

# Uso de fibrinógeno humano en la generación de soportes para la obtención de equivalentes tisulares

## Use of human fibrinogen in the generation of scaffold for obtaining Tissue equivalents

Dionisio Malagón\* ; Carmen Cardozo\*\* ; Rubén Godoy\*\*\*

### Resumen

Desde sus orígenes, la Ingeniería de Tejidos ha buscado diversos materiales que puedan ser utilizados para la generación de soportes que sirvan para el anclaje, proliferación y diferenciación celular que conduzcan a la obtención de tejidos humanos. Muchos materiales de tipo cerámico, polimérico y metálico se han evaluado, pero hasta la fecha muchos de ellos han sido rechazados por diversas razones, entre otras su escasa biocompatibilidad y biodegradabilidad, la respuesta inmune generada, la baja resistencia mecánica o el riesgo de transmisión de virus o priones. El fibrinógeno es una proteína presente en el plasma sanguíneo que puede ser utilizada para la generación de soportes tridimensionales que favorezcan el crecimiento de células; se obtiene a partir del propio paciente, bancos de sangre o como proteína purificada (Tisseel® o Tissucol®, Laboratorios Baxter). El fibrinógeno evita el desencadenamiento de una respuesta inmunológica y el uso de productos xenogénicos. Debido a la estructura proteica, la adhesión y proliferación celular se ven favorecidas dando excelentes resultados en la generación de equivalentes de piel, cartílago, córnea y reemplazos cardíacos en aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. Como desventajas presenta su rápida degradación y su baja resistencia mecánica; sin embargo, en los últimos años se han venido evaluando mezclas con algunos biopolímeros como ácido poliláctico (PLLA), ácido poli-glicólico (PGA) y alginato de sodio. Esta revisión presenta algunas de las principales aplicaciones del fibrinógeno en Ingeniería de Tejidos.

**Palabras clave:** fibrina, cultivos celulares, biomaterial, hidrogel, proteína.

### Abstract

Since its origin, Tissue Engineering has sought various materials that can be used for generation of scaffolds that serve to anchor, proliferation and cell differentiation leading to the production of human tissues. Many materials such as ceramic, polymeric and metal type have been evaluated to date but many have been rejected for various reasons, including its limited biocompatibility and biodegradability, immune response generated, low mechanical strength or the risk of transmission of virus or prions. Fibrinogen is a protein present in blood plasma that can be used to generate three-dimensional scaffolds that favors growth of cells, it is obtained from the patient itself, bank of blood or purified protein (Tisseel® or Tissucol®, Laboratorios Baxter). Fibrinogen acts slowing or reversing the immune response and avoiding the use of xenogeneic materials. Because the protein structure, adhesion and cell proliferation is favored with excellent results in the generation of skin equivalents, cartilage, cornea and even heart replacements *in vitro* and *in vivo*. The disadvantages presented are the rapid degradation and low mechanical strength, but in recent years it has been evaluating some biopolymer mixtures as polylactic acid (PLLA), poly-glycolic acid (PGA) and sodium alginate. This review presents some of the main applications of fibrinogen in Tissue Engineering.

**Key words:** fibrin, culture cells, biomaterial, hydrogel, protein.

**Recibido:** octubre 11 de 2011

**Aprobado:** noviembre 30 de 2011

\* Ing. Qco, c-Ph.D. División de Ingenierías, Universidad Santo Tomás- Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Correo: dhmalagonr@unal.edu.co

\*\* Odontóloga, M.Sc. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Correo: cdcardozor@unal.edu.co

\*\*\* Ing. Qco, M.Sc, Ph.D. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia. Correo: rdgodoy@unal.edu.co

## Introducción

A lo largo de los últimos años la Ingeniería Tisular ha venido desarrollando técnicas para el cultivo de células sobre soportes tridimensionales, con el propósito de mejorar la calidad de vida de muchos pacientes que han perdido total o parcialmente algunos de sus órganos y/o tejidos; adicionalmente, los avances y expectativas en el uso de células madre para el desarrollo de tejidos y órganos han impulsado el desarrollo de esta área del conocimiento. No obstante, uno de los grandes retos presentes en este campo es el de los materiales empleados como soportes para el crecimiento, expansión y diferenciación de las células que permitan integrarse al tejidos del paciente sin generar una respuesta inmune, con una velocidad de degradación controlada y que produzcan subproductos fácilmente integrables al metabolismo normal del organismo sin afectar la expresión de genes propios de cada línea celular.

Aunque se han evaluado muchos materiales hasta la fecha (Yoon and Fischer, 2007; Pachence *et al.*, 2007; Warren *et al.*, 2004), la experiencia con ellos ha llevado a desarrollar materiales biocompatibles y biodegradables los cuales, una vez que se implanta el equivalente en el organismo, son absorbidos y reemplazados paulatinamente por el tejido neoformado del mismo paciente (Falke y Atala, 2000). Pese al amplio abanico de materiales desarrollados, aún no se cuenta con un material capaz de cumplir con todos los requerimientos necesarios para garantizar la integración al tejido del paciente. Uno de los materiales en ascenso en la Ingeniería de Tejidos, por su facilidad de obtención y la posibilidad de conseguir equivalentes autólogos, es el fibrinógeno, una proteína presente en el plasma sanguíneo en un porcentaje cercano al 1% del total de proteínas presentes en él (Moure *et al.*, 2003). Debido a la presencia del fibrinógeno en la sangre, se considera un material biocompatible y biodegradable (Eyrich, 2006).

