

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA

**GENERACIÓN DE TEJIDOS ARTIFICIALES FUNCIONALIZADOS
PARA APLICACIONES DE INGENIERÍA TISULAR CRANEOFACIAL Y
DENTAL**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA CLÍNICA Y SALUD
PÚBLICA**



Tesis doctoral de:
Enrique España Guerrero

Realizado bajo la dirección de:
Dra. Ingrid Johanna Garzón Bello
Dr. Antonio José España López

2022

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Enrique España Guerrero
ISBN: 978-84-1117-619-4
URI: <https://hdl.handle.net/10481/79136>

Esta **Tesis Doctoral** ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular CTS-115 del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y financiada por los siguientes proyectos de investigación:

- Development of an improved polyvalent biomimetic model of human oral mucosa as a substitutive therapy in oral surgery. FIS PI21/00980. Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Elaboración de un sustituto osteo-mucoso biomimético 3D para el tratamiento de defectos graves de la cavidad oral. PI-0442-2019. Consejería de Salud y Familias. Junta de Andalucía.
- Generación de nuevos modelos de piel medicalizada a partir de la piel artificial de fibrina-agarosa ensayada clínicamente en grandes quemados. Funcionalización con fármacos y nuevos procesos de biofabricación PE-0395-2019. Consejería de Salud y Familias. Junta de Andalucía.

Parte de los resultados expuestos en esta memoria han sido publicados en el siguiente artículo científico original:

Blanco-Elices C, España-Guerrero E, Mateu-Sanz M, Sánchez-Porras D, García-García ÓD, Sánchez-Quevedo MDC, Fernández-Valadés R, Alaminos M, Martín-Piedra MÁ, Garzón I. In Vitro Generation of Novel Functionalized Biomaterials for Use in Oral and Dental Regenerative Medicine Applications. Materials (Basel). 2020 Apr 4;13(7). pii: E1692. doi: 10.3390/ma13071692. Factor de Impacto: 3.623; Percentil: 21

AGRADECIMIENTOS

Quería agradecer en primer lugar a mis padres y mi familia por todo el apoyo, no solo durante la elaboración de esta Tesis Doctoral, sino también durante todos los años de carrera.

Merecen especial atención mis directores, la Catedrática Dra. Ingrid J. Garzón Bello, y el Dr. Antonio J. España López, además del Catedrático Dr. Miguel Alaminos Mingorance, los cuales poseen unas ganas inagotables de trabajar, enseñar y de investigar en el campo de la Ingeniería Tisular, campo que actualmente tiene un gran potencial de desarrollo. Esta tesis doctoral no podría haber sido posible sin la ayuda de estas grandísimas personas.

Le agradezco también a todo el grupo de investigación del Departamento de Histología, especialmente a Cristina Blanco, por su ayuda inestimable en el desarrollo de los cultivos.

Por último, y no menos importante, agradecer también a los pacientes, ya que sin su desinteresada colaboración no hubiera sido posible la realización de esta Tesis Doctoral.

ÍNDICE

I TABLA DE CONTENIDO

II	RESUMEN	1
III	INTRODUCCIÓN	4
IV	HIPÓTESIS	17
V	OBJETIVOS.....	19
VI	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
VII	RESULTADOS.....	28
VIII	DISCUSIÓN	46
IX	CONCLUSIONES	53
X	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

II RESUMEN

1 RESUMEN

Los avances recientes en ingeniería de tejidos ofrecen alternativas clínicas innovadoras en odontología y medicina regenerativa. La ingeniería tisular combina células humanas con biomateriales compatibles para inducir la regeneración de tejidos. Una de las limitaciones de la ingeniería tisular es el tiempo requerido para fabricar los tejidos artificiales, por lo que reducir dicho tiempo de biofabricación contribuiría significativamente a la mejora del tratamiento. Asimismo, la funcionalización de los biomateriales utilizados en ingeniería tisular mejoraría las propiedades funcionales del tejido artificial y, por tanto, su utilidad clínica. En esta Tesis Doctoral, hemos probado un método de biofabricación alternativo mediante la inclusión directa de bioexplantes de tejido de mucosa oral humana dentro del biomaterial para la generación de tejidos orales y maxilofaciales humanos para su uso en ingeniería tisular. Para ello, se desarrollaron y analizaron biomateriales acelulares de fibrina-agarosa, tejidos artificiales de fibrina-agarosa no funcionalizados que contenían células estromales, y nuevos sustitutos de tejido de fibrina-agarosa funcionalizados con bioexplantes tisulares, analizándose cada tipo de tejido tras 1, 2 y 3 semanas de desarrollo en cultivo. Tras ello, se analizaron los componentes de la matriz extracelular para determinar su nivel de biomimetecidad respecto a los controles de la mucosa oral humana nativa aplicando métodos histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos. Los resultados mostraron que la funcionalización contribuyó a acelerar y mejorar el método de biofabricación y a obtener un tejido artificial con características biomiméticas respecto al tejido nativo en términos de componentes de la matriz extracelular.

2 SUMMARY

Recent advances in tissue engineering offer innovative clinical alternatives in dentistry and regenerative medicine. Tissue engineering combines human cells with compatible biomaterials to induce tissue regeneration. Shortening the fabrication time of biomaterials used in tissue engineering will contribute to treatment improvement, and biomaterial functionalization can be exploited to enhance scaffold properties. In this work, we have tested an alternative biofabrication method by directly including human oral mucosa tissue explants within the biomaterial for the generation of human bioengineered mouth and dental tissues for use in tissue engineering. To achieve this, acellular fibrin–agarose scaffolds (AFAS), non-functionalized fibrin-agarose oral mucosa stroma substitutes (n-FAOM), and novel functionalized fibrin-agarose oral mucosa stroma substitutes (F-FAOM) were developed and analyzed after 1, 2, and 3 weeks of in vitro development to determine extracellular matrix components as compared to native oral mucosa controls by using histochemistry and immunohistochemistry. Results demonstrate that functionalization speeds up the biofabrication method and contributes to improve the biomimetic characteristics of the scaffold in terms of extracellular matrix components and reduce the time required for in vitro tissue development.

III INTRODUCCIÓN

Se denomina ingeniería tisular a la construcción de tejidos biológicos artificiales y su utilización médica para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los propios tejidos orgánicos (Campos Muñoz, 2004). Se trata de una disciplina de reciente desarrollo en la que se combinan tres componentes fundamentales: células, biomateriales y factores de crecimiento (Langer y Vacanti, 1993). En el contexto de la medicina regenerativa, los recientes avances de la ingeniería tisular han permitido generar en laboratorio distintos tipos de tejidos y órganos que han demostrado utilidad potencial para el tratamiento de distintas enfermedades (Dogan *et al.*, 2017; Rico-Sánchez *et al.*, 2019; Stephenson *et al.*, 2017).

Frente a otros tratamientos basados en materiales inertes, especialmente, las prótesis, los tejidos generados mediante ingeniería tisular presentan gran biocompatibilidad, lo cual podría facilitar la regeneración *ad integrum* del tejido afectado (Requicha *et al.*, 2016).

En odontología y cirugía maxilofacial, la ingeniería de tejidos ha permitido desarrollar diferentes tipos de tejidos artificiales de utilidad potencial. Para ello, se han utilizado distintos tipos de células, tanto humanas como animales, biomateriales de origen natural o sintético, y diferentes factores de crecimiento (Figura 1), que se describen brevemente a continuación.

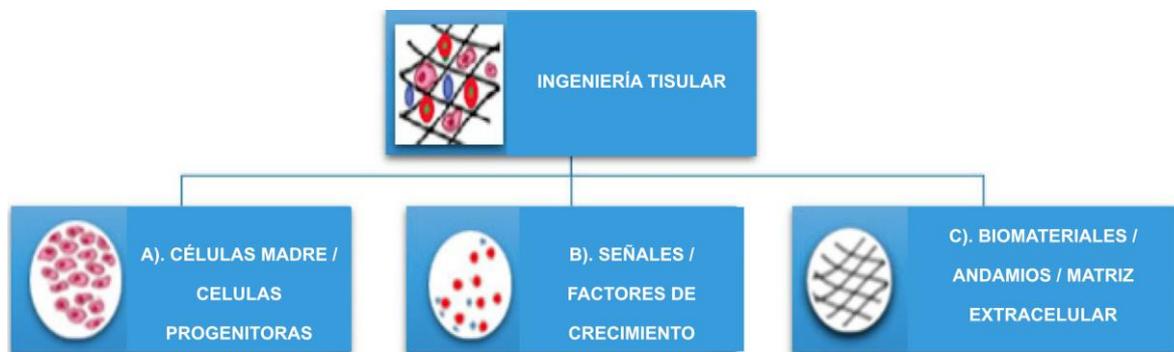


Figura 1. Componentes básicos de la ingeniería tisular (modificado de Maticescu *et al.*, 2020).

1. Células. Las células son, probablemente, el componente más importante de los tejidos artificiales generados mediante ingeniería tisular. En general, las características fundamentales que deben cumplir las células para su utilización en ingeniería tisular son, principalmente, la capacidad de proliferación y la capacidad de diferenciación, que determinan, especialmente, a las células madre (Martín-Piedra *et al.*, 2013 y 2014).

Entre los principales tipos de células madre aplicados a la ingeniería tisular en odontología, encontramos las células madre pluripotentes, las células multipotentes y las células monopotentes (Mosaddad *et al.*, 2022).

- Células pluripotentes. Las células pluripotentes, incluyendo las células embrionarias y las células de pluripotencialidad inducida (iPSC), presentan la ventaja de proliferar de forma indefinida y tienen capacidad de diferenciarse hacia estirpes celulares provenientes de diferentes hojas embrionarias, por lo que se consideran las células potencialmente más útiles en ingeniería tisular (Fanizza *et al.*, 2022; Ferreira *et al.*, 2022). En odontología, las células pluripotentes han demostrado su capacidad para diferenciarse *ex vivo* hacia progenitores mesenquimales con capacidad odontogénica (Duan *et al.*, 2011). Asimismo, estas células promueven la formación y regeneración del cemento, el hueso alveolar y el ligamento periodontal, entre otros (Rashed *et al.*, 2019). A pesar de su gran potencialidad, las células pluripotentes presentan distintas limitaciones, incluyendo importantes aspectos éticos relacionados con el origen de las células embrionarias y la posibilidad de generar tumores, así como rechazo inmunológico una vez implantadas en el paciente especialmente, en el caso de las células embrionarias (Zakrzewski *et al.*, 2019).

- Células multipotentes. Debido a su carácter como células madre adultas, las células multipotentes presentan capacidad de proliferación y diferenciación limitadas, y su papel fundamental en el organismo vivo es mantener la homeostasis y la regeneración funcional de los tejidos (Gurusamy *et al.*, 2018). Su potencial de diferenciación es menor que el de las células pluripotentes, pues sólo pueden diferenciarse hacia células de una misma hoja embrionaria, aunque con capacidad para generar diferentes tipos celulares y no un solo tipo, como es el caso de las células unipotentes (Kolios y Moodley, 2013) (Figura 2). Entre las células multipotentes más utilizadas en ingeniería tisular, encontramos las células madre mesenquimales. Distintos tipos de células madre mesenquimales se han utilizado para la ingeniería tisular en el campo de la odontología, destacando especialmente, las células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical, las células madre del tejido adiposo, las células madre de la médula ósea y las células madre de la pulpa dental (Blanco-Elices *et al.*, 2021 y 2022; Costela-Ruiz *et al.*, 2022; Garzón *et al.*, 2013; Martín-Piedra *et al.*, 2019).

- Células unipotentes. Aunque su naturaleza es aún poco conocida, la mayor parte de nuestros tejidos contienen una población de células indiferenciadas adultas que se encargan de la regeneración y renovación del propio tejido (Fu *et al.*, 2021). Las células madre monopotentes son tejido-específicas y constituyen residen en el propio tejido. Mediante la división asimétrica (Kolios y Moodley, 2013), pueden dar lugar a células hijas que se diferencian hacia un único tipo celular del propio tejido (por ejemplo, queratinocitos

de la mucosa oral), quedando la célula original como célula madre indiferenciada (Ono *et al.*, 2014) (Figura 2). Su utilización en ingeniería tisular oral y maxilofacial está muy extendida, pues la mayor parte de los cultivos celulares establecidos para ingeniería tisular en este campo se generan a partir de biopsias de los propios tejidos orales y maxilofaciales (Garzón *et al.*, 2009).

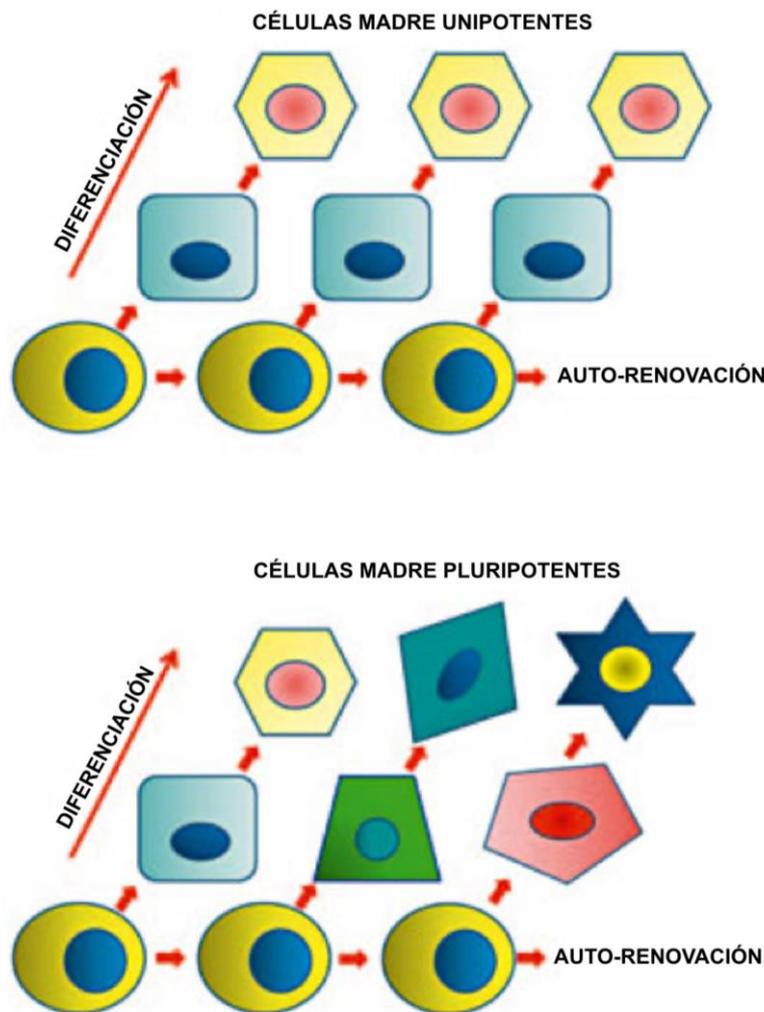


Figura 2. Representación esquemática del potencial de diferenciación de las células madre unipotentes y las células pluripotentes. Mientras las células unipotentes pueden diferenciarse a un único tipo de célula adulta, las pluripotentes pueden dar lugar a varios tipos celulares dentro de la misma estirpe y hoja embrionaria (modificado de Kolios y Moodley, 2013).

Aunque los avances técnicos han permitido establecer hasta el momento cultivos celulares de la mayor parte de las células humanas, la generación de un cultivo de células viables que permita desarrollar un tejido artificial en un tiempo determinado, es una de las mayores limitaciones de la ingeniería tisular actual (Chato-Astrain *et al.*, 2020). De hecho, la obtención de un número suficiente de células en cultivo que permita fabricar un tejido

artificial es una de las mayores dificultades a las que se enfrentan los investigadores, especialmente en aquellos casos en los que la crítica situación del paciente requiere un tratamiento lo más precozmente posible, como es el caso de los grandes quemados (Chato-Astrain *et al.*, 2020 y 2021). Aunque se están intentando desarrollar nuevos métodos de biofabricación que permitan obtener poblaciones celulares en cultivo de forma más rápida y eficaz, existen tipos celulares, tales como los queratinocitos de la piel y la mucosa oral, que aún son difíciles de cultivar en un tiempo reducido.

2. Biomateriales. Los materiales que se utilizan en contacto con un ser vivo o sistema biológico, se denominan biomateriales. En ingeniería tisular odontológica, numerosos autores han descrito previamente la utilización de biomateriales de origen natural o sintético, combinados o no con células vivas, para la regeneración tisular (Mosaddad *et al.*, 2022; Tumedei *et al.*, 2022). En general, se considera que un biomaterial ideal es aquél que cumple cuatro requisitos: ser biocompatible, biodegradable, bioactivo y susceptible de esterilización durante el proceso de biofabricación del mismo (Eldeeb *et al.*, 2022) (Figura 3).



Figura 3. Principales características que debería cumplir un biomaterial ideal (modificado de Eldeeb *et al.*, 2022).

Por un lado, los biomateriales de origen sintético, especialmente los materiales cerámicos, los vidrios y algunos metales, presentan excelentes propiedades biomecánicas en lo que se refiere a resistencia, aunque su biocompatibilidad *in vivo* viene limitada por su estructura interna y la rugosidad de su superficie (Eliades, 2007; Vallittu *et al.*, 2015). Por otro lado, los biomateriales naturales tienden a mostrar excelente biocompatibilidad *in vivo*, aunque sus propiedades biomecánicas suelen ser limitadas. Entre los biomateriales naturales más

utilizados en odontología, destacan los hidrogeles, caracterizados por su elevada concentración de agua (Scionti *et al.*, 2014). A este respecto, los hidrogeles más utilizados en ingeniería tisular odontológica son el colágeno (Binlatah *et al.*, 2022), las gelatinas (Kim *et al.*, 2022), la fibrina (Farshidfar *et al.*, 2021), la fibrina-agarosa (Fernández-Valadés-Gómez *et al.*, 2016; Garzón *et al.*, 2009; San Martín *et al.*, 2013; Viñuela-Prieto *et al.*, 2015) y otros tipos de fibras de diferente naturaleza (Petre and Leeuwenburgh, 2022).

Uno de los hidrogeles que ha mostrado resultados más prometedores hasta la fecha es la fibrina. La fibrina es un biomaterial natural que se puede obtener del fibrinógeno de la sangre de un donante, y presenta una excelente biocompatibilidad tanto *ex vivo* como *in vivo* (Noori *et al.*, 2017). La estructura química del fibrinógeno es compleja, pero, en general, se pueden distinguir dos regiones: una región E y dos regiones D localizadas a ambos lados de la región E (Figura 4). A su vez, en estas regiones existen cadenas de configuración α , cadenas β , cadenas γ y varios enlaces disulfuro que mantienen unidas las distintas cadenas (Noori *et al.*, 2017).

Tras su escisión enzimática en presencia de iones de calcio durante el proceso de coagulación, las fibras de fibrinógeno existentes en el plasma son capaces de polimerizarse para formar largas fibras de fibrina (Weisel, 2005) (Figura 5). Durante este proceso, las fibras se asocian a otras proteínas bioactivas, tales como la fibronectina, albúmina, tromboespondina, factor de von Willebrand, fibulina, factor de crecimiento fibroblástico 2, factor de crecimiento vascular endotelial e interleucina 1 (Weisel, 2005). Esta malla de fibras de fibrina asociadas a otros componentes ha demostrado tener excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad para atraer células del tejido nativo (Park y Woo, 2018). En ingeniería tisular, los biomateriales de fibrina han demostrado gran utilidad y biocompatibilidad, y han sido utilizados en ingeniería tisular del disco intervertebral (Colombini *et al.*, 2014), menisco (Pereira *et al.*, 2011), cartílago (Fu *et al.*, 2018), piel (Gómez *et al.*, 2011) y otros tejidos y órganos humanos. En el campo de la ingeniería tisular maxilofacial y dental, la fibrina se ha utilizado con éxito para reparar lesiones tanto de los tejidos blandos, como del hueso maxilofacial y otros tejidos duros en el campo de la odontología (Liu *et al.*, 2019; Ngah *et al.*, 2021; Zumarán *et al.*, 2018).

