

Proliferación celular en andamios de fibrina, agarosa y fibrina-agarosa: Revisión

Narrativa.

Cortés Múnera Yessica María*; Lacera Pérez Ovanys*; Pedraza Corrales Kelly Johanna*.

*Estudiantes Posgrado de Periodoncia, Facultad de Odontología, Universidad Antonio Nariño. Bogotá, Colombia.

RESUMEN:

Introducción: Los andamios debe estar diseñado para replicar *in vitro* la arquitectura del tejido nativo, para que las células se adhieran, se extiendan, proliferen, se diferencien y maduren, de manera similar a lo que hacen *in vivo*. El objetivo de esta revisión fue analizar la evidencia científica disponible sobre la proliferación celular en andamios basados en biomateriales de fibrina, agarosa y mezcla de fibrina-agarosa.

Materiales y métodos: Revisión narrativa, búsqueda bibliográfica de los últimos 5 años publicada en Medline-PubMed y Web of Science. durante el periodo de agosto y septiembre de 2020. Criterios de inclusión :1). Estudios experimentales *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*, 2) Estudios que evaluaran la proliferación celular en andamios de fibrina, agarosa y mezcla de fibrina-agarosa, 3). Ensayos preclínicos, 4). Revisiones bibliográficas, 5). Artículos publicados en inglés y español, 6). Documentos publicados entre 2016 y 2020. Se realizó análisis temático por tópicos en cada andamio: Tipos celulares, tipos de ensayos de proliferación celular, tiempos de evaluación de la proliferación celular y resultados de la proliferación celular.

Resultados: 40 artículos, 21 para fibrina, 9 para agarosa, 10 para fibrina-agarosa. Las células más usadas en los estudios de los tres andamios fueron las células madre mesenquimales de diversos orígenes. Los tipos de ensayo más utilizados fueron la cuantificación de ADN, el marcador de proliferación Ki67 y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). El periodo de tiempo de evaluación de la proliferación celular más usado fue de 1 a 7 días. Los resultados de la proliferación cualitativos fueron más prevalentes que los cuantitativos, encontrándose gran diversidad en los reportes.

Conclusiones: Se reporta que los tres andamios objeto de la revisión en general tienen la capacidad de promover la proliferación celular.

PALABRAS CLAVE: Fibrin, agarose, fibrin-agarose, cell proliferation, scaffolds, hydrogels.

INTRODUCCIÓN

Todos los tejidos y órganos contienen una mezcla de componentes celulares y no celulares, que forman redes bien organizadas llamadas matrices extracelulares (MEC). Las MEC proporcionan andamios físicos que dan soporte a las células, permitiendo interacciones entre ellas y con sus diversos componentes, que regulan procesos celulares cruciales como la proliferación, adhesión, migración y diferenciación celular, además determinan la organización tridimensional de los tejidos y órganos que surgen desde el desarrollo embrionario¹⁻².

La generación de un andamio apropiado para la regeneración de tejidos es uno de los componentes fundamentales de la ingeniería tisular³. El andamio debe estar diseñado para

replicar *in vitro* la arquitectura del tejido nativo, es decir, la estructura de la MEC para que las células se adhieran, se extiendan, proliferen, se diferencien y maduren, de manera similar a lo que hacen *in vivo*⁴. Su diseño se ha basado en materiales de origen natural como el alginato, ácido hialurónico, chitosan, colágeno y gelatina⁵⁻⁹. También se han utilizado biopolímeros sintéticos tales como el ácido poli glicólico (PGA)¹⁰, ácido poliláctico (PLA)¹¹, ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA)¹², generado con la mezcla de algunos materiales como colágeno y PLGA^{17,18}, chitosan y gelatina¹⁹, policaprolactona (PCL) y gelatina^{20,21}, PCL Y PLA²².

Los materiales de origen natural son biopolímeros que tienen la capacidad de formar hidrogeles. Los hidrogeles son materiales altamente hidratados, compuestos de polímeros hidrófilos similares a las macromoléculas biológicas que son reticulados para formar redes tridimensionales; teniendo una estructura similar a la MEC de muchos tejidos humanos²³. Dentro de estos biomateriales, la fibrina y la agarosa ha sido ampliamente utilizada en ingeniería tisular para la fabricación de sustitutos de tejidos. La fibrina es un biopolímero natural, formado fisiológicamente durante el último paso de la cascada de coagulación por la acción de la trombina sobre el fibrinógeno. La matriz de fibrina no solo actúa como una barrera que previene una mayor pérdida de sangre, sino que también proporciona un andamio temporal necesario para apoyar la cicatrización y remodelación de los tejidos²⁴. Tiene además la capacidad de adaptarse para proporcionar un microambiente biomimético específico de tejido, para que las células se alojen, mejorando su retención, proliferación y viabilidad *in situ*²⁵. Por su parte la agarosa es un polisacárido formado por galactosas alfa-beta que se extrae de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*, con la característica de formar geles biocompatibles y presentar una gelificación termo-reversible²⁶. Presenta una estructura

similar a la MEC, con una alta capacidad de absorbancia de agua que es útil para el crecimiento, diferenciación y proliferación celular²⁷.

En años recientes, un nuevo hidrogel híbrido compuesto de fibrina humana y agarosa tipo VII, se ha utilizado como andamio para la generación de tejidos bioartificiales tales como córnea²⁸, mucosa oral²⁹, piel³⁰, nervio periférico³¹, cartílago³², paladar³³, mucosa vesical³⁴, paredes abdominales³⁵ y andamios magnéticos³⁶, con resultados relevantes *in vitro* e *in vivo*, con posible aplicación clínica. Estos estudios previos demostraron que los modelos de tejidos basados en la mezcla de estos biomateriales fueron altamente biocompatibles, biodegradables y soportaron los procesos celulares³⁷.

La proliferación celular es un requerimiento fundamental para el desarrollo del organismo y la homeostasis³⁸. En el campo de la ingeniería tisular los componentes y la estructura del andamio tienen un papel importante que influencia directamente el comportamiento de la proliferación de las células, funcionando como una matriz extracelular artificial. Es necesario tener en cuenta la proliferación celular para evaluar la calidad y biocompatibilidad de los andamios, dado que un material con buenas propiedades mecánicas permitirá a las células cumplir procesos esenciales. Un andamio ideal debe ser biodegradable, con una tasa de degradación que se ajuste al tejido que quiere regenerar y debe contar con una estructura porosa adecuada para asegurarle a las células un espacio suficiente para su proliferación, formación y secreción de MEC³⁹. Teniendo en cuenta lo anterior el objetivo de esta revisión es analizar la evidencia científica disponible sobre la proliferación celular en andamios basados en biomateriales de fibrina, agarosa y mezcla de fibrina-agarosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda bibliográfica internacional de la literatura publicada en los últimos cinco años durante el periodo de agosto y septiembre de 2020. La estrategia de búsqueda de la información se realizó en las siguientes bases de datos: Medline-PubMed y Web of Science.

Los criterios de inclusión para el análisis de los documentos fueron los siguientes: 1). Estudios experimentales *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*, 2) Estudios que evaluaran la proliferación celular en andamios de fibrina, agarosa y mezcla de fibrina-agarosa, 3). Ensayos preclínicos, 4). Revisiones bibliográficas, 5). Artículos publicados en inglés y español, 6). Documentos publicados entre 2016 y 2020.

Las palabras claves se basaron en los términos: “fibrin”, “agarose”, “hydrogels”, “scaffolds”, “cell proliferation”. La mayoría de ellos están dentro de los términos Mesh a excepción de agarose que no se encontró individualmente. Con los siguientes algoritmos de búsqueda: (fibrin AND scaffolds AND cell proliferation), (fibrin AND hydrogels AND cell proliferation), (agarose AND scaffolds AND cell proliferation), (agarose AND hydrogels AND cell proliferation), (fibrin-agarose AND scaffolds AND cell proliferation), (fibrin-agarose AND hydrogels AND cell proliferation). Los resultados de la búsqueda se presentan en la tabla 1.

