

Recomendaciones para la evaluación de las propiedades biomecánicas de hidrogeles de fibrina agarosa nanoestructurado por medio de microscopia de fuerza atómica

Lucila Ospina Toro¹, Sandra Patricia Muñoz Tocua¹, Camilo Alfonso Rodríguez², Sebastián Jaramillo², Gustavo Jaimes Monroy², David Gutiérrez³

1. Estudiantes de postgrado de Periodoncia de la Universidad Antonio Nariño- Bogotá Colombia
2. Docente investigador del postgrado de Periodoncia de la Universidad Antonio Nariño- Bogotá Colombia
3. Docente investigador del postgrado de Periodoncia de la Universidad Antonio Nariño- Popayán – Cauca- Colombia

Resumen. (250 palabras)

Introducción: La agarosa nanoestructurada con fibrina es un material usado recientemente en aplicaciones de bioingeniería, pero aún no conocen las propiedades físicas, mecánicas y las características topográficas de superficie en nanoescala.

Objetivo. revisar la teoría y contrastar con algunos resultados previos de laboratorio en relación con ensayos sobre andamios de hidrogeles de fibrina agarosa para los valores de fuerza de perforación, fuerza de adhesión, como propiedades físicas y módulo de elasticidad aparente como propiedad mecánica por valoración con microscopía de fuerza atómica.

Métodos: Se obtuvieron muestras de hidrogeles fibrina agarosa y se hizo un análisis preliminar en microscopia de fuerza atómica (AFM). Se revisaron artículos de las bases de datos Pubmed, google scholar y sciencedirect, con unos algoritmos de búsqueda para extraer la información acerca de los parámetros de análisis en AFM en muestra de hidrogeles de fibrina-agarosa.

Resultados. Las pruebas preliminares mostraron que la punta piramidal sin recubrimiento mostró una mejor penetración en la superficie del material sin generar

desgarros o adhesión al material y no se requirió un adhesivo para fijar las muestras debido a las características del material. La revisión teórica mostró que para muestras de hidrogeles lo ideal es hacer análisis de AFM en medio líquido con un buffer, que también puede ser usado como medio de transporte. De igual forma se recomienda usar cargas bajas y una constante entre $k=0,01-0,9$ N/m. El tiempo de contacto ideal es de 100ms y una fuerza máxima de 100 pN por cada indentación.

Conclusiones: La Microscopía de Fuerza Atómica se puede usar para el análisis en escala nanométrica de los geles de fibrina agarosa, pero requiere establecer unos parámetros estandarizados para evitar inconvenientes con las muestra.

Palabras clave (DeCS): Ingeniería de tejidos, Agarosa, fibrina, andamios del tejido, materiales biocompatibles, regeneración tisular dirigida, microscopia de fuerza atómica, hidrogeles.

Abstract (250 words)

Introduction: The nanostructured agarose-fibrin is a material recently used in bioengineering applications, but the physical, mechanical and surface topographic characteristics at the nanoscale are still unknown.

Objective. Is to review the theory and contrast with some previous laboratory results in relation to tests on hydrogel fibrin agarose scaffolds for the values of perforation force, adhesion force, as physical properties and apparent modulus of elasticity as mechanical property by evaluation with microscopy of atomic force.

Methods: Samples of agarose-fibrin hydrogels were obtained, and a preliminary analysis was carried out in atomic force microscopy (AFM). Articles from the Pubmeds, google scholar, and sciencedirect databases were reviewed with search algorithms to extract information about the analysis parameters in AFM in a fibrin-agarose hydrogel sample.

Results. Preliminary tests showed that the uncoated pyramid tip showed better penetration into the material surface without creating tears or adhesion to the material and an adhesive was not required to fix the samples due to the characteristic of the material. The theoretical review showed that for hydrogel

samples, the ideal is to do AFM analysis in liquid medium with a buffer, which can also be used as a means of transport. In the same way, it is recommended to use low loads and a constant between $k = 0.01-0.9 \text{ N / m}$. The ideal contact time is 100ms and a maximum force of 100pN for each indentation.

Conclusions: Atomic force microscopy can be used for the analysis on a nanometric scale of fibrin agarose gels, but it requires establishing standardized parameters to avoid inconveniences with the samples.

Keywords: Tissue Engineering, agarose, fibrin, scaffolds, Guided Tissue Regeneration, atomic force microscopy,

Introducción.