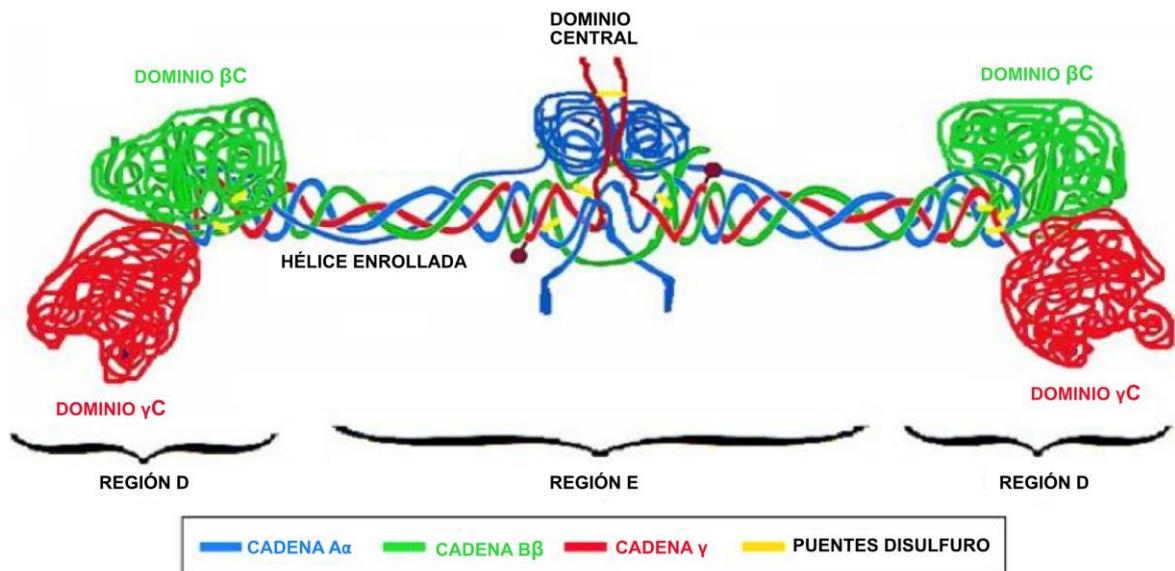


Figura 4. Estructura tridimensional de la cadena de fibrinógeno, mostrando sus regiones y su estructura química (modificado de Noori *et al.*, 2017).

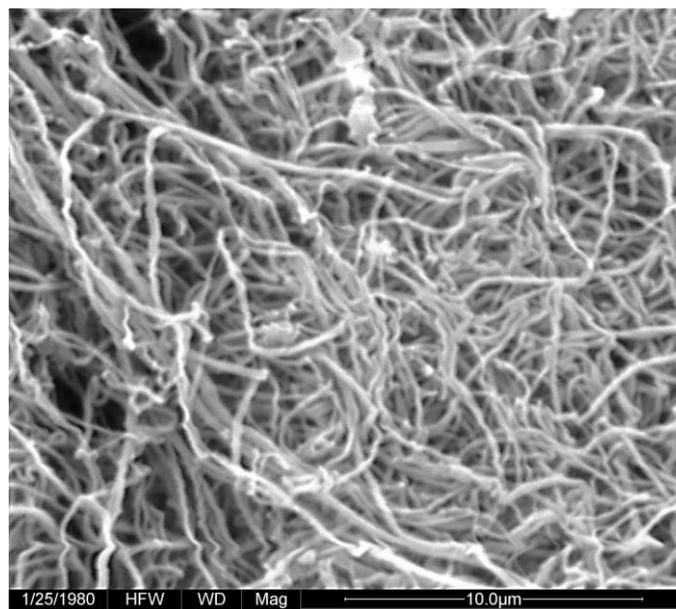


Figura 5. Imagen de microscopía electrónica de barrido de un hidrogel formado por fibras de fibrina humana.

Por otro lado, la agarosa es un polímero natural obtenido de ciertas algas marinas que se ha utilizado en investigación básica y aplicada desde hace décadas (Irastorza-Lorenzo *et al.*, 2021) (Figura 6). En ingeniería tisular, la agarosa ha demostrado ser biocompatible, altamente accesible y fácilmente manipulable para la generación de biomateriales de distinto tipo (Zarrintaj *et al.*, 2018). Los hidrogeles de agarosa son dependientes de

temperatura y su composición y estructura tridimensional muestran numerosas similitudes con la matriz extracelular del tejido nativo humano (Zarrintaj *et al.*, 2018). La utilización de hidrogeles de agarosa ha demostrado gran utilidad en ingeniería tisular del cartílago (Salati *et al.*, 2020), el hueso (Hasan *et al.*, 2019) y otras estructuras biológicas. Sin embargo, su utilización como biomaterial se ha visto limitada por la escasa capacidad de respuesta que este biomaterial es capaz de generar en las células humanas debido a la ausencia de receptores celulares para la agarosa, lo cual genera una lenta capacidad de proliferación y desarrollo cuando las células humanas son cultivadas en este material (Aufderheide y Athanasiou, 2005). De hecho, los hidrogeles de agarosa concentrada son difíciles de reabsorber y permanecen en el tejido receptor durante mucho tiempo (Figura 7).

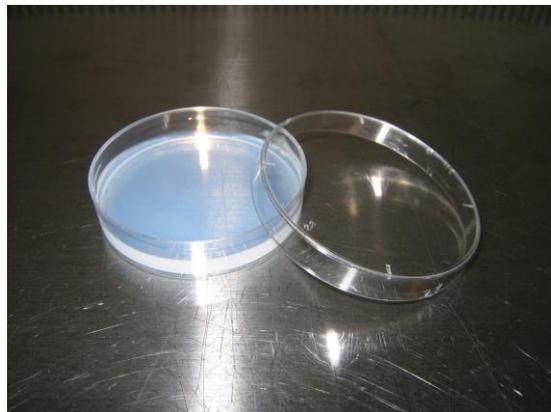


Figura 6. Aspecto macroscópico de un hidrogel de agarosa al 2% en una placa de Petri.



Figura 7. Imagen macroscópica de un hidrogel de agarosa al 3% implantado subcutáneamente en un animal de laboratorio tras 3 meses de seguimiento. Como se puede apreciar, la mayor parte del hidrogel se muestra íntegro y aún no ha sido reabsorbido (modificado de Irastorza-Lorenzo *et al.*, 2021).

Debido a sus propiedades potenciales, investigadores de la Universidad de Granada diseñaron en 2006 un nuevo biomaterial consistente en una combinación de fibrina humana y agarosa (Alaminos *et al.*, 2006) (Figura 8). Desde entonces, la fibrina-agarosa ha demostrado ser altamente biocompatible tanto *ex vivo* como *in vivo* en animales de experimentación (Campos *et al.*, 2020 y 2021; García-Martínez *et al.*, 2017; Marañés Gálvez *et al.*, 2011). La combinación de un material altamente biocompatible, como es la fibrina, con otro altamente resistente, como es la agarosa, dio como resultado un nuevo biomaterial que ofrecía propiedades incrementadas respecto a los biomateriales originales, especialmente, cuando el biomaterial de fibrina-agarosa es posteriormente sometido a técnicas de nanoestructuración (Campos *et al.*, 2020; Ionescu *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2012; Scionti *et al.*, 2014). Basada en métodos de compresión plástica, la nanoestructuración permite eliminar la mayor parte del agua del biomaterial y generar una serie de enlaces intermoleculares en la fibrina-agarosa (Figura 9).

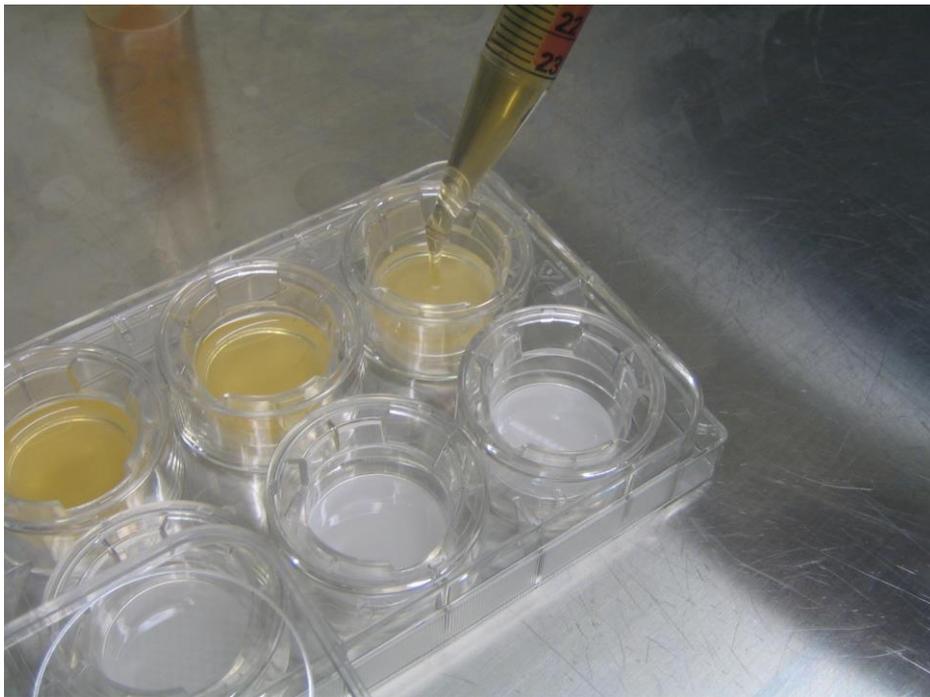


Figura 8. Generación de biomateriales de fibrina-agarosa sobre insertos de cultivo celular. El biomaterial en estado líquido ya ha sido alicuotado en los tres insertos de arriba, mientras que los tres insertos de la parte inferior aún aparecen vacíos.

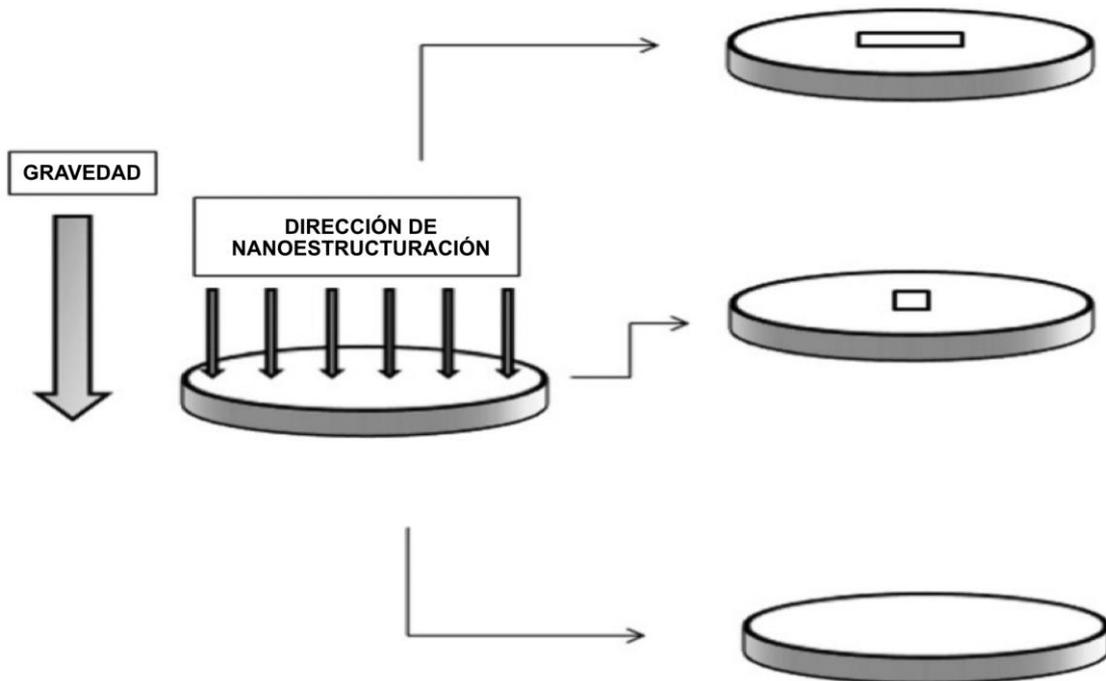


Figura 9. Representación esquemática del proceso de nanoestructuración aplicado a la biofabricación de un tejido artificial de fibrina-agarosa. El tejido artificial se representa a la izquierda con forma circular, con las fuerzas de compresión plástica (nanoestructuración) aplicadas en la misma dirección de las fuerzas gravitacionales. Una vez nanoestructurado, el tejido puede tallarse para generar tubos, formas cuadrangulares o formas redondeadas, como se muestra a la derecha de la imagen (modificado de Scionti *et al.*, 2014).

Los resultados prometedores obtenidos tras la aplicación de la fibrina-agarosa a la ingeniería tisular de los tejidos bucales y craneofaciales (Fernández-Valadés-Gómez *et al.*, 2016; Garzón *et al.*, 2009 y 2013; Viñuela-Prieto *et al.*, 2015; San Martín *et al.*, 2013) permitió la aprobación de este biomaterial por parte de la Agencia Española de Medicamentos y Terapias Avanzadas para su utilización clínica. De este modo, se pudo comprobar que el biomaterial de fibrina-agarosa es, asimismo, biocompatible cuando se utiliza clínicamente para la reparación de la córnea (Rico-Sánchez *et al.*, 2019) y de la piel (Egea-Guerrero *et al.*, 2019). A pesar de ello, aún es necesario desarrollar métodos capaces de mejorar las propiedades del biomaterial de fibrina-agarosa para lograr un producto susceptible de generar tejidos artificiales totalmente biomiméticos respecto a los tejidos nativos del área bucal y maxilofacial.

Uno de los métodos más utilizados para incrementar las propiedades de los aplicables a la ingeniería tisular es la aplicación de métodos de funcionalización durante el proceso de biofabricación del material, esto es, la modificación del mismo mediante el uso de

moléculas o sustancias bioactivas (Malcor y Mallein-Gerin, 2022). En general, la funcionalización permite modificar la estructura o las propiedades de un biomaterial determinado, para dotar a éste de propiedades incrementadas, permitiendo diseñar biomateriales más funcionales que los materiales originales. De este modo, diferentes biomateriales han sido previamente funcionalizados con moléculas procedentes de la matriz extracelular, tales como el colágeno o los glicosaminoglicanos (Stadlinger *et al.*, 2012), fibronectina (Sapudom *et al.*, 2015), laminina (Koh *et al.*, 2008), péptidos funcionales (Rosellini *et al.*, 2015) y otros tipos de moléculas. Para ello, distintos investigadores han aplicado técnicas de conjugación, encapsulación, polimerización, generación de uniones no covalentes e incluso la aplicación de técnicas de nano-inmunoterapia (Chen *et al.*, 2022; Gnanasekar *et al.*, 2022). En cuanto a la fibrina-agarosa, recientes estudios demostraron la posibilidad de funcionalizar este biomaterial con nanopartículas cargadas con antibióticos para dotar a este producto de propiedades antibacterianas que no existían en el biomaterial original (Chato-Astrain *et al.*, 2020) (Figura 10). Sin embargo, otros tipos de funcionalización apenas han sido aplicados a los biomateriales de fibrina-agarosa.

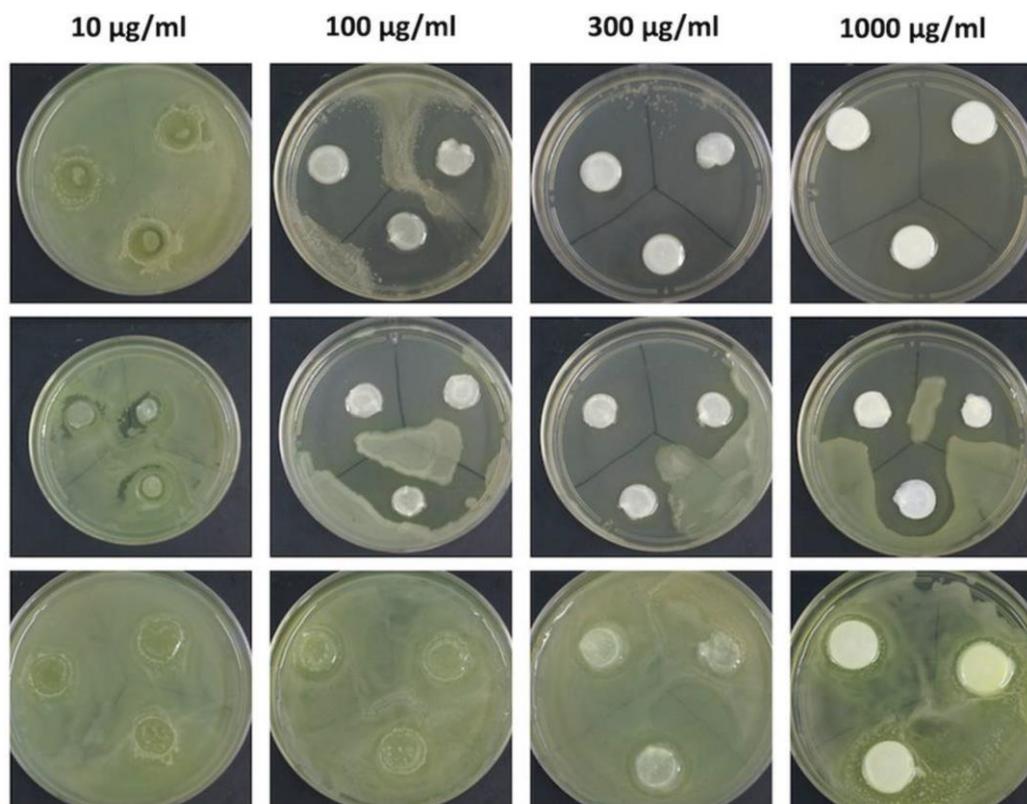


Figura 10. Tejidos artificiales de fibrina-agarosa funcionalizados con nanopartículas de antibióticos. Los tejidos artificiales aparecen como estructuras redondeadas de color amarillento o blanquecino depositadas sobre placas de Petri sembradas con *Pseudomonas aeruginosa* (modificado de Chato-Astrain *et al.*, 2020).

3. Factores de crecimiento. Uno de los componentes fundamentales de la ingeniería tisular son los factores de crecimiento y diferenciación (Langer y Vacanti, 1993 y 2016). En general, estos factores son añadidos a los medios de cultivo o al propio biomaterial para incrementar la viabilidad del tejido artificial, inducir la síntesis de material extracelular o aumentar la funcionalidad del mismo (Bakhshandeh *et al.*, 2018). Aunque los requerimientos específicos de cada tipo de tejido sean probablemente distintos y aún no se conocen de todo, los factores de crecimiento actúan como moléculas de señalización multifuncional capaces de coordinar procesos complejos de crecimiento, proliferación, maduración o biointegración del tejido artificial (Guan *et al.*, 2020).

En ingeniería tisular de la mucosa oral y tejidos maxilofaciales, la mayoría de los tejidos artificiales requieren la utilización de factores capaces de incrementar la supervivencia y la proliferación celular actuando a nivel de membrana o de receptores intranucleares relacionados con la captación y el metabolismo de nutrientes, la síntesis de ADN y otros procesos vitales, tales como la insulina, la adenina, la hidrocortisona o la tiroxina (Alaminos *et al.*, 2006; Garzón *et al.*, 20019 y 2013; Llamas *et al.*, 2006).