## Estructura del fibrinógeno

El fibrinógeno es una glicoproteína con estructura globular y fibrosa que corresponde al Factor I de la Cascada de Coagulación y está formada por dos subconjuntos proteicos consistentes de tres cadenas, denominadas  $(A\alpha)_2$ ,  $(B\beta)_2$  y  $(\gamma)_2$ , unidas mediante puentes disulfuro creando la estructura molecular dimérica (Rawn, 1989). La parte central de la molécula, denominada región E, contiene un nitrógeno terminal en todas las seis cadenas las cuales se entrelazan y forman  $\alpha$ -hélices unidas por puentes disulfuro, manteniendo el dominio D en el extremo y las cadenas  $B\beta$  y  $\gamma$  en los

extremos de este dominio (Standeven *et al.*, 2005). Las cadenas  $(A\alpha)$  consisten de 610 aminoácidos, las  $(B\beta)$  de 461 y las  $(\gamma)$  de 411 (Standeven *et al.*, 2005; Grassl and Tranquillo, 2006), en consecuencia el fibrinógeno humano consta de 2.964 aminoácidos con un peso molecular de 329,818 kDa; además, posee 4 grupos de carbohidratos, uno en cada cadena  $B\beta$  y  $\gamma$  lo cual contribuye con otros 10 kDa al peso molecular para dar un valor aproximado de 340 kDa (Standeven *et al.*, 2005). El fibrinógeno es sintetizado, principalmente, en el hígado en cantidades de 1,7-5,0 g por día para mantener una concentración normal de fibrinógeno en la sangre de 2,5-3,0 mg / ml (Standeven *et al.*, 2005). El fibrinógeno es un zimógeno que viaja en el torrente sanguíneo y cuando se requiere la coagulación de la sangre se activa a través de la Cascada de Coagulación donde la trombina (Factor IIa) hidroliza los fibrinopéptidos AA y BB, el uno de 13 y el otro de 14 aminoácidos, que están en las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del fibrinógeno, lo cual induce la polimerización del fibrinógeno de forma vertical, mientras que la polimerización horizontal causa la unión covalente entre dos moléculas de fibrinógeno por el factor XIIIa para formar un coágulo insoluble de fibrina polimerizado (Eyrich *et al.*, 2007b; Blomback and Bark, 2004; Doolittle, 1984). El grado de asociación lateral de dichas fibrillas conduce a la estabilización del gel mediante entrecruzamientos covalentes de grupos e-amino de residuos de lisina de una cadena y residuos de glutamina de cadena adyacente; dicha reacción depende de las condiciones en las cuales ocurra la formación de la fibrina, como el pH, la fuerza iónica y la concentración de trombina y fibrinógeno, con lo cual se pueden obtener fibras con diámetros de 10 a 200 nm (Grassl and Tranquillo, 2006).

La función primordial del coágulo de fibrina es taponar el vaso lesionado y contribuir con la reparación de la zona lesionada; en la medida en que se presenta la cicatrización y regeneración de la zona afectada, la fibrina es degradada y reabsorbida por el organismo. La degradación de la fibrina es debida a la plasmina, la cual es la enzima activa gracias a las acción del activador tisular de plasminógeno (t-PA); la plasmina degrada la fibrina a péptidos conocidos como PDF (productos de degradación de la fibrina) (Rawn, 1989; Doolittle *et al.*, 2006; Robbins *et al.*, 1967; Ranby, 1982).

El fibrinógeno ofrece algunas propiedades que son importantes en los materiales empleados en Ingeniería de Tejidos tales como una favorable interacción con células en procesos como la distribución, adhesión y señalización plaquetaria, proliferación de fibroblastos y células endoteliales, cicatrización y respuesta inflamatoria; además, es capaz de unirse a proteínas como

fibronectina (facilitando su incorporación a la matriz extracelular), factores de crecimiento para fibroblastos (FDF-2,  $\beta$ -FGF) y endotelio vascular (VEDF) que estimulan la angiogénesis, y la interleucina-1 $\beta$  que interviene en inflamación (Lauricella, 2007). Una de las desventajas que tienen los geles de fibrina es su baja resistencia mecánica, por lo que se hace necesario su reforzamiento mediante mezclas con otros materiales biocompatibles y biodegradables (Hokugo *et al.*, 2006).

Adicionalmente, los constructos del fibrinógeno mantienen la actividad física y biológica de las proteínas durante la aplicación, sin inducir respuesta inmune; además, la fabricación de dichos geles puede ser manipulada de tal forma que las redes de fibrina pueden ser orientadas de manera que permiten alinear las células durante su crecimiento (Grassl and Tranquillo, 2006; Bak *et al.*, 2002; Hokugo *et al.*, 2006).

### Gelificación del fibrinógeno

Tanaka (1981) definió un gel como una forma intermedia entre un líquido y un sólido, consiste en hebras o cadenas entrecruzadas que crean una red continua inmersa en un medio líquido; también se puede definir un gel como la suspensión o dispersión coloidal formada cuando una sustancia líquida insoluble se dispersa en una fase sólida. Cuando los geles son capaces de retener en su estructura tridimensional moléculas de agua reciben el nombre de hidrogeles, los cuales son redes de polímeros hidrofílicos que pueden absorber desde un 10-20% hasta varios miles de veces su propio peso seco en agua; pueden ser químicamente estables o ser disueltos y desintegrados, esto depende del tipo de aplicación para la cual se requieran (Hoffman, 2002). Esta estructura y el microambiente generado son bastante similares al ambiente natural de los tejidos vivos, por lo cual, los hidrogeles son útiles para una variedad de aplicaciones biomédicas (Coviello *et al.*, 2007) ya que permiten incorporar algunas sustancias que contribuyen fundamentalmente en la regeneración del tejido como los ligandos peptídicos que actúan como receptores de la membrana celular y estimulan la adhesión, proliferación y crecimiento celular (Brandl *et al.*, 2007); por otro lado, dichos hidrogeles facilitan la difusión de nutrientes y desechos en la matriz extracelular, pueden ser gelificados a temperatura corporal *in situ*; dentro de las desventajas están la dificultad de manipulación, baja resistencia mecánica y dificultad para la esterilización. Inicialmente se emplearon para encapsular células y recientemente se han vuelto interesantes para la generación de matrices para la reparación y regeneración de una amplia variedad de tejidos y órganos (Hoffman, 2002); además,

durante la cicatrización, los hidrogeles proveen una cobertura húmeda que protege la herida de la infección (Seal *et al.*, 2001). Dentro de los polímeros que se han evaluado por su capacidad para gelificar sobresalen colágeno, quitosano, fibrinógeno, polietilenglicol y polipropilénfumarato (Hoffman, 2002; Seal *et al.*, 2001; Yoon and Fischer, 2007).