ALGORITMO	RESULTADOS PubMed	RESULTADOS Web of Science
“fibrin AND scaffolds AND cell proliferation”	135	205
“fibrin AND hydrogels AND cell proliferation”	84	137
“agarose AND scaffolds AND cell proliferation”	43	69
“agarose AND hydrogels AND cell proliferation”	55	38

“fibrin-agarose AND scaffolds AND cell proliferation”	3	5
“fibrin-agarose AND hydrogels AND cell proliferation”	6	4
	Total: 326	Total:458

Tabla 1. Resultados de algoritmos de búsqueda.

La base de la búsqueda bibliográfica se enfocó en hallar información sobre la proliferación celular en andamios basados en fibrina, agarosa y mezcla de fibrina-agarosa. En la búsqueda de bibliografía inicial se identificaron 784 artículos potenciales para el análisis, al hacer la preselección por lectura de título y resumen, se eligieron aquellos en los cuales se hiciera explícita la temática de andamios de fibrina, agarosa o mezcla de fibrina-agarosa (se seleccionaron 117 artículos), posteriormente se hizo un tamizaje para seleccionar las publicaciones que cumplieran con los criterios de inclusión excluyendo 77 artículos. Finalmente se seleccionaron 40 artículos que cumplieron con los criterios para el análisis. El proceso de selección se presenta en la figura 1, mediante un diagrama de flujo.

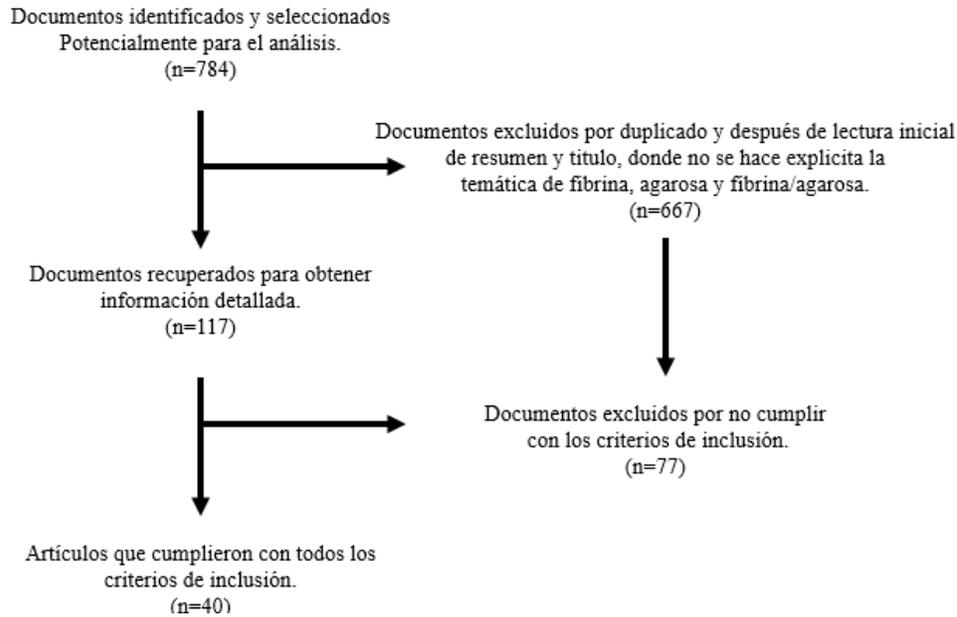


Figura 1. Diagrama de flujo del estudio. Proceso de selección de los documentos.

Análisis de datos: Se realizó análisis temático y se agruparon los documentos por tópicos, los cuales fueron: Tipos celulares, tipos de ensayos de proliferación celular, tiempos de evaluación de la proliferación celular y resultados de la proliferación celular. Estas temáticas fueron abordadas para cada andamio (fibrina, agarosa y fibrina-agarosa) de manera independiente.

Acorde a la Resolución 8430 de 1993, esta investigación no fue realizada en seres humanos, por lo que se cataloga sin riesgo.

RESULTADOS

De los 40 artículos, 25 fueron estudios *in vitro* 40,41,42,43,45,46,48,49,50,52,53,54,55,56,57,58,59,61,62,64,65,66,68,72,76, 8 estudios *in vitro/in vivo* 44,47,51,63,69,71,74,77, 3 estudios *ex vivo*^{36,37,70}, 2 estudios *in vitro/ex vivo*^{67,73}, 1 estudio *in*

vitro/preclínico⁷⁵ y 1 estudio *in vivo*⁶⁰. Los estudios que analizaron proliferación celular en fibrina fueron 21, en agarosa 9 y en fibrina-agarosa 10.

1. ANDAMIOS DE FIBRINA: PROLIFERACIÓN CELULAR

1.1 Tipos celulares

Los tipos celulares utilizados para la evaluación de la proliferación celular fueron variados, del total de los estudios analizados, las células madre mesenquimales humanas^{40,41} derivadas de tejido adiposo^{42,43}, de médula ósea⁴⁴⁻⁴⁶, de vena umbilical⁴⁷ y de conjuntiva⁴⁸ fueron las más usadas para la siembra en los andamios; el segundo grupo celular de mayor uso fue el de las células endoteliales⁴⁹, endoteliales microvasculares^{50,51} y derivadas de vena umbilical humana^{52,53}, del restante de la literatura hallada se identificó 1 estudio con células madre/progenitoras neuronales⁵⁴, 1 estudio con queratinocitos y fibroblastos de origen murino⁵⁵, 1 estudio con células conjuntivales humanas⁵⁶, 1 estudio con mioblastos humanos⁵⁷, 1 estudio con células del anillo fibroso bovinas⁵⁸ y por último un estudio con tres grupos celulares de neuronas piramidales, células madre neuronales y fibroblastos respectivamente⁵⁹.

1.2 Ensayos de proliferación celular

Respecto a la metodología utilizada, diferentes ensayos fueron llevados a cabo para evaluar la proliferación celular, 4 estudios realizaron cuantificación de ADN con los kits de ensayo dsDNA Quanti-iT™PicoGreen™^{46,50}, QuantiFluor⁵⁸ y kit de ensayo de proliferación celular CyQUANT⁴⁷ respectivamente, 3 estudios usaron el ensayo de proliferación celular CellTiter 96® Aqueous One Solution^{40,44,52}, 3 estudios el reactivo de viabilidad AlamarBlue®^{41,55,56}, 3 estudios el ensayo de proliferación celular MTT [3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-bromuro de

difeniltetrazolio]^{42,43,48}, 3 estudios utilizaron el marcador de proliferación Ki67^{57,58,60}, 2 estudios la evaluaron mediante microscopía confocal de barrido⁵⁴ y microscopía electrónica de barrido⁵⁹, 1 estudio por medio del ensayo XTT sal de tetrazol (3),2,3-bis-(2-methoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamin-carbonil-2H-tetrazol hidróxido)⁵³, 1 estudio usó timidina marcada con tritio ([³H])⁴⁵, 1 estudio utilizó ensayo basado en resazurina⁵¹ y finalmente 1 estudio utilizó análogo de timidina BrdU⁴⁹.

1.3 Tiempo de evaluación de proliferación celular

La proliferación celular en estos andamios fue evaluada en diferentes tiempos de cultivo, del total de los estudios el 85,8 % la reportó en rangos de días, mientras que el restante 14,2% la evaluó en horas^{45,53,59}, el periodo de tiempo de evaluación más común fue entre 1-7 días en 8 estudios^{40,43,47,48,49,52,57,58}, extendiéndose hasta 14 días en 5 estudios^{41,42,50,54,56}, 21 días⁴⁶ y máximo 22 días⁵⁵.

1.4 Resultados de proliferación celular

La literatura hallada en la búsqueda arrojó resultados cuantitativos en 7 estudios^{42,45,49,50,51,56,58} y cualitativos en 14^{40,41,43,44,46,47,48,52,53,54,55,57,59,60}. Los resultados reportados son muy variados, con relación a los estudios cualitativos los autores comentan que las células cultivadas dentro de los andamios de fibrina conservaron su capacidad proliferativa^{43,54,57,59,60}, también evidenciaron que el número celular en los andamios aumentó proporcionalmente a los diferentes tiempos de evaluación^{41,46,55} y concluyeron que la fibrina tiene la capacidad de soportar colonias celulares⁴⁰.