Asimismo, es muy común utilizar factor de crecimiento epidérmico (EGF) para facilitar la proliferación de los queratinocitos de la piel y la mucosa oral (Alaminos *et al.*, 2006; Garzón *et al.*, 20019 y 2013; Llamas *et al.*, 2006). De hecho, el EGF ha demostrado ser un regulador esencial de múltiples funciones celulares del queratinocito, tales como la progresión del ciclo celular, diferenciación, migración y supervivencia (Hashimoto, 2000), para lo cual, se une a un receptor dimérico de membrana plasmática (Figura 11). La limitada vida media de este factor en cultivo ha llevado a varios investigadores a utilizar el EGF encapsulado en nanopartículas de liberación lenta, obteniéndose resultados prometedores en términos de crecimiento celular incrementada y reducción del tiempo requerido para establecer cultivos primarios de queratinocitos para uso en ingeniería tisular (Chato-Astrain *et al.*, 2021; Gainza *et al.*, 2014).

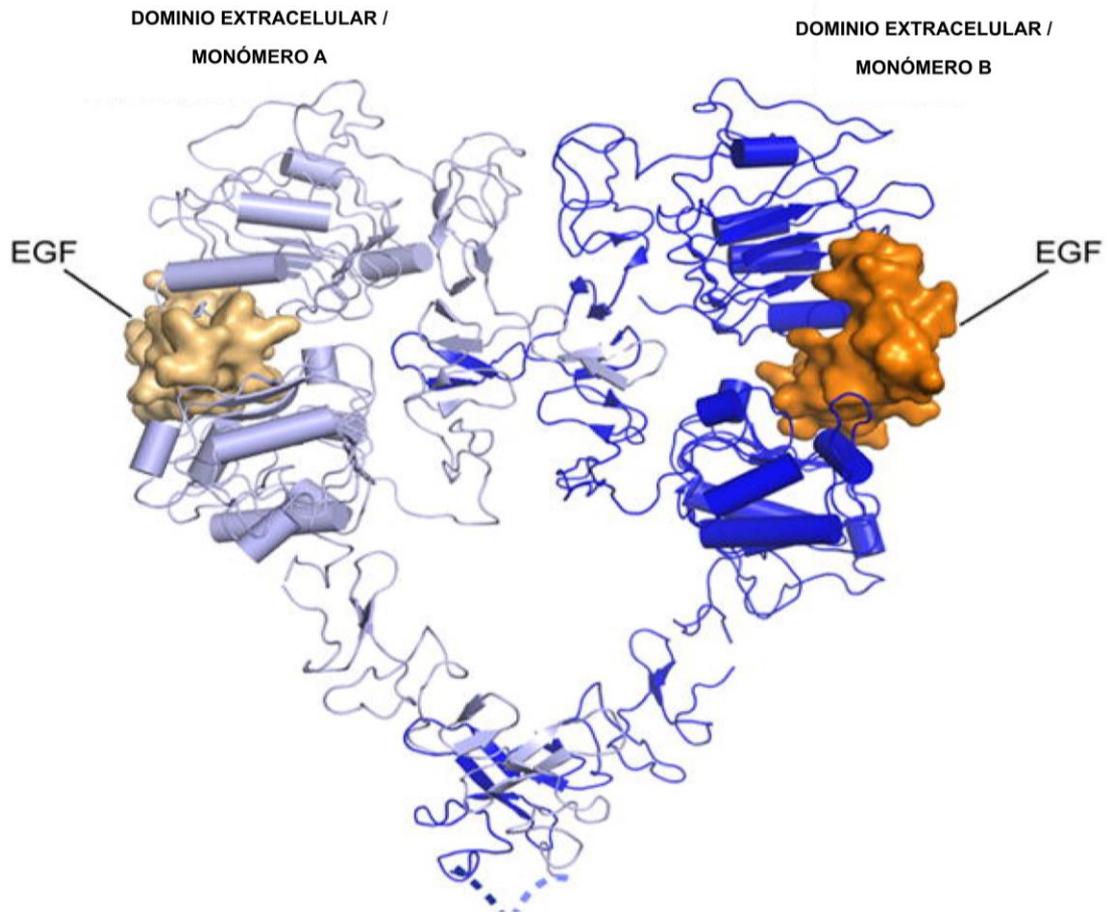


Figura 11. Estructura tridimensional de la molécula de EGF unida a su receptor de membrana. Como se puede observar, el receptor es una estructura dimérica formada por un monómero A y un monómero B, y ambos tienen afinidad de unión a EGF.

IV HIPÓTESIS

La reciente optimización de métodos y técnicas de biofabricación en ingeniería tisular ha posibilitado la generación de biomateriales funcionalizados con propiedades mejoradas respecto al biomaterial original.

Nuestra hipótesis de trabajo es que la utilización de bioexplantes tisulares durante el proceso de gelificación podría contribuir a la funcionalización de los biomateriales de fibrina-agarosa utilizados en ingeniería tisular bucodental. La aplicación de bioexplantes de tejido oral podría optimizar el proceso de generación de cultivos celulares de forma más eficaz y podría, a su vez, contribuir a fabricar tejidos bioartificiales cuya matriz extracelular reproduzca más fielmente la estructura de la matriz nativa.

De este modo, los tejidos funcionalizados podrían resultar más biomiméticos respecto a los tejidos bucodentales nativos a nivel estructural y en cuando a su composición molecular y bioquímica, lo cual podría asociarse a mejores resultados clínicos una vez implantados en el paciente.

V OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es desarrollar y evaluar un nuevo método de biofabricación basado en bioexplantes tisulares para generar nuevos tejidos artificiales funcionalizados de mucosa oral humana de posible utilidad en ingeniería tisular bucodental.

Los objetivos específicos son los siguientes:

1. Funcionalizar biomateriales de fibrina-agarosa mediante la utilización de técnicas de biofabricación basadas en bioexplantes tisulares.
2. Evaluar histológicamente los nuevos tejidos funcionalizados de fibrina-agarosa para determinar la utilidad de los nuevos métodos de funcionalización para inducir la proliferación celular en el interior del biomaterial a distintos tiempos.
3. Evaluar los nuevos tejidos funcionalizados de fibrina-agarosa para determinar la síntesis de componentes fibrilares de la matriz extracelular de la mucosa oral humana (colágeno maduro y colágeno tipo I) en el interior del biomaterial a distintos tiempos.
4. Evaluar los nuevos tejidos funcionalizados de fibrina-agarosa para determinar la síntesis de componentes no fibrilares de la matriz extracelular de la mucosa oral humana (proteoglicanos y glicoproteínas) en el interior del biomaterial a distintos tiempos.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

1. Generación de sustitutos acelulares de fibrina-agarosa no funcionalizados

Para la generación de biomateriales acelulares y no funcionalizados, se utilizaron materiales de fibrina-agarosa previamente desarrollados en el Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada. Estos biomateriales se generan a partir de plasma humano normal procedente de donantes sanos de sangre, y de agarosa, obtenida comercialmente.

Para generar 20 ml del biomaterial de fibrina agarosa, se mezclaron 15,2 ml de plasma humano y 1,5 ml de medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Para prevenir la fibrinólisis, proceso que degrada la malla de fibrina mediante la acción de la plasmina, se añadieron 300 µl de ácido tranexámico (Amchafibrin, Fides Ecopharma, Valencia), un antifibrinolítico de uso clínico. Tras ello, se a la mezcla se añadió 1 ml de una solución de agarosa tipo VII diluida en tampón fosfato (PBS) a una concentración del 2% (Merck/Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) calentada hasta alcanzar el estado líquido. La concentración final de agarosa fue del 0,1%. Finalmente, y de forma rápida, se procedió a añadir 2 ml de una solución de CaCl₂ al 1% a la mezcla para inducir la reacción de coagulación del plasma y producir un material gelificado. Esta reacción, que es dependiente de calcio, está mediada por diferentes factores existentes en el plasma, como la trombina, y ocurre mediante la ruptura de residuos de la cadena de fibrinógeno para generar monómeros de fibrina capaces de asociarse entre sí para formar cadenas no solubles de fibrina.

Una vez realizada la mezcla, ésta se alicuotó rápidamente en placas de cultivo de 6 pocillos, las cuales se mantuvieron en un incubador celular a 37°C con un 5% de CO₂ para favorecer el proceso de gelificación.

2. Generación de tejidos artificiales de fibrina-agarosa celulares no funcionalizados

Para desarrollar los sustitutos tisulares no funcionalizados que contenían células estromales, en primer lugar, se procedió a obtener cultivos celulares primarios de fibroblastos humanos a partir de pequeñas muestras de biopsia de mucosa oral humana cuyo tamaño medio fue de 3 x 3 x 3 mm. Dichas biopsias se obtuvieron de donantes sanos sometidos a cirugía oral menor con anestesia local en una consulta de odontología. Estas biopsias se utilizaron tanto para generar cultivos primarios, como para la funcionalización tisular, que se describirá en el siguiente apartado de esta memoria.

Inmediatamente después de extraer el tejido, las biopsias se lavaron con PBS y se enviaron al laboratorio en medio de cultivo DMEM suplementado con 100 U/mL de penicilina G, 100 g/mL de estreptomina y 0.25 g/mL de anfotericina B (Merck/Sigma-Aldrich). A su llegada

al laboratorio de histología del Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada, las biopsias se lavaron con PBS y se sometieron a digestión enzimática en una solución de 2 mg/ml de colagenasa tipo I de *Clostridium histolyticum* (Gibco BRL, Waltham, MA, EEUU) durante 6-8 h a 37°C para degradar la matriz extracelular del estroma del tejido. Una vez completado el proceso de digestión, se llevó a cabo la recuperación de las células liberadas de la lámina propia mediante centrifugación. Las células así recogidas se lavaron en PBS y se cultivaron utilizando medio de cultivo DMEM enriquecido con un 1% de antibióticos y un 10% de suero bovino fetal (Merck/Sigma-Aldrich). Estos cultivos celulares se mantuvieron en un incubador celular, procediéndose a la renovación del medio de cultivo cada 3 días, y a su tripsinización, cuando las células alcanzaron el estado de subconfluencia, utilizando protocolos estándar de cultivo celular.

Para la fabricación de los tejidos artificiales celulares de fibrina-agarosa no funcionalizados, se procedió tal como se detalla en el apartado anterior para los biomateriales acelulares. Sin embargo, el medio de cultivo DMEM utilizado en el primer paso del protocolo fue sustituido en este caso por la misma cantidad de medio DMEM en el que previamente se habían resuspendido los fibroblastos humanos procedentes del cultivo primario previamente establecido a partir de biopsias de mucosa oral humana. La densidad celular se calculó para obtener 10.000 fibroblastos por ml de biomaterial al final del proceso.

Toda la mezcla, que en este caso contenía células, se alicuotó, igual que se hizo para el material acelular, en placas de cultivo de 6 pocillos, las cuales se mantuvieron en un incubador celular a 37°C con un 5% de CO₂ para favorecer el proceso de gelificación. Una vez gelificado el material, aproximadamente 6-12 h más tarde, los tejidos artificiales se cubrieron con medio de cultivo DMEM con un 1% de antibióticos y un 10% de suero bovino fetal, el cual se renovó cada 3 días.

3. Generación de tejidos artificiales de fibrina-agarosa funcionalizados mediante bioexplantes tisulares

Para la fabricación de los sustitutos tisulares funcionalizados, se combinó el biomaterial de fibrina-agarosa descrito más arriba, con las biopsias de mucosa oral obtenidas de donantes sanos.

En este caso, las biopsias de mucosa oral se lavaron en PBS y se fragmentaron en pequeños explantes de un tamaño aproximado de 0,5 × 0,5 × 0,5 mm utilizando un bisturí estéril. Estos fragmentos se resuspendieron en 1,5 ml de medio DMEM, que se mezclaron con 15,2 ml de plasma humano, 300 µl de ácido tranexámico, 1 ml de una solución de

agarosa tipo VII diluida en PBS a una concentración del 2% y 2 ml de una solución de CaCl_2 al 1%, tal como se describió para los biomateriales no funcionalizados.

Tal como se hizo para los tejidos no funcionalizados, esta mezcla fue rápidamente alicuotada en placas de 6 pocillos y se dejó gelificar en un incubador celular a 37°C con un 5% de CO_2 , renovándose el medio de cultivo cada 3 días.

El desarrollo experimental de este trabajo fue aprobado por el Comité Coordinador de ética de la Investigación Biomédica de Andalucía (ref. 0116-N-19), y todos los pacientes que participaron en el estudio dieron su consentimiento por escrito para la donación de tejidos.

4. Análisis histológicos

Todos los tejidos utilizados en la presente Tesis Doctoral (mucosa oral humana nativa utilizada como control normal, tejidos artificiales de fibrina-agarosa acelular no funcionalizados, tejidos artificiales de fibrina-agarosa no funcionalizados con fibroblastos cultivados en su interior y tejidos artificiales de fibrina-agarosa funcionalizados mediante bioexplantos tisulares) fueron sometidos a análisis histológicos. Para ello, las muestras se fijaron en formaldehído al 4% tamponado durante 24h. Posteriormente, se deshidrataron en etanol de concentración creciente, se aclararon en xileno y se incluyeron en parafina líquida, siguiendo protocolos estándar de análisis histológico. Todos estos productos se adquirieron de la casa comercial PanReac Química S.L.U. (Barcelona).

Para el estudio histológico, en primer lugar, se obtuvieron secciones de 4µm de espesor de los tejidos incluidos en parafina, las cuales se montaron en portaobjetos de vidrio y se desparafinaron utilizando xileno. Tras ello, se eliminó el xileno utilizando alcoholes de concentración decreciente, hasta incubarlos en agua destilada para su rehidratación. Tras ello, se incubaron en hematoxilina, se viraron en agua y se tiñeron con eosina alcohólica (PanReac Química S.L.U.). Tras ello, se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente y se montaron con cubreobjetos utilizando bálsamo de montaje histológico. Para su análisis, se utilizó un microscopio óptico Nikon RS-Di2 (Nikon corp., Tokio, Japón) dotado del programa de captura de imágenes NIS-Elements BR 4.50.00 64-bit.

5. Análisis histoquímicos de los tejidos nativos y los tejidos artificiales

Los principales componentes de la matriz extracelular de las muestras de tejido nativo y tejido artificial utilizadas en la presente Tesis Doctoral fueron analizados mediante técnicas histoquímicas.

En primer lugar, se obtuvieron secciones de los diferentes tejidos incluidos en parafina, los cuales se desparafinaron y se rehidrataron tal como se detalló en el apartado anterior. Posteriormente, se realizaron los métodos histoquímicos rojo picrosirius (para la identificación de fibras de colágeno maduras), azul alcian (para la identificación de proteoglicanos) y ácido periódico-Schiff -PAS- (para la identificación de glicoproteínas), tal como se describió previamente (Oliveira *et al.*, 2013; Alfonso-Rodríguez *et al.*, 2014).

- Para la identificación de fibras de colágeno maduras mediante rojo picrosirius, las muestras se tiñeron con una solución de trabajo de rojo sirius F3B durante 30 minutos y se contratiñeron suavemente con hematoxilina de Harris durante 5 minutos, deshidratándose y montándose con cubreobjetos a continuación.

- Para la identificación de proteoglicanos mediante la técnica de azul alcian, las muestras se tiñeron en solución de reactivo azul alcian durante 30 minutos, utilizándose posteriormente contratiñición breve con hematoxilina para marcar los núcleos celulares. Tras ello, las muestras se deshidrataron en alcoholes y se montaron con cubreobjetos.

- Para marcar las glicoproteínas mediante el método PAS, las secciones de tejido se incubaron en una solución de ácido periódico al 0,5% durante 5 min como oxidante, seguido de incubación en reactivo de Schiff durante 15 min y contratiñición con hematoxilina de Harris durante 1 min.

Todos los reactivos utilizados en las histoquímicas fueron adquiridos a la empresa PanReac Química S.L.U. Para cada tinción histoquímica, se utilizaron tejidos humanos normales considerados controles técnicos.

6. Análisis inmunohistoquímicos de los tejidos nativos y los tejidos artificiales

Por un lado, la identificación de las fibras de colágeno tipo I en los diferentes tipos de tejido, se realizó mediante tinción inmunohistoquímica para colágeno tipo I. Por otro lado, las células de estirpe fibroblástica de cada tipo de tejido se identificaron mediante inmunohistoquímica para el marcador estromal vimentina.

En ambos casos, se comenzó desparafinando y rehidratando las secciones de tejido incluido en parafina. Posteriormente, se procedió a la recuperación antigénica mediante incubación en tampón citrato a 98°C durante 25 min. Una vez frías, las muestras se lavaron en PBS y se incubaron en H₂O₂ al 3% durante 10 min para extinguir la actividad de la peroxidasa endógena. Tras ello, se bloqueó la señal inespecífica con una solución de suero de caballo normal durante 15 min. Todos estos productos se adquirieron

a la empresa Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU. Las secciones se incubaron a continuación en una dilución 1:200 de cada anticuerpo primario en suero de caballo. En concreto, se utilizaron anticuerpos anti-colágeno tipo I de la casa comercial Acris/OriGene Technologies GmbH (Herford, Alemania) y anticuerpos anti-vimentina de la casa comercial Merck/Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). Tras incubar durante al menos 2 horas y lavar con PBS, las muestras se incubaron en una solución universal de anticuerpos secundarios tipo IgG anti-ratón/conejo (ImmPRESS™ HRP Reagent Kit (Vector laboratories, Burlingame, CA, EEUU). Posteriormente, se reveló la reacción de peroxidasa utilizando un kit de sustrato de peroxidasa DAB SK-4011 (Vector Laboratories). La reacción se interrumpió con agua corriente una vez detectada la reacción. Finalmente, las secciones de tejido se contratiñeron brevemente con hematoxilina de Harris (PanReac Química S.L.U.) durante 15 segundos y se montaron con cubreobjetos. Como controles técnicos, se utilizaron tejidos humanos nativos control.

7. Análisis cuantitativos

Para todos los estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos, se realizaron análisis cuantitativos para determinar intensidad de señal o número de células positivas.

En el caso de los componentes de la matriz extracelular (rojo picosirius, inmunohistoquímica para colágeno tipo I, azul alcian y PAS), las imágenes obtenidas mediante un microscopio óptico Nikon RS-Di2 (Nikon corp.) fueron analizadas para determinar intensidad de señal para cada una de las técnicas. Para ello, se utilizó el programa ImageJ 1.51n, como se describió previamente (Oliveira *et al.*, 2013). En cada imagen correspondiente a cada muestra, se seleccionaron 10 puntos al azar, y se pidió al programa calcular automáticamente la intensidad de señal, la cual fue restada de la intensidad obtenida sobre un fondo blanco. Estos análisis se realizaron sobre 10 muestras independientes (n=10).

Para las muestras sometidas a inmunohistoquímica para vimentina, las imágenes se dividieron cuadrantes de 1 mm² utilizando el programa ImageJ 1.51n. Tras ello, se procedió al conteo manual del número de células marcadas por vimentina en cada cuadrante. Estos análisis se realizaron sobre 10 muestras independientes (n=10).

8. Análisis estadísticos

Para el análisis descriptivo de cada variable del estudio, se calcularon valores medios y desviaciones estándar para cada uno de los siguientes grupos de estudio:

- Mucosa oral humana nativa utilizada como control normal.
- Tejidos artificiales de fibrina-agarosa acelular no funcionalizados.
- Tejidos artificiales de fibrina-agarosa no funcionalizados con fibroblastos cultivados en su interior.
- Tejidos artificiales de fibrina-agarosa funcionalizados mediante bioexplantes tisulares.

En el caso de los tejidos artificiales de fibrina-agarosa no funcionalizados y funcionalizados, se calcularon valores correspondientes al biomaterial acelular mantenido en cultivo durante 7 días, el material mantenido en cultivo durante 14 días y el material mantenido en cultivo durante 21 días, así como al promedio de los tres valores (media de los tres tiempos del estudio).

