



**Universidad de Granada**  
***Facultad de Medicina***  
***Departamento de Histología***

**GENERATION OF BIOMIMETIC TISSUE-LIKE BIOMATERIALS WITH CONTROLLED  
BIOMECHANICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES FOR TISSUE ENGINEERING  
APPLICATIONS**

**TESIS DOCTORAL**

**Fernando Campos Sánchez**  
**Programa de Doctorado de Biomedicina**  
**Granada, 2017**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Fernando Campos Sánchez  
ISBN: 978-84-9163-103-3  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/44886>



**Universidad de Granada**  
**Facultad de Medicina**  
**Departamento de Histología**

**GENERATION OF BIOMIMETIC TISSUE-LIKE BIOMATERIALS WITH CONTROLLED  
BIOMECHANICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES FOR TISSUE ENGINEERING  
APPLICATIONS**

Memoria que presenta el Graduado y Máster en Ingeniería Tisular Fernando Campos  
Sánchez para aspirar al título de Doctor

Fdo: Fernando Campos Sánchez

**Director**

Prof. Dr. Víctor Sebastián Carriel Araya  
Doctor en Biomedicina  
Universidad de Granada, España

**Director**

Prof. Dr. Miguel Alaminos Mingorance  
Doctor en Medicina y Cirugía  
Doctor en Ciencias Biológicas  
Universidad de Granada, España

El doctorando / The *doctoral candidate* [ **Fernando Campos Sánchez** ] y los directores de la tesis / and the thesis supervisor/s: [ **D. Miguel Alaminos Mingorance y D. Victor Sebastian Carriel Araya** ]

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.

/

*Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.*

Lugar y fecha / Place and date:

Granada, 5 de Enero 2017

Director/es de la Tesis / *Thesis supervisor/s*;

Doctorando / *Doctoral candidate*:



Firma / Signed



Firma / Signed

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el marco del Plan Propio de investigación de la Universidad de Granada (programa 6B) de contratos predoctorales con la Fundación San Francisco Javier y Santa Cándida (Ref. 4028/15). La tesis ha sido financiada asimismo parcialmente por el Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular CTS-115 y por los proyectos FIS PI14/955, PI14/2110, PI14/1343 y PI15/2048 del *Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I + D + I)*, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía e Innovación (cofinanciados por fondos FEDER, UE) y SAS PI-0653-2013 de la Fundación Progreso y Salud, Consejería de Salud, Junta de Andalucía, España.

# ÍNDICE

I Resumen .....	1
II Summary .....	3
III Introducción .....	5
1 Estado del arte .....	7
1.1 Ingeniería Tisular .....	8
1.2 Composición y estructura de los tejidos artificiales .....	9
1.2.1 Células.....	10
1.2.2 Factores de crecimiento.....	12
1.2.3 Biomateriales .....	13
1.2.3.1 Definición y características de los biomateriales en ingeniería tisular .....	13
1.2.3.2 Clasificación de los biomateriales .....	14
1.2.3.3 Técnicas para la generación de los biomateriales.....	16
1.2.3.4 Métodos de biofabricación .....	17
1.2.3.4.1 Nanoestructuración .....	18
1.2.3.4.2 Entrecruzamiento.....	19
1.3 Controles de calidad en ingeniería tisular.....	23
1.3.1 Controles de calidad de la función celular .....	23
1.3.2 Caracterización biológica y biomecánica de biomateriales .....	25
1.4 Hidrogeles de fibrina-agarosa en ingeniería tisular.....	27
1.4.1 Estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	29
1.4.2 Ensayos clínicos .....	29
1.4.3 Ventajas, desventajas y aplicaciones futuras de la fibrina-agarosa.....	30
2 Objetivos .....	33
3 Metodología .....	35
3.1 Generación de hidrogeles de fibrina-agarosa (HFA).....	36
3.2 Nanoestructuración de hidrogeles de fibrina-agarosa (NHFA) .....	37
3.3 Entrecruzamiento de HFA y NHFA mediante los agentes químicos glutaraldehído y genipín .....	37
3.4 Evaluación por microscópica óptica y electrónica de barrido (MEB) del efecto del entrecruzamiento químico en los HFA y NHFA .....	39
3.5 Análisis cuantitativo de la porosidad.....	40
3.6 Caracterización reológica .....	40
3.7 Biocompatibilidad <i>ex vivo</i> .....	45
3.7.1 Generación de cultivos primarios de fibroblastos humanos .....	45
3.7.2 Ensayo de viabilidad celular <i>Live/Dead</i> .....	46
3.7.3 Evaluación de la interacción célula-biomaterial por MEB .....	47
3.7.4 Determinación de la actividad de deshidrogenasas mitocondriales (WST-1) .....	47
3.7.5 Cuantificación de la liberación de ADN .....	48
3.8 Análisis cuantitativo y estadístico .....	48
4 Resultados.....	50
4.1 Resultados del efecto del entrecruzamiento con glutaraldehído en los HFA y NHFA.....	51
4.1.1 Análisis estructural .....	51
4.1.2 Análisis reológico.....	54
4.1.3 Análisis de biocompatibilidad <i>ex vivo</i> .....	59
4.2 Resultados del efecto del entrecruzamiento con genipín en los HFA y NHFA .....	64
4.2.1 Análisis estructural .....	64
4.2.2 Análisis reológico.....	67
4.2.3 Análisis de biocompatibilidad <i>ex vivo</i> .....	72
4.3 Resultado del análisis comparativo de las muestras sometidas a glutaraldehído y genipín ...	78
4.3.1 Análisis estructural .....	78
4.3.2 Análisis reológico.....	80
4.3.3 Análisis de biocompatibilidad <i>ex vivo</i> .....	83
5 Discusión .....	84
6 Conclusiones .....	94
7 Conclusions .....	98
8 Bibliografía .....	102

## I. RESUMEN

La elaboración de tejidos artificiales, cada vez más biomiméticos y biocompatibles con los tejidos corporales, constituye el objetivo básico de la ingeniería tisular. En tal sentido, los procesos de biofabricación y de funcionalización de los biomateriales que forman parte de los tejidos artificiales constituyen un objeto preferente de investigación en este campo, al considerarse dichos biomateriales componentes activos y determinantes en las distintas propiedades que van a desempeñar los nuevos tejidos. La reciente generación de un hidrogel de fibrina-agarosa con gran aplicación a la ingeniería tisular ha estimulado la investigación de procesos de mejora de sus propiedades para su aplicación a distintas situaciones terapéuticas.

En la presente Tesis Doctoral, con el objeto de generar nuevos modelos tisulares más biomiméticos, se desarrollan dos modelos tisulares constituidos por hidrogeles de fibrina-agarosa (FAH) y de fibrina-agarosa nanoestructurada (NFAH) que se someten a la acción de glutaraldehído y genipín, agentes químicos con efectos de entrecruzamiento. Aunque los efectos de la nanoestructuración han sido estudiados, es la primera vez que se investigan los efectos de estos agentes químicos sobre los hidrogeles de fibrina-agarosa y de fibrina-agarosa nanoestructurada.

Tras la generación de los hidrogeles de fibrina-agarosa a partir de plasma humano, ácido tranexámico, agarosa tipo VII y cloruro cálcico como elementos básicos, tanto los no nanoestructurados como los nanoestructurados por comprensión plástica se someten a la acción de los agentes químicos glutaraldehído y genipín a concentraciones de 0,25% y 0,5% y se realizan estudios estructurales sobre los patrones fibrilares y de porosidad, estudios reológicos sobre los módulos de rigidez ( $G$ ), de elasticidad ( $G'$ ) y de viscosidad ( $G''$ ) y estudios de biocompatibilidad mediante ensayos biofuncionales, bioquímicos e histológicos.

Los resultados de esta Tesis Doctoral, en la que se combina la aplicación de procesos de entrecruzamiento con una concentración variable de glutaraldehído o genipín con protocolos de nanoestructuración permiten afirmar que: 1) tanto el



entrecruzamiento como la nanoestructuración permiten controlar la porosidad en los modelos tisulares de fibrina-agarosa, 2) que el módulo de rigidez ( $G$ ) mejora significativamente tras la utilización de las distintas concentraciones de glutaraldehído y genipín, con independencia de que el biomaterial esté o no nanoestructurado, 3) que el módulo elástico ( $G'$ ) alcanza en todos los casos valores hasta cuatro veces superiores a los del módulo viscoso ( $G''$ ) con independencia de la utilización de glutaraldehído o genipín, lo que indica que los nuevos modelos tisulares generados poseen propiedades marcadamente elásticas y 4) que existen diferencias significativas en relación con la viabilidad a favor del genipín. La concentración más citotóxica es glutaraldehído al 0,5%, con una importante mortalidad celular, y la más viable es la de genipín al 0,25%, que se asocia a una escasa disminución de la viabilidad celular.

La generación de diferentes modelos de tejidos artificiales de fibrina-agarosa mediante la aplicación combinada de dos procesos de biofabricación (entrecruzamiento por agentes químicos y nanoestructuración) permite el diseño de modelos versátiles de tejidos artificiales con patrones estructurales biomiméticos de diferente porosidad, con patrones biomecánicos de diferente rigidez, elasticidad y viscosidad y con patrones de biocompatibilidad y viabilidad diferentes que pueden ser utilizados en los protocolos de ingeniería tisular de acuerdo con los tejidos nativos que hayan de ser sustituidos en los nuevos protocolos terapéuticos que actualmente promueve la medicina regenerativa.

## II. SUMMARY

Generation of increasingly biomimetic and biocompatible artificial tissues is the basic objective of tissue engineering. In this sense, the processes of biofabrication and functionalization of the biomaterials that are part of the artificial tissues are a preferential research object in this field, since these biomaterials are considered to be active components influencing the different properties of the new tissues.

The recent generation of a fibrin-agarose hydrogel with important applications in tissue engineering has stimulated the investigation of different processes and biofabrication methods to improve its properties for its possible application to different therapeutic situations. In this doctoral thesis, we generated two novel tissue models based on fibrin-agarose (FAH) and nanostructured fibrin-agarose (NFAH) hydrogels treated with glutaraldehyde and genipin as crosslinker chemical agents. Although the effects of nanostructuration have been previously studied on this biomaterial, it is the first time that the effects of these crosslinker agents are investigated on non-nanostructured and nanostructured fibrin-agarose hydrogels.

After generation of the fibrin-agarose hydrogels using human plasma, tranexamic acid, type VII agarose and calcium chloride as basic elements, both the non-nanostructured and the nanostructured hydrogels were treated with the chemical crosslinker agents glutaraldehyde and genipin using concentrations of 0.25% and 0.5%. The elastic ( $G'$ ), viscous ( $G''$ ) and rigidity ( $G$ ) moduli were determined by rheological analysis and biocompatibility was analyzed using biofunctional and biochemical assays and histological examination.

The results show that the combination of a variable concentration of glutaraldehyde and genipin with or without nanostructuration allows us to conclude that: 1) porosity can be controlled and tuned in the fibrin-agarose tissue models, 2) a significant improvement of the stiffness modulus ( $G$ ) can be obtained after the use of different concentrations of glutaraldehyde and genipin in non-nanostructured and nanostructured biomaterials, 3) the elastic modulus ( $G'$ ) is significantly higher than the viscous modulus ( $G''$ ) in all cases, regardless of the use of glutaraldehyde or genipin,

suggesting that the new tissue models are very elastic, 4) there is a significant difference of viability in favor of genipin after the use of both crosslinker agents. The most cytotoxic concentration is 0.5% glutaraldehyde, which is significantly associated to cell death, whereas the most viable agent was 0.25% genipín, with low cell decrease.

The generation of different artificial fibrin-agarose tissue models by a combined application of two biofabrication processes -chemical crosslinking and nanostructuration- allows the design of versatile artificial tissue models with biomimetic structural patterns of different porosity, with biomechanical patterns of different stiffness, elasticity and viscosity and with different patterns of viability. The results of this doctoral thesis could be used in different tissue engineering protocols according to the native tissues to be replaced.

### III. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de sanar constituye el objetivo básico de la medicina. A través de la historia cuatro han sido los instrumentos básicos que el ser humano ha utilizado para lograr este propósito: la física, la química, la cirugía y la palabra. A todo ello hay que añadir las numerosas prótesis de todo tipo que el ser humano ha ido, asimismo incorporando en el curso del tiempo para sustituir, compensar o paliar las distintas minusvalías y enfermedades que han ido demandando su uso (Campos, 2011, 2013). En la segunda mitad del siglo XX, un nuevo agente terapéutico comienza a incorporarse a la medicina, se trata del uso de las células y los tejidos corporales que implantados en los pacientes han logrado, en algunos casos, resultados terapéuticos muy eficaces. Por una parte, los trasplantes de órganos -riñón, corazón, pulmón, hígado, etc.- que en la actualidad forman parte de la rutina terapéutica en un conjunto de indicaciones perfectamente establecidas; por otra, la terapia celular, como ocurre con el trasplante de médula ósea y de progenitores hematopoyéticos, ha alcanzado también, resultados sumamente satisfactorios (Jurado Chacón, 2016). En los últimos años, el desarrollo de la denominada ingeniería tisular ha logrado, asimismo, la generación de distintos tipos de tejidos artificiales o constructos, algunos de los cuales ya han sido transferidos a la clínica o se encuentran en fase de ensayo clínico.

La presente Tesis Doctoral se enmarca en este contexto, en concreto en el área de la ingeniería tisular, y tiene por objeto generar nuevos modelos de tejidos artificiales biomiméticos destinados a su posible uso terapéutico. Antes de enumerar el objetivo general y los objetivos específicos de la tesis y de exponer el material y la metodología a utilizar, describiremos, en sucesivos apartados, y como capítulo introductorio de la misma, los conocimientos básicos de este ámbito que sustentan el fundamento necesario para el logro de dichos objetivos.

A este respecto abordaremos, en primer lugar, el estado del arte, considerando un primer apartado con las características generales de la ingeniería tisular, así como su incidencia en la medicina de nuestro tiempo. En un segundo apartado abordaremos la composición y estructura de los tejidos artificiales haciendo especial énfasis en las características de los biomateriales que constituyen el objeto fundamental de

investigación de la presente Tesis Doctoral y uno de los elementos esenciales para la elaboración de los constructos generados en el laboratorio. En un tercer apartado de la introducción nos ocuparemos de los controles de calidad en ingeniería tisular, que son absolutamente imprescindibles para que los tejidos artificiales o constructos generados en el laboratorio puedan ser trasladados a la clínica. Finalmente, y antes de exponer los objetivos, dedicaremos el último apartado del estado del arte a describir los hidrogeles de fibrina-agarosa en ingeniería tisular que constituyen el biomaterial básico utilizado en la investigación que llevamos a cabo en la presente Tesis Doctoral.

# **1. ESTADO DE ARTE**

## 1.1 Ingeniería tisular

La Ingeniería tisular se ha definido como la construcción de tejidos artificiales y su utilización para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los tejidos orgánicos (Campos, 2004). En el momento actual la ingeniería tisular, la terapia celular y la terapia génica constituyen las tres modalidades de terapias avanzadas que con un mayor impacto han irrumpido en la medicina de los últimos treinta años (*Committee for Advanced Therapies –CAT-* 2010) (Cuende, 2013). En el caso de la ingeniería tisular, desde la publicación en 1993 del trabajo pionero de Robert Langer y Joseph Vacanti en la revista Science titulado “*Tissue engineering*” su expansión ha sido extraordinaria y su aplicación clínica creciente (Langer y Vacanti, 1993; Atala, 2014; Kaul y Ventikos, 2015).

A raíz de esta nueva realidad el paradigma de la ciencia histológica ha cambiado de modo muy significativo en las dos últimas décadas. La histología -la ciencia de los tejidos- ha dejado de ser una ciencia meramente descriptiva o como mucho funcional para convertirse en una ciencia constructiva cuya misión consiste no solo en conocer, cada vez mejor, la naturaleza de los distintos tejidos de nuestro cuerpo sino en construir tejidos nuevos o constructos en el laboratorio utilizando para ello los propios elementos biológicos existentes en ellos -las células madre y los factores de crecimiento- y aquellos materiales inertes o biomateriales de distinta naturaleza que permitan articular un sucedáneo tisular lo más biomimético posible (Campos, 2004; Willians, 2014).

La construcción de tejidos artificiales viables de naturaleza biológica equivalentes a los tejidos y órganos corporales, objeto último de la ingeniería tisular, constituye en la medicina actual la alternativa más importante a los problemas que genera el trasplante en algunas localizaciones y a la propia imposibilidad de llevar a cabo un trasplante en algunas otras. La utilización de tejidos artificiales sustitutorios no es solo importante como acto terapéutico en sí mismo sino como acción paliativa destinada a mejorar la calidad de vida en el ámbito de las grandes cirugías o cirugías en regiones de anatomía compleja, como ocurre por ejemplo en el área de la región

maxilofacial, que exigen el recubrimiento de importantes áreas reseca­das (Zhang et al., 2010; Sierira et al., 2015).

La necesidad de desarrollar cada vez más controles de calidad y cada vez más exhaustivos en estos nuevos tejidos generados por ingeniería tisular viene determinada, además, en los últimos años, por su consideración como medicamentos. De acuerdo con las recientes normativas europeas y de otros países dicha consideración exige una serie de controles de calidad no solo para su aprobación sino para su posterior fabricación en condiciones de calidad farmacéutica con destino a su uso terapéutico (Directiva Europea 2003/63/EC) (Reglamento 1394/2007) (Directiva 2009/120/CE) (Cuende y Izeta, 2010, 2012, 2013).

Pero además de una alternativa terapéutica la construcción de tejidos artificiales constituye una alternativa válida para la sustitución de la experimentación animal en determinadas condiciones con la ventaja de poder utilizar células humanas en los experimentos a desarrollar en los nuevos tejidos generados (Olson et al., 2011; De Vries et al., 2015).

Por las circunstancias arriba indicadas la ingeniería tisular, en el contexto de las terapias avanzadas, juegan un importante papel en la investigación y el desarrollo de la medicina del futuro y constituye una actividad industrial emergente que de acuerdo con todos los indicadores prospectivos va a tener un gran impacto en la economía de los próximos años (Campos, 2013).

## **1.2 Composición y estructura de los tejidos artificiales**

Para la fabricación de tejidos artificiales mediante ingeniería tisular se requieren tres componentes básicos: células con alta capacidad de proliferación, matrices extracelulares formadas principalmente por biomateriales y factores de crecimiento. Las células desarrollan su actividad biológica en el soporte de biomaterial utilizado como sustituto temporal o definitivo de la matriz, siendo esta última importante, ya que proporciona un microambiente adecuado para la proliferación



celular. Los factores de crecimiento son finalmente los componentes encargados de facilitar y promover el desarrollo y maduración del nuevo tejido. A continuación, describiremos muy esquemáticamente el componente celular y el formado por los factores de crecimiento y dedicaremos una mayor extensión a los biomateriales sustitutos de la matriz extracelular que van a constituir el objeto fundamental sobre el que se lleva a cabo la investigación que se desarrolla en la presente Tesis Doctoral.

### **1.2.1 Células**

Las células que se utilizan en ingeniería tisular para generar tejidos artificiales han de ser células viables con una adecuada capacidad de proliferación y diferenciación que además deben estar libres de patógenos y de contaminación. En relación con su origen se distinguen tres tipos de células para su uso en ingeniería tisular:

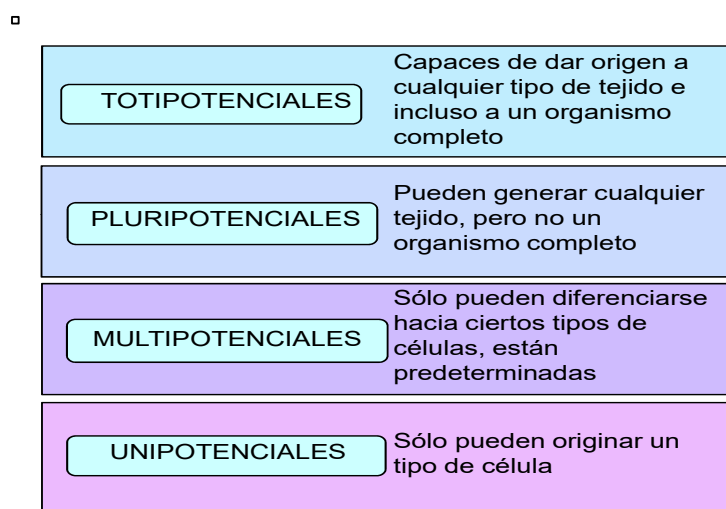
- Células autólogas: son aquellas que se obtienen del propio paciente y se caracterizan por no producir una respuesta inmunológica.
- Células alogénicas: proceden de otro individuo de la misma especie y generan, en general, una respuesta inmunológica en el receptor.
- Células xenogénicas: son aquellas que proceden de un individuo de otra especie generando una importante respuesta de rechazo.

Las células se clasifican además en relación con su estado de maduración, en células diferenciadas y células madre indiferenciadas.

Como fuente principal de células en la ingeniería tisular se utilizan células madre. Dichas células, según su origen pueden ser: embrionarias y adultas. De acuerdo con su potencialidad las células madre se clasifican en distintos tipos (Fig. 1).

En relación con las células madre adultas se han identificado, tanto en su estructura como en sus marcadores, la mayoría de las existentes en los distintos tejidos corporales, desde la médula ósea, las inicialmente mejor conocidas, a las

localizadas en el sistema nervioso, de las que hasta hace muy poco tiempo se desconocía incluso su existencia (Lanza, 2006; Campos, 2013). Por lo que respecta a las células madre embrionarias no solo se han identificado y evaluado en toda su potencialidad, como se ha señalado previamente, sino que, como ha demostrado el Premio Nobel Shinya Yamanaka, pueden incluso, con determinadas técnicas, obtenerse a partir de células maduras: son las conocidas células iPS para las que se vaticina un futuro uso terapéutico (Takahashi y Yamanaka, 2006).



**Figura 1:** Clasificación de las células madre de acuerdo a su potencialidad diferenciativa.

En el momento presente algunas de las áreas más importantes de investigación en el campo de las células madre y su aplicación a la ingeniería tisular son la viabilidad de las mismas y su variación en los diferentes subcultivos, lo cual incide directamente sobre su eficacia terapéutica (Alaminos et al., 2007a; Rodríguez-Morata et al., 2008; Garzón et al., 2012a, 2012b; Fisher y Mauck, 2013; Martín-Piedra et al., 2013, 2014b; Vico et al., 2015; Campos et al, 2016a); la heterogeneidad funcional según su ubicación en los distintos órganos corporales (Strioga et al., 2012); las funciones que pueden ejercer algunos tipos de células madre, como por ejemplo la importante actividad inmunomoduladora que poseen las células madre mesenquimales (Aggarwal y

Pittenger, 2005); el mayor impacto terapéutico de las células madre femeninas en relación con las masculinas (Manukyan et al., 2011); el efecto que la criopreservación tiene sobre dichas células y finalmente su proliferación y expansión en biorreactores (Siegel et al., 2013).

### **1.2.2 Factores de crecimiento**

La detección de señales químicas o estímulos físicos por parte de la célula genera la respuesta de la misma en relación con el medioambiente extracelular. Dicha respuesta genera la activación de distintos mecanismos moleculares y biológicos que conducen a la división, la migración, la diferenciación, el mantenimiento del fenotipo o la apoptosis. La actividad coordinada de estos procesos por parte de las células que forman un tejido conduce a la definición estructural y funcional del mismo en un momento temporal determinado (Campos 2004, 2013). Los factores de crecimiento son moléculas secretadas por las células de forma endógena o bien, son el resultado de señales paracrinas con células vecinas. Desde el descubrimiento del factor de crecimiento nervioso a mediados del siglo XX el número de factores que inciden en la actividad biológica de las células no ha dejado de incrementarse. Entre los factores más utilizados en ingeniería tisular destacan los vinculados a la ingeniería tisular vascular, ósea y cartilaginosa (familias FGF, TGF, PDGF, VEGF, BMP, etc.). En el momento presente aparte de investigarse en la identificación de nuevos factores, y de familias de factores en los ya conocidos, se investiga preferentemente sobre los factores más importantes que contribuyen al desarrollo tisular embrionario con el objeto de poder imitar biomiméticamente su incidencia en la generación de tejidos y órganos artificiales (Herbert y Stainier, 2011). Un campo de investigación que en esta área se ha desarrollado desde hace algún tiempo es el modo de incorporar al organismo o al constructo artificial los distintos factores necesarios para estimular el desarrollo del constructo y/o tejidos. Los factores de crecimiento se pueden incorporar directamente (en solución), en asociación con el biomaterial (funcionalización) o a través del uso de células que tienen la capacidad de elaborar y segregar en el interior

del constructo y/o tejidos dichos factores (Boontheekul y Mooney, 2003; Shin et al., 2003).

### **1.2.3 Biomateriales**

El término de biomaterial se ha utilizado en biología y medicina con un doble sentido. Por una parte, para identificar a los materiales con origen en fuentes biológicas y por otro para identificar a los materiales que se han venido empleando en distintos protocolos terapéuticos de la medicina (Griggith, 2000). En el presente apartado no nos ocuparemos de los primeros como tales ni de los que reciben dicha denominación y que son utilizados en procesos terapéuticos no vinculados a la ingeniería tisular como son los materiales empleados en la fabricación de prótesis u otros protocolos fundamentalmente quirúrgicos (Beaman et al., 2006; Chiarello et al., 2013). El objeto por tanto de este apartado es definir en que consiste un biomaterial utilizado como sustrato estructural en ingeniería tisular, y describir sus características generales más importantes, clasificar los posibles biomateriales disponibles en la actualidad, identificar algunas de las técnicas básicas de su generación y describir más pormenorizadamente las dos técnicas que van a utilizarse para generar el desarrollo de nuevos biomateriales, la nanoestructuración y el entrecruzamiento en la presente Tesis Doctoral.

#### **1.2.3.1 Definición y características de los biomateriales en ingeniería tisular**

El biomaterial se define, en el ámbito de la ingeniería tisular, como el componente del tejido artificial que actúa como soporte estructural tridimensional y funcional de las células y como agente facilitador para la acción sobre ellas de los factores de crecimiento y señales moleculares, es decir, como la matriz extracelular nativa. Las propiedades fundamentales que debe presentar un biomaterial varían de acuerdo a su aplicación, pero en general estos deben ser: biocompatibles, no ser tóxicos, ser químicamente estables, poseer adecuadas propiedades físicas y morfológicas, poseer un diseño que imite al tejido nativo y estar sujeto a un proceso de degradación controlada (Dee et al., 2003; Cardona et al., 2011; Ionescu et al., 2011;

Daly et al., 2012; Scionti et al., 2014b; Carriel et al., 2014b). En este sentido la generación de biomateriales adecuados para la construcción de tejidos artificiales por técnicas de ingeniería tisular constituye uno de los objetivos principales de la Ingeniería tisular y de la medicina regenerativa.

En un tejido construido mediante ingeniería tisular el biomaterial debe tener como actividad básica de promover la función y la viabilidad del tejido y, por tanto, facilitar diversas funciones celulares como la adhesión, la proliferación, la migración y la diferenciación celular. Campos (2004) ha descrito que el biomaterial debe también facilitar el desarrollo de un ambiente en el que las células puedan mantener su fenotipo y mantener la actividad de síntesis de distintas proteínas y moléculas. Además, otras características que deben poseer los biomateriales en Ingeniería tisular son una adecuada porosidad, una amplia superficie y una organización tridimensional específica, según el tejido a construir. Los poros y canales son puertas de entrada que facilitan la migración celular y la penetración de capilares; la amplia superficie permite el soporte y el intercambio celular de las células que junto al biomaterial configuran el nuevo tejido; el carácter biodegradable del biomaterial se requiere si el nuevo tejido puede sustituir el inicial soporte constructivo por una matriz propia fruto de la actividad sintética de sus células (Campos, 2004; Palsson y Bhatia., 2004; Carriel et al., 2014a, 2014b).

### **1.2.3.2 Clasificación de los biomateriales**

Los biomateriales utilizados en ingeniería tisular se clasifican en tres tipos: sintéticos, naturales y mixtos. También se pueden clasificar en bioinertes o bioactivos, bioestables o biodegradables y sólidos o hidrogeles (Ramakrishna et al., 2001; Peña y Alvarado, 2010).

Los biomateriales sintéticos pueden ser metales, cerámicas y diversos polímeros. Dichos biomateriales permiten la posibilidad de controlar sus propiedades físicas, químicas, tiempo de degradación y, en gran medida, sus características estructurales. Sin embargo, no poseen la biocompatibilidad y biodegradabilidad de los

biomateriales naturales, los cuales a la vez que soporte estructural facilitan diversos procesos biológicos a nivel celular (Ratner, 2004, 2014).

Los biomateriales naturales son fundamentalmente de naturaleza polimérica, y presentan propiedades similares a las de la matriz extracelular nativa. Estos biomateriales pueden extraerse de plantas, animales, algas o pueden ser sintetizados por microorganismos (Santos Estévez, 2013). Algunos de los más importantes se recogen en la tabla 1.

Dichos polímeros naturales se han utilizado para aplicaciones muy diferentes en el campo de la ingeniería tisular debido a las distintas propiedades que poseen. En primer lugar, a sus propiedades biomecánicas viscoelásticas; en segundo lugar, a su capacidad de gelificación y de retención de agua; en tercer lugar a la posibilidad de ser degradados por enzimas biológicos, lo que permite que dichos biomateriales sean metabolizados más fácilmente por el organismo humano a través de mecanismos fisiológicos (Van Blitterswijk et al., 2008; Patterson et al., 2010).

POLIMEROS NATURALES					
Origen Animal		Origen Vegetal		Origen Microbiano	
Proteínas	Polisacáridos	Proteínas	Polisacáridos	Polisacáridos	Poliésteres
Colágeno Gelatina Elastina Fibrinógeno Albúmina Seda Queratina Tela de araña	Ac. Hialurónico Quitina Quitosano	Derivados de la soja	Almidón Celulosa Agarosa Alginato	Dextrano Ac. Hialurónico Quitina Quitosano Alginato Proteoglicanos GAGs	Polihidroxibutirato (PHB) Polihidroxibutiratovalerato (PHBH)

**Tabla1.** Clasificación de los polímeros naturales atendiendo a su origen (modificado de Santos Estévez, 2013)

En ingeniería tisular los polímeros más utilizados son los hidrogeles, que están constituidos por cadenas hidrófilas en los que el agua es el medio de dispersión (Scionti, 2014a). Los hidrogeles pueden ser de origen proteico o de polisacáridos. Entre los polisacáridos, destacan el quitosano, el alginato, la celulosa, la agarosa y el ácido

hialurónico, mientras que las proteínas que se utilizan con mayor frecuencia en ingeniería tisular son el colágeno, la fibrina y la elastina (Van Blitterswijk et al., 2008).

