



Casa abierta al tiempo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD CUAJIMALPA
POSGRADO EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

ESTANDARIZACIÓN DE CULTIVOS DE CARDIOMIOCITOS NEONATALES EN UN
BIORREACTOR ELÉCTRICO PARA EL DESARROLLO DE TEJIDO CARDIACO

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

PRESENTA:

ING. EMMANUEL FRANCISCO SOLANO

DIRECTORA:

DRA. NOHRA ESY BELTRÁN VARGAS

CODIRECTOR:

DR. ALVARO RAÚL LARA RODRÍGUEZ

ASESOR:

MARIO GARCIA LORENZANA

Agosto 2022. Cuajimalpa de Morelos, C.P. 05348, CDMX, México



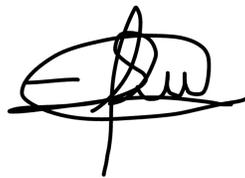
Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Maestría del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental fue realizado de abril del 2021 a junio del 2021 en el Laboratorio de Superficies de la DCNI y en el Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 22 de agosto del 2022, el que suscribe Emmanuel Francisco Solano alumno del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor intelectual de la presente idónea comunicación de resultados intitulada; “Estandarización de cultivos de cardiomiocitos neonatales en un biorreactor eléctrico para el desarrollo de tejido muscular cardíaco” realizada bajo la dirección de la Dra. Nohra E. Beltrán Vargas y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso de la directora del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: nbeltran@cua.uam.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Ing. Emmanuel Francisco Solano

Nombre y firma del alumno

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El que suscribe, Emmanuel Francisco Solano, alumno del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”

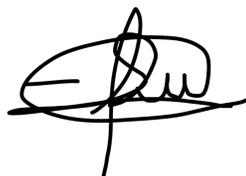


Ing. Emmanuel Francisco Solano

Nombre y firma del alumno

DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

El que suscribe, Emmanuel Francisco Solano, alumno del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Emmanuel Francisco Solano.



Ing. Emmanuel Francisco Solano

Nombre y firma del alumno

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mis padres y con un especial cariño a mis hermanos, quienes en todo momento y bajo cualquier circunstancia me han brindado su cariño, apoyo y respaldo. “No es una carga, es mi hermano”.

Agradecimientos

Quiero agradecer...

A la Universidad Autónoma Metropolitana, particularmente a la Unidad Cuajimalpa y al Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería.

A mis padres y hermanos por apoyarme en todo, incluida la realización de este trabajo.

A la Dra. Nohra Beltrán que me acogió desde la licenciatura en su grupo de investigación, me guía y muestra con su ejemplo a ser profesional, ético, recto y con principios.

Al Dr. Mario García y al Dr. Álvaro Lara por sus comentarios y sugerencias sumamente constructivas y enriquecedoras a este trabajo.

Al CONACyT por la beca 003760 que me otorgó del 1° de enero del 2020 al 31 de diciembre del 2021.

Al Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental del HIMFG y a su personal científico, técnico y administrativo por su apoyo durante la realización del trabajo experimental.

Al bioterio del HIMFG y al Biólogo Experimental Daniel Hernández por las facilidades y apoyo técnico brindados para la realización del trabajo experimental.

Al Dr. Valaur Ekbalam Márquez Baños y la Dra. Marcela Salazar García por sus enriquecedores comentarios y sugerencias a esta ICR.

Y finalmente, pero no por ello menos importante, a todos los que trabajamos, formamos parte y aportamos a este grupo de trabajo. Especialmente al Dr. Eduardo Peña, Mta. Nancy Viveros e Ing. Daniela Cruz quienes me apoyaron en la realización del trabajo técnico y experimental.

TABLA DE CONTENIDO

1	Introducción.....	9
2	Antecedentes	11
2.1	Importancia de las enfermedades cardiovasculares	11
2.2	Tratamientos para el infarto agudo al miocardio	13
2.2.1	Fármacos.....	13
2.2.2	Trasplante de corazón	14
2.2.3	Terapia celular	14
2.3	Sistema cardiovascular	15
2.3.1	El corazón	16
2.3.2	Tejido muscular cardíaco	17
2.3.3	Actividad contráctil de las células musculares cardíacas	20
2.4	Ingeniería de Tejido Cardíaco	21
2.4.1	Fuente celular	22
2.4.2	Biomateriales y andamios	23
2.4.3	Biorreactores para el cultivo de células cardíacas.....	25
2.4.4	Biorreactor de perfusión	25
2.4.5	Biorreactor eléctrico.....	28
2.4.6	Uso de nanopartículas en la Ingeniería de Tejido Cardíaco	30
2.5	Antecedentes del proyecto	32
2.5.1	Biorreactor electromecánico-UAM Cuajimalpa.	32
3	Justificación.....	35
4	Pregunta de investigación	36
5	Hipótesis.....	36
6	Objetivos	36
6.1	Objetivos generales.....	36
6.2	Objetivos específicos	36
7	Materiales y métodos.....	37
7.1	Prueba de esterilidad del biorreactor	38
7.2	Generación de Np Au y Np Au+Alg.....	38
7.3	Generación de andamios de alginato-quitosano (0.75-1.25 % p/v)	39
7.4	Condiciones de operación del biorreactor	39
7.4.1	Cálculo de la cantidad de células a sembrar.....	39

7.4.2	Cálculo del flujo de operación del biorreactor	40
7.4.3	Transferencia de masa por convección.....	41
7.4.4	Estrés hidrodinámico generado por el flujo de operación	41
7.4.5	Transferencia de masa interna	42
7.5	Cultivo de cardiomiocitos de rata neonatal	42
7.6	Análisis histológico	43
7.6.1	Tinción Hematoxilina - Eosina.....	44
7.6.2	Inmunohistoquímica.....	44
7.6.3	Morfometría celular y expresión de marcadores cardíacos.	45
8	Resultados	45
8.1	Prueba de esterilidad del biorreactor	45
8.2	Generación de Np Au y Np Au+Alg.....	46
8.3	Generación de andamios de alginato-quitosano (0.75-1.25 %p/v)	47
8.4	Condiciones de operación del biorreactor	47
8.4.1	Cálculo de la cantidad de células a sembrar.....	48
8.4.2	Cálculo del flujo de operación del biorreactor	48
8.4.3	Transferencia de masa por convección.....	50
8.4.4	Estrés hidrodinámico generado por el flujo de operación	54
8.4.5	Transferencia de masa interna	56
8.5	Cultivo de cardiomiocitos de rata neonatal	57
8.6	Análisis histológico	59
8.6.1	Análisis inmunohistoquímico	66
9	Discusión.....	70
10	Conclusiones.....	75
11	Perspectivas.....	75
12	Bibliografía	76

1 INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, con un 16% del total de las muertes a nivel mundial, la principal causa de muerte es la cardiopatía isquémica [1]. La cardiopatía isquémica es una afección del corazón que se origina por la disminución o interrupción del flujo sanguíneo en las arterias coronarias. En la mayoría de los casos la disminución de la irrigación sanguínea es causada por la reducción de la luz y endurecimiento de las arterias coronarias que a su vez se origina por la acumulación de lípidos en el lumen del vaso sanguíneo, por ejemplo, lipoproteínas de baja densidad (LDL), fenómeno conocido como aterosclerosis. La disminución del flujo sanguíneo provoca un desbalance entre las necesidades y el suministro de oxígeno y nutrientes en el músculo cardíaco y genera un ambiente hipóxico que provoca muerte celular por isquemia [2]. En el ámbito clínico este fenómeno se conoce como infarto agudo al miocardio (IAM). Un IAM provoca la muerte de ~1000 millones de células cardíacas [3] y causa un daño permanente en el corazón porque no posee la capacidad de regeneración. La tasa de proliferación celular de un corazón adulto es extremadamente baja, se ha reportado que el recambio anual de cardiomiocitos en el corazón humano es aproximadamente del 1 % en personas de 25 años y de 0.45 % en personas de 75 años [4], [5].

Los tratamientos comunes para el IAM son el trasplante de corazón y los medicamentos; sin embargo, no logran resolver el problema eficazmente [6]. Por otra parte, están siendo desarrollados tratamientos alternativos para el IAM. Uno de ellos es la terapia celular que utiliza células troncales diferenciadas a cardiomiocitos y se aplican al tejido cardíaco lesionado para regenerarlo. Sin embargo, la baja supervivencia de los cardiomiocitos y el bajo porcentaje de diferenciación celular son dos de las principales limitantes que la descartan como un tratamiento seguro [7], [8]. En los últimos años ha surgido la propuesta de generar tejido muscular cardíaco *in vitro* como tratamiento para el IAM [9]. La Ingeniería de Tejido Cardíaco (ITC) desarrolla tejido muscular cardíaco *in vitro* a partir de tres elementos. En primer lugar, una fuente celular para tomar las células a partir de las cuales se va desarrollar el tejido *in vitro*. Idealmente las células deben ser del propio paciente para minimizar o eliminar el rechazo inmunológico del injerto. Sin embargo, es posible utilizar células de otro individuo u otra especie principalmente en ensayos preclínicos y experimentos como la validación y caracterización de biomateriales y biorreactores. Las células utilizadas con mayor frecuencia en ensayos preclínicos son cardiomiocitos de rata neonatal (CMRN) y células troncales [10].