Para determinar la biomimeticidad de cada tejido artificial respecto a la mucosa oral humana normal, todos los valores se normalizaron respecto a los niveles encontrados en la mucosa oral humana nativa utilizada como control, considerando que dichos valores correspondían al 100% para cada componente histoquímico o inmunohistoquímico analizado en la presente Tesis Doctoral.

Para el análisis inferencial, se evaluó la diferencia estadística existente entre dos grupos de muestras utilizando la prueba ANOVA con análisis *post-hoc* de Tukey. Para los análisis de correlación temporal, se utilizó la prueba tau de Kendall. Puesto que en este estudio se realizaron más de 400 análisis estadísticos, se determinó un valor p de significación estadística ajustado por Bonferroni de 0,0001 para considerar que las diferencias entre dos grupos eran estadísticamente significativas. Los valores de p comprendidos entre 0,05 y 0,0001 se consideraron como marginalmente significativos, mientras que los valores situados por encima de 0,05 fueron no significativos. Todos los análisis inferenciales se realizaron utilizando el programa SPSS versión 15.0.

VII RESULTADOS

1. Obtención de los tejidos artificiales no funcionalizados y de los nuevos sustitutos tisulares funcionalizados mediante técnicas de bioexplante tisular

La aplicación de los nuevos protocolos de biofabricación descritos en esta memoria de Tesis Doctoral mostró la utilidad de los métodos de bioexplante tisular para generar tejidos artificiales mediante ingeniería tisular.

En primer lugar, el análisis macroscópico de los biomateriales acelulares de fibrina-agarosa mostró un material homogéneo, con una superficie aplanada. en segundo lugar,

En concreto, el análisis macroscópico de los tejidos funcionalizados mostró la presencia de los bioexplantes tisulares en el interior del biomaterial de fibrina-agarosa, existiendo aparentemente una correcta integración de dichos bioexplantes con el material. Frente a los biomateriales de fibrina-agarosa no funcionalizados, cuya estructura era homogénea, los tejidos sometidos a funcionalización presentaban una estructura heterogénea y mixta, con zonas de fibrina-agarosa y zonas en las que se podían apreciar los bioexplantes cultivados en su interior (Figura 12). No se apreciaron diferencias macroscópicas detectables a lo largo de las 3 semanas en las que se mantuvieron los tejidos artificiales en cultivo.



Figura 12. Imagen macroscópica de los distintos geles de fibrina-agarosa fabricados en esta Tesis Doctoral. A: Biomaterial de fibrina-agarosa acelular no funcionalizado; B: Biomaterial de fibrina-agarosa no funcionalizado con fibroblastos cultivados en su interior; C: Biomaterial de fibrina-agarosa funcionalizado mediante bioexplantes tisulares. En el material funcionalizado, los bioexplantes son visibles en el interior del biomaterial de fibrina-agarosa, mientras que el material no funcionalizado aparece más homogéneo.

2. Análisis histológico de los tejidos artificiales no funcionalizados y de los nuevos sustitutos tisulares funcionalizados mediante técnicas de bioexplante tisular

El análisis histológico de los nuevos sustitutos tisulares, junto con los biomateriales celulares y acelulares de fibrina-agarosa y los controles utilizados en la presente Tesis Doctoral utilizando la tinción de hematoxilina y eosina reveló numerosas diferencias entre las diferentes muestras analizadas (Figura 13).

En primer lugar, el análisis de los controles de mucosa oral humana nativa normal mostraron la típica estructura histológica de la mucosa oral, con un epitelio estratificado en la parte superior y una lámina propia o corion en la parte inferior. El epitelio mostró claros signos de diferenciación celular, con estratos basal, espinoso, granuloso y córneo, con signos de descamación celular en las capas más apicales. Asimismo, la unión del epitelio con el estroma mostró abundantes crestas y papilas típicas de esta unión entre el tejido epitelial y el conectivo. A continuación, el estroma de la mucosa oral mostró abundantes fibroblastos de morfología elongada, fusiforme o estrellada, que se localizaban en una matriz extracelular con abundantes fibras y vasos sanguíneos, compatible con una lámina propia normal.

En segundo lugar, el análisis de los diferentes tipos de tejido artificial generados en la presente Tesis Doctoral mostró importantes diferencias entre los tejidos artificiales. Por un lado, los biomateriales acelulares de fibrina-agarosa no funcionalizada mostraron una estructura regular y uniforme en la que podían apreciarse las fibras del biomaterial teñidas de forma muy tenue con el colorante. No se observaron diferencias apreciables entre los tres tiempos de cultivo analizados.

Por otro lado, el análisis de los tejidos artificiales de fibrina-agarosa con células de la mucosa oral cultivadas en su interior mostró asimismo una estructura fibrilar bastante regular y uniforme, en la que las células aparecían dispersas por todo el biomaterial. Estas células mostraban la típica morfología elongada o fusiforme de las células estromales mantenidas en cultivo, sin que se apreciara ninguna alteración morfológica detectable. Al igual que en el caso anterior, no se apreciaron diferencias notables entre los tres días de cultivo analizados.

A continuación, el análisis histológico de los tejidos de fibrina-agarosa funcionalizados con bioexplantes de tejido humano mostró la presencia de los bioexplantes tisulares en el interior del biomaterial de fibrina-agarosa. Durante los primeros días, los bioexplantes mostraron la estructura típica de la mucosa oral humana, con un epitelio estratificado que descansa sobre un estroma correspondiente a la lámina propia de aspecto normal. Sin embargo, a partir del día 14, se comenzó a observar la migración de las células estromales

hacia el interior del biomaterial de fibrina-agarosa, con abundantes células que partían del bioexplante y crecían hacia el mencionado biomaterial. Estas células presentaban la típica morfología fibroblástica y no presentaban alteraciones detectables mediante el análisis histológico. Cuando se observó el tejido funcionalizado a los 21 días, se pudo comprobar cómo había aumentado la población de células estromales que había migrado hacia el biomaterial, existiendo abundantes fibroblastos fuera del bioexplante, con signos de proliferación y migración en el seno de la fibrina-agarosa.

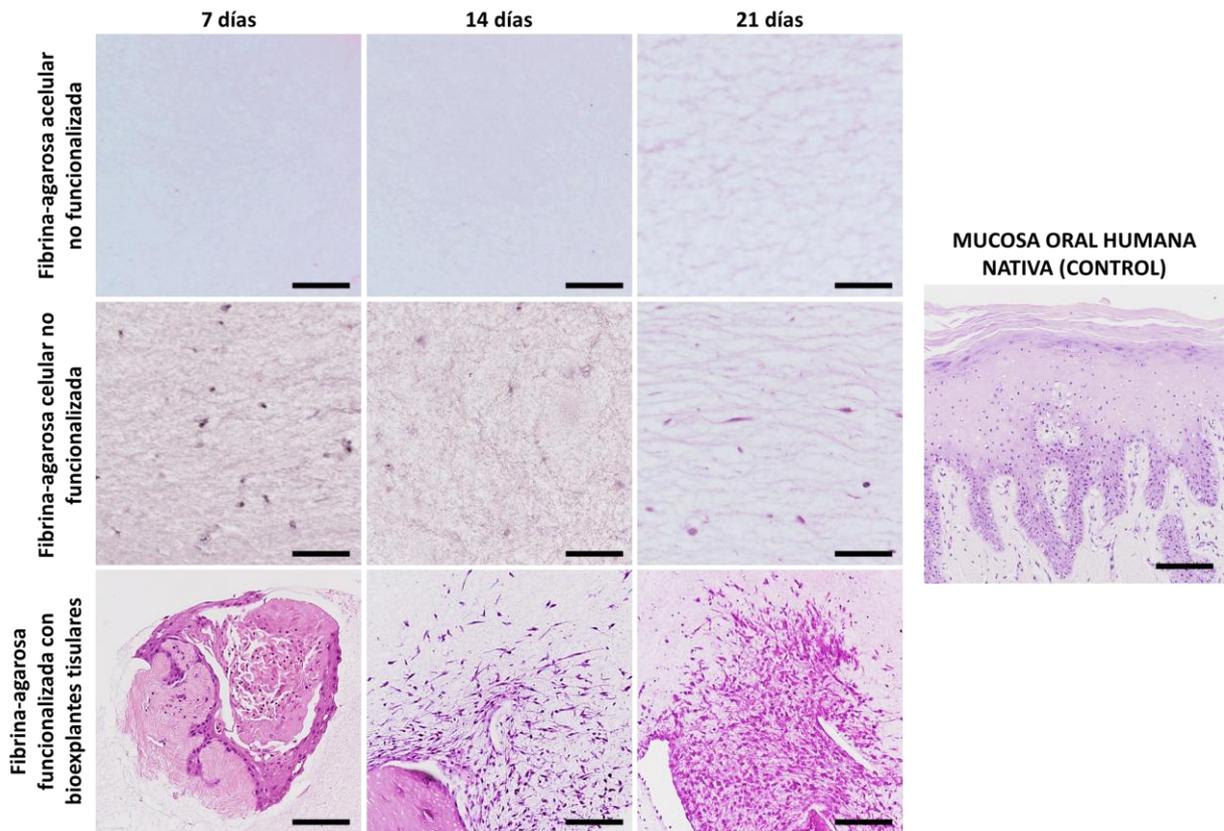


Figura 13. Análisis histológico de los distintos tejidos artificiales de fibrina-agarosa fabricados en esta Tesis Doctoral y los controles de mucosa oral utilizando la tinción de hematoxilina y eosina. Para cada tejido artificial, se muestran imágenes correspondientes a los 7, 14 y 21 días de cultivo *ex vivo*. Escala: 100µm.

3. Análisis de proliferación celular en los tejidos artificiales no funcionalizados y los sustitutos tisulares funcionalizados mediante técnicas de bioexplanje tisular

Para determinar la capacidad de proliferación en cada tipo de tejido artificial, se procedió a contar el número de células existente por unidad de área en cada tipo de tejido. Al tratarse de células de tipo fibroblástico, las células se marcaron inmunohistoquímicamente para el marcador vimentina (Figura 14).

Como era de esperar en un material carente de células, los biomateriales acelulares de fibrina-agarosa no mostraron ninguna célula en su interior. Sin embargo, la fibrina-agarosa con fibroblastos en su interior mostró una población celular fibroblástica que se mantuvo estable durante el tiempo. Como se muestra en la Tabla 1, todos los tejidos artificiales de fibrina-agarosa celular mantuvieron una población celular constante en torno a $291,7 \pm 124$ células por mm^2 , con pocas variaciones en los diferentes tiempos de cultivo.

Cuando se analizaron los tejidos funcionalizados con bioexplantos tisulares, comprobamos que la población celular fibroblástica vimentín-positiva tendía a aumentar con el tiempo de cultivo, existiendo una correlación positiva entre el número de células y el tiempo ($r=0,4961$ y $p<0,0001$). Mientras a día 7, aún no se pudo apreciar crecimiento celular en el interior del biomaterial, encontramos un aumento progresivo del número celular a día 14 y a día 21, con un promedio de $3166,7 \pm 2420,5$ células por mm^2 , en el total de los tres tiempos de estudio evaluados (Tabla 1). Este número promedio resultó estadísticamente similar ($p>0,05$) al encontrado en la mucosa oral nativa, la cual presentaba $3142,6 \pm 174,9$ células fibroblásticas por mm^2 , y significativamente superior al encontrado en el biomaterial celular no funcionalizado ($p<0,0001$).

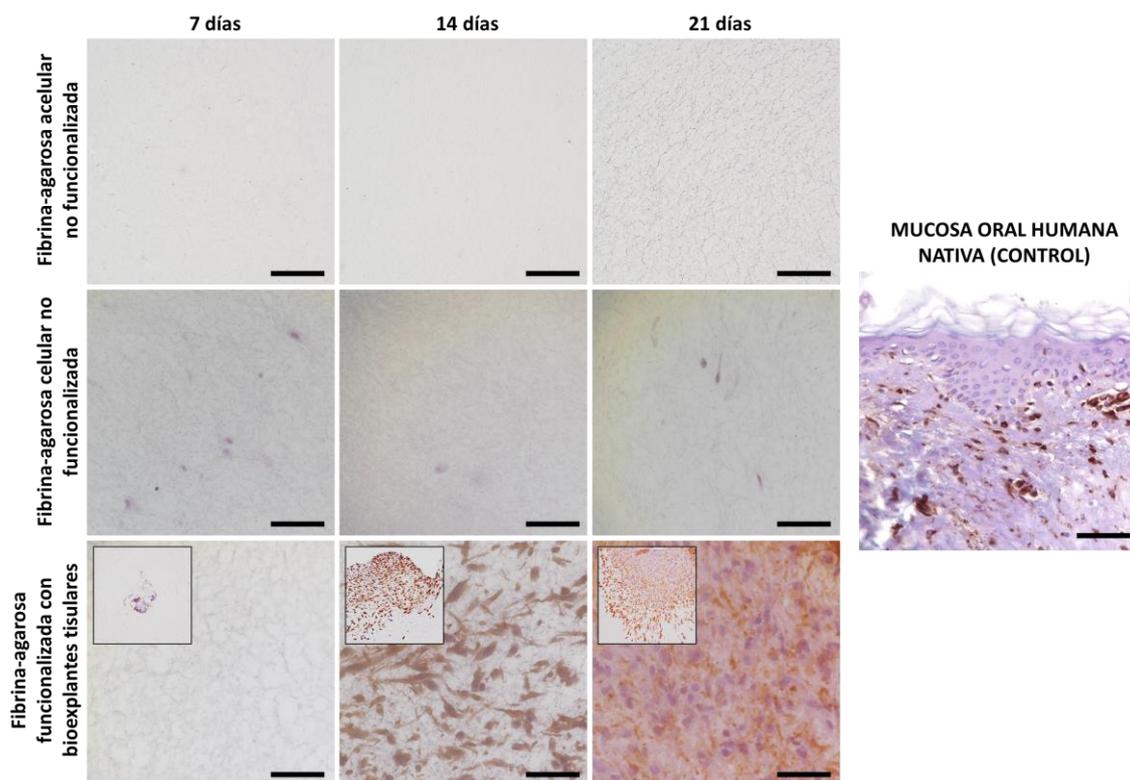


Figura 14. Análisis de proliferación celular utilizando el marcador fibroblástico vimentina en los distintos tejidos artificiales de fibrina-agarosa fabricados en esta Tesis Doctoral y los controles de mucosa oral. Para cada tejido artificial, se muestran imágenes correspondientes a los 7, 14 y 21 días de cultivo *ex vivo*. Escala: 100 μ m.

RECUESTO CELULAR	Tiempo en cultivo	Número de células por mm ² de área
Biomaterial de fibrina-agarosa acelular no funcionalizado	7 días	0 \pm 0
	14 días	0 \pm 0
	21 días	0 \pm 0
	Promedio	0 \pm 0
Biomaterial de fibrina-agarosa con fibroblastos en su interior no funcionalizado	7 días	325 \pm 125,8
	14 días	250 \pm 173,2
	21 días	300 \pm 81,6
	Promedio	291,7 \pm 124
Biomaterial de fibrina-agarosa funcionalizado mediante bioexplantes tisulares	7 días	0 \pm 0
	14 días	4125 \pm 457,3
	21 días	5375 \pm 419,3
	Promedio	3166,7 \pm 2420,5
Mucosa oral humana nativa control	-	3142,6 \pm 174,9

Tabla 1. Recuento celular en los distintos tipos de muestras analizados en la presente Tesis Doctoral. Los valores corresponden al número de células por unidad de área (1 mm²) expresados como media \pm desviación estándar.

4. Análisis de fibras de colágeno maduro de la matriz extracelular en los tejidos artificiales no funcionalizados y los sustitutos tisulares funcionalizados mediante técnicas de bioexplante tisular

Para identificar fibras de colágeno maduro, los diferentes tejidos fueron sometidos a la técnica histoquímica de rojo picrosirius (Figura 15). Como era de esperar, se encontró que los controles de mucosa oral humana nativa normal presentaron una intensa tinción de este colorante a nivel de la lámina propia, reflejando la presencia de abundantes fibras de colágeno.

El análisis de las muestras de tejido artificial reveló importantes diferencias entre los diferentes tipos de tejido artificial. Por un lado, las muestras acelulares mostraron muy escasa intensidad de tinción, con un promedio del $12,11 \pm 6,04\%$ del control. Por otro lado, las muestras de fibrina-agarosa con fibroblastos en su interior no sometidas a funcionalización, mostraron niveles algo mayores de intensidad de rojo picrosirius, con un promedio del $19,66 \pm 11,06\%$ del control. Sin embargo, las diferencias entre las muestras celulares y las acelulares, así como las diferencias entre los diferentes tiempos de cultivo de ambos tipos de muestras, resultaron estadísticamente no significativas (Tabla 2). En último lugar, la evaluación de las muestras funcionalizadas mostró un aumento progresivo de la cantidad de fibras de colágeno presentes en el tejido artificial, siendo significativamente mayor dicha cantidad en las muestras de 21 días respecto a las de 7 y 14 días, con diferencias marginalmente significativas entre los días 7 y 14. A este respecto, es importante destacar que los tejidos funcionalizados correspondientes a 21 días de cultivo resultaron estadísticamente similares a los controles de mucosa oral nativa, mostrando niveles de tinción superiores al 85% de dichos controles.

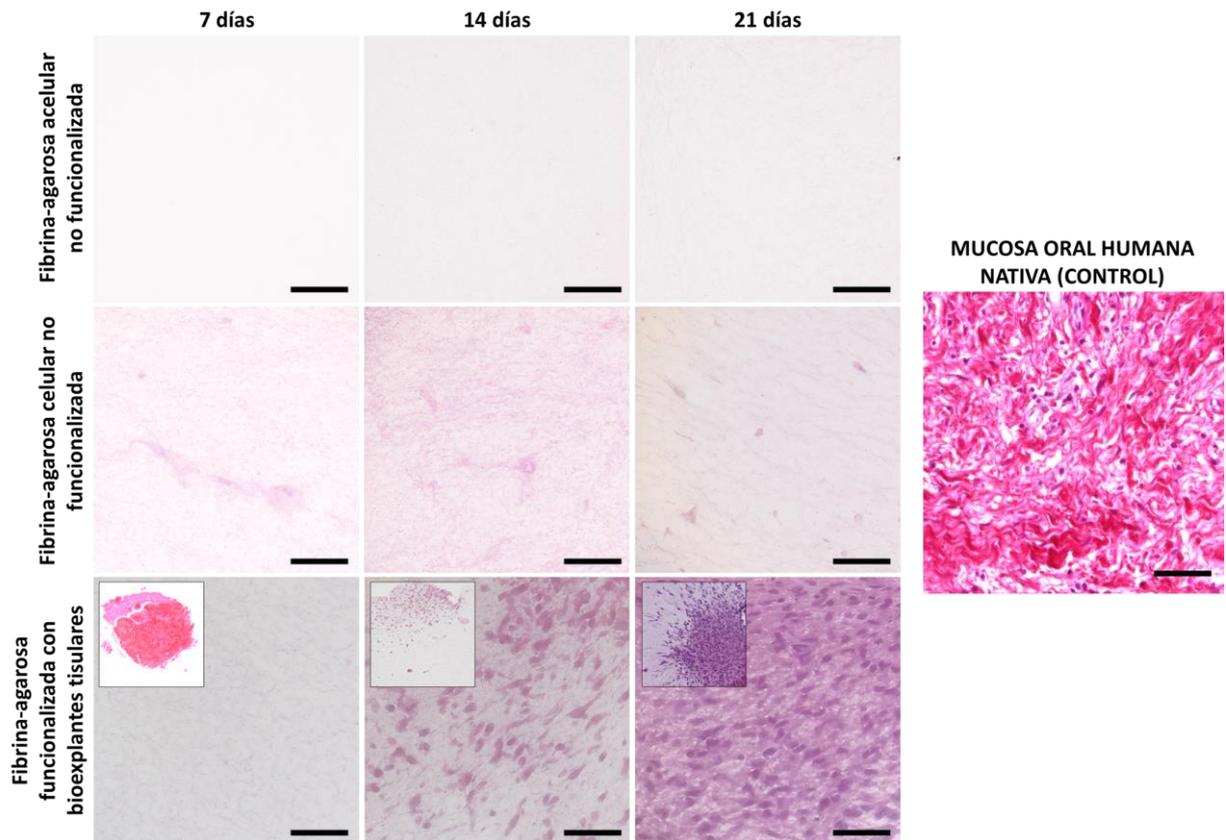


Figura 15. Análisis histoquímico mediante la técnica del rojo picrosirius de los distintos tejidos artificiales de fibrina-agarosa fabricados en esta Tesis Doctoral y los controles de mucosa oral. Para cada tejido artificial, se muestran imágenes correspondientes a los 7, 14 y 21 días de cultivo *ex vivo*. Escala: 100µm.

