulos grises representan los rangos cubiertos por los geles de fibrina y fibrina-agarosa producidos en este trabajo de Tesis Doctoral. Los datos de los tejidos nativos fueron tomados de las referencias siguientes: Levental et al. 2007; Elsheikh et al. 2008; Nava et al. 2008; Wells & Liang 2011; Aernouts et al. 2012; Khamdaeng et al. 2012.

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOMECÁNICAS DE TEJIDOS ARTIFICIALES
ELABORADOS CON BIOPOLÍMEROS PARA SU UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

Tabla 3: Valores medios de los módulos de almacenamiento (G'), de pérdida (G''), de Young (E_Y) y elástico de compresión (E_c) de las diferentes formulaciones del biomaterial generado en esta Tesis Doctoral. En la columna a la derecha se indican los tejidos nativos que poseen parámetros biomecánicos similares a cada formulación del biomaterial y se especifica cuál es el módulo biomecánico para el cual presentan similitud con los tejidos artificiales.

Agarosa	Semana	G' [Pa]	G'' [Pa]	E_Y [Pa]	E_c [Pa]	Similar a:
Fibrina	0	313	103	500770	192	
FA 0.1%	0	1731	280	293200	281	
FA 0.2%	0	2805	357	221530	527	Córnea humana (G''), Hígado humano (E_c)
FA 0.3%	0	2605	251	185810	1440	Sustancia blanca humana (G')
FA 0.4%	0	2454	322	101500	2700	Riñón de cerdo (G')
FA 0.5%	0	1916	164	37070	15160	Músculos humanos (E_Y), Cuello uterino humano (E_Y)
Fibrina	1	259	91	401610	779	
FA 0.1%	1	2235	398	321000	262	
FA 0.2%	1	2950	368	181150	1540	Córnea humana (G')
FA 0.3%	1	2203	254	143060	1280	Médula espinal humana (E_Y)
FA 0.4%	1	2146	230	93200	2830	
FA 0.5%	1	1925	193	25230	15730	Músculo humanos (E_Y), Tejidos humanos mamarios (E_Y)
Fibrina	2	224	89	516040	188	
FA 0.1%	2	2219	293	419530	328	
FA 0.2%	2	3488	335	180320	2150	Córnea humana (G'')
FA 0.3%	2	2901	203	139260	3370	
FA 0.4%	2	2453	137	92980	7120	Riñón de cerdo (G'), Médula espinal hum. (E_Y), Glándula tiroides hum. (E_c)
FA 0.5%	2	1797	143	24290	27690	Músculo humano (E_Y), Tejidos humanos mamarios (E_Y)
Fibrina	3	178	76	439320	844	Mucosa oral humana (G')
FA 0.1%	3	2287	276	315860	721	Hígado humano (E_c)
FA 0.2%	3	2386	358	180460	977	Córnea humana (G'')
FA 0.3%	3	2204	145	129650	1120	
FA 0.4%	3	2206	235	74710	2130	Cuello uterino humano (E_Y)
FA 0.5%	3	2089	276	31810	22990	Músculo hum. (E_Y), Cuello uterino hum. (E_Y), Tejido adiposo mamario hum. (E_c)
Fibrina	4	208	82	414780	375	
FA 0.1%	4	2360	252	282130	429	
FA 0.2%	4	3762	409	172030	3720	
FA 0.3%	4	2412	146	153070	2790	
FA 0.4%	4	2514	173	74190	5670	Riñón de cerdo (G'), Cuello uterino humano (E_Y)
FA 0.5%	4	1371	126	19070	28610	Músculos humanos (E_Y), Tejido glandular mamario humano (E_c)
Hidratación						
Fibrina	99%	16	3	11550	1100	Mucosa oral humana (G'), Hígado humano (E_Y)
Fibrina	90%	280	56	321550	4390	
Fibrina	80%	285	65	460090	4640	
FA 0.1%	99%	37	5	6110	1690	Mucosa oral humana (G'), Riñón humano (E_Y)
FA 0.1%	90%	1211	192	139840	14700	
FA 0.1%	80%	1615	252	378030	43120	
FA 0.2%	99%	69.85	8	5110	1440	Mucosa oral humana (G'), Pulmón de cerdo (E_Y)
FA 0.2%	90%	1812	162	95660	24050	Tejido adiposo mamario humano (E_c)
FA 0.2%	80%	2740	261	344920	55160	Sustancia blanca humana (G')
FA 0.3%	99%	99	17	6230	1900	Mucosa oral humana (G' , G''), Riñón humano (E_Y)
FA 0.3%	90%	2610	284	96510	46250	Sustancia blanca humana (G'), Médula espinal humana (E_Y)
FA 0.3%	80%	3065	409	340380	75000	Sustancia gris humana (G')
FA 0.4%	99%	213	22	4530	1120	
FA 0.4%	90%	3136	305	99620	50380	Sustancia gris humana (G'), Córnea humana (G')
FA 0.4%	80%	3400	480	332970	72330	
FA 0.5%	99%	381	49	6190	2010	Riñón humano (E_Y)
FA 0.5%	90%	3597	407	95360	77780	Médula espinal humana (E_Y), Tejido glandular mamario humano (E_c)
FA 0.5%	80%	4756	597	318010	-	Hígado bovino (G')

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El desarrollo de la Ingeniería Tisular en los últimos años ha permitido generar distintos prototipos de tejidos artificiales de posible utilidad clínica. El objetivo a alcanzar consiste en reproducir las propiedades estructurales, funcionales y biomecánicas biomiméticas del tejido nativo a sustituir (Shin et al. 2003; Patterson et al. 2010).

A tal efecto, se han investigado distintos tipos de biomateriales con el objetivo de identificar aquéllos que, por sus propiedades, puedan sustituir con más eficacia los distintos tejidos orgánicos. En el estudio de las propiedades biomecánicas de estos biomateriales y en su adecuada selección para la construcción de tejidos radicarán el éxito de este tipo de terapia.

El Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada ha desarrollado en los últimos años un biomaterial de fibrina-agarosa que ha resultado de gran utilidad para la construcción de distintos modelos de tejidos humanos, tales como la córnea, piel, mucosa oral y nervio periférico (Alaminos et al. 2006; Sanchez-Quevedo et al. 2007; Rodriguez et al. 2012; Carriel et al. 2013; Garzón et al. 2013). Aunque dicho biomaterial facilita la reproducción biomimética de los tejidos y es de naturaleza biocompatible, su optimización en lo que respecta a sus propiedades biomecánicas, no ha sido aún investigada en profundidad.