En segundo lugar, se requiere de un soporte celular denominado andamio. El andamio imita la función de la matriz extracelular (MEC) del tejido muscular cardíaco nativo al proporcionar un sitio de anclaje para las células que es fundamental para la supervivencia y proliferación celular [11]. Los andamios suelen tener morfología

3D para reproducir el ambiente fisiológico del tejido muscular cardíaco nativo y promover una organización celular que ayude a la maduración estructural del tejido *in vitro*. Sin embargo, en andamios con estructura 3D suelen haber problemas de transferencia de masa interna lo que limita la supervivencia celular a las regiones superficiales del andamio [12]. Por tal razón, se han propuesto diferentes sistemas de cultivo donde se implementa la perfusión del medio como estrategia para aumentar la transferencia de masa en el constructo (andamio+células) y aumentar la densidad y viabilidad celular [13], [14].

Debido a que algunos materiales con los que se fabrican ciertos andamios, son poco conductivos o carecen de esta propiedad, a los andamios se les añaden nanopartículas de materiales altamente conductivos, por ejemplo, oro, plata, carbono, entre otros; para dotarlos de conductividad de tal manera que el andamio promueva en mayor grado la adhesión y proliferación celular a la vez que permita y facilite la propagación de los pulsos eléctricos que suelen aplicarse al constructo durante el cultivo celular para promover y acelerar la maduración del tejido muscular cardíaco *in vitro* [15].

El tercer elemento clave para generar tejido muscular cardíaco *in vitro* es un biorreactor o dispositivo de cultivo. El biorreactor ayuda a establecer las condiciones óptimas de cultivo para las células cardíacas generando un ambiente similar a las condiciones fisiológicas del tejido muscular cardíaco. Para ello se aplica perfusión, estimulación eléctrica y estimulación mecánica de manera individual o en conjunto. De este modo, existen biorreactores de perfusión, eléctricos (estimulación eléctrica), mecánicos (estimulación mecánica: por estiramiento o por compresión) y electromecánicos [16], [17]. La perfusión del medio aumenta la transferencia de masa hacia el constructo y aumenta la viabilidad y densidad celular [12]; la estimulación eléctrica ayuda a establecer comunicaciones del tipo célula-célula entre los cardiomiocitos y promueve la actividad electrofisiológica de las células que genera contracciones uniformes similares a las del tejido muscular cardíaco nativo [18]; y la estimulación mecánica ayuda a generar y mantener contracciones uniformes además de promover una morfología alargada en las células similar a las células del tejido muscular cardíaco nativo [19]. Los biorreactores electromecánicos aplican simultáneamente estímulos eléctricos y mecánicos y en ocasiones operan con perfusión por lo que se consideran la clase de biorreactor más completo para desarrollar tejido muscular cardíaco *in vitro*. El tejido muscular cardíaco completamente desarrollado o maduro generado *in vitro* se caracteriza por la expresión de marcadores cardíacos: troponinas (TnT, TnI), conexina 43 (Cnx43), tropomiosina (TPM), cadenas ligeras de miosina (CLM), entre otros; células organizadas en sincitios con sarcómeros definidos y actividad contráctil regulada por pulsos eléctricos [20].

En el grupo de investigación en Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa de la UAM Cuajimalpa estamos trabajando en la generación de tejido muscular cardíaco *in vitro* para su posible aplicación terapéutica. La meta a largo plazo es generar un parche cardíaco a partir de células troncales autólogas cultivadas en andamios de alginato/quitosano funcionalizados con nanopartículas de oro y alginato (Np Au y Np Au+Alg) para implantarlo en un corazón con IAM y ayudar a recuperar la función normal del corazón. Los avances del proyecto al día de hoy incluyen una metodología para elaborar andamios de alginato/quitosano [21], la construcción y validación de un biorreactor electromecánico [22] y el cultivo de CMRN con perfusión y estimulación eléctrica (1.5 mL/min y 1.5 V, 1 Hz, 0.3 ms) [23]. Este primer cultivo de CMRN fue el inicio de una serie de experimentos que tienen como objetivo definir los parámetros de perfusión, estimulación mecánica y estimulación eléctrica para el cultivo y diferenciación de células troncales a cardiomiocitos para generar tejido muscular cardíaco *in vitro* para usos clínicos. Por esta razón el objetivo de este trabajo es estandarizar el cultivo de CMRN con perfusión y estimulación eléctrica. Una vez que se definan los parámetros de cultivo de CMRN con perfusión y estimulación eléctrica estos parámetros serán utilizados en otros trabajos para cultivar células troncales para diferenciarlas a cardiomiocitos donde se espera que promuevan el desarrollo de tejido muscular cardíaco *in vitro* del mismo modo que lo hacen con células cardíacas (CMRN). Otros trabajos del grupo se han enfocado en la fabricación y caracterización de andamios, fabricación y caracterización de nanopartículas y cultivos celulares de cardiomiocitos embrionarios [24], [25], [26].

2 ANTECEDENTES

2.1 IMPORTANCIA DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un grupo de afecciones del corazón y los vasos sanguíneos. Las ECV se clasifican en cardiopatía isquémica y accidente cerebrovascular (ACV). A su vez la cardiopatía isquémica se clasifica en IAM y angina de pecho, siendo el IAM el trastorno isquémico de mayor incidencia en la población mundial y una de las principales causas de muerte [27]. Las estadísticas de los últimos 10 años catalogan a las ECV como la principal causa de muerte en y como una de las principales causas de morbilidad. En el 2013 se registraron más de 23 millones de muertes en el mundo por ECV [28]. En el 2016 más de 360 millones de personas sufrieron algún tipo de ECV, representando el 15% de las enfermedades a nivel mundial y la primera causa de morbilidad [29]. En el 2017 más de 17 millones de personas murieron en el mundo por alguna ECV, cifra equivalente a la población de países como Ecuador o Países Bajos [30]. En el 2019 las ECV continuaron ocupando el primer lugar como causa de muerte a nivel mundial con un

27% del total de las muertes, equivalente a 15 millones de defunciones. En términos de cardiopatía isquémica y accidente cerebrovascular, en el 2019, cada una fue responsable del 16% (cardiopatía isquemia) y del 11% (ACV) del total de las muertes (Figura 1) [1]. Los índices más altos de mortalidad por ECV se registran en los países industrializados. Por ejemplo, en Estados Unidos las ECV son responsables del 50% de las defunciones anuales [29].

El riesgo de muerte por ECV es muy alto. El 50% de los pacientes diagnosticados con insuficiencia cardíaca muere en los siguientes 5 años y el 90% después de 10 años. El riesgo de muerte aumenta en personas de edad avanzada; aproximadamente el 37% muere un año después de ser diagnosticados [31]. Además, las personas diagnosticadas con ECV se ven obligadas a seguir un estilo de vida restrictivo que implica hábitos y cuidados especiales que resultan en una baja calidad de vida y en otros casos las personas no pueden reincorporarse al campo laboral productivo [32].

En México el escenario no es distinto al que prevalece a nivel mundial, las ECV ocupan la principal causa de muerte a nivel nacional. Las tres primeras causas de muerte en México son 1) ECV, 2) Diabetes mellitus y 3) Tumores malignos [33].

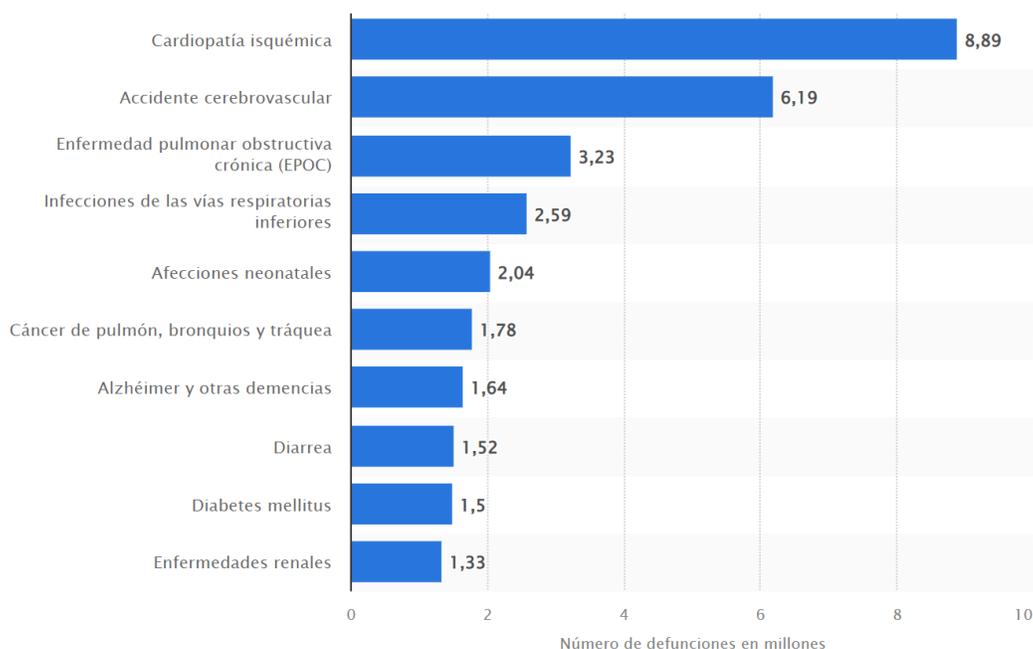


Figura 1. Principales causas de muerte en el mundo, 2019. Fuente: WHO Statista [1].