Los artículos que reportaron resultados cuantitativos hicieron uso adicional de moléculas, factores de crecimiento y péptidos para evaluar el comportamiento de la proliferación celular

en estos andamios, encontrando en uno de los estudios que la presencia de un medio condrogénico enriquecido con Piascledine, TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante β) o ambos, demostró que Piascledine podría aumentar significativamente la proliferación y supervivencia de células diferenciadas en el andamio de fibrina en comparación con los controles, adicionalmente el TGF- β 1 junto con Piascledine aumentó la proliferación celular en el andamio de fibrina significativamente más que TGF- β 1 solo en el andamio de fibrina-alginato ($p=0.045$)⁴². El uso del péptido T1 inmovilizado en andamios de fibrina demostró por medio del número de células, que su presencia no afectó la proliferación, la cual presentó un aumento con relación a los días 2 y 4 de cultivo 3D ($p < 0.001$ entre día 0-4 y 2-4 respectivamente)⁵¹. Finalmente, se observó que las células que fueron tratadas con adición de plasma rico en plaquetas en andamios de fibrina proliferaron de forma no significativa en comparación con la matriz ósea desmineralizada y tendón humano nativo, ($p=0.25$, $p=0.02$ y $p=0.02$ respectivamente)⁴⁵.

La cuantificación de la cantidad de ADN como método para analizar la proliferación celular presentó un aumento con el tiempo de cultivo, indicando así la proliferación de las células dentro de estos andamios, pero con tasas de proliferación diferente entre las proporciones (célula:fibrina), observándose para el día 7, que los microtejidos de proporción 1:1 contenían un 37% más de ADN que los microtejidos de proporción 1:3 ($p < 0.001$), y para el día 14 los microtejidos de proporción 1:1 contenían 52% más de ADN que los microtejidos de 1:3 ($p < 0.001$), indicando una proliferación celular significativamente mayor a una proporción más alta⁵⁰. La cuantificación de ADN mostró también que los andamios en concentraciones de Fibrina 70mg/ml-Genipin 1mg/ml y Fibrina 35mg/ml-Genipin 1mg/ml, contenían ADN significativamente mayor que las concentraciones de Fibrina 140mg/ml-Genipin 6mg/ml en

el día 1 ($p < 0.0469$). El ADN en concentraciones de Fibrina 35mg/ml-Genipin 1mg/ml fue también significativamente mayor que en Fibrina 140mg/ml-Genipin 1mg/ml en el día 1 ($p = 0.0047$)⁵⁸. Adicional a la cuantificación de ADN, el uso del marcador de proliferación celular Ki67 demostró que el número de células positivas fue significativamente mayor en los andamios de fibrina de crioprecipitados en comparación con los andamios de fibrina de plasma en los días 3 ($38,97 \pm 4,63\%$ frente a $23,13 \pm 3,94\%$, $p = 0.012$) y 7 ($35,28 \pm 7,92\%$ frente a $16,13 \pm 3,72\%$, $p = 0.023$). También se evidenció con el tiempo una disminución significativa en el porcentaje de células positivas en la matriz de crioprecipitado de $38,97 \pm 4,63\%$ en el día 3 a $35,28 \pm 7,92\%$ en el día 7 y $10,96 \pm 2,48\%$ el día 14 (día 14 vs día 3 $p = 0.0004$; día 14 vs día 7 $p = 0.015$)⁵⁶.

La influencia de la cantidad de oxígeno necesaria que requieren las células para poder seguir demostrando su capacidad proliferativa cuando son cambiadas a condiciones hipóxicas fue evaluada, demostrando que la proliferación fue mayor en grupos normóxicos que hipóxicos con 0 (hipóxico 870.0 ± 381.1 , normóxico $1201.7 \pm 340.1 \text{ \#/mm}^2$) y 2 días de premontaje (hipóxico 270.0 ± 38.8 , normóxico $995,1 \pm 143,1 \text{ \#/mm}^2$), y luego cambia aumentándose en los grupos hipóxicos con 4 (hipóxico $1038,6 \pm 226,6$, normóxico $594,4 \pm 132,7 \text{ \#/mm}^2$) y 6 días de premontaje (hipóxico $1304,7 \pm 341,6$, normóxico $437,9 \pm 68,0 \text{ \#/mm}^2$). Estos resultados indican que las células con 4 o más días de premontaje antes de su implantación entran en un estado más proliferativo después de la exposición a la hipoxia⁴⁹.

2. ANDAMIOS DE AGAROSA: PROLIFERACIÓN CELULAR

2.1 Tipos celulares

Las células utilizadas para el cultivo en andamios de agarosa derivaban de células madre mesenquimales de médula ósea bovina⁶¹, neuronales⁶² y espermatozonales porcinas⁶³, seguidas de los condrocitos⁶⁴⁻⁶⁶, los investigadores también usaron la línea celular MUTZ-3 para diferenciarlas hacia células dendríticas⁶⁷, así como la línea celular pre-osteoblástica MC3T3-E1⁶⁸, el último tipo celular fueron osteoblastos hFOB1.19 y células de osteosarcoma humano MG63⁶⁹.

2.2 Ensayos de proliferación celular

Tras el análisis de la literatura se observó variedad de ensayos para la evaluación de la proliferación celular, siendo usado el marcador de proliferación Ki67^{62,66}, el antígeno nuclear de proliferación celular(PCNA)⁶⁵, el ensayo de proliferación celular MTT[3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio]⁶⁹, el ensayo colorimétrico WST-1⁶⁷, el kit de ensayo DNA Quanti-iT™ PicoGreen™⁶¹, el ensayo Hoechst 33258⁶⁴, el software IMT i-Solution Lite versión 10.0⁶³ y por último microscopia (TE-2000, Nikon, Japón)⁶⁸.

2.3 Tiempos de evaluación de la proliferación celular

Los tiempos de evaluación en los estudios hallados se encuentran en rangos que van desde horas⁶⁸ hasta días, con un máximo de 3 días^{67,62}, 7 días^{65,69}, 14 días^{61,64} y finalmente 21 días⁶⁶. En el estudio de Park et al.⁶³, el tiempo de evaluación no fue especificado.

2.4 Resultados de proliferación celular

De los 9 estudios, 33,3% reportaron resultados cuantitativos^{65,66,69}, mientras que en el 66,7% restante los autores solo lo hicieron de forma cualitativa^{61,62,63,64,67,68}.

De los resultados cualitativos reportados, se pudo evidenciar que los andamios de agarosa puros tienen la capacidad de promover la proliferación celular⁶², presentando un incremento de la proliferación con relación a los grupos control⁶¹ y con el tiempo de evaluación, generando un aumento significativo pero que no alcanzó los niveles de proliferación al compararse con andamios de colágeno y matrigel⁶⁴. La agarosa en diferentes concentraciones demostró tener un impacto sobre la proliferación celular, las células proliferaron mejor en concentraciones de 0,25% al ser comparadas en concentraciones de 0,5% y 0,35%⁶⁷, mostrándose de forma similar una elevada proliferación celular en hidrogeles de menor concentración (0,5% y 2%) en comparación con los de 3% y 5%⁶⁸. Las células cultivadas en un microambiente de cultivo 3D, también mostraron una mejor capacidad proliferativa en concentraciones menores de agarosa (0,2% versus 0,6%)⁶³.

El análisis de proliferación celular en condrocitos demostró que la mayoría de estas células proliferaron y formaron clusters celulares, mostrando una tasa de proliferación en el grupo de método de cultivo de gota suspendida que cambió de 1.1% -11.89%, mientras que la tasa del grupo con método de molde de agarosa cambió de 2.74% -8.52%, indicando estos resultados que el primer grupo evaluado presentó una proliferación celular más fuerte⁶⁶. Los condrocitos proliferantes en los grupos de andamios con HP (presión hidrostática), HP/DS (estrés desviador) y DS fueron significativamente 2.3 veces ($p < 0.05$), 2.6 veces ($p < 0.05$) y 2.6 veces ($p < 0.05$) mayores que el control sin estrés, respectivamente⁶⁵.