La ingeniería de tejidos es una ciencia multidisciplinar que tiene por objeto desarrollar materiales y técnicas para regenerar tejidos vivos a partir de la aplicación de conceptos de ingeniería, biología y otras disciplinas (1). Los tres componentes importantes que sustentan la ingeniería tisular son las células, los andamios y las moléculas de señalización (2). Los andamios celulares deben tener propiedades mecánicas adecuadas que permitan la interacción biológica con las células y estructuralmente debe tener poros con un tamaño suficiente para permitir la migración de las células a través de la estructura(3, 4).

La industria ha tenido un interés creciente y progresivo en el desarrollo de nuevos materiales para andamiaje. Uno de los retos en el desarrollo de estas estructuras tridimensionales es lograr un biomaterial con buenas propiedades biomecánicas sin que se pierdan las propiedades biológicas. Una de las alternativas para lograr este propósito ha sido la utilización de mezclas de diferentes materiales durante el desarrollo (3).

Recientemente se han realizado ensayos con hidrogeles, que son redes poliméricas hidrófilas tridimensionales que pueden absorber y retener grandes cantidades de

agua, pueden generarse a través de la reticulación física mediante fuerzas cohesivas débiles, como los enlaces iónicos o de hidrógeno y las interacciones van der Waals, o la reticulación química mediante fuerzas covalentes estables que mejoran las propiedades mecánicas del hidrogel (5). La agarosa, es un hidrogel que se obtiene en polvo y se puede gelificar mediante termoinducción en un procedimiento sencillo y de bajo costo. Al pasar a un estado de gel, presenta una densidad similar a los líquidos, pero su estructura se asemeja más a la de un sólido. Esta característica le permite mezclarse con muchos otros materiales tanto líquidos como sólidos antes de que se gelifique (6, 7).

Se ha estudiado la combinación de fibrina con agarosa como un método sencillo para mejorar las características de los hidrogeles (8). Una técnica reciente propone realizar modificaciones a la agarosa por medio de la técnica de nanoestructuración, para mejorar las propiedades del material. Esta técnica se utiliza para mejorar la calidad del biomaterial, implica realizar cambios en escala nanométrica que afectan positivamente las propiedades de éste (9). Además, durante el proceso se pueden ajustar las propiedades biomecánicas de los hidrogeles (10).

Los estándares de calidad de biomateriales indican que además de las propiedades biológicas, deben cumplir con propiedades físicas como la resistencia, microdureza o elasticidad, entre otras (11). También deben tener propiedades mecánicas que permitan una mejor interacción con el tejido a reparar (12). Los métodos y ensayos mecánicos para evaluar estas propiedades de los materiales ya están estandarizados (13). Las pruebas mecánicas más comunes incluyen pruebas de tracción y compresión. Cada aplicación requiere un rango diferente para las propiedades del tejido u órgano nativo (14).

La agarosa nanoestructurada con fibrina (0,1%) es un material recientemente desarrollado y aunque ha sido eficientemente probado en diferentes tejidos *in vitro* (15, 16), hay evidencia que demuestra óptimas propiedades biológicas (17), las propiedades físicas, mecánicas y las características topográficas de superficie no

han sido evaluadas en escala nanométrica. El objetivo del presente estudio es revisar la teoría y contrastar con algunos resultados previos de laboratorio en relación con ensayos sobre andamios de hidrogeles de fibrina agarosa para los valores de fuerza de perforación, fuerza de adhesión, como propiedades físicas y módulo de elasticidad aparente como propiedad mecánica por valoración con microscopía de fuerza atómica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Se realizó un estudio descriptivo, preliminar *in vitro* y una revisión en la que se ofrecieron elementos para analizar muestras de hidrogeles de fibrina-agarosa por medio de microscopía de fuerza atómica.

Hidrogeles de fibrina-agarosa

Las muestras de hidrogeles de fibrina –agarosa 0,1% se obtuvieron en los laboratorios de investigación de la Universidad Antonio Nariño. Se siguió el protocolo propuesto por la Universidad de Granada (19). La fibrina fue obtenida desde plasma donado de un paciente en un banco de sangre.

Posteriormente, el plasma fue mezclado (en condiciones ambientales) con 75 μ l de ácido tranexámico (Amcha fibrina®) en un tubo estéril. Después se añadió 500 μ l de CaCl₂ al 2% a la solución para activar el proceso de polimerización de la fibrina. Finalmente se adicionó la agarosa tipo VII pre diluida en PBS (0,02 g/ml) hasta alcanzar la concentración final de agarosa de 0.1%. El volumen final se ajustó con 750 μ l de DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco®). Finalmente se vertieron 3ml en 10 placas de Petri y se llevaron a incubar a 37°C hasta lograr la gelificación completa (**Figura 1A**). Como control se utilizó un gel que consistía sólo en agarosa tipo VII diluida en PBS (0,02 g/ml). Una vez generadas las muestras, 4 de los geles de fibrina-agarosa fueron sometidos a compresión plástica (nanoestructuración) a 450g. Las muestras fueron colocadas entre un par de

membranas de filtro de nylon con un tamaño de poro de $0,22 \mu\text{m}$ y se comprimieron entre un par de papeles absorbentes estériles (Whatman de 3 mm de espesor), bajo una superficie plana de vidrio durante 10 minutos (**Figura 1B**).