En general, el proceso de gelificación depende de las siguientes cuatro variables: temperatura, concentración, fuerza iónica y pH; sin embargo, en sistemas biológicos en los cuales la gelificación se produce por la acción de enzimas el estudio se ha extendido también a la concentración de la enzima. En el caso del fibrinógeno, la gelificación depende fundamentalmente de la concentración de fibrinógeno, trombina y calcio, pH y fuerza iónica que pueden favorecer la unión lateral de las moléculas de fibrinógeno (Grassl and Tranquillo, 2006; Eyrich, 2006), con lo cual se pueden generar dos tipos de geles: finos y gruesos. Los geles finos consisten en un alto número de fibras delgadas y unidas compuestas de protofibrillas que generan un gel transparente y rígido con pequeños poros; en contraste, los geles gruesos están compuestos de fibras gruesas formadas por la unión lateral de agregados de protofibrillas que conducen a la formación de un gel turbio con un tamaño de poro mayor (Eyrich *et al.*, 2007b; Blomback, 2000). Se ha demostrado que un aumento en la fuerza iónica produce fibrina de estructura más compacta de mayor turbidez y rigidez, y de porosidad marcadamente disminuida con respecto a la fibrina obtenida a menor fuerza iónica (Lauricella, 2007).

La gelificación del fibrinógeno ha sido estudiada por varios grupos de investigación. Zhao *et al.* (2008) evaluaron el efecto de la concentración de trombina (0,5 UT/ml-10 UT/ml) sobre la velocidad de gelificación y encontraron que existe una relación inversa entre la concentración de trombina y el tiempo de gelificación; además, encontraron que estructuras más fibrosas y con fibras más delgadas son obtenidas cuando la concentración de trombina es alta y a una mayor concentración de trombina se obtiene un mayor entrecruzamiento del gel, lo que conlleva a un aumento en la capacidad de resistir la deshidratación. En cuanto a la resistencia mecánica, Rowe *et al.* (2007) mezclaron células de músculo liso de aorta de rata en concentración  $1 \times 10^6$  células/ml, las cuales se combinaron con fibrinógeno bovino en concentración de 2 mg/ml y diversas concentraciones de trombina 1,0; 0,1; 0,01 y 0,001 UT/mg fibrinógeno, suplementada con ácido e-amino-caproico (inhibidor de plasmina); las condiciones de gelificación fueron de 3 h y 37 °C. Los resultados muestran que la mejor concentración de trombina es 0,001 UT/mg fibrinógeno, donde se presenta el va-

lor más alto del esfuerzo tensil último (38,6 kPa); las células fueron alineadas a lo largo del eje de las fibras de fibrina, sin embargo, la compactación del gel fue demasiado alta y en el día 7 de cultivo, el volumen era cercano al 5% del volumen original. Por tanto, la resistencia mecánica de los geles de fibrina es inversamente proporcional a la concentración de trombina.

La concentración de trombina resulta ser un factor preponderante durante la gelificación del fibrinógeno y, por tanto, se requiere un proceso para su obtención de manera sencilla con miras a estandarizar un proceso de producción de equivalentes autólogos. Haisch *et al.* (2000) presentan una alternativa para aislar la trombina a partir de plasma sanguíneo usando cromatografía de intercambio iónico y diálisis, y concluyen que a partir de 200 ml de plasma sanguíneo es posible conseguir trombina con una actividad de 51 NIH/ml a 414 NIH/ml (58,65 UT/ml a 476,1 UT/ml, usando un factor de conversión de 1,15, factor recomendado por National Institute for Health).

En cuanto al comportamiento reológico, Eyrich *et al.* (2007a) realizaron reología dinámica para la optimización del gel y encontraron que las mejores condiciones de gelificación son estas: 50 mg de fibrinógeno/ml, 20 mM de Ca<sup>2+</sup>, pH 7,0; si la concentración es mayor a 25 mg de fibrinógeno/ml el gel tiene apariencia transparente y es estable en el cultivo de condrocitos durante el tiempo del ensayo (3 semanas), si la concentración de calcio es menor a 20 mM resultan ser opacos; la evaluación de pH mostró que valores por debajo de 6,8 y mayores a 9,0 generaron geles turbios.

Una característica de los equivalentes de fibrina es su inestabilidad y solubilidad en el tiempo debido a la fibrinólisis; en los sellantes disponibles comercialmente tienden a contraerse y desintegrarse *in vitro* e *in vivo* después de unos días y se disuelven completamente dentro de 4 semanas (Eyrich, 2006). En los cultivos *in vitro*, para evitar dicha fibrinólisis, se suelen emplear agentes antifibrinolíticos que inhiben la acción de la plasmina tales como el ácido tranexámico (Laboratorios Ropsohn), que bloquea la lisina presente en el sitio activo de la plasmina permitiendo que los constructos generados perduren por más tiempo sin un cambio apreciable en sus propiedades (Llames *et al.*, 2004; Arvelo *et al.*, 2004; Iriarte, 2007), la aptotina (serinoproteasa) y el ácido e-aminocaproico (un análogo de la lisina que compite inhibiendo la unión entre plasmina y plasminógeno a la fibrina) (Grassl and Tranquillo, 2006; Rowe *et al.*, 2007; Eyrich *et al.*, 2007b). Existen divergencias entre los resultados obtenidos experimentalmente sobre el uso estos inhibidores de la fibrinólisis en la generación del tejido, pues algunos concluyen

que disminuye la formación de la matriz extracelular y otros no encuentran diferencia significativa (Mol *et al.*, 2005), por lo cual es necesaria la evaluación de los inhibidores de la plasmina con cada línea celular.

### Mezcla de fibrinógeno con otros materiales

Para mejorar las propiedades mecánicas, el fibrinógeno se ha mezclado con otros materiales. Bak *et al.* (2002) evaluaron el efecto reológico de adicionar úrea y alginato a un medio que contiene fibronectina y fibrinógeno (obtenido a partir de plasma humano mediante precipitación con PEG), con miras a obtener fibras estables mediante extrusión de tal manera que se mantenga la actividad biológica y las propiedades estructurales. Por otro lado, Zhao *et al.* (2009b) fabricaron un soporte de polilactida (PLLA) y fibrina (obtenida a partir de plasma humano) usando la técnica de separación de fases inducida térmicamente, luego realizaron la polimerización sobre la superficie porosa y obtuvieron un tamaño de poro del orden de 150 a 350 nm con una porosidad del 93% y lograron que la degradación de dichos geles fuera de 20 días frente a los 3 días que tardaron los geles de fibrina sola, usados como testigos. Hokugo *et al.* (2006) mezclaron fibrina con ácido poli-glicólico (PGA) para generar esponjas mediante el método de liofilización y sobre estas se cultivaron fibroblastos de ratón de la línea L929 con miras a obtener un equivalente cutáneo. Los investigadores encontraron que en los ensayos donde se colocó PGA la proliferación celular y el intercambio de nutrientes fueron mejores que en el ensayo control donde no se colocó PGA; esto se debe a una menor contracción del gel durante el crecimiento celular cuando hay PGA que cuando no está presente. De las mezclas de fibrina con otros polímeros que se reportan como una alternativa tecnológica, sobresalen las mezclas con alginato [Bhakta *et al.*, 2009 y Shikanov *et al.* (2009)], alginato-ácido gúlcónico y gelatina (Xu *et al.*, 2010), k-carragenina-quitosan (Doncel *et al.*, 2006), poliglactina (Aper *et al.*, 2004) y agarosa (Ionescu *et al.*, 2011).