Varios biomateriales naturales y sintéticos como algunas proteínas, polisacáridos y biopolímeros, aunque presentan propiedades biológicas adecuadas, no poseen sin embargo un comportamiento óptimo en relación con sus propiedades biomecánicas y su estabilidad estructural *in vivo*, lo que limita su potencial aplicación a la clínica (Scionti et al., 2014b; Reddy et al., 2015). Entre estos biomateriales se encuentran los hidrogeles que contienen concentraciones variables de agua y que son, en general, muy biocompatibles y, en gran medida, muy similares biomiméticamente a la matriz extracelular tanto por su naturaleza físico-química como por su capacidad para incorporar células y permitir el flujo de nutrientes y material de desecho, gracias al contenido de agua existente (Drury y Mooney, 2003).

### **1.2.3.3 Técnicas para la generación de los biomateriales**

La generación de biomateriales está relacionada con la composición química con la que estos están constituidos y con un conjunto de propiedades y factores relacionados con dichos componentes. Entre ellos son importantes la macroestructura que determina la geometría externa, la porosidad y la interconectividad de los poros, los diámetros de poro y las estructuras tubulares interconectoras, la ratio superficie/volumen y las características de la degradación del material, así como, las características mecánicas que queramos establecer en el biomaterial a construir (Wiesmann y Lammers, 2009). Es evidente que desarrollar un proceso en el que estén presentes todos estos factores resulta muy complejo y difícil de conseguir.

En lo que a los métodos concretos de fabricación se refiere se han descrito varios procesos de biofabricación que van desde los más elementales desarrollados sobre soportes plásticos hasta los procesos químicos y de biofabricación más complejos entre los que destacan la lixiviación, la congelación desecación, el laminado de membranas, la generación por inyección de gas, la extrusión fibrilar, la bioimpresión, etc. La utilización de uno u otro proceso de fabricación dependerá de los

objetivos que queremos alcanzar en relación con la búsqueda del tejido artificial más biomimético posible (Hutmacher, 2001; Liu y Ma., 2004; Wiessman y Lammers, 2009; Sears et al., 2016).

Otro modelo para generar biomateriales aplicables a ingeniería tisular lo constituyen las técnicas de descelularización tisular que permiten preservar estructuralmente la matriz extracelular una vez eliminadas las células que contienen. Dichos protocolos se han aplicado a distintos tejidos y órganos con resultados variables. Aunque las ventajas son evidentes, dado que se preserva el patrón estructural del tejido descelularizado, la principal desventaja consiste en la permanencia de restos celulares que no siempre son fáciles de eliminar, y especialmente la eliminación de los epítomos alfa-gal (importante en matrices de origen animal), así como el problema que supone la recelularización de esta matriz descelularizada (Badylak et al., 2011, 2012; Arenas-Herrera et al., 2013; He et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Gonzalez-Andrades et al., 2015).

#### **1.2.3.4 Métodos de biofabricación**

Con el objeto de mejorar las propiedades biomecánicas, químicas y estructurales de los biomateriales e hidrogeles utilizados en ingeniería tisular, se han desarrollado distintos métodos físicos y químicos destinados a promover la interacción molecular de los componentes que conforman el biomaterial. Dichos métodos de biofabricación, con independencia de mejorar en mayor o menor medida las propiedades biomecánicas deben preservar la biocompatibilidad de los nuevos tejidos generados y por tanto sus propiedades biológicas. Los biomateriales constituyen, cada vez más, por todo ello un objetivo de creciente interés al dejar de ser interpretados como un mero andamio de soporte celular para convertirse en un componente activo y determinante de las propiedades funcionales de los nuevos tejidos (Rosso et al., 2005, Castro y Mano, 2013; Rodríguez-Arco et al., 2016).

El proceso de mejora se inserta en lo que actualmente se conoce como la biofabricación de los tejidos artificiales. En este sentido, recientemente se han



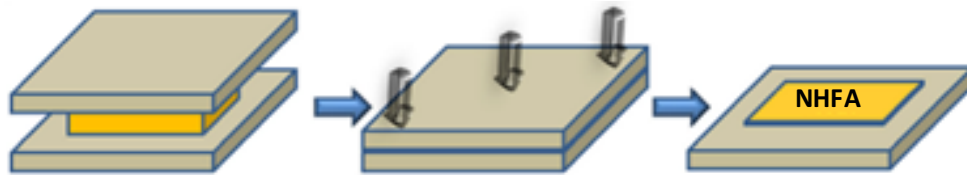
diseñado nuevos procesos de biofabricación específicos para ingeniería tisular que permiten mejorar significativamente las propiedades de los tejidos artificiales. A este respecto, se han utilizado moléculas de distinta naturaleza asociadas al biomaterial (Pereira et al., 2017) o la incorporación de partículas magnéticas (López-López et al., 2015; Rodríguez-Arco et al., 2016) pero, sobre todo, se han ido desarrollando procesos vinculados a la nanoestructuración y el entrecruzamiento molecular (*crosslinking*), que tienen por objeto mejorar las propiedades de los biomateriales.

A continuación, describiremos esquemáticamente las bases de los dos métodos utilizados en la Tesis Doctoral: la nanoestructuración y la acción de distintos agentes de entrecruzamiento de tipo químico que han permitido alcanzar en distintos estudios realizados resultados muy esperanzadores en lo que al diseño de biomateriales específicos para tejido artificiales se refiere (Scionti et al., 2014b; Carriel et al., 2015; Campos et al., 2016b).

#### **1.2.3.4.1 Nanoestructuración**

La nanoestructuración es un proceso físico, basado en la aplicación de técnicas de compresión plástica que fue inicialmente aplicado en hidrogeles de colágeno para incrementar su densidad y rigidez (Brown et al., 2005; Abou Neel et al., 2006; Bitar et al., 2007). Dicho proceso induce la formación de enlaces nanomoleculares entre las fibras del biomaterial mediante fuerzas de deshidratación y presión sin alterar sustancialmente la viabilidad celular en el seno del gel (Brown et al., 2005; Hadjipanayi et al., 2011). Estudios *in vivo* demuestran, asimismo, la idoneidad de la nanoestructuración como modelo de biofabricación de tejidos artificiales para su aplicación a distintas soluciones terapéuticas especialmente en piel (Braziulis et al., 2012). El modelo de nanoestructuración se ha aplicado, asimismo, a otros biomateriales como la fibrina y la fibrina-agarosa obteniéndose de igual forma resultados muy satisfactorios en lo que a la mejora de las propiedades biomecánicas se refiere (Haug et al., 2012; Scionti, 2014a).

Algunos estudios han investigado sobre los mecanismos que contribuyen al proceso de nanoestructuración estableciendo la importancia del flujo de deshidratación y los mecanismos que permiten resistir, al incrementarse las propiedades biomecánicas, a las fuerzas de tracción, compresión y de cizallamiento (Serpooshan et al., 2013; Scionti et al., 2014b; Carriel et al., 2015) (Fig. 2)

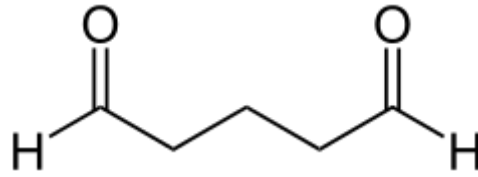


**Figura 2.** Esquema del proceso de nanoestructuración o compresión plástica. El hidrogel queda comprendido entre membranas de filtro de nylon con un tamaño de poro de  $0,22\ \mu\text{m}$  y se comprimen entre un par de papeles absorbentes esteriles Whatman de 3 mm de espesor, bajo una superficie plana de vidrio durante 3 minutos (modificada de Carriel et al., 2015).

#### 1.2.3.4.2 Entrecruzamiento

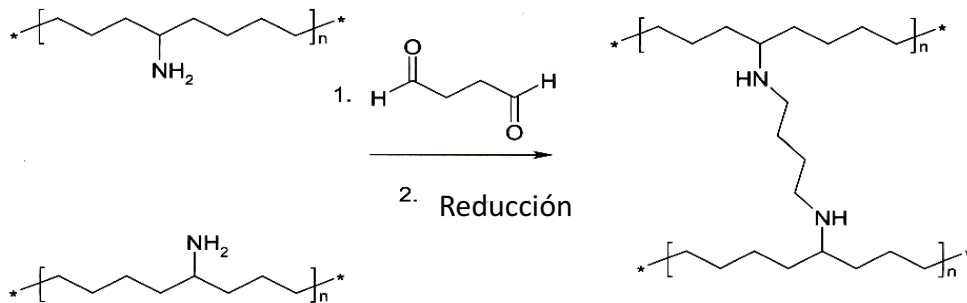
Con respecto a los agentes químicos de *entrecruzamiento*, éstos promueven la formación de nuevos enlaces moleculares entre las moléculas del biomaterial que modifican sustancialmente las propiedades biomecánicas y estructurales de los mismos (Hennink y Van Nostrum, 2002; Ma et al., 2014; Gamboa-Martínez et al., 2015; Reddy et al., 2015; Campos et al., 2016b).

Entre los agentes químicos más utilizados para promover un efecto entrecruzante destaca el glutaraldehído (GA) el cual presenta una alta eficiencia, un tiempo corto de reacción y un bajo coste (Ramires y Milella, 2002; Wang et al., 2016). El GA está compuesto por dos grupos aldehído unidos por una cadena flexible de tres átomos de carbono (Kiernan, 2008) (Fig. 3).



**Figura 3.** Fórmula estructural del glutaraldehido (Kiernan, 2008)

En solución acuosa, el glutaraldehido reacciona, principalmente, con los grupos amino libre de proteínas induciendo la formación de puentes de metileno (Bigi et al., 2001; Kiernan, 2008). Por esta razón es considerado el mejor fijador para microscopia electrónica de transmisión. Estas complejas interacciones moleculares estabilizan y modifican la estructura de biomateriales proteicos, mejorando sus propiedades biomecánicas y estructurales (Bigi et al., 2001; Siriwardane et al., 2014). En la figura 4 se esquematiza el mecanismo de reacción química propuesto para explicar la reacción de entrecruzamiento del glutaraldehido.

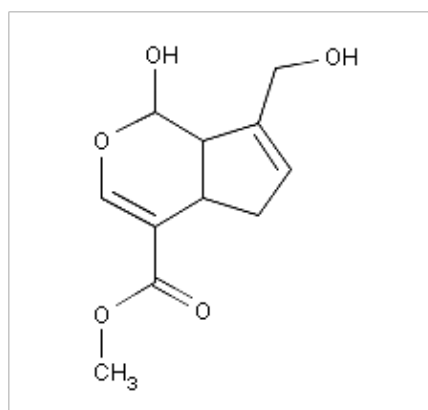


**Figura 4.** Reacción química de entrecruzamiento del glutaraldehido.

El glutaraldehido ha sido utilizado para estimular el entrecruzamiento en válvulas bioprotésicas, pericardio bovino e hidrogeles de colágeno (Bigi et al., 2001; Ma et al., 2014; Reddy et al., 2015). Sin embargo, algunos trabajos han demostrado que

el glutaraldehído puede generar efectos citotóxicos cuando se utiliza a concentraciones superiores al 8%. Es por ello por lo que solo concentraciones por debajo de dicho nivel podrían constituir una alternativa, potencialmente útil, para promover el entrecruzamiento en biomateriales susceptibles de ser utilizados en ingeniería tisular (Umashankar et al., 2012; Lai et al., 2014; Reddy et al., 2015).

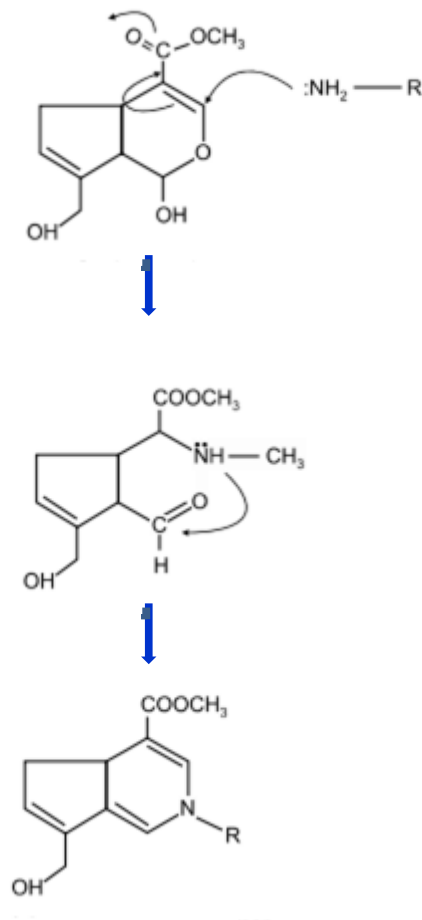
Otro de los agentes químicos empleados para fomentar el entrecruzamiento es el genipín (también denominado genipína o genipíno), el cual es extraído del fruto de *Gardenia jasminoides* (Yoo et al., 2011) (Fig. 5).



**Figura 5.** Fórmula estructural del genipín (Yoo et al., 2011)

El genipín (GP), que es un glicósido iridoide cuya estructura molecular es  $C_{11}H_{14}O_5$  (Yoo et al., 2011), ha sido utilizado en la medicina tradicional china y como colorante azul por las industrias alimentarias y su estructura fue descrita en la década de 1960 (Akaoet al., 1994; Song et al., 2009). El genipín se caracteriza por presentar una baja citotoxicidad, y se ha demostrado un incremento en las propiedades biomecánicas de diversas matrices de válvulas cardíacas, pericardio e injertos vasculares, generalmente tejidos descelularizados (Chang et al., 2002, 2005; Somers et al., 2008). El genipín, por otra parte, ha sido utilizado también para estimular el entrecruzamiento en hidrogeles de quitosán, colágeno, geletina, polietilenglicol y fibrina con resultados diversos, aunque positivos (Mi et al., 2002; Mwale et al., 2005; Ferrettiet al., 2006; Dare et al., 2009; McGann et al., 2015).

En relación con su actividad como agente de entrecruzamiento el genipín se caracteriza por reaccionar con grupos de aminas primarias, dando lugar al entrecruzamiento molecular covalente. Sin embargo, el mecanismo de acción no se conoce por el momento de una forma precisa (Song et al., 2009). En la figura 6 se esquematiza el mecanismo de reacción química más aceptado para explicar la reacción de entrecruzamiento del GP (Yoo et al., 2011).



**Figura 6.** Mecanismo de reacción química de entrecruzamiento del genipín (Yoo et al., 2011).

### **1.3. Controles de calidad en ingeniería tisular**

El control de calidad de los tejidos generados por ingeniería tisular exige, en la fase de elaboración del constructo, al menos dos niveles esenciales de evaluación: en primer lugar, el control de calidad de la función celular en su selección y en su interacción con el biomaterial y, en segundo lugar, un control de calidad vinculado a las propiedades biomecánicas de biomaterial objeto de posterior evaluación *in vivo*.

#### **1.3.1 Controles de calidad de la función celular**

La determinación de los patrones de viabilidad de las células que son candidatas a participar o forman parte de un tejido artificial generado por ingeniería tisular aporta una valiosa información sobre la proporción de células vivas y funcionales existentes en la población estudiada. De ello se deduce que la determinación de la viabilidad celular constituye un marcador predictivo para el buen funcionamiento de los futuros tejidos. Dicho de otra forma, no se podrá garantizar la funcionalidad de un tejido artificial si previamente no se garantiza la viabilidad de las células empleadas para tal fin (Martín-Piedra, 2014a; Garzón et al., 2012). Entre los métodos utilizados en el laboratorio para estudiar la viabilidad y funcionalidad celular, destaca en primer lugar el ensayo biofuncional basado en sustancias fluorescentes. Este ensayo morfofuncional permite cuantificar la viabilidad de las células en base a la integridad de su membrana plasmática. Para tal fin se utilizan dos sustancias fluorescentes, la acetometoxi-calceína y bromuro de etidio. La primera nos permite realizar un ensayo funcional, pues es un componente permeable para la membrana plasmática de células viables. En el citosol de las células vivas la acetometoxi-calceína es hidrolizada por acción esterasa y da lugar a la calceína, una sustancia que emite una señal fluorescente del espectro de color verde (515 nm). El bromuro de etidio, sin embargo, no penetra en las células viables, haciéndolo solo en caso de que las células tengan una membrana alterada. Cuando dicho compuesto alcanza el núcleo celular se une a la molécula de ADN aumentando su fluorescencia y emitiendo una señal en el espectro del rojo (617 nm).

Otro de los métodos utilizados para determinar la viabilidad celular es el ensayo bioquímico de actividad de deshidrogenasa mitocondriales (WST-1). Las deshidrogenasas mitocondriales son enzimas reductoras que intervienen en la producción de ATP y, por tanto, la detección de dichas enzimas será un signo de viabilidad celular con este método. Se utiliza una sal de tetrazolio soluble en agua (WST-1) como reactivo de una reacción de reducción. Las deshidrogenasas de las células viables provocan la reducción de WST-1 dando lugar a un compuesto de formazan soluble en agua de color amarillento. Mediante la cuantificación de la reacción colorimétrica podemos determinar la viabilidad y función celular.

Otro método altamente sensible es la cuantificación del ADN presente en el medio de cultivo. A mayor liberación de ADN mayor será el daño irreversible de las membranas y por tanto de muerte celular. El estudio del patrón morfológico observado mediante MEB permite asimismo evaluar la viabilidad de las células a utilizar en los protocolos de ingeniería tisular al determinar asimismo los distintos signos de funcionalidad celular.

La aplicación de estos métodos y algunos otros más complejos, de forma aislada o de forma combinada, a los protocolos de ingeniería tisular ha permitido establecer el perfil de viabilidad de distintas poblaciones de células madre utilizadas para la generación de tejidos artificiales. En este contexto, las células endoteliales de la córnea (Alaminos et al., 2007a), los fibroblastos de la mucosa oral (Sánchez-Quevedo et al., 2007), las células endoteliales del cordón umbilical (Rodríguez-Morata et al., 2008), los fibrocondrocitos de la articulación temporomandibular humana (Garzón et al., 2012b) o las células de la pulpa dental (Martín-Piedra et al., 2013, 2014b) han sido recientemente investigadas determinándose la subpoblación más viable para su aplicación en la construcción de tejidos artificiales.

Pero además de aplicar estas técnicas para evaluar la selección de células a utilizar en los protocolos de ingeniería tisular, los métodos arriba indicados también nos permiten evaluar con una alta precisión la viabilidad de las células que interactúan con los biomateriales. Ello permite por tanto realizar estudios predictivos muy valiosos para establecer la biocompatibilidad de los biomateriales susceptibles de ser utilizados

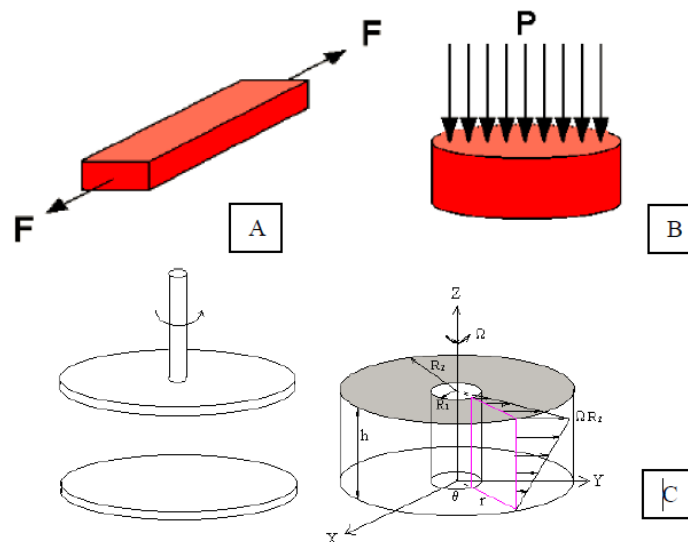
en la generación de nuevos tejidos artificiales (Rodríguez et al., 2008, 2011). La evaluación genética y epigenética de las células en contacto con biomateriales pueden también proporcionarnos información sobre los efectos del biomaterial sobre el patrón genómico. Estudios recientes prestan atención a las modificaciones epigenéticas, frente a las genéticas o cromosómicas, que podrían sufrir algunas de las células más frecuentemente empleadas en ingeniería tisular. Estas alteraciones epigenéticas podrían constituir uno de los principales obstáculos para la traslación al ámbito clínico de los productos terapéuticos derivados de la ingeniería tisular (Chow et al., 2013; Wang et al., 2013). Se postula en este sentido que la evaluación de algunos genes supresores tumorales como EMP3, RASSF1 y HOXA9 podrían incorporarse al control de calidad a realizar en los nuevos tejidos (Alaminos et al., 2005; López-Serra et al., 2006). Aunque no constituye el objeto específico de esta tesis determinar los efectos de los biomateriales diseñados en la misma sobre el patrón genético y epigenético si formará parte obligada de su continuación en una segunda fase.

### **1.3.2 Caracterización biológica y biomecánica de biomateriales**

La caracterización biológica de los biomateriales está relacionada con la identificación en los mismos de patrones histológicos e histoquímicos que contribuyan a establecer el carácter biomimético de los mismos. En este sentido la utilización de las técnicas histológicas e histoquímicas necesarias para determinar el patrón estructural y los componentes presentes en el seno de los constructos son fundamentales para establecer la idoneidad del producto generado. Dicho estudio histológico debe hacerse a nivel de la microscopia óptica, electrónica de transmisión y de barrido según el objetivo a determinar. Algunos estudios han desarrollado y adaptado distintas técnicas histológicas para la investigación microscópica de estos nuevos tejidos (Serrato et al., 2009; Carriel et al., 2011; 2012; 2013; 2014a; 2014b; 2015). Resulta evidente que cuando se evalúa un constructo celular la investigación genética es también necesaria para determinar el patrón evolutivo de la expresión génica en el curso del desarrollo y maduración del constructo (Alaminos et al., 2007b).



La evaluación de las propiedades mecánicas de los biomateriales utilizados en ingeniería tisular constituye asimismo un proceso necesario para el desarrollo de nuevos tejidos. El objetivo es garantizar que éstos puedan imitar y restaurar las funciones de los órganos y tejidos nativos que van a ser reemplazados (Ratner et al. 2004). En el caso de los hidrogeles, la evaluación biomecánica de estos biomateriales es especialmente necesaria, ya que la principal desventaja que tiene el uso de los hidrogeles en ingeniería tisular es su limitación desde el punto de vista biomecánico (Slaughter et al., 2009). Ello se debe a que los biomateriales, para que sean funcionalmente útiles en su actividad sustitutoria de los tejidos lesionados deben alcanzar una cierta resistencia a los esfuerzos una vez implantados. Para analizar el comportamiento biomecánico de los hidrogeles que se utilizan en ingeniería tisular se aplican técnicas físicas que consisten en evaluar su resistencia a diferentes tipos de esfuerzos impuestos desde el exterior (Knapp et al., 1997). Las técnicas convencionales para evaluar la funcionalidad biomecánica de los hidrogeles incluyen ensayos de resistencia a esfuerzos de tracción, compresión y rotación o cizalla (Ionescu et al., 2011; Scionti, 2014a; Carriel et al., 2015; Campos et al., 2016b). En la figura 7 se representan las técnicas de análisis biomecánico a las que deben someterse los biomateriales con el objeto de determinar sus propiedades biomecánicas (Ahearne et al., 2009).



**Figura 7.** Representación esquemática de las técnicas de análisis biomecánico de: A) tracción, B) compresión y C) rotación o cizalla (Ahearne et al., 2009)

#### 1.4 Hidrogeles de fibrina-agarosa en ingeniería tisular

En el presente apartado desarrollaremos con más detalle las características del hidrogel de fibrina-agarosa (HFA) recientemente utilizados en protocolos de ingeniería tisular, dado que los experimentos que se realizan en la presente Tesis Doctoral se llevan a cabo utilizando dicho hidrogel como sustrato de los distintos modelos de tejidos artificiales que se pretenden elaborar.

La fibrina es un polímero biodegradable natural de carácter proteico que se forma a partir del fibrinógeno por acción de la trombina. La fibrina participa en el proceso de reparación de los tejidos nativos tras el desarrollo de una lesión y principalmente tras la ruptura vascular. La fibrina está formada por largas cadenas fibrilares muy flexibles que poseen gran resistencia mecánica (Mosesson et al., 2001). Además, la fibrina puede formar grandes estructuras tridimensionales mediante la asociación de diferentes fibrillas de fibrina lo que confieren a las mismas una resistencia elevada (Mosesson, 2005). Por sus características naturales la fibrina tiene un gran potencial en ingeniería tisular (Ahmed et al., 2008). La fibrina, sola o en combinación con otros materiales, ha sido utilizada como biomaterial 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; Sánchez-Quevedo et al., 2007; Fisher, 2007; Ahmed et al., 2008; Garzón et al., 2013; Carriel et al., 2013).

La agarosa, por otra parte, es un polisacárido extraído de algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*, que tiene la capacidad de formar geles biocompatibles y térmicamente reversibles (Stellwagen y Stellwagen, 1995). La agarosa en tal sentido ha sido también utilizada para varias aplicaciones de ingeniería tisular, especialmente en tejido nervioso y cartilaginoso (Mauck et al., 2006; Nisbet et al., 2008).

En los últimos años el grupo de investigación de ingeniería tisular de la Universidad de Granada, ha desarrollado a partir de ambos compuestos, la fibrina y la agarosa, un hidrogel (Hidrogel de fibrina-agarosa –HFA-) que ha sido aplicado como

biomaterial a distintos protocolos de ingeniería tisular para la construcción de nuevos tejidos artificiales como córnea (Alaminos et al., 2006) , mucosa oral (Sánchez-Quevedo et al., 2007), piel (Carriel et al., 2012), nervio periférico (Carriel et al., 2013, 2014a, 2014b, 2015) y vejiga (Jaimes-Parra et al., 2016) con resultados muy satisfactorios, en lo que a sus propiedades y potencial aplicación clínica se refiere. Los hidrogeles se generan mezclando plasma humano y agarosa tipo VII al 0.1% con ácido tranexámico como agente anti-fibrinolítico y cloruro de calcio como activador da la reacción de polimerización de la fibrina.

En la tabla 2 se indican los distintos tejidos artificiales elaborados hasta el momento presente con el hidrogel de fibrina-agarosa como biomaterial.

Tejidos Artificiales	Geles Fibrina-Agarosa
Piel	Carriel et al., 2012 Garzón et al., 2013
Córnea	Alaminos et al., 2006 González-Andrades et al., 2009 Garzón et al., 2014
Mucosa Oral	Alaminos et al., 2007 Sánchez-Quevedo et al., 2007 Garzón et al., 2009; 2013 Rodríguez et al., 2012 San Martin et al., 2013 Fernández-Valadés et al., 2016
T. nervioso	Nieto-Aguilar et al., 2011 Carriel et al., 2013; 2014; 2015
Cartílago	Nieto-Aguilar et al., 2011 García-Martines et al., 2016
T. óseo	Nieto-Aguilar et al., 2011 Liceras-Liceras et al., 2015
Vejiga	Jaimes-Parra et al., 2016

**Tabla 2:** Tejidos artificiales elaborados con fibrina-agarosa.

#### **1.4.1 Estudios *in vitro* e *in vivo***

El HFA ha sido objeto de un intenso estudio preclínico con el objeto de facilitar su traslación a la clínica. En tal sentido en todos los modelos de tejidos generados, el HFA ha demostrado ser biocompatible y biodegradable. Los análisis histológicos han demostrado que las células son capaces de proliferar, diferenciarse y promover la regeneración *in vivo* a un nivel óptimo. Los estudios histológicos e histoquímicos fueron realizados con microscopía óptica y electrónica de transmisión y barrido en distintas fases y periodos cronológicos. De igual modo se realizaron los estudios genéticos y reológicos a los que se hacía referencia en el apartado correspondiente al control de calidad de los tejidos artificiales. La conclusión de dichos estudios pone de relieve la idoneidad de este tipo de hidrogel como biomaterial básico para la elaboración de constructos eficaces susceptibles de transferencia clínica (Alaminos et al., 2006; Sánchez-Quevedo et al., 2007; González-Andrades et al., 2009; Rodríguez et al., 2012; Carriel et al., 2012, 2013, 2014a, 2014b, 2015; San Martín et al., 2013; Garzón et al., 2014; Fernández-Valadés-Gámez et al., 2016; Jaimes-Parra et al., 2016; Martín-Piedra et al., 2016).

#### **1.4.2 Ensayos clínicos**

El HFA tras superar la aprobación de la Agencia Española del Medicamento y Productos sanitarios se encuentra en estos momentos en un ensayo clínico formado parte de un producto farmacéutico denominado: “Cornea artificial humana nanoestructurada lamelar anterior”. Ello implica que el producto ha sido fabricado como producto de calidad farmacéutica de acuerdo con la normativa existente al respecto. Las instalaciones y los procesos de producción deben cumplir con las normas de correcta fabricación (denominadas GMP -iniciales de *Good Manufacturing Practice*-) que se exigen a los laboratorios farmacéuticos (Cuende et al., 2010, 2012). Desde el punto de vista normativo el proceso a desarrollar y aplicar requiere lo siguiente (Campos, 2013):

- 1º La existencia de salas que cumplan las normas GMP para la producción de medicamentos de terapia celular con acreditación específica de la Agencia Española de Medicamentos para cada tipo de medicamento celular o tisular que vaya a producirse.
- 2º La autorización asimismo por la Agencia Española de Medicamentos de los propios medicamentos celulares y tisulares para indicaciones clínicas concretas.
- y 3º La autorización de los protocolos de ensayo clínico por los Comités éticos de investigación clínica de los hospitales participantes y, también, de nuevo por la Agencia Española de Medicamentos, previo informe preceptivo de la Organización Nacional de Trasplante.

Es importante reseñar que el HFA, junto a las células corneales que lo acompañan en el diseño de dicho producto, ha superado todas las etapas arriba indicadas para su traslación a la clínica con independencia del resultado final del ensayo, lo que justifica que dicho biomaterial constituya un excelente producto sobre el que diseñar mejoras y potenciar efectos que redunden en tejidos artificiales más biomiméticos incluso que los actualmente en desarrollo.