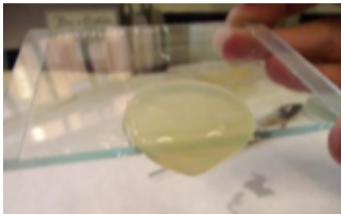
Todos los hidrogeles preparados tenían una forma similar a un disco, y la dirección de la nanoestructuración coincidió con el eje principal de la muestra en forma de disco (**Figura 1C**). Finalmente, las muestras nanoestructuradas fueron recortadas en tamaño de 5 x 5 cm para someterlas a los análisis biomecánicos.

Figura 1. Obtención de hidrogeles de fibrina-agarosa 0,1%

A. Fibrina agarosa sin y con nanoestructuración



B. Gel de fibrina agarosa sin nanoestructuración



C. Gel de fibrina agarosa nanoestructurado



Análisis de microscopía de fuerza atómica (AFM)

Una vez obtenidas las muestras fueron llevadas inmediatamente en una caja de petri pequeña sin medio líquido al laboratorio de microscopía de la Universidad de Los Andes y se analizaron en el microscopio de fuerza atómica (Asylum Research,

modelo MFP-3D-BIO) para realizar análisis topográficos de superficie y pruebas biomecánicas con nanoindentación dinámica.

Cada muestra de fibrina -agarosa fue transferida a una caja de petri pequeña y luego se esperó 5 minutos hasta que lograran la adhesión a la superficie de la caja. Luego se vertieron 1,5 ml de PBS para hacer el análisis en AFM en medio líquido.

Para la caracterización de superficie se utilizó una punta de 15 nm piramidal (100x0,8 μm) sin recubrimiento (TR800PSA) con una constante ($k=0,15$ N/m) y una frecuencia de resonancia de 24 kHz. El tiempo de contacto fue de 100ms y se usó una fuerza máxima de 100 pN por cada indentación.

Se utilizó la teoría general de contacto mecánico para el cálculo de la fuerza, adhesión y módulo elástico calculado, a partir de modelos basados en la teoría de Hertz. Por otra parte, se evaluó la topografía del hidrogel por medio del cálculo de la rugosidad media Ra en 5 puntos de la muestra seleccionados aleatoriamente. Se utilizó el software de uso libre (Gwyddion®) para realizar las reconstrucciones tridimensionales. Se obtuvo promedios y desviaciones estándar de las variables topográficas y biomecánicas.

Recomendaciones teóricas

Se realizó una recuperación de artículos científicos de los últimos cinco años utilizando el algoritmo “fibrina agarosa nanoestructurada” y “Microscopía de Fuerza Atómica” en español e inglés en las bases de datos PubMed, ScienceDirect y Google académico.

Los artículos se seleccionaron por título y resumen y sirvieron de base para realizar las recomendaciones cuando se estudian las propiedades físicas y mecánicas en hidrogeles de fibrina agarosa en contraste con los hallazgos en las pruebas preliminares de laboratorio.

Consideraciones éticas.

El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Antonio Nariño mediante el número de radicado 20160801.. Para su formulación y desarrollo se

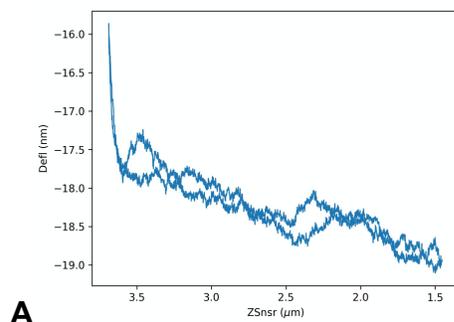
tuvo en cuenta tanto los contenidos de la declaración de Helsinki (20) para los aspectos bioéticos en general, así como, las recomendaciones vigentes en Colombia, la resolución 8430 de 1993 para investigación en salud, en la que se clasifica este estudio como de riesgo mínimo (21).