En este sentido, mejorar la elasticidad, resistencia y rigidez de los hidrogeles de fibrina-agarosa utilizados para construir tejidos artificiales constituye un reto básico para incrementar la eficacia terapéutica de estos tejidos.

La adición de una cantidad de agarosa a los hidrogeles de fibrina y la aplicación de métodos de compresión plástica (nanoestructuración), han demostrado previamente su utilidad para la modulación de las propiedades mecánicas de los biomateriales generados a base de fibrina (Alaminos et al. 2006; Ionescu et al. 2011). Sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado un análisis biomecánico completo de un modelo biológico de fibrina-agarosa.

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado el efecto del contenido de agarosa, del grado de hidratación y de la evolución temporal del material, sobre el comportamiento biomecánico de hidrogeles de fibrina-agarosa sometidos a esfuerzos de tracción, compresión y cizalla, con el fin de seleccionar el modelo de biomaterial más apropiado para la generación de tejidos artificiales mediante técnicas de ingeniería tisular.

A continuación, discutiremos los resultados obtenidos tras el desarrollo de nuestro protocolo experimental, atendiendo en primer lugar a los efectos de la hidratación, en segundo lugar a los efectos de la concentración de agarosa y, en tercer lugar, al efecto del tiempo sobre las propiedades biomecánicas de los biomateriales utilizados en la construcción de tejidos artificiales de fibrina-agarosa.

Es importante reseñar que la investigación realizada en esta Tesis Doctoral nos ha permitido reproducir los modelos tisulares de fibrina-agarosa ya ensayados previamente por el Grupo de Ingeniería Tisular sin observar modificaciones artefactuales significativas. Sobre estos modelos, hemos diseñado los protocolos experimentales del presente trabajo de investigación.

5.1 Efecto de la hidratación

Nuestros resultados ponen de relieve que, a medida que el grado de hidratación del biomaterial disminuye, existe un aumento progresivo y significativo de los módulos elásticos bajo esfuerzos de tracción y compresión y un aumento similar de los módulos viscoelásticos bajo esfuerzos de cizalla. Además, la aplicación de métodos de compresión plástica comporta un aumento de los valores medios de esfuerzo y deformación a rotura en tracción. Esto puede ser debido a modificaciones en la estructura tridimensional que la nanoestructuración provoca en las fibras de fibrina y, probablemente, también en la agarosa. La compresión plástica (nanoestructuración) contribuye a eliminar una parte del agua que llena los espacios dentro de la red porosa del hidrogel, produciendo un material más denso y más rígido. Al aumentar la densidad, disminuye la distancia entre las fibras, lo que ayuda a la formación de interacciones covalentes y enlaces por puentes de hidrógeno entre las moléculas del biomaterial (Rosenblatt et al. 1994; Knapp et al. 1997; Pratt et al. 1997). Ello contribuye al aumento de los parámetros biomecánicos característicos de los hidrogeles, como ha sido previamente demostrado para los hidrogeles de fibrina (Guthold et al. 2007).

El hecho que los niveles de hidratación influyan igualmente sobre las propiedades biomecánicas bajo esfuerzos de cizalla, tracción y compresión podría indicar que la hidratación es el parámetro esencial en la configuración tisular, al ejercer una influencia muy significativa sobre el conjunto de las propiedades biomecánicas del tejido.

Una posible explicación a este fenómeno es el alto porcentaje de agua existente en los tejidos, así como el elevado grado de difusión de la misma en la estructura del biomaterial. Ello conduce sin duda a una mayor homogeneidad del constructo tisular y refuerza la idea de que este parámetro debe ser estrictamente controlado en los biomateriales a utilizar en ingeniería tisular.

5.2 Efecto del contenido de agarosa

La adición de una cantidad definida de agarosa a los hidrogeles de fibrina produjo biomateriales con mejor consistencia física y más fáciles de manejar, que demostraron poseer módulos elásticos más elevados bajo esfuerzos de cizalla y de compresión, aunque no de tracción. En el caso de los hidrogeles de fibrina-agarosa sometidos a un proceso de nanoestructuración con concentraciones crecientes de agarosa, el módulo elástico de compresión aumentó casi exponencialmente al aumentar el contenido de agarosa. El aumento de los módulos viscoelásticos bajo fuerzas de cizalla fue lineal hasta valores de concentraciones de agarosa de 0.2%, mientras que se observó una ligera disminución a concentraciones más elevadas de agarosa. Estos resultados corroboran estudios previos de nuestro grupo de investigación que demuestran que los módulos viscoelásticos de cizalla tienden a aumentar linealmente con el aumento de las concentraciones de agarosa hasta el 0.2% de agarosa, apreciándose una ligera disminución a partir de esta concentración (Ionescu et al. 2011). Estos resultados parecen demostrar que la utilización de la agarosa contribuye a incrementar las propiedades biomecánicas de los tejidos artificiales (módulo elástico de compresión, módulos viscoelásticos de cizalla) tanto cuando los biomateriales son sometidos a fuerzas de compresión uniaxial, como cuando son sometidos a fuerzas de corte rotacionales.

El conocimiento de estas propiedades puede ser de gran interés desde una perspectiva biomédica a la hora de seleccionar el biomaterial que debemos utilizar ante un determinado tipo de tejido. A este respecto, existen tejidos nativos sometidos a grandes esfuerzos de compresión como es el caso del hueso, y tejidos sometidos a grandes esfuerzos de cizalla, como es el caso del cartílago articular (Zhu et al. 1993; Bitar et al. 2007).

La tendencia general de los módulos en compresión y cizalla a aumentar con la concentración de agarosa es probablemente debida a los elevados valores del módulo de elasticidad a compresión, del módulo de almacenamiento y del módulo de pérdida que mostró el control de agarosa pura.

Resulta evidente en nuestros resultados que el incremento de la concentración de agarosa genera un aumento progresivo del módulo elástico de compresión, lo cual habría que relacionar con la mayor densidad de la agarosa en el constructo y con la demostrada capacidad de la misma para la retención de agua (Normand et al. 2000).