En los cultivos 2D y 3D las células cultivadas lograron proliferar con el aumento del tiempo. En el caso de los cultivos 2D, el crecimiento celular se mantuvo en el orden de andamios de colágeno>matrigel>alginato>agarosa ($p < 0,001$) para osteoblastos y células de osteosarcoma. El soporte de los andamios en la proliferación de células de osteosarcoma se dio en el orden

de colágeno>agarosa>matrigel>alginato ($p<0,001$), mientras que los osteoblastos se comportaron casi de la misma manera en hidrogeles 3D que en 2D⁶⁹.

3. ANDAMIOS DE FIBRINA-AGAROSA: PROLIFERACIÓN CELULAR

3.1 Tipos celulares

Las células cultivadas en los andamios de fibrina agarosa de mayor uso fueron los fibroblastos derivados de piel humana^{37,70}, de tendón de rata⁷¹ y de mucosa oral en conjunto con explantes del mismo origen⁷², el segundo tipo más común fueron los condrocitos humanos^{36,72}, identificando también en los estudios el uso de queratocitos con células epiteliales de córnea y células de la gelatina de Wharton del cordón umbilical⁷⁴, queratinocitos y células epiteliales de limbo escleral humano⁷⁵ y las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo⁷⁶.

3.2 Ensayos de proliferación celular

Los autores dentro de la metodología utilizada en sus estudios para la evaluación de la proliferación celular hicieron uso de variados ensayos, siendo el ensayo colorimétrico WST-1 el más utilizado^{37,70,71,73}, seguido por el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)^{36,75,76}, tinción con hematoxilina- eosina en conjunto con microscopía^{72,74,77} y la expresión de vimentina⁷².

3.3 Tiempo de evaluación de proliferación celular

Mientras que en 3 de los estudios analizados los autores no especifican el tiempo de evaluación de la proliferación celular^{37,70,75}, el restante de los estudios lo reportan en horas⁷¹ y días, siendo evaluada en un periodo máximo de 16 días⁷⁶ y 30 días⁷³, también las semanas

fueron usadas para la evaluación, extendiéndose hasta 3 semanas^{72,74}, 5 semanas³⁶ y 12 semanas⁷⁷.

3.4 Resultados de proliferación celular

Los autores reportaron resultados variados de forma cuantitativa en 8 de los estudios analizados^{36,37,74,70,71,72,73,76}, mientras que los 2 estudios remanentes lo hicieron de forma cualitativa^{75,77}.

Los resultados cualitativos evidenciaron que las células presentaron buena tasa de proliferación en el andamio con altos niveles del marcador PCNA⁷⁵, el andamio de fibrina-agarosa similar a tejido implantando in vivo demostró tener la capacidad de permitir la colonización y proliferación de poblaciones celulares del huésped, siendo los macrófagos las células más identificadas⁷⁷.

El análisis bioquímico de la actividad metabólica celular realizada con el ensayo WST-1 fue utilizado por varios estudios, mostrando que los fibroblastos sembrados en hidrogeles de fibrina-agarosa presentaron niveles más altos ($p < 0.05$) de proliferación celular que los sembrados en hidrogeles de fibrina-agarosa con glutaraldehído (G 0.25%-0.5%)⁷⁰ y genipin (GP)³⁷. Se evidenció una disminución de los valores de proliferación en función del aumento de las concentraciones de GP (0,1%, 0,25%, 0,5% y 0,75%), siendo la mayoría de estas diferencias significativas ($p < 0.05$)³⁷. Los fibroblastos en fibrina-agarosa nanoestructurada con genipin presentaron menor proliferación que los del control técnico positivo ($p = 0.002$) y Matri-Derm ($p < 0.001$), pero sin diferencias en la fibrina agarosa nanoestructurada ($p = 0,011$)⁷¹. Por último, este ensayo arrojó resultados comparables entre los grupos de hidrogel de fibrina-agarosa celular e hidrogel de fibrina-agarosa celular con nanopartículas

magnéticas, donde ambas condiciones fueron significativamente mayor que para el control negativo ($p < 0.05$)⁷³.

En los estudios con inmunohistoquímica de PCNA se demostró que el índice de proliferación en el grupo de fibrina-agarosa con menor densidad celular, disminuyó significativamente ($p < 0.05$) desde la semana 1 (100% positivo células) a la semana 5 (86% de células positivas) de desarrollo *ex vivo*. Mientras que en el grupo de fibrina-agarosa con mayor densidad celular, se observó una disminución significativa en el índice entre la semana 1 y 5 (44% de células positivas) ($p < 0,05$)³⁶. Similarmente, la presencia y porcentajes de células con proliferación activa en grupos de sustituto de nervio artificial de fibrina-agarosa nanoestructurada disminuyó en el día 2 (índice de proliferación 21,1%), reactivándose a partir del día 4, alcanzando un índice de proliferación de 68,7% después de 16 días. Mientras en el hidrogel de fibrina-agarosa siempre fue mayor al 50%, llegando al 80% después de 16 días, siendo significativamente mayor que el primer grupo en los días 8 y 16. ($p < 0,05$)⁷⁶.

Se demostró que el grupo de sustitutos de estroma de mucosa oral no funcionalizado de fibrina-agarosa con siembra de fibroblastos presentó un comportamiento celular estable con el tiempo de evaluación (325 ± 125 , 250 ± 173 y 300 ± 81 células por mm^2 de tejido en 1 semana, 2 semanas y 3 semanas respectivamente). Presentando resultados similares el grupo de sustitutos de estroma de mucosa oral funcionalizados de fibrina-agarosa con siembra de suspensión de explantes de biopsias de mucosa oral (0 ± 0 , 4125 ± 457 y 5375 ± 419 células por mm^2 de tejido en la semana 1, semana 2 y semana 3, respectivamente), siendo la proliferación más alta en el segundo grupo mencionado ($p < 0.0001$)⁷². Esta relación de aumento celular con el tiempo también ocurrió en los modelos ortotópicos corneales con células corneales y los modelos heterotópicos corneales con células madre de la gelatina de Wharton, los cuales

pasaron de un promedio de 2, 4.5, 6 capas epiteliales y 1.5, 6.5 y 9 capas epiteliales a la semana 1, 2 y 3 respectivamente *in vitro*⁷⁴.

DISCUSIÓN

Este estudio busca analizar la evidencia científica disponible sobre la proliferación celular en andamios basados en biomateriales de fibrina, agarosa y mezcla de fibrina-agarosa. La búsqueda bibliográfica inicial arrojó 784 documentos, la literatura basada en fibrina es amplia y es la que más resultados presenta, seguida de agarosa, siendo la mezcla de fibrina-agarosa la menos estudiada. Un gran número de documentos fueron excluidos, ya que a pesar de incluir los biomateriales objeto del estudio, estos se presentaban mezclados con materiales de otro origen. Así mismo, algunos estudios no evalúan el comportamiento celular o específicamente la proliferación. Finalmente 40 artículos fueron incluidos para esta revisión narrativa.

Se puede observar una gran variedad de tipos celulares para el cultivo en los tres andamios, pero las células usadas con mayor frecuencia son las células madre mesenquimales^{40,42,43,44,45,46,47,48,50,54,61,62,63,74,76}. Estas células multipotenciales son unas de las más comúnmente utilizadas en terapia celular e ingeniería de tejidos⁴³, representando una fuente celular atractiva, porque tienen potencial de autorrenovación y pueden diferenciarse *in vivo* y *ex vivo*, en múltiples linajes como condrocitos, adipocitos y osteoblastos. Además, también demuestran una alta capacidad proliferativa *ex vivo* y su aislamiento no se asocia con una morbilidad grave en el sitio donante⁴⁰.