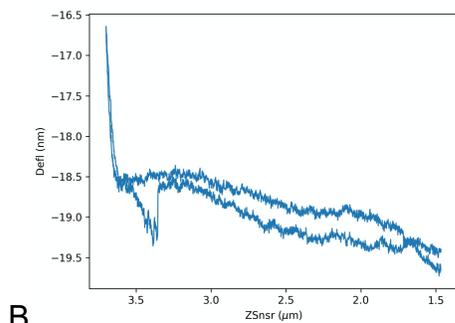
Resultados

Se obtuvo 4 muestras de gel de fibrina agarosa nanoestructurado de los cuales 2 tenían concentración 0.5% y los otros 2 de 1%. De cada concentración se produjo dos matrices con diferente espesor. Las muestras gelificadas se nanoestructuraron y se llevaron inmediatamente al laboratorio de análisis de AFM y se sumergieron en PBS (hasta 1 mm por encima). Luego de este procedimiento, se realizó el análisis dinámico.

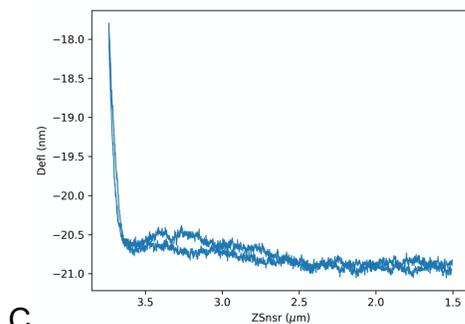
Se efectuó un ensayo inicial con puntas redondas, que son las indicadas para el análisis de materiales biológicos elásticos, pero se encontró mucha adhesión en diferentes puntos de la muestra (Figura 2a) y rupturas en varias zonas. Se optó por realizar el análisis con el mismo calibre de puntas pero con recubrimiento, para evitar la adhesión que ocasionaba el problema, esto, sin embargo, no logró disminuir la dificultad en la medición (Figura 2b). Finalmente se utilizó una punta piramidal sin recubrimiento que mostró una mejor penetración en la superficie del material (Figura 2c)

Figura 2





B



C

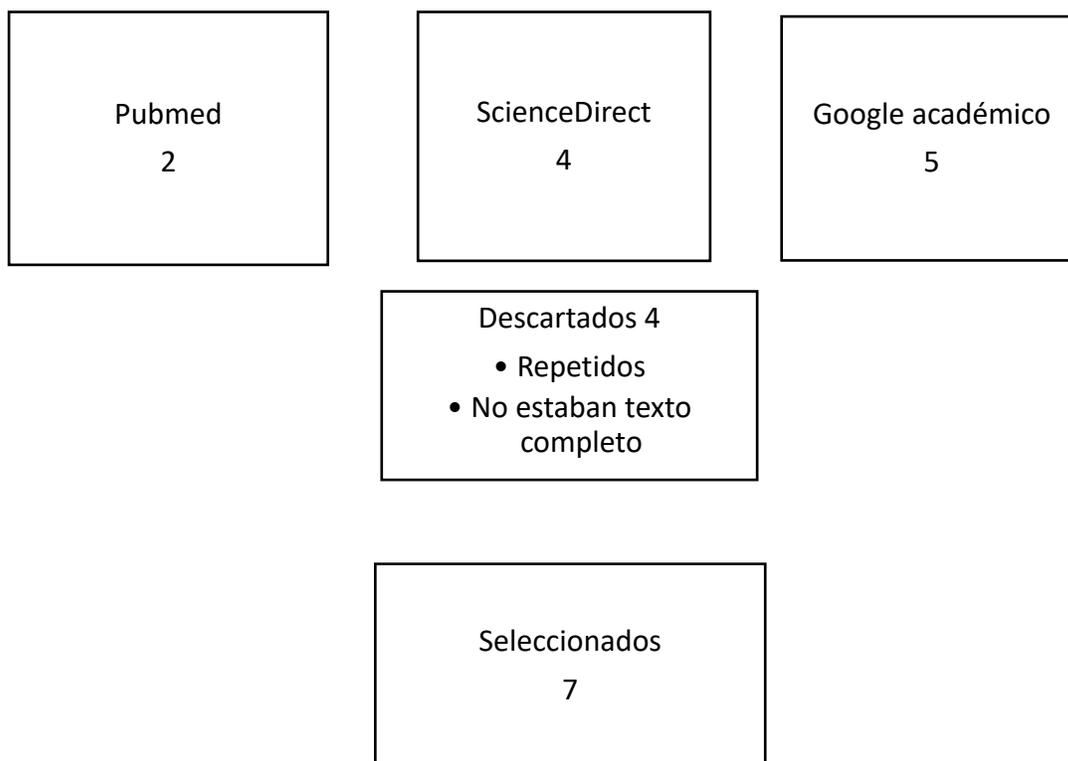
Una vez realizado el análisis dinámico se hizo una prueba preliminar de superficie en un área de $20 \times 20 \mu\text{m}$ y se evaluaron características superficiales.