Las enfermedades cardíacas se clasifican en las que afectan la actividad mecánica del corazón y las que afectan su actividad eléctrica [34]. Las enfermedades que alteran la actividad mecánica del corazón se relacionan con fallas en el ciclo cardíaco (sístole/diástole). El ciclo cardíaco consta de 5 etapas durante las cuales las aurículas y los ventrículos se llenan de sangre y después la expulsan, éstas son:

llenado ventricular activo (sístole auricular), contracción ventricular isovolumétrica, eyección, relajación ventricular isovolumétrica y llenado auricular pasivo. La mayoría de las alteraciones del ciclo cardíaco se originan por una disminución en la capacidad contráctil del corazón que es causada por la muerte de millones de células cardíacas por falta de irrigación sanguínea, padecimiento conocido como infarto agudo al miocardio (IAM) [35]. El IAM se define como “la necrosis o muerte de una porción del músculo cardíaco que se produce cuando se obstruye completamente el flujo sanguíneo en una de las arterias coronarias”. El IAM es considerado una urgencia médica donde la ventana de tiempo para recibir atención médica para evitar daños permanentes o la muerte del paciente es de apenas de 20 minutos, tiempo en el que debe reestablecerse el flujo sanguíneo de la arteria bloqueada [35].

Las enfermedades del corazón que alteran su actividad eléctrica son las arritmias. Las arritmias se clasifican en taquicardias (frecuencia cardíaca elevada > 100 latidos/min) y bradicardias (frecuencia cardíaca baja < 60 latidos/min). El riesgo de muerte por arritmia es más bajo que el riesgo de muerte por IAM y generalmente el tratamiento consiste en fármacos o en dispositivos que ayudan a regular la actividad eléctrica del corazón [34].

Los factores de riesgo más importantes de las enfermedades cardíacas son: hipertensión arterial, hipercolesterolemia, diabetes, obesidad y sobrepeso, tabaquismo, inactividad física, edad, entre otros (género, herencia, hábitos alimenticios).

2.2 TRATAMIENTOS PARA EL INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO

La importancia médica, económica y social que genera el IAM a nivel mundial ha impulsado la investigación y el desarrollo de nuevos tratamientos para reducir la tasa de mortalidad por IAM. Sin embargo, actualmente los mejores tratamientos para el IAM son los farmacológicos, la intervención quirúrgica (trasplante de corazón, angioplastia) y en menor grado la terapia celular, no obstante, no resuelven completamente el problema.

2.2.1 Fármacos

Cuando una persona sufre un IAM el médico recurre en una serie de recursos clínicos y farmacológicos para estabilizar y mantener con vida al paciente. Los fármacos representan una solución temporal y rápida para contrarrestar los efectos del IAM y a largo plazo ayudan a prevenir un segundo IAM. Existen cuatro fármacos que se utilizan con frecuencia para tratar el IAM [36].

1. Medicamentos para controlar la presión arterial y dilatar las arterias. Este grupo comprende medicamentos inhibidores de la enzima convertidora de

angiotensina (IECA) y ayudan a reestablecer el flujo sanguíneo para disminuir el riesgo de sufrir un segundo IAM.

2. Fármacos para prevenir la formación de trombos o coágulos, conocidos como antiagregantes plaquetarios y anticoagulantes.
3. Fármacos que relajan la musculatura cardíaca y reducen la presión arterial. Estos medicamentos pertenecen al grupo de los betabloqueadores.
4. Fármacos para reducir los niveles de colesterol y triglicéridos de la sangre. Estos fármacos pertenecen al grupo de las estatinas.

2.2.2 Trasplante de corazón

Actualmente, las intervenciones quirúrgicas del corazón son procedimientos de riesgo medio gracias a los avances tecnológicos y médicos. A pesar de ello, el trasplante de corazón implica ciertos riesgos de muerte. La probabilidad de muerte en personas adultas que reciben un trasplante de corazón es alrededor del 50% con una vida media de 13 años para aquellos que logran sobrevivir los primeros 6 meses. No obstante, el trasplante de corazón sigue siendo la mejor opción para pacientes con insuficiencia cardíaca terminal que no es mejorable con tratamientos médicos y/o quirúrgicos convencionales. Sin embargo, la escasez de donantes sigue siendo el mayor problema [37].

2.2.3 Terapia celular

La necrosis del tejido muscular cardíaco adyacente a la obstrucción de la arteria coronaria es la mayor consecuencia del IAM, de la cual se derivan otras complicaciones. El tejido muscular cardíaco adyacente al punto de obstrucción es reemplazado por una cicatriz compuesta de fibroblastos y miofibroblastos que carece de actividad contráctil y conductividad eléctrica. La terapia celular emplea diferentes tipos de células mezcladas con biomateriales y las aplica al área del IAM para regenerar el tejido dañado. Algunos tipos de células utilizadas son las células troncales de origen autólogo las cuales reducen o eliminan el rechazo inmunológico que puede provocar la terapia [38]. No obstante, dos aspectos que hacen de la terapia celular una opción poco viable como tratamiento para el IAM son el bajo porcentaje de supervivencia celular y el bajo porcentaje de diferenciación celular a CMs (1-12%). A pesar de que la diferenciación de células troncales a cardiomiocitos *in vitro* alcanza porcentajes de diferenciación cercanos al 90% [39].

También se ha estudiado la reprogramación de los miofibroblastos del tejido cicatrizal a CMs mediante factores de transcripción como Hand2, Nkx2.5, Gata4, Mef2c y Tbx5; sin embargo, la tasa de reprogramación celular es baja lo cual limita la efectividad de la terapia [40].

2.3 SISTEMA CARDIOVASCULAR

El sistema cardiovascular (SC) está constituido por el corazón, vasos sanguíneos (arterias, venas, capilares), vasos linfáticos y la sangre. La principal función del SC es transportar por medio de la sangre diferentes sustancias (nutrientes, oxígeno y hormonas) a los órganos y tejidos del cuerpo. La sangre es transportada de dos maneras en el cuerpo humano: circulación sistémica y circulación pulmonar. La circulación sistémica transporta sangre rica en oxígeno a los diferentes órganos y tejidos del cuerpo y la circulación pulmonar transporta sangre saturada de CO_2 entre el corazón y los pulmones donde elimina el CO_2 y se satura de O_2 . En la Figura 2 la circulación sistémica está representada en color rojo y la circulación pulmonar en azul [41].

En la circulación pulmonar la sangre saturada de CO_2 proveniente de los órganos y tejidos llega al corazón a través de la vena cava inferior y la vena cava superior, entra a la aurícula derecha y después pasa al ventrículo derecho que la eyecta a los pulmones donde se elimina el CO_2 y se satura de O_2 . Enseguida regresa al corazón a través de las venas pulmonares y entra a la aurícula izquierda [41].

En la circulación sistémica la sangre rica en O_2 es eyectada por el ventrículo izquierdo, sale por la aorta y llega a los órganos y tejidos a través de las arterias y la red de capilares del organismo. La circulación sistémica y pulmonar mueven y oxigenan diariamente alrededor de 8 litros de sangre en una persona adulta. Este proceso ocurre de manera cíclica por lo que el corazón bombea diariamente alrededor de 7200 litros de sangre y consume ~20 g de carbohidratos, ~30 g de ácidos grasos y ~35 L de oxígeno en una persona adulta con buen estado de salud [42].

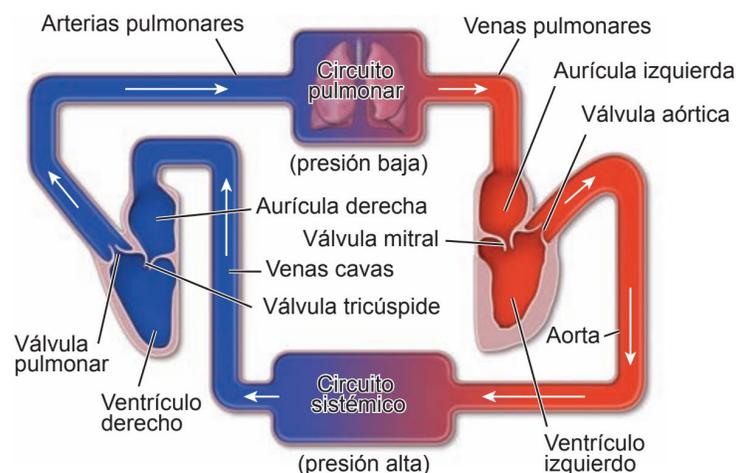


Figura 2. Circulación sistémica y pulmonar del sistema cardiovascular. Fuente: Ross, M. & Pawlina (2016) [41].