Por otra parte, y mediante el denominado uso compasivo el modelo de piel artificial humana nano de HFA ha sido implantado en pacientes con quemaduras graves (70% de la superficie corporal) sin que se haya mostrado ningún tipo de complicación inherente a su composición y proceso de elaboración (Editorial, 2016).

#### **1.4.3 Ventajas, desventajas y aplicaciones futuras de la fibrina-agarosa**

Entre las ventajas del HFA destaca su bajo coste de producción, y su elevada biocompatibilidad y biodegradabilidad así como su potencial aplicación clínica como hemos descrito en el apartado anterior. Sin embargo, aunque con la nanoestructuración las propiedades biomecánicas de estos modelos mejoran significativamente no llegan a alcanzar valores idóneos para sustituir o reparar tejidos con propiedades de rigidez y elasticidad biomecánicas más complejos.

Con el objeto de mejorar las propiedades biomecánicas y estructurales de los biomateriales elaborados con HFA para su aplicación a algunos tejidos y órganos con propiedades biomecánicas específicas, se han realizado diferentes estudios en dicho biomaterial aplicando la técnica de nanoestructuración mediante compresión plástica (Ionescu et al., 2011, Scionti et al., 2014b; Carriel et al., 2015; García-Martínez et al., 2016). Los resultados han demostrado, con el uso de esta técnica, una mejora significativa de las propiedades biomecánicas y estructurales del HFA a la vez que mantiene la función celular (Carriel et al., 2015; García-Martínez et al., 2016). Su futura aplicación a la clínica es muy prometedora como demuestra la aprobación por la Agencia española del Medicamento de un producto de córnea con HFA nanoestructurado para un ensayo clínico y, asimismo, el uso de la piel artificial nanoestructurada para uso compasivo.

Dada la eficacia biológica y la biocompatibilidad mostrada por los HFA en el desarrollo de tejidos artificiales especialmente en aquellos a los se ha hecho referencia con anterioridad -piel, cornea, mucosa oral, nervios periféricos, etc.-, resulta imprescindible que su diseño alcance además todo el conjunto de propiedades biomecánicas que demandan dichos órganos y que igualmente suceda con aquellos otros tejidos y órganos que pudieran asimismo generarse por ingeniería tisular utilizando dicho biomaterial. Investigar por tanto la aplicación de distintos agentes facilitadores del entrecruzamiento al biomaterial de fibrina-agarosa con el objeto de desarrollar propiedades biomecánicas específicas para cada tejido u órgano artificial fabricado, permitiría no solo la generación de tejidos artificiales más biomiméticos que los que actualmente se generan con dicho biomaterial sino lograr un mayor grado de eficacia terapéutica.

Es importante reseñar que la acción de agentes químicos de entrecruzamiento como el glutaraldehido y el genipín no han sido investigados hasta el momento en HFA y que por tanto se desconocen los efectos potencialmente positivos sobre las propiedades del hidrogel de dichos compuestos. Investigar los efectos de los mismos sobre el HFA para su utilización en protocolos de ingeniería tisular constituye uno de los fines a lograr en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

Por otra parte, resulta asimismo de especial interés investigar en el biomaterial de fibrina-agarosa la acción conjunta de ambas técnicas promotoras de entrecruzamiento: la nanoestructuración por compresión plástica, de eficacia ya probada, y la aplicación de soluciones de glutraldehído y genipín. Dicha investigación, objeto de estudio asimismo en la presente tesis permitirá explorar la posibilidad de nuevos modelos de biomateriales, y por tanto de tejidos artificiales, con propiedades inéditas hasta ahora inexploradas.

La obtención de biomateriales bioactivos y personalizados, que puedan controlar la dimensión espacio-temporal y adaptarse a un entorno vivo cambiante, constituye, según Williams, uno de los objetivos básicos de la ingeniería tisular de nuestros días (Williams, 2014). En este contexto la generación, con métodos de entrecruzamiento concretos (nanoestructuración o soluciones químicas) o combinados (nanoestructuración y soluciones químicas) de biomateriales de fibrina-agarosa con propiedades biomecánicas específicas, alta viabilidad celular y elevada biocompatibilidad permitiría la obtención de un rango variable de biomateriales tisulares biomiméticos con numerosos tejidos corporales. Esta gama de posibles sustitutos constituiría no solo un importante avance en el campo de la ingeniería tisular, sino que podrían ser una alternativa terapéutica mucho más efectiva para el tratamiento de distintos tipos de lesiones.

En el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se expondrá en primer lugar el objetivo general y los objetivos específicos de la misma. Con posterioridad se expondrán pormenorizadamente los materiales y métodos utilizados tanto para la generación de dichos tejidos como para la evaluación *ex vivo* de los mismos. Tras describir los resultados, éstos se discutirán en el contexto de la bibliografía existente y se enumerarán las conclusiones de la investigación realizada.

## **2. OBJETIVOS**



**Objetivo general:**

Generar y caracterizar nuevos modelos de biomateriales y tejidos artificiales no nanoestructurados y nanoestructurados de fibrina-agarosa mediante técnicas de entrecruzamiento (*crosslinking*) utilizando distintos agentes químicos -glutaraldehído y genipín- con el objeto de evaluar el impacto estructural y biomecánico de los mismos y su aplicación en ingeniería tisular.

**Objetivos específicos:**

1. Elaborar nuevos modelos de biomateriales y tejidos artificiales no nanoestructurados y nanoestructurados de fibrina-agarosa mediante técnicas de entrecruzamiento utilizando distintas concentraciones de los agentes químicos glutaraldehído y genipín.
2. Establecer con microscopía óptica y electrónica de barrido los patrones estructurales y de porosidad de los nuevos biomateriales y tejidos artificiales con el objeto de evaluar el carácter biomimético de los mismos para su posible utilización en protocolos de ingeniería tisular.
3. Establecer, mediante un análisis reológico, los patrones biomecánicos de los nuevos biomateriales con el objeto de evaluar el carácter biomimético de los mismos para su posible utilización en protocolos de ingeniería tisular.
4. Evaluar las propiedades de biocompatibilidad *ex vivo* de los biomateriales generados por ingeniería tisular mediante la utilización de técnicas de análisis de viabilidad celular de carácter morfológico, biofuncional y bioquímico.
5. Seleccionar el proceso de biofabricación que resulte en biomateriales y tejidos artificiales de propiedades estructurales, reológicas y de viabilidad celular idóneas para protocolos específicos de ingeniería tisular.

# **3. METODOLOGÍA**

En este apartado se describe en primer lugar el proceso de elaboración de los constructos tisulares de fibrina-agarosa con y sin nanoestructuración y, en ambos casos, con o sin la acción entrecruzamiento de los agentes químicos glutaraldehído y genipín. Con posterioridad se describen los distintos métodos y técnicas con las que se identifican por un lado las características morfológicas y estructurales de los distintos modelos de constructos elaborados y se evalúan por otro las distintas propiedades biomecánicas y de biocompatibilidad que presentan.

### **3.1 Generación de hidrogeles de fibrina-agarosa (HFA)**

Para la elaboración de 30 mL de los constructos de fibrina-agarosa no nanoestructurados (HFA) al 0,1%, se añadieron 22,8mL de plasma sanguíneo humano, procedente de donantes sanos de sangre humana suministrados de acuerdo con la normativa existente por el CRTSBT (Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada Almería), a 2,25 mL de PBS (Alaminos et al., 2006; Sánchez-Quevedo et al., 2007; Garzón et al., 2009; Carriel et al., 2012, 2015). Para evitar la fibrinólisis espontánea de la fibrina, se añaden 450  $\mu$ L de ácido tranexámico (Amchafibrín®, FidesEcofarma, Valencia, España). La reacción de coagulación de la fibrina se precipita finalmente mediante la adición de 3 mL de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  0,025 mM a la mezcla anterior. A continuación, se añade 1,5 mL de agarosa tipo VII al 2% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) disuelta en PBS, previamente calentada hasta alcanzar el punto de fusión. La solución resultante se mezcla cuidadosamente y se distribuye en placas de 6 pocillos (3,5 cm de diámetro y 0,5 cm de espesor), colocando 5 mL de solución en cada uno de ellos. Los HFA se dejaron gelificar (polimerización) a 37°C durante 2h.

### **3.2 Nanoestructuración de hidrogeles de fibrina-agarosa (NHFA)**

Para elaborar los constructos de fibrina-agarosa nanoestructurados (NHFA), de acuerdo con las pautas previamente descritas (Ionescu et al., 2011, Scionti et al, 2014b y Carriel et al., 2015) los constructos fueron cuidadosamente extraídos de cada pocillo con la ayuda de una espátula de plástico flexible (Corning Microspatulaith V-shapedScoop/rounded Blade, Estéril), y colocados sobre la superficie de una placa de Petri de 6 cm de diámetro donde se secaron con papel absorbente para extraer el líquido sobrante alrededor del constructo. Posteriormente los hidrogeles de fibrina-agarosa fueron sometidos a un proceso de compresión plástica (nanoestructuración). Para ello, se colocaron las muestras entre un par de membranas de filtro de nylon con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Merck - Millipore, Darmstadt, Alemania) y se comprimieron entre un par de papeles absorbentes estériles Whatman de 3 mm de espesor, bajo una superficie plana de vidrio durante 3 minutos. La presión mecánica aplicada fue uniforme (500 g distribuidos homogéneamente que corresponden a una presión mecánica de 5100 Pa), obteniéndose una película o membrana de fibrina-agarosa nanoestructurada de alta densidad de app 50-60  $\mu\text{m}$  de espesor. Se utilizó un microscopio óptico Nikon E90i. Para determinar el espesor de las muestras. 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 (Scionti et al., 2014b). La dirección de nanoestructuración coincidió con el eje principal de los HFA (Fig. 2).

### **3.3 Entrecruzamiento en hidrogeles de fibrina-agarosa e hidrogeles de fibrina-agarosa nanoestructurados mediante los agentes químicos glutaraldehído y genipín**

Para mejorar las propiedades estructurales y biomecánicas de los HFA y NHFA, los constructos fueron sometidos a la técnica de entrecruzamiento con glutaraldehído al 0,25% y 0,5% (p/v) diluido en solución tampón fosfato (STF) (0,1 M, pH 7,2-7,4) y genipín al 0,25%, y 0,5% (p/v) diluido en STF 0,1M y PH 7,2-7,4) basados en artículos previos.

Para realizar el entrecruzamiento con glutaraldehído los constructos se sumergieron en 5 mL de solución de glutaraldehído al 0,25 y 0,5% durante 72h a temperatura ambiente y luego se lavaron varias veces con PBS suplementado con antibiótico al 5% (Sigma Aldrich, Alemania) durante 24h. Para realizar el entrecruzamiento con genipín, los constructos se sumergieron en 5 mL de cada solución de genipín durante 72h a 37°C y a continuación se aclararon varias veces con PBS durante 24h.

En el presente trabajo se establecieron cuatro grupos experimentales para el glutaraldehído y genipín. Estos grupos se detallan en la tabla 3. Asimismo en ambos casos se han utilizado 2 controles sin del proceso de entrecruzamiento (CTR-HFA, CTR-NHFA).

GA	GP
HFA-GA 0,25%	HFA-GP 0,25%
HFA-GA 0,5%	HFA-GP 0,5%
NHFA-GA 0,25%	NHFA-GP 0,25%
NHFA-GA 0,5%	NHFA-GP 0,5%

**Tabla 3:** Grupos experimentales sometidos al entrecruzamiento con glutaraldehído y genipín.

Tanto los grupos experimentales (glutaraldehído y genipín) como los grupos controles fueron evaluados por triplicado (n = 3 cada uno).

### **3.4 Evaluación por microscópica óptica y electrónica de barrido (MEB) del efecto del entrecruzamiento químico en los hidrogeles de fibrina-agarosa e hidrogeles de fibrina-agarosa nanoestructurados.**

Para el análisis por microscopía óptica los constructos (HFA Y NHFA) sometidos a entrecruzamiento con GA y GP y los grupos controles fueron fijados en una solución de formalina al 10% en PBS 0,1M durante 24h a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron deshidratadas, incluidas en parafina y cortadas a 5  $\mu\text{m}$  de espesor. Las secciones fueron desparafinadas, hidratadas y finalmente teñidas con eosina para su observación por microscopía de luz y fluorescencia (Carriel et al., 2015). Todas las secciones fueron examinadas en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i Fluorescencia y en microscopio de luz. Las imágenes fueron captadas con una cámara digital Nikon DXM 1200 con el software NIS Elements (Nikon, Tokio, Japón).

Para el estudio por MEB los constructos de los distintos grupos fueron lavados con agua destilada, durante algunos segundos y secados sobre papel de filtro. A continuación, fueron congelados mediante inmersión rápida en nitrógeno líquido y posteriormente criodesecados durante 17h en un sistema de alto vacío (Emitech, Walford,UK), con el objeto de extraer el agua de las muestras por sublimación. Las muestras permanecieron en la cámara del criodesecador hasta recuperar lentamente la temperatura ambiental para evitar la condensación del vapor de agua atmosférico sobre su superficie. Por último, las muestras fueron montadas sobre portamuestras de grafito y recubiertas con oro durante 30 segundos, en una unidad de recubrimiento (sputtering Emitech K775 Watford, UK) empleándose argón ( $P=10^{-5}$  mbar), para facilitar el barrido del haz de electrones durante su observación microscópica. El análisis microscópico se realizó en un microscopio electrónico de barrido ambiental PHILIPS Quanta 200 (FEI Europa, Eindhoven, Netherlands).

### **3.5 Análisis cuantitativo de la porosidad**

Para determinar la porosidad en los biomateriales con GA y GP, 6 imágenes obtenidas mediante MEB, de cada uno de los grupos anteriormente indicados, se analizaron mediante la función umbral (threshold) del software ImageJ (National Institutes of Health EE.UU.) siguiendo una metodología descrita previamente (Carriel et al., 2013, y 2014a). En concreto se determinó automáticamente el porcentaje de área libre entre las fibras del biomaterial o la fracción de área y se calculó el valor de la densidad de fibras mediante la utilización del NIS Elements software. Finalmente, los valores medios con su desviación estándar (SD) fueron calculados para cada variable en los grupos experimentales y grupos control.

### **3.6 Caracterización reológica**

Las propiedades mecánicas de las muestras de tejidos se midieron, a las 24 horas de su preparación a 37°C, con un reómetro de esfuerzo controlado de la marca Haake MARS III (Thermo Fisher Scientific, USA). La geometría de medida empleada fue la de placas paralelas, que consistía en dos discos con un diámetro de 3.5 cm, donde la superficie en contacto con la muestra presentaba rugosidad para evitar fenómenos de deslizamiento en superficie. La gelificación de las muestras de tejido se había realizado en placas de cultivo de 6 pocillos con un diámetro de 3.5 cm, igual que el de las placas del reómetro.

El procedimiento seguido fue el siguiente; se sitúa la muestra de tejido sobre la placa inferior del reómetro, y poco a poco se va acercando el plato superior hasta que la fuerza normal es ligeramente superior a 0 N (0.05 N aprox.). La distancia entre las dos placas del sistema de medida para la que se alcanzó dicho valor de fuerza normal varió de una muestra a otra, encontrándose para los geles no nanoestructurados entre 2.5 - 5.8 mm y para los geles nanoestructurados entre 50-400  $\mu\text{m}$ .

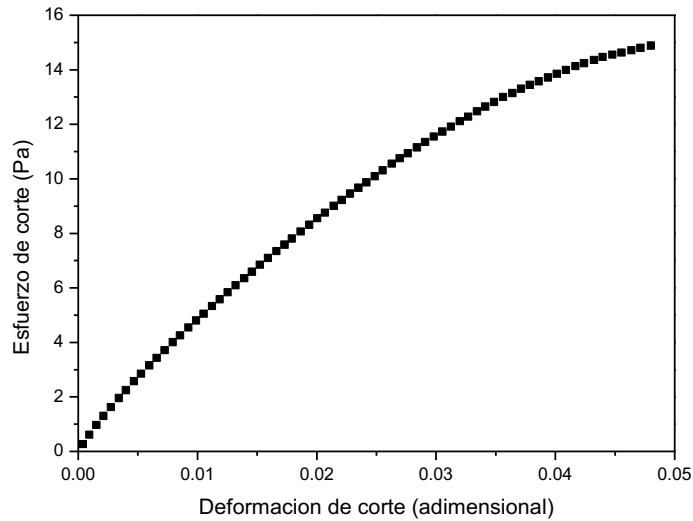
La consistencia mecánica de los hidrogeles generados se evaluó tanto en régimen estacionario como en régimen dinámico, siguiendo los siguientes protocolos:

**Estado estacionario.** En este tipo de ensayo, la muestra se somete a una rampa de esfuerzos de corte, midiéndose para cada valor el esfuerzo de corte necesario para mantener la deformación en estado estacionario. En los experimentos realizados, se mantuvo cada valor de deformación aplicada durante 10s. Este proceso se repitió para valores crecientes de deformación (rampa de deformación) hasta alcanzarse la zona de dependencia esfuerzo-deformación no lineal. Una dependencia típica del esfuerzo con la deformación de cizalla para este tipo de experimentos se muestra en la figura 8. Como se puede observar, a bajos valores de la deformación existe una dependencia aproximadamente lineal del esfuerzo con la deformación. A medida que aumenta la deformación aplicada, la linealidad comienza a perderse, tomando la curva una forma cóncava, que indica que la deformación sucesiva del material es más fácil a medida que este se encuentra más deformado, es decir, los incrementos de esfuerzo para igual incremento de deformación son menores a medida que aumenta la deformación. Se trata del comportamiento típico de los materiales elásticos reales. La consistencia de un material en régimen estacionario suele cuantificarse con el valor de su módulo de rigidez, que es la pendiente de la zona lineal en las curvas esfuerzo de corte vs. deformación de corte.

**Estado dinámico.** En este tipo de ensayos, la muestra se somete a un esfuerzo de corte oscilatorio de frecuencia y amplitud dadas y se mide el esfuerzo de corte resultante. Habitualmente se aplican esfuerzos oscilatorios sinusoidales y, dentro de la llamada zona viscoelástica lineal, el esfuerzo resultante es también sinusoidal, de la misma frecuencia que la deformación, pero desfasado respecto de ella (Macosko, 1994). Bajo estas condiciones se puede descomponer el esfuerzo en la suma de la parte en fase con la deformación y la parte en oposición de fase con la misma. De este modo, se pueden definir los módulos viscoelásticos,  $G'$  (módulo elástico) y  $G''$  (módulo viscoso), de la siguiente forma: siendo  $G'$  el cociente entre la amplitud de la parte del esfuerzo en fase con la deformación y la amplitud de la misma, y  $G''$  el cociente entre la amplitud de la parte del esfuerzo en oposición de fase con la deformación y la amplitud de esta. Dentro de la zona viscoelástica lineal (ZVL),  $G'$  cuantifica la respuesta elástica del material, mientras que  $G''$  su respuesta viscosa. Para la caracterización del



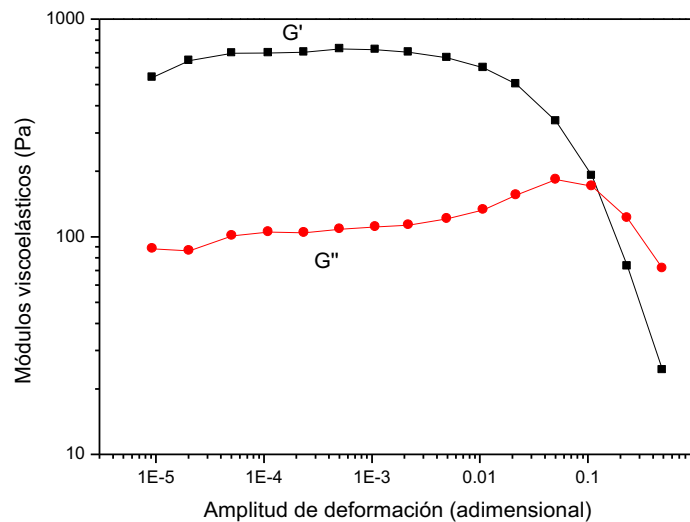
estado dinámico realizamos dos tipos de ensayos, barridos de amplitud de deformación a frecuencia constante y barridos de frecuencia a amplitud constante.



**Figura 8.** Típica dependencia del esfuerzo de corte en función de la deformación de corte para los hidrogeles preparados.

**Barrido en amplitud a frecuencia constante.** Durante este ensayo, la muestra se sometió a una deformación de corte de amplitud creciente, manteniéndose constante la frecuencia, e igual a 1 Hz. Para cada valor de amplitud se realizaron 5 ciclos de oscilación, tomándose la media de los tres últimos ciclos, descartándose los 2 primeros para eliminar los transitorios. Una dependencia típica de  $G'$  y  $G''$  en estos experimentos se muestra en la figura 9. Como se puede observar, tanto  $G'$  como  $G''$  presentan un valor inicial (bajos valores de amplitud de deformación) aproximadamente independiente de la amplitud de deformación, disminuyendo  $G'$  rápidamente para valores de amplitud de deformación superiores a aprox. 0.01. Esta brusca disminución de  $G'$  marca el inicio la pérdida de linealidad del material. Es habitual caracterizar la respuesta viscoelástica de un material a partir de los valores de  $G'$  y  $G''$  correspondientes a la ZVL (zona plana). Téngase en cuenta que los materiales marcadamente elásticos (por ejemplo, piel, elastómeros y caucho) presentan valores

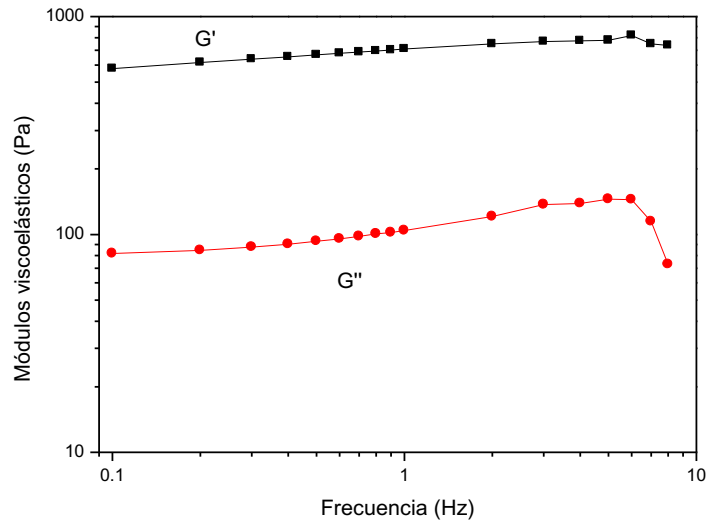
de  $G'$  muy superiores a los de  $G''$  en la ZVL, mientras que los materiales de carácter marcadamente líquido (aceites, grasas, disoluciones acuosas, sangre, etc.) presentan valores superiores de  $G''$  a  $G'$  en la ZVL. Las muestras de la presente invención presentan todas ellas un carácter marcadamente elástico, con valores de  $G'$  muy superiores a los de  $G''$ .



**Figura 9.** Típica dependencia de los módulos viscoelásticos con la amplitud de deformación para medidas en régimen dinámico (oscilaciones sinusoidales de frecuencia igual a 1 Hz).

**Barrido de frecuencia a amplitud constante.** En estos ensayos en régimen dinámico, se somete el material a esfuerzos oscilatorios de amplitud constante (pertenece a la ZVL) y frecuencia variable. Para cada valor de amplitud se realizaron 5 ciclos de oscilación, tomándose la media de los tres últimos ciclos, descartándose los 2 primeros para eliminar los transitorios. Una dependencia típica de las tendencias obtenidas se muestra en la figura 10. Como se puede observar en dicha figura,  $G'$  y  $G''$  presentan una tendencia ligeramente ascendente a medida que la frecuencia de oscilación aumenta, siendo  $G'$  muy superior a  $G''$  en todo el rango de valores. Esta tendencia es típica de materiales poliméricos con un elevado entrecruzamiento (Macosko, 1994). Nótese, además, que  $G''$  presenta una marcada tendencia decreciente a elevados

valores de la frecuencia, que parece ser típica de tejidos biológicos humanos (Rodríguez et al., 2013).



**Figura 10.** Típica dependencia de los módulos viscoelásticos con la frecuencia de deformación para medidas en régimen dinámico (oscilaciones sinusoidales de frecuencia amplitud perteneciente a la zona viscoelástica lineal).

Todos los ensayos mencionados se efectuaron con diferentes alícuotas de cada tipo de muestra. Los resultados que se describen a continuación siempre corresponden a los valores medios obtenidos con al menos 3 alícuotas diferentes.

Para el análisis cuantitativo y estadístico, se analizaron en los geles tratados con genipín y GA tres constructos de cada grupo ( $n = 3$ ). Asimismo, los ensayos reológicos ( $G$ ,  $G'$  y  $G''$ ) se llevaron a cabo tres veces en cada constructo, por lo que los valores cuantitativos incluidos en la sección de resultados son siempre la media de tres pruebas x tres construcciones ( $n = 9$ ).

### **3.7 Biocompatibilidad *ex vivo***

Para determinar la biocompatibilidad *ex vivo* de los distintos tipos de constructos generados se utilizaron fibroblastos de piel humana. Estas células fueron previamente obtenidas de biopsias de piel de donantes sanos. Para determinar la biocompatibilidad, las células fueron subcultivadas en la superficie de cada constructo y se determinó la viabilidad transcurridas 48h utilizando los siguientes ensayos de viabilidad

- Generación de cultivos primarios de fibroblastos humanos
- Ensayo de viabilidad celular *Live / Dead*<sup>®</sup> (Kit Viabilidad / Citotoxicidad Molecular Sondas, Eugene, Oregon, EE.UU.)
- Evaluación de la interacción célula-biomaterial por MEB
- Determinación de la actividad de deshidrogenasas mitocondriales (WST-1)
- Cuantificación de ADN.

A continuación, se describe el protocolo de las distintas técnicas realizadas:

#### **3.7.1 Generación de cultivos primarios de fibroblastos humanos**

Para la realización de la presente Tesis Doctoral, se han utilizado pequeñas biopsias (tamaño medio 2x2x2 mm) de piel humana sana procedentes de pacientes sometidos a cirugía menor en el departamento de dermatología del Complejo hospitalario de la Universidad de Granada. Una vez obtenidas las muestras, estas fueron introducidas inmediatamente en medio de transporte estéril constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich, Company, Ltd, UK) suplementado con antibióticos (500 U/mL de penicilina G y 500 µg/mL de estreptomina) y antimicóticos (1.25 µg/mL de anfotericina B) (Sigma-Aldrich, Company, Ltd, UK) para evitar una eventual contaminación de la muestra.

Transcurrido el periodo de transporte, todas las muestras fueron lavadas 3 veces en una solución estéril de PBS suplementado con antibióticos (500 U/mL, 500 µg/mL y 1.25 µg/mL, respectivamente) para eliminar todos los restos de sangre,

fibrina, grasa o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a las muestras. Para llevar a cabo la digestión de la matriz extracelular de la dermis y conseguir la separación de los fibroblastos, las muestras fueron inmersas a 37°C en una solución estéril de colagenasa tipo I de *Clostridium hystolicum* (Gibco BRL Life Technologies Ref. 17100-017, Karlsruhe, Alemania) al 2% en medio de cultivo DMEM durante 10-12 horas. Esta solución es capaz de digerir el colágeno de la dermis y liberar los fibroblastos. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a retirar el epitelio no digerido de la piel. Para la obtención de cultivos primarios de fibroblastos, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos la solución de digestión que contenía los fibroblastos disgregados de la dermis recogiendo el pellet celular correspondiente a los fibroblastos en frascos de cultivo de 15 cm<sup>2</sup> de superficie. Como medio de cultivo, se utilizó DMEM rico en glucosa (Sigma-Aldrich Ref. D5796) suplementado con antibióticos-antimicóticos (100 U/mL de penicilina G, 100 µg/mL de estreptomicina y 0,25 µg/mL de anfotericina B; Sigma-Aldrich Ref. A5955) y suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich Ref. F9665) al 10%. En todos los casos, las células fueron incubadas a 37°C con un 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo fueron renovados cada tres días.

### **3.7.2 Ensayo de viabilidad celular *Live/Dead***

Este ensayo permite cuantificar la viabilidad de las células evaluando la integridad de su membrana plasmática. Para la realización del ensayo se cultivaron 10<sup>4</sup> células 48h en la superficie de cada uno de los constructos generados sin nanoestructuración y con o sin la acción de los agentes químicos de entrecruzamiento glutaraldehído y genipín. A continuación, se lavaron en PBS, 3 veces (5 min cada uno) y se incubaron en una disolución de acetometoxi-calceína y compuesto de etidio durante 30 minutos. Los constructos fueron lavados en PBS e inmediatamente después se analizaron con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-U (Nikon Instruments Inc, NY, USA) y microscopio de luz invertida Microscopio (Nikon) equipado con una cámara digital Nikon DXM1200c (Nikon, Tokio, Japón). Las longitudes de onda

de excitación de los fluorocromos fueron 494 nm para la calceína y 528 nm para bromuro de etidio, respectivamente.

Como control positivo se utilizaron células cultivadas en porta objetos para cultivo celular o *chambers slides* (2D Control positivo). Como control negativo (control negativo 2D) las células fueron tratadas con Tritón X-100 al 2%. El ensayo se realizó por triplicado y siguiendo las recomendaciones del fabricante y estudios previos (Campos et al., 2016a, 2016b; García-Martínez et al., 2016).

### **3.7.3 Evaluación de la interacción célula-biomaterial por MEB**

Para determinar el patrón morfo-estructural de las células depositadas sobre los distintos tipos de constructos estos se fijan en glutaraldehído al 2,5% en buffer cacodilato y se post-fijan en tetróxido de osmio al 1% durante 90 minutos. Tras la fijación las muestras se deshidratan en concentraciones crecientes de acetona y sometidas a desecación con punto crítico, montadas en soportes de aluminio y recubiertas de oro de acuerdo con las técnicas establecidas al respecto (Carriel et al., 2015; Sánchez-Quevedo et al., 2007)). Las muestras se observaron en un microscopio ambiental FEI Quanta 200 SEM (FEI Europe, Eindhoven, Netherlands).