Por otra parte, nuestros resultados demuestran la existencia de un punto crítico de concentración de agarosa (0.2%) en lo que a las propiedades viscoelásticas de cizalla se refiere. En efecto, existe una relación lineal ascendente hasta dicha concentración, y una estabilización en relación con dichas propiedades a partir del 0.2% de concentración. Una posible hipótesis, que habrá que confirmar en el futuro, podría ser la asociación de la agarosa con la fibrina, incrementando los valores viscoelásticos, y una concentración de la agarosa al margen de la fibrina a partir del punto crítico de concentración antes referido. La relación fibrina-agarosa en el primer caso, y la concentración de agarosa en el segundo, podrían explicar el comportamiento biomecánico del material.

Por contra, todos los ensayos de tracción mostraron que la adición de agarosa provoca una disminución del módulo de elasticidad, del esfuerzo a rotura y de la deformación a rotura por tracción, hasta un valor asintótico que se alcanza aproximadamente al 0.3% de agarosa, dependiendo del grado de hidratación. Curiosamente, el efecto del contenido de agarosa estudiado en los ensayos de tracción se diferencia de los resultados obtenidos en pruebas de compresión y de cizalla.

Este hallazgo sugiere que las propiedades biomecánicas de los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa son fuertemente dependientes de la dirección de los esfuerzos aplicados a estos biomateriales, lo que implica que estos geles pueden ser anisotrópicos después de la nanoestructuración. En este sentido, trabajos anteriores han demostrado que las fibras de fibrina tienen la capacidad de distribuir las fuerzas a lo largo de la red de fibrillas cuando son sometidas a tracción, de manera que los esfuerzos pueden ser compartidos entre todas las fibrillas, lo que resulta en un endurecimiento secuencial de los hidrogeles de fibrina (Piechocka et al. 2010; Hudson et al. 2010). Por ello, es evidente que la dirección de las fibras dentro del biomaterial influirá en el comportamiento de la malla cuando ésta se somete a pruebas mecánicas.

Por esta razón, la diferente orientación de las muestras en los diferentes ensayos con respecto a la dirección de la presión de nanoestructuración, podría explicar estos resultados. Para ser precisos, en los ensayos de compresión, el esfuerzo se aplica en la misma dirección que las fuerzas de gravedad y de nanoestructuración, mientras que en las pruebas de tracción, el esfuerzo es aplicado perpendicularmente a estas fuerzas (Figura 9). Por lo tanto, en los ensayos de compresión, la capacidad de retención de agua de la agarosa, junto con la débil compresibilidad del agua, puede explicar por qué el mayor contenido de agarosa se asoció con los valores más altos del módulo de elasticidad. Por el contrario, los ensayos de tracción refuerzan la idea de que estos geles son anisotrópicos, lo cual quedó demostrado en los experimentos llevados a cabo para determinar la anisotropía. Cuando los hidrogeles nanoestructurados son sometidos a esfuerzos de tracción, la presencia de moléculas de agarosa unidas a las fibras de fibrina, según revela la microscopía electrónica de barrido, podría reducir la capacidad de la fibrina de distribuir la carga a través de la red fibrilar, limitando de este modo la capacidad de endurecimiento secuencial de los hidrogeles de fibrina. Por otro lado, la presencia de no homogeneidades, derivada de la adición de agarosa, podría influir en los resultados de los ensayos de tracción, que son muy sensibles a cualquier irregularidad en el biomaterial. En el caso de las pruebas de cizalla, las muestras fueron sometidas a esfuerzos de corte en un plano perpendicular a la dirección de las fuerzas de gravedad y de nanoestructuración (Figura 9). Muy probablemente, la presencia de agarosa con elevado contenido de agua refuerza la conexión entre diferentes capas de fibras de fibrina que, de otra manera, serían más libres para deslizarse unas sobre otras.

5.3 Efecto del tiempo de evolución en cultivo

Para evaluar la evolución temporal de los hidrogeles generados en esta Tesis Doctoral, se analizaron las propiedades biomecánicas y morfológicas de los biomateriales de fibrina-agarosa han sido analizadas durante 4 semanas desde el momento de su fabricación. Durante este tiempo de evaluación, no se apreciaron modificaciones significativas en ninguno de los parámetros biomecánicos analizados (módulos elásticos de tracción y compresión, esfuerzo y deformación a fractura por tracción, módulos de almacenamiento y de pérdida en cizalla), ni en la morfología de los biomateriales analizados mediante microscopía electrónica de barrido.

Estos resultados coinciden con los reportados en un artículo previo de nuestro grupo de investigación (Ionescu et al. 2011) donde se analizaron biomateriales de fibrina-agarosa nanoestructurados y no nanoestructurados (con un 0%, 0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3% de agarosa) con células estromales de la córnea humana, demostrándose que los módulos de almacenamiento y de pérdida de cizalla se mantenían constantes durante las primeras 4 semanas de evaluación, disminuyendo a partir de entonces.

Sin embargo, otros estudios sobre el efecto del tiempo sobre distintos biomateriales (colágeno, quitosano) hallaron modificaciones de las propiedades biomecánicas y morfológicas de los mismos con el tiempo de evolución en cultivo (Grover et al. 2012; Silva et al. 2013). En este sentido, el biomaterial de fibrina-agarosa carente de células utilizado en la presente Tesis Doctoral se configura como un biomaterial idóneo y estable en el tiempo, útil para su aplicación en protocolos de Ingeniería Tisular.

5.4 Demostración de la anisotropía

Como se indicó anteriormente, uno de los aspectos más importantes de un biomaterial es su diferente comportamiento ante distintas fuerzas que inciden sobre el mismo (esfuerzos dirigidos en diferentes direcciones). Mientras los biomateriales isotrópicos responden de igual manera independientemente de la dirección de la fuerza (por ejemplo, los hidrogeles de colágeno no comprimidos plásticamente), los biomateriales anisotrópicos se comportan de distinta forma según la dirección de las fuerzas aplicadas (por ejemplo los polímeros con fibras alineadas en paralelo) (Harley et al. 2007; Fratzi 2008; Fujimura et al. 2008; Namani et al. 2009; Davidenko et al. 2012).