FIBRAS DE COLÁGENO (ROJO PICROSIRIUS)	Tiempo en cultivo	U.I. de rojo picrosirius	Porcentaje respecto al control
Biomaterial de fibrina-agarosa acelular no funcionalizado	7 días	7,5±0,71 U.I.	6,04±0,71%
	14 días	18,4±2,76 U.I.	14,83±2,76%
	21 días	19,2±3,82 U.I.	15,47±3,82%
	Promedio	15,03±6,04 U.I.	12,11±6,04%
Biomaterial de fibrina-agarosa con fibroblastos en su interior no funcionalizado	7 días	14,5±8,1 U.I.	11,68±8,1%
	14 días	26±10,48 U.I.	20,95±10,48%
	21 días	32,7±5,54 U.I.	26,35±5,54%
	Promedio	24,4±11,06 U.I.	19,66±11,06%
Biomaterial de fibrina-agarosa funcionalizado mediante bioexplantos tisulares	7 días	37±6,41 U.I.	29,81±6,41%
	14 días	64±9,26 U.I.	51,57±9,26%
	21 días	106,7±15,2 U.I.	85,98±15,2%
	Promedio	69,23±31,03 U.I.	55,79±31,03%
Mucosa oral humana nativa control	-	124,1±42,28 U.I.	100±42,28%

Tabla 2. Cuantificación de la señal histoquímica de rojo picrosirius en los distintos tipos de muestras analizadas en la presente Tesis Doctoral. Los resultados se muestran como valores crudos de unidades de intensidad de señal (U.I.) y como porcentaje de señal respecto al control de mucosa humana nativa, tomada como 100% de intensidad de señal. En cada caso, los valores se expresan como media ± desviación estándar.

FIBRAS DE COLÁGENO (ROJO PICROSIRIUS)		Biomaterial de fibrina-agarosa acelular no funcionalizado			Biomaterial de fibrina-agarosa celular no funcionalizado			Biomaterial de fibrina-agarosa funcionalizado			Mucosa oral humana nativa control
		7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días	-
Biomaterial de fibrina-agarosa acelular no funcionalizado	7 días	-	0,8534	0,7938	0,9906	0,1960	0,0149*	0,0018*	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**
	14 días	0,8534	-	1,0000	0,9999	0,9832	0,5496	0,1900	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**
	21 días	0,7938	1,0000	-	0,9996	0,9923	0,6294	0,2411	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**
Biomaterial de fibrina-agarosa celular no funcionalizado	7 días	0,9906	0,9999	0,9996	-	0,8097	0,2145	0,0473*	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**
	14 días	0,1960	0,9832	0,9923	0,8097	-	0,9931	0,8466	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**
	21 días	0,0149*	0,5496	0,6294	0,2145	0,9931	-	0,9998	0,0007*	<0,0001**	<0,0001**
Biomaterial de fibrina-agarosa funcionalizado	7 días	0,0018*	0,1900	0,2411	0,0473*	0,8466	0,9998	-	0,0064*	<0,0001**	<0,0001**
	14 días	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	0,0007*	0,0064*	-	<0,0001**	<0,0001**
	21 días	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	-	0,2698
Mucosa oral humana nativa control	-	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	0,2698	-

Tabla 3. Valores p de significación estadística para la comparación de los niveles de intensidad de tinción de rojo picrosirius en las diferentes muestras analizadas en la presente Tesis Doctoral. Los valores corresponden a las p obtenidas tras comparar estadísticamente dos grupos concretos de muestras.

5. Análisis de fibras de colágeno tipo I de la matriz extracelular en los tejidos artificiales no funcionalizados y los sustitutos tisulares funcionalizados mediante técnicas de bioexplante tisular

En último lugar, en la presente Tesis Doctoral, se analizó la presencia de fibras de colágeno tipo I en los diferentes tipos de muestras, utilizando para ello, técnicas de inmunohistoquímica.

A este respecto, se observó que la mayor intensidad de señal inmunohistoquímica correspondía a la lámina propia de los controles de mucosa oral humana nativa, los cuales presentaban abundantes fibras de colágeno tipo I a este nivel (Figura 16).

En cuanto a los tejidos artificiales generados en esta Tesis Doctoral, se observó de nuevo que los biomateriales acelulares presentaban muy escasa presencia de colágeno tipo I (promedio $22,05 \pm 1,45\%$ del control), con un leve incremento no significativo en los biomateriales de fibrina-agarosa celulares no funcionalizados (promedio $30,93 \pm 5,85\%$ del control). Las diferencias entre los tejidos celulares y acelulares no fueron estadísticamente significativas, al igual que las diferencias entre los distintos tiempos de cultivo (Tabla 4). El análisis de los tejidos artificiales funcionalizados mediante bioexplantes tisulares mostró un incremento de la señal inmunohistoquímica de colágeno tipo I, con un promedio del $36,16 \pm 17,33\%$ del control. Aunque todos los tiempos resultaron significativamente inferiores al control de mucosa oral humana nativa, las muestras funcionalizadas correspondientes al día 21 mostraron diferencias significativas con los biomateriales acelulares no funcionalizados y diferencias marginalmente significativas con los tejidos celulares no funcionalizados. Asimismo, el análisis temporal de los tejidos funcionalizados reveló un aumento significativo de la intensidad de colágeno tipo I a los 21 días, respecto a los 7 días, y un aumento marginalmente significativo a los 21 días, respecto a los 14 días.

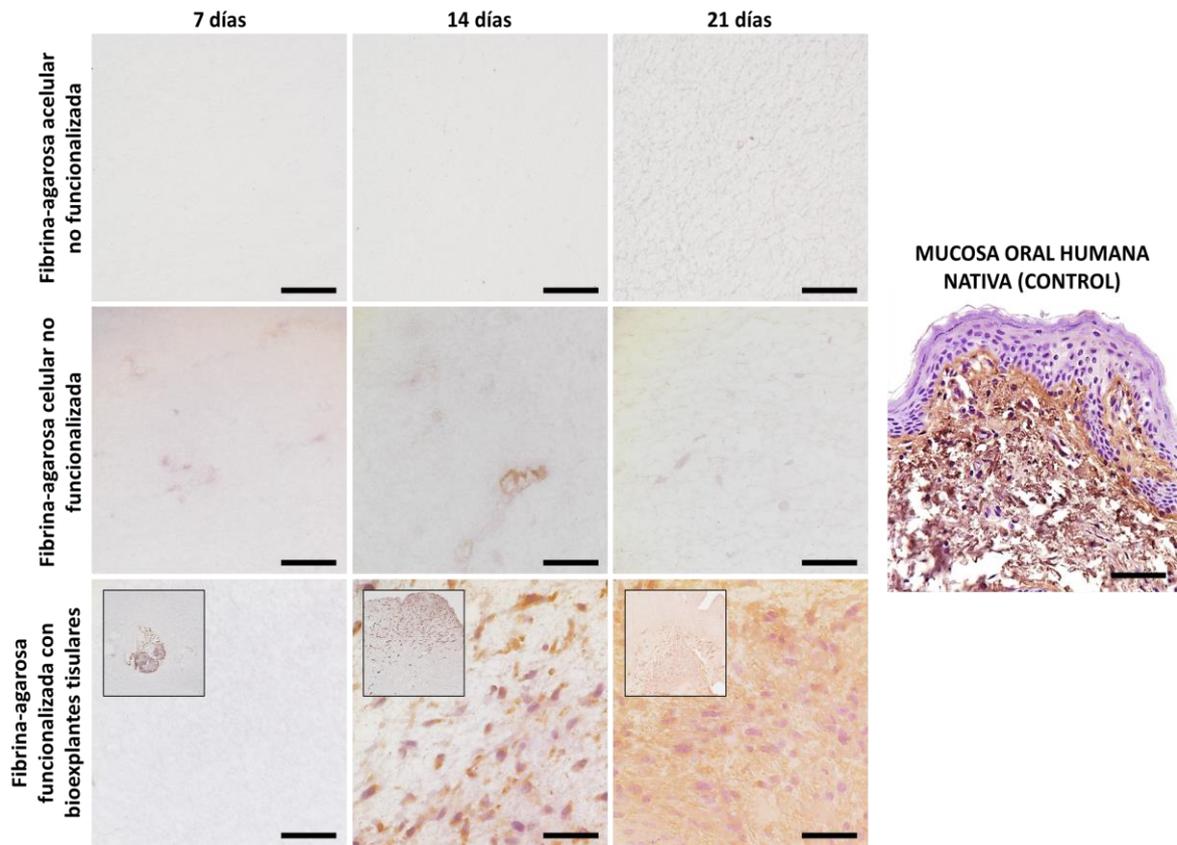


Figura 16. Análisis histoquímico mediante la técnica inmunohistoquímica de colágeno tipo I de los distintos tejidos artificiales de fibrina-agarosa fabricados en esta Tesis Doctoral y los controles de mucosa oral. Para cada tejido artificial, se muestran imágenes correspondientes a los 7, 14 y 21 días de cultivo *ex vivo*. Escala: 100µm.

COLÁGENO TIPO I (INMUNOHISTOQUÍMICA)	Tiempo en cultivo	U.I. de colágeno tipo I	Porcentaje respecto al control
Biomaterial de fibrina-agarosa acelular no funcionalizado	7 días	26,3±0,48 U.I.	22,03±0,48%
	14 días	26,4±1,71 U.I.	22,11±1,71%
	21 días	26,3±1,89 U.I.	22,03±1,89%
	Promedio	26,33±1,45 U.I.	22,05±1,45%
Biomaterial de fibrina-agarosa con fibroblastos en su interior no funcionalizado	7 días	34,2±4,18 U.I.	28,64±4,18%
	14 días	37±4,19 U.I.	30,99±4,19%
	21 días	39,6±7,69 U.I.	33,17±7,69%
	Promedio	36,93±5,85 U.I.	30,93±5,85%
Biomaterial de fibrina-agarosa funcionalizado mediante bioexplantos tisulares	7 días	26,1±4,23 U.I.	21,86±4,23%
	14 días	40,8±12,36 U.I.	34,17±12,36%
	21 días	62,6±6,9 U.I.	52,43±6,9%
	Promedio	43,17±17,33 U.I.	36,16±17,33%
Mucosa oral humana nativa control	-	119,4±39,4 U.I.	100±39,4%

Tabla 4. Cuantificación de la señal inmunohistoquímica de colágeno tipo I en los distintos tipos de muestras analizadas en la presente Tesis Doctoral. Los resultados se muestran como valores crudos de unidades de intensidad de señal (U.I.) y como porcentaje de señal respecto al control de mucosa humana nativa, tomada como 100% de intensidad de señal. En cada caso, los valores se expresan como media \pm desviación estándar.

COLÁGENO TIPO I (INMUNOHISTOQUÍMICA)		Biomaterial de fibrina-agarosa acelular no funcionalizado			Biomaterial de fibrina-agarosa celular no funcionalizado			Biomaterial de fibrina-agarosa funcionalizado			Mucosa oral humana nativa control
		7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días	
Biomaterial de fibrina-agarosa acelular no funcionalizado	7 días	-	1,0000	1,0000	0,9532	0,7644	0,4820	1,0000	0,3561	<0,0001**	<0,0001**
	14 días	1,0000	-	1,0000	0,9567	0,7740	0,4931	1,0000	0,3660	<0,0001**	<0,0001**
	21 días	1,0000	1,0000	-	0,9532	0,7644	0,4820	1,0000	0,3561	<0,0001**	<0,0001**
Biomaterial de fibrina-agarosa celular no funcionalizado	7 días	0,9532	0,9567	0,9532	-	1,0000	0,9966	0,9454	0,9856	0,0005*	<0,0001**
	14 días	0,7644	0,7740	0,7644	1,0000	-	1,0000	0,7448	0,9998	0,0026*	<0,0001**
	21 días	0,4820	0,4931	0,4820	0,9966	1,0000	-	0,4601	1,0000	0,0107*	<0,0001**
Biomaterial de fibrina-agarosa funcionalizado	7 días	1,0000	1,0000	1,0000	0,9454	0,7448	0,4601	-	0,3368	<0,0001**	<0,0001**
	14 días	0,3561	0,3660	0,3561	0,9856	0,9998	1,0000	0,3368	-	0,0198*	<0,0001**
	21 días	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	0,0005*	0,0026*	0,0107*	<0,0001**	0,0198*	-	<0,0001**
Mucosa oral humana nativa control	-	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	-

Tabla 5. Valores p de significación estadística para la comparación de los niveles de intensidad de tinción inmunohistoquímica para colágeno tipo I en las diferentes muestras analizadas en la presente Tesis Doctoral. Los valores corresponden a las p obtenidas tras comparar estadísticamente dos grupos concretos de muestras.

6. Análisis de proteoglicanos de la matriz extracelular en los tejidos artificiales no funcionalizados y los sustitutos tisulares funcionalizados mediante técnicas de bioexplante tisular

Cuando se analizaron las diferentes muestras incluidas en la presente Tesis Doctoral mediante la técnica histoquímica de azul alcian (Figura 17) para la detección de proteoglicanos, se encontró, en primer lugar, que la lámina propia de la mucosa oral nativa presentaba abundante presencia de estos componentes.

Sin embargo, el análisis de los diferentes tipos de tejidos artificiales mostró escasa presencia de proteoglicanos, especialmente en las muestras de fibrina-agarosa acelular (Tabla 6). De hecho, los valores de intensidad mostrados por el material acelular fueron inferiores al 25% del control y mostraron diferencias significativas con el control (Tabla 6). En los tejidos celulares no funcionalizados de fibrina-agarosa, encontramos un promedio de intensidad de señal del $21.22 \pm 2.72\%$ respecto al control, no alcanzando ninguna de las muestras el 30% del control. Las diferencias con el control fueron estadísticamente significativas. Por el contrario, la presencia de proteoglicanos fue mayor en los tejidos funcionalizados mediante bioexplantes tisulares, aunque éstos no alcanzaron los niveles observados en la mucosa oral nativa utilizada como control. Las diferencias frente al control de mucosa oral fueron estadísticamente significativas a los 7 y 14 días, y marginalmente significativas a los 21 días.

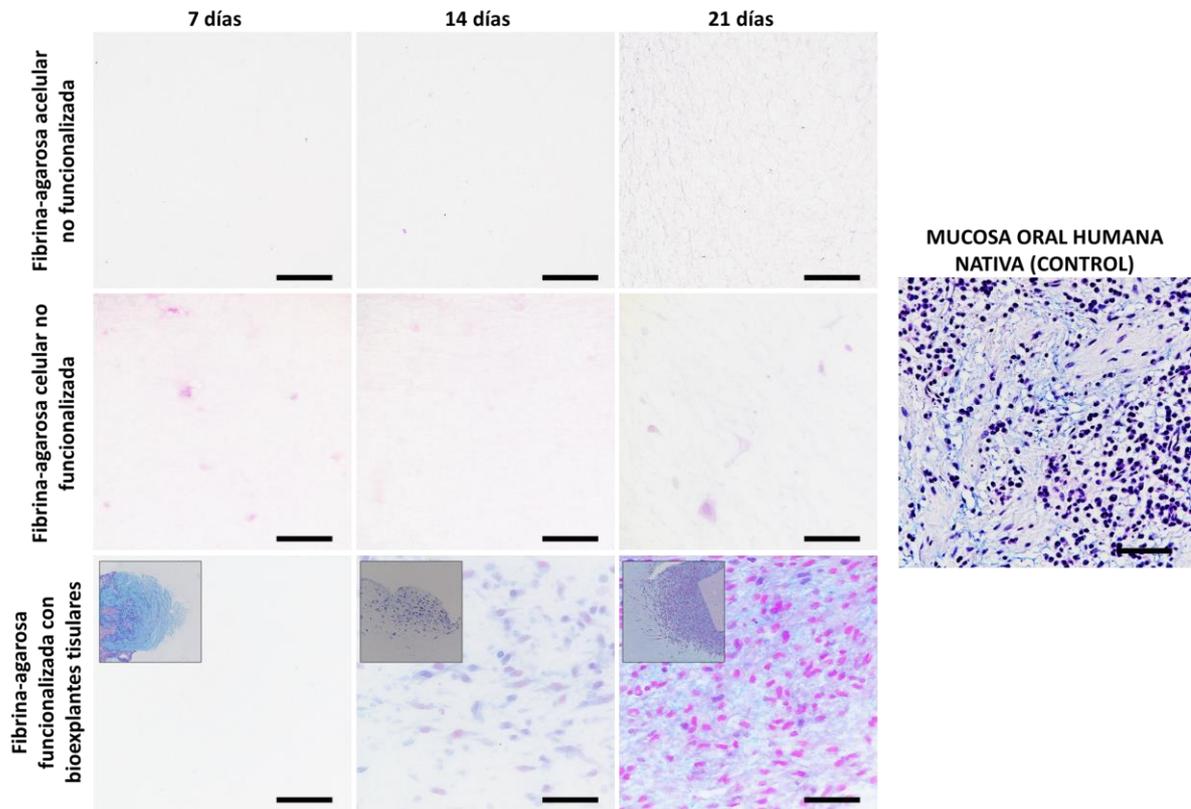


Figura 17. Análisis histoquímico mediante la técnica de azul alcian de los distintos tejidos artificiales de fibrina-agarosa fabricados en esta Tesis Doctoral y los controles de mucosa oral. Para cada tejido artificial, se muestran imágenes correspondientes a los 7, 14 y 21 días de cultivo *ex vivo*. Escala: 100µm.

PROTEOGLICANOS (AZUL ALCIÁN)	Tiempo en cultivo	U.I. de azul alcíán	Porcentaje respecto al control
Biomaterial de fibrina-agarosa acelular no funcionalizado	7 días	12,9±1,1 U.I.	22,87±1,1%
	14 días	12,8±1,14 U.I.	22,7±1,14%
	21 días	13,2±1,81 U.I.	23,4±1,81%
	Promedio	12,97±1,35 U.I.	23±1,35%
Biomaterial de fibrina-agarosa con fibroblastos en su interior no funcionalizado	7 días	10,1±1,2 U.I.	17,91±1,2%
	14 días	10,7±1,7 U.I.	18,97±1,7%
	21 días	15,1±1,73 U.I.	26,77±1,73%
	Promedio	11,97±2,72 U.I.	21,22±2,72%
Biomaterial de fibrina-agarosa funcionalizado mediante bioexplantos tisulares	7 días	9,9±0,74 U.I.	17,55±0,74%
	14 días	22,4±4,4 U.I.	39,72±4,4%
	21 días	38,4±10,42 U.I.	68,09±10,42%
	Promedio	23,57±13,44 U.I.	41,79±13,44%
Mucosa oral humana nativa control	-	56,4±26,01 U.I.	100±26,01%

Tabla 6. Valores obtenidos tras la cuantificación de proteoglicanos mediante la técnica de azul alcíán en las diferentes muestras analizadas en la presente Tesis Doctoral. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar.