### **3.7.4 Determinación de la actividad de deshidrogenasas mitocondriales (WST-1)**

El ensayo de WST-1 se realizó siguiendo las recomendaciones de fabricación y los protocolos descritos anteriormente (Garzón et al., 2012a, Martín-Piedra et al., 2014). Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos (Iwaki, Japan) en las cuales se sembraron  $5 \times 10^4$  células en la superficie de los constructos; después de 48 h se retiró el medio, se lavaron en PBS y fueron incubados con la solución de trabajo (100µl de sal de tetrazolio soluble en agua, WST-1) como reactivo de una reacción de reducción, durante 4 a 37°C. Para cuantificar la observancia en cada pocillo, usando siempre dos longitudes de onda predeterminadas: 450 nm y 690 nm, se usó un lector de placas (UVM 340, Asys, Cambridge, UK). Como control negativo, los constructos con células

cultivadas en la parte superior de los mismos, se incubaron con solución de tritón X-100 al 2% durante 10 min, lo que induce un daño rápido e irreversible y la muerte de las células. Estos ensayos se realizaron en triplicado.

### **3.7.5 Cuantificación de la liberación de ADN**

Con el fin de evaluar cuantitativamente la permeabilidad de la membrana celular, se cuantificó el ADN liberado usando un Espectrofotómetro UV-Vis Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) (Rodríguez-Arco et al., 2016; Campos et al., 2016b). Tras 48 h después del cultivo, de las células sobre la superficie de los constructos, el sobrenadante del medio de cultivo se colocó en tubos Eppendorf para la cuantificación del ADN. Para este análisis se utilizaron cuatro constructos de cada modalidad y se realizaron tres cuantificaciones de ADN en cada una de ellas (n = 12 en cada una). Como grupo control negativo se utilizaron las células incubadas con tritón x-100 al 2% durante 10 min, induciéndose una liberación elevada de ADN debido al daño irreversible de las membranas plasmáticas y nucleares.

### **3.8 Análisis cuantitativo y estadístico**

Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones experimentales y los controles, todas las variables fueron sometidas primero a la prueba de Shapiro-Wilk para contrastar la normalidad. En este sentido se utilizó la prueba t de Student para variables de distribución normal con el objeto de comparar los resultados de la fracción de área (porosidad) y densidad de fibras entre los grupos. La prueba de Mann-Whitney fue utilizada para comparar las variables no-paramétricas como los resultados de los ensayos WST-1, y liberación de ADN, así como las propiedades reológicas (módulos  $G$ ,  $G'$  y  $G''$ ). La prueba de correlación de Kendall se utilizó para determinar la significación estadística y las correlaciones positivas o negativas entre los valores de WST-1 y ADN. Para comparar los resultados de los distintos modelos tisulares se utilizó la prueba de Mann-Whitney tras la normalización de las medias. Todos los datos fueron analizados con SPSS 16.00 y valores  $p < 0.05$

fueron considerados estadísticamente significativos, excepto para las comparaciones globales de valores normalizados en las que se aplicó la corrección de Bonferroni.



## **4. RESULTADOS**

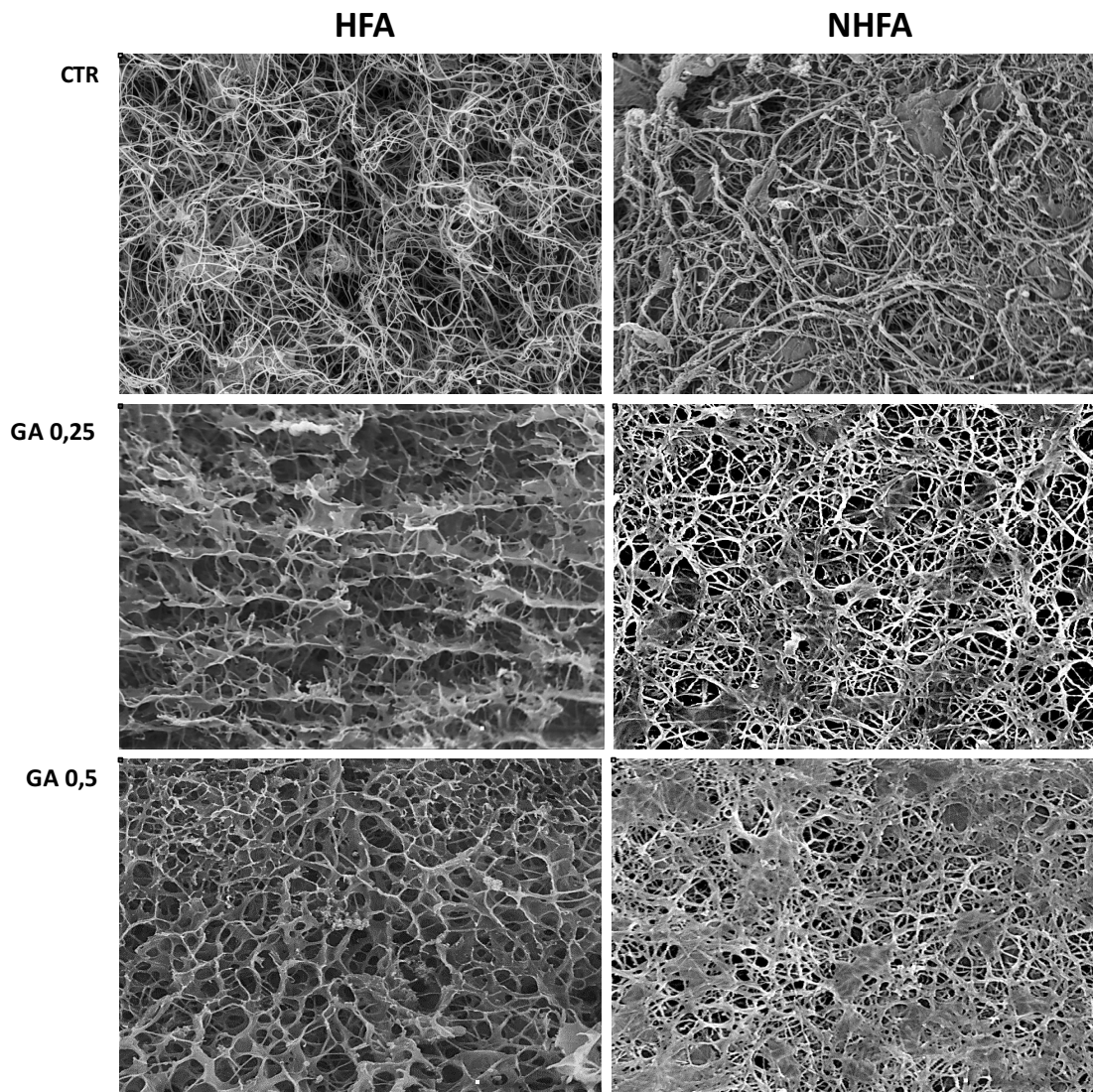
Una vez aplicada la metodología descrita en capítulo correspondiente para la elaboración de los constructos artificiales y sometidos estos a la acción de los agentes químicos de entrecruzamiento, glutaraldehido y genipín, y una vez evaluados los mismos con las distintas técnicas descritas asimismo en dicho capítulo, procedemos en la presente Tesis Doctoral a exponer los resultados obtenidos subdividiendo los mismos en tres grandes apartados: los resultados obtenidos en la generación de los constructos de HFA y NHFA sometidos a la acción del glutaraldehido, los resultados obtenidos en idénticos constructos tras la acción del genipín y las comparaciones de los resultados obtenidos en los dos anteriores apartados. En los dos primeros apartados se describen el análisis estructural de dichos constructos, incluidos sus patrones de porosidad, el análisis reológico y el análisis de biocompatibilidad *ex vivo*. Los resultados serán comparados en cada apartado con constructos de fibrina-agarosa controles no tratados con los agentes químicos utilizados para el entrecruzamiento. En el tercer apartado, se establecen las comparaciones existentes entre todos los grupos experimentales.

#### **4.1 Resultados del efecto del entrecruzamiento con glutaraldehido en los HFA y NHFA**

##### **4.1.1 Análisis estructural**

El análisis histológico utilizando la tinción con eosina y la microscopía de fluorescencia puso de relieve que tanto en los constructos control, como aquellos que fueron sometidos a entrecruzamiento existe un patrón fibrilar variable que delimita un alto nivel de porosidad.

El análisis histológico con microscopía de barrido permite definir con mayor claridad el patrón fibrilar y de porosidad en cada uno de los grupos de estudio y realizar un análisis morfométrico de la fracción de área (porosidad) y la densidad fibrilar (Fig. 11).



**Figura 11.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los geles no nanoestructurados (HFA) y nanoestructurados (NHFA). CTR: controles no sometidos a entrecruzamiento; GA 0,25: biomateriales sometidos a la acción del entrecruzamiento con glutaraldehído 0,25%; GA 0,5: biomateriales sometidos a la acción del entrecruzamiento con glutaraldehído 0,5% Escala = 20  $\mu$ m.

Los resultados en este sentido ponen de relieve que los HFA y NHFA sometidos a entrecruzamiento con glutaraldehído muestran cambios estructurales significativos en relación con los CTR-HFA y CTR-NHFA.

El análisis cuantitativo realizado sobre la porosidad -fracción de área- muestra que el glutaraldehído induce una disminución significativa de dicha porosidad en los constructos HFA ( $p < 0,05$ ) (tabla 4), especialmente en el grupo HFA-GA 0,5. Sin embargo, las diferencias entre HFA-GA 0,25 y HFA-GA 0,5 no fueron estadísticamente significativas ( $p = 0,244$ ) (tabla 4).

El análisis cuantitativo de los constructos nanoestructurados muestra diferencias significativas entre los constructos control CTR-NHFA y los constructos sometidos a entrecruzamiento con glutaraldehído ( $p < 0,05$ ). En los constructos CTR-NHFA y NHFA-GA 0,25, la porosidad fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que la existente en el grupo NHFA-GA 0,5 (tabla 4). La mayor porosidad se observó en cualquier caso en el grupo control CTR-HFA en comparación con la observada en los demás grupos, y estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) (tabla 4), El grupo NHFA-GA 0,5 presentó por el contrario uno de los valores más bajos de fracción de área ( $p < 0,05$ ).

El análisis cuantitativo de la densidad de fibras, fue superior después de la nanoestructuración y la aplicación del glutaraldehído en ambas concentraciones 0,25% y 0,5% en comparación con los constructos no nanoestructurados. Todas las diferencias entre todos los grupos fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) (tabla 4).

Finalmente, las diferencias entre los constructos HFA y NHFA con entrecruzamiento y NHFA con entrecruzamiento y constructos control CTR-HFA fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, no fueron estadísticamente significativas para la comparación entre HFA con entrecruzamiento y constructos control CTR-NHFA ( $P > 0,05$ ) (tabla 4).

	GRUPO CONTROL		GRUPO GA-0,25%		GRUPO GA-0,5%	
	HFA	NHFA	HFA	NHFA	HFA	NHFA
% FRACCIÓN DE ÁREA (POROSIDAD)	65.27 ± 5.23	48.61 ± 3.70 a	57.54 ± 8.46 a, b, e	53.85 ± 4.37 a, b, d	54.48 ± 2.66 a, b	40.49 ± 6.42 a, b
DENSIDAD DE FIBRAS (%)	34.73 ± 5.22	51.39 ± 3.69 a	42.45 ± 8.45 a, b	48.39 ± 9.42 a, d	45.51 ± 2.66 a, b	59.51 ± 6.42 a, b, e

**Tabla 4.** Resultados cuantitativos y estadísticos de la porosidad de los biomateriales. La fracción de área y la densidad de fibras de HFA, NHFA y constructos sometidos a los agentes de entrecruzamiento se muestran como media ± desviación estándar. La comparación entre los grupos se llevó a cabo mediante el uso de la prueba T de Student para la fracción de área y la densidad de fibras.

*a = Indica diferencias estadísticamente significativas de todos los grupos frente a HFA.*

*b = Indica diferencias estadísticamente significativas de todos los grupos vs. NHFA.*

*c = Indica diferencias estadísticamente significativas entre HFA-GA 0,25 vs. HFA-GA 0,5.*

*d = Indica diferencias estadísticamente significativas entre NHFA-GA 0,25 vs. NHFA-GA 0,5.*

*e = Indica diferencias estadísticamente significativas entre HFA-GA 0,25 vs. NHFA-GA 0,5.*

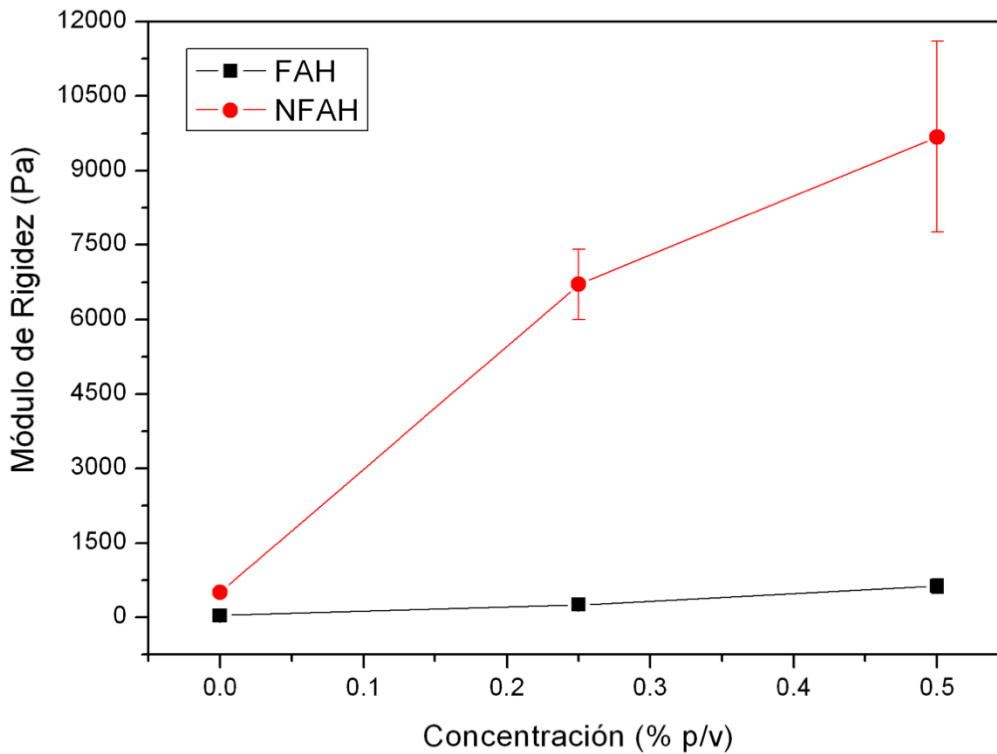
*f = Indica diferencias estadísticamente significativas entre HFA-GA 0,5 vs. NHFA-GA 0,25.*

#### 4.1.2 Análisis reológico

A continuación, pasamos a comentar los resultados obtenidos para el estado estacionario y el estado dinámico de los constructos generados en esta Tesis Doctoral tras ser sometidos a la acción del glutaraldehído.

##### Estado estacionario:

En la figura 12, podemos ver representado los valores del módulo de rigidez dentro de la zona viscoelástica lineal para las distintas concentraciones del glutaraldehído utilizadas. Como se observa en la imagen podemos ver que el módulo de rigidez aumenta a medida que aumenta la concentración del agente de entrecruzamiento utilizado tanto para los constructos no nanoestructurados como para los constructos nanoestructurados.



**Figura 12:** Valor del módulo de rigidez de los constructos preparados (no nanoestructurados -HFA- y nanoestructurados -NHFA-) en función de la concentración de glutaraldehído.

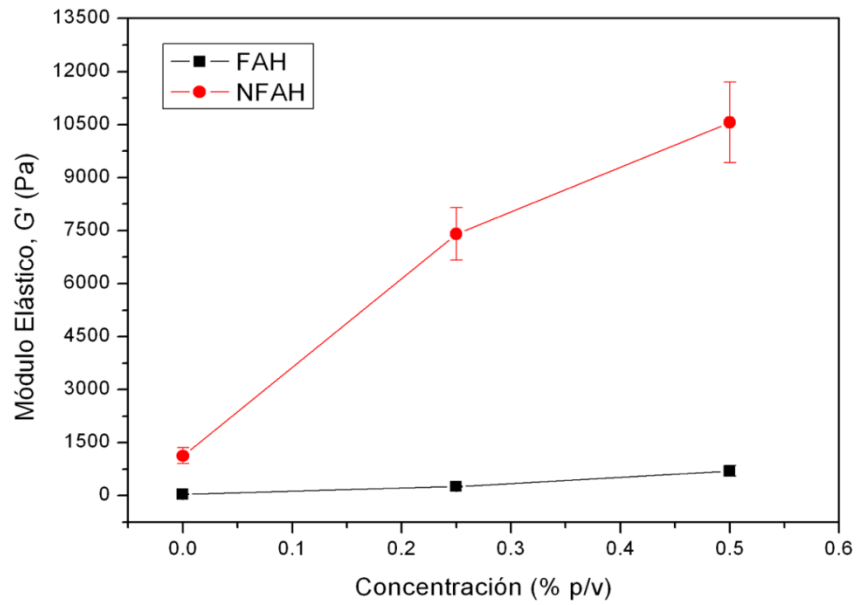
En este sentido, la determinación del módulo de rigidez (G) de los controles (HFA y NHFA) y de los constructos sometidos a los agentes de entrecruzamiento, mostraron valores significativamente mayores que para los controles, especialmente en el grupo de GA 0,5 (Fig. 12, tabla 5). Además, cuando comparamos los valores del módulo de rigidez entre ambos controles (HFA y NHFA) y entre los grupos de entrecruzamiento, las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) (Fig. 12, tabla 5).

### **Estado dinámico:**

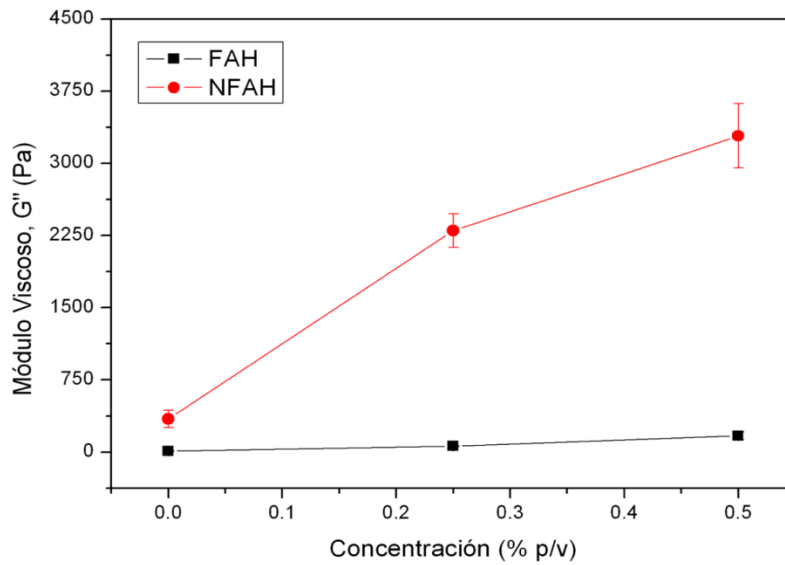
Con los barridos de amplitud y de frecuencia obtenidos para todos los materiales estudiados, se obtuvieron los valores de los módulos elásticos y viscoso, correspondientes con una frecuencia de 1 Hz y a una amplitud de un 1%, en función de la concentración de agente de entrecruzamiento utilizada.

Como podemos ver en las figuras 13 y 14, correspondientes al módulo elástico y al módulo viscoso respectivamente, se observa una tendencia ascendente de estos módulos a medida que aumentamos la concentración del agente de entrecruzamiento.

El análisis estadístico de los módulos elásticos y viscoso ( $G'$  y  $G''$  respectivamente) muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre HFA vs NHFA (Fig. 13-14 y tabla 5). Al mismo tiempo, los constructos nanoestructurados sometidos a los agentes de entrecruzamiento mostraron valores significativamente mayores de  $G'$  y  $G''$  que los constructos no nanoestructurados sometidos a los agentes entrecruzamiento (Fig. 13-14 y tabla 5).



**Figura 13.** Valor del módulo elástico correspondiente a la zona viscoelástica lineal (correspondiente a una deformación de corte de 0.01 y una frecuencia de 1Hz) de los constructos preparados (HFA y NHFA) en función de la concentración de glutaraldehído utilizado.



**Figura 14.** Valor del módulo viscoso correspondiente a la zona viscoelástica lineal (correspondiente a una deformación de corte de 0.01 y una frecuencia de 1Hz) de los constructos preparados (HFA y NHFA) en función de la concentración de glutaraldehído utilizado.



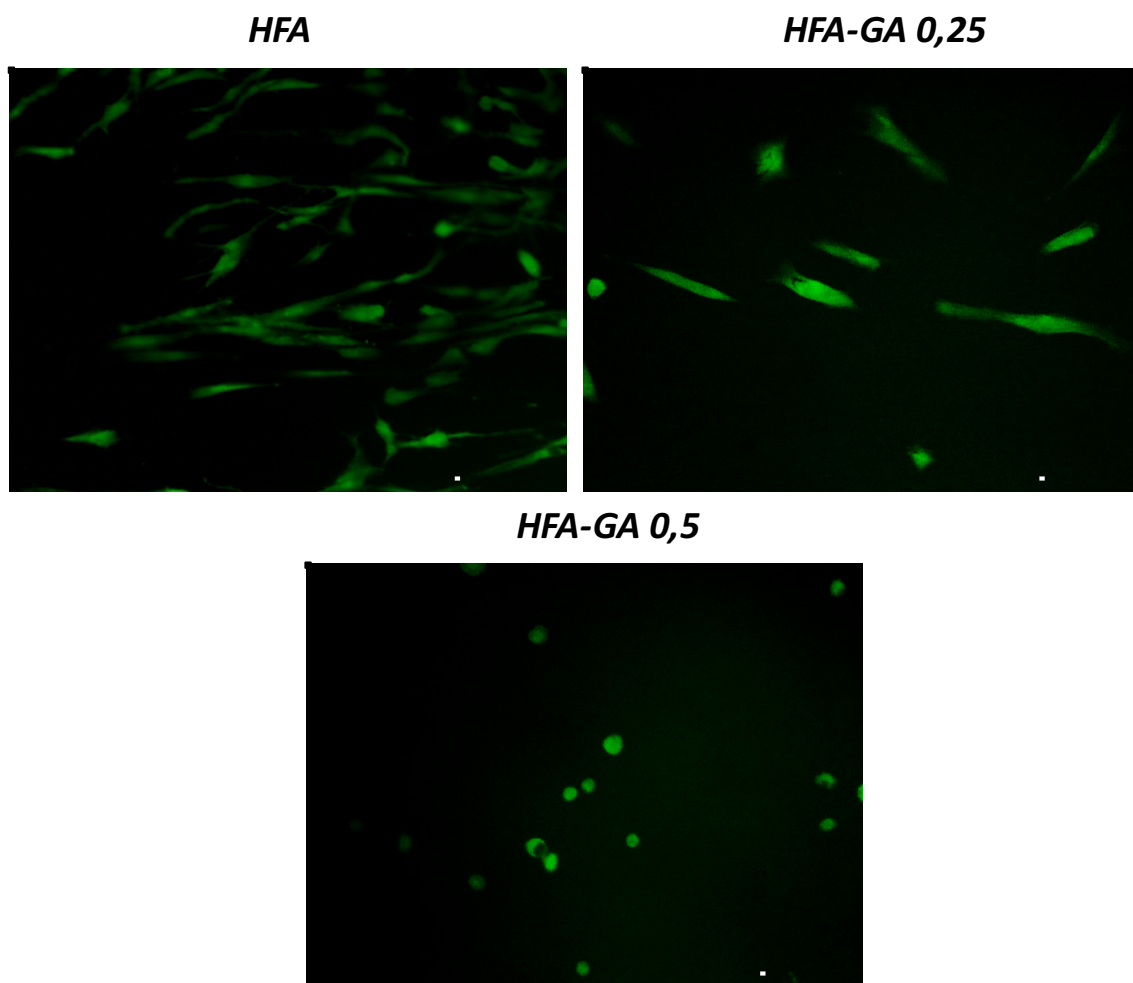
	GRUPO CONTROL		GRUPO GA-0,25%		GRUPO GA-0,5%	
	HFA	NHFA	HFA	NHFA	HFA	NHFA
G (Pa)	31.5 ± 2.3	500 ± 60	250 ± 12	6700 ± 700	630 ± 150	9700 ± 1900
G' (Pa)	36 ± 7	1130 ± 220	258 ± 18	7400 ± 700	700 ± 150	10600 ± 1100
G'' (Pa)	8.9 ± 1.7	350 ± 90	61 ± 4	2300 ± 170	170 ± 40	3300 ± 300

**Tabla 5.** Resultados cuantitativos y estadísticos de la caracterización reológica de los constructos los grupos controles y los grupos sometidos a entrecruzamiento. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar, y las comparaciones se realizaron mediante la prueba de Mann-Whitney, que reveló diferencias estadísticamente significativas para todas las comparaciones.

#### 4.1.3 Análisis de biocompatibilidad *ex vivo*

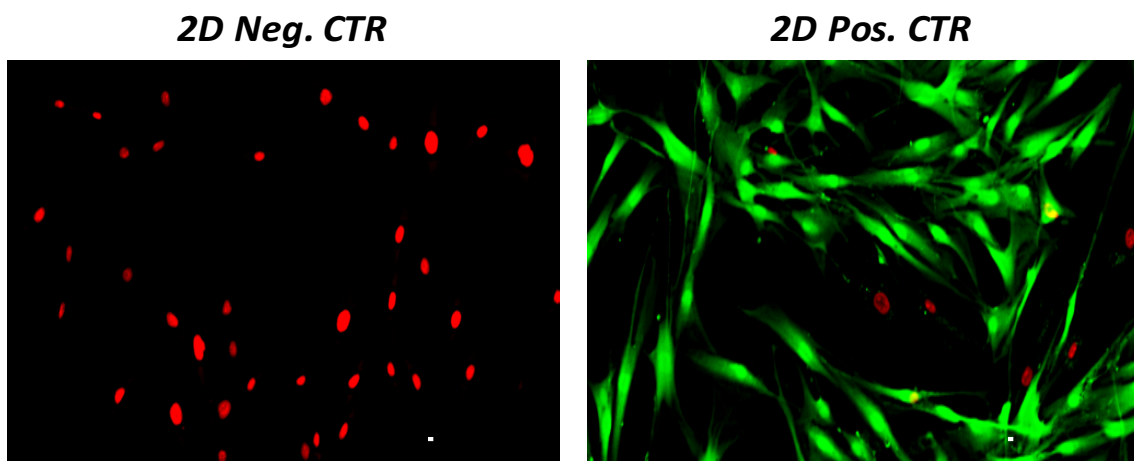
Los resultados en relación con la biocompatibilidad *ex vivo* se derivan de la aplicación de las distintas técnicas descritas en el apartado de material y métodos

El análisis funcional y morfológico mediante la técnica de *Live/Dead* demuestra la existencia de viabilidad en las células cultivadas sobre los constructos no nanoestructurados (CTR-HFA) y los sometidos a entrecruzamiento con GA (Fig. 15).



**Figura 15.** Comportamiento de los fibroblastos en el grupo control HFA y los sometidos a entrecruzamiento con GA. El ensayo de proliferación celular *Live/Dead* mostró las células viables en verde. Escala= 100  $\mu$ m

En los constructos control HFA, los fibroblastos, en elevado número, se adhieren a la superficie del biomaterial, con un patrón morfológico fusiforme o estrellado. La viabilidad que presentan dichas células es muy similar a la que presentan las células en el control positivo (2D) (Fig. 16).

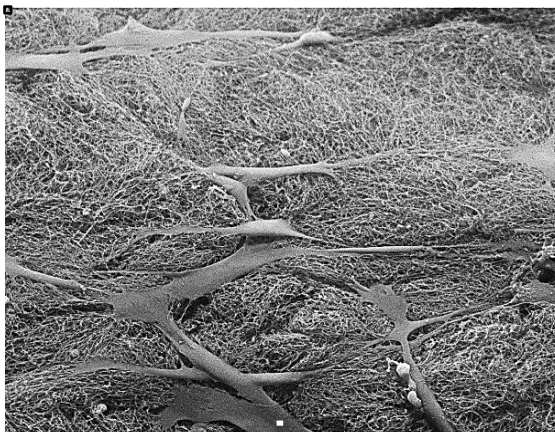


**Figura 16.** El ensayo de proliferación de células *Live/Dead* mostró las células viables en verde, mientras que las células muertas se tiñeron en rojo, que son evidentes en el grupo de control negativo 2D. Escala= 100  $\mu$ m

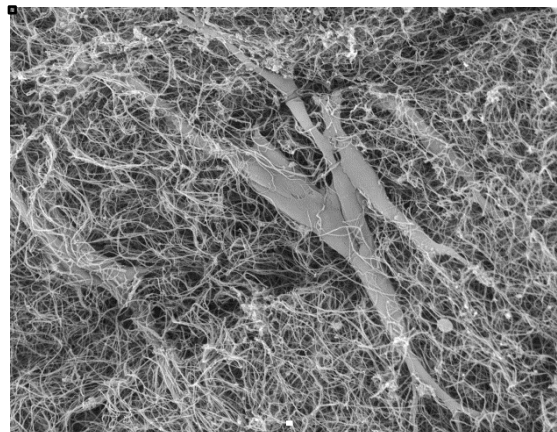
El estudio con microscopía electrónica de barrido puso en evidencia que los fibroblastos fueron capaces de interactuar con el componente fibroso del biomaterial de fibrina-agarosa para formar lamellipodia y filopodia (Fig. 17).

El examen con la técnica de *Live/Dead* y con microscopía electrónica de barrido de los constructos no nanoestructurados sometidos a entrecruzamiento con glutaraldehído al 0,25% (HFA-GA 0,25) pone de relieve que el número de fibroblastos adheridos a la superficie del biomaterial es algo menor, si bien la morfología de los mismos fue similar a la observada en los constructos HFA y en el grupo control 2D (Fig. 15). En los constructos no nanoestructurados sometidos a entrecruzamiento con glutaraldehído al 0,5% (HFA-GA 0,5) las células presentes en la superficie de los mismos, escasas en número, ofrecen una morfología de carácter generalmente esférico.