En este sentido, nuestros resultados demostraron que los hidrogeles de fibrina-agarosa utilizados en esta Tesis Doctoral presentaban carácter anisotrópico, al menos en la formulación experimentada en esta Tesis Doctoral (fibrina-agarosa con un 0.5% de agarosa y 90% de hidratación). Futuros estudios deberán llevarse a cabo para demostrar la anisotropía de otras formulaciones de este biomaterial. Estos resultados confirman nuestra hipótesis previa, según la cual las fibras del biomaterial se orientan en un plano concreto después de la nanoestructuración, lo que implica la existencia de anisotropía y, por tanto, la distinta respuesta del biomaterial ante las fuerzas que se ejercen en distintas direcciones. En ingeniería tisular, resulta evidente la necesidad de tener en cuenta esta propiedad a la hora de diseñar los prototipos artificiales de los distintos tejidos nativos.

5.5 Comportamiento de los hidrogeles de fibrina-agarosa bajo esfuerzos de tracción

Los esfuerzos de tracción constituyen fuerzas muy relevantes en la biomecánica corporal y, por tanto, afectan muy significativamente a los tejidos humanos. Los tejidos artificiales a desarrollar por ingeniería tisular deben adquirir propiedades similares a los tejidos nativos en relación al sometimiento a las fuerzas de tracción.

Trabajos previos han demostrado que las fibras de fibrina individuales son extraordinariamente extensibles y elásticas, con una media de deformación a rotura del 332% (Liu et al. 2006). Sin embargo, las membranas de fibrina experimentan fractura a valores de deformación inferiores (del orden del 100-200%) al rango obtenido en esta Tesis Doctoral. Los hidrogeles de fibrina ensayados en nuestro estudio mostraron una deformación media a fractura entre el 80%, para las muestras no nanoestructuradas, y el 200%, en el caso de las muestras nanoestructuradas. Ello implica una mayor resistencia a la tracción de los constructos nanoestructurados y sugiere su uso como sustituto idóneo de determinados tejidos orgánicos. El mismo fenómeno se reproduce en nuestro estudio cuando utilizamos hidrogeles de fibrina-agarosa con distintos niveles de hidratación o con distintas concentraciones de agarosa, lo que permite unir en este ámbito las ventajas inherentes a la presencia de la agarosa a las propiedades de la nanoestructuración arriba descritas.

Aunque sean muy elásticas, distintos investigadores demostraron que las fibras de fibrina presentan un módulo de Young pequeño, en comparación con las fibras de otros polímeros naturales. Concretamente, un grupo de fibras de fibrina entrecruzadas presenta un módulo de Young de 1-10 MPa (Collet et al. 2005), mientras que un grupo de fibras de colágeno entrecruzadas posee un valor de módulo de Young en el rango de 5000-7500 MPa (Guthold et al. 2007). Sin embargo, desde un punto de vista biológico, la fibrina, a pesar de su menor módulo de Young, posee un importante conjunto de propiedades vinculadas a mecanismos básicos necesarios para la construcción tisular (biocompatibilidad, biodisponibilidad, posibilidad de utilización autóloga, ausencia de retracción).

En este trabajo de Tesis Doctoral, el valor medio del módulo de Young calculado para los geles de fibrina no nanoestructurados ($E=0.01155$ MPa) está en el mismo orden de magnitud que el valor calculado por Benkherourou y cols. ($E=0.00649$ MPa) (Benkherourou et al. 2000). Sin embargo, las distintas aportaciones biotecnológicas realizadas en esta Tesis Doctoral (control regulado de hidratación y de concentración de la agarosa) han permitido generar hidrogeles de fibrina con mayor módulo de Young, de posible utilidad en Ingeniería Tisular.

5.6 Comportamiento de los hidrogeles de fibrina-agarosa bajo esfuerzos de compresión

Al igual que la tracción, las fuerzas de compresión constituyen fuerzas relevantes que afectan a los tejidos humanos. En este sentido, Haugh y cols. demostraron que la aplicación de métodos de compresión plástica a los hidrogeles de fibrina con condrocitos puede aumentar el módulo elástico de compresión de estos constructos (Haugh et al. 2012). En este trabajo, los hidrogeles fueron ensayados bajo compresión al día 0 después de la fabricación y mostraron un módulo elástico de compresión, calculado al 2-5% de deformación, con unos valores de 0.005 MPa y 0.013 MPa, asociados respectivamente, a los constructos sometidos o no a compresión plástica.

Los valores calculados por Haugh y cols. son superiores a los resultados obtenidos en nuestro trabajo en el caso de las muestras no nanoestructuradas. Esto podría deberse, en parte, al hecho que los geles de fibrina descritos por Haugh y cols. fueron fabricados a partir de fibrinógeno purificado (con una concentración de fibrinógeno en los hidrogeles de 40 mg/ml), mientras que las muestras de nuestro trabajo se produjeron gelificando directamente el plasma humano, que contiene entre 1.5 y 4.5 mg/ml de fibrinógeno (Kamath & Lip 2003). De hecho, Eyrich y cols. demostraron que las propiedades biomecánicas de los geles de fibrina varían mucho al cambiar la concentración de fibrinógeno (Eyrich et al. 2007). Aunque la concentración de fibrinógeno en nuestras muestras sea inferior, los geles producidos en esta Tesis Doctoral y nanoestructurados mostraron un valor de módulo elástico de compresión más elevado en el caso de muestras con grados de hidratación inferiores y concentraciones de agarosa superiores. De nuevo, nuestros resultados demuestran que tanto el control de la hidratación, como la concentración de agarosa, utilizados en la generación de nuestros constructos, permiten que los mismos alcancen mayores niveles de resistencia a fuerzas de compresión que los modelos arriba descritos.

El modelo de constructo sustentado en fibrina-agarosa nanoestructurada, en las distintas formulaciones descritas en el capítulo de Resultados de esta Tesis Doctoral, podría ser útil para la reproducción biomimética de tejidos humanos sometidos a importantes esfuerzos de compresión, como el hueso.

5.7 Comportamiento de los hidrogeles de fibrina-agarosa bajo esfuerzos de cizalla (análisis reológico)

Los esfuerzos de cizalla son importantes en tejidos humanos sometidos a esfuerzos rotatorios, como ocurre por ejemplo en el cartílago articular. En trabajos previos del grupo de investigación, se estudió el comportamiento viscoelástico de biomateriales de fibrina-agarosa con queratocitos humanos sometidos a esfuerzos de cizalla (Ionescu et al. 2011), con concentraciones variables de fibrina y agarosa. Sin embargo, hasta la fecha no existía ningún estudio reológico de este biomaterial con diferentes grados de hidratación.