Las referencias presentadas muestran que la tendencia actual es usar diferentes mezclas de la fibrina con otros materiales, principalmente polisacáridos, donde se pueda tener un efecto sinérgico entre la resistencia mecánica que ofrecen dichos materiales y la adhesión celular que ofrece la fibrina.

### Uso de fibrinógeno en Ingeniería de Tejidos

La aplicación de fibrina en la Ingeniería de Tejidos puede ser agrupada en 3 áreas principales: fibrina como material para el soporte celular, fibrina combi-

nada con otros materiales poliméricos y como sistema de liberación de factores de crecimiento u otros agentes terapéuticos (Eyrich, 2006). De hecho, el uso de fibrinógeno en aplicaciones biomédicas no es algo reciente, Laboratorios Baxter tiene en el mercado dos productos, Tissucol® y Tisseel®, que son fibrinógeno humano purificado y que se emplean como sellante en cirugía (Buchta *et al.*, 2005; Spotnitz, 2010), en el cual la concentración de fibrinógeno es del orden de 50 mg/ml y la de trombina es de 100 U/ml con un sistema de 2 jeringas (Marx, 2003).

Para que pueda ser usado en Ingeniería de Tejidos como soporte, el material debe proveer un ambiente que permita la migración, proliferación y diferenciación celular que favorezca el desarrollo del tejido (Eyrich, 2006); el fibrinógeno reúne estas características ya que posee una cadena peptídica específica, también referida como heptida, que contribuye a la adhesión celular de células mesenquimales como fibroblastos, endotelio y músculo liso (Eyrich *et al.*, 2007b). En los últimos años, el fibrinógeno ha venido ganando terreno como uno de los materiales que puede ser empleado para la fabricación de geles que soporten el crecimiento celular; muchos grupos usan el fibrinógeno comercial distribuido por Laboratorios Baxter, mientras que otros grupos usan plasma aprovechando la presencia del fibrinógeno para obtener equivalentes autólogos. Llames *et al.* (2004) muestran que el uso de plasma resulta más adecuado que el fibrinógeno purificado en cuanto a costos y tiempo, además aporta citoquinas, factores de adhesión y factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) que no contiene el fibrinógeno purificado; por otro lado, la capacidad de usar la sangre de los mismos pacientes reduce el riesgo de transmisión de patógenos incluidos los virus; la desventaja de usar el plasma es que se pueden requerir volúmenes grandes del mismo y haría necesario usar plasma proveniente de los bancos de sangre.

Recientemente, Huang *et al.* (2010) han demostrado que células estromales mesenquimales cultivadas en geles de fibrina pueden expresar genéticamente actividad vasculogénica, miogénica, neurogénica, condrogénica y osteogénica, la cual puede ser potenciada mediante el empleo de factores de crecimiento apropiados sin que exista influencia del tamaño del poro y de la concentración de fibrina. Esto muestra las posibilidades de uso de la fibrina en los próximos años, para la generación de tejidos.

### Equivalentes de piel

Una de las primeras aplicaciones que tuvo el fibrinógeno fue como soporte para la proliferación de quera-

tinocitos. Horch *et al.* (1999) demostró en un modelo de experimentación animal porcino que los queratinocitos cultivados sobre geles de fibrina son una excelente alternativa para la cicatrización de heridas. Desde entonces, productos como Tissucol® y Tisseel® se han ofertado para su aplicación en el cultivo de queratinocitos y como sellante de heridas.

En cuanto al uso de fibrinógeno y plasma para la producción de equivalentes de piel, Llames *et al.* (2004) evaluaron el plasma fresco como soporte para la proliferación de queratinocitos y fibroblastos, y encontraron que el plasma fresco resulta adecuado para el crecimiento y proliferación de estas dos líneas celulares; además, evaluaron los equivalentes dérmicos completos autólogos en pacientes con quemaduras hasta por 2 años y encontraron la ausencia de respuesta inmunológica y la integración total del constructo con los tejidos adyacentes en los pacientes. En un trabajo similar, Arvelo *et al.* (2004) obtuvieron equivalentes completos empleando plasma fresco, fibroblastos y queratinocitos y concluyeron que en geles de fibrina los fibroblastos son capaces de sintetizar múltiples factores de crecimiento, similares a los que son producidos y secretados por ellos *in vivo*; además, que los geles pueden servir como reservorio de otras sustancias como los factores de crecimiento y antibióticos que favorecen y permiten la correcta cicatrización; también demostraron que los queratinocitos se expanden con facilidad ya que la capa de fibroblastos obtenida constituye el soporte dérmico que favorece su proliferación al ser capaz de producir KGF (factor de crecimiento de queratinocitos). Otra ventaja del uso de fibrina es que mantiene la totipotencialidad de las células epidérmicas, lo cual es un requisito para la regeneración permanente (Llames *et al.*, 2004).

Zhao *et al.* (2008) evaluaron el crecimiento de fibroblastos humanos atrapados en geles de fibrinógeno humano y encontraron una excelente citocompatibilidad debido a los ingredientes activos derivados del plasma que están unidos al fibrinógeno, pues ellos proveen un espacio para la proliferación celular que impide la existencia de inhibición durante la misma. Meana *et al.* (1998) evaluaron el uso de crioprecipitados de plasma sanguíneo para la formación de geles de fibrina y determinaron la expresión de proteínas membranales como colágeno tipo IV, laminina y queratina durante el crecimiento de fibroblastos y queratinocitos. Por otro lado, Mazlyzam *et al.* (2008) compararon el crecimiento de fibroblastos en el medio DMEM/Ham's F-12 suplementado con suero humano o suero fetal bovino en la misma proporción (10%) y encontraron que la viabilidad celular es mayor con suero humano que con suero fetal bovino; además, el tiempo de du-