2.3.1 El corazón

El corazón es el órgano más importante del SC. Es un órgano hueco, compuesto por cuatro cámaras: aurículas y ventrículos derecho e izquierdo (Figura 3). En una persona adulta tiene un peso aproximado de 300 gramos y un tamaño similar al de su puño. El corazón está constituido por tejido muscular cardíaco, a su vez compuesto por endocardio, miocardio y pericardio (Figura 3-B). El endocardio es la pared interna de las cámaras cardíacas, tiene contacto directo con la sangre y está formado por una fina capa de células endoteliales. El miocardio o músculo cardíaco se encuentra entre el endocardio y el pericardio y constituye la parte más gruesa del tejido muscular cardíaco. Está constituido por células contráctiles llamadas cardiomiocitos y se caracteriza por tener un espesor mayor en el ventrículo izquierdo. El pericardio es una membrana fibroserosa compuesta principalmente por fibroblastos y sirve como “envoltura” para separar al corazón de otras estructuras [43]. El corazón se caracteriza por poseer actividad electrofisiológica autónoma que es independiente del sistema nervioso central.

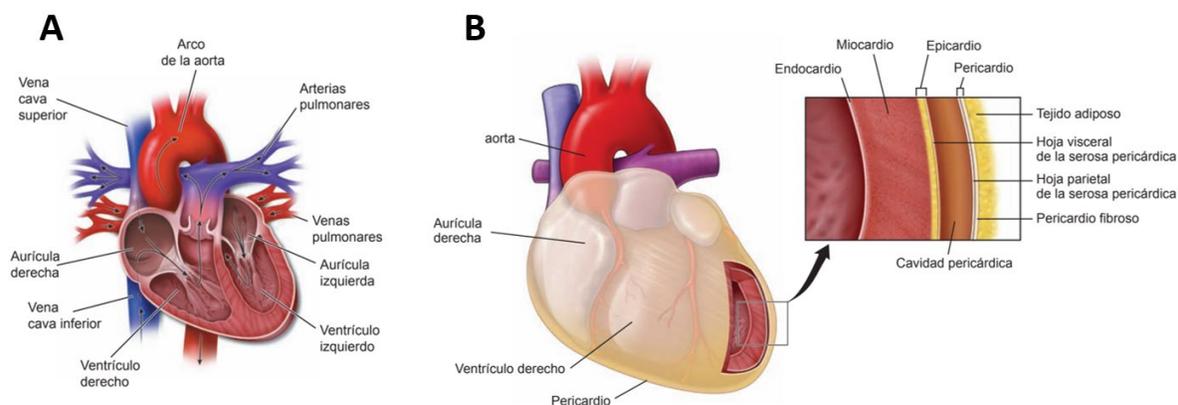


Figura 3. Anatomía del corazón. Modificado de Ross, M. & Pawlina (2016) [41].

Durante la contracción (sístole) la sangre es eyectada de los ventrículos y en la relajación (diástole) las aurículas se llenan con sangre proveniente del sistema venoso. El ventrículo izquierdo eyecta sangre hacia la circulación sistémica con una presión relativamente alta y el ventrículo derecho expulsa sangre al sistema pulmonar de baja presión [44].

La contracción del tejido muscular cardíaco se origina a partir de pulsos eléctricos que nacen en el nódulo sinoauricular (Figura 4). El nódulo sinoauricular (SA) es conocido como el marcapasos del corazón, en él se localizan las células marcapasos del corazón que tiene la capacidad de autoexcitarse y excitar al resto de las células del tejido muscular cardíaco. El nódulo SA se ubica cerca de la unión de la vena cava superior y la aurícula derecha y ahí se originan los pulsos eléctricos que se propagan a través de las fibras musculares cardíacas de las aurículas, llegan al nódulo auriculoventricular y se conducen a través del esqueleto fibroso hacia los

ventrículos por el haz de His. El haz de His se divide en las fibras de Purkinje que se distribuyen entre los ventrículos.

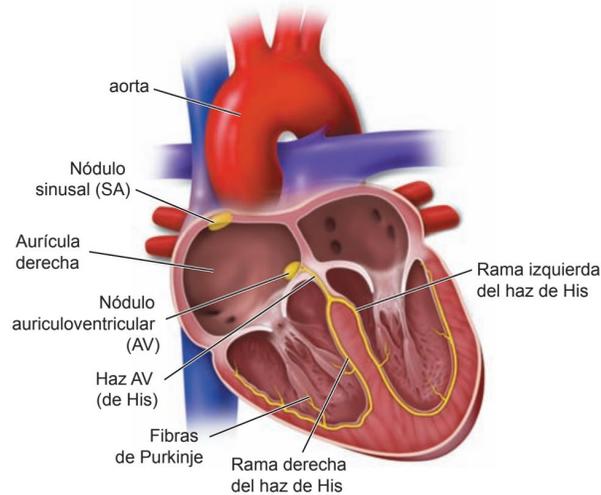


Figura 4. Sistema de conducción eléctrica del corazón. Los pulsos eléctricos se originan en el nódulo sinusal (SA), viajan por la pared auricular, llegan al nódulo auriculoventricular (AV), atraviesan el haz de His y se distribuyen por las fibras de Purkinje. Fuente: Ross, M. & Pawlina (2016) [41].

2.3.2 Tejido muscular cardíaco

El tejido muscular cardíaco está constituido en su mayoría por tres tipos de células, cardiomiocitos (CM), fibroblastos (FB) y células endoteliales (CE) y en proporciones menores macrófagos, leucocitos, pericitos y células mesenquimales. Los FB y las CE forman parte del tejido conectivo, ayudan a mantener la matriz extracelular y brindan soporte a las células cardíacas mientras que los cardiomiocitos son células contráctiles. En mamíferos la composición celular media del tejido muscular cardíaco es 30 % CM, 45 % CE, 11 % FB y 14 % otros tipos celulares (Figura 5) [45].

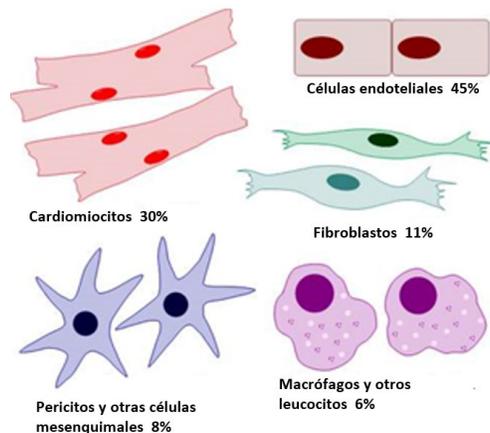


Figura 5. Esquema que representa la composición celular media del tejido muscular cardíaco en mamíferos. Modificado de Pinto, A., et al., (2016) [45].

Los cardiomiocitos constituyen la unidad estructural y funcional del tejido muscular cardíaco. Son células alargadas de 50-150 μm de largo y 10-20 μm de ancho (Figura 6). Dos células contiguas se unen a través de sitios de adhesión muy especializados denominados discos intercalados y forman una fibra muscular cardíaca (denominada célula muscular). En ocasiones las fibras son ramificadas y una misma célula se une con dos o más células vecinas. Las fibras musculares cardíacas exhiben estriaciones transversales evidentes en cortes histológicos de rutina observados con microscopía electrónica por lo que el tejido muscular cardíaco es clasificado como tejido muscular estriado [46].

El citoplasma de los CM, también denominado sarcoplasma, está repleto de subunidades estructurales dispuestas longitudinalmente denominadas miofibrillas cuya unidad funcional es el sarcómero. El sarcómero es la unidad contráctil básica del músculo estriado y está constituido mayormente por las proteínas estructurales miosina y actina que forman filamentos dispuestos de forma intercalada [47]:

- Filamentos delgados o de actina. Miden entre 6 nm y 8 nm de diámetro y 1 μm de largo. Cada filamento de actina filamentosa (actina F) es un polímero formado por moléculas de actina globular (actina G).
- Filamentos gruesos o de miosina. Miden ~ 15 nm de diámetro y 1.5 μm de largo. Cada filamento está constituido por 200 a 300 moléculas de miosina.

El sarcómero está delimitado en sus dos extremos por discos Z, también conocidos como líneas Z, compuestos por la proteína CapZ. Los filamentos de actina y miosina están anclados perpendicularmente a los discos Z de tal manera que el deslizamiento entre ellos produce la contracción y la relajación del sarcómero. En mamíferos, un sarcómero mide de 2 μm a 3 μm y puede distenderse a más de 4 μm y durante la contracción extrema puede reducirse hasta a 1 μm [47].