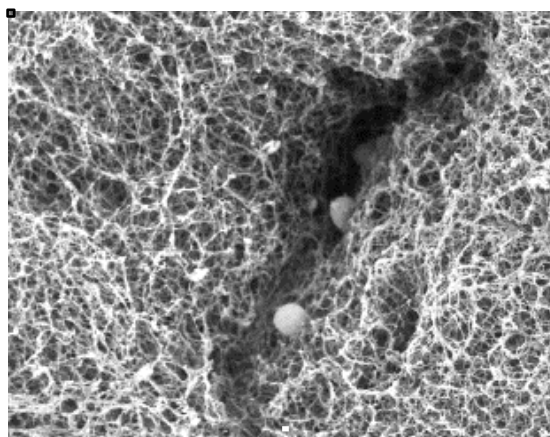
**HFA**



**HFA-GA 0,25**



**HFA-GA 0,5**



**Figura 17.** Imágenes con microscopía electrónica de barrido (MEB) de fibroblastos adheridos a la superficie de los geles controles y de los sometidos a entrecruzamiento con GA.

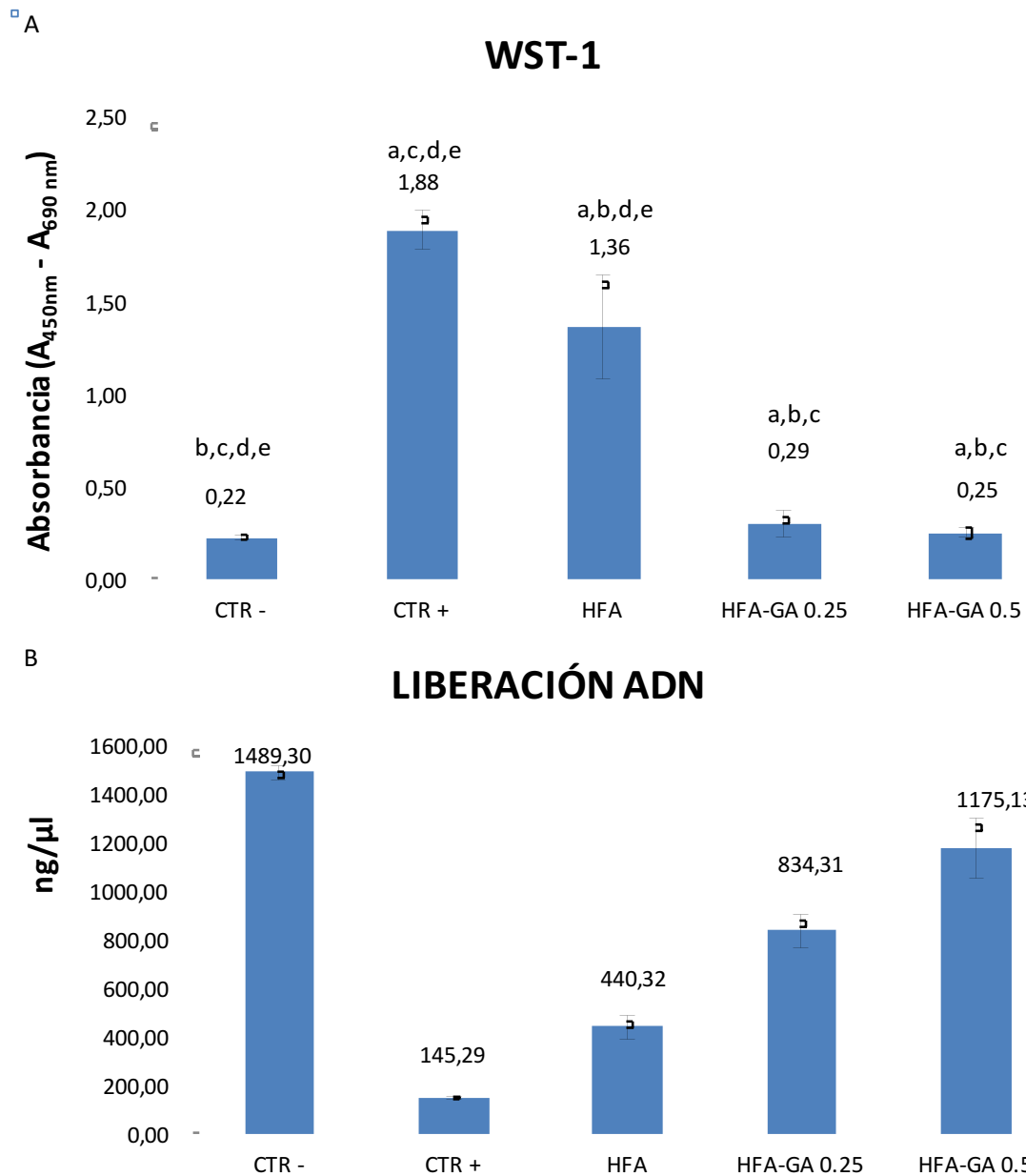
Escala= 100  $\mu$ m

El análisis de proliferación celular, mediante los ensayos con WST-1, muestra valores significativamente superiores en el grupo control 2D positivo en comparación con los obtenidos en los constructos no nanoestructurados (HFA), los constructos no nanoestructurados sometidos a entrecruzamiento con glutaraldehído (HFA-GA) y el grupo control 2D negativo (Fig. 18-A).

Los fibroblastos cultivados sobre los constructos no nanoestructurados HFA mostraron niveles significativamente más altos ( $p < 0,05$ ) de proliferación celular que los cultivados en constructos sometidos a entrecruzamiento (HFA-GA 0,25 y 0,5%) y los controles negativos 2D (Fig. 18-A). De hecho, los valores de proliferación celular fueron significativamente más bajos ( $p < 0,05$ ) en paralelo con el incremento de la concentración de glutaraldehído en el proceso de entrecruzamiento. En cualquier caso, las células cultivadas sobre los constructos sometidos a entrecruzamiento (HFA-GA 0,25 y 0,5%) mostraron una proliferación celular significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que la del grupo control negativo 2D. La proliferación celular en los constructos con entrecruzamiento fue superior en el grupo sometido a un entrecruzamiento con glutaraldehído al 0,25% (HFA-GA 0,25%) que en el grupo sometido a un entrecruzamiento con glutaraldehído al 0,5% (HFA-GA 0,5%). A pesar de ello no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p = 0,506$ ).

El análisis espectrofotométrico de la liberación de ADN, como resultado del daño irreversible de la membrana nuclear, mostró un impacto significativo en los cultivos 3D en comparación con el grupo control positivo 2D, presentando este último grupo los valores más bajos, mientras que el grupo control negativo 2D tuvo la mayor liberación de ADN. Cuando comparamos la liberación de ADN en células cultivadas sobre los constructos no nanoestructurados (HFA) y los constructos sometidos a entrecruzamiento con las dos concentraciones de glutaraldehído (HFA-GA 0,25 y 0,5%), los valores aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) en paralelo con la concentración de GA. Sin embargo, la liberación de ADN de las células cultivadas sobre los constructos sometidos a entrecruzamiento (HFA-GA 0,25 y 0,5%), mostraron valores significativamente más bajos ( $p < 0,05$ ) que los existentes en el grupo de control negativo 2D (Fig. 18-B).

El test de correlación de Kendall mostró una correlación negativa entre los valores de proliferación de células WST-1 y los valores de liberación de ADN ( $p = 0,000$ ; coeficiente de correlación  $r = -0,716$ ).



**Figura 18.** Análisis cuantitativo de biocompatibilidad *ex vivo*. Representaciones gráficas del ensayo de proliferación de celular WST-1 (a) y liberación de ADN (b) de los controles 2D (negativos y positivos), constructo control (HFA) y los constructos sometidos a entrecruzamiento (HFA-GA 0,25 y HFA-GA 0,5 respectivamente) con sus respectivos valores medios  $\pm$  desviación estándar. Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante la prueba de Mann-Whitney.

a = Indique las diferencias estadísticamente significativas de cada grupo frente al CTR negativo de 2D.

b = Indica diferencias estadísticamente significativas de HFA, HFA-GA 0,25 y HFA-GA 0,5 frente a 2D positivo-CTR.

\* = Indique diferencias estadísticamente significativas para todas las comparaciones.

## **4.2 Resultados del efecto del entrecruzamiento con genipín en los HFA y NHFA**

### **4.2.1 Análisis estructural**

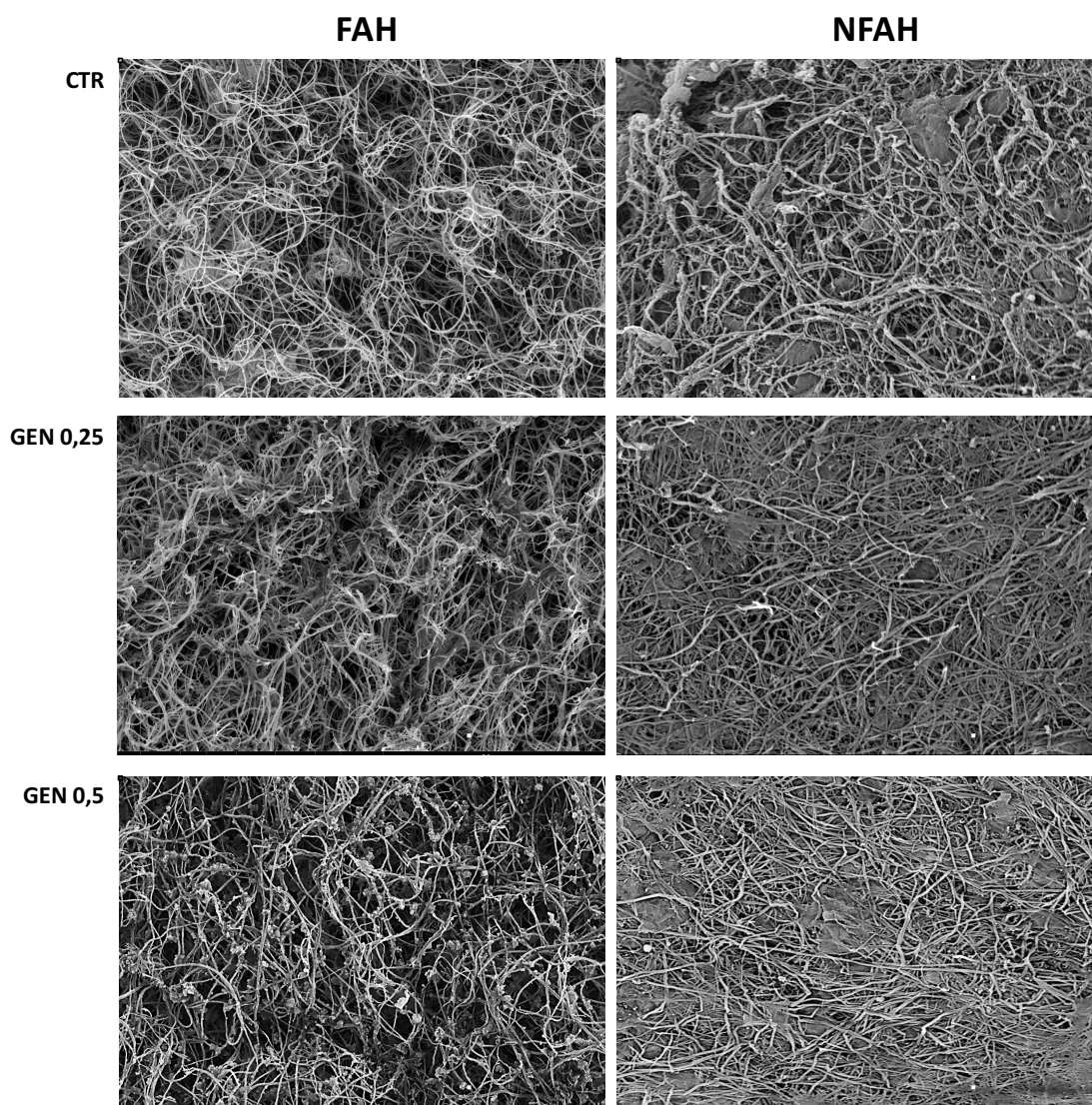
El estudio con microscopia óptica tras la utilización de la tinción con eosina y la microscopia de fluorescencia demostró que ambos modelos de constructos, el constructo control y el sometido a la acción del genipín, poseen un patrón fibrilar de densidad variable que ofrece un alto nivel de porosidad.

El estudio con microscopia electrónica de barrido pone asimismo de relieve, en los constructos control y en los sometidos a la acción del genipín, un patrón fibrilar y de porosidad evidente que permite la realización del análisis morfométrico.

Los resultados, por tanto, ponen de relieve que en ambos constructos o hidrogeles no nanoestructurados y nanoestructurados (HFA y NHFA) presentan cambios estructurales significativos cuando son sometidos a la acción del genipín en relación con sus respectivos constructos controles (CTR-HFA y CTR-NHFA).

El análisis cuantitativo realizado sobre la porosidad -fracción de área- muestra que el genipín induce una disminución significativa de dicha porosidad en los constructos HFA ( $p < 0,05$ ) (tabla 6), especialmente en el grupo HFA-GP 0,5. Asimismo, existen diferencias significativas entre los constructos HFA-GP 0,25 y HFA-GP 0,5 ( $p < 0,05$ ) (tabla 6).

El análisis cuantitativo realizado sobre la porosidad -fracción de área- muestra que el genipín induce una disminución significativa de dicha porosidad en los constructos HFA ( $p < 0,05$ ) (tabla 6), especialmente en el grupo HFA-GP 0,5. Asimismo, existen diferencias significativas entre los constructos HFA-GP 0,25 y HFA-GP 0,5 ( $p < 0,05$ ) (tabla 6).



**Figura 19.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los geles no nanoestructurados (HFA) y nanoestructurados (NHFA). CTR: controles no sometidos a entrecruzamiento; GP 0,25: biomateriales sometidos a la acción del entrecruzamiento con genipín 0,25%; GP 0,5: biomateriales sometidos a la acción del entrecruzamiento con genipín 0,5%. Escala = 20  $\mu$ m.



El análisis cuantitativo realizado sobre la porosidad -fracción de área- muestra que el genipín induce una disminución significativa de dicha porosidad en los constructos HFA ( $p < 0,05$ ) (tabla 6), especialmente en el grupo HFA-GP 0,5. Asimismo, existen diferencias significativas entre los constructos HFA-GP 0,25 y HFA-GP 0,5 ( $p < 0,05$ ) (tabla 6).

El análisis cuantitativo de los constructos nanoestructurados muestra diferencias significativas entre los constructos control (CTR-NHFA) y los constructos sometidos a entrecruzamiento con genipín ( $p < 0,05$ ). En los constructos CTR-NHFA la porosidad fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ), que la existente en los grupos NHFA-GP 0,25 y NHFA-GP 0,5 (tabla 6). La mayor porosidad se observó en cualquier caso en el grupo control CTR-HFA en comparación con la observada en los demás grupos, y estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en todos los grupos, excepto en la comparación con el HFA-GP 0,25 ( $p > 0,05$ ) (tabla 6). Los grupos NHFA-GP 0,25 y NHFA-GA 0,5 presentaron, por el contrario, los valores más bajos de fracción de área ( $p < 0,05$ ).

El análisis cuantitativo de la densidad de fibras, fue superior después de la nanoestructuración y la aplicación del genipín en ambas concentraciones 0,25% y 0,5% en comparación con los constructos no nanoestructurados. Todas las diferencias entre todos los grupos fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) excepto en la comparación del grupo CTR-HFA y el HFA-GP 0,25 ( $p > 0,05$ ) (tabla 6).

	GRUPO CONTROL		GRUPO GP-0,25%		GRUPO GP-0,5%	
	HFA	NHFA	HFA	NHFA	HFA	NHFA
% FRACCIÓN DE ÁREA (POROSIDAD)	65.27 ± 5.23	49.24 ± 4.53 a	55.61 ± 9.68 b	45.04 ± 4.20 a, b, c	49.00 ± 7.98 a, c, d	45.78 ± 4.55 a, b, c, e
DENSIDAD DE FIBRAS (%)	34.73 ± 5.22	50.76 ± 4.53 a	44.39 ± 9.68 b	54.96 ± 4.20 a, b, c	51.00 ± 7.98 a, c, d	54.22 ± 4.55 a, b, c, e

**Tabla 6.** Resultados cuantitativos y estadísticos de la porosidad de los biomateriales. La fracción de área y la densidad de fibras de HFA, NHFA y constructos sometidos a los agentes cross-linker se muestran como media ± desviación estándar. La comparación entre los grupos se llevó a cabo mediante el uso de la prueba T de Student para la fracción de área y la densidad de fibras.

a= Indica diferencias estadísticamente significativas de todos los grupos vs HFA.

b= Indica diferencias estadísticamente significativas de todos los grupos vs. NHFA.

c= Indica diferencias estadísticamente significativas de todos los grupos vs. HFA-GP 0,25

d= Indica diferencias estadísticamente significativas de todos los grupos vs. NHFA-GP 0,25

e= Indica diferencias estadísticamente significativas de todos los grupos vs. HFA-GP 0,5

#### 4.2.2 Análisis reológico

A continuación, pasamos a comentar los resultados obtenidos para el estado estacionario y el estado dinámico de los constructos generados en esta Tesis Doctoral sometidos a la acción del genipín.

##### Estado estacionario:

En la figura 20, se representan los valores del módulo de rigidez (G) dentro de la zona viscoelástica lineal para las diferentes concentraciones del genipín utilizadas. En la imagen se observa que el G aumenta a medida que aumenta la concentración del agente de entrecruzamiento utilizado tanto para los HFA (Fig. 20).

En este sentido, en cuanto al efecto de genipín, podemos observar un aumento gradual tanto del módulo de rigidez en las comparaciones de los constructos no nanoestructurados, siendo estos estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ), como en la comparación de los constructos nanoestructurados, siendo también estadísticamente significativas estas comparaciones ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, cuando comparamos los valores del módulo de rigidez entre ambos controles (HFA y NHFA) y entre los grupos de entrecruzamiento, no nanoestructurados y nanoestructurados, las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), excepto en la comparación del grupo NHFA con el grupo HFA-GP 0,5 ( $p > 0,05$ ), y de la comparación del NHFA-GP 0,25 con el grupo NHFA-GP 0,5 ( $p > 0,05$ ) (Fig. 20, tabla 7).

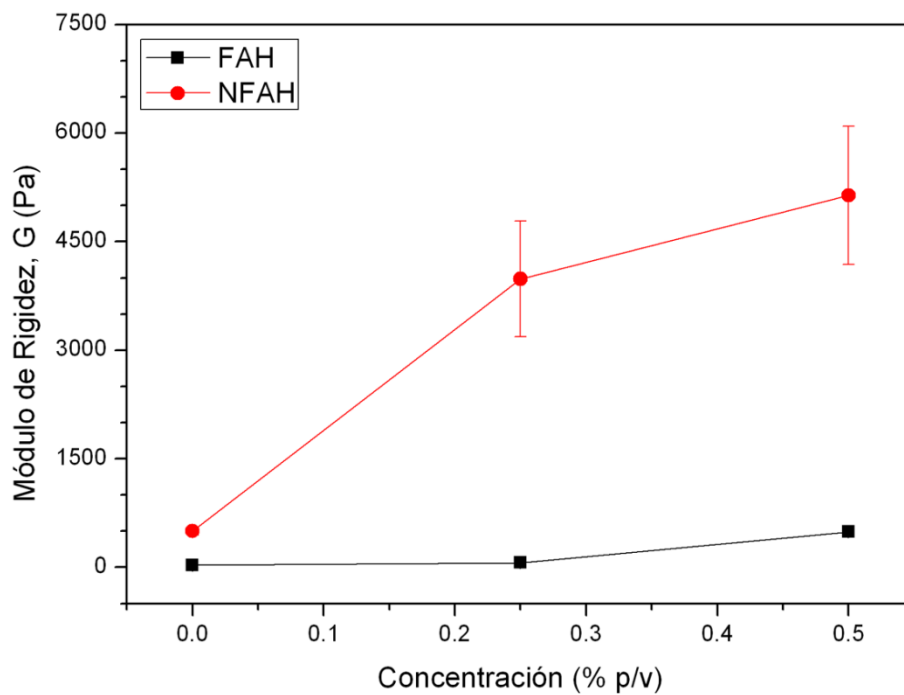
#### **Estado dinámico:**

Con los barridos de amplitud y de frecuencia obtenidos para todos los materiales estudiados, se obtuvieron los valores de los módulos elásticos y viscoso, correspondientes con una frecuencia de 1 Hz y a una amplitud de un 1%, en función de la concentración de agente químico utilizada.

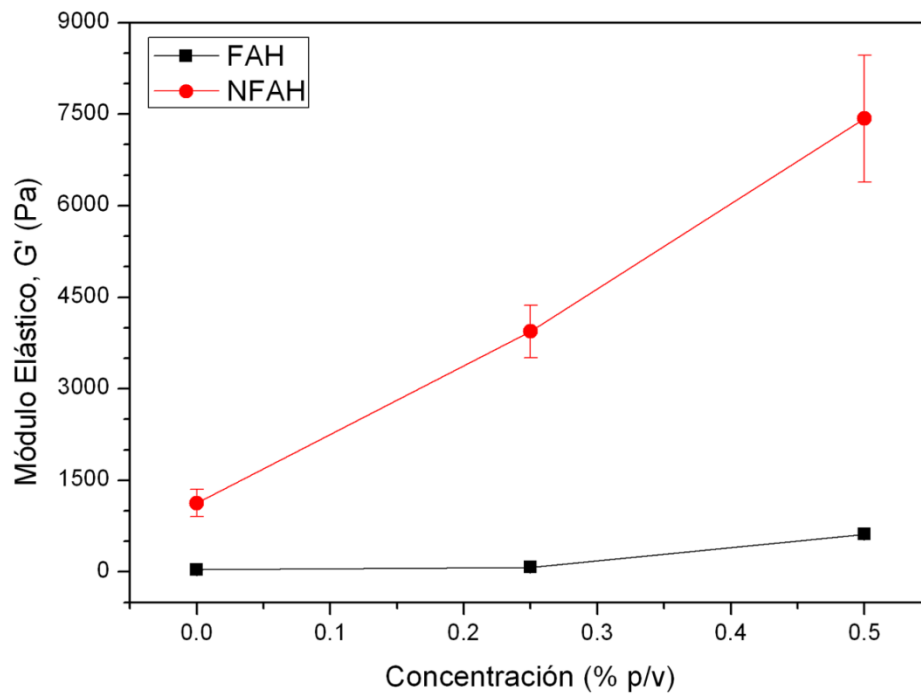
Como podemos ver en las figuras 21 y 22, correspondientes al módulo elástico y al módulo viscoso respectivamente, se observa una tendencia ascendente de estos módulos a medida que aumentamos la concentración del agente de entrecruzamiento.

Observando las figuras 21 y 22, observamos tanto para los constructos no nanoestructurados como para los constructos nanoestructurados, los controles y los sometidos a la acción del genipín, valores muy superiores de  $G'$  y  $G''$ , por lo que los constructos presentan propiedades marcadamente elásticas, propias de un material polimérico. En cuanto al efecto de la nanoestructuración, como se puede observar por comparación directa de los datos de las figuras 20, 21 y 22 los hidrogeles nanoestructurados presentan valores de los parámetros biomecánicos ( $G$ ,  $G'$  y  $G''$ ) unas 20-30 veces superiores a los correspondientes a los hidrogeles no nanoestructurados.

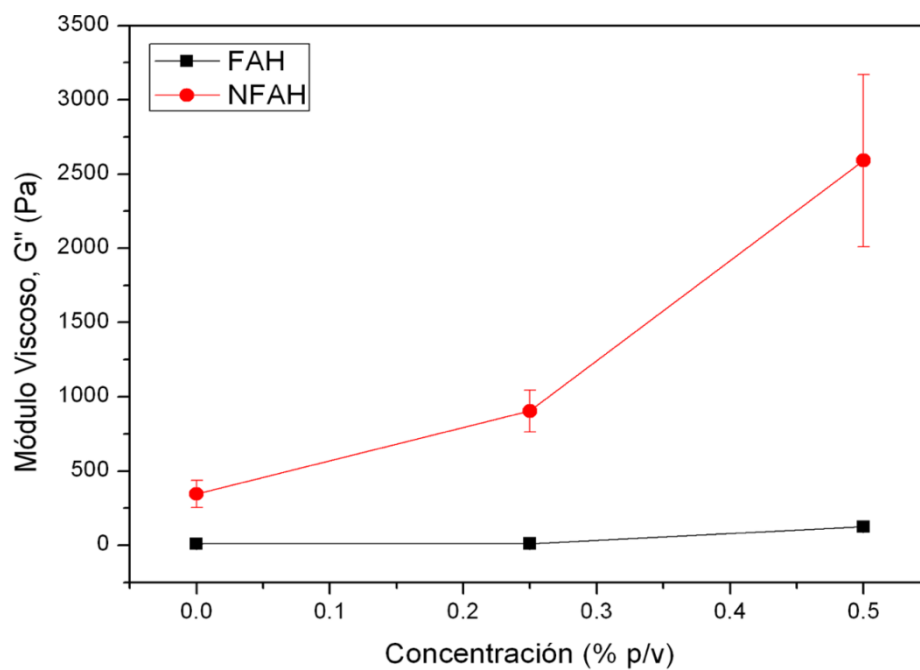
El análisis estadístico de los módulos elásticos y viscoso ( $G'$  y  $G''$  respectivamente) muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre HFA vs NHFA (Fig. 21-22 y tabla 7). Al mismo tiempo, los constructos nanoestructurados sometidos a los agentes de entrecruzamiento mostraron valores significativamente mayores de  $G'$  y  $G''$  que los constructos no nanoestructurados sometidos a los agentes de entrecruzamiento (Fig. 21-22 y tabla 7).



**Figura 20.** Valor del módulo de rigidez de los constructos preparados (no nanoestructurados -HFA- y nanoestructurados -NHFA-) en función de la concentración de genipín.



**Figura 21** Valor del módulo elástico correspondiente a la zona viscoelástica lineal (correspondiente a una deformación de corte de 0.01 y una frecuencia de 1Hz) de los constructos preparados (HFA y NHFA) en función de la concentración de Genipín utilizado.



**Figura 22.** Valor del módulo viscoso correspondiente a la zona viscoelástica lineal (correspondiente a una deformación de corte de 0.01 y una frecuencia de 1Hz) de los constructos preparados (HF- y NHFA) en función de la concentración de genipín utilizado.

	GRUPO CONTROL		GRUPO GP-0,25%		GRUPO GP-0,5%	
	HFA	NHFA	HFA	NHFA	HFA	NHFA
G (Pa)	31.5 ± 2.3	500 ± 60 a	65 ± 4 a, b	4000 ± 800 a, b, c	490 ± 9 a, c, d	5100 ± 1000 a, b, c, e
G' (Pa)	36 ± 7	1130 ± 220 a	74 ± 8 a, b	3900 ± 400 a, b, c	610 ± 40 a, b, c, d	7400 ± 1000 a, b, c, d, e
G'' (Pa)	8.9 ± 1.7	350 ± 90 a	10.3 ± 1 a, b	900 ± 140 a, b, c	124 ± 8 a, b, c, d	2600 ± 600 a, b, c, d, e

**Tabla 7.** Resultados cuantitativos y estadísticos de la caracterización reológica de los constructos los grupos controles y los grupos sometidos a entrecruzamiento. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar, y las comparaciones se realizaron mediante la prueba de Mann-Whitney, que reveló diferencias estadísticamente significativas para las siguientes comparaciones:

a= Indica diferencias estadísticamente significativas de todos los grupos vs HFA.

b= Indica diferencias estadísticamente significativas de todos los grupos vs. NHFA.

c= Indica diferencias estadísticamente significativas de todos los grupos vs. HFA-GP 0,25

d= Indica diferencias estadísticamente significativas de todos los grupos vs. NHFA-GP 0,25

e= Indica diferencias estadísticamente significativas de todos los grupos vs. HFA-GP 0,5

### 4.2.3 Análisis de biocompatibilidad *ex vivo*

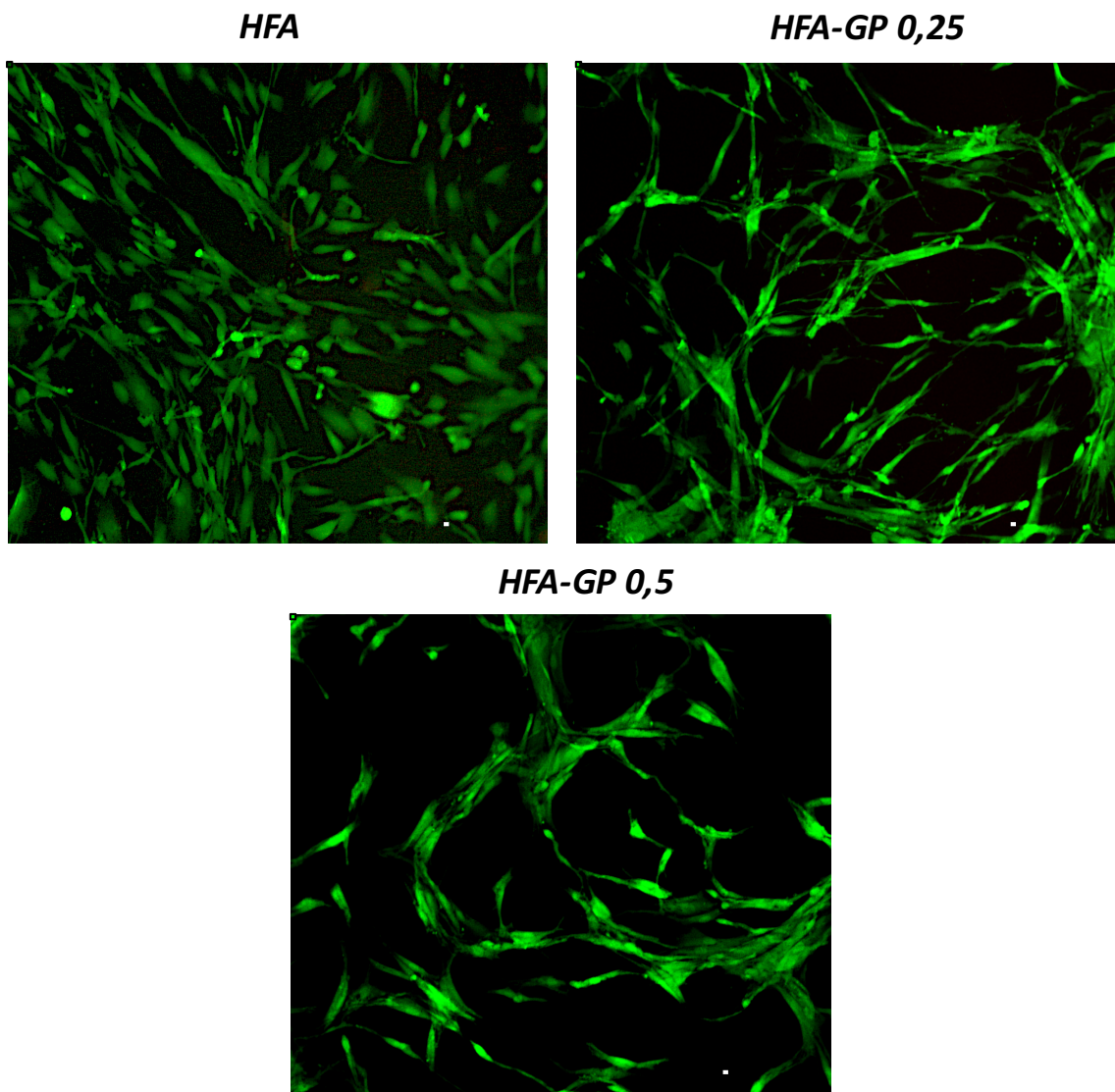
La aplicación de los métodos descritos en el apartado de materiales y métodos nos han permitido obtener los siguientes resultados.