plicación resultó menor con suero humano y la fase S del ciclo celular (fase de síntesis) resultó mayor. Mediante RT-PCR se muestra que las células mantienen la capacidad de sintetizar colágeno tipo I e incrementa la expresión de genes asociados con la producción de colágeno tipo III y fibronectina comparado con suero fetal bovino. En esta misma línea, Mazlyzam *et al.* (2007) cultivaron sobre plasma sanguíneo fibroblastos y queratinocitos y mediante pruebas inmunohistoquímicas demostraron que las células expresaron colágeno y queratina en la dermis y epidermis, respectivamente. Kopp *et al.* (2004) realizaron un análisis de las aplicaciones clínicas del cultivo de queratinocitos en matrices de fibrinógeno (usando Tisseel®, Laboratorios Baxter) y encontraron que el cultivo y aplicación de queratinocitos autólogos muestran, a nivel clínico, una capacidad para re-epitelizar heridas crónicas. Bannasch *et al.* (2008) evaluaron el crecimiento de queratinocitos sobre constructos fabricados con una matriz acelular de Alloderm® (LifeCell Corporation) y una matriz celular preparada con fibrina (Tisseel®, Laboratorios Baxter) en un modelo porcino; con esta metodología lograron una excelente integración histológica y una reducción en la contracción de la herida en comparación con el grupo control (queratinocitos atrapados en fibrina). A nivel nacional, Iriarte (2007), empleando plasma fresco, generó la matriz para el crecimiento de fibroblastos procedentes de biopsias de cirugía y mostró que es posible reemplazar el suero fetal bovino del medio de cultivo por plasma fresco; Escobar *et al.* (2007) presentan el uso de equivalentes cutáneos fabricados con plasma sanguíneo para el tratamiento de úlceras de difícil cicatrización, con excelentes resultados a nivel clínico; Arango *et al.* (2009) reportan la producción de equivalentes de piel usando plasma sanguíneo humano.

Recientemente, Vavken *et al.* (2011) muestran que es posible obtener una mayor expresión de colágeno en soportes fabricados con bajas concentraciones de fibrina (1-3 mg/ml), lo cual resulta ser ventajoso ya que soluciones de fibrinógeno cercanas a las fisiológicas para la generación del soporte, presentarían mejores resultados que una mayor concentración.

En términos de procesamiento, Mazlyzam *et al.* (2007) muestran que con 2 ml de plasma sanguíneo se pueden generar 9,6 cm<sup>2</sup> de equivalente dérmico, lo cual permite estimar que con una unidad de plasma sanguíneo de 250 ml se alcanzaría a cubrir un área cercana a 1000 cm<sup>2</sup>, que podría ser el área de una quemadura mediana. Algunos estudios han evidenciado que dentro de los 3 días de aplicación del gel de fibrina se presenta una granulación del tejido con un gran número de células, las cuales son reemplazadas con fibras

de colágeno después de 1 ó 2 semanas (Eyrich *et al.*, 2007b). En cuanto a la resistencia mecánica, Ahlfors and Billiar (2007) reportan valores para la resistencia tensil última de 133±8,0 kPa, la cual es del mismo orden de magnitud que la reportada en el mismo estudio para los geles de colágeno.

## Cartílago

El fibrinógeno también ha sido ampliamente usado para el cultivo de condrocitos hasta el punto de ser considerado el cartílago como la más importante aplicación de fibrina en Ingeniería de Tejidos (Eyrich, 2006). Perka *et al.* (2001) evaluaron la inmovilización de condrocitos empleando geles de fibrina y alginato de sodio polimerizados con cloruro de calcio y trombina; una vez inmovilizadas las células, las cultivaron en frascos Roller usando medio de cultivo DMEM/Ham's F-12 con suero bovino al 10% y Trasylol (aprotinina, Laboratorio Bayer), como resultado obtuvieron el crecimiento celular de condrocitos y el mantenimiento de esta línea celular por el uso de alginato de sodio. Eyrich *et al.* (2007a) evaluaron el crecimiento celular de condrocitos bovinos empleando geles de fibrina obtenidos a partir de Tissucol® (Laboratorios Baxter) y concluyeron que es necesario sembrar mínimo 75 X 10<sup>6</sup> células/ml de suspensión para lograr una adecuada producción de matriz extracelular, rica en colágeno tipo II y GAG. Almqvist *et al.* (2001) evaluaron el crecimiento de condrocitos en matrices de alginato de calcio rodeados por fibrina y encontraron que la mejor concentración para la proliferación celular es alginato al 1% y fibrinógeno (Tissucol®, Laboratorios Baxter) al 0,5%; las pruebas inmunohistoquímicas revelaron la formación de agregados y colágeno tipo I y II durante las 8 semanas de evaluación. Zhao *et al.* (2009b) evaluaron el crecimiento de condrocitos obtenidos a partir de cartílago de conejo de la zona auricular usando soportes de polilactida (PLLA) y fibrina (obtenida a partir de plasma humano) y encontraron que los condrocitos son capaces de proliferar y generar Glicosaminoglicanos (GAG) manteniéndose la forma esférica. Finalmente, Hunter *et al.* (2004) evaluaron el efecto de la aplicación de esfuerzos mecánicos sobre geles de fibrina fabricados con fibrinógeno bovino (ICN Biomedical) y en los cuales sembraron 10<sup>7</sup> células/ml de condrocitos aislados de tejido articular bovino; ellos encontraron que dichos esfuerzos mecánicos no favorecieron la formación de hidroxiprolina y Glicosaminoglicano sulfatado (sGAG), por lo cual concluyen que no hay formación de tejido cartilaginoso.

Estos resultados obtenidos permiten concluir que la fibrina es un excelente soporte para la formación de

cartílago al garantizar una matriz extracelular que favorece la expresión de marcadores característicos de los condrocitos.

### Tejidos cardiovasculares

El fibrinógeno también se ha usado para la generación de soportes cardiovasculares, aprovechando la posibilidad de alinear las fibras (Jockenhoevel *et al.*, 2001), y en la generación de válvulas cardíacas o venosas [Ye *et al.* (2000); Aper *et al.* (2004)]. Aper *et al.* (2004) realizaron matrices de fibrina mezclada con poliglactina, sobre ella hicieron crecer miofibroblastos aislados de la vena safena y evaluaron su crecimiento *in vitro* durante 14 días; transcurrido este tiempo se hicieron crecer células endoteliales que proliferaron en la superficie del soporte con miofibroblastos. Mediante pruebas inmunohistoquímicas se encontró la formación de laminina y colágeno tipo IV y se apreció que las células endoteliales cubrieron la superficie de manera uniforme.