II. Recomendaciones teóricas para ensayos de evaluación de propiedades biomecánicas en hidrogeles de fibrina agarosa nanoestructurados.

Se realizó una recuperación de artículos científicos de los últimos 10 años utilizando el algoritmo “*Fibrina Agarosa*” y “*Microscopía de Fuerza Atómica*” en inglés (“*Fibrin-Agarose*” AND “*Atomic Force Microscopy*”) en las bases de datos PubMed, ScienceDirect, y Google académico. Se utilizó el operador lógico “AND” en búsquedas avanzadas en cada una de las bases de datos. Dada la escasa información producida en relación con el problema y para cumplir con el objetivo de la investigación se realizaron adicionalmente búsquedas manuales con el objeto de establecer y seleccionar los documentos más relevantes.

Una vez realizada la búsqueda en las bases de datos, se encontraron $n=2$ artículos en PubMed , $n=4$ artículos en ScienceDirect, y $n=5$ en Google Académico.

Diagrama de búsqueda de literatura



Desde las búsquedas efectuadas se seleccionaron aquellos artículos que permitieron realizar las recomendaciones a tener en cuenta para evaluar las propiedades biomecánicas en hidrogeles de esta naturaleza del estudio. Ver tabla 1.

Tabla 1. Resumen de artículos seleccionados

Nombre del artículo	Autores	Temática	Recomendaciones	SJR
Atomic force microscopy-based force measurements on animal cells and tissues	Gautier, H et al (2015)	Mediciones de propiedades físico químicas en células y tejidos similares	Calibración preliminar del cantiléver, cálculo de la constante (k) para tejidos biológicos. Inmovilización de la muestra biológica	Q3

Atomic force microscopy of fibrin networks and plasma clots during fibrinolysis	Blinc A et al	Evaluaron muestras de fibrina activada con cloruro de calcio en diferentes concentraciones. Midieron tamaño de fibra y de poro, pero no hicieron mediciones nanomecánicas	Utilizar medio líquido para evaluar las muestras Análisis de única imagen 128 × 128 μm to 0.7×0.7 μm. con resolución de 512 × 512 pixels. Tapping mode. Fibrinógeno de plasma humano fresco. Cantilever de Si3 N4 y punta redonda de radio 10nm	Q3
Nonuniform Internal Structure of Fibrin Fibers: Protein Density and Bond Density Strongly Decrease with Increasing Diameter	Li, W et al (2017)	Evaluaron muestras de fibrin de diferentes pacientes y realcionaron el tamaño de la fibra y el modulo de Young medido con AFM The spring constant $k=0.03$ N/m 0.09 N/m, Y f de 10 kHz a 20 kHz. (Frecuencia de resonancia)	El material es muy adhesive y debe usarse puntas que no se adhieran. El tamaño de la fibra esta relacionado directamente proporcional con el modulo elástico y con la adhesion	Q2
Seawater at the nanoscale: marine gel imaged by atomic force microscopy	Radić, T et al (2010)	Tecnicas para evaluación de geles biológicos con AFM	Utilización de PBS para muestras de gel marino. Medición de AFM en condiciones ambiente humedad (50-60%)	Q4
Effect of Tip Geometry of Atomic Force Microscope on Mechanical Responses of	Park, S et al (2010)	Evaluaron muestras de gel agarosa con AFM	Usaron modelos basados en la teoría Hertzian para el calculo de las variables mecánicas	Q1

Bovine Articular Cartilage and Agarose Ge		Modulo elástico, propiedades de superficie y nanomecánicas en diferentes concentraciones (2% y 3%)y las compararon con el cartilago	$F = \frac{4}{3} ER D$ para puntas de forma esférica ($R=2.5 \mu m$),	
Experimental study on the mechanical properties of Biological hydrogels of different concentrations	Alam, K (2020)	Propiedades mecánicas de Hidrogeles en diferentes concetraciones: agarosa y metacriloil	La concentración de los geles afecta las propiedades mecánicas como el módulo de Young	

Discusión.