PROTEOGLICANOS (AZUL ALCIÁN)		Biomaterial de fibrina-agarosa acelular no funcionalizado			Biomaterial de fibrina-agarosa celular no funcionalizado			Biomaterial de fibrina-agarosa funcionalizado			Mucosa oral humana nativa control
		7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días	
Biomaterial de fibrina-agarosa acelular no funcionalizado	7 días	-	1,0000	1,0000	0,9995	0,9999	0,9999	0,9991	0,3690	<0,0001**	<0,0001**
	14 días	1,0000	-	1,0000	0,9996	1,0000	0,9999	0,9993	0,3541	<0,0001**	<0,0001**
	21 días	1,0000	1,0000	-	0,9989	0,9998	1,0000	0,9982	0,4156	<0,0001**	<0,0001**
Biomaterial de fibrina-agarosa celular no funcionalizado	7 días	0,9995	0,9996	0,9989	-	1,0000	0,9644	1,0000	0,0856	<0,0001**	<0,0001**
	14 días	0,9999	1,0000	0,9998	1,0000	-	0,9847	1,0000	0,1230	<0,0001**	<0,0001**
	21 días	0,9999	0,9999	1,0000	0,9644	0,9847	-	0,9544	0,7305	<0,0001**	<0,0001**
Biomaterial de fibrina-agarosa funcionalizado	7 días	0,9991	0,9993	0,9982	1,0000	1,0000	0,9544	-	0,0754	<0,0001**	<0,0001**
	14 días	0,3690	0,3541	0,4156	0,0856	0,1230	0,7305	0,0754	-	0,0056*	<0,0001**
	21 días	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	0,0056*	-	0,0010*
Mucosa oral humana nativa control	-	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	0,0010*	-

Tabla 7. Valores *p* de significación estadística para la comparación de los niveles de intensidad de tinción de azul alcíán en las diferentes muestras analizadas en la presente Tesis Doctoral. Los valores corresponden a las *p* obtenidas tras comparar estadísticamente dos grupos concretos de muestras.

7. Análisis de glicoproteínas de la matriz extracelular en los tejidos artificiales no funcionalizados y los sustitutos tisulares funcionalizados mediante técnicas de bioexplante tisular

El análisis cuantitativo de la presencia de glicoproteínas identificadas mediante la técnica del ácido periódico de Schiff (PAS) mostró, asimismo, diferencias entre los distintos grupos de estudio. En primer lugar, se observó que la mucosa oral nativa utilizada como control mostró señal intensa para esta reacción histoquímica, especialmente a nivel de la membrana basal de la unión entre el epitelio y la lámina propia y de los vasos sanguíneos (Figura 18).

En segundo lugar, los biomateriales acelulares no funcionalizados mostraron muy escasa intensidad de señal PAS, con un promedio de $16.34 \pm 1.94\%$ de la intensidad encontrada en el control, y sin que existieran diferencias entre los diferentes tiempos de cultivo. Las diferencias con el control y con el tejido de fibrina-agarosa celularizado no funcionalizado resultaron no significativas (Tabla 8). Cuando se analizaron los tejidos celulares no funcionalizados, se encontró que estos tejidos también presentaban muy escasa intensidad de tinción PAS a los tres tiempos analizados, con un promedio de $19.84 \pm 10.42\%$ de la intensidad encontrada en el control, y sin que existieran diferencias entre los diferentes tiempos de cultivo. Finalmente, la cuantificación de intensidad de señal PAS en los tejidos de fibrina-agarosa funcionalizados mediante bioexplantes tisulares mostró un aumento de la intensidad de este marcador histoquímico, alcanzando un promedio de $54.51 \pm 23.97\%$ del control. En este caso, se observaron diferencias significativas entre los días 7 y 14 de cultivo, así como diferencias marginalmente significativas entre los días 14 y 21. Aunque los niveles alcanzados en los días 7 y 14 fueron significativamente inferiores a los del control, la mucosa oral funcionalizada resultó estadísticamente comparable a la mucosa oral nativa a los 21 días de cultivo ($p > 0,05$).

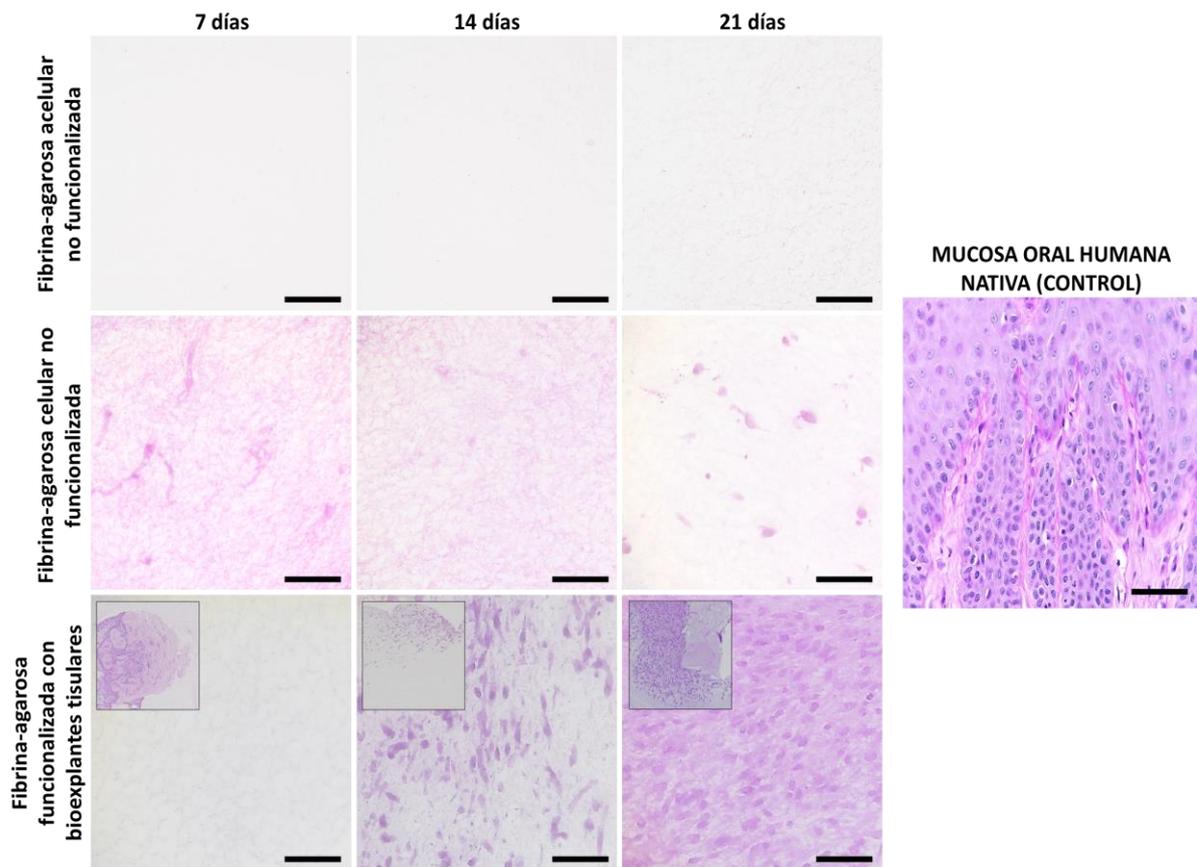


Figura 18. Análisis histoquímico mediante la técnica del ácido periódico de Schiff (PAS) de los distintos tejidos artificiales de fibrina-agarosa fabricados en esta Tesis Doctoral y los controles de mucosa oral. Para cada tejido artificial, se muestran imágenes correspondientes a los 7, 14 y 21 días de cultivo *ex vivo*. Escala: 100µm.

GLICOPROTEÍNAS (PAS)	Tiempo en cultivo	U.I. de PAS	Porcentaje respecto al control
Biomaterial de fibrina-agarosa acelular no funcionalizado	7 días	12,8±0,79 U.I.	15,61±0,79%
	14 días	13,7±2 U.I.	16,71±2%
	21 días	13,7±2,63 U.I.	16,71±2,63%
	Promedio	13,4±1,94 U.I.	16,34±1,94%
Biomaterial de fibrina-agarosa con fibroblastos en su interior no funcionalizado	7 días	17,3±10,71 U.I.	21,1±10,71%
	14 días	18,3±5,21 U.I.	22,32±5,21%
	21 días	13,2±13,85 U.I.	16,1±13,85%
	Promedio	16,27±10,42 U.I.	19,84±10,42%
Biomaterial de fibrina-agarosa funcionalizado mediante bioexplantos tisulares	7 días	17,3±10,04 U.I.	21,1±10,04%
	14 días	45,6±10,63 U.I.	55,61±10,63%
	21 días	71,2±4,64 U.I.	86,83±4,64%
	Promedio	44,7±23,97 U.I.	54,51±23,97%
Mucosa oral humana nativa control	-	82±27,38 U.I.	100±27,38%

Tabla 8. Cuantificación de la señal histoquímica del ácido periódico de Schiff (PAS) en los distintos tipos de muestras analizadas en la presente Tesis Doctoral. Los resultados se muestran como valores crudos de unidades de intensidad de señal (U.I.) y como porcentaje de señal respecto al control de mucosa humana nativa, tomada como 100% de intensidad de señal. En cada caso, los valores se expresan como media ± desviación estándar.

GLICOPROTEÍNAS (PAS)		Biomaterial de fibrina-agarosa acelular no funcionalizado			Biomaterial de fibrina-agarosa celular no funcionalizado			Biomaterial de fibrina-agarosa funcionalizado			Mucosa oral humana nativa control
		7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días	
Biomaterial de fibrina-agarosa acelular no funcionalizado	7 días	-	1.0000	1.0000	0.9969	0.9867	1.0000	0.9969	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**
	14 días	1.0000	-	1.0000	0.9995	0.9964	1.0000	0.9995	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**
	21 días	1.0000	1.0000	-	0.9995	0.9964	1.0000	0.9995	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**
Biomaterial de fibrina-agarosa celular no funcionalizado	7 días	0.9969	0.9995	0.9995	-	1.0000	0.9985	1.0000	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**
	14 días	0.9867	0.9964	0.9964	1.0000	-	0.9922	1.0000	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**
	21 días	1.0000	1.0000	1.0000	0.9985	0.9922	-	0.9985	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**
Biomaterial de fibrina-agarosa funcionalizado	7 días	0.9969	0.9995	0.9995	1.0000	1.0000	0.9985	-	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**
	14 días	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**	-	0.0001*	<0.0001**
	21 días	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**	0.0001*	-	0.5366
Mucosa oral humana nativa control	-	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**	0.5366	-

Tabla 9. Valores p de significación estadística para la comparación de los niveles de intensidad de tinción de PAS en las diferentes muestras analizadas en la presente Tesis Doctoral. Los valores corresponden a las p obtenidas tras comparar estadísticamente dos grupos concretos de muestras.

VIII DISCUSIÓN

En la presente Tesis Doctoral se ha desarrollado una estrategia novedosa de biofabricación de tejidos artificiales para su aplicación en Ingeniería Tisular de la región oral y maxilofacial. Esta técnica, consiste en la estandarización de nuevos métodos que permitan funcionalizar los tejidos artificiales mediante la utilización de bioexplantes de tejidos con el objetivo de conseguir un mayor grado biomimeticidad con los tejidos nativos. Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral revelaron que los nuevos modelos funcionalizados de fibrina-agarosa se pueden generar con facilidad en el laboratorio mediante el uso de pequeños bioexplantes de tejido obtenidos de biopsias de mucosa oral humana en combinación con biomateriales de fibrina y agarosa que han sido previamente utilizados y caracterizados en protocolos de fabricación de tejidos artificiales (Alfonso-Rodríguez *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2013; Fernández-Valadés-Gámez *et al.*, 2016). Este avance, supone una gran mejora en la técnica de fabricación de tejidos artificiales ya que no requiere de la necesidad de establecer cultivos celulares primarios y, por tanto, se reducirían los tiempos de fabricación en el laboratorio.

Los estudios realizados previamente sobre biomateriales no funcionalizados desarrollados con fibrina y agarosa demostraron tener propiedades biomecánicas adecuadas (Scionti *et al.*, 2014) y un alto grado de biocompatibilidad cuando fueron implantados sobre modelos de experimentación animal (Fernández-Valadés *et al.*, 2017; Martín-Piedra *et al.*, 2017). Este hecho, permitió trasladar el modelo no funcionalizado de fibrina y agarosa a pacientes, con resultados preliminares prometedores (Egea-Guerrero *et al.*, 2019; González-Andrades *et al.*, 2019). Sin embargo, es bien conocido que el proceso de biofabricación de un tejido artificial no funcionalizado para su uso terapéutico requiere de largos periodos de fabricación *in vitro* hasta obtener la densidad celular adecuada, esto unido a un largo proceso de maduración del tejido artificial que suele tardar aproximadamente tres semanas desde el momento de su fabricación (Garzón *et al.*, 2009). En este sentido, el desarrollo de una novedosa técnica de biofabricación basada en la funcionalización de los biomateriales a partir de la utilización de bioexplantes de tejido, podría acelerar significativamente el proceso de biofabricación y, por ende, contribuir a su traslación clínica.

De acuerdo con esto, la literatura ha descrito numerosos procesos de biofabricación de tejidos artificiales para mejorar la regeneración de los tejidos blandos y duros de la cavidad oral. En este sentido, destaca el uso de sistemas de auto-ensamblaje de biomateriales con secuencias peptídicas, el uso de polímeros sintéticos, biomateriales cerámicos y composites (Moussa *et al.*, 2019), todos ellos con resultados favorables pero que aún requieren un mayor grado de optimización para su utilización en la clínica. La búsqueda de nuevas estrategias de funcionalización de biomateriales pone de relieve el interés de la comunidad científica por optimizar los resultados hasta ahora alcanzados con otros

sistemas de funcionalización. El sistema de funcionalización diseñado en la presente Tesis doctoral consiste en combinar dos biomateriales de origen natural altamente biocompatibles como son la fibrina y la agarosa, una proteína filamentosa e insoluble y un polisacárido capaz de mejorar las propiedades biomecánicas de materiales de baja estabilidad mecánica como la fibrina. Una vez mezclados los dos biomateriales naturales, se lleva a cabo su funcionalización mediante la agregación de bioexplantes de tejido provenientes de biopsias de mucosa oral con el objetivo de mejorar las propiedades biológicas del tejido artificial y, por ende, su aplicabilidad en la odontología traslacional.

Los resultados de la presente Tesis Doctoral demostraron que las células contenidas en los bioexplantes de mucosa oral eran capaces de migrar y crear un entorno bioactivo dentro del biomaterial de fibrina-agarosa funcionalizada y, en consecuencia, inducir la proliferación celular. Por tanto, el número de células aumentó exponencialmente después de tres semanas de cultivo *in vitro*, siendo similar al grupo control de mucosa oral nativa y diferente al tejido celular no funcionalizado. Una de las razones por las cuales las células tienden a proliferar y crear un entorno bioactivo dentro de los biomateriales funcionalizados con respecto a los no funcionalizados, podría ser debido a la ausencia de la utilización de una técnica de disociación enzimática para introducir las células dentro del biomaterial y que no son requeridas en los sistemas de funcionalización aquí propuestos. En este sentido, recientes publicaciones, han descrito el daño celular que ocasionan las enzimas de digestión como la tripsina-EDTA sobre la membrana plasmática (Kasai *et al.* 2020). Así mismo, el uso de enzimas como la colagenasa tipo I y II han demostrado un efecto negativo sobre la migración celular dependiendo concentración enzimática y el tiempo de exposición a los tejidos (Seol *et al.*, 2014). Este hecho, podría explicar la escasa capacidad de proliferación que tienen las células dentro de las matrices celulares no funcionalizadas durante las primeras semanas de cultivo *in vitro*.

El desarrollo de un nuevo método de funcionalización, tema de estudio de la presente Tesis Doctoral, no requiere de digestión enzimática previa, constituyendo una importante ventaja con respecto a otros métodos de biofabricación de tejidos artificiales. En la mayoría de los casos, el uso de enzimas de origen animal está asociado a numerosas complicaciones en el ámbito regulatorio de la medicina traslacional limitando así la transferencia a la clínica (Heathman *et al.*, 2015). Con el objetivo de reducir dichas complicaciones el método de funcionalización pretende evitar el uso de enzimas de digestión, así como, reducir los tiempos de fabricación *in vitro* de los tejidos orales para su uso en odontología regenerativa.

Por otra parte, el uso de los métodos de funcionalización ha demostrado ser útil en la generación de tejidos artificiales más biomiméticos. Esto quiere decir, tejidos artificiales con una cantidad definida de proteínas de la matriz extracelular con un rol esencial en la

fisiología, la división y la diferenciación celular que permiten la nutrición e intercambio de oxígeno dentro de los tejidos desarrollados (Costa *et al.*, 2017). En este contexto, diferentes experimentos han comprobado el uso de eficaz de bioexplantes tejido mamario cultivado dentro de esponjas sintéticas manteniendo la capacidad de respuesta tisular sin la necesidad de una extensa manipulación del tejido mediante digestión enzimática, manteniendo así, la organización del tejido conectivo y la matriz extracelular. Además, este método de funcionalización tiene el potencial de mejorar los resultados de los estudios preclínicos ya que proporcionan datos más precisos que reflejan las interacciones célula-célula y célula-matriz, el microambiente tisular, los efectos de los fármacos o la función de las células (Gris-Cárdenas *et al.*, 2022).

A pesar de la gran importancia de contener proteínas de la matriz extracelular dentro de los tejidos artificiales, la síntesis de dichas proteínas suele ser escasa a nivel *in vitro* (Garzón *et al.*, 2013; Alfonso-Rodríguez *et al.*, 2015), como lo confirman los resultados obtenidos en los grupos de estudio acelulares y celulares no funcionalizados. Sin embargo, una vez realizados los métodos de funcionalización los tejidos artificiales mostraron tener una mayor cantidad de proteínas constitutivas de la matriz extracelular. En este sentido, uno de los componentes fundamentales de la matriz extracelular son los componentes fibrilares, los cuales son fundamentales para el mantenimiento de la estructura tridimensional de los tejidos, así como para su hidratación (Halper *et al.*, 2014). Aparte de los componentes fibrilares de la matriz extracelular, los componentes no fibrilares como los proteoglicanos juegan también un papel relevante en la regulación de la actividad proteasa, la respuesta celular a factores de crecimiento, las interacciones célula a célula y las interacciones célula-matriz, así como, en el proceso de síntesis de colágeno (Aviezer *et al.*, 1994). De acuerdo con esto, el uso de los métodos de funcionalización en la fabricación de tejidos artificiales mostró estar directamente relacionado con el aumento de proteoglicanos en la matriz extracelular de las muestras de fibrina-agarosa funcionalizada con bioexplantes tisulares.

Asimismo, otro de los componentes no fibrilares de la matriz son las glicoproteínas, componentes fundamentales en la estructura de los tejidos (Browning, 2018). Los hallazgos de la presente Tesis Doctoral confirmaron que los tejidos no funcionalizados carecían de componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular mientras se mantuvieron en cultivo (Fernández-Valadés-Gámez *et al.*, 2016) y que su funcionalización con bioexplantes tisulares mejora la capacidad de síntesis de dichas proteínas especialmente a las tres semanas de cultivo. El incremento en la síntesis de proteínas no fibrilares de la matriz extracelular en los tejidos funcionalizados podría mejorar la funcionalidad de los tejidos una vez implantados *in vivo*, a diferencia de los tejidos

artificiales no funcionalizados que mostraron bajos niveles de diferenciación celular. Una posible explicación del fenómeno de incremento de proteínas de la matriz extracelulares en tejidos artificiales obtenidos mediante el uso de métodos de funcionalización podría ser que los bioexplantes incorporados en el biomaterial son capaces de liberar componentes solubles de la matriz extracelular que podrían difundirse dentro del material y actuar como agente activador de la función celular. Por otra parte, el aumento del número de células proliferativas dentro del biomaterial funcionalizado podría ser el responsable del aumento en la síntesis de proteínas de la matriz extracelular. En concreto, el número de células, la cantidad de proteínas de la matriz extracelular y el tiempo de cultivo podrían correlacionarse de manera positiva entre sí y favorecer el proceso de desarrollo y maduración de los tejidos *in vitro*.