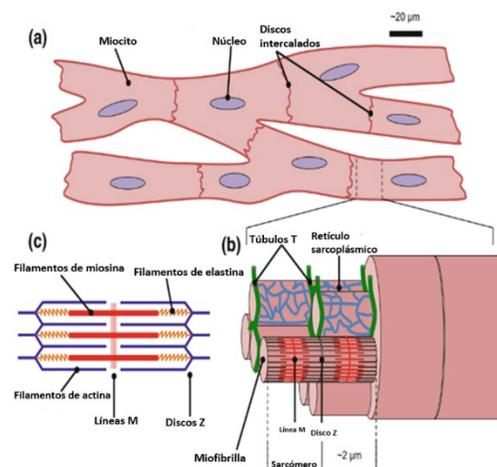


Figura 6. Representación del tejido muscular cardíaco. a) Sincitio cardíaco b) Fibra muscular cardíaca c) Sarcómero. Adaptado de Cardiovascular Biomechanics (2017) [46].

El sarcómero cuenta con 3 proteínas que regulan su actividad contráctil, la tropomiosina (TPM), tropomodulina y el complejo de troponinas; estas proteínas están unidas a los filamentos de actina. La tropomiosina se encuentra entrelazada longitudinalmente a los filamentos de actina (Figura 7). Cuando el sarcómero está en reposo (relajación), la tropomiosina y sus proteínas reguladoras, el complejo de troponinas, ocultan los sitios de unión de la miosina que está en la molécula de actina. El complejo de troponina está constituido por troponina C (TnC), troponina T (TnT) y troponina I (TnI). La TnT une a la tropomiosina con las subunidades I y T de troponina. La troponina I inhibe la interacción entre la miosina y la actina y la TnC interactúa con iones calcio (Ca^{2+}). Cuando la TnC interactúa con moléculas de Ca^{2+} los sitios de unión de la miosina que están en los filamentos de actina quedan libres y permiten la unión de los filamentos de miosina. La interacción entre los filamentos de miosina y actina se da de tal manera que se deslizan unas sobre otras y el sarcómero se contrae [47].

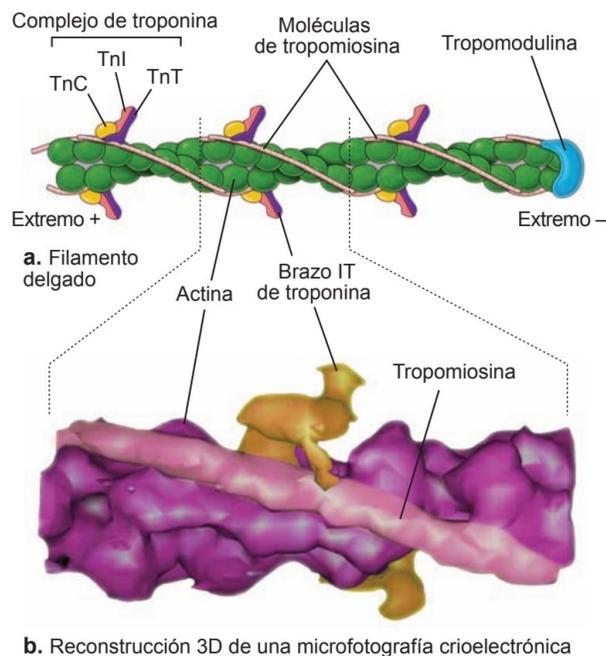


Figura 7. Proteínas reguladoras en la contracción sarcomérica. Fuente: Wojciech P. (2015) [47].

Algunas proteínas que regulan la contracción sarcomérica son utilizadas como marcadores para identificar células cardíacas en cultivos *in vitro*. Los marcadores de células cardíacas incluyen proteínas, genes y factores de transcripción. A continuación, se mencionan algunos de ellos [48]:

- Proteínas: TnT, TnI, tropomiosina, conexina 43, α -actina, miosina sarcomérica.
- Factores de transcripción: Nkx2.5, Tbx5, Isl1, GATA-4, GATA-6

- Genes. Genes que se expresan en células cardíacas maduras: MYH7, ACTC1, TNNT2, MLC2V, GATA4 y GJA1. Genes que codifican canales iónicos cardíacos: RYR2, SERCA2A, CACNA1C, SCNA5A, KCNH2 y KCNQ1 [49].

Los marcadores cardíacos de uso común en ITC son las proteínas del complejo de troponina, la tropomiosina y la conexina 43 (Cx43). Existen tres isoformas de la TnI: *TNNI1*, *TNNI2*, *TNNI3*. La 1 y la 2 se expresan en el tejido muscular liso y la 3 en el tejido muscular cardíaco. La TnT se expresa en el tejido muscular liso (TNNT1, TNNT3) y en el tejido muscular cardíaco (TNNT2) pero no en el tejido muscular esquelético. La TnC no es un marcador cardíaco útil ya que no es específico del músculo cardíaco [50]. Las conexas son una familia de al menos 15 proteínas que forman canales de membrana y permiten el flujo de iones hacia y desde el interior de la célula. En el corazón, los canales que forman las conexas son indispensables para la propagación de los pulsos eléctricos que dan lugar a la contracción muscular [51]. La Cx43 es la más abundante y la más importante en la formación de uniones *gap*, abundantes en el tejido muscular cardíaco [48].

2.3.3 Actividad contráctil de las células musculares cardíacas

Las células cardíacas tienen tres propiedades electrofisiológicas mediadas por iones de sodio (Na^+), calcio (Ca^{2+}) y potasio (K^+): automatismo, excitabilidad y conductividad. El automatismo es la capacidad de empezar y mantener contracciones rítmicas sin la ayuda del sistema nervioso, esta capacidad es propia de las células marcapasos, sin embargo, el resto de las células cardíacas también la tienen, pero en menor grado. La excitabilidad es la capacidad de responder a un estímulo eléctrico mediante despolarización y repolarización a la vez que transmiten el impulso eléctrico a células vecinas (conductividad). La velocidad de transferencia de los impulsos eléctricos varía según la región del tejido muscular cardíaco: 200 mm/s en el nodo AV, 400 mm/s en los ventrículos, 1000 mm/s en las aurículas y 4000 mm/s en las fibras de Purkinje [52]. La velocidad de conducción promedio en el corazón de una rata de 10 días de edad es ~270 mm/s [53].

En estado de reposo la membrana celular de los cardiomiocitos tiene carga negativa (-90 mV). Bajo estas condiciones la concentración de Na^+ y Ca^{2+} es mayor afuera de la célula y la concentración de K^+ lo es en el citoplasma. Cuando la célula es sometida a corrientes eléctricas la carga de la membrana celular cambia a -65 mV y sus canales de iones dependientes de voltaje se abren permitiendo la entrada de Ca^{2+} y N^+ , entonces la carga de la membrana celular cambia a +70 mV. Cuando la corriente eléctrica se detiene los canales iónicos dependientes de voltaje se cierran y la carga eléctrica de la membrana celular regresa a su estado basal de -90 mV. La entrada de Ca^{2+} al citoplasma desencadena la liberación de grandes cantidades de Ca^{2+} almacenados en el retículo sarcoplásmico lo cual eleva la concentración de

Ca^{2+} de 0.0001 mM a 0.001 mM. El exceso de Ca^{2+} permite que iones de Ca^{2+} interactúen con moléculas de TnC y provoca un cambio conformacional en la tropomiosina que libera los sitios de unión entre la actina y la miosina y permite el deslizamiento de los filamentos de miosina sobre los filamentos de actina dando lugar a la contracción del sarcómero (Figura 8). Cuando la concentración intracelular de Ca^{2+} regresa a su nivel normal los filamentos de actina y miosina ya no pueden interactuar y el sarcómero se relaja. Los cardiomiocitos ventriculares se contraen con una fuerza aproximada de 1400 nN [54].