Los biomateriales usados en ingeniería de tejido deben cumplir con ciertas propiedades físicas y/o químicas. Con las recientes técnicas de nanoestructuración de los biomateriales es necesario también realizar estudios de las propiedades en escala nanométrica, por medio de técnicas como la Microscopía de fuerza atómica. Uno de los retos para analizar materiales biológicos con esta metodología es identificar bien los parámetros de análisis como el medio, la fuerza, el tipo de punta, la teoría de análisis, entre otros. El objetivo del presente estudio es revisar la teoría y contrastar con algunos resultados previos de laboratorio en relación con ensayos sobre andamios de hidrogeles de fibrina agarosa para los valores de fuerza de perforación, fuerza de adhesión, como propiedades físicas y módulo de elasticidad aparente como propiedad mecánica por valoración con microscopía de fuerza atómica.

Para poder obtener un buen análisis de muestras biológicas con microscopía de fuerza atómica (AFM) se requiere establecer una serie de parámetros previos a la lectura de las muestras. Gautier y et al en 2015 publicaron la estandarización de

parámetros para realizar análisis de AFM en muestras biológicas como células y tejidos (18). Dentro de los diferentes aspectos reportados se estableció la importancia de realizar una calibración previa del cantiléver. En este estudio, también se hizo la calibración antes del análisis de las muestras, en el que se puso el andamio de fibrina-agarosa nanoestructurada en el lector del microscopio de fuerza atómica y se posicionó el laser en varias ocasiones sobre la muestra hasta obtener el máximo de reflexión. Similar a lo propuesto por Gautier y et al, en el presente estudio también se hicieron correcciones adicionales por cambios en el índice de refracción del medio, para posteriormente ajustar la posición del fotodiodo y obtener la más alta detección de la señal.

Una vez calibrado el equipo se debe determinar la fuerza previamente a la lectura de las muestras. En este estudio se utilizó una fuerza de 100 pN según los parámetros reportados por Gautier (18) en el que plantea diferentes fuerzas según el tipo de muestra, si son células o tejidos biológicos y la misma naturaleza de los tejidos. Esto es importante a tener en cuenta porque con mucha fuerza se puede destruir la muestra, o por el contrario con muy poca no se alcanzaría a realizar un escaneo correcto.

Una de las recomendaciones de preparación de las muestras sugeridas por Gautier (18) es que no se utilice agua como medio para análisis de AFM en medio líquido. En el presente estudio se utilizó buffer fisiológico salino (PBS) como lo sugiere Park y et al, en su estudio (19), en el que analizaron muestras de un gel de agarosa al 2% y 3% y utilizaron también PBS. Esto se debe a que posiblemente el agua puede generar interacciones electrostáticas que pueden alterar los resultados y el PBS no contiene iones que afecten estas condiciones.

Radic y et al utilizaron puntas siliconadas (TESP®, Veeco®) para realizar los análisis de muestras de geles marinos que tienen una estructura similar al gel de agarosa utilizado en presente estudio, en el cual, se hizo pruebas con puntas siliconadas pero no mostraron diferencias (20). Para la presente experiencia realizada también se utilizaron puntas redondas similares a las utilizadas por Blinc

y col, en su estudio en el que usaron puntas redondas de Si_3N_4 para evaluar muestras de fibrina durante el proceso de fibrinólisis (21). En el presente estudio se usaron piramidales porque las redondas fueron más susceptibles a adherirse a la muestra, como se observó en los gráficos anteriormente expuestos.

Por otra parte, las recomendaciones de Radic y et al (20) tienen que ver con que se realice una adquisición de imágenes en el modo contacto de $n=512$ muestras por línea, similar a los parámetros del estudio que se realizó aquí en el que también se utilizó la misma resolución de escaneo. Aunque Radic utilizó el software Nanoscope™ (Digital Instruments, version V531r1) y para el ensayo del presente estudio se utilizó el software Gwidion de uso gratuito.

Las gráficas de fuerza y deflexión obtenidas en el presente estudio mostraron diferentes errores tanto en la fase de aproximación como en la de retracción, que fueron ajustadas en el proceso de calibración. Gautier obtuvo gráficas en donde evidenciaron picos asociados con la adhesión del material, que coincide con las reportadas en este estudio (18). Estos picos se observan comúnmente por la misma naturaleza de los geles.

También, en el artículo de Li y et al, reportaron que se debe utilizar una constante entre $0,03 < \text{N/m}$ a $0,09 \text{ N/m}$, para este estudio se utilizó una $K=0,1 \text{ N/m}$. De igual forma utilizaron el mismo buffer de preparación de las muestras para el análisis en medio líquido (22).