Como se describió en el capítulo de los Resultados, el control del grado de hidratación y de la concentración de agarosa es capaz de modificar significativamente tanto G' como G'' . Hemos observado que G' es siempre mayor que G'' a la frecuencia de 1 Hz, lo cual significa que estos materiales son más elásticos que viscosos, en todos los casos. Hemos observado, además, un comportamiento diferente dependiendo del grado de hidratación de los biomateriales. Los constructos de fibrina-agarosa con un 80% de hidratación mostraron los valores más altos de G' y G'' . Como se observó en el caso del módulo de Young y del módulo elástico de compresión, los biomateriales nanoestructurados mostraron valores más elevados de los módulos reológicos de almacenamiento y pérdida, lo cual significa que estos hidrogeles son más elásticos y viscosos.

Los valores obtenidos para los biomateriales no nanoestructurados son parecidos a los valores previamente publicados por Ionescu y cols. (Ionescu et al. 2011). Con respecto a los constructos nanoestructurados, los valores máximos de G' y G'' obtenidos en esta Tesis Doctoral fueron iguales a 5000 Pa y 600 Pa, respectivamente. En comparación con los valores máximos de G' y G'' obtenidos por Rodríguez y cols. ($G'=40$ Pa, $G''=10$ Pa) y Ionescu y cols. ($G'=350$ Pa, $G''=30$ Pa), nuestros valores representan un aumento muy importante de ambos módulos viscoelásticos, demostrando que los constructos de fibrina-agarosa podrían ser utilizados en futuro para nuevas aplicaciones de ingeniería tisular en las que se necesite un biomaterial con mayores módulos viscoelásticos.

5.8 Aplicaciones potenciales de hidrogeles de fibrina-agarosa en ingeniería tisular

El biomaterial de fibrina-agarosa ha demostrado su utilidad como sustrato para cultivo celular y tisular en ingeniería tisular, debido a su biocompatibilidad y a la presencia de receptores de unión celular en su microestructura. Por lo tanto, desde el punto de vista biológico, los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa son adecuados para generar constructos para la regeneración de tejidos. Sin embargo, aunque trabajos anteriores demostraron que los valores de los módulos viscoelásticos en cizalla de hidrogeles de fibrina-agarosa al 0.1% de agarosa nanoestructurados y no nanoestructurados son comparables a los de la córnea porcina y los de la mucosa oral humana (Ionescu et al. 2011; Rodriguez et al. 2012), el potencial de la fibrina-agarosa para aplicaciones precisas dependerá de las propiedades biomecánicas del tejido nativo que va a ser reemplazado, los cuales deben ser imitados por los hidrogeles artificiales.

La posibilidad de modulación de sus propiedades biomecánicas hace que los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa sean candidatos potenciales para su utilización en un buen número de aplicaciones en ingeniería tisular. A este respecto, como se describió en el capítulo Resultados, los módulos viscoelásticos de algunos tejidos nativos se encuentran dentro de los rangos existentes en nuestros hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa (Nasseri et al. 2002; Geerligts & Peters 2008; Green et al. 2008; Vanderhooft et al. 2009; Sharif-Kashani et al. 2011; Hatami-Marbini 2014). Tejidos humanos como córnea, mucosa oral, cerebro e hígado presentan valores de módulos viscoelásticos en el rango de los valores de los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa analizados en el presente trabajo, lo que sugiere que el modelo de fibrina-agarosa podría ser utilizado para la sustitución eficiente de estos tipos de tejidos desde un punto de vista biomecánico (Chan & Titze 1999; Vanderhooft et al. 2009; Ionescu et al. 2011). Otra potencial aplicación de los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa es su uso como rellenos de tejidos blandos en cirugía, una aplicación que podría beneficiarse de la alta capacidad de retención de agua de agarosa (Stellwagen & Stellwagen 1995). Es importante tener en cuenta que los módulos viscoelásticos de los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa generados en esta Tesis Doctoral, se encuentran en el rango de valores previamente descritos para los rellenos de tejidos blandos comerciales (Sundaram et al. 2010).

Además, los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa generados en esta Tesis Doctoral poseen valores de módulo de Young y módulo elástico de compresión que coinciden con los de algunos tejidos nativos, incluyendo hígado, músculo, riñones, cuello uterino, mama y arterias, lo que refuerza la utilidad potencial de estos biomateriales (Levental et al. 2007; Wells & Liang 2011).