Si bien existen una amplia gama de ensayos para evaluación de la proliferación celular, dentro de los más utilizados en esta revisión se encuentra la cuantificación de ADN^{46,47,50,58,61}, el marcador de proliferación celular Ki67^{57,58,60,62,66} y el PCNA^{36,65,75,76}. Con relación a la cuantificación de ADN, algunos de estos ensayos cuantifican exclusivamente células vivas, mientras que otros son capaces de discriminar entre células vivas y muertas⁷⁸. Estos se fundamentan en sistemas basados en tinciones fluorescentes que permiten la unión al ADN bicatenario y a los ácidos nucleicos de las células, generando una cuantificación directa de toda la población celular. La cuantificación de ADN se recomienda debido a su sensibilidad, selectividad, costo y facilidad de uso. Adicionalmente ofrecen una precisión mejorada sobre la proliferación celular o los ensayos de citotoxicidad basados en el metabolismo que pueden verse influenciados por cambios celulares que no están relacionados con el número de células⁷⁹. Por su parte el marcador Ki67 y el PCNA se basan en la identificación inmunohistoquímica de proteínas nucleares cuya expresión es regulada durante el ciclo celular (células normales o tumorales) permitiendo reconocer el comportamiento proliferativo de una determinada población^{80,81}. El marcador Ki67 presenta la ventaja de ser más sensible en comparación con la determinación del contenido de ADN celular mediante citometría de flujo y marcaje in vitro de ADN recién sintetizado⁸². El PCNA tiene como ventajas que puede aplicarse a un tejido fijado sin generar ningún efecto perjudicial sobre la arquitectura histológica, pero teniendo como limitación la variación en la intensidad de tinción de los núcleos, la dependencia de la tinción del método de fijación y la vida media más larga^{36,82}.

En esta revisión se puede observar variedad en los tiempos de evaluación, lo que nos indica falta de unanimidad y de un estándar definido, ya que se presentan tiempos de horas, días,

hasta semanas. Siendo 1 a 7 días el periodo de tiempo más usado por los investigadores^{40,43,47,48,49,57,58,65,69}, seguido de 14 días^{41,42,50,54,56,61,64}. El tiempo es una variable fundamental para el desarrollo de los cultivos celulares, este le permite a las células tener una señalización bidireccional entre ellas y su microambiente⁸³, así como llevar a cabo procesos vitales como maduración, proliferación celular y secreción de su propia MEC fisiológica, haciéndolas crecer en una plataforma de MEC “derivada de células”⁸⁴.

En los 3 andamios el reporte de los resultados se realizó en 22 de los artículos de forma cuantitativa, los 18 restantes no presentan resultados numéricos relacionados con la proliferación celular. Esto permite interpretar una falta de implementación estadística dentro de los estudios cualitativos, la cual es necesaria para darle mayor validez científica y exactitud a los resultados.

Las concentraciones del biomaterial utilizadas para la fabricación de los andamios tienen un impacto en la proliferación celular. Se puede observar una tendencia al aumento de la proliferación con el decrecimiento de la concentración de fibrina y genipin, pero más asociada a la concentración del biomaterial. Los ensayos a los 7 días de cultivo no mostraron sugerencia de proliferación celular⁵⁸, ocasionado posiblemente por las altas concentraciones de fibrina usadas en este estudio. Apoyando este hallazgo, otros autores reportan que reducidas concentraciones de fibrina pueden mejorar la proliferación celular y la quimiotaxis^{85,86}. De igual forma, se demuestra que el uso de agarosa en bajas concentraciones (0.25%⁶⁷, 0.5%⁶⁸ y 0.2%⁶³), mejoró la proliferación, una posible explicación es que a menor concentración del biomaterial las células tienen mayor acceso a los nutrientes, al oxígeno y una mejor difusión de los componentes del medio. Otra explicación se relaciona con la rigidez mecánica del andamio la cual afecta directamente el comportamiento celular, los

andamios a menor concentración son menos rígidos, lo cual pueden mejorar las capacidades proliferativas de las células⁶⁸.

Varios métodos se han propuestos para mejorar las propiedades biomecánicas de los andamios. Dentro de estos métodos, los agentes químicos reticulantes inducen la formación de diferentes tipos de enlaces entre las moléculas del biomaterial, teniendo así un impacto en su biomecánica y propiedades estructurales⁸⁷. Los resultados de esta revisión reportan que el uso de agentes químicos como el glutaraldehído⁷⁰ y genipin^{37,58,71} pueden afectar negativamente la proliferación de las células dependiendo de la concentración que se agregue al andamio. El glutaraldehído se ha reportado como un agente muy eficiente pero involucra un efecto de citotoxicidad⁸⁷, se ha sugerido que concentraciones menores a 8% son no tóxicas para las células^{88,89}. Contrario a este reporte, en esta revisión la función celular se ve significativamente más afectada en andamios de fibrina-agarosa con concentraciones de glutaraldehído al 0.5% que a 0.25%⁷⁰. Por otra parte, el genipin ha sido aceptado en general como un agente de reticulación de menor toxicidad, especialmente si se compara con el glutaraldehído⁹⁰. Concordando con lo anterior, los resultados hallados muestran que el hidrogel de fibrina-agarosa con genipin a concentración de 0.75% presenta una reducción de la densidad y la actividad metabólica celular, lo cual podría relacionarse con citotoxicidad³⁷. Siendo este hallazgo reportado previamente por otros autores^{91,92}. Estos resultados nos sugieren que el uso de genipin, incluso en concentraciones más altas, es considerablemente más biocompatible que el glutaraldehído en hidrogeles de fibrina-agarosa.

Adicional a los métodos químicos mencionados anteriormente, se ha desarrollado el uso de métodos físicos como la técnica de nanoestructuración^{70,89,93,89,94}. Este método induce enlaces nanomoleculares entre los componentes fibrilares del biomaterial, mejorando las fuerzas

biomecánicas e incrementando la densidad de las fibras⁷⁶. El efecto de la nanoestructuración sobre el comportamiento celular fue confirmado en esta revisión por la disminución significativa del número celular en la fibrina-agarosa nanoestructurada que mejoró del día 8 al 16, así como el significativo y progresivo aumento de este parámetro en andamios de fibrina-agarosa⁷⁶. Estos resultados están de acuerdo con otros autores que reportan que la fibrina agarosa sin nanoestructuración puede soportar la proliferación celular^{28,94-96}. El impacto de la nanoestructuración sobre el comportamiento celular puede ser explicado por una disminución de la difusión de oxígeno que afecta directamente la función y viabilidad de las células, encontrando estudios que soportan este hallazgo en otros biomateriales^{97,98}. A pesar de que este microambiente hipóxico genera un efecto no deseado, se demuestra que las células tienen una alta capacidad para recuperar su función, reactivar su metabolismo, proliferar y migrar⁷⁶.

CONCLUSIONES

En general la evidencia científica de esta revisión narrativa puede concluir que las células madre mesenquimales son las más utilizadas para ser mezcladas con los diferentes biomateriales para generar un tejido artificial debido a su estado indiferenciado y su capacidad proliferativa. En este caso, se reporta que los tres andamios objeto de la revisión tienen la capacidad de promover la proliferación celular.

Por otro lado, se pudo observar que los ensayos más determinantes para evaluar la proliferación celular en los biomateriales objeto de ese estudio están fundamentados en la evaluación de la integridad de la membrana celular y análisis de estadios tempranos de la división celular observando además la integridad del ADN. Adicionalmente, estos ensayos de proliferación son utilizados por su fácil ejecución y aporte de información. Las técnicas

inmunohistoquímica e inmunofluorescencia son las más utilizadas siendo los marcadores PCNA y Ki67 los marcadores de elección.

En este contexto, este trabajo pone de manifiesto que los ensayos realizados entre los 7 a 14 días permiten que las células se integren con los materiales de fibrina, agarosa y fibrina-agarosa presentando un incremento de la proliferación en este periodo de tiempo. Además, las concentraciones de los biomateriales usados para la generación de tejidos artificiales influyen en la proliferación, siendo determinantes en disponibilidad de oxígeno necesario para el crecimiento celular aquellos andamios con poca concentración del biomaterial, en este caso fibrina y agarosa respectivamente. De igual forma, los biomateriales reticulados con sustancias químicas y físicas en concentraciones adecuadas mejoran las propiedades mecánicas de los materiales incrementando las tasas de proliferación.