Por otra parte, durante los últimos años se ha descrito la funcionalización de biomateriales naturales y sintéticos con secretoma obtenido a partir de células madre mesenquimales (Cases-Perera *et al.*, 2022) que ha demostrado un potente efecto inductor a través de las biomoléculas que contiene (Romanazzo *et al.*, 2022) donde destaca la presencia de factores de crecimiento, citoquinas, proteasas, factores de transcripción y otras moléculas involucradas en el proceso de adhesión y viabilidad celular, migración, proliferación y diferenciación (Baez-Jurado *et al.*, 2019). Estos hallazgos, ponen de relieve el alto contenido de biomoléculas inductoras que podrían contener los bioexplantes de tejido usados en los métodos de funcionalización. La cantidad de biomoléculas inductoras podrían ser comparables con las contenidas en el secretoma y jugarían, por tanto, un papel crucial en las funciones de desarrollo, maduración y diferenciación de los tejidos artificiales.

El contenido fibrilar de los componentes de la matriz extracelular de los tejidos de la cavidad oral está representado principalmente por la presencia de fibras de colágeno maduro, con abundancia en colágeno tipo I, existiendo, además, escasas fibras reticulares y elásticas. En concreto, el colágeno tipo I es una proteína importante dentro del proceso de diferenciación y migración celular, además de ser la encargada de mantener las propiedades mecánicas dentro de los tejidos (Aviezer *et al.*, 1994; Kubo, 2018). En este contexto, en la presente Tesis Doctoral se confirmó que la mucosa oral nativa es rica en colágeno tipo I, y contiene una escasa cantidad fibras reticulares y elásticas (Alfonso-Rodríguez *et al.*, 2015). En este sentido, cuando se evaluaron los tejidos artificiales funcionalizados durante tres semanas *in vitro* se observó la presencia de colágeno tipo I, no detectada en los tejidos que no fueron sometidos al método de funcionalización. Estos resultados, validan los resultados previos obtenidos por el grupo de investigación en Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada (Martin-Piedra *et al.*, 2017; Alfonso-Rodríguez *et al.*, 2015) en los que se observó una escasa presencia de colágeno tipo I a

nivel in vitro que mejoró una vez que los tejidos artificiales fueron implantados in vivo. En general, los tejidos funcionalizados fueron capaces de sintetizar colágeno tipo I de manera similar al control. Sin embargo, los resultados obtenidos tras el análisis inmunohistoquímico mostraron niveles inferiores de colágeno respecto a los niveles obtenidos mediante la técnica de detección histoquímica con la tinción de rojo picrosirius. Este hecho podría explicarse con las diferencias encontradas en las muestras control donde se encontraron fibras colágenas maduras e inmaduras.

En la presente Tesis Doctoral es importante destacar que los niveles de proteoglicanos y fibras de colágeno se incrementaron con las semanas de cultivo. Estos resultados, como se comentó previamente, podrían sugerir que el incremento gradual del número de células podría ser el responsable de la expresión secuencial de proteínas de la matriz extracelular dentro de los biomateriales de fibrina y agarosa. Este hallazgo sugiere que el uso de técnicas de funcionalización en tiempos prolongados de cultivo celular podría generar tejidos artificiales con niveles óptimos de diferenciación. Estudios preliminares desarrollados por Sheila MacNeil en el 2014 sobre sustitutos dérmicos (MacNeil *et al.*, 2014), confirman que la utilización de pequeños bioexplantes de tejido dentro de biomateriales biodegradables promueven la migración celular el proceso de angiogénesis y el depósito de matriz extracelular como lo evidencian los datos del presente estudio.

En resumen, la presente Tesis Doctoral describe un nuevo y sencillo método de funcionalización que permite la generación eficiente de sustitutos de mucosa oral. El análisis de los biomateriales funcionalizados reveló que estos nuevos modelos de tejido artificial presentan mayor grado de biomimeticidad que los tejidos artificiales no funcionalizados en lo que se refiere al número de células y la síntesis de componentes de la matriz extracelular, lo que respalda su potencial uso clínico. Una de las posibles aplicaciones de los biomateriales funcionalizados desarrollados en la presente Tesis Doctoral podría ser la generación de membranas biológicas para su uso en regeneración periodontal. Otras posibles aplicaciones podrían ser el reemplazo de la mucosa oral patológica en medicina oral y maxilofacial, y el tratamiento de pacientes con fisura palatina.

Aunque el grupo de investigación en Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada cuenta con una dilatada experiencia en el desarrollo de tejidos artificiales para su uso en regeneración de tejidos del área maxilofacial (Osorio *et al.*, 2017; Garzón *et al.*, 2013; Martín-Piedra *et al.*, 2017) los nuevos modelos de tejidos artificiales funcionalizados podrían proporcionar mayor capacidad funcionales y, por lo tanto, mejores resultados clínicos en el futuro.

Una de las principales aportaciones científicas de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo de nuevos tejidos artificiales generados con técnicas de biofabricación de última generación. El uso de los métodos de funcionalización para la fabricación de tejidos artificiales reduce sustancialmente el tiempo de fabricación y se convierten en una técnica de biofabricación de un solo paso, eliminando el aislamiento y la expansión celular de los sistemas tradicionales de biofabricación. Una de las principales ventajas de la biofabricación en un solo paso es que se requiere de menor cantidad de tejido donante, ya que el tejido es disgregado hasta obtener numerosos bioexplantes de tejido. Por otra parte, los costes de biofabricación disminuyen ya que la cantidad de material fungible se reduce al prescindir de la necesidad de aislamiento y expansión celular. Sin embargo, uno de los grandes retos a futuro será continuar los estudios preclínicos tanto en laboratorio como *in vivo* en animales de experimentación, para determinar la capacidad de vascularización de estos modelos y posteriormente proceder a su validación como medicamento de terapias avanzadas y su consecuente aprobación por la Agencia Española del Medicamento. En concreto, contar con los biomateriales de fibrina y agarosa, actualmente aprobados para uso clínico (Egea-Guerrero *et al.*, 2019; González-Andrades *et al.*, 2017), respalda la utilidad clínica futura de los modelos de mucosa oral humana funcionalizados con bioexplantes tisulares.

IX CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral nos permiten inferir las siguientes conclusiones:

1. La aplicación de los métodos de biofabricación basados en bioexplantes tisulares desarrollados en la presente Tesis Doctoral ha posibilitado la obtención de biomateriales de fibrina-agarosa funcionalizados de posible utilidad en protocolos de ingeniería tisular oral y maxilofacial.

2. El análisis histológico de los nuevos tejidos de fibrina-agarosa funcionalizados mediante el uso de bioexplantes tisulares reveló la biomimetividad del modelo y su utilidad para inducir significativamente la proliferación de las células del estroma de la mucosa oral en el interior del biomaterial en comparación con los tejidos artificiales no funcionalizados. El análisis temporal reveló, asimismo, un incremento significativo de la población fibroblástica de tejido artificial a lo largo del tiempo.

3. Cuando se analizó la composición de la matriz extracelular de los nuevos tejidos de fibrina-agarosa funcionalizados mediante el uso de bioexplantes tisulares, se observó un incremento en la síntesis de fibras de colágeno maduras y de colágeno tipo I en estos tejidos funcionalizados en comparación con los tejidos artificiales no funcionalizados. A este respecto, existió un aumento significativo de la cantidad de colágeno maduro y de colágeno tipo I en los tejidos funcionalizados correspondientes a 21 días, en comparación con los tejidos funcionalizados mantenidos en cultivo durante 7 y 14 días, alcanzando niveles similares al control de mucosa oral nativa a los 21 días en el caso del colágeno maduro identificado mediante la técnica histoquímica de rojo picrosirius.

4. La evaluación de los nuevos tejidos de fibrina-agarosa funcionalizados mediante el uso de bioexplantes tisulares para determinar la síntesis de componentes no fibrilares de la matriz extracelular reveló, en primer lugar, la utilidad del modelo funcionalizado para incrementar la síntesis de proteoglicanos identificados mediante la técnica histoquímica de azul alcian respecto al tejido artificial no funcionalizado, aunque el modelo funcionalizado no llegó a alcanzar los niveles del control. En cuanto a las glicoproteínas identificadas mediante la técnica del PAS, el método de funcionalización aquí descrito logró asimismo aumentar la producción de estos componentes no fibrilares de la matriz extracelular en comparación con los tejidos artificiales no funcionalizados, alcanzándose niveles comparables al control de mucosa oral humana nativa a los 21 días de cultivo.

5. En conjunto, estos resultados nos permiten confirmar la utilidad de la técnica de funcionalización basada en bioexplantes tisulares a la hora de generar tejidos artificiales más biomiméticos respecto a la mucosa oral humana. En comparación con los tejidos artificiales no funcionalizados de fibrina-agarosa, el modelo funcionalizado presenta un

mayor número de células y un incremento en la síntesis de componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular, alcanzando, para algunos de estos componentes, niveles comparables a los de la mucosa oral humana nativa utilizada como control. El desarrollo de futuros ensayos clínicos deberá determinar la utilidad clínica del modelo en patología oral y maxilofacial.

X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alaminos M, Del Carmen Sánchez-Quevedo M, Muñoz-Avila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Aug;47(8):3311-7. doi: 10.1167/iovs.05-1647
2. Alfonso-Rodríguez CA, Garzón I, Garrido-Gómez J, Oliveira AC, Martín-Piedra MÁ, Scionti G, Carriel V, Hernández-Cortés P, Campos A, Alaminos M. Identification of histological patterns in clinically affected and unaffected palm regions in dupuytren's disease. *PLoS One*. 2014 Nov 7;9(11): e112457. doi: 10.1371/journal.pone.0112457. eCollection 2014.
3. Alfonso-Rodríguez CA, González-Andrades E, Jaimes-Parra BD, Fernández-Valadés R, Campos A, Sánchez-Quevedo MC, Alaminos M, Garzón I. Ex vivo and in vivo modulatory effects of umbilical cord Wharton's jelly stem cells on human oral mucosa stroma substitutes. *Histol Histopathol*. 2015 Nov;30(11):1321-32. Epub 2015 May 13.
4. Aufderheide AC, Athanasiou KA. Comparison of scaffolds and culture conditions for tissue engineering of the knee meniscus. *Tissue Eng*. 2005 Jul-Aug;11(7-8):1095-104. doi: 10.1089/ten.2005.11.1095.
5. Aviezer D, Levy E, Safran M, Svahn C, Buddecke E, Schmidt A, David G, Vlodavsky I, Yayon A. Differential structural requirements of heparin and heparan sulfate proteoglycans that promote binding of basic fibroblast growth factor to its receptor. *J Biol Chem*. 1994 Jan 7;269(1):114-21.
6. Baez-Jurado E, Hidalgo-Lanussa O, Barrera-Bailón B, Sahebkar A, Ashraf GM, Echeverria V, Barreto GE. *Mol Neurobiol*. 2019 Oct;56(10):6902-6927. Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Protective Effects on Brain Pathologies.
7. Bakhshandeh B, Zarrintaj P, Oftadeh MO, Keramati F, Fouladiha H, Sohrabi-Jahromi S, Ziraksaz Z. Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2017 Oct;33(2):144-172. doi: 10.1080/02648725.2018.1430464. Epub 2018 Jan 31.
8. Binlath T, Thammanichanon P, Rittipakorn P, Thinsathid N, Jitprasertwong P. Collagen-Based Biomaterials in Periodontal Regeneration: Current Applications and Future Perspectives of Plant-Based Collagen. *Biomimetics (Basel)*. 2022 Mar 24;7(2):34. doi: 10.3390/biomimetics7020034.
9. Blanco-Elices C, Chato-Astrain J, González-González A, Sánchez-Porras D, Carriel V, Fernández-Valadés R, Sánchez-Quevedo MDC, Alaminos M, Garzón I. Histological Profiling of the Human Umbilical Cord: A Potential Alternative Cell Source in Tissue Engineering. *J Pers Med*. 2022 Apr 18;12(4):648. doi: 10.3390/jpm12040648.
10. Blanco-Elices C, Chato-Astrain J, Oyonarte S, Bermejo-Casares F, España-López A, Fernández-Valadés R, Sánchez-Quevedo MDC, Alaminos M, Martín-Piedra MA, Garzón I. Generation of a novel model of bioengineered human oral mucosa with increased vascularization potential. *J Periodontal Res*. 2021 Dec;56(6):1116-1131. doi: 10.1111/jre.12927. Epub 2021 Sep 12.
11. Browning KN. Extracellular matrix proteins in the gastrointestinal tract: more than a supporting role. *J Physiol*. 2018 Sep;596(17):3831-3832.
12. Campos F, Bonhome-Espinosa AB, Carmona R, Durán JDG, Kuzhir P, Alaminos M, López-López MT, Rodríguez IA, Carriel V. In vivo time-course biocompatibility assessment of biomagnetic nanoparticles-based biomaterials for tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021 Jan; 118:111476. doi: 10.1016/j.msec.2020.111476. Epub 2020 Sep 3.
13. Campos F, Bonhome-Espinosa AB, Chato-Astrain J, Sánchez-Porras D, García-García ÓD, Carmona R, López-López MT, Alaminos M, Carriel V, Rodríguez IA. Evaluation of Fibrin-Agarose Tissue-Like Hydrogels Biocompatibility for Tissue Engineering Applications. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Jun 16; 8:596. doi: 10.3389/fbioe.2020.00596. eCollection 2020.
14. Campos Muñoz A. *Cuerpo, Histología y Medicina. De la descripción microscópica a la ingeniería tisular. Discurso de Toma de Posesión como Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina. Madrid, 17 de febrero de 2004.*
15. Cases-Perera O, Blanco-Elices C, Chato-Astrain J, Miranda-Fernández C, Campos F, Crespo PV, Sánchez-Montesinos I, Alaminos M, Martín-Piedra MA, Garzón I. Development of secretome-based strategies to improve cell culture protocols in tissue engineering. *Sci Rep*. 2022 Jun 15;12(1):10003.
16. Chato-Astrain J, Chato-Astrain I, Sánchez-Porras D, García-García ÓD, Bermejo-Casares F, Vairo C, Villar-Vidal M, Gainza G, Villullas S, Oruezabal RI, Ponce-Polo Á, Garzón I, Carriel V, Campos F, Alaminos M. Generation of a novel human dermal substitute functionalized with antibiotic-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) with antimicrobial properties for tissue engineering. *J Nanobiotechnology*. 2020 Nov 23;18(1):174. doi: 10.1186/s12951-020-00732-0.

17. Chato-Astrain J, Sánchez-Porras D, García-García ÓD, Vairo C, Villar-Vidal M, Villullas S, Sánchez-Montesinos I, Campos F, Garzón I, Alaminos M. Improvement of Cell Culture Methods for the Successful Generation of Human Keratinocyte Primary Cell Cultures Using EGF-Loaded Nanostructured Lipid Carriers. *Biomedicines*. 2021 Nov 6;9(11):1634. doi: 10.3390/biomedicines9111634.
18. Chen BQ, Zhao Y, Zhang Y, Pan YJ, Xia HY, Kankala RK, Wang SB, Liu G, Chen AZ. Immune-regulating camouflaged nanoplatfoms: A promising strategy to improve cancer nano-immunotherapy. *Bioact Mater*. 2022 Aug 10; 21:1-19. doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.07.023. eCollection 2023 Mar.
19. Colombini A, Ceriani C, Banfi G, Brayda-Bruno M, Moretti M. Fibrin in intervertebral disc tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014 Dec;20(6):713-21. doi: 10.1089/ten.TEB.2014.0158. Epub 2014 Jul 29.
20. Costa A, Naranjo JD, Londono R, Badylak SF. Biologic Scaffolds. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017 Sep 1;7(9):a025676.
21. Costela-Ruiz VJ, Melguizo-Rodríguez L, Bellotti C, Illescas-Montes R, Stanco D, Arciola CR, Lucarelli E. Different Sources of Mesenchymal Stem Cells for Tissue Regeneration: A Guide to Identifying the Most Favorable One in Orthopedics and Dentistry Applications. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun 6;23(11):6356. doi: 10.3390/ijms23116356.
22. Dogan A, Elcin AE, Elcin YM. Translational Applications of Tissue Engineering in Cardiovascular Medicine. *Curr Pharm Des*. 2017 Mar 26;23(6):903-914. doi: 10.2174/138161282366616111141954.
23. Duan X, Tu Q, Zhang J, Ye J, Sommer C, Mostoslavsky G, Kaplan D, Yang P, Chen J. Application of induced pluripotent stem (iPS) cells in periodontal tissue regeneration. *J Cell Physiol*. 2011 Jan;226(1):150-7. doi: 10.1002/jcp.22316.
24. Egea-Guerrero JJ, Carmona G, Correa E, Mata R, Arias-Santiago S, Alaminos M, Gacto P, Cuende N. Transplant of Tissue-Engineered Artificial Autologous Human Skin in Andalusia: An Example of Coordination and Institutional Collaboration. *Transplant Proc*. 2019 Nov;51(9):3047-3050. doi: 10.1016/j.transproceed.2019.08.014. Epub 2019 Oct 15.
25. Eldeeb AE, Salah S, Elkasabgy NA. Biomaterials for Tissue Engineering Applications and Current Updates in the Field: A Comprehensive Review. *AAPS PharmSciTech*. 2022 Sep 26;23(7):267. doi: 10.1208/s12249-022-02419-1.
26. Eliades T. Orthodontic materials research and applications: part 2. Current status and projected future developments in materials and biocompatibility. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2007 Feb;131(2):253-62. doi: 10.1016/j.ajodo.2005.12.029.
27. Fanizza F, Campanile M, Forloni G, Giordano C, Albani D. Induced pluripotent stem cell-based organ-on-a-chip as personalized drug screening tools: A focus on neurodegenerative disorders. *J Tissue Eng*. 2022 May 9; 13:20417314221095339. doi: 10.1177/20417314221095339. eCollection 2022 Jan-Dec.
28. Farshidfar N, Amiri MA, Jafarpour D, Hamedani S, Niknezhad SV, Tayebi L. The feasibility of injectable PRF (I-PRF) for bone tissue engineering and its application in oral and maxillofacial reconstruction: From bench to chairside. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021 Nov 24:112557. doi: 10.1016/j.msec.2021.112557
29. 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. Usefulness of a bioengineered oral mucosa model for preventing palate bone alterations in rabbits with a mucoperiostial defect. *Biomed Mater*. 2016 Feb 19;11(1):015015. doi: 10.1088/1748-6041/11/1/015015.
30. Fernández-Valadés-Gámez R, Garzón I, Licerias-Licerias E, España-López A, Carriel V, Martín-Piedra MÁ, Muñoz-Miguel Sanz MÁ, Sánchez-Quevedo MC, Alaminos M, Fernández-Valadés R. Usefulness of a bioengineered oral mucosa model for preventing palate bone alterations in rabbits with a mucoperiostial defect. *Biomed Mater*. 2016 Feb 19;11(1):015015.
31. Ferreira MJS, Mancini FE, Humphreys PA, Ogene L, Buckley M, Domingos MAN, Kimber SJ. Pluripotent stem cells for skeletal tissue engineering. *Crit Rev Biotechnol*. 2022 Aug;42(5):774-793. doi: 10.1080/07388551.2021.1968785. Epub 2021 Sep 6.
32. Fu N, Dong T, Meng A, Meng Z, Zhu B, Lin Y. Research Progress of the Types and Preparation Techniques of Scaffold Materials in Cartilage Tissue Engineering. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018;13(7):583-590. doi: 10.2174/1574888X12666170718152611.