Maaloum M y et al, en 1997 reportaron el primer trabajo de microscopía de fuerza atómica sobre muestras de geles de agarosa en diferentes concentraciones entre

el 1% y el 5%, en el trabajo, tan solo hicieron mediciones del tamaño del poro pero no realizaron análisis biomecánicos de las muestras (23). Identificaron una relación directa entre tamaño del poro y concentración del gel, los geles de menor concentración tenían tamaños de poro más grandes. En los resultados del presente estudio no fue posible determinar el tamaño de poro dado que ni se presentó la posibilidad de adhesión sobre la muestra.

Finalmente, en cuanto a las propiedades mecánicas y físicas de los hidrogeles, y en particular las propiedades elásticas tienen una alta importancia en el campo de la ingeniería de tejidos. Los tejidos biológicos exhiben una amplia gama de valores de módulo elástico con diferencias hasta de cientos de pascales(Pa). Alam y et al, encontraron que el modulo elástico de los hidrogeles de agarosa está relacionado con la concentración de los componentes y se puede ajustar según las necesidades de uso y aplicación del biomaterial (24). Usaron concentraciones de 2%, 3% ,4%, 5%, y 6%, en el que evidenciaron óptimos resultados con estas concentraciones, estas fueron distintas a las que se utilizaron en este estudio que fueron de 0,5% y 1% lo que indica que quizás sea la variable que no permitió la correcta obtención de imágenes desde el AFM y tendría que ser valorado en posteriores estudios.

Este estudio tuvo como limitaciones en la parte teórica que solo se tuvieron en cuenta los estudios científicos en idioma inglés y español, y en tres bases de datos. En cuanto a la parte experimental la limitación fue el número de muestras llevadas para prueba. Se sugiere realizar el estudio de AFM en la muestra de fibrina-agarosa con análisis triplicados y siguiendo los parámetros que se determinaron en esta revisión.

Conclusiones

Cuando se realiza un estudio de las propiedades físicas de fuerza de perforación y fuerza de adhesión y módulo de elasticidad aparente por valoración con microscopía electrónica de fuerza atómica se aprecia que se deben usar una punta piramidal sin recubrimiento, sin necesidad de adhesivos para inmovilizar las muestras. La revisión teórica mostró que para muestras de hidrogeles lo ideal es hacer análisis de AFM en medio líquido con un buffer, que también puede ser usado como medio de transporte. De igual forma se recomienda usar cargas bajas y una constante entre $k=0,01-0,9$ N/m. El tiempo de contacto ideal es de 100ms y una fuerza máxima de 100 pN por cada indentación. El análisis se puede hacer con modelos adaptados a partir de la teoría Hertziana.

Referencias

1. Hassanzadeh P, Atyabi F, Dinarvand R. Tissue engineering: Still facing a long way ahead. J Control Release. 2018;279:181-97.
2. O'Brien F. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Materials Today. 2011;14(3):88-95.
3. Hollister SJ. Scaffold engineering: a bridge to where? Biofabrication. 2009;1(1):012001.
4. Beitzel K, McCarthy MB, Cote MP, Russell RP, Apostolakis J, Ramos DM, et al. Properties of Biologic Scaffolds and Their Response to Mesenchymal Stem Cells. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery. 2014;30(3):289-98.
5. Zuidema JM, Rivet CJ, Gilbert RJ, Morrison FA. A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2014;102(5):1063-73.
6. Chato-Astrain J, Campos F, Roda O, Miralles E, Durand-Herrera D, Saez-Moreno JA, et al. In vivo Evaluation of Nanostructured Fibrin-Agarose Hydrogels With Mesenchymal Stem Cells for Peripheral Nerve Repair. Front Cell Neurosci. 2018;12:501.
7. Giuseppe MD, Law N, Webb B, R AM, Liew LJ, Sercombe TB, et al. Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. J Mech Behav Biomed Mater. 2018;79:150-7.