Finalmente, varias investigaciones reportan sus resultados en una forma cualitativa limitándose a describir la intensidad de señal de las pruebas inmunohistoquímicas e inmunofluorescentes. De igual manera, reportan resultados microscópicos descriptivos sin reportar datos cuantitativos, siendo esto una deficiencia para la replicación de los experimentos realizados por otros investigadores.

Se hace necesario la inclusión de otras bases de datos como herramientas para ampliar la búsqueda de literatura, con la finalidad de obtener un panorama más amplio del tema. También es importante la evaluación de otros materiales y otras funciones celulares tales como la adhesión, migración y diferenciación, ya que el andamio debe proporcionar un sustrato adecuado para el desarrollo de estas. De igual forma el andamio debe permitir el transporte de nutrientes, desechos y factores de señalización biológica para permitir la supervivencia celular⁹⁹. Finalmente se hace necesario el desarrollo de estudios

experimentales para corroborar y comparar los resultados ya reportados en la literatura sobre el comportamiento celular en estos andamios.

BIBLIOGRAFÍA

1. Achilleas T, Spyros S, Chrysostomi G, Karamanos K. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016; 97: 4-27.
2. Kant G. Interacción entre las células y su ambiente. En: Javier de León Fagra. *Biología molecular y celular-Conceptos y experimentos.* Sexta edición. México D.F.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES;2011. p. 230.
3. Campos F, Bonhome-Espinosa A, García-Martínez L, Durán J, López-López M, Alaminos M, Sánchez-Quevedo M, Carriel V. Ex vivo characterization of a novel tissue-like cross-linked fibrin-agarose hydrogel for tissue engineering applications. *Biomed Mater.* 2016; 11(5): 1-12.
4. Caddeo S, Boffito M, Sartori S. Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2017; 5(40); 1-22.
5. Hunt N, Shelton R, Grover L. An alginate hydrogel matrix for the localised delivery of a fibroblast/keratinocyte co-culture. *Biotechnol J.* 2009; 4(5): 730-7.

6. Stark H, Szabowski A, Fusenig N, Maas-Szabowski N. Organotypic cocultures as skin equivalents: a complex and sophisticated in vitro system. *Biol Proced Online*. 2004; 6: 55-60.
7. Yang J, Woo SL, Yang G, Wang J, Cui L, Liu W, Cao Y. Construction and clinical application of a human tissue-engineered epidermal membrane. *Plast Reconstr Surg*. 2010; 125(3): 901-9.
8. Horch R, Debus M, Wagner G, Stark GB. Cultured human keratinocytes on type I collagen membranes to reconstitute the epidermis. *Tissue Eng*. 2000; 6(1): 53-67.
9. Echave MC Sáenz del Burgo L, Pedraz J, Orive G. Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering. *Curr Pharm Des*. 2017; 23(24): 3567-3584.
10. Sekiya N, Ichioka S, Terada D, Tsuchiya S, Kobayashi H. Efficacy of a poly glycolic acid (PGA)/collagen composite nanofiber scaffold on cell migration and neovascularization in vivo skin defect model. *J Plast Surg Hand Surg*. 2013; 47(6): 498–502.
11. Narayanan G, Vernekar V, Kuyinu E, Laurencin C. Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016; 107(5): 247–276.
12. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton P. An overview of poly(lactic-co glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(3): 3640–3659.
13. Mkhabelal V, Ray S. Poly(ε-caprolactone) nanocomposite scaffolds for tissue engineering: a brief overview. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014; 14(1): 535–545.
14. Dash T, Konkimalla V. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: a review. *J Control Release*. 2012; 158(1): 15–33.

15. Harata M, Watanabe M, Nagata S, Ko E, Ohba S, Takato T, Hikita A, Hoshi K. Improving chondrocyte harvests with poly(2-hydroxyethyl methacrylate) coated materials in the preparation for cartilage tissue engineering. *Regenerative Therapy*. 2017; 7: 61–71.
16. Pedraza E, Brady A, Fraker C, Stabler C. Synthesis of macroporous poly (dimethylsiloxane) scaffolds for tissue engineering applications. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2013; 24(9): 1041–1056.
17. Chen G, Sato T, Sakane M, Ohgushi H, Ushida T, Tanaka J, Tateishi T. Application of PLGA-collagen hybrid mesh for three-dimensional culture of canine anterior cruciate ligament cells. *Mater Sci Eng:C*. 2004; 24(6-8): 861–866.
18. Sadeghi-avalshahr A, Khorsand-Ghayeni, Nokhasteh M, Molavi A, Naderi-Meshkin H. Synthesis and characterization of PLGA/collagen composite scaffolds as skin substitute produced by electrospinning through two different approaches. *J Mater Sci Mater Med*. 2017; 28(1): 14.
19. Zhang Y, Wang Q, Yan K, Qi Y, Wang G, Cui Y. Preparation, characterization, and evaluation of genipin crosslinked chitosan/gelatin three-dimensional scaffolds for liver tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*. 2016; 104(8): 1863–1870.
20. Yao R, He J, Meng G, Jiang B, Wu F. Electrospun PCL/Gelatin composite fibrous scaffolds: mechanical properties and cellular responses. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2016; 27(9): 824–838.
21. Coimbra P, Santos P, Alves P, Miguel S, Carvalho M, D. de Sá K, Correia I, Ferreira P. Coaxial electrospun PCL/Gelatin-MA fibers as scaffolds for vascular tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017; 159: 7–15.

22. Patrício T, Glória A, Bártolo P. Mechanical and biological behaviour of PCL and PCL/PLA scaffolds for tissue engineering applications. *Chem Eng Trans.* 2013; 32: 1645–1650.
23. Gasperini L, Mano J, Reis R. Natural polymers for the microencapsulation of cells. *J R Soc Interface.* 2014; 11(100): 1-17.
24. Noori A, Ashrafi S, Vaez-Ghaemi R, Hatamian-Zaremi A, Webster T. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine.* 2017; 12: 4937–4961.
25. Montalbano G, Toumpaniari S, Popov A, Duan P, Chen J, Dalgarno K, Scott W, Ferreira A. Synthesis of bioinspired collagen/alginate/fibrin/ based hydrogels for soft tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018; 91: 236-246.
26. Stellwagen J, Stellwagen NC. Internal structure of the agarose gel matrix. *J Phys Chem.* 1995; 99(12): 4247–4251.
27. Zarrintag P, Manouchehri S, Ahmadi Z, Reza Saeb M, Urbanska A, Kaplan D, Mozafari M. Agarose-based Biomaterials for Tissue Engineering. *Carbohydr Polym.* 2018; 1(187):66-84.
28. Alaminos M, Sánchez-Quevedo M, Muñoz-Avila M, Serrano J, Medialdea D, Carreras S, Campos A. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47(8): 3311-3317.
29. Sánchez-Quevedo M, Alaminos M, Capitan L, Moreu G, Garzón I, Crespo P, Campos A. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol.* 2007; 22(6): 631-640.
30. Carriel V, Garzón I, Jiménez J, Oliveira M, Arias-Santiago S, Sánchez-Quevedo M, Alaminos M. Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of