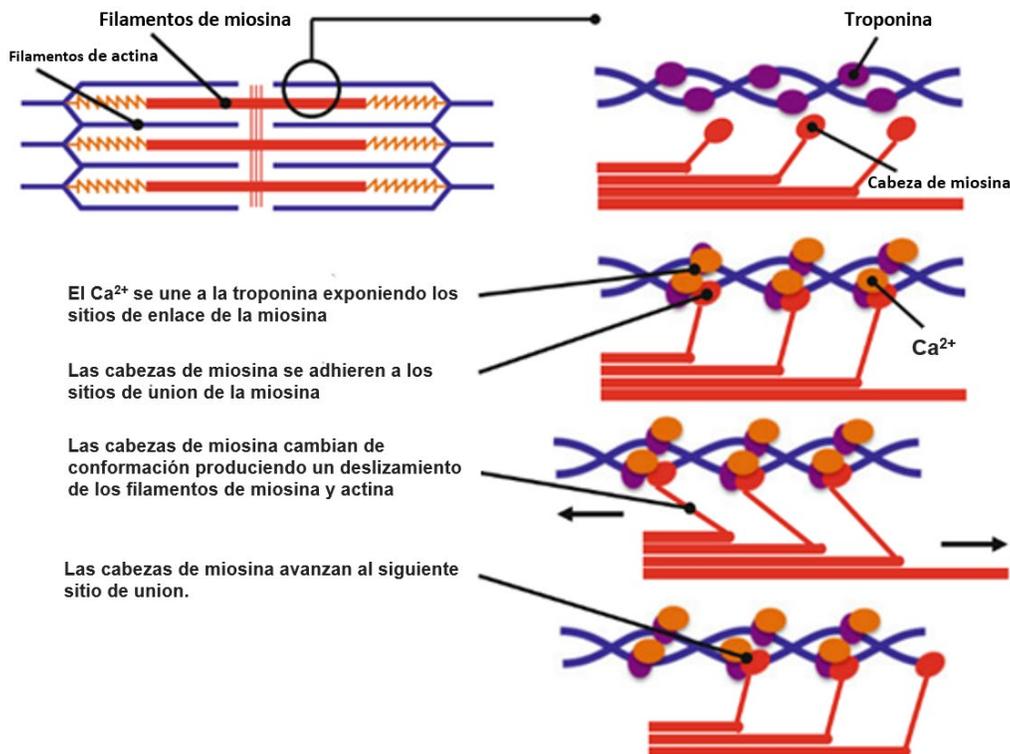


Figura 8. Representación del mecanismo de contracción sarcomérica mediada por Ca^{2+} . Modificado de Cardiovascular Biomechanics (2017) [46].

2.4 INGENIERÍA DE TEJIDO CARDÍACO

La Ingeniería de Tejido Cardíaco (ITC) es un área específica de la ingeniería de tejidos. La ingeniería de tejidos aplica principios ingenieriles y conocimientos de biología, medicina, bioquímica, biología molecular, entre otras, con el objeto de generar tejidos *in vitro* para reconstruir, reemplazar o restaurar tejidos u órganos dañados, entre otras aplicaciones [55]. La ITC se enfoca en el desarrollo de tejido muscular cardíaco *in vitro* para su posible uso como terapia para el IAM [56]. Para lo cual hace uso de los siguientes elementos: 1) Células, 2) Andamios y 3) Biorreactores.

2.4.1 Fuente celular

El tejido muscular cardíaco *in vitro* se desarrolla a partir de una cantidad inicial de células. Pueden utilizarse células somáticas (CM, FB, CE) y células troncales. Los cardiomiocitos de rata neonatal (CMRN) son el tipo de células somáticas más utilizadas debido a que conservan cierta capacidad para proliferar y cuentan con el linaje cardíaco. Sin embargo, la generación de tejido muscular cardíaco *in vitro* con aplicaciones terapéuticas precisa de una fuente celular autóloga, por ejemplo, cardiomiocitos diferenciados de células troncales. Las células troncales con aplicaciones en ITC deben poder aislarse fácilmente, por ejemplo, células troncales de tejido adiposo [57]. No obstante, hoy en día pueden reprogramarse células somáticas a células troncales y después diferenciarlas al linaje cardíaco [58]. Algunos factores de transcripción que ayudan a reprogramar células somáticas de ratón y de humano a células troncales, denominadas células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) por sus siglas en inglés, son: Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28 y Nanog [59].

Una fuente celular ideal debería 1) poderse expandir *in vitro* a gran escala; 2) integrarse al tejido dañado, y 3) diferenciarse a nuevos CMs acoplados electromecánicamente con el tejido huésped [60]. En la Tabla 1 se presenta un resumen de los tipos de células utilizadas en la ITC [60].

Tabla 1. Tipos de células con aplicaciones en la ITC. Adaptado de [60]

Tipo de célula	Ventajas	Inconvenientes
Cardiomiocitos fetales y neonatales	<ul style="list-style-type: none"> Fenotipo de cardiomiocito Capacidad proliferativa 	<ul style="list-style-type: none"> Baja disponibilidad Baja supervivencia Respuesta inmune del huésped Problemas éticos
Células derivadas de médula ósea <ul style="list-style-type: none"> Células troncales mesenquimales Células progenitoras endoteliales Células troncales hematopoyéticas 	<ul style="list-style-type: none"> Autólogas Fáciles de aislar Multipotentes Baja respuesta inmunológica 	<ul style="list-style-type: none"> Disponibilidad limitada Diferenciación incorrecta o incompleta.
Mioblastos esqueléticos	<ul style="list-style-type: none"> Fáciles de aislar Alta tasa de proliferación Resistentes a la hipoxia Autólogos 	<ul style="list-style-type: none"> Altamente propensos a generar arritmias
Células troncales derivadas de tejido adiposo	<ul style="list-style-type: none"> Fáciles de aislar Elevada disponibilidad Multipotentes Baja respuesta inmunológica 	<ul style="list-style-type: none"> Baja supervivencia
Células troncales cardíacas	<ul style="list-style-type: none"> Multipotentes Autólogas 	<ul style="list-style-type: none"> Teratogénicas Baja disponibilidad Respuesta inmune del huésped Problemas éticos

Células troncales pluripotentes inducidas	<ul style="list-style-type: none"> • Pluripotentes • Fáciles de expandir • Buena disponibilidad • Autólogas 	<ul style="list-style-type: none"> • Potencial teratogénico • Posible potencial oncogénico
Células troncales embrionarias	<ul style="list-style-type: none"> • Pluripotentes • Fáciles de expandir 	<ul style="list-style-type: none"> • Teratogénicas • Baja disponibilidad • Respuesta inmune del huésped • Problemas éticos

2.4.2 Biomateriales y andamios

El soporte celular para el cultivo *in vitro* de células cardíacas, andamio, está constituido de materiales biocompatibles que pueden ser de origen natural o sintético. La función principal del andamio es suplir y emular la función de la Matriz Extracelular (MEC) del tejido muscular cardíaco nativo [11]. La matriz extracelular está compuesta de proteínas y polisacáridos como colágeno, elastina, proteoglicanos y laminina. En el tejido muscular cardíaco nativo la MEC permite que las células se integren y comuniquen adecuadamente para formar tejido funcional. Los CMs interactúan con las fibras de colágeno, fibronectina y laminina de la MEC a través de receptores de integrina de su membrana celular [61].

El andamio no debe ser tóxico para las células y debe poder degradarse en un tiempo adecuado para permitir el desarrollo del tejido [62]. Los requerimientos imprescindibles de un andamio para generar tejido muscular cardíaco *in vitro* son [11]:

- Brindar soporte a las células. Deben actuar como soporte de las células hasta que ellas secreten su propia MEC.
- Biocompatibles y biodegradables. No deben provocar reacciones inmunológicas y los compuestos de degradación no deben ser tóxicos.
- Estructura. Deben imitar el ambiente natural del miocardio y ser porosos para permitir la vascularización del tejido.

Los andamios pueden ser hidrogeles, estructuras descelularizadas, matrices prefabricadas y láminas celulares. Los hidrogeles y las matrices prefabricadas son el tipo de andamio empleado con mayor frecuencia. Las matrices prefabricadas se prefieren cuando se aplica estimulación mecánica al constructo porque son fáciles de manipular y resisten mejor la tracción, sin embargo, no promueven la adhesión celular tanto como lo hacen los hidrogeles. Los hidrogeles son polímeros entrecruzados que están formados por la reacción de uno o más monómeros por asociación de puentes de hidrogeno o interacciones de Van der Waals entre sus cadenas y se caracterizan por su extraordinaria capacidad para absorber agua debido a su alto contenido de grupos -OH, -COOH, -CONH₂ y -SO₃H [63]. Los

hidrogeles favorecen la proliferación celular en gran parte de su volumen y eliminan prácticamente cualquier respuesta inmune que pudiese generarse a la hora de implantar el constructo al organismo vivo ya que la mayoría están compuestos de polisacáridos de origen natural que han demostrado no provocar reacciones de inflamación en sistemas vivos, sin embargo, son endeble y difíciles de manipular [64].

Los andamios pueden ser fabricados a partir de materiales de origen natural como el alginato, quitosano, colágeno, matrigel, gelatina, entre otros o bien a partir de materiales sintéticos como el ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), ácido glicólico poliláctico (PLGA) y poliuretano. Las evidencias indican que los biomateriales de origen natural ayudan a generar constructos cardíacos con mayores densidades celulares, distribuciones celulares uniformes y con mejor alineación celular que los biomateriales de origen sintético [65].

En cualquier caso, se busca dotar al andamio de propiedades químicas y físicas que permitan generar o transmitir señales químicas y eléctricas del tipo célula-célula y célula-andamio mismas que son esenciales para la comunicación y supervivencia celular [66]. En la Tabla 2 se presenta un resumen de materiales que han sido utilizados en el desarrollo de tejido muscular cardíaco *in vitro* [67], [68].