En relación con el análisis funcional y morfológico mediante la técnica de *Live/Dead*, nuestros resultados ponen de relieve la existencia de células viables cultivadas sobre los constructos no nanoestructurados (CTR-HFA) y los sometidos a entrecruzamiento con GP (Fig. 23).

En los constructos control y tratados con GP al 0,25% y 0,5%, las células se adhieren en elevado número a la superficie del biomaterial, y muestran una distribución homogénea sobre el constructo control y un patrón de distribución circular en los constructos sometidos a la acción del genipín.

Las células de morfología básicamente fusiforme, se distribuyen en efecto formando círculos más o menos irregulares que delimitan espacios acelulares bien definidos. Este patrón de distribución circular es más acusado en el constructo sometido al 0,5%. La viabilidad que presentan dichas células es muy similar a la que presentan las células en el control positivo (2D) (Fig. 24).

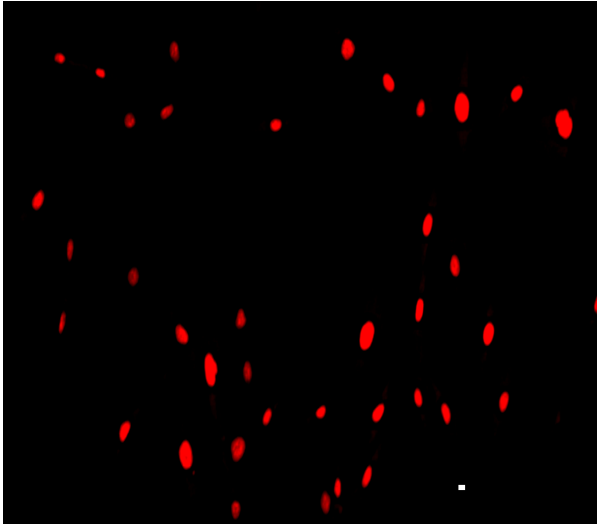
El estudio con microscopia electrónica de barrido puso de relieve una importante presencia del componente celular depositado en la superficie. Los fibroblastos, asimismo, presentan una estrecha interrelación con el componente fibroso del biomaterial de fibrina-agarosa, observándose expansiones citoplasmáticas que interactúan con dicho componente fibrilar (Fig. 25). Las células que presentan una morfología fusiforme en el constructo control adoptan una morfología más aplanada irregularmente poligonal en el constructo sometido a 0,25%. Dichas células muestran asimismo en este modelo de constructo una importante interrelación entre sus prolongaciones. En el constructo sometido al 0,5% las células adoptan básicamente una morfología fusiforme sin que exista en mismo nivel de interrelación observado en los que a las expansiones se refiere observado en los constructos sometidos a la acción del genipín al 0,25%.



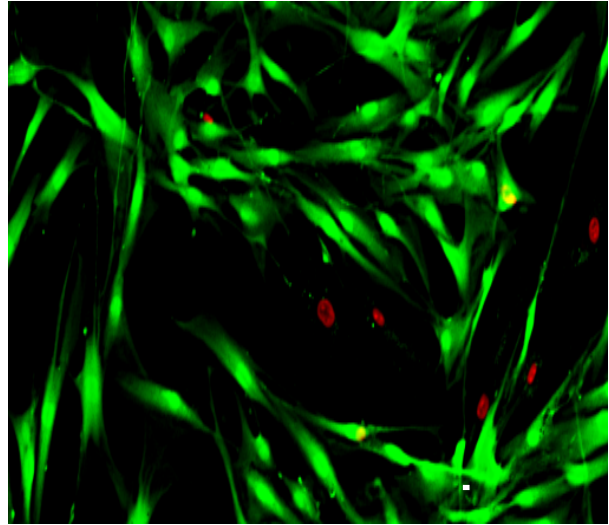
**Figura 23.** Comportamiento de los fibroblastos en el grupo control HFA y los sometidos a entrecruzamiento con genipín a distintas concentraciones. El ensayo de proliferación celular Live/Dead mostró las células viables en verde. Escala= 100  $\mu$ m



**2D Neg. CTR**



**2D Pos. CTR**

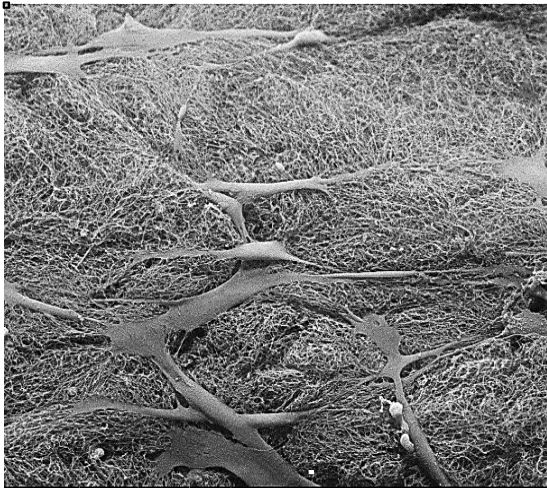


**Figura. 24.** El ensayo de proliferación de células Live/Dead mostró las células viables en verde, mientras que las células muertas se tiñeron en rojo, que son evidentes en el grupo de control negativo 2D.  
Escala= 100  $\mu$ m

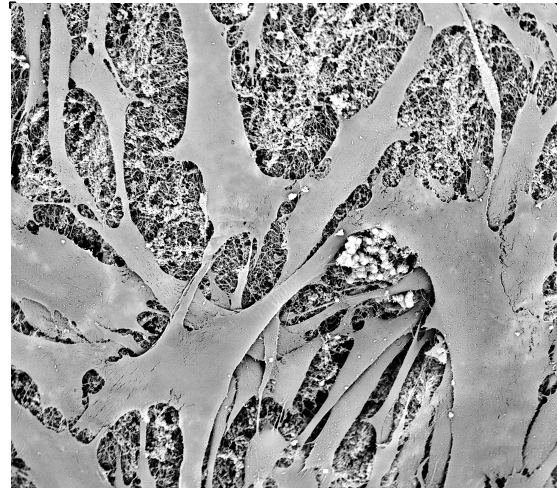
El análisis de la actividad deshidrogenasa mitocondrial mediante el reactivo WST-1, presentó valores significativamente superiores en el grupo control 2D positivo (1,36) en comparación con los obtenidos en los constructos no nanoestructurados (HFA), los constructos no nanoestructurados sometidos a entrecruzamiento con genipín (HFA-GP) y el grupo control 2D negativo (Fig. 26).

El estudio de datos puso de relieve diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CTR positivo, HFA y HFA-GP 0,25 con respecto al CTR negativo ( $p < 0,05$ ), pero no hubo diferencias significativas entre en CTR negativo y el grupo HFA-GP 0,5 ( $p = 0,401$ ). Asimismo, comparando los resultados obtenidos en los constructos sometidos a entrecruzamiento (HFA-GP 0,25 y HFA-GP 0,5) se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo HFA ( $p < 0,05$ ). Asimismo, también se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con entrecruzamiento con un valor más elevado en el grupo HFA-GP 0,25 ( $p < 0,05$ ) (Fig. 26).

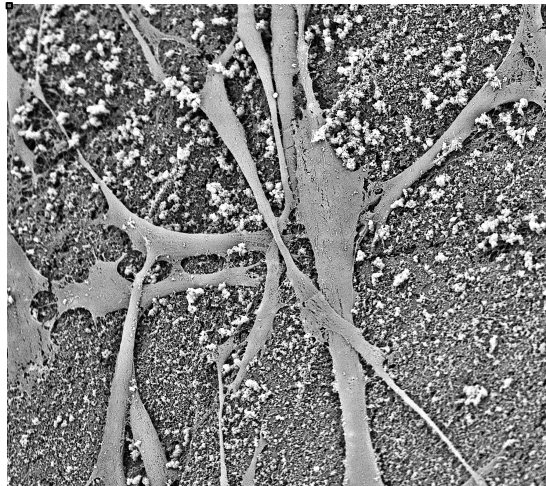
**HFA**



**HFA-GP 0,25**



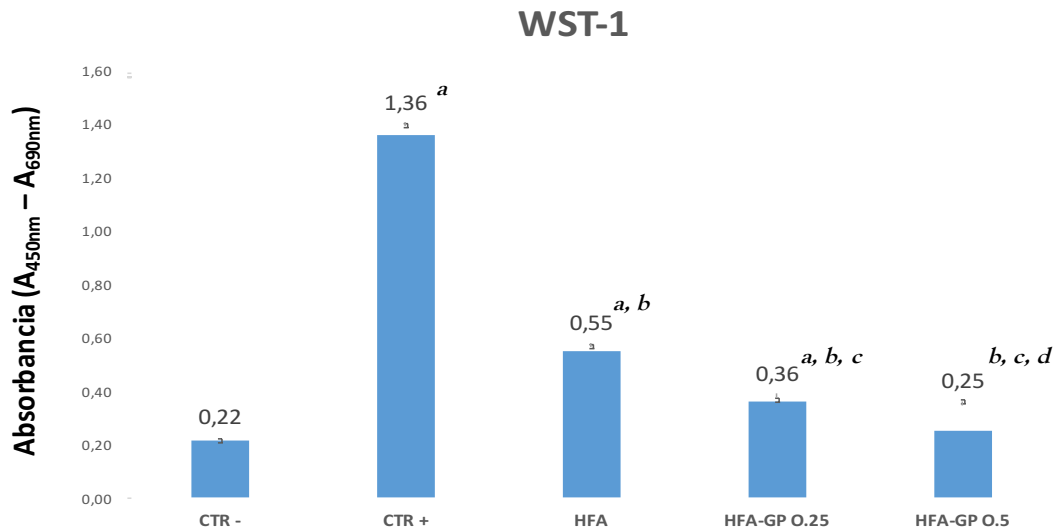
**HFA-GP 0,5**



**Figura 25.** Imágenes con microscopía electrónica de barrido (MEB) de fibroblastos adheridos a la superficie de los geles controles y de los sometidos a entrecruzamiento con genipín a distintas concentraciones. Escala= 100  $\mu$ m

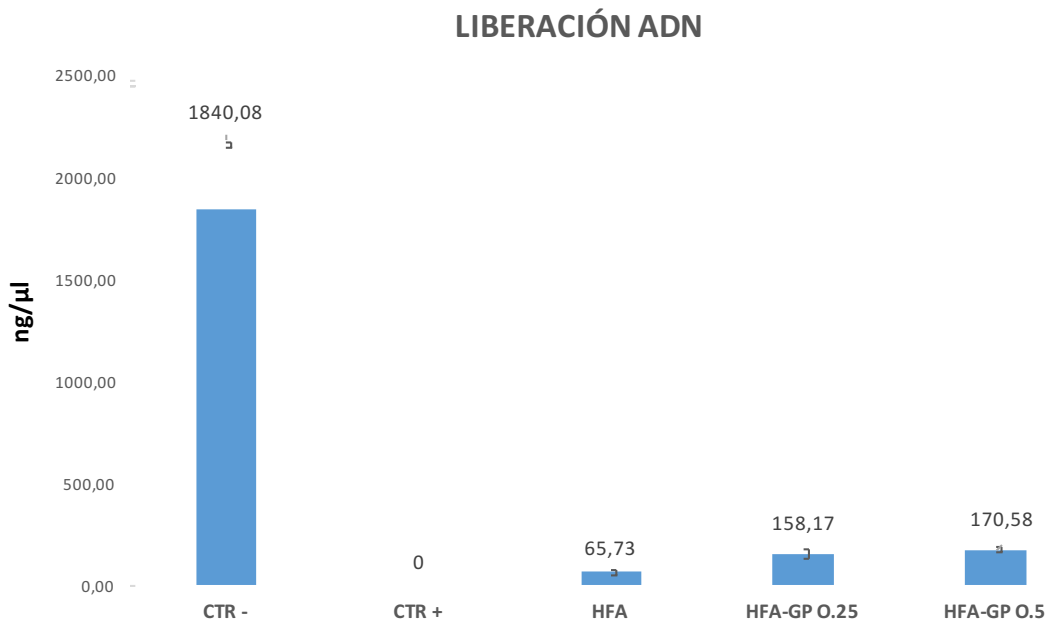
El análisis espectrofotométrico de la liberación de ADN, como resultado del daño irreversible de la membrana nuclear, puso de relieve una liberación progresiva de ADN en los constructos controles y los sometidos a la acción del genipín con diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos ( $p < 0,05$ ), de forma que existe una menor liberación en el constructo control (HFA) y una mayor liberación en el constructo HFA-GP 0,5. Los resultados en los tres tipos de constructos fueron estadísticamente significativos en relación tanto con el control positivo como con el control negativo (2D) ( $p < 0,05$ ) (Fig. 27).

El test de correlación de Kendall mostró una correlación negativa entre los valores de proliferación de células WST-1 y los valores de liberación de ADN ( $p = 0,000$ , coeficiente de correlación  $r = -0,323$ ).



**Figura 26.** Análisis cuantitativo de biocompatibilidad *ex vivo*. Representación gráfica del ensayo de proliferación de celular WST-1 del genipín. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba de Mann-Whitney, que reveló diferencias estadísticamente significativas para todas las comparaciones:

- a= Indica diferencias estadísticamente significativas de cada grupo frente al CTR negativo de 2D
- b= Indica diferencias estadísticamente significativas de cada grupo frente al CTR positivo de 2D
- c= Indica diferencias estadísticamente significativas de todos los grupos vs HFA.
- d= Indica diferencias estadísticamente significativas de todos los grupos vs. HFA-GP 0,25



**Figura 27.** Análisis cuantitativo de biocompatibilidad *ex vivo*. Representación gráfica del ensayo de liberación de ADN del Genipín. Los resultados se muestran como media  $\pm$  desviación estándar, y las comparaciones se realizaron mediante la prueba de Mann-Whitney, que reveló diferencias estadísticamente significativas para todas las comparaciones.

### **4.3 Resultado del análisis comparativo de las muestras sometidas a glutaraldehido y genipín.**

#### **4.3.1 Análisis estructural**

La comparación de los resultados obtenidos tras el estudio con microscopía electrónica de barrido en los constructos control y los sometidos a glutaraldehido y genipín mostró la existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio. Las medias normalizadas y desviaciones estándar normalizadas se expresan en la tabla 8. En la tabla 9 se indican asimismo las diferencias estadísticas entre los distintos grupos. Para la fracción de área las medias normalizadas más elevadas corresponden al HFA-GP y HFA-GA al 0,25%, mientras que los valores más bajos corresponden al HFA-GP y NHFA-GA al 0,5%, en todos los casos, en relación con sus respectivos controles. Respecto a la densidad de fibras, las medias normalizadas más elevadas corresponden al HFA-GP y NHFA-GA al 0,5%, y las más bajas corresponden a HFA-GP y HFA-GA al 0,25%.

TABLA POROSIDAD		MEDIA NORMALIZADA	SD NORMALIZADA	
FRACCIÓN ÁREA	GENIPIN	HFA	99,20	6,11
		NHFA	100,86	3,83
		HFA-GP 0,25	104,49	4,05
		HFA-GP 0,5	93,56	7,62
		NHFA-GP 0,25	96,20	5,16
		NHFA-GP 0,5	94,75	3,38
DENSIDAD FIBRAS	GENIPIN	HFA	100,70	5,35
		NHFA	99,17	3,71
		HFA-GA 0,25	94,88	4,62
		HFA-GA 0,5	107,35	8,70
		NHFA-GA 0,25	103,68	5,00
		NHFA-GA 0,5	105,10	3,28
FRACCIÓN ÁREA	GLUTARALDEHIDO	HFA	100,01	8,01
		NHFA	80,81	9,56
		HFA-GP 0,25	88,17	12,96
		HFA-GP 0,5	83,48	4,07
		NHFA-GP 0,25	82,51	6,69
		NHFA-GP 0,5	62,04	9,84
DENSIDAD FIBRAS	GLUTARALDEHIDO	HFA	99,99	15,05
		NHFA	136,06	17,97
		HFA-GA 0,25	122,23	24,35
		HFA-GA 0,5	131,05	7,66
		NHFA-GA 0,25	132,86	12,58
		NHFA-GA 0,5	171,35	18,50

*Tabla 8:* Valores de las medias normalizadas de fracción de área y densidad de fibras.

	FRACCIÓN ÁREA NORMALIZADA	DENSIDAD FIBRAS NORMALIZADA
NHFA-GP 0,25 vs. NHFA-GA 0,25	0,00017432	0,00003213
NHFA-GP 0,25 vs. HFA-GA 0,25	0,10589290	0,04326265
NHFA-GP 0,25 vs. NHFA-GA 0,5	0,00003213	0,00003213
NHFA-GP 0,25 vs. HFA-GA 0,5	0,00005292	0,00003213
HFA-GP 0,25 vs. NHFA-GA 0,25	0,00003226	0,00003226
HFA-GP 0,25 vs. HFA-GA 0,25	0,00034416	0,00110341
HFA-GP 0,25 vs. NHFA-GA 0,5	0,00003226	0,00003226
HFA-GP 0,25 vs. HFA-GA 0,5	0,00003226	0,00003226
NHFA-GP 0,5 vs. NHFA-GA 0,25	0,00008607	0,00003213
NHFA-GP 0,5 vs. HFA-GA 0,25	0,29859249	0,05669301
NHFA-GP 0,5 vs. NHFA-GA 0,5	0,00003213	0,00003213
NHFA-GP 0,5 vs. HFA-GA 0,5	0,00004130	0,00003213
HFA-GP 0,5 vs. NHFA-GA 0,25	0,00665673	0,00007631
HFA-GP 0,5 vs. HFA-GA 0,25	0,38626965	0,09406855
HFA-GP 0,5 vs. NHFA-GA 0,5	0,00003226	0,00003226
HFA-GP 0,5 vs. HFA-GA 0,5	0,00558362	0,00006785

*Tabla 9.* Resultados de la comparación estadística de los grupos experimentales con glutaraldehído y genipín en relación con la fracción de área y densidad de fibras. Los valores marcados en verde son significativos, mientras que los marcados en rojo presentan una alta significación estadística (ajuste de Bonferroni).

### 4.3.2 Análisis reológico

La comparación de los resultados obtenidos tras el estudio del estado estacionario (módulo de rigidez), y el estado dinámico (módulo elástico y módulo viscoso) se expresan en la tabla 10. Las diferencias estadísticas entre los distintos grupos se indican, asimismo, en la tabla 11.

Para el módulo de rigidez (G) las medias normalizadas más elevadas en relación con los controles, corresponden al HFA-GA y NHFA-GA al 0,5% y los valores más bajos corresponden al HFA-GP y NHFA-GP al 0,25%.

Para el módulo elástico los valores más elevados son los correspondientes al HFA-GP y HFA-GA al 0,5%, y los valores más bajos al HFA-GP y NHFA-GP al 0,25%. En relación con el módulo viscoso los respectivos valores más altos y más bajos son, asimismo, los correspondientes al HFA-GP y HFA-GA al 0,5% y al HFA-GP y NHFA-GP al 0,25%.

TABLA REOLOÍA		MEDIA NORMALIZADA	SD NORMALIZADA	
ESTADO ESTACIONARIO	MÓDULO DE RIGIDEZ (G)	HFA	100	7,34
		NHFA	100	11,47
		HFA-GP 0,25	207,69	13,52
		HFA-GP 0,5	1554,18	26,55
		NHFA-GP 0,25	694,56	316,73
		NHFA-GP 0,5	981,34	151,59
		HFA-GA 0,25	793,41	40,72
		HFA-GA 0,5	2003,86	414,52
		NHFA-GA 0,25	1335,56	140,51
		NHFA-GA 0,5	1927,52	381,20
ESTADO DINÁMICO	MÓDULO ELÁSTICO (G')	HFA	100	18,50
		NHFA	100	19,89
		HFA-GP 0,25	208,19	24,35
		HFA-GP 0,5	1703,01	107,56
		NHFA-GP 0,25	349,42	38,24
		NHFA-GP 0,5	644,05	86,24
		HFA-GA 0,25	710,77	46,41
		HFA-GA 0,5	1919,56	425,77
		NHFA-GA 0,25	656,51	66,05
	NHFA-GA 0,5	936,68	101,41	
	MÓDULO VISCOSO (G'')	HFA	100	19,07
		NHFA	100	64,89
		HFA-GP 0,25	116,80	11,06
		HFA-GP 0,5	1413,30	71,61
		NHFA-GP 0,25	261,50	40,68
		NHFA-GP 0,5	730,19	167,83
		HFA-GA 0,25	687,03	43,18
		HFA-GA 0,5	1877,46	452,49
NHFA-GA 0,25		665,84	50,03	
NHFA-GA 0,5	950,91	96,87		

**Tabla 10:** Valores de las medias normalizadas de los módulos de rigidez, elástico y viscoso.



	MÓDULO ELÁSTICO NORMALIZADO	MÓDULO VISCOSO NORMALIZADO	MÓDULO DE RIGIDEZ NORMALIZADO
NHFA-GP 0,25 vs. HFA-GP 0,25	0,00021283	0,00021283	0,00085510
NHFA-GP 0,25 vs. NHFA-GP 0,5	0,00053201	0,00053201	0,08071626
NHFA-GP 0,25 vs. HFA-GP 0,5	0,00027822	0,00027995	0,00119375
NHFA-GP 0,25 vs. NHFA-GA 0,25	0,00194577	0,00194577	0,00269980
NHFA-GP 0,25 vs. HFA-GA 0,25	0,00021283	0,00021283	0,73520489
NHFA-GP 0,25 vs. NHFA-GA 0,5	0,00194577	0,00194577	0,00269980
NHFA-GP 0,25 vs. HFA-GA 0,5	0,00016516	0,00016516	0,00031149
HFA-GP 0,25 vs. NHFA-GP 0,5	0,00012424	0,00012424	0,00034858
HFA-GP 0,25 vs. HFA-GP 0,5	0,00004844	0,00004865	0,00053201
HFA-GP 0,25 vs. NHFA-GA 0,25	0,00074703	0,00074703	0,00146272
HFA-GP 0,25 vs. HFA-GA 0,25	0,00003226	0,00003226	0,00012361
HFA-GP 0,25 vs. NHFA-GA 0,5	0,00074703	0,00074703	0,00146272
HFA-GP 0,25 vs. HFA-GA 0,5	0,00002201	0,00002201	0,00009364
NHFA-GP 0,5 vs. HFA-GP 0,5	0,00016848	0,00016944	0,00053201
NHFA-GP 0,5 vs. NHFA-GA 0,25	0,90618562	0,28884437	0,01842213
NHFA-GP 0,5 vs. HFA-GA 0,25	0,28642202	0,22699442	0,00012361
NHFA-GP 0,5 vs. NHFA-GA 0,5	0,00146272	0,03389485	0,00146272
NHFA-GP 0,5 vs. HFA-GA 0,5	0,00009321	0,00009321	0,00009364
HFA-GP 0,5 vs. NHFA-GA 0,25	0,00090451	0,00091112	0,00450870
HFA-GP 0,5 vs. HFA-GA 0,25	0,00004844	0,00004865	0,00021166
HFA-GP 0,5 vs. NHFA-GA 0,5	0,00090451	0,00091112	0,03886710
HFA-GP 0,5 vs. HFA-GA 0,5	0,36896852	0,00193338	0,00016597
NHFA-GA 0,25 vs. HFA-GA 0,25	0,06104469	0,51207505	0,00074233
NHFA-GA 0,25 vs. NHFA-GA 0,5	0,00394775	0,00394775	0,01040562
NHFA-GA 0,25 vs. HFA-GA 0,5	0,00062156	0,00062156	0,00062500
HFA-GA 0,25 vs. NHFA-GA 0,5	0,00104527	0,00074703	0,00074233
HFA-GA 0,25 vs. HFA-GA 0,5	0,00002201	0,00002201	0,00002201
NHFA-GA 0,5 vs. HFA-GA 0,5	0,00062156	0,00062156	0,53925457

**Tabla 11.** Resultados de la comparación estadística de los grupos experimentales con glutaraldehído y genipín en relación con los módulos de rigidez, elasticidad y viscosidad. Los valores marcados en verde son significativos, mientras que los marcados en rojo presentan una alta significación estadística (ajuste de Bonferroni).

### 4.3.3 Análisis de biocompatibilidad *ex vivo*

La comparación de los resultados obtenidos para las distintas pruebas de biocompatibilidad (WST-1 y ADN) se expresa en la tabla 12. Las diferencias estadísticas entre los distintos grupos se indican en la tabla 13.

Los valores de más alta viabilidad con ambos agentes químicos, genipín y glutaraldehído, corresponden en ambas pruebas a la concentración de 0,25%.

TABLA BIOCOMPATIBILIDAD <i>EX VIVO</i>			MEDIA NORMALIZADA	SD NORMALIZADA
GENIPIN	WST-1	HFA	100	6,87
		HFA-GP 0,25	65,64	4,68
		HFA-GP 0,5	45,66	23,26
	ADN	HFA	100	52,93
		HFA-GP 0,25	240,75	240,75
		HFA-GP 0,5	259,64	71,05
GLUTARALDEHIDO	WST-1	HFA	100	17,68
		HFA-GA 0,25	21,59	5,47
		HFA-GA 0,5	18,27	1,66
	ADN	HFA	100,00	13,08
		HFA-GA 0,25	197,47	15,54
		HFA-GA 0,5	265,36	34,53

**Tabla 12:** Valores de las medias normalizadas de las pruebas de viabilidad, WST-1 y liberación de ADN.

	WST-1 NORMALIZADO	ADN NORMALIZADO
HFA-GP 0,25 vs. HFA-GA 0,25	0,00034858	0,01184894
HFA-GP 0,25 vs. HFA-GA 0,5	0,00034368	0,01928337
HFA-GP 0,5 vs. HFA-GA 0,25	0,00067476	0,04694473
HFA-GP 0,5 vs. HFA-GA 0,5	0,00034368	0,75727775

**Tabla 13.** Resultados de la comparación estadística de los grupos experimentales con glutaraldehído y genipín en relación las pruebas de viabilidad, WST-1 y liberación de ADN. Los valores marcados en verde son significativos, mientras que los marcados en rojo presentan una alta significación estadística (ajuste de Bonferroni).

## **5. DISCUSIÓN**

La elaboración de nuevos tejidos artificiales, cada vez más biomiméticos y biocompatibles con los tejidos corporales, constituye el objetivo básico de la ingeniería tisular. En tal sentido, los procesos de biofabricación y de funcionalización de los biomateriales que forman parte de los tejidos artificiales constituyen cada vez más, como indicamos en la introducción, un objeto preferente de investigación en este campo, al considerarse dichos biomateriales componentes activos y determinantes en las distintas propiedades que van a desempeñar los nuevos tejidos (Castro y Mano, 2013; Rosso et al., 2005; Rodríguez-Arco et al., 2016; Sears et al., 2016).

La generación de un hidrogel de fibrina-agarosa de gran versatilidad para su aplicación a la ingeniería tisular ha permitido la reciente elaboración de distintos tejidos artificiales (Carriel et al., 2012, 2014a, 2014b, 2015; Alaminos et al., 2006, 2007b; Sánchez-Quevedo et al., 2007; Garzón et al., 2009, 2012b, 2013, 2014; García-Martínez et al., 2016). Aunque este biomaterial ha sido transferido a la clínica muy recientemente, sus propiedades biomecánicas han estimulado la investigación y el desarrollo de proyectos de mejora de sus propiedades a los efectos de conseguir modelos funcionalizados de fibrina-agarosa aplicables a distintas situaciones terapéuticas. A tal efecto, se ha investigado ampliamente la nanoestructuración en dicho hidrogel, comprobándose que tanto las concentraciones de agarosa como el grado de hidratación están directamente relacionados con las propiedades biomecánicas finales del tejido artificial generado (Ionescu et al., 2011; Scionti et al., 2014a; Carriel et al., 2015; Campos et al., 2016b). Sin embargo, sigue siendo necesario desarrollar nuevos métodos y tecnologías que permitan mejorar las propiedades físicas de estos biomateriales.

A este respecto, procedimientos químicos de entrecruzamiento o *crosslinking* basados en productos como el glutaraldehído y el genipín, han sido tradicionalmente aplicados a la ingeniería tisular para funcionalizar hidrogeles destinados a la construcción de tejidos artificiales (Lima et al., 2009; Yan et al., 2010; Cheng et al., 2013; Reddy et al., 2015). No obstante, aún no existen estudios sobre la incidencia de dichos agentes químicos sobre los hidrogeles de fibrina-agarosa, habiéndose descrito tan solo algunos efectos sobre hidrogeles de fibrina (Dare et al., 2009a, 2009b; Schek et al., 2011; Gamboa-Martínez et al., 2014).