- the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *Cells, tissues organs*. 2012; 196(1): 1-12.
31. Carriel V, Garrido-Gómez J, Hernández-Cortes P, Garzón I, García-García S, Sáez-Moreno J, Sánchez-Quevedo M, Campos A, Alaminos M. Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *J Neural Eng*. 2013;10(2): 026022.
 32. Carriel V, Alaminos M, Garzón I, Campos A, Cornelissen M. Tissue engineering of the peripheral nervous system. *Expert Rev Neurother*. 2014; 14(3): 301-318.
 33. Fernández Valadéz Gámez R, Garzón I, Licerias-Licerias E, España-López A, Carriel V, Martin-Piedra M, Muñoz-Miguelsanz M, Sánchez-Quevedo M, Alaminos M, Fernandez-Valades R. Usefulness of a bioengineered oral mucosa model for preventing palate bone alterations in rabbits with a mucoperiosteal defect. *Biomed Mater*. 2016; 11(1): 015015.
 34. Jaimes-Parra B, Valle-Diaz de la Guardia F, Arrabal-Polo M, Herrera-Imbroda B, Lara M, Machuca-Santa-Cruz J, Campos A, Alaminos M, Crespo, P, Garzón I. Ex vivo construction of a novel model of bioengineered bladder mucosa: A preliminary study. *Int J Urol*. 2016; 23(1): 85-92.
 35. Martin-Piedra M, Garzón I, Gómez-Sotelo A, García-Abril E, Jaimes-Parra B, 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; 12(12): 1-33.
 36. García-Martínez L, Campos F, Godoy-Guzmán C, 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; 147(1): 83-95.
37. Campos F, Bonhome-Espinosa A, Vizcaino G, Rodríguez I, Durand-Herrera D, López-López M, Sánchez-Montesinos I, Alaminos M. Generation of genipin cross-linked fibrin-agarose hydrogel tissue-like models for tissue engineering applications. *Biomed Mater.* 2018; 13(2): 025021.
38. Matson J, Cook J. Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell analyses. *FEBS J.* 2017; 284(3): 362-375.
39. Arahira T, Todo M. Effects of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells on compressive mechanical behavior of collagen/ β -TCP composite scaffold. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2014; 39: 218-30.
40. Benning L, Gutzweiler L, Tröndle K, Riba J, Zengerle R, Koltay P, Zimmermann S, Stark G, Finkenzeller G. Cytocompatibility testing of hydrogels toward bioprinting of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A.* 2017; 105(12): 3231-3241.
41. Linsley C, Wu B, Tawl B. Mesenchymal stem cell growth on and mechanical properties of fibrin-based biomimetic bone scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2016; 104(12): 2945-2953.
42. Hashemibeni B, Valiani A, Esmaeli M, Kazemi M, Aliakbari M, Iranpour F. Comparison of the efficacy of piacledine and transforming growth factor β 1 on chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in fibrin and fibrin-alginate scaffolds. *Iran J Basic Med Sci.* 2018; 21(2): 212–218.

43. Mousavifard A, Pourazizi E, Akhavan M, Anbarlou A, Atashi A. Elevated expression of stemness genes in adipose-derived mesenchymal stem cells cultured on fibrin scaffold. *J Biosci.* 2020; 45(81): 3-8.
44. Kim B, Shkemi F, Lee J. Vitro and In Vivo Evaluation of Commercially Available Fibrin Gel as a Carrier of Alendronate for Bone Tissue Engineering. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 1-10.
45. Hoberman A, Cirino C, McCarthy M, Cote M, Pauzenberger L, Beitzel K, Mazzoca A, Dyna F. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Enhanced by Platelet-Rich Plasma Maintain Adhesion to Scaffolds in Arthroscopic Simulation. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery.* 2018; 34(3); 872-881.
46. Mikael P, Golebiowska A, Kumbar S, Nukavarapu S. Evaluation of Autologously Derived Biomaterials and Stem Cells for Bone Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A.* 2020: 1-33.
47. Cao Z, Yao S, Xiong Y, Zhang Z, Yang Y, He F, Zhao H, Guo Y, Wang G, Xie S, Wang X. Directional axonal regrowth induced by an aligned fibrin nanofiber hydrogel contributes to improved motor function recovery in canine L2 spinal cord injury. *J Mater Sci Mater Med.* 2020; 31(5): 2-13.
48. Soleimannejad M, Ebrahimi-Barough S, Soleimani M, Nadri S, Tavangar S, Roohipour R, Yazdankhah M, Bayat N, Riazi-Esfahani M, Ai J. Fibrin gel as a scaffold for photoreceptor cells differentiation from conjunctiva mesenchymal stem cells in retina tissue engineering. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018; 46(4): 805-814.

49. Nyberg E, Grayson W. Assessing the Minimum Time-Period of Normoxic Preincubation for Stable Adipose Stromal Cell-Derived Vascular Networks. *Cell Mol Bioeng.* 2018; 11(6): 471-481.
50. Annamalai R, Rioja A, Putnam A, Stegemann J. Vascular Network Formation by Human Microvascular Endothelial Cells in Modular Fibrin Microtissues. *ACS Biomater Sci Eng.* 2016; 2(11): 1914–1925.
51. Loureiro J, Torres A, Nete T, Aguiar P, Carvalho C, Texeira Pinto M, Freitas Amaral I. Conjugation of the T1 sequence from CCN1 to fibrin hydrogels for therapeutic vascularization. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019; 104: 1-10.
52. Benning L, Gutzweiler L, Tröndle K, Riba J, Zengerle R, Koltay P, Zimmermann S, Stark G, Finkenzeller G. Assessment of hydrogels for bioprinting of endothelial cells. *J Biomed Mater Res A.* 2018; 106(4): 935-947.
53. Zhang S, Thiebes A, Kreimendahl F, Ruetten S, Buhl E, Wolf M, Jockenhoevel S, Apel A. Extracellular Vesicles-Loaded Fibrin Gel Supports Rapid Neovascularization for Dental Pulp Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(12): 1-17.
54. Bento A, Quelhas P, Oliviera M, Pêgo A, Amaral I. Three-dimensional culture of single embryonic stem derived neural/stem progenitor cells in fibrin hydrogels: neuronal network formation and matrix remodelling. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016; 11(12): 3494-3507.
55. Law J, Musa F, Ruszymah Bt, El Haj A, Yang Y. A comparative study of skin cell activities in collagen and fibrin constructs. *Med Eng Phys.* 2016; 38(9): 854-861.
56. García-Posadas L, Soriano-Romaní L, López-García Antonio, Diebold Y. An engineered human conjunctival-like tissue to study ocular surface inflammatory diseases. *PLoS One.* 2017; 12(3): 1-17.

57. Hejbøl E, Sellathurai J, Nair P, Schröder D. Injectable scaffold materials differ in their cell instructive effects on primary human myoblasts. *J Tissue Eng.* 2017; 8: 1-11.
58. Cruz M, Hom W, DiStefano T, Merrill R, Torre O, Lin H, Hecht A, Illien-Junger S, Iatridis J. Cell-Seeded Adhesive Biomaterial for Repair of Annulus Fibrosus Defects in Intervertebral Discs. *Tissue Eng Part A.* 2018; 24(3-4): 187-198.
59. Mo L, Wang Y, Zhang J, Cao Z, Wang S, Zheng W, Li Q, Zheng T, Wang X, Xu Q, Chen Z. Culture of pyramidal neural precursors, neural stem cells, and fibroblasts on various biomaterials. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2018; 29(17): 2168-2186.
60. Nam K, Dean S, Brown C, Smith Jr. R, Lei P, Andreadis S, Baker O. Synergistic effects of laminin-1 peptides, VEGF and FGF9 on salivary gland regeneration. *Acta Biomaterialia.* 2019; 19: 186-194.
61. Goldman S, Barabino G. Spatial Engineering of Osteochondral Tissue Constructs Through Microfluidically Directed Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Biores Open Access.* 2016; 5(1): 109-17.
62. Lins L, Wianny F, Dehay C, Jestin J, Loh W. Adhesive Sponge Based on Supramolecular Dimers Interactions as Scaffolds for Neural Stem Cells. *Biomacromolecules.* 2020; 21(8): 3394-3410.
63. Park J, Park M, Kim M, Park Y, Yun J, Cheong H, Kim M, Choi J, Lee E, Lee S. Porcine spermatogonial stem cells self-renew effectively in a three dimensional culture microenvironment. *Cell Biol Int.* 2017; 41(12): 1316-1324.
64. Miao Z, Lu Z, Wu H, Liu H, Li M, Lei D, Zheng L, Zhao J. Collagen, agarose, alginate, and Matrigel hydrogels as cell substrates for culture of chondrocytes in vitro: A comparative study. *J Cell Bioche.* 2018; 119(10): 7924-7933.