Tabla 2. Biomateriales utilizados en ITC

Material	Resultados	Origen
Alginato	↓ Grosor de la cicatriz, tamaño del infarto, progresión de falla cardíaca. ↑ Densidad microvascular, función cardíaca, fracción de eyección	Natural
Quitosano	↓ Tamaño del infarto ↑ Angiogénesis, función cardíaca	Natural
Ácido hialurónico	↑ Fracción de eyección, función del ventrículo izquierdo	Natural
Celulosa	↓ Fibrosis, apoptosis ↑ Angiogénesis	Natural
Colágeno	↑ Densidad vascular, función cardíaca, contracción ↓ Tamaño del infarto, fibrosis,	Natural
Fibrina	↑ Función cardíaca, densidad vascular, angiogénesis ↓ Apoptosis, inflamación, tamaño del infarto	Natural
Gelatina	↑ Densidad microvascular, gasto cardíaco ↓ Fibrosis	Natural
Poliuretano	↓ Tamaño del infarto, ↑ Revascularización, fracción de eyección, función cardíaca	Sintético
Poli (glicerol sebacato)	↑ Función cardíaca	Sintético
Policaprolactona	↑ Angiogénesis, densidad de vasos sanguíneos ↓ Tamaño del infarto, fibrosis	Sintético
Ácido poliglicólico	↑ Función ventricular	Sintético
Ácido poliláctico	↓ Inflamación ↑ Angiogénesis, función cardíaca	Sintético
Ácido poli(láctico-co-glicólico)	↑ Función cardíaca	Sintético

↑ Aumento, ↓ Disminución. Adaptado de [69].

El alginato y el quitosano son dos polisacáridos de origen natural de uso común en la medicina y la industria alimentaria debido a su excelente biocompatibilidad y

comportamiento bactericida. Además, pueden mezclarse con otros materiales, por ejemplo, colágeno, ácido láctico, lactosa, fibronectina, PCL, PLGA y gelatina [70], y con nanopartículas de oro y grafeno [71].

Añadir oro y grafeno a andamios de quitosano mejora la conductividad eléctrica del constructo y éste a la vez ayuda a recuperar la función contráctil de un corazón que ha sufrido un IAM [72]. En el campo de la medicina regenerativa una mezcla de alginato y quitosano puede acelerar la curación de lesiones en el hígado de conejos [73] y a atenuar el daño y la remodelación ventricular en un corazón que ha sufrido un IAM [74]. El quitosano puede mezclarse con polipirrol y formar un hidrogel que favorece la adhesión y proliferación de CMRN para generar tejido muscular cardíaco *in vitro* que promueve la recuperación del tejido muscular cardíaco dañado por IAM en rata [75].

Otras características importantes que deben poseer los andamios para cultivar células cardíacas *in vitro* son la capacidad de absorber líquidos y permitir el paso de sustancias a través de su estructura sin sufrir modificaciones importantes, hinchamiento y permeabilidad, respectivamente. Ambas propiedades son de suma importancia en el desarrollo de tejido muscular cardíaco *in vitro* porque las células cardíacas son altamente dependientes de oxígeno y nutrientes. En un trabajo realizado por nuestro grupo de investigación determinamos el porcentaje de hinchamiento y la permeabilidad de andamios de alginato-quitosano (0.75-1.25 % p/v) y se encontró que son adecuados para el cultivo de células cardíacas [76].

2.4.3 Biorreactores para el cultivo de células cardíacas

El biorreactor es el espacio físico donde se lleva a cabo el desarrollo del tejido muscular cardíaco. El biorreactor proporciona las condiciones adecuadas para el cultivo de células cardíacas, por ejemplo, un ambiente estéril libre microorganismos, temperatura y pH fisiológicos (37 °C, pH≈7), así mismo ayuda a suministrar la cantidad adecuada de nutrientes y oxígeno mediante transferencia de masa por convección al mismo tiempo que aplica estimulación mecánica y eléctrica al constructo [18]. La estimulación eléctrica y mecánica y la transferencia de masa por convección inducen la expresión de proteínas estructurales cardíacas y aumentan la densidad celular del constructo hasta en un 60% respecto a cultivos en placa [77].

2.4.4 Biorreactor de perfusión

En los sistemas de cultivo tradicionales, por ejemplo, los cultivos en placa (cultivo estático) el principal factor limitante para generar tejido muscular cardíaco con espesor superior a 100 µm es la baja transferencia de masa, específicamente la transferencia de oxígeno. En un cultivo en placa la transferencia de masa se da exclusivamente por difusión cuya fuerza motriz es un gradiente de concentraciones que se da entre una zona de concentración alta y otra de menor concentración. Los

cultivos de células cardíacas en placa generan constructos con densidades celulares bajas y la presencia de células se limita a la superficie (100 μm de profundidad) y la periferia del andamio. Esto se debe a que la transferencia de masa por difusión es lenta e ineficiente y no satisface las necesidades de nutrientes y oxígeno en la región central del andamio [12]. La concentración de oxígeno en los constructos generados en cultivo estático es alta en la superficie, pero disminuye rápidamente conforme aumenta la profundidad alcanzando valores cercanos a cero en el centro del andamio. La baja o nula concentración de oxígeno en regiones profundas del andamio impide la proliferación celular en esas regiones y provoca muerte celular porque las células cardíacas mueren en ambientes hipóxicos [78]

El oxígeno no solo es un elemento esencial para el metabolismo celular, también ayuda a mantener el pH del medio a un valor cercano a 7 evitando que adquiera valores ácidos. Brown, D. *et al.*, (2008) [79] reportaron que CMRN cultivados en un ambiente sin oxígeno (aire con 0 % O_2) y con una concentración media de oxígeno (aire con 10 % O_2) morían cuando el pH alcanzaba valores menores a 6, el cual fue asociado a la baja concentración de oxígeno en el medio. Sin embargo, los CMRN proliferan y son viables cuando son cultivados en ambientes cuya concentración de oxígeno es similar a la concentración de oxígeno del aire ambiental (20% O_2) (Figura 9). Además, determinaron que el medio se considera hipóxico para CMRN cuando la concentración de oxígeno es $<14 \mu\text{M O}_2$ ($1.4 \times 10^{-5} \text{ mol/L O}_2$).

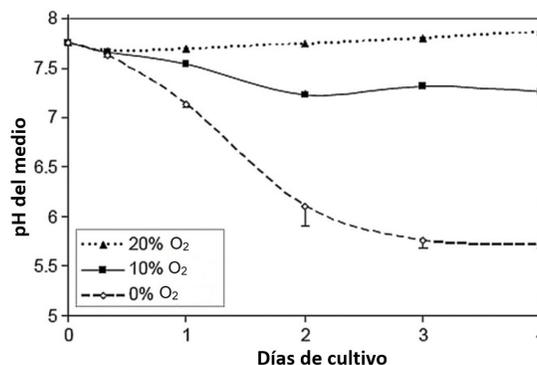


Figura 9. Dependencia del pH del medio con la concentración de oxígeno. Concentraciones de oxígeno de 0% y 10% acidifican el medio y provocan muerte celular en CMRN. Modificado de Brown, D. A., *et al.* (2008) [79].

El cultivo de células cardíacas en un biorreactor de perfusión permite aumentar la transferencia de masa en el constructo [13]. Los tejidos generados con perfusión tienen el doble de espesor que los tejidos generados en cultivo estático ($\sim 200 \mu\text{m}$ Vs $\sim 80 \mu\text{m}$) [80]. El régimen de transferencia de masa en constructos sometidos a perfusión es la convección. La transferencia de masa por convección ocurre entre una superficie sólida y un fluido en movimiento o entre dos fluidos inmiscibles en movimiento. La fuerza motora es un gradiente de presiones entre dos puntos por lo que es más eficiente que la transferencia de masa por difusión. El biorreactor de

perfusión circula continuamente el medio de tal manera que el constructo recibe medio fresco en todo momento a la vez que se le retira el medio cuya concentración de oxígeno es baja. Al mismo tiempo se retiran del constructo los desechos generados por el metabolismo celular [13]. Sin embargo, la perfusión genera esfuerzo cortante que provoca estrés hidrodinámico a las células del constructo. El esfuerzo cortante puede desprender a las células del constructo o desencadenar señales de muerte celular activadas por estrés hidrodinámico, por tal razón la velocidad del flujo no debe rebasar valores que generan esfuerzos cortantes perjudiciales para el constructo. En condiciones fisiológicas las células del miocardio de rata están sometidas a un esfuerzo cortante de $\sim 0.5 \text{ dina/cm}^2$ [81]. Sin embargo, las células cardíacas cultivadas *in vitro* toleran esfuerzos cortantes de mayor magnitud. Por ejemplo, Valls-Margarit, *et al.*, (2019) [49] crearon tejido muscular cardíaco contráctil partir de CMRN y CMs de humano sometidos a un esfuerzo cortante de 0.7 dina/cm^2 y 1.3 dina/cm^2 . Estos valores fueron generados con flujos de perfusión de 0.1 mL/min y 0.2 mL/min , respectivamente. En otro trabajo Boycott, *et al.*, (2013) [82] cultivaron células cardíacas sometidas a un esfuerzo cortante de 2.8 dina/cm^2 y el constructo expresó mayor cantidad de proteínas cardíacas involucradas en la formación de canales dependientes de voltaje, respecto al constructo generado en condiciones de cultivo estático. Otros tipos de células animales cultivadas *in vitro* alcanzan porcentajes de viabilidad celular $>90\%$ cuando son sometidas a esfuerzos cortantes entre $0.15\text{-}0.33 \text{ dina/cm}^2$ [83].