En la presente Tesis Doctoral, hemos caracterizado dos modelos tisulares constituidos por hidrogeles de fibrina-agarosa (FAH) y de fibrina-agarosa nanoestructurada (NFAH) sometidos a la acción de glutaraldehído y genipín, agentes químicos con acción entrecruzante o de *crosslinking*. En el primer modelo de FAH, se evalúan los efectos del entrecruzamiento sobre el biomaterial de fibrina-agarosa sin nanoestructurar, mientras que en el segundo (NFAH), la evaluación se lleva a cabo sobre el mismo modelo previamente nanoestructurado y, por tanto, con propiedades físico-químicas modificadas mediante compresión plástica. Ambos modelos fueron analizados *ex vivo* a nivel estructural, mecánico y biológico.

Estructuralmente, ambos materiales se caracterizan por poseer un patrón altamente poroso compuesto por espacios interconectados distribuidos entre fibras alineadas de forma irregular, como ya se había demostrado en trabajos previos (Sánchez-Quevedo et al., 2007; Scionti et al., 2014; Carriel et al., 2015). Los biomateriales porosos se utilizan con mucha frecuencia en ingeniería tisular dado que favorecen la proliferación y migración de células en el seno de los mismos y ofrecen un micro-medioambiente adecuado para la difusión del oxígeno y los nutrientes (Cheema et al., 2010; Carriel et al., 2014a; Carriel et al., 2015). En la actualidad, se ha demostrado, además, que la velocidad de migración celular está estrechamente relacionada con el tamaño de poro de los biomateriales (Delgado et al., 2015, Vu et al., 2015).

Nuestros estudios con microscopía electrónica de barrido ponen de relieve que tanto los hidrogeles control como los sometidos a los efectos del glutaraldehído y del genipín presentan un patrón fibrilar y poroso. Sin embargo, nuestro estudio demuestra que en los constructos nanoestructurados existe un incremento significativo de la densidad fibrilar en relación con los constructos no nanoestructurados una vez sometidos a entrecruzamiento. El incremento de la densidad fibrilar se acompaña de una importante modificación en la porosidad del biomaterial. En este sentido, los niveles más altos de porosidad y más bajos de densidad fibrilar se encuentran en los constructos no nanoestructurados, mostrando los constructos nanoestructurados sometidos a concentraciones del 0,5% de glutaraldehído los niveles más altos de densidad fibrilar y más bajos de porosidad. Los valores obtenidos para los constructos

nanoestructurados con genipín al 0,25% y 0,5% demuestran también un alto nivel de densidad fibrilar y un bajo nivel de porosidad, aunque con valores superiores a los obtenidos en los constructos nanoestructurados sometidos a la acción del glutaraldehído al 0,5%. La comparación entre los constructos nanoestructurados con genipín a ambas concentraciones y los constructos nanoestructurados con glutaraldehído al 0,5% es altamente significativa ( $p=0,00018$ ).

Estos resultados hay que relacionarlos con los obtenidos en geles de fibrina sometidos a entrecruzamiento con genipín en los que la porosidad varía dependiendo de la concentración de dicho agente químico y del momento en el que se realiza el entrecruzamiento. Si éste se lleva a cabo después de la formación del gel, como ocurre en nuestro caso, la porosidad disminuye, pero si se efectúa simultáneamente, la porosidad aumenta (gamboa 2014). Este hecho es importante para configurar el patrón final de porosidad en el diseño del nuevo tejido artificial. El bajo rango de porosidad que se observa en los constructos nanoestructurados sometidos a entrecruzamiento podría explicar, en general, la menor capacidad de compresión de los biomateriales nanoestructurados en relación con los no nanoestructurados. Asimismo, la diferente capacidad de retener agua (rehidratación o edematización) de los materiales sometidos a entrecruzamiento por acción del glutaraldehído y del genipín podría influir sobre las propiedades biomecánicas de éstos (Bigi et al., 2001; Slaughter et al., 2009; Siriwardane et al., 2014; Gamboa-Martínez et al., 2015; Jiang et al., 2016).

La utilización de los agentes químicos glutaraldehído y genipín, en combinación con la técnica de nanoestructuración permite, por tanto, controlar la porosidad en los constructos de fibrina-agarosa. En consecuencia, los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral permiten correlacionar el biomaterial con los diferentes tipos de células a utilizar en la elaboración de un tejido artificial, lo que contribuirá a diseñar el tipo más adecuado de biomaterial en relación con el tejido y la aplicación médica deseada (Fallica et al., 2012; Delgado et al., 2015; Vu et al., 2015).

La utilización de glutaraldehído o genipín como agentes de entrecruzamiento constituye, como han demostrado diferentes autores, una estrategia útil para mejorar

las propiedades biomecánicas de los distintos biomateriales utilizados en ingeniería tisular (Bigi et al., 2001; Siriwardane et al., 2014; Reddy et al., 2015). Dado que los biomateriales de fibrina-agarosa no nanoestructurados y nanoestructurados presentan propiedades biomecánicas aceptables como han demostrado varios autores (Ionescu et al., 2011; Rodríguez et al., 2012; Scionti et al., 2014b), demostrar si la acción del glutaraldehído y del genipín puede potencialmente mejorar dichas propiedades constituye un objetivo importante de la presente Tesis Doctoral. Para ello, se llevaron a cabo estudios reológicos tanto en estado estacionario como en estado dinámico.

En primer lugar, las pruebas reológicas realizadas en estado estacionario han demostrado una mejora significativa del módulo de rigidez ( $G$ ) cuando los constructos de fibrina-agarosa no nanoestructurados y nanoestructurados son sometidos a la acción de las distintas concentraciones de glutaraldehído y genipín. Los resultados son significativamente superiores cuando se realiza el entrecruzamiento con glutaraldehído, tanto en constructos no nanoestructurados como en nanoestructurados, alcanzando valores más altos en estos últimos. Por otra parte, es importante reseñar que la acción del genipín al 0,5% sobre los constructos no nanoestructurados alcanza valores semejantes a los existentes en los constructos controles nanoestructurados, lo cual sugiere que el efecto de este producto sería comparable al del proceso de nanoestructuración.

En segundo lugar, las pruebas reológicas realizadas en estado dinámico han demostrado que los valores de módulo elástico ( $G'$ ) y de módulo viscoso ( $G''$ ) fueron significativamente más elevados cuando los constructos no nanoestructurados y nanoestructurados fueron sometidos a las distintas concentraciones de los agentes químicos utilizados, especialmente en el caso de los constructos nanoestructurados y en aquéllos sometidos a glutaraldehído.

La comparación de los resultados nos permite comprobar que, en todos los casos, los valores de  $G'$  son muy superiores a los valores de  $G''$ , por lo que todos los constructos presentan propiedades marcadamente elásticas, propias de un material polimérico entrecruzado. Estos resultados son característicos de biopolímeros presentes en la matriz extracelular de tejidos blandos, tanto nativos como obtenidos

por ingeniería tisular, como ha sido demostrado en córnea y en mucosa oral (Ionescu et al., 2011; Rodríguez et al., 2012). Es importante señalar que, para todas las muestras, los valores de  $G'$  son aproximadamente 4 veces superiores a los de  $G''$ , no afectando significativamente la cantidad de glutaraldehído o de genipín a esta relación. Esto indica que, bajo esfuerzos externos, la mayor parte de la energía comunicada al constructo se almacena en forma de energía elástica (correspondiente al módulo elástico  $G'$ ), mientras que una pequeña parte se disiparía por rozamiento viscoso (correspondiente al módulo viscoso  $G''$ ). En cuanto al efecto de ambos agentes, podemos observar un aumento gradual tanto del módulo de rigidez como de los módulos viscoelásticos hasta alcanzar valores en un orden de magnitud elevada. Como se puede observar, la regulación de las propiedades mecánicas es progresiva a medida que se pasa del constructo control al constructo con mayor concentración del agente químico utilizado, por lo que es posible generar constructos con propiedades mecánicas regulables en distintos órdenes de magnitud eligiendo adecuadamente la concentración del agente de entrecruzamiento en combinación o no con la técnica de nanoestructuración para obtener los biomateriales y los constructos más biomiméticos respecto al tejido humano nativo. De este modo, se obtuvieron los valores correspondientes a las propiedades biomecánicas de rigidez y viscoelasticidad correspondientes a cada grupo de estudio, los cuales serán utilizados para seleccionar los biomateriales más adecuados a cada aplicación clínica.

En relación con los estudios de biocompatibilidad, existen resultados previos contradictorios sobre la posible acción citotóxica del glutaraldehído y del genipín en su interacción con los biomateriales. En relación con el glutaraldehído, mientras algunos autores han señalado sus efectos citotóxicos (Hoffmann et al., 2009; Jiang et al., 2016), otros han sugerido que concentraciones inferiores al 8% no generan alteraciones significativas (Umashankar et al., 2012; Reddy et al., 2015). La mayoría de los estudios realizados sobre la acción entrecruzante del glutaraldehído están dirigidos a evaluar los efectos biomecánicos que su actividad desarrolla en los biomateriales, sin considerar los efectos biológicos, cuyo conocimiento resulta fundamental para la traslación clínica de los tejidos artificiales generados por ingeniería tisular. Por otra parte, aunque distintos autores señalan la baja toxicidad del genipín cuando se usa



como agente de entrecruzamiento, se han descrito efectos citotóxicos en distintas concentraciones de dicha sustancia (Liu et al., 2003; Kim et al., 2005; Mwale et al., 2005; Koo et al., 2006; Bedran-Russo et al., 2007; Sundararaghavan et al., 2008; Dare et al., 2009a).

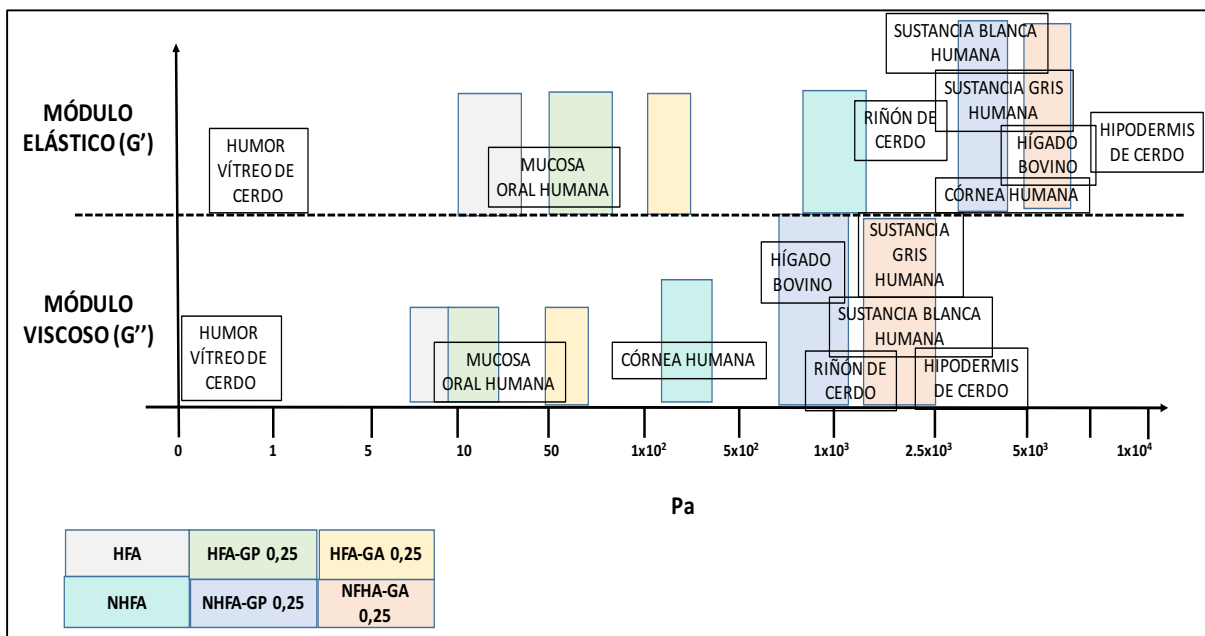
Por todo ello, en la presente Tesis Doctoral, se realiza un estudio *ex vivo* de los efectos celulares del glutaraldehído y del genipín para evaluar la interacción entre las células y los biomateriales sometidos a la acción entrecruzante de dichos agentes. De esta forma, los estudios morfológicos y funcionales llevados a cabo con la técnica de Live/Dead y con microscopía electrónica de barrido, ponen de relieve la presencia de fibroblastos viables en los constructos controles y en los sometidos a entrecruzamiento mediante agentes químicos. Sin embargo, los resultados difieren entre los dos agentes estudiados en esta Tesis Doctoral. En efecto, el menor número de células se localiza en el grupo sometido a glutaraldehído al 0,5%, presentando, además, dichas células una morfología esferoide que caracteriza a células con viabilidad reducida (Alaminos et al., 2007a; Schek et al., 2011). El resto de grupos presentan una morfología fusiforme o estrellada de carácter ortotípico (Errington et al., 1998), si bien difieren en su número y en su interacción con la estructura reticular de biomaterial. En tal sentido, aunque se observan células fusiformes en los constructos sometidos a genipín al 0,5%, su número es más limitado y sus células despliegan menos expansiones que las existentes en los constructos tratados con genipín al 0,25%. En nuestras observaciones, no identificamos células esferoides en los constructos tratados con genipín, como ha sido descrito en constructos de fibrina sometidos a la acción de dicho agente (Schek et al., 2011). Asimismo, en los constructos tratados con genipín, aunque el número de fibroblastos se reduce, no alcanza en nuestro biomaterial de fibrina-agarosa los elevados valores de hasta el 50% descritos en los geles de colágeno (Sundararaghavan et al., 2008). En nuestro biomaterial, el genipín parece afectar más al patrón estructural de distribución de las células que a su eliminación, lo que podría relacionarse con posibles alteraciones en el citoesqueleto generadas por la acción del genipín. Aunque no se ha comprobado la alteración de la integrina  $\beta 1$  en células sometidas a la acción del genipín, sí parecen

existir alteraciones a nivel de la conformación de las fibras de estrés de F-actina (Wang et al., 2011).

Por otro lado, nuestros estudios cuantitativos de viabilidad celular utilizando el método enzimático WST-1 y la cuantificación de ADN liberado al medio muestran valores decrecientes y crecientes, respectivamente, cuando las células están en contacto con constructos control y constructos sometidos a entrecruzamiento con glutaraldehído y genipín. El estudio reveló, asimismo, que las células en contacto con constructos entrecruzados fueron más viables que las del grupo control negativo, observándose la mayor viabilidad en los constructos sometidos a entrecruzamiento con una concentración de 0,25%, especialmente en el caso del genipín. Las diferencias entre los valores de los constructos tratados con genipín al 0,25% y al 0,5% con los obtenidos en los constructos tratados con glutaraldehído al 0,25% y 0,5% fueron muy significativas en el caso de WST-1 y la liberación de ADN, a excepción de los valores de ADN cuando se comparan los grupos tratados al 0,5%. Ello implica que el genipín y el glutaraldehído muestran una toxicidad similar a altas concentraciones, pero diferente a bajas concentraciones. Además, puesto que la primera técnica es capaz de detectar daño celular mucho más precozmente que la segunda, podríamos afirmar que el genipín utilizado a bajas dosis (0,25%) alteraría las funciones metabólicas y de proliferación de la célula de forma mucho menos significativa que el glutaraldehído a las mismas dosis (0,25%).

La alteración de la viabilidad celular tiene posiblemente su origen en la liberación de residuos químicos citotóxicos a partir de las propias moléculas del agente entrecruzante (grupos aldehído, amina, ácidos, etc.) o bien a partir de los biomateriales tratados con estos agentes (Dare et al., 2009; Hoffmann et al., 2009; Schek et al., 2011; Jiang et al., 2016). Aunque en general, estos residuos químicos son muy escasos en el biomaterial y no deberían ejercer una acción citotóxica aguda sobre las células, hay que tener en cuenta que el proceso natural de biodegradación del biomaterial podría conducir a la liberación de otros agentes citotóxicos a partir del propio material, los cuales podrían influir igualmente sobre la función celular y la respuesta del huésped, como ocurre con biomateriales sintéticos como el ácido poliláctico o poliglicólico (Wang et al., 2011; Carriel et al., 2014b). Algunos estudios

llevados a cabo sobre la acción citotóxica del genipín han contribuido a establecer el fundamento y los mecanismos de toxicidad de los agentes de entrecruzamiento. Dos son los mecanismos básicos que han sido descritos en relación con este agente: la alteración del citoesqueleto y la inducción de un proceso de apoptosis. En el primer caso, como se ha indicado previamente, se ha demostrado la alteración de la F-actina y su incidencia en la desestructuración del citoesqueleto, al afectarse las fibras de estrés relacionadas con la fijación al sustrato (Wang et al., 2011). En lo que la apoptosis se refiere, algunos autores han sugerido que las especies reactivas del oxígeno (ROS) juegan un papel sustancial en la inducción de la apoptosis por genipín, activando las rutas intrínsecas y extrínsecas que conducen a la muerte celular programada (Kim et al., 2005; Circu y Aw, 2010). Por otra parte, se ha demostrado que la acción del genipín no es idéntica en todas las células, observándose variaciones en sus efectos incluso en células de la misma estirpe, como los condrocitos y los osteoblastos (Wang et al., 2011).



**Figura 28.** Representación del rango de los valores de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) de diferentes tejidos nativos (rectángulos incoloros) y de los tejidos artificiales de fibrina-agarosa no nanoestructurados y nanoestructurados controles y sometidos a la acción de glutaraldehído y genipín al 0,25% (rectángulos en color).

Tras analizar el conjunto de datos procedentes de los experimentos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, podemos afirmar que es posible generar modelos tisulares basados en hidrogeles de fibrina-agarosa con diferentes propiedades biomecánicas y que estas propiedades pueden ser, en parte, controladas por el investigador. Los diferentes modelos pueden generarse utilizando técnicas combinadas de nanoestructuración y/o entrecruzamiento con glutaraldehído y genipín, de tal manera que sea posible controlar el grosor, la densidad de fibras, la porosidad, así como las propiedades biomecánicas y biológicas de estos constructos. En la figura 28 se representa la correlación de los distintos modelos tisulares generados en la presente Tesis Doctoral en relación con las propiedades biomecánicas representadas por los módulos reológicos de diferentes tejidos nativos (Chan y Titzte, 1999; Liu y Bilston, 2000; Geerligts et al., 2008; Green et al., 2008; Scionti et al., 2014b). De dicha correlación se deduce que el modelo tisular HFA-GP 0,25%, en lo que a los módulos viscoelásticos se refiere, es altamente compatible con la mucosa oral, mientras que los modelos NHFA-GP y NHFA-GA al 0,25% lo son para el tejido nervioso. En relación con la córnea, es importante destacar que los modelos más compatibles son NHFA-GP y NHFA-GA al 0,25% para el módulo elástico y el HFA para el módulo viscoso. A dichas correlaciones hay que añadir necesariamente los datos estructurales biomiméticos de porosidad y los de biocompatibilidad a la hora de seleccionar el modelo de tejido artificial deseado.

En consecuencia, todo ello permite el diseño selectivo de modelos tisulares específicos para distintas aplicaciones terapéuticas en el marco de la ingeniería tisular y la medicina regenerativa. Dichos modelos deberán en un futuro próximo evaluarse in vivo para determinar la posible aplicabilidad médica de los mismos.

## **6. CONCLUSIONES**

1. La metodología desarrollada en la presente Tesis Doctoral ha permitido generar diferentes biomateriales y modelos de tejidos artificiales basados en un biomaterial polimérico de fibrina-agarosa obtenido mediante la aplicación combinada de dos procesos de biofabricación: la acción de los agentes químicos de entrecruzamiento glutaraldehído y genipín y la compresión plástica o nanoestructuración. La utilización controlada de concentraciones variables de los dos agentes químicos (0,25% y 0,5% de glutaraldehído o de genipín) y de la nanoestructuración da origen a un conjunto de modelos tisulares diferentes susceptibles de ser aplicados a distintos protocolos de ingeniería tisular según sus propiedades biomecánicas, biomiméticas y de biocompatibilidad.

2. El análisis histológico con microscopía óptica y electrónica de barrido y el análisis morfométrico llevado a cabo en los distintos biomateriales y modelos tisulares ponen de relieve que el patrón estructural con más alta porosidad y más baja densidad fibrilar se observa en los modelos no nanoestructurados y que los de más baja de porosidad y más alta densidad fibrilar están presentes en modelos nanoestructurados sometidos a un proceso de entrecruzamiento con 0,5% de glutaraldehído. Entre ambos extremos existen niveles intermedios de porosidad y densidad celular en los modelos tisulares biofabricados mediante nanoestructuración con entrecruzamiento con genipín al 0,25% y al 0,5%. La combinación de una concentración variable de glutaraldehído o genipín y/o técnicas de nanoestructuración permite controlar la porosidad en los modelos tisulares de fibrina-agarosa y, en consecuencia, correlacionar el biomaterial con los diferentes tipos de células a utilizar en la elaboración del tejido artificial, lo que contribuirá a diseñar el tipo de biomaterial más biomimético a utilizar en relación con el tejido y la aplicación médica deseada.

3. El análisis reológico realizado en estado estacionario en los distintos modelos tisulares pone de relieve que el patrón biomecánico representado por el módulo de rigidez (G) mejora significativamente tras la utilización de las distintas concentraciones de glutaraldehído y genipín, con independencia de que el biomaterial esté o no nanoestructurado. El módulo se incrementa más con concentraciones crecientes de glutaraldehído que de genipín, especialmente en los modelos tisulares nanoestructurados en comparación con los no nanoestructurados. La combinación

conjunta de glutaraldehído o genipín y nanoestructuración permite potenciar el patrón biomecánico de rigidez y controlar, por tanto, el módulo G en el modelo tisular de fibrina-agarosa que deba diseñarse para un determinado protocolo de ingeniería tisular, de modo que éste resulte lo más biomimético posible desde un punto de vista reológico. Asimismo, el análisis reológico realizado en estado dinámico en los distintos modelos tisulares pone de relieve que los patrones biomecánicos representados por el módulo elástico ( $G'$ ) y el módulo viscoso ( $G''$ ) mejoran significativamente en sus valores cuando los modelos tisulares no nanoestructurados y nanoestructurados se someten a las distintas concentraciones de glutaraldehído y genipín, especialmente en el caso de los constructos nanoestructurados y en aquéllos sometidos a entrecruzamiento con glutaraldehído. Con independencia de la utilización de glutaraldehído y genipín el módulo elástico ( $G'$ ) alcanza en todos los casos valores hasta cuatro veces superiores a los del módulo viscoso ( $G''$ ), lo que indica que los nuevos modelos tisulares generados poseen propiedades marcadamente elásticas. La combinación conjunta de glutaraldehído o genipín y nanoestructuración permite controlar los valores de los patrones biomecánicos de elasticidad y viscosidad y establecer los módulos elásticos ( $G'$ ) y viscosos ( $G''$ ) que, en asociación con el módulo de rigidez (G), deban seleccionarse para generar el modelo tisular de fibrina-agarosa necesario con el que sustituir a un tejido nativo determinado y que reproduzca sus propiedades biomecánicas.

4. El análisis de biocompatibilidad ex vivo mediante métodos morfológicos, biofuncionales y bioquímicos pone de relieve una progresiva alteración de la morfología, el metabolismo y la continuidad de la membrana de las células cultivadas en los distintos modelos tisulares estudiados, lo cual hay que relacionar directamente con las concentraciones crecientes de glutaraldehído y genipín. Existen diferencias significativas en relación con la viabilidad a favor del genipín. La concentración más citotóxica es glutaraldehído al 0,5%, con importante mortalidad celular, mientras que la más viable es genipín al 0,25%, con escasa disminución celular y tan solo un patrón estructural diferente en la distribución celular que puede relacionarse con la acción del genipín sobre el citoesqueleto y el sistema de adhesión. La liberación de ADN, con independencia de otros indicadores de viabilidad, pone de relieve que a la

concentración de 0,5%, el glutaraldehido y el genipín podrían tener efectos citotóxicos similares.

5. La generación de diferentes biomateriales y modelos de tejidos artificiales de fibrina-agarosa mediante dos procesos de biofabricación (entrecruzamiento con agentes químicos y nanoestructuración) permite el diseño de modelos versátiles de tejidos artificiales con patrones estructurales de diferente porosidad, con patrones biomecánicos de diferente rigidez, elasticidad y viscosidad y con patrones de biocompatibilidad y viabilidad diferentes que pueden ser utilizados en protocolos de ingeniería tisular de acuerdo con los tejidos nativos que hayan de ser sustituidos. La elaboración de dichos tejidos se inserta en el nuevo paradigma constructivo de la ciencia histológica y de la medicina del siglo XXI.



# **7. CONCLUSIONS**

1. The methodology developed in this Doctoral Thesis has allowed the generation of different biomaterials and artificial tissue models based on a fibrin-agarose polymer biomaterial obtained by the combined application of two processes of biofabrication: the action of the crosslinking chemical agents glutaraldehyde and genipin and the plastic compression or nanostructuration. The controlled use of varying concentrations of the two chemical agents (0.25% and 0.5% of glutaraldehyde or genipin) and nanostructuration gave rise to a set of different tissue models capable of being applied to different tissue engineering protocols according to their biomechanical, biomimetic and biocompatibility properties.

2. The histological analysis using light microscopy and scanning electron microscopy and the morphometric analysis carried out in the different biomaterials and tissue models showed that the structural pattern with the highest porosity and lower fibrillar density corresponded to the non-nanostructured models and that the lower porosity and higher fibrillar density were present in nanostructured models subjected to a crosslinking process with 0.5% glutaraldehyde. Between the two extremes, there were intermediate levels of porosity and fibrillar density in the biofabricated tissue models using nanostructuration and crosslinking with 0.25% and 0.5% genipin. The combination of a variable concentration of glutaraldehyde or genipin and/or nanostructuration techniques allowed an efficient control of the porosity in fibrin-agarose tissue models. Consequently a correlation between the biomaterial and the cell type to be used in the elaboration of artificial tissues is possible. This will contribute to select the more appropriate biomimetic biomaterial for the desired medical application.

3. The steady-state rheological analysis carried out on the different tissue models showed that the biomechanical pattern represented by the rigidity modulus (G) was significantly improved with the use of different concentrations of glutaraldehyde and genipin, in non-nanostructured and nanostructured biomaterials. The modulus tended to increase more significantly with increasing concentrations of glutaraldehyde as compared to genipin, especially in nanostructured tissue models. The joint combination of glutaraldehyde or genipin and nanostructuration allowed us to enhance the biomechanical stiffness pattern and therefore, to control the G modulus

in the fibrin-agarose tissue model. This will allow to designing a specific biomaterial for a given tissue engineering protocol, with biomimetic properties from a rheological point of view. Also, the rheological analysis carried out in dynamic state in the different tissue models showed that the biomechanical patterns represented by the elastic modulus ( $G'$ ) and the viscous modulus ( $G''$ ) improved significantly when the nanostructured and non-nanostructured tissue models were treated with different concentrations of glutaraldehyde or genipin, especially in the case of nanostructured models and in those subjected to glutaraldehyde crosslinking. Regardless of the use of glutaraldehyde or genipin, the elastic modulus ( $G'$ ) was four times higher than the viscous modulus ( $G''$ ), indicating that the new tissue models generated had marked elastic properties. The combination of glutaraldehyde or genipin and nanostructuring allowed controlling the biomechanical values of elasticity and viscosity which, in association with the stiffness modulus ( $G$ ) should be selected to generate the necessary fibrin-agarose tissue model to replace a specific native tissue and reproduce its biomechanical properties.

4. The *ex vivo* biocompatibility analysis at the morphological, biofunctional and biochemical levels showed a progressive alteration in the cell morphology, metabolism and membrane integrity of cells cultured in the different tissue models studied. This was directly related to the increasing concentrations of glutaraldehyde and genipin. There were significant differences regarding cell viability in favor of genipin. The most cytotoxic concentration was 0.5% glutaraldehyde, which was associated to a significant level of cell damage, while the most viable condition was 0.25% genipin, which had only a different structural pattern and cell distribution that could be related to the action of the genipin on the cytoskeleton and the cell adhesion systems. DNA release, independent of other viability indicators, suggests that 0.5% concentrations of glutaraldehyde and genipin could have similar cytotoxic effects.

5. The generation of different biomaterials and artificial fibrin-agarose tissue models by using two biofabrication processes (cross-linking with chemical agents and nanostructuring) allowed designing versatile models of artificial tissues with different porosity structural patterns, with biomechanical patterns of different stiffness, elasticity and viscosity and with different biocompatibility and viability

patterns that could be used in tissue engineering protocols according to the native tissues to be replaced. The elaboration of these artificial tissues is inserted in the new constructive paradigm of the histological science and medicine of the XXI<sup>st</sup> century.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

- Abou Neel EA, Cheema U, Knowles JC, Brown RA, Nazhat SN (2006). Use of multiple unconfined compression for control of collagen gen scaffold density and mechanical properties. *Soft Matter*. 2(11):986-92.
- Aggarwal S, Pittenger MF (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815-22.
- Ahearne M, Siamantouras E, Yang Y, Liu KK (2009). Mechanical characterization of hydrogels for tissue engineering applications. *J R Soc Interface*. 6(34):471-8.
- Ahmed TA, Dare EV, Hincke M (2008). Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng. Part B Rev*. 14(2):199-215.
- Akao T, Kobashi K, Aburada M (1994). Enzymic studies on the animal and intestinal bacterial metabolism of genoposide. *Biol Pharm Bull*.17: 1573-76.
- Alaminos M, Dávalos V, Ropero S, Setién F, Paz MF, Herranz M, Fraga MF, Mora J, Cheung NKV, Gerald WL, Esteller M (2005). EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma. *Cancer Research*. 65:2565-71.
- Alaminos M, Del Carmen Sánchez-Quevedo M, Muñoz-Avila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A (2006). Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 47:3311-7.
- Alaminos M, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Andrades M, Fernández-Montoya A, Campos A (2007b). Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med*. 1(5):350-9.
- Alaminos M, Sánchez-Quevedo MC, Muñoz-Avila JI, García JM, Crespo PV, Conzález-Andrades M, Campos A (2007a). Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *J Cell Physiol*. 211(3):692-8.
- Arenas-Herrera JE, Ko IK, Atala A, Yoo JJ (2013). Decellularization for whole organ bioengineering. *Biomed Mater* 8:014106.
- Atala A (2014). Organ preservation, organ and cell transplantation, tissue engineering and regenerative medicine: the terms may change, but the goals remain the same. *Tissue Eng. Part A*. 20(3-4):445-6.
- Badylak SF, Taylor D, Uygun K (2011). Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng* 13:27-53.
- Badylak SF, Weiss DJ, Caplan A, Macchiarini P (2012). Engineered whole organs and complex tissues. *Lancet*. 379(9819):943-52.
- Beaman FD, Bancroft LW, Peterson JJ, Kransdorf MJ (2006). Bone graft materials and synthetic substitutes. *Radiol Clin North Am*. 44(3):451-61.
- Bedran-Russo AK, Pereira PN, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M (2007). Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 80:268-272.
- Berneel E (2015). Towards engineering of the meniscus. Tesis Doctoral. Universidad de Gante.
- Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N (2001). Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde cross-linking *Biomaterials*.22:763-8.