Mol *et al.* (2005) evaluaron el efecto del uso de un inhibidor de plasmina, el ácido e-amino-n-caproico, sobre la formación de matriz extracelular para geles de fibrina en los cuales se colocaron miofibroblastos humanos. Los investigadores encontraron que el inhibidor de la fibrinólisis no afecta la formación de la matriz extracelular cuando cuantifican hidroxiprolina, pero a nivel de microscopía sí observaron una formación más madura cuando no hay inhibidor.

### Tejido Óseo

También se han realizado ensayos para evaluar el uso de fibrina en la generación de tejido óseo; sin embargo, el uso de otros materiales como la hidroxiapatita y el ácido poliláctico han predominado. Dentro de los trabajos realizados en este ámbito sobresalen el de Bensaïd *et al.* (2003) quienes tomaron geles de fibrinógeno (Tissucol®, Laboratorios Baxter) para ser gelificados *in situ* en el desarrollo de equivalentes óseos usando células madre mesenquimales, y encontraron que la mejor relación para la fabricación del gel es 18 mg/ml de fibrinógeno, lo que permite tener un producto que se puede manipular, no se desintegra tan fácilmente y además, el gel permite la liberación de células que se integran al tejido del modelo *in vivo* empleado para la evaluación. Zhao *et al.* (2009a) prepararon partículas de fosfato tricálcico- $\beta$ , las cuales fueron suspendidas en geles de fibrina humana con células madre mesenquimales humanas, y se demostró que los geles obtenidos tuvieron una estructura más densa, con un comportamiento marcadamente elástico ( $G' > G''$  en

un orden de magnitud); de esta manera se encontró que las partículas de fosfato tricálcico- $\beta$  promovieron la proliferación celular con una alta expresión de fosfatasa alcalina, la cual es un marcador propio de células óseas.

### Liberación controlada de fármacos

Una aplicación reciente para los geles de fibrina está relacionada con la liberación de células y factores de crecimiento en aplicaciones de Ingeniería Tisular tales como factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), entre otros (Cox *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006; Mogford *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2006; Spicer and Mikos, 2010; Liang and Andreadis, 2011). El método de preparación de estos sistemas es bastante sencillo, ya que se adiciona el factor a liberar en el gel de fibrinógeno antes de la polimerización y una vez se produce este dicho factor queda atrapado en el gel; posteriormente, mediante la degradación controlada del gel se produce la liberación del factor. Mediante esta alternativa es posible liberar factores de crecimiento en los equivalentes de tejidos, de tal manera que se pueda modular la expresión celular y así tener un mayor control sobre la cicatrización y regeneración tisular.

### Nuevas alternativas

Dos alternativas, recientemente publicadas, muestran nuevos escenarios de uso del fibrinógeno. Por un lado, Bhakta *et al.* (2009) mezclan soluciones de alginato de sodio y fibrinógeno para conseguir una concentración final del 0,6% p/v y 30 mg/ml, respectivamente, para atrapar células mesenquimales en concentración de  $2,0 \times 10^7$  células/ml antes del proceso de polimerización que lo realizan con cloruro de calcio (0,102 M) y trombina (46 IU/ml). Posteriormente someten las esferas a un proceso de vitrificación y encuentran que este atrapamiento celular protege las células durante la congelación. La otra alternativa es la presentada por Shikanov *et al.* (2009) quienes mezclan fibrinógeno con alginato de sodio para el crecimiento de folículos ováricos y encuentran producción de oocitos competentes.

Mediante la mezcla de k-carragenina/quitosan con fibrina es posible el cultivo de células de glioma de rata C6, con lo cual se puede esperar la regeneración de tejido nervioso (Doncel *et al.*, 2006).

Como se puede ver, el uso de fibrinógeno en la Ingeniería Tisular ha cobrado gran importancia; por ser un material de origen humano, su aplicación en pacientes

es más rápida comparada con otros materiales de origen xenogénico u obtenidos, por rutas biotecnológicas, usando microorganismos recombinantes.

Una novedosa alternativa para la generación de equivalentes de tejidos es mediante el empleo de sistemas de impresión, en los cuales se pueden depositar células y soporte para alcanzar equivalentes de menos de 200  $\mu\text{m}$  de espesor y evitar restricciones difusionales durante el crecimiento celular; a través de esta técnica se coloca la solución de trombina y células en un cartucho de impresora y la solución de fibrinógeno hace las veces de papel, de esta manera, la impresión puede generar soportes con una estructura bastante definida (Cui and Boland, 2009). Con el uso de esta técnica, Xu *et al.* (2010) fabricaron una estructura tridimensional empleando fibrina, alginato, ácido glicólico y gelatina, en ella atraparon células adipocitos derivados de células estromales y posteriormente colocaron islotes pancreáticos de rata; los investigadores encontraron que es factible obtener *in vitro* un modelo del síndrome metabólico.

### Consideraciones finales

El fibrinógeno es un material biocompatible, biodegradable, de fácil obtención, económico y seguro que puede emplearse en la generación de soportes tridimensionales para el crecimiento celular. La evaluación de este material por diversos grupos de investigación y el uso clínico que actualmente tiene como sellante en cirugía preveen su importancia en el desarrollo de diversos tejidos en un futuro cercano. La mezcla con biopolímeros permite aumentar su resistencia mecánica y amplía el espectro de aplicación de este material. Mediante el desarrollo de procedimientos que empleen plasma del propio paciente como fuente de fibrinógeno se podrían alcanzar equivalentes totalmente autólogos con bajos costos. Esta tecnología desarrollada adecuadamente en el medio colombiano estaría fácilmente a disposición de los grupos de mayor vulnerabilidad en el sistema asistencial de salud.

### Referencias bibliográficas

Ahlfors, J., and Billiar, K. 2007. Biomechanical and biochemical characteristics of a human fibroblast-produced and remodeled matrix. *Biomaterials* 28: 2183-2191.

Almqvist, K., Wang, L., Wang, J., Baeten, D., Cornelissen, M., Verdonk, R., Veys, E. and Verbruggen, G. 2001. *Ann Rheum Dis* 60: 781-790.

Aper, T; Teebken, O; Steinhoff, G; Haverich, A. 2004. Use of a fibrin preparation in the engineering of a vascular graft model. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 28: 296-302.