Además de estos tejidos, los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa podrían ser utilizados con éxito como matrices para la regeneración de otros tejidos humanos. Por ejemplo, aunque los valores del módulo de almacenamiento bajo cizalla de los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa son más bajos que los descritos en la literatura para el cartílago nativo ($G' \sim 0.03$ MPa) (Stolz et al. 2004), el uso de concentraciones de agarosa por encima de 0.5%, utilizada en esta Tesis Doctoral, podría contribuir a la generación de hidrogeles adecuados para la regeneración del cartílago. De hecho, existen estudios en los que se utilizan biomateriales de fibrina o agarosa para la regeneración de algunos modelos de cartílago (Chien et al. 2012). Los hidrogeles de fibrina y fibrina-agarosa podrían utilizarse también para la regeneración de la piel o del tejido adiposo subcutáneo, a pesar de que el valor de los módulos viscoelásticos de la piel ($G' \sim 2$ MPa) y del tejido adiposo subcutáneo ($G' \sim 0.01$ MPa, $G'' \sim 0.005$ MPa) son superiores a los valores medidos en los hidrogeles de fibrina-agarosa (Geerligts & Peters 2008). Como se ha indicado anteriormente, los módulos viscoelásticos de los hidrogeles de fibrina-agarosa podrían aumentar por encima de los valores obtenidos en la presente Tesis Doctoral, al aumentar el contenido de agarosa o reducir la concentración de agua. Trabajos futuros deben determinar la utilidad y la biocompatibilidad de estos tipos de hidrogeles para otras aplicaciones, así como su viabilidad a través de sucesivos ensayos preclínicos y clínicos.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- 1- La metodología desarrollada en esta Tesis Doctoral permite el diseño y la elaboración de un modelo de tejido artificial nanoestructurado generado con biopolímeros de fibrina-agarosa, en el que resulta posible controlar el grado de hidratación y la concentración de agarosa. El control de ambos parámetros permite la obtención de tejidos artificiales nanoestructurados específicos en relación con la terapia tisular a utilizar.
- 2- La concentración de agarosa, en el modelo de tejido artificial diseñado, presenta una relación directa con los módulos biomecánicos bajo esfuerzos de compresión y cizalla, y una relación inversa con el módulo de resistencia a la tracción. Ello implica que el incremento de la concentración de agarosa en el biomaterial permite generar tejidos con mayor capacidad de resistencia a las fuerzas rotatorias y a las fuerzas compresivas. Por el contrario, un tejido con mayor resistencia a las fuerzas de tracción paralelas al eje mayor del tejido puede lograrse disminuyendo la concentración de agarosa.
- 3- El grado de hidratación, en el modelo de tejido artificial diseñado, presenta una relación inversa con el conjunto de módulos biomecánicos evaluados en esta Tesis Doctoral. De este modo, la disminución del grado de hidratación en el biomaterial permite generar tejidos con mayor resistencia tanto a las fuerzas rotatorias de cizalla, como a las fuerzas de compresión y de tracción que se ejercen en dirección perpendicular o paralela al eje mayor del tejido.
- 4- El análisis de las propiedades biomecánicas de los modelos de tejidos artificiales generados con biopolímeros de fibrina-agarosa nanoestructurados permite seleccionar formulaciones del biomaterial con propiedades biomecánicas semejantes a las de los tejidos humanos. La formulación del biomaterial a seleccionar deberá estar en relación con las propiedades biomecánicas del tejido artificial a generar.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou Neel, E.A. et al., 2006. Use of multiple unconfined compression for control of collagen gel scaffold density and mechanical properties. *Soft Matter*, 2(11), p.986. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b609784g> [Accessed July 12, 2013].
- Aernouts, J., Aerts, J.R.M. & Dirckx, J.J.J., 2012. Mechanical properties of human tympanic membrane in the quasi-static regime from in situ point indentation measurements. *Hearing research*, 290(1-2), pp.45–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22583920> [Accessed March 23, 2014].
- Ahearne, M. et al., 2008. Mechanical characterisation of hydrogels for tissue engineering applications R. R. Ashammakhi N Chiellini F, ed. *Topics Tissue Eng.* Available at: http://www.oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e_vol4/abstracts/ahearne.pdf [Accessed November 7, 2012].
- Ahmed, T.A.E., Dare, E. V & Hincke, M., 2008. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 14(2), pp.199–215. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18544016> [Accessed January 27, 2014].
- Al, H.E.T. et al., 2014. Year in Review Tissue Engineering and Regenerative Medicine : A Year in Review. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 20(1), pp.1–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24410501> [Accessed January 22, 2014].
- Alaminos, M. et al., 2006. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(8), pp.3311–3317. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16877396>.
- Benkherourou, M. et al., 2000. Quantification and macroscopic modeling of the nonlinear viscoelastic behavior of strained gels with varying fibrin concentrations. *IEEE transactions on bio-medical engineering*, 47(11), pp.1465–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11077740>.
- Bitar, M. et al., 2007. Effect of multiple unconfined compression on cellular dense collagen scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 18(2), pp.237–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17323154> [Accessed November 6, 2012].
- Campos, A., 2004. Cuerpo, Histología y Medicina. De la Descripción Microscópica a la Ingeniería Tisular. In *Discurso de Ingreso en la Real Academia Nacional de Medicina*. Madrid: Real Academia Nacional de Medicina.
- Carriel, V. et al., 2013. Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *Journal of neural engineering*, 10(2), p.026022. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23528562> [Accessed April 1, 2013].
- Carriel, V. et al., 2012. Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *Cells Tissues Organs*, 196(1), pp.1–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22146480>.
- Carriel, V. et al., 2014. Tissue engineering of the peripheral nervous system. *Expert review of neurotherapeutics*, 14(3), pp.301–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24506662> [Accessed February 18, 2014].

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOMECÁNICAS DE TEJIDOS ARTIFICIALES
ELABORADOS CON BIOPOLÍMEROS PARA SU UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

- Chan, R.W. & Titze, I.R., 1999. Viscoelastic shear properties of human vocal fold mucosa: measurement methodology and empirical results. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 106(4 Pt 1), pp.2008–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10530024> [Accessed April 14, 2013].
- Chien, C. et al., 2012. Incorporation of exudates of human platelet-rich fibrin gel in biodegradable fibrin scaffolds for tissue engineering of cartilage. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 100(4), pp.948–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22279009> [Accessed April 16, 2013].
- Collet, J.-P. et al., 2005. The elasticity of an individual fibrin fiber in a clot. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), pp.9133–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1166643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Davidenko, N. et al., 2012. Biomimetic collagen scaffolds with anisotropic pore architecture. *Acta biomaterialia*, 8(2), pp.667–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22005330> [Accessed April 10, 2013].
- Dee, K.C., Puleo, D.A. & Bizios, R., 2003. *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions*, Wiley. Available at: <http://books.google.com/books?id=V-Ola9wJte8C&pgis=1> [Accessed November 14, 2012].
- Diekman, B.O. et al., 2012. Cartilage tissue engineering using differentiated and purified induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(47), pp.19172–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3511083&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 22, 2014].
- Drury, J.L. & Mooney, D.J., 2003. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24(24), pp.4337–4351. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12922147>.
- Dvir, T. et al., 2011. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature nanotechnology*, 6(1), pp.13–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21151110> [Accessed January 23, 2014].
- Elsheikh, A., Alhasso, D. & Rama, P., 2008. Biomechanical properties of human and porcine corneas. *Experimental eye research*, 86(5), pp.783–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18396276> [Accessed May 6, 2014].
- Eyrich, D. et al., 2007. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials*, 28(1), pp.55–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16962167> [Accessed November 20, 2012].
- Fernández-Segura, E. et al., 1999. Changes in Elemental Content During Apoptotic Cell Death Studied by Electron Probe X-Ray Microanalysis. *Experimental Cell Research*, 253(2), pp.454–462. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482799946578> [Accessed January 3, 2014].
- Fisher, J.P., 2007. *Tissue Engineering* J. P. Fisher, ed., Boston, MA: Springer US. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-34133-0_24 [Accessed November 19, 2012].
- Fisher, M.B. & Mauck, R.L., 2013. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Recent Innovations and the Transition to Translation*. Available at:

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOMECÁNICAS DE TEJIDOS ARTIFICIALES
ELABORADOS CON BIOPOLÍMEROS PARA SU UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.TEB.2012.0723?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub=pubmed [Accessed November 24, 2013].