- Bitar M, Salih V, Brown R, Nazhat S (2007). Effect of multiple unconfined compression on cellular dense collagen scaffolds for bone tissue engineering. *J Materials Science: Materials in Medicine* 18:237-44.
- Boonthekul T, Mooney DJ (2003). Protein-based signaling systems in tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 14:559-565.
- Braziulis E, Diezi M, Biedermann T, Pontiggia L, Schmucki M, Hartmann-Fritsch F, Luginbühl J, Schiesti C, Meuli M, Reichmann E (2012). Modified plastic compression of collagen hydrogels provides an ideal matrix for clinically applicable skin substitutes. *Tissue Eng. Part C Methods*. 18(6):464-74.
- Brown RA, Wiseman M, Chuo CB, Cheema U, Nazhat SN (2005). Ultrarapid engineering of biomimetic materials and tissues: fabrication of nano- and micro-structures by plastic compression. *Advanced Functional Materials* 15:1762-70.
- Campos A (2004). *Cuerpo, histología y medicina. Discurso de ingreso*. Real Academia Nacional de Medicina. Madrid.
- Campos A (2011). *El cuerpo que viene y otros ensayos efímeros*. Ed. S.L. Alhulia. Granada.
- Campos A (2013). *La célula y el tejido como medicamento. De la médula ósea al sistema nervioso. Discurso de apertura*. Universidad de Granada.
- Campos F, Bonhome-Espinosa AB, García-Martínez L, Durán JD, López-López MT, Alaminos M, Sánchez-Quevedo MC, Carriel V (2016b). *Ex vivo* characterization of a novel tissue-like cross-linked fibrin-agarose hydrogel for tissue engineering applications. *Biomed Mater*. 11(5):055004
- Campos F, Garzón I, Rodríguez IA, Martín-Piedra MA (2016a). Cell viability evaluation in tissue constructs. A preliminary study. *Actualidad Médica*. 101:13-17.
- Cardona J de L, Ionescu AM, Gómez-Sotomayor R, González-Andrades M, Campos A, Alaminos M, Pérez M del M (2011). Transparency in a fibrin and fibrin-agarose corneal stroma substitute generated by tissue engineering. *Cornea*. 30: 1428-35.
- Carriel V, Alaminos M, Garzón I, Campos A, Cornelissen M (2014b). Tissue engineering of the peripheral nervous system. *Expert Rev Neurother*. 14:301-18.
- Carriel V, Garrido-Gómez J, Hernández-Cortés P, Garzón I, García-García S, Sáez-Moreno JA, Del Carmen Sánchez-Quevedo M, Campos A, Alaminos M (2013). Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *J Neural Eng*. 10(2):026022.
- Carriel V, Garzón I, Alaminos M, Cornelissen M (2014a). Histological assessment in peripheral nerve tissue engineering. *Neural Regen Res*. 9:1657-60.
- Carriel V, Garzón I, Jiménez JM, Oliveira AC, Arias-Santiago S, Campos A, Sánchez-Quevedo MC, Alaminos M (2012). Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *Cells Tissues Organs*. 196:1-12.
- Carriel V, Scionti G, Campos F, Roda O, Castro B, Cornelissen M, Garzón I, Alaminos M (2015). *In vitro* characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute. *J Tissue Eng Regen Med*. doi: 10.1002/term.2039.
- Castro E, Mano JF (2013). Magnetic force-based tissue engineering and regenerative medicine. *J Biomed Nanotechnol*. 9(7):1129-36.
- Chan RW, Titze IR (1999). Viscoelastic shear properties of human vocal fold mucosa: measurement methodology and empirical results. *J Acoust Soc Am*. 106(4 Pt 1):2008-21.

- Chang Y, Hsu CK, Wei HJ, Chen SC, Liang HC, Lai PH, Sung HW (2005). Cell-free xenogenic vascular grafts fixed with glutaraldehyde or genipin: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Biotechnol.* 120:207-19.
- Chang Y, Tsai CC, Liang HC, Sung HW (2002). *In vivo* evaluation of cellular and acellular bovine pericardia fixed with a naturally occurring cross-linking agent (genipin). *Biomaterials.* 23:2447-57.
- Cheema U, Brown RA (2013). Rapid fabrication of living tissue models by collagen plastic compression: understanding three-dimensional cell matrix repair *in vitro*. *Adv Wound Care.* 2(4):176-84.
- Cheema U, Alekseeva T, Abou-Neel EA, Brown RA (2010). Switching off angiogenic signaling: creating channeled construct for adequate oxygen delivery in tissue engineered construct. *Eur Cell Mater.* 20:274-80.
- Cheng NC, Estes BT, Young TH, Guilak F (2013). Genipin-crosslinked cartilage-derived matrix as a scaffold for human adipose-derived stem cell chondrogenesis. *Tissue Eng Part A.* 19(3-4):484-96.
- Chiarello E, Cadossi M, Tedesco G, Capra P, Calamelli C, Shehu A, Giannini S (2013). Autograft, allograft and bone substitutes in reconstructive orthopedic surgery. *Aging Clin Exp Res.* 25(1):S101-3.
- Chow MZ, Boheler KR, Li RA (2013). Human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for heart regeneration, drug discovery and disease modeling: from the genetic, epigenetic and tissue modeling perspective. *Stem Cell Res Ther.* 4(4):97.
- Circu ML, Aw TY (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 48:749-62.
- Committee for Advanced Therapies (CAT) (2010). Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them. *Nat Rev Drug Discov.* 9:195-201.
- Cuende N (2013). Andalusian initiative for advanced therapies: fostering synergies. *Stem Cells Transl Med.* 2(4):243-5.
- Cuende N, Izeta A (2010). Clinical translation of stem cell therapies: a bridgeable gap. *Cell Stem Cell.* 6(6):508-12.
- Cuende N, Rico L, Herrera C (2012). Bone marrow mononuclear cells for the treatment of ischemic syndromes: medicinal product or cell transplantation?. *Stem Cells Translational Medicine.* 1:403-8.
- Daly W, Yao L, Zeugolis D, Windebank A, Pandit A (2012). A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. *J R Soc Interface.* 9(67):202-21.
- Dare EV, Griffith M, Poitras P, Wang T, Dervin GF, Giulivi A, Hincke MT (2009b). Fibrin sealants from fresh or fresh/frozen plasma as scaffolds for *in vitro* articular cartilage regeneration. *Tissue Eng. Part A.* 15(8):2285-97.
- Dare EV, Griffith M, Poitras P, Kaupp JA, Waldman SD, Carlsson DJ, Dervin G, Mayoux C, Hincke MT (2009a). Genipin cross-linked fibrin hydrogels for *in vitro* human articular cartilage tissue-engineered regeneration. *Cells Tissues Organs.* 190(6):313-25.
- De Vries RB, Leenaars M, Tra J, Huijbregtse R, Bongers E, Jansen JA, Gordijn B, Ritskes-Hoitinga M (2015). The potential of tissue engineering for developing alternatives to animal experiments: a systematic review. *J Tissue Eng Regen Med.* 9(7):771-8.
- Dee KC, Puleo DA, Bizios R (2003). *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions.* Wiley.



- Delgado L M, Bayon Y, Pandit A, Zeugolis D I (2015). To cross-link or not to cross-link? Cross-linking associated foreign body. Response of collagen-based devices Tissue Eng. B. 21:298-313.
- Directiva 2003/63/CE de la Comisión de 25 de junio de 2003 que modifica la Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano. Diario Oficial de la Unión Europea de 27 de junio de 2003.
- Directiva 2009/120/CE de la Comisión de 14 de septiembre de 2009 que modifica la Directiva 2001/83/CE del parlamento europeo y del consejo, por la que se establece el código comunitario sobre medicamentos para uso humano, en lo que se refiere a los medicamentos de terapia avanzada. Diario Oficial de la Unión Europea de 15 de septiembre de 2009.
- Drury JL, Mooney DJ (2003). Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. Biomaterials. 24: 4337-51.
- Editorial (2016). Generación e implantación de piel artificial creada por ingeniería de tejidos fabricada en Granada: Un modelo de medicina traslacional. Actual Med. 101(798):65.
- Errington RJ, Puustjarvi K, White IR, Roberts S, Urban JP (1998). Characterisation of cytoplasm-filled processes in cells of the intervertebral disc. J Anat. 192(Pt 3):369-78.
- Fallica B, Maffei J S, Villa S, Makin G, Zaman M (2012). Alteration of cellular behavior and response to PI3K pathway inhibition by culture in 3D collagen gels. PLoS One. 7: e48024
- Fernández-Valadés-Gámez R, Garzón I, Licerias-Licerias E, España-López A, Carriel V, Martín-Piedra MÁ, Muñoz-Miguelsanz MÁ, Sánchez-Quevedo MC, Alaminos M, Fernández-Valadés R (2016). Usefulness of a bioengineered oral mucosa model for preventing palate bone alterations in rabbits with a mucoperiosteal defect. Biomed Mater. 11(1):015015.
- Ferreti M, Marra KG, Kobayashi K, Defail AJ, Chu CR (2006). Controlled *in vivo* degradation of genipin crosslinked polyethylene glycol hydrogels within osteochondral defects. Tissue Eng. 12(9):2657-63.
- Fisher JP (2007). Tissue Engineering. Fisher JP (ed). Springer US. Boston
- Fisher MB, Mauck RL (2013). Tissue engineering and regenerative medicine: recent innovations and the transition to translation. Tissue Eng. Part B Rev. 1:1-13.
- Gamboa-Martínez TC, Luque-Guillén V, González-García C, Gómez Ribelles JL, Gallego-Ferrer G (2015). Crosslinked fibrin gels for tissue engineering: two approaches to improve their properties. J Biomed Mater Res A. 103(2):614-21.
- García-Martínez L, Campos F, Godoy-Guzmán C, Del Carmen Sánchez-Quevedo M, Garzón I, Alaminos M, Campos A, Carriel V (2016). Encapsulation of human elastic cartilage-derived chondrocytes in nanostructured fibrin-agarose hydrogels. Histochem Cell Biol. DOI 10.1007/s00418-016-1485-9.
- Garzón I, Carriel V, Marín-Fernández AB, Oliveira AC, Garrido-Gómez J, Campos A, Sánchez-Quevedo MC, Alaminos M (2012b). A combined approach for the assessment of cell viability and cell functionality of human fibrochondrocytes for use in tissue engineering. PLoS One. 7(12):e51961.
- Garzón I, Martín-Piedra MA, Alfonso-Rodríguez C, González-Andrades M, Carriel V, Martínez-Gómez C, Campos A, Alaminos M (2014). Generation of a biomimetic human

artificial cornea model using Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 55(7):4073-83.

- Garzón I, Miyake J, González-Andrades M, Carmona R, Carda C, Sánchez-Quevedo Mdel C, Campos A, Alaminos M (2013). Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration. *Stem Cells Transl Med.* 2(8):625-32.
- Garzón I, Perez-Kohler B, Garrido-Gómez J, Carriel V, Nieto-Aguilar R, Martín-Piedra MA, García-Honduvilla N, Bujan J, Campos A, Alaminos M (2012a). Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy. *Tissue Eng. Part C.* 18:408-19.
- Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Jaranay M, González-Andrades M, Montalvo A, Campos A, Alaminos M (2009). *In vitro* and *in vivo* cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. *J Periodontol Res.* 44:588-97.
- Geerligs M, Peters GW, Ackermans PA, Oomens CW, Baaijens FP (2008). Linear viscoelastic behavior of subcutaneous adipose tissue. *Biorheology.* 45(6):677-88.
- González-Andrades M, Carriel V, Rivera-Izquierdo M, Garzón I, González-Andrades E, Medialdea S, Alaminos M, Campos A (2015). Effects of Detergent-Based Protocols on Decellularization of Corneas with Sclerocorneal Limbus. Evaluation of Regional Differences. *Transl Vis Sci Technol.* 4(2):13.
- González-Andrades M, Garzón I, Gascón MI, Muñoz-Avila JI, Sánchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M (2009). Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *J Tissue Eng Regen Med.* 3(6):442-9.
- Green MA, Bilston LE, Sinkus R (2008). *In vivo* brain viscoelastic properties measured by magnetic resonance elastography. *NMR Biomed.* 21(7):755-64.
- Griggith LG (2000). Polymeric biomaterials. *Acta Mater.* 48:263-77.
- Hadjipanayi E, Ananta M, Binkowski M, Streeter I, Lu Z, Cui ZF, Brown RA (2011). Mechanisms of structure generation during plastic compression of nanofibrillar collagen hydrogel scaffolds: towards engineering of collagen. *J Tissue Eng Regen Med.* 5(7):505-19.
- Hatami-Marbini H (2014). Viscoelastic shear properties of the corneal stroma. *J Biomech.* 47(2):723-8.
- Haugh MG, Thorpe SD, Vinardell T, Buckley CT, Kelly DJ (2012). The application of plastic compression to modulate fibrin hydrogel mechanical properties. *J Mech Behav Biomed Mater.* 16:66-72.
- He M, Callanan A (2013). Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs. *Tissue Eng. Part B Rev.* 3: 194-208.
- Hennink WE, Van Nostrum CF (2002). Novel cross-linking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev.* 54:13-36.
- Herbert SP, Stainier DY (2011). Molecular control of endothelial cell behavior during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12(9):551-64.
- Hoffmann B, Seitz D, Mencke A, Kokott A, Ziegler G (2009). Glutaraldehyde and oxidised dextran as crosslinker reagents for chitosan-based scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 20:1495-503.
- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123708694000069>
- Hutmacher DW (2001). Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues-state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci Polym Ed.* 12:107-124.

- Ionescu AM, Alaminos M, De la Cruz Cardona J, De Dios García-López Duran J, González-Andrades M, Ghinea R, Campos A, Hita E, del Mar Pérez M (2011). Investigating a novel nanostructured fibrinagarose biomaterial for human cornea tissue engineering: Rheological properties. *J Mech Behav Biomed Mater.* 4:1963-1973.
- Jaimes-Parra BD, Valle-Díaz de la Guardia F, Arrabal-Polo MÁ, Herrera-Imbroda B, Lara MF, Machuca-Santa-Cruz FJ, Campos A, Alaminos M, Crespo PV, Garzón I (2016). *Ex vivo* construction of a novel model of bioengineered bladder mucosa: A preliminary study. *Int J Urol.* 23(1):85-92.
- Jiang X, Yang Z, Peng Y, Han B, Li Z, Li X, Liu W (2016). Preparation, characterization and feasibility study of dialdehyde carboxymethyl cellulose as a novel cross-linking reagent. *Carbohydr Polym.* 137:632-41.
- Jurado Chacón M (2016). Asistencia, investigación y gestión en hematología y trasplante. Discurso de Ingreso. Real Academia de Medicina y Cirugía de Granada y Andalucía Oriental.
- Kaul H, Ventikos Y (2015). On the genealogy of tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng. Part B Rev.* 21(2):203-17.
- Kiernan JA (2008). *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice.* Bloxham: Scion.
- Kim BC, Kim HG, Lee SA, Lim S, Park EH, Kim SJ, Lim CJ (2005). Genipín-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway. *Biochem Pharmacol* 70: 1398-1407.
- Knapp DM, Barocas VH, Moon AG (1997). Rheology of reconstituted type I collagen gel in confined compression. *J Rheol.* 41(5):971-93.
- Koo HJ, Lim KH, Jung HJ, Park EH (2006). Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipín. *J Ethnopharmacol.* 103:496-500.
- Lai JY (2014). Interrelationship between cross-linking structure, molecular stability, and cytocompatibility of amniotic membranes cross-linked with glutaraldehyde of varying concentrations. *RSC Adv.* 4:18871-80.
- Langer R, Vacanti J (1993). *Tissue engineering Science.* 60(5110):920-6.
- Lanza R (2006). *Essentials of stem cell biology.* Elsevier Academic Press. Nueva York.
- Liceras-Liceras E, Garzón I, España-López A, Oliveira AC, García-Gómez M, Martín-Piedra MA, Roda O, Alba-Tercedor J, Alaminos M, Fernández-Valadés R (2015). Generation of a bioengineered autologous bone substitute for palate repair: an *in vivo* study in laboratory animals. *J Tissue Eng Regen Med.* Doi: 10.1002/term.2088
- Lima EG, Tan AR, Tai T, Marra KG, DeFail A, Ateshian GA, Hung CT (2009). Genipín enhances the mechanical properties of tissue-engineered cartilage and protects against inflammatory degradation when used as a medium supplement. *J Biomed Mater Res A.* 91(3):692-700.
- Liu BS, Yao CH, Chen YS, Hsu SH (2003). *In vitro* evaluation of degradation and cytotoxicity of a novel composite as a bone substitute. *J Biomed Mater Res A.* 67:1163-69.
- Liu X, Ma PX (2004). Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng.* 32(3):477-86.
- Liu Z, Bilston L (2000). On the viscoelastic character of liver tissue: experiments and modelling of the linear behaviour. *Biorheology.* 37(3):191-201.

- López-López MT, Scionti G, Oliveira AC, Duran JD, Campos A, Alaminos M, Rodríguez IA (2015). Generation and Characterization of Novel Magnetic Field-Responsive Biomaterials. *PLoS One*. 10(7):e0133878.
- López-Serra L, Ballestar E, Fraga M, Alaminos M, Setién F, Esteller M (2006). A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. *Cancer Research*. 66:8342-46.
- Ma B, Wang X, Wu C, Chang J (2014). Cross-linking strategies for preparation of extracellular matrix-derived cardiovascular scaffolds. *Regen Biomater*. 1:81-9.
- Macosko CW (1994). *Rheology: Principles, measurements and applications*. Wiley-VCH. New York.
- Manukyan MC, Weil BR, Wang Y, Abarbanell AM, Herrmann JL, Poynter JA, Brewster BD, Meldrum DR (2011). Female stem cells are superior to males in preserving myocardial function following endotoxemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 300(6):1506-14.
- Martín-Piedra MA (2014a). Evaluación de los perfiles de viabilidad celular de células madre de la pulpa dental y de la gelatina de Wharton como control de calidad para su uso en Ingeniería Tisular. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Martín-Piedra MA, Alaminos M, Fernández-Valadés-Gómez R, España-López A, Licerias-Licerias E, Sánchez-Montesinos I, Martín-Plaza A, Sánchez-Quevedo MC, Fernández-Valadés R, Garzón I (2016). Development of a multilayered palate substitute in rabbits: a histochemical *ex vivo* and *in vivo* analysis. *Histochem Cell Biol*. (En prensa).
- Martín-Piedra MA, Garzón I, Oliveira AC, Alfonso-Rodríguez CA, Carriel V, Scionti G, Alaminos M (2014b). Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. *Cytotherapy*. 16(2):266-77.
- Martín-Piedra MA, Garzón I, Oliveira AC, Alfonso-Rodríguez CA, Sánchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M (2013). Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering. *Cytotherapy*. 15(4):507-18.
- Mauck RL, Yuan X, Tuan RS (2006). Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture. *Osteoarthritis Cartilage*. 14(2):179-89.
- McGann ME, Bonitsky CM, Jackson ML, Ovaert TC, Trippel SB, Wagner DR (2015). Genipin cross-linking of cartilage enhances resistance to biochemical degradation and mechanical wear. *J Orthop Res*. 33(11):1571-9.
- Mi FL, Tan YC, Liang HF, Sung HW (2002). *In vivo* biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials*. 3:181-91.
- Mosesson MW (2005). Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*. 3(8):1894-904.
- Mosesson MW, Siebenlist KR, Neh DA (2001). The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann NY Acad Sci*. 936:11-30.
- Mwale F, Jordanova M, Demers CN, Steffen T, Roughley P, Antoniou J (2005). Biological evaluation of chitosan salts cross-linked to genipin as a cell scaffold for disk tissue engineering. *Tissue Eng*. 11(1-2):130-40.
- Mwale F, Jordanova M, Demers CN, Steffen T, Roughley P, Antoniou J (2005). Biological evaluation of chitosan salts cross-linked to genipin as a cell scaffold for disk tissue engineering. *Tissue Eng*. 11:130-40.

- Nieto-Aguilar R, Serrato D, Garzón I, Campos A, Alaminos M (2011). Pluripotential differentiation capability of human adipose-derived stem cells in a novel fibrin-agarose scaffold. *J Biomater Appl.* 25(7):743-68.
- Nisbet DR, Crompton KE, Horne MK, Finkelstein DI, Forsythe JS (2008). Neural tissue engineering of the CNS using hydrogels. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 87(1):251-63.
- Oliveira AC, Garzón I, Ionescu AM, Carriel V, Cardona Jde L, González-Andrades M, Pérez Mdel M, Alaminos M, Campos A (2013). Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering. *PloS One.* 8(6):e66538
- Olson JL, Atala A, Yoo JJ (2011). Tissue engineering: current strategies and future directions. *Chonnam Med J.* 47(1):1-13.
- Palsson BO, Bhatia SN (2004). *Tissue engineering.* Pearson Prentice Hall. New Jersey.
- Patterson J, Martino MM, Hubbell JA (2010). Biomimetic materials in tissue engineering. *Materials Today.* 13(1-2):14-22
- Peña MAV, Alvarado DAG (2010). Scaffolds implants for bone regeneration. Materials, techniques and modeling by means of reaction-diffusion systems. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.* 25:1569-82.
- Pereira Am, Machado R, Da Costa A, Ribeiro A, Collins T, Gomes AC, Leonor IB, Kaplan DL, Reis RL, Casal M (2017). Silk-based biomaterials functionalized with fibronectin type II promotes cell adhesión. *Acta Biomater.* 47:50-9.
- Ramakrishna S, Mayer J, Wintermantel E, Leong KW (2001). Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Composite Science and Technology.* 61:1189-1224.
- Ramires PA, Milella E (2002). Biocompatibility of poly(vinyl alcohol)-hyaluronic acid and poly(vinyl alcohol)-gellan membranes crosslinked by glutaraldehyde vapors. *J Mater Sci Mater Med.* 13:119-23.
- Ratner BD (2004). *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine.* Elsevier Science.
- Ratner BD (2012). *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine.* Academic Press.
- Reddy N, Reddy R, Jiang Q (2015). Cross-linking biopolymers for biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 33:362-9.
- Reglamento (CE) No 1394/2007 del Parlamento europeo y del Consejo de 13 de noviembre de 2007 sobre medicamentos de terapia avanzada y por el que se modifica la Directiva 2001/83/CE y el Reglamento (CE) no 726/2004. *Diario Oficial de la Unión Europea* de 10 de diciembre de 2007.
- Rodríguez IA, Fernández-Segura E, Ceballos G, Arrebola F, Sánchez-Quevedo MC, Campos A (2008). Hybrid cell death induced by exposure to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA): an ultrastructural and X-ray microanalytical study. *J Adhes Dent.* 10(2):105-11.
- Rodríguez IA, López-López MT, Oliveira AC, Sánchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M, Durán JD (2012). Rheological characterization of human fibrin and fibrin-agarose oral mucosa substitutes generated by tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 6:636-44.

- Rodríguez IA, López-González G, Rodríguez MA, Campos-Sanchez F, Alaminos M (2011). Biological evaluation of 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA) toxicity in human gingival fibroblasts with histochemical X-ray microanalysis. *J Adhes Dent.* 13(4):375-81.
- Rodríguez MA, López-López MT, Durán JD, Alaminos M, Campos A, Rodríguez IA (2013). Cryopreservation of an artificial human oral mucosa stroma. A viability and rheological study. *Cryobiology.* 67(3):355-62.
- Rodríguez-Arco I, Rodríguez IA, Carriel V, Bonhome-Espinosa AB, Campos F, Kuzhir P, Durán JD, López-López MT (2006). Biocompatible magnetic core-shell nanocomposites for engineered magnetic tissues. *Nanoscale.* 8(15):8138-50.
- Rodríguez-Morata A, Garzón I, Alaminos M, García-Honduvilla N, Sánchez-Quevedo MC, Buján J, Campos A (2008). Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Ann Vasc Surg.* 22(3):440-8.
- Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Parmeggiani D, Barbarisi A (2005). Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *J Cell Physiol.* 203(3):465-70.
- San Martín S, Alaminos M, Zorn TM, Sánchez-Quevedo MC, Garzón I, Rodríguez IA, Campos A (2013). The effects of fibrin and fibrin-agarose on the extracellular matrix profile of bioengineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med.* 7:10-9.
- Sánchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitán LM, Moreu G, Garzón I, Crespo PV, Campos A (2007). Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol.* 22:631-40.
- Santos Esteve L (2013). Síntesis y caracterización de scaffolds poliméricos para la ingeniería de tejidos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Schek RM, Michalek AJ, Iatridis JC (2011). Genipin-crosslinked fibrin hydrogels as a potential adhesive to augment intervertebral disc annulus repair. *Eur Cell Mater.* 21:373-83.
- Scionti G (2014a). Evaluación de las propiedades biomecánicas de tejidos artificiales elaborados con biopolímeros para su utilización en ingeniería tisular. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Scionti G, Moral M, Toledano M, Osorio R, Durán JD, Alaminos M, Campos A, López-López MT (2014b). Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model. *J Biomed Mater Res.* 102:2573-82.
- Sears NA, Seshadri DR, Dhavalikar PS, Cosgriff-Hernández E (2016). A review of three-dimensional printing in tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 4:298-310.
- Serpooshan V, Quinn TM, Muja N, Nazhat SN (2013). Hydraulic permeability of multilayered collagen gel scaffolds under plastic compression-induced unidirectional fluid flow. *Acta Biomater.* 9(1):4673-80.
- Serrato D, Nieto-Aguilar R, Garzón I, Roda O, Campos A, Alaminos M (2009). Comparison of the effect of cryopreservation protocols on the histology of bioengineered tissues. *Histol Histopathol.* 24(12):1531-40.
- Shin H, Jo S, Mikos AG (2003). Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials.* 24:4353-64.
- Siegel G, Kuba T, Hermanutz-Klein U, Bieback K, Northoff N, Schäfer R (2013). Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Medicine.* 11:146-54.
- Sieira Gil R, Pagés CM, Díez EG, Llamas S, Fuertes AF, Vilagran JL (2015). Tissue-engineered oral mucosa grafts for intraoral lining reconstruction of the maxilla and mandible with a fibula flap. *J Oral Maxillofac Surg.* 73(1):195.e1-16.

- Siriwardane ML, Derosa K, Collins G, Pfister B J (2014). Controlled formation of cross-linked collagen fibers for neural tissue engineering applications. *Biofabrication*. 6: 015012.
- Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. (2009). Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials*. 21(32-33):3307-29.
- Somers P, De Somer F, Cornelissen M, Bouchez S, Gasthuys F, Narine K, Cos E, Van Nooten G (2008). Genipin blues: an alternative non-toxic crosslinker for heart valves? *J Heart Valve Dis*. 17:682-8.
- Song F, Zhang LM, Yang C, Yan L (2009). Genipin-crosslinked casein hydrogels for controlled drug delivery. *Int J Pharm*. 373:41-7.
- Stellwagen J, Stellwagen NC (1995). Internal structure of the agarose gel matrix. *J Phys Chemistry*. 99(12):4247-51.
- Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J (2012). Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev*. 21(4):272-52.
- Sundararaghavan HG, Monteiro GA, Lapin NA, Chabal YJ, Miksan JR, Shreiber DI (2008). Genipin-induced changes in collagen gels: Correlation of mechanical properties to fluorescence. *J Biomed Mater Res A*. 87A:308-20.
- Takahashi K, Yamanaka S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126(4):663-76.
- Umashankar PR, Mohanan PV, Kumari TV (2012). Glutaraldehyde treatment elicits toxic response compared to decellularization in bovine pericardium. *Toxicol Int*. 19:51-8.
- Van Blitterswijk CA (2008). Natural polymers in tissue engineering applications. En: *Tissue Engineering*.145-92.
- Vico M, Rodríguez-Morata A, garzón I, campos F, Jaimes-Parra BD, Pérez-Köhler B, Buján J, Alaminos M, Sánchez-Quevedo MC (2015). Cell viability evaluation of transdifferentiated endothelial-like cells by quantitative electro-probe X-ray microanalysis for tissue engineering. *Histol Histopathol*. 30(11):1333-40.
- Vu L T, Jain G, Veres B D, Rajagopalan P (2015). Cell migration on planar and three-dimensional matrices: a hydrogel-based perspective. *Tissue Eng B*. 21: 67-74.
- Wang C, Lau TT, Loh WL, Su K, Wang DA (2011). Cytocompatibility study of a natural biomaterial crosslinker-genipin with therapeutic model cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 97:58-65.
- Wang W, Jin X, Zhu Y, Zhu C, Yang J, Wang H, Lin T (2016). Effect of vapor-phase glutaraldehyde cross-linking on electrospun starch fibers. *Carbohydr Polym*. 140:356-61.
- Wang Y, Chen T, Yan H, Oi H, Deng C, Ye T, Zhou S, Li FR (2013). Role of histone deacetylase inhibitors in the aging of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 114(10):2231-9.
- Wiesmann HP, Lammers L (2009). Scaffold structure and fabrication. En: *Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine*. Ed. Springer-Verlag. Berlin.
- Williams DF (1987). *Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials*, Chester, England. Elsevier.
- Williams DF (2014). The biomaterials conundrum in tissue engineering. *Tissue Eng. Part A*. 20(7-8):1129-31.

- Yan LP, Wang YJ, Ren L, Wu G, Caridade SG, Fan JB, Wang LY, Ji PH, Oliveira JM, Oliveira JT, Mano JF, Reis RL (2010). Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*. 95(2):465-75.
- Yoo JS, Kim YJ, Kim SH, Choi SH (2011). Study on genipín: a new alternative natural cross-linking agent for fixing heterograft tissue. *Korean J Thorac Cardiovasc*. 44: 197-207.
- Zhang L, Cheng JP, Zhang WC, Li W, Anniko M (2010). Reconstruction of defects following surgery for hypopharyngeal carcinoma using artificial biological material. *Acta Otolaryngol*. 130(11):1293-9.