El cultivo *in vitro* de células cardíacas en un biorreactor de perfusión incrementa la expresión de proteínas contráctiles y de uniones gap a través de vías activadas por el inductor de hipertrofia, ERK1/2 (quinasa regulada por señales extracelulares) [84] y en células troncales, la perfusión, favorece la diferenciación al linaje cardíaco donde las células diferenciadas adquieren actividad contráctil similar a la del tejido muscular cardíaco nativo, además los niveles de expresión de proteínas cardíacas son más altos respecto a las células cultivadas en condiciones estáticas [85]. El efecto más importante de la perfusión es el aumento de la tasa de transferencia de oxígeno en el constructo, sin embargo, se ha reportado que una mayor concentración de O_2 se asocia a un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno que a su vez pueden provocar daño al ADN o arresto celular [86]. Por otra parte, las células cardíacas responden de una manera particular a los niveles de oxígeno. Por ejemplo, cardiomiocitos fetales y neonatales proliferan en ambientes hipóxicos, pero entran en arresto celular cuando aumenta la concentración de oxígeno, sin embargo, adquieren un fenotipo y genotipo maduro cuando la concentración de oxígeno aumenta [87].

En la Tabla 3 se enlistan trabajos de cultivo de células cardíacas en un biorreactor de perfusión.

Tabla 3. Cultivo de células cardíacas con perfusión

Flujo	Tipo de célula	Andamio	Año Ref.
1.17 mL/min Dinámico: 4 días	150×10 ⁶ células/cm ³ CMRN + CEr Densidad	Poliglicerol sebacato (PGS) Di= 8 mm (5 mm), z=1 mm	2010 [13]
0.38 mL/min Dinámico: 8 días	CMRN+FB 6×10 ⁶ células/andamio	Colágeno/matrigel Di=6.35 mm, z=1.5 mm	2009 [88]
0.5 mL/min Cultivo: 7 días	CMRN 1.35×10 ⁸ cels/cm ³ "Densidad fisiológica"	Colágeno: Di: 5 mm, z=1.5 mm	2004 [89]
0.5-1.5 mL/min Dinámico: 7 días	CMRN 0.5-1×10 ⁸ cels/cm ³ 6-12×10 ⁶ cels/andamio	Colágeno Di= 13 mm, z=3 mm	2003 [90]
0.2-3 mL/min Dinámico: 12 días	CMRN 24×10 ⁶ cels/0.95 cm ²	Ácido poliglicólico Di=11 mm, z= 2 mm	2002 [91]
0.2 mL/min Estático: 7 días Dinámico: 4 días	Célula cardíacas progenitoras de humano 2×10 ⁶ cels/mL	Gelatina	2014 [85]
Balaceo, ± 30°, 0.4 Hz Estático: 45 min Dinámico: 14 días	CMRN 6×10 ⁶ cels/cm ²	Polidimetilsiloxano (PDMS) 1 cm × 1 cm × 2mm	2018 [92]
Balaceo ±30°, 0.414 días	CMRN +CMs derivados de hPSC 3.75×10 ⁵ cels	PDMS + fibrina 7 mm × 2 mm	2016 [93]
3.47 mL/min Estático: 3 días Dinámico: 7 días	hEMSC diferenciadas a osteocitos 5×10 ⁵ cels/andamio	Poliuretano Di= 3 cm, h= 5 mm	2018 [94]
1.5 mL/min y 0.32 mL/min	CMRN 8×10 ⁶ células	Di= 5.9 mm h= 3mm	2008 [95]
0.1 mL/min Estático: 5 días Dinámico: 6 días	CEh+FBh 5×10 ⁵ CEh 1×10 ⁶ FBh	Acido poli-L-láctico (PLLA) Di= 6 mm, h=1 mm	2019 [14]
25 rpm 6 días	CMRN 1.33×10 ⁸ células/andamio	Ácido poliglicólico Diámetro: 5 mm Espesor: 2 mm	2001 [96]
0.6 mL/min Estático= 2 días Dinámico= 10 días	CMRN 2.4×10 ⁶	Ácido poliglicólico Di = 9.5 mm Espesor = 2 mm	2002 [78]
25 mL/min, 5 V (74.4 mA/cm ²), 2 ms, 1 Hz, Estático: 2 días, dinámico=4 días.	CMRN 1.8×10 ⁸ células/cm ³	Alginato Di=5 mm h= 2 mm	2010 [97]
0.6 mL/min, Estiramiento: 10%, 1Hz, 24 h EE: 7 V/cm, 4ms, 1 y 2 Hz	CMRN+FB+CE 1×10 ⁴ células/cm ²	PDMS 2 cm x 1 cm x 50 µm	2013 [98]
0.3 mL/min, 5 V, 1 Hz, 3 días estático + 4 días dinámico,	CMRN+FBrn 6×10 ⁶ células	Colágeno Di= 8 mm h= 2 mm	2018 [99]
0.1 mL/min 1-5 V, 3 Hz, 2 ms Dinámico= 14 días	CMs-hiPSC+FB en relación 7:1, 5 millones 5×10 ⁶ células	Colágeno + elastina Di= 10 mm h= 1 mm	2019 [49]

CMRN: cardiomiocito de rata neonatal, EMSC=Células troncales mesenquimales embrionarias humanas
CEr: células endoteliales de rata, CEh: células endoteliales de humano

2.4.5 Biorreactor eléctrico

En condiciones fisiológicas las células marcapasos del nódulo sinoauricular generan impulsos eléctricos que desencadenan la actividad contráctil del tejido muscular cardíaco. En el cultivo *in vitro* de células cardíacas la estimulación eléctrica es proporcionada de manera artificial. La estimulación eléctrica favorece el desarrollo

del tejido muscular cardíaco porque induce la comunicación celular mediante la formación de canales entre células contiguas conocidos como uniones gap cuyas proteínas constituyentes son las conexas, específicamente la conexina 34 (Cx43) [100].

La estimulación eléctrica en cultivos *in vitro* intenta imitar la actividad eléctrica del tejido muscular cardíaco nativo. En vertebrados (por ejemplo, ballena, rata, colibri) el corazón tiene gradientes de campo eléctrico que van de 0.1 V/cm a 10 V/cm con una frecuencia de 0.05-20 Hz y una duración de 1-2 ms. El corazón de ratas late a una frecuencia de ~300 bpm equivalente a 3 Hz [101]. Aunque los valores de la estimulación eléctrica varían de acuerdo al tipo de material del andamio, el consenso general indica que la estimulación eléctrica aplicada de la siguiente manera promueve en mayor grado la maduración del tejido muscular cardíaco *in vitro* [101], [102]:

- Campo eléctrico: <8 V/cm
- Frecuencia: 1 Hz - 3 Hz
- Ancho de pulso: ~ 2 ms
- Forma del pulso: cuadrados bifásicos
- Material: electrodos de carbono
- Tiempo de cultivo: estático 3 días + dinámico 5 días

Los biorreactores eléctricos aplican la estimulación eléctrica al constructo de dos maneras, estimulación directa y estimulación indirecta. En la estimulación directa, los electrodos están en contacto directo con el constructo y en la estimulación indirecta el estímulo proviene de un campo electromagnético generado por bobinas o barras de metal conductor colocadas en los extremos de la cámara de cultivo por lo que no entran en contacto con las células [103]. Sin embargo, se prefiere la estimulación directa porque el campo eléctrico que produce es uniforme y constante, en cambio el campo eléctrico generado mediante estimulación indirecta se dispersa.

En la Tabla 4 se enlista una serie de trabajos donde se han cultivado células cardíacas con estimulación eléctrica.

Tabla 4. Cultivo de células cardíacas con estimulación eléctrica

Estímulo eléctrico	Células	Andamio	Año/Ref.
5 V, 2 Hz, 10 ms	5x10 ⁴ células/pozo CMRN	Gelatina	2020 [100]
2.5 V, 3 Hz, 10 ms Estático: 2 días Dinámico: 10 días	4x10 ⁶ células/pozo CMRN	Fibrina	2017 [102]
4 V/cm, 1 Hz, 2 ms Estático: 3 días Dinámico: 9 días	4.1x10 ⁶ células/mL CMRN	Matrigel + fibrina	2012 [104]
3 V/cm, 3 Hz*, 2 ms** Estático: 3 días* Dinámico: 5 días	5x10⁶ células/mL CMRN	Colágeno Ultrafoam + Matrigel 6 mm x 6 mm x1.5 mm	2011 [105]
2.5 V/cm, 1 Hz, 1 ms, y	8x10 ⁴ células/andamio	Polietilenglicol/diacrilato+ matrigel	2011

5 V/cm, 1 Hz, 2 ms Estático: 2 días