65. Ogura T, Minas T, Tsuchiya A, Mizuno S. Effects of hydrostatic pressure and deviatoric stress on human articular chondrocytes for designing neo-cartilage construct. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019; 13(7): 1143-1152.
66. Chen Y, Ma M, Teng Y, Cao H, Yang Y, Wang Y, Li X, Sun Y, Liang J, Fan Y, Zhang X. Efficient manufacturing of tissue engineered cartilage in vitro by a multiplexed 3D cultured method. *J Mater Chem B.* 2020; 8(10): 2082-2095.
67. Groel F, Kalia Y, Jordan O, Bordchar G. Hydrogels in three-dimensional dendritic cell (MUTZ-3) culture as a scaffold to mimic human immuno competent subcutaneous tissue. *Int J Pharm.* 2018; 544(1): 297-303.
68. Kazi G, Anisur Rahman K, Farahat M, Matsumoto T. Fabrication of single gel with different mechanical stiffness using three-dimensional mold. *J Biomed Mater Res A.* 2019; 107(1): 6-11.
69. Jiang T, Xu G, Chen X, Huang X, Zhao J, Zheng L. Impact of Hydrogel Elasticity and Adherence on Osteosarcoma Cells and Osteoblasts. *Adv Healthc Mater.* 2019; 8(9): 1-11.
70. Campos F, Bonhome-Espinosa A, García-Martínez L, Durán J, López-López M M, Alaminos M, Sánchez-Quevedo M, Carriel V. Ex vivo characterization of a novel tissue-like cross-linked fibrin-agarose hydrogel for tissue engineering applications. *Biomed Mater.* 2016.; 11(5): 1-13.
71. González-Quevedo D, Díaz-Ramos M, Chato-Astrain J, Sánchez-Porras D, Tamimi I, Campos A, Campos F, Carriel V. Improving the regenerative microenvironment during tendon healing by using nanostructured fibrin/agarose-based hydrogels in a rat Achilles tendon injury model. *Bone Joint J.* 2020; 102-B(8): 1095-1106.

72. Blanco-Elices B, España-Guerrero E, Mateu-Sanz M, Sánchez-Porras D, García-García O, Sánchez-Quevedo M, Fernández-Valadés R, Alaminos M, Martín-Piedra M, Garzón I. In Vitro Generation of Novel Functionalized Biomaterials for Use in Oral and Dental Regenerative Medicine Applications. Running Title: Fibrin-Agarose Functionalized Scaffolds. *Materials (Basel)*. 2020; 13(7): 2-16.
73. Bonhome-Espinosa A, Campos F, Durand-Herrera D, Sánchez-López J, Schaub S, Durán J, López-López M, Carriel V. In vitro characterization of a novel magnetic fibrin-agarose hydrogel for cartilage tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2020; 104: 2-10.
74. Garzón I, Chato-Astrain J, González-Gallardo C, Ionescu A, Cardona J, Mateu M, Carda C, Pérez M, Martín-Piedra M, Alaminos M. Long-Term in vivo Evaluation of Orthotypical and Heterotypical Bioengineered Human Corneas. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020; 8: 1-13.
75. Rico-Sánchez L, Garzón I, González-Andrades G , Ruíz-García A, Punzano M, Antonio Lizana-Moreno A, Muñoz-Ávila J, Sánchez-Quevedo M , Martínez-Atienza J, López-Navas L , Sánchez-Pernaute R, Iñaki Oruezaba R, Medialdea S, González-Gallardo M ,Gloria Carmona G, Sanbonmatsu-Gámez S , Perez M, Jiménez 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; 13(12): 2142-2154.
76. Carriel V, Scionti G, Campos F, Roda O, Castro B, Cornelissen M, Garzón I, Alaminos M. In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017; 11(5): 1412-1426.

77. Campos F, Bonhome-Espinosa A, Chato-Astrain J, Sánchez-Porras D, García-García O, Carmona R, López-López M, Alaminos M, Carriel V, Rodríguez I. Evaluation of Fibrin-Agarose Tissue-Like Hydrogels Biocompatibility for Tissue Engineering Applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020; 8: 2-16.
78. Zimmerman S, Gretzinger S, Scheeder C, Schwab M, Oelmeier S, Osberghaus A, Gotwald E, Hubbuch J. High-throughput cell quantification assays for use in cell purification development - enabling technologies for cell production. *Biotechnol J.* 2016; 11(5): 676-86.
79. Li X, Wu Y, Zhang L, Cao Y, Li Y, Li J, Zhu L, Wu G. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Anal Biochem.* 2014; 451:1 8-24.
80. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182: 311-322.
81. Miller I, Min M, Yang C, Tian C, Gookin S, Carter D, Spence S. Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. *Cell Rep.* 2018; 24(5): 1105–1112.
82. Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 2016; 17: 1213-1221.
83. Asthana A, Kissalita W. Is time an extra dimension in 3D cell culture?. *Drug Discov Today.* 2016; 21(3): 395-9.
84. Cukierman E, Pankov R, Stevens D, Yamada K. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science.* 2001; 294(5547): 1708-12.
85. Wilke H, Neef P, Caimi M, Hoogland T, Claes L. New in vivo measurements of pressures in the intervertebral disc in daily life. *Spine.* 1999; 24(8): 755-.62

86. Brown A, Barker T. Fibrin-based biomaterials: modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. *Acta Biomater.* 2014; 10(4): 1502-14.
87. Ma B, Wang X, Wu C, Chang J. Crosslinking strategies for preparation of extracellular matrix-derived cardiovascular scaffolds. *Regen Biomater.* 2014; 1(1):81–9.
88. Umashankar P, Mohanan P, Kumari T. Glutaraldehyde treatment elicits toxic response compared to decellularization in bovine pericardium. *Toxicol Int.* 2012; 19(1): 51-8.
89. Reddy N, Reddy R, Jiang Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 2015; 33(6): 362–9.
90. Ninh C, Iftikhar A, Cramer M, Bettinger C. Diffusion–reaction models of genipin incorporation into fibrin networks. *J Mater Chem B.* 2015; 3(22): 4607-461.
91. Dare E, Griffith M, Poitras, P, Kaupp J, Waldman S, Carlsson D, Dervin G, Mayoux C, Hincke M. Genipin cross-linked fibrin hydrogels for in vitro human articular cartilage tissue-engineered regeneration. *Cells tissues organs.* 2009; 190(6): 313-25.
92. Fessel G, Cadby J, Wunderli S, Weeren R, Snedeker J. Dose- and time-dependent effects of genipin crosslinking on cell viability and tissue mechanics -toward clinical application for tendon repair. *Acta Biomater.* 2014; 10(5): 1897-1906.
93. Scionti G, Moral M, Toledano M, Osorio R, Durán J, Alaminos M, Campos A, López-López M. Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model. *J Biomed Mater Res A.* 2014; 102(8): 2573-82.
94. Carriel V, Garzón I, Jiménez, Ximenes A, Arias-Santiago S, Campos A, Sánchez-Quevedo M, Alaminos M. Epithelial and stromal developmental patterns in a novel

- substitute of the human skin generated with fibrin–agarose biomaterials. *Cells Tissues Organs*. 2012; 196(1): 1–12.
95. San Martin S, Alaminos M, Zorn T, Sánchez-Quevedo M, Garzón I, Rodríguez I, Campos A. The effects of fibrin and fibrin–agarose on the extracellular matrix profile of bioengineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med* 2013; 7(1): 10–19.
96. Garzón I, Martín-Piedra, Alfonso-Rodríguez C, González-Andrades M, Carriel V, Martínez-Gómez C, Campos A, Alaminos M. Generation of a biomimetic human artificial cornea model using Wharton’s jelly mesenchymal stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 55(7): 4073–4083.
97. Cheema U, Brown RA, Alp B, MarcRobert A. Spatially defined oxygen gradients and vascular endothelial growth factor expression in an engineered 3D cell model. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65(1): 177–186.
98. Cheema U, Alekseeva T, Abou-Neel E, Brown R. Switching off angiogenic signalling: creating channelled constructs for adequate oxygen delivery in tissue engineered constructs. *Eur Cell Mater*. 2010; 20: 274–280.
99. Garg T, Singh O, Arora S, Murthy R. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2012; 29(1): 1-63.