- Fratzl, P., 2008. *Collagen: Structure and Mechanics*, Springer. Available at: <http://books.google.es/books?id=dyWFTqEtXXwC>.
- Fujimura, Y., Tada, T. & Iino, M., 2008. Anisotropic Young's modulus on magnetically ordered agarose gel. *Journal of Applied Physics*, 104(12), p.123526. Available at: <http://link.aip.org/link/JAPIAU/v104/i12/p123526/s1&Agg=doi> [Accessed April 16, 2013].
- Garzón, I. et al., 2013. Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration. *Stem cells translational medicine*, 2(8), pp.625–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23817131> [Accessed January 22, 2014].
- Geerligs, M. & Peters, G., 2008. Linear viscoelastic behavior of subcutaneous adipose tissue. *Biorheology*. Available at: <http://iospress.metapress.com/index/f7713285766r17ju.pdf> [Accessed May 24, 2013].
- Gonfiotti, A. et al., 2014. The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results. *Lancet*, 383(9913), pp.238–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24161821> [Accessed January 26, 2014].
- Gonzalez-Andrades, M. et al., 2011. Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(1), pp.215–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20739475> [Accessed February 6, 2011].
- Green, M.A.M., Bilston, L.E. LE & Sinkus, R., 2008. In vivo brain viscoelastic properties measured by magnetic resonance elastography. *NMR in Biomedicine*, (May), pp.755–764. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/nbm.1254/abstract> [Accessed March 14, 2013].
- Grover, C.N., Cameron, R.E. & Best, S.M., 2012. Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 10, pp.62–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22520419> [Accessed November 20, 2012].
- Guthold, M. et al., 2007. A comparison of the mechanical and structural properties of fibrin fibers with other protein fibers. *Cell biochemistry and biophysics*, 49(3), pp.165–81. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3010386&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 21, 2012].
- Hadjipanayi, E. et al., 2011. Mechanisms of structure generation during plastic compression of nanofibrillar collagen hydrogel scaffolds: towards engineering of collagen. *J Tissue Eng Regen Med*, 5(7), pp.505–519. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21695792>.
- Harley, B.A. et al., 2007. Mechanical characterization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Acta biomaterialia*, 3(4), pp.463–74. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2006.12.009> [Accessed November 9, 2012].
- Hatami-Marbini, H., 2014. Viscoelastic shear properties of the corneal stroma. *Journal of biomechanics*, 47(3), pp.723–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24368145> [Accessed April 2, 2014].

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOMECÁNICAS DE TEJIDOS ARTIFICIALES
ELABORADOS CON BIOPOLÍMEROS PARA SU UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

- Haugh, M.G. et al., 2012. The application of plastic compression to modulate fibrin hydrogel mechanical properties. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 16, pp.66–72. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1751616112002676> [Accessed November 9, 2012].
- Hudson, N.E. et al., 2010. Stiffening of individual fibrin fibers equitably distributes strain and strengthens networks. *Biophys J*, 98(8), pp.1632–1640. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20409484>.
- Ionescu, A.M. et al., 2011. Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: rheological properties. *J Mech Behav Biomed Mater*, 4(8), pp.1963–1973. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22098895>.
- Jaklenec, A. et al., 2012. Progress in the tissue engineering and stem cell industry “are we there yet?” *Tissue Engineering ...*, 18(3). Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.TEB.2011.0553> [Accessed November 24, 2013].
- Kamath, S. & Lip, G.Y.H., 2003. Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. *Qjm*, 96(10), pp.711–729. Available at: <http://www.qjmed.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/qjmed/hcg129> [Accessed November 27, 2012].
- Khamdaeng, T. et al., 2012. Arterial stiffness identification of the human carotid artery using the stress-strain relationship in vivo. *Ultrasonics*, 52(3), pp.402–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22030473> [Accessed April 29, 2014].
- Kim, S.-H., Turnbull, J. & Guimond, S., 2011. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *The Journal of endocrinology*, 209(2), pp.139–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21307119> [Accessed March 4, 2013].
- Knapp, D.M., Barocas, V.H. & Moon, A.G., 1997. Rheology of reconstituted type I collagen gel in confined compression. , (October), pp.971–993.
- Langer, R. & Vacanti, J.P., 1993. Tissue engineering. *Science*, 260(5110), pp.920–926.
- Lee, K.Y. & Mooney, D.J., 2001. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev*, 101(7), pp.1869–1879. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11710233>.
- Levental, I., Georges, P.C. & Janmey, P. a., 2007. Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter*, 3(3), pp.299–306. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b610522j> [Accessed February 27, 2013].
- Lisi, A. et al., 2012. A combined synthetic-fibrin scaffold supports growth and cardiomyogenic commitment of human placental derived stem cells. *PLoS one*, 7(4), p.e34284. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3317941&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 3, 2014].
- Liu, W. et al., 2006. Fibrin fibers have extraordinary extensibility and elasticity. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5787), p.634. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1950267&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOMECÁNICAS DE TEJIDOS ARTIFICIALES
ELABORADOS CON BIOPOLÍMEROS PARA SU UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