Arango, M., Chamorro, C., Restrepo, L., Correa, L. y Henao, J. 2009. Características histológicas de piel cultivada *in vitro*. *Revista Argentina de Dermatología* 90: 190-200.

Arvelo, F., Pérez, P. y Cotte, C. 2004. Obtención de láminas de piel humana mediante Ingeniería de Tejidos. *Acta Científica Venezolana* 55: 74-82.

Bak, H., Afoke, A., McLeod, A., Brown, R., Shamlou, P. and Dunnill, P. 2002. The impact of rheology of human fibronectin-fibrinogen solutions on fibre extrusion for tissue engineering. *Chemical Engineering Science* 57: 913-920.

Bannasch, H., Unterberg, T., Fohn, M., Weyand, B., Horch, R. and Stark, B. 2008. Cultured keratinocytes in fibrin with decellularised dermis close porcine full-thickness wounds in a single step. *Burns* 34: 1015-1021.

Bensaid, W., Triffitt, J., Blanchat, C., Oudina, K., Sedel, L. and Petite, H. 2003. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials* 24: 2497-2502.

Bhakta, G., Lee, K., Magalhaes, R., Wen, F., Siam, S., Hutmacher, D. and Kuleshova, L. 2009. Cryopreservation of alginate-fibrin beads involving bone marrow derived mesenchymal stromal cells by vitrification. *Biomaterials* 30: 336-343.

Blomback, B. 2000. Fibrinogen: evolution of the structure-function concept. Keynote address al fibrinogen 2000 Congress.

Blomback, B. and Bark, N. 2004. Fibrinopeptides and fibrin gel structure. *Biophysical Chemistry* 112: 147-151.

Brandl, F., Sommer, F. and Goepperich, A. 2007. Rational design of hydrogels for tissue engineering: impact of physical factors on cell behavior. *Biomaterials* 28: 134-146.

Buchta, C., Hedrich, H., Macher, M., Hocker, P. and Redl, H. 2005. Biochemical characterization of autologous fibrin sealants produced by Cryoseal and vivostat in comparison to the homologous fibrin sealant product Tissucol/Tisseel. *Biomaterials* 26: 6233-6241.

Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C. and Alhaique, F. 2007. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release* 119: 5-24.

Cox S., Cole M. and Tawil B. 2004. Behaviour of human dermal fibroblasts in three-dimensional fibrin clots: dependence on fibrinogen and thrombin concentrations. *Tissue Engineering* 10: 942-954.

Cui X. and Boland T. 2009. Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. *Biomaterials* 30: 6221-6227.

Doncel E., Darder M., Martín E., Vásquez L., Nieto M. and Ruiz, E. 2006. Gelation under dynamic conditions: a strategy for *in vitro* cell ordering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 17: 795-802.

Doolittle, R. 1984. Fibrinogen and fibrin. *Annual Reviews Biochemistry* 53: 195-229.

Doolittle, R., Yang, Z. and Mochalkin, I. 2006. Crystal structure studies on fibrinogen and fibrin. *Annals New York Academy of Sciences* 31-43.



- Escobar, M., Henao, J., Wolff, M., Estrada, S. y Restrepo, L. 2007. Tratamiento de las úlceras crónicas en los miembros inferiores con un equivalente cutáneo autólogo y desbridación con larvas de *Lucilia sp.*(Diptera: calliphoridae): reporte de un caso. *Atreia* 20: 4.
- Eyrich, D. 2006. *Fibrin for Tissue Engineering of Cartilage*. Regensburg: Tesis Ph.D., Universidad de Regensburg 208 p. <[http://epub.uni-regensburg.de/10444/1/Diss\\_Final\\_web\\_pass.pdf](http://epub.uni-regensburg.de/10444/1/Diss_Final_web_pass.pdf)
- Eyrich, D., Brandl, F., Appel, B., Wiese, H., Maier, G., Wenzel, M., Staudenmaier, R., Goepferich, A. and Blunk, T. 2007a. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials* 28: 55-65.
- Eyrich, D., Gopferich, A. and Blunk, T. 2007b. Fibrin in tissue engineering. In *"Tissue Engineering", series Advances in experimental medicine and biology* 585: 379-392.
- Falke, G. y Atala, A.. 2000. Reconstrucción de tejidos y órganos usando ingeniería tisular. *Archivos Argentinos de Pediatría* 98 (2): 103-115.
- Grassl, E. and Tranquillo, R. 2006. Fibrillar fibrin gels. En: Ma, P. and Elisseeff, J. (ed.). *Scaffolding in Tissue Engineering*. Boca Ratón: Taylor y Francis, 638 p.
- Haisch, A., Loch, A., David, J., Prub, A., Hansen, R. and Sittinger, M. 2000. Preparation of a pure autologous biodegradable fibrin matrix for tissue engineering. *Medical and Biological Engineering and Computing* 38: 686-689.
- Ham, B., Schwab, I., Madsen, R. and Isseroff, R. 2002. A fibrin-based bioengineered ocular surface with human corneal epithelial stem cells. *Cornea* 21 (5): 505-510.
- Ho, W, Tawil, B., Dunn, J. and Wu, B. 2006. The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. *Tissue Engineering* 12: 1587-1595.
- Hoffman, A. 2002. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 43: 3-12.
- Horch, R., Bannasch, H. and Stark, G. 1999. Cultured human keratinocytes as a single cell suspension in fibrin glue combined with preserved dermal grafts enhanced reconstitution in athymic mice full-thickness wounds. *European Journal of Plastic Surgery* 22: 237-243.
- Hokugo, A., Takamoto, T. and Tabata, Y. 2006. Preparation of hybrid scaffold from fibrin and biodegradable polymer fiber. *Biomaterials* 27: 61-67.
- Huang, N., Chu, J., Lee, R. and Li, S. 2010. Biophysical and chemical effects of fibrin on mesenchymal stromal cell gene expression. *Acta Biomaterialia* 6: 3947-3956.
- Hunter, C., Mouw, J. and Levenston, M. 2004. Dynamic compression of chondrocyte-seeded fibrin gels: effects on matrix accumulation and mechanical stiffness. *Osteoarthritis and cartilage* 12: 117-130.
- Ionescu, A., Alaminos, M., Cardona, J., García-López, J., González, M., Ghinea, R., Campos, A., Hita, E. and Pérez, M. 2011. Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: rheological properties. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 4: 1963-1973.
- Iriarte, J. 2007. *Obtención de un constructo tridimensional tisular como equivalente dérmico para terapéutica alternativa en dermatología*. Universidad Nacional de Colombia: Tesis de especialización en dermatología.
- Jockenhoevel, S., Zund, G., Hoerstrup, S., Chalabi, K., Sachweh, J., Demircan, L., Messmer, B. and Turina, M. 2001. Fibrin-gel advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 19: 424-430.
- Kopp, J., Jeschke, M., Bach, A., Knese, U. and Horch, R. 2004. Applied tissue engineering in the closure of severe burns and chronic wounds using cultured human autologous keratinocytes in a natural fibrin matrix. *Cell and Tissue Banking*: 5: 89-96.
- Lauricella, A. M. 2007. Variabilidad de las redes de fibrina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 41(1): 7-19.
- Liang, M. and Andreadis, S. 2011. Engineering fibrin-binding TGF- $\beta$ 1 for sustained signaling and contractile function of MSC based vascular constructs. *Biomaterials* 32: 8684-8693.
- Liu, H., Collins, S. and Suggs, L. 2006. Three-dimensional culture for expansion and differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials* 27: 6004-6014.
- Llames, S., Del Rio, M., Larcher, F., García, E., García, M., Escamez, M., Jorcano, J., Holguín, P. and Meana, A. 2004. Human plasma as termal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* 77 (3): 350-355.
- Marx, G. 2003. Evolution of fibrin glue applications. *Transfusion Medicine Review* 17(4), 287-298.
- Mazlyzam, A., Aminuddin, D., Fuzina, N., Norhayati, M., Fauziah, O., Isa, M., Saim, L. and Ruszymah. 2007. Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold. *Burns* 33: 355-363.
- Mazlyzam, A., Aminuddin, B., Saim, L. and Ruszymah, B. 2008. Human serum is an advantageous supplement for human dermal fibroblast expansion: clinical implications for tissue engineering of skin. *Archives of Medical Research*: 39: 743-752.
- Meana, A., Iglesias, J., Del Río, M., Larcher, F., Madrigal, B. and Fresno, M. 1998. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matriz based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns* 24 (7): 621-630.
- Mogford, J., Tawil, B., Jia, S. and Mustoe, T. 2009. Fibrin sealant combined with fibroblasts and platelet-derived growth factor enhance wound healing in excisional wounds. *Wound Repair Regeneration* 17: 405-410.
- Mol, A., Lieshout, M., Dam-de Veen, C., Neuenschwander, S., Hoerstrup, S., Baaijens, F. and Bouten, C. 2005. *Biomaterials* 26: 3113-3121.
- Moure, F., Rendueles, M. and Diaz, M. 2003. Coupling process for plasma protein fractionation using ethanol precipitation