8. Carriel V, Vizcaino-Lopez G, Chato-Astrain J, Durand-Herrera D, Alaminos M, Campos A, et al. Scleral surgical repair through the use of nanostructured fibrin/agarose-based films in rabbits. *Exp Eye Res.* 2019;186:107717.
9. Campos F, Bonhome-Espinosa AB, Garcia-Martinez L, Duran JD, Lopez-Lopez MT, Alaminos M, et al. Ex vivo characterization of a novel tissue-like cross-linked fibrin-agarose hydrogel for tissue engineering applications. *Biomed Mater.* 2016;11(5):055004.
10. Benning L, Gutzweiler L, Trondle K, Riba J, Zengerle R, Koltay P, et al. Assessment of hydrogels for bioprinting of endothelial cells. *J Biomed Mater Res A.* 2018;106(4):935-47.
11. Yarlagala. Hassanzadeh P, Atyabi F, Dinarvand R. Tissue engineering: Still facing a long way ahead. *J Control Release.* 2018;279:181-97.
2. O'Brien F. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today.* 2011;14(3):88-95.
3. Hollister SJ. Scaffold engineering: a bridge to where? *Biofabrication.* 2009;1(1):012001.
4. Beitzel K, McCarthy MB, Cote MP, Russell RP, Apostolakos J, Ramos DM, et al. Properties of Biologic Scaffolds and Their Response to Mesenchymal Stem Cells. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery.* 2014;30(3):289-98.
5. Zuidema JM, Rivet CJ, Gilbert RJ, Morrison FA. A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014;102(5):1063-73.
6. Chato-Astrain J, Campos F, Roda O, Miralles E, Durand-Herrera D, Saez-Moreno JA, et al. In vivo Evaluation of Nanostructured Fibrin-Agarose Hydrogels With Mesenchymal Stem Cells for Peripheral Nerve Repair. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:501.
7. Giuseppe MD, Law N, Webb B, R AM, Liew LJ, Sercombe TB, et al. Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018;79:150-7.
8. Carriel V, Vizcaino-Lopez G, Chato-Astrain J, Durand-Herrera D, Alaminos M, Campos A, et al. Scleral surgical repair through the use of nanostructured fibrin/agarose-based films in rabbits. *Exp Eye Res.* 2019;186:107717.
- dda PK, Chandrasekharan M, Shyan JY. Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *Biomed Mater Eng.* 2005;15(3):159-77.
12. Bakht Khosh Hagh H, Farshi Azhar F. Reinforcing materials for polymeric tissue engineering scaffolds: A review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2019;107(5):1560-75.
13. Patel PP, Buckley C, Taylor BL, Sahyoun CC, Patel SD, Mont AJ, et al. Mechanical and biological evaluation of a hydroxyapatite-reinforced scaffold for bone regeneration. *J Biomed Mater Res A.* 2019;107(4):732-41.
14. Zhang J, Wehrle E, Vetsch JR, Paul GR, Rubert M, Mueller R. Alginate dependent changes of physical properties in 3D bioprinted cell-laden porous scaffolds affect cell viability and cell morphology. *Biomed Mater.* 2019.
15. Ionescu AM, Alaminos M, de la Cruz Cardona J, de Dios Garcia-Lopez Duran J, Gonzalez-Andrades M, Ghinea R, et al. Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: rheological properties. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2011;4(8):1963-73.
16. Campos-Cuerva R, Fernandez-Munoz B, Farfan Lopez F, Pereira Arenas S, Santos-Gonzalez M, Lopez-Navas L, et al. Nanostructured fibrin agarose hydrogel as a novel haemostatic agent. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(4):664-73.
17. Hong X, Annamalai RT, Kemerer TS, Deng CX, Stegemann JP. Multimode ultrasound viscoelastography for three-dimensional interrogation of microscale mechanical properties in heterogeneous biomaterials. *Biomaterials.* 2018;178:11-22.

18. Gautier H, Thompson A, Achouri S, Koser D, Holtzmann K, Moeendarbary E, et al. Atomic force microscopy-based force measurements on animal cells and tissues. *Methods in cell biology*. 2015;125.
19. Park S, Duong C, Lee J, Lee S, Son K. Effect of tip geometry of atomic force microscope on mechanical responses of bovine articular cartilage and agarose gel. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*. 2010;11(1):129-36.
20. Radić T, Svetličić V, Žutić V, Boulgaropoulos B. Seawater at the nanoscale: marine gel imaged by atomic force microscopy". *Journal of Molecular Recognition*. 2011;24(3):397-405.
21. Blinc A, Magdic J, Fric J, Musevic I. Atomic force microscopy of fibrin networks and plasma clots during fibrinolysis. *Fibrinolysis and proteolysis*. 2000;14(5):288-99.
22. Li W, Sigley J, Baker S, Helms C, Kinney M, Pieters M, et al. Nonuniform Internal Structure of Fibrin Fibers: Protein Density and Bond Density Strongly Decrease with Increasing Diameter. *BioMed research international*. 2017;2017:PMCID: PMC5654258.
23. Maaloum M, Pernodet N, Tinland B. Agarose gel structure using atomic force microscopy: gel concentration and ionic strength effects. *Electrophoresis*. 1998;19(10):1606-10.
24. K A, A H, M I, J U, S P. Experimental study on the mechanical properties of biological hydrogels of different concentrations. *Technology and health care : official journal of the European Society for Engineering and Medicine*. 2020.