- Liu, Z. & Bilston, L., 2000. On the viscoelastic character of liver tissue: experiments and modelling of the linear behaviour. *Biorheology*, 37(3), pp.191–201. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11026939> [Accessed May 9, 2014].
- Marklein, R. a & Burdick, J. a, 2010. Controlling stem cell fate with material design. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 22(2), pp.175–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20217683> [Accessed January 22, 2014].
- Mauck, R.L., Yuan, X. & Tuan, R.S., 2006. Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*, 14(2), pp.179–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16257243> [Accessed January 30, 2014].
- Miller, J.S.J. et al., 2012. Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues. *Nature materials*, 11(9), pp.768–74. Available at: <http://www.nature.com/nmat/journal/vaop/ncurrent/full/nmat3357.html> [Accessed January 22, 2014].
- Mosesson, M.W., 2005. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*, 3(8), pp.1894–1904. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102057>.
- Mosesson, M.W., Siebenlist, K.R. & Meh, D.A., 2001. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 936, pp.11–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11460466> [Accessed November 19, 2012].
- Namani, R. et al., 2009. Anisotropic mechanical properties of magnetically aligned fibrin gels measured by magnetic resonance elastography. *Journal of Biomechanics*, 42(13), pp.2047–2053. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2756967&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nasseri, S., Bilston, L.E. LE & Phan-Thien, N., 2002. Viscoelastic properties of pig kidney in shear, experimental results and modelling. *Rheologica acta*, (2002), pp.180–192. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s003970200017> [Accessed May 24, 2013].
- Nava, A. et al., 2008. In vivo mechanical characterization of human liver. *Medical image analysis*, 12(2), pp.203–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171633> [Accessed May 9, 2014].
- Nisbet, D.R. et al., 2008. Neural tissue engineering of the CNS using hydrogels. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 87(1), pp.251–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18161806> [Accessed March 22, 2013].
- Normand, V. et al., 2000. New insight into agarose gel mechanical properties. *Biomacromolecules*, 1(4), pp.730–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11710204> [Accessed November 23, 2012].
- Orwin, E.J., Borene, M.L. & Hubel, A., 2003. Biomechanical and optical characteristics of a corneal stromal equivalent. *J Biomech Eng*, 125(4), pp.439–444. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12968568>.
- Patterson, J., Martino, M.M. & Hubbell, J. a., 2010. Biomimetic materials in tissue engineering. *Materials Today*, 13(1-2), pp.14–22. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369702110700134> [Accessed November 6, 2012].

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOMECÁNICAS DE TEJIDOS ARTIFICIALES
ELABORADOS CON BIOPOLÍMEROS PARA SU UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

- Piechocka, I.K. et al., 2010. Structural hierarchy governs fibrin gel mechanics. *Biophys J*, 98(10), pp.2281–2289. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20483337>.
- Pratt, K.P. et al., 1997. The primary fibrin polymerization pocket: three-dimensional structure of a 30-kDa C-terminal gamma chain fragment complexed with the peptide Gly-Pro-Arg-Pro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14), pp.7176–81. Available at: <http://www.pnas.org/content/94/14/7176.short> [Accessed May 19, 2014].
- Ratner, B.D. et al., 2004. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Elsevier Science. Available at: <http://books.google.es/books?id=9PMU1iYGe34C>.
- Ratner, B.D. et al., 2012. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press. Available at: <http://books.google.com/books?id=8hBq-dLLaxwC&pgis=1> [Accessed January 23, 2014].
- Rodriguez, I.A. et al., 2012. Rheological characterization of human fibrin and fibrin-agarose oral mucosa substitutes generated by tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*, 6(8), pp.636–644. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21916018>.
- Rosenblatt, J., Devereux, B. & Wallace, D.G., 1994. Injectable collagen as a pH-sensitive hydrogel. *Biomaterials*, 15(12), pp.985–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7841296> [Accessed May 9, 2014].
- Sanchez-Quevedo, M.C. et al., 2007. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol*, 22(6), pp.631–640. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17357093>.
- Sharif-Kashani, P. et al., 2011. Rheology of the vitreous gel: effects of macromolecule organization on the viscoelastic properties. *Journal of biomechanics*, 44(3), pp.419–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21040921> [Accessed February 28, 2013].
- Shin, H., Jo, S. & Mikos, A.G.A., 2003. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, 24(24), pp.4353–4364. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961203003399> [Accessed November 7, 2013].
- Silva, S.S. et al., 2013. An investigation of the potential application of chitosan/aloë-based membranes for regenerative medicine. *Acta Biomaterialia*, null(null). Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.02.027> [Accessed March 2, 2013].
- Slaughter, B. V et al., 2009. Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 21(32-33), pp.3307–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20882499> [Accessed April 28, 2014].
- Stellwagen, J. & Stellwagen, N.C., 1995. Internal Structure of the Agarose Gel Matrix. *The Journal of Physical Chemistry*, 99(12), pp.4247–4251. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100012a054>.
- Stolz, M. et al., 2004. Dynamic elastic modulus of porcine articular cartilage determined at two different levels of tissue organization by indentation-type atomic force microscopy. *Biophysical journal*, 86(5), pp.3269–83. Available at: [http://www.cell.com/biophysj/fulltext/S0006-3495\(04\)74375-1](http://www.cell.com/biophysj/fulltext/S0006-3495(04)74375-1) [Accessed March 21, 2013].

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOMECÁNICAS DE TEJIDOS ARTIFICIALES
ELABORADOS CON BIOPOLÍMEROS PARA SU UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

- Sundaram, H. et al., 2010. Comparison of the rheological properties of viscosity and elasticity in two categories of soft tissue fillers: calcium hydroxylapatite and hyaluronic acid. *Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]*, 36 Suppl 3, pp.1859–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20969663> [Accessed April 16, 2013].
- Van Blitterswijk, C. A. et al., 2008. Natural Polymers in tissue engineering applications. In *Tissue Engineering*. pp. 145–192. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123708694000069> [Accessed November 13, 2013].
- Van Blitterswijk, C.A., Moroni, L. & Rouwkema, J., 2008. *Tissue Engineering (Academic Press Series in Biomedical Engineering)* Van Blitterswijk et al., eds., Academic Press. Available at: <http://www.amazon.com/Tissue-Engineering-Academic-Series-Biomedical/dp/0123708699> [Accessed November 14, 2012].
- Vanderhooft, J.L. et al., 2009. Rheological properties of cross-linked hyaluronan-gelatin hydrogels for tissue engineering. *Macromolecular bioscience*, 9(1), pp.20–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2711643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 24, 2013].
- Villar, G., Graham, A.A.D. & Bayley, H., 2013. A tissue-like printed material. *Science (New York, N.Y.)*, 340(6128), pp.48–52. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/340/6128/48.short> [Accessed January 22, 2014].
- Wells, P.N.T. & Liang, H.-D., 2011. Medical ultrasound: imaging of soft tissue strain and elasticity. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 8(64), pp.1521–49. Available at: <http://rsif.royalsocietypublishing.org/content/8/64/1521.abstract?sid=16045040-3724-42fb-b122-8d7f13b7f403> [Accessed June 2, 2013].
- Williams, D.F., 1987. *Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986*, Elsevier. Available at: <http://books.google.es/books?id=6zdrAAAAMAAJ>.
- Zhu, W. et al., 1993. Viscoelastic shear properties of articular cartilage and the effects of glycosidase treatments. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 11(6), pp.771–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8283321> [Accessed May 9, 2014].