- and ion exchange chromatography. *Meat Science* 64: 391-398.
- Pachence, J., Bohrer, M. and Kohn, J. 2007. En: *Principles of Tissue Engineering*. 3 ed (Lanza, Langer y Vacanti). Elsevier: Amsterdam.
- Perka, C., Arnold, U., Spitzer, R. and Lindenhayn, K. 2001. The use of fibrin beads for Tissue Engineering an Subsequential Transplantation. *Tissue Engineering* 7: 359-361.
- Ranby, M. 1982. Studies on the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator. *Biochimica et Biophysica Acta* 704: 461-469.
- Robbins, K., Summari, L., Hsieh, B. and Shah R. 1967. The peptide chains of human plasmin: mechanism of activation of human plasminogen to plasmin. *The Journal of Biological Chemistry* 242: 23-33.
- Rawn, D. 1989. *Bioquímica Tomo I*. Madrid: McGraw-Hill, 532 p.
- Rowe, S., Lee, S. and Stegemann, J. 2007. Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels. *Acta Biomaterialia* 3: 59-67.
- Seal, B., Otero, T. and Panitch, A. 2001. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering R* 34: 147-230.
- Shikanov, A., Xu, M., Woodruff, T. and Shea, L. 2009. Interpenetrating fibrin-alginate matrices for in vitro ovarian follicle development. *Biomaterials* 30: 5476-5485.
- Spicer, P. and Mikos, A. 2010. Fibrin glue as a drug delivery system. *Journal of controlled release* 148: 49-55.
- Spotnitz, W. 2010. Fibrin sealant: past, present, and future: a brief review. *World Journal of Surgery* 34: 632-634.
- Standeven, K., Ariens, R. and Grant, P. 2005. The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function. *Blood Reviews* 19: 275-288.
- Tanaka, T. 1981. Gels. *Sci. Am.* 244 (1): 124-138.
- Vavken, P., Joshi, S. and Murray, M. 2011. Fibrin concentration affects ACL fibroblast proliferation and collagen synthesis. *The Knee* 18: 42-46.
- Warren, S., Fong, K., Nacamuli, R., Song, H., Fang, T. and Longaker, M. 2004. Biomateriaux de reparation de la peau et de l'os en chirurgie plastique. *EMC-Chirurgie* 1: 583-591.
- Xu, M., Wang, X., Yan, Y., Yao, R. and Ge, Y. 2010. An cell-assembly derived physiological 3D model of the metabolic syndrome, based on adipose-derived stromal cells and a gelatin/alginate/fibrinogone matrix. *Biomaterials* 31: 3668-3877.
- Ye, Q., Zund, G., Benedikt, P., Jockenhoevel, S., Hoerstrup, S., Sakayama, S., Hubbell. and Turina, M. 2000. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 17: 587-591.
- Yoon, D. and Fischer, J. 2007. Polymeric scaffolds for tissue engineering applications. En: *Tissue Engineering* (ed. Fischer, J., Mikos, P. and Antonios G). Taylor and Francis: New York.
- Zhao, H., Ma, L., Gao, C., Wang, J. and Shen, J. 2009a. Frabrication and properties of injectable b-tricalcium phosphate particles/fibrin gel composite scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C. Biomimetic and supramolecular systems* 29: 836-842.
- Zhao, H., Ma, L., Gong, Y., Gao, C. and Shen, J. 2009b. A polylactide/fibrin gel composite scaffold for cartilage tissue engineering: fabrication and an in vitro evaluation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20: 135-143.
- Zhao, H., Ma, L., Zhou, J., Mao, Z., Gao, C. and Shen, J. 2008. Fabrication and physical and biological properties of fibrin gel derived from human plasma. *Biomedical Materials* 3: 015001. 9 p.