33. Fu X, He Q, Tao Y, Wang M, Wang W, Wang Y, Yu QC, Zhang F, Zhang X, Chen YG, Gao D, Hu P, Hui L, Wang X, Zeng YA. Recent advances in tissue stem cells. *Sci China Life Sci.* 2021 Dec;64(12):1998-2029. doi: 10.1007/s11427-021-2007-8. Epub 2021 Nov 30.
34. Gainza G, Pastor M, Aguirre JJ, Villullas S, Pedraz JL, Hernandez RM, Igartua M. A novel strategy for the treatment of chronic wounds based on the topical administration of rhEGF-loaded lipid nanoparticles: In vitro bioactivity and in vivo effectiveness in healing-impaired db/db mice. *J Control Release.* 2014 Jul 10; 185:51-61. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.04.032. Epub 2014 Apr 29.
35. García-Martínez L, Campos F, Godoy-Guzmán C, Del Carmen Sánchez-Quevedo M, Garzón I, Alaminos M, Campos A, Carriel V. Encapsulation of human elastic cartilage-derived chondrocytes in nanostructured fibrin-agarose hydrogels. *Histochem Cell Biol.* 2017 Jan;147(1):83-95. doi: 10.1007/s00418-016-1485-9. Epub 2016 Sep 1.
36. Garzón I, Miyake J, González-Andrades M, Carmona R, Carda C, Sánchez-Quevedo Mdel C, Campos A, Alaminos M. Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration. *Stem Cells Transl Med.* 2013 Aug;2(8):625-32. doi: 10.5966/sctm.2012-0157. Epub 2013 Jul 1.
37. Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Jaranay M, González-Andrades M, Montalvo A, Campos A, Alaminos M. In vitro and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. *J Periodontal Res.* 2009 Oct;44(5):588-97. doi: 10.1111/j.1600-0765.2008.01159.x. Epub 2009 Mar 7.
38. Giordano li R. Ceramics overview. *Br Dent J.* 2022 May;232(9):658-663. doi: 10.1038/s41415-022-4242-6. Epub 2022 May 13.
39. Gnanasekar S, Kasi G, He X, Zhang K, Xu L, Kang ET. Recent advances in engineered polymeric materials for efficient photodynamic inactivation of bacterial pathogens. *Bioact Mater.* 2022 Aug 21; 21:157-174. doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.08.011. eCollection 2023 Mar.
40. Gómez C, Galán JM, Torrero V, Ferreiro I, Pérez D, Palao R, Martínez E, Llamas S, Meana A, Holguín P. Use of an autologous bioengineered composite skin in extensive burns: Clinical and functional outcomes. A multicentric study. *Burns.* 2011 Jun;37(4):580-9. doi: 10.1016/j.burns.2010.10.005. Epub 2011 Jan 20.
41. González-Andrades M, Mata R, González-Gallardo MDC, Medialdea S, Arias-Santiago S, Martínez-Atienza J, Ruiz-García A, Pérez-Fajardo L, Lizana-Moreno A, Garzón I, Campos A, Alaminos M, Carmona G, Cuende N. A study protocol for a multicentre randomised clinical trial evaluating the safety and feasibility of a bioengineered human allogeneic nanostructured anterior cornea in patients with advanced corneal trophic ulcers refractory to conventional treatment. *BMJ Open.* 2017 Sep 24;7(9):e016487.
42. Gris-Cárdenas I, Rábano M, Vivanco MDM. Patient-Derived Explant Cultures of Normal and Tumor Human Breast Tissue. *Methods Mol Biol.* 2022; 2471:301-307.
43. Guan N, Liu Z, Zhao Y, Li Q, Wang Y. Engineered biomaterial strategies for controlling growth factors in tissue engineering. *Drug Deliv.* 2020 Dec;27(1):1438-1451. doi: 10.1080/10717544.2020.1831104.
44. Gurusamy N, Alsayari A, Rajasingh S, Rajasingh J. Adult Stem Cells for Regenerative Therapy. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2018; 160:1-22. doi: 10.1016/bs.pmbts.2018.07.009. Epub 2018 Sep 6.
45. Halper J, Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 802:31-47.
46. Hasan ML, Padalhin AR, Kim B, Lee BT. Preparation and evaluation of BCP-CSD-agarose composite microsphere for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2019 Oct;107(7):2263-2272. doi: 10.1002/jbm.b.34318. Epub 2019 Jan 24.
47. Hashimoto K. Regulation of keratinocyte function by growth factors. *J Dermatol Sci.* 2000 Dec;24 Suppl 1: S46-50. doi: 10.1016/s0923-1811(00)00141-9.
48. Heathman TR, Glyn VA, Picken A, Rafiq QA, Coopman K, Nienow AW, Kara B, Hewitt CJ. Expansion, harvest and cryopreservation of human mesenchymal stem cells in a serum-free microcarrier process. *Biotechnol Bioeng.* 2015 Aug;112(8):1696-707.
49. Ionescu AM, Alaminos M, de la Cruz Cardona J, de Dios García-López Durán J, González-Andrades M, Ghinea R, Campos A, Hita E, del Mar Pérez M. Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: rheological properties. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2011 Nov;4(8):1963-73. doi: 10.1016/j.jmbbm.2011.06.013. Epub 2011 Jun 30.

50. Irastorza-Lorenzo A, Sánchez-Porras D, Ortiz-Arrabal O, de Frutos MJ, Esteban E, Fernández J, Janer A, Campos A, Campos F, Alaminos M. Evaluation of Marine Agarose Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 15;22(4):1923. doi: 10.3390/ijms22041923.
51. Kasai Y, Takagi R, Kobayashi S, Owaki T, Yamaguchi N, Fukuda H, Sakai Y, Sumita Y, Kanai N, Isomoto H, Kanetaka K, Ohki T, Asahina I, Nagai K, Nakao K, Takeda N, Okano T, Eguchi S, Yamato M. A stable protocol for the fabrication of transplantable human oral mucosal epithelial cell sheets for clinical application. *Regen Ther*. 2020 Jan 16; 14:87-94.
52. Kim YH, Dawson JI, Oreffo ROC, Tabata Y, Kumar D, Aparicio C, Mutreja I. Gelatin Methacryloyl Hydrogels for Musculoskeletal Tissue Regeneration. *Bioengineering (Basel)*. 2022 Jul 21;9(7):332. doi: 10.3390/bioengineering9070332.
53. Koh HS, Yong T, Chan CK, Ramakrishna S. Enhancement of neurite outgrowth using nano-structured scaffolds coupled with laminin. *Biomaterials*. 2008 Sep;29(26):3574-82. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.05.014. Epub 2008 Jun 3.
54. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2013;85(1):3-10. doi: 10.1159/000345615. Epub 2012 Dec 13.
55. Kubo K. Effects of static stretching on mechanical properties and collagen fiber orientation of the Achilles tendon in vivo. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2018 Dec; 60:115-120. doi: 10.1016/j.clinbiomech.2018.10.013. Epub 2018 Oct 16.
56. Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. *J Pediatr Surg*. 2016 Jan;51(1):8-12. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022. Epub 2015 Nov 10.
57. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920-6. doi: 10.1126/science.8493529.
58. Liu R, Yan M, Chen S, Huang W, Wu D, Chen J. Effectiveness of Platelet-Rich Fibrin as an Adjunctive Material to Bone Graft in Maxillary Sinus Augmentation: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Biomed Res Int*. 2019 Mar 17; 2019:7267062. doi: 10.1155/2019/7267062. eCollection 2019.
59. Llamas S, García E, García V, del Río M, Larcher F, Jorcano JL, López E, Holguín P, Miralles F, Otero J, Meana A. Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank*. 2006;7(1):47-53. doi: 10.1007/s10561-004-7253-4.
60. Malcor JD, Mallein-Gerin F. Biomaterial functionalization with triple-helical peptides for tissue engineering. *Acta Biomater*. 2022 Aug; 148:1-21. doi: 10.1016/j.actbio.2022.06.003. Epub 2022 Jun 5.
61. Marañés Gálvez C, Licerias Licerias E, Alaminos M, Fernández Valadés R, Ruiz Montes AM, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Campos A. Generación de un sustituto de mucosa oral humana y comprobación de su viabilidad mediante ingeniería tisular. *Cir Pediatr*. 2011 Jan;24(1):13-8.
62. Martín-Piedra MA, Alaminos M, Fernández-Valadés-Gámez R, España-López A, Licerias-Licerias E, Sánchez-Montesinos I, Martínez-Plaza A, Sánchez-Quevedo MC, Fernández-Valadés R, Garzón I. Development of a multilayered palate substitute in rabbits: a histochemical ex vivo and in vivo analysis. *Histochem Cell Biol*. 2017 Mar;147(3):377-388.
63. Martín-Piedra MA, Alfonso-Rodríguez CA, Zapater A, Durand-Herrera D, Chato-Astrain J, Campos F, Sánchez-Quevedo MC, Alaminos M, Garzón I. Effective use of mesenchymal stem cells in human skin substitutes generated by tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2019 Mar 29; 37:233-249. doi: 10.22203/eCM.v037a14.
64. Martín-Piedra MA, Garzón I, Gómez-Sotelo A, García-Abril E, Jaimes-Parra BD, López-Cantarero M, Alaminos M, Campos A. Generation and Evaluation of Novel Stromal Cell-Containing Tissue Engineered Artificial Stromas for the Surgical Repair of Abdominal Defects. *Biotechnol J*. 2017 Dec;12(12).
65. Martín-Piedra MA, Garzón I, Oliveira AC, Alfonso-Rodríguez CA, Carriel V, Scionti G, Alaminos M. Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. *Cytherapy*. 2014 Feb;16(2):266-77. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.10.016.
66. Martín-Piedra MA, Garzón I, Oliveira AC, Alfonso-Rodríguez CA, Sánchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M. Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering. *Cytherapy*. 2013 Apr;15(4):507-18. doi: 10.1016/j.jcyt.2012.11.017. Epub 2013 Jan 23.
67. Matichescu A, Ardelean LC, Rusu LC, Craciun D, Bratu EA, Babucea M, Leretter M. Advanced Biomaterials and Techniques for Oral Tissue Engineering and Regeneration-A Review. *Materials (Basel)*. 2020 Nov 23;13(22):5303. doi: 10.3390/ma13225303.

68. Mosaddad SA, Rasoolzade B, Namanloo RA, Azarpira N, Dortaj H. Stem cells and common biomaterials in dentistry: a review study. *J Mater Sci Mater Med*. 2022 Jun 18;33(7):55. doi: 10.1007/s10856-022-06676-1.
69. Moussa DG, Aparicio C. Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin-pulp complex regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019 Jan;13(1):58-75.
70. Ngah NA, Ratnayake J, Cooper PR, Dias GJ, Tong DC, Mohd Noor SNF, Hussaini HM. Potential of Lyophilized Platelet Concentrates for Craniofacial Tissue Regenerative Therapies. *Molecules*. 2021 Jan 20;26(3):517. doi: 10.3390/molecules26030517.
71. Noori A, Ashrafi SJ, Vaez-Ghaemi R, Hatamian-Zaremi A, Webster TJ. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine*. 2017 Jul 12; 12:4937-4961. doi: 10.2147/IJN.S124671. eCollection 2017.
72. Oliveira AC, Garzón I, Ionescu AM, Carriel V, Cardona Jde L, González-Andrades M, Pérez Mdel M, Alaminos M, Campos A. Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering. *PLoS One*. 2013 Jun 14;8(6): e66538. doi: 10.1371/journal.pone.0066538. Print 2013.
73. Ono M, Bulun SE, Maruyama T. Tissue-specific stem cells in the myometrium and tumor-initiating cells in leiomyoma. *Biol Reprod*. 2014 Dec;91(6):149. doi: 10.1095/biolreprod.114.123794. Epub 2014 Nov 5.
74. Osorio R, Alfonso-Rodríguez CA, Osorio E, Medina-Castillo AL, Alaminos M, Toledano-Osorio M, Toledano M. Novel potential scaffold for periodontal tissue engineering. *Clin Oral Investig*. 2017 Dec;21(9):2695-2707.
75. Park CH, Woo KM. Fibrin-Based Biomaterial Applications in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Adv Exp Med Biol*. 2018; 1064:253-261. doi: 10.1007/978-981-13-0445-3_16.
76. Pereira H, Frias AM, Oliveira JM, Espregueira-Mendes J, Reis RL. Tissue engineering and regenerative medicine strategies in meniscus lesions. *Arthroscopy*. 2011 Dec;27(12):1706-19. doi: 10.1016/j.arthro.2011.08.283. Epub 2011 Oct 21.
77. Petre DG, Leeuwenburgh SCG. The Use of Fibers in Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2022 Feb;28(1):141-159. doi: 10.1089/ten.TEB.2020.0252. Epub 2021 Feb 17.
78. Rashed FM, GabAllah OM, AbuAli SY, Shredah MT. The Effect of Using Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Versus Platelet Rich Plasma on the Healing of Induced Oral Ulcer in Albino Rats. *Int J Stem Cells*. 2019 Mar 30;12(1):95-106. doi: 10.15283/ijsc18074.
79. Requicha JF, Viegas CA, Hede S, Leonor IB, Reis RL, Gomes ME. Design and characterization of a biodegradable double-layer scaffold aimed at periodontal tissue-engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016 May;10(5):392-403. doi: 10.1002/term.1816. Epub 2013 Sep 1.
80. Rico-Sánchez L, Garzón I, González-Andrades M, Ruíz-García A, Punzano M, Lizana-Moreno A, Muñoz-Ávila JI, Sánchez-Quevedo MDC, Martínez-Atienza J, Lopez-Navas L, Sanchez-Pernaute R, Oruezabal RI, Medialdea S, Gonzalez-Gallardo MDC, Carmona G, Sanbonmatsu-Gámez S, Perez M, Jimenez P, Cuende N, Campos A, Alaminos M. Successful development and clinical translation of a novel anterior lamellar artificial cornea. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019 Dec;13(12):2142-2154. doi: 10.1002/term.2951. Epub 2019 Oct 25.
81. Rodríguez IA, López-López MT, Oliveira AC, Sánchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M, Durán JD. Rheological characterization of human fibrin and fibrin-agarose oral mucosa substitutes generated by tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012 Aug;6(8):636-44. doi: 10.1002/term.466. Epub 2011 Sep 14.
82. Romanazzo S, Kopecky C, Jiang S, Doshi R, Mukund V, Srivastava P, Rnjak-Kovacina J, Kelly K, Kilian KA. Biomaterials directed activation of a cryostable therapeutic secretome in induced pluripotent stem cell derived mesenchymal stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2022 Aug 26.
83. Rosellini E, Cristallini C, Guerra GD, Barbani N. Surface chemical immobilization of bioactive peptides on synthetic polymers for cardiac tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2015;26(9):515-33. doi: 10.1080/09205063.2015.1030991. Epub 2015 Apr 21.
84. Salati MA, Khazai J, Tahmuri AM, Samadi A, Taghizadeh A, Taghizadeh M, Zarrintaj P, Ramsey JD, Habibzadeh S, Seidi F, Saeb MR, Mozafari M. Agarose-Based Biomaterials: Opportunities and Challenges in Cartilage Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. 2020 May 18;12(5):1150. doi: 10.3390/polym12051150.

85. San Martin S, Alaminos M, Zorn TM, Sánchez-Quevedo MC, Garzón I, Rodriguez IA, Campos A. The effects of fibrin and fibrin-agarose on the extracellular matrix profile of bioengineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013 Jan;7(1):10-9. doi: 10.1002/term.490. Epub 2011 Nov 3.
86. San Martin S, Alaminos M, Zorn TM, Sánchez-Quevedo MC, Garzón I, Rodriguez IA, Campos A. The effects of fibrin and fibrin-agarose on the extracellular matrix profile of bioengineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013 Jan;7(1):10-9. doi: 10.1002/term.490. Epub 2011 Nov 3.
87. Sapudom J, Rubner S, Martin S, Thoenes S, Anderegg U, Pompe T. The interplay of fibronectin functionalization and TGF- β 1 presence on fibroblast proliferation, differentiation and migration in 3D matrices. *Biomater Sci*. 2015 Sep;3(9):1291-301. doi: 10.1039/c5bm00140d.
88. Scionti G, Moral M, Toledano M, Osorio R, Durán JD, Alaminos M, Campos A, López-López MT. Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model. *J Biomed Mater Res A*. 2014 Aug;102(8):2573-82. doi: 10.1002/jbm.a.34929. Epub 2013 Sep 2.
89. Seol D, Yu Y, Choe H, Jang K, Brouillette MJ, Zheng H, Lim TH, Buckwalter JA, Martin JA. Effect of short-term enzymatic treatment on cell migration and cartilage regeneration: in vitro organ culture of bovine articular cartilage. *Tissue Eng Part A*. 2014 Jul;20(13-14):1807-14.
90. Sharma K, Bullock A, Ralston D, MacNeil S. Development of a one-step approach for the reconstruction of full thickness skin defects using minced split thickness skin grafts and biodegradable synthetic scaffolds as a dermal substitute. *Burns*. 2014 Aug;40(5):957-65.
91. Stadlinger B, Hintze V, Bierbaum S, Möller S, Schulz MC, Mai R, Kuhlisch E, Heinemann S, Scharnweber D, Schnabelrauch M, Eckelt U. Biological functionalization of dental implants with collagen and glycosaminoglycans-A comparative study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012 Feb;100(2):331-41. doi: 10.1002/jbm.b.31953. Epub 2011 Nov 21.
92. Stephenson MK, Farris AL, Grayson WL. Recent Advances in Tissue Engineering Strategies for the Treatment of Joint Damage. *Curr Rheumatol Rep*. 2017 Aug;19(8):44. doi: 10.1007/s11926-017-0671-7.
93. Tumedei M, Mijiritsky E, Mourão CF, Piattelli A, Degidi M, Mangano C, Iezzi G. Histological and Biological Response to Different Types of Biomaterials: A Narrative Single Research Center Experience over Three Decades. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Jun 28;19(13):7942. doi: 10.3390/ijerph19137942.
94. Viñuela-Prieto JM, Sánchez-Quevedo MC, Alfonso-Rodríguez CA, Oliveira AC, Scionti G, Martín-Piedra MA, Moreu G, Campos A, Alaminos M, Garzón I. Sequential keratinocytic differentiation and maturation in a three-dimensional model of human artificial oral mucosa. Vallittu PK, Närhi TO, Hupa L. Fiber glass-bioactive glass composite for bone replacing and bone anchoring implants. *Dent Mater*. 2015 Apr;31(4):371-81. doi: 10.1016/j.dental.2015.01.003. Epub 2015 Jan 29.
95. Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem*. 2005; 70:247-99. doi: 10.1016/S0065-3233(05)70008-5.
96. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Feb 26;10(1):68. doi: 10.1186/s13287-019-1165-5.
97. Zarrintaj P, Manouchehri S, Ahmadi Z, Saeb MR, Urbanska AM, Kaplan DL, Mozafari M. Agarose-based biomaterials for tissue engineering. *Carbohydr Polym*. 2018 May 1; 187:66-84. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.01.060. Epub 2018 Jan 31.
98. Zumarán CC, Parra MV, Olate SA, Fernández EG, Muñoz FT, Haidar ZS. The 3 R's for Platelet-Rich Fibrin: A "Super" Tri-Dimensional Biomaterial for Contemporary Naturally-Guided Oro-Maxillo-Facial Soft and Hard Tissue Repair, Reconstruction and Regeneration. *Materials (Basel)*. 2018 Jul 26;11(8):1293. doi: 10.3390/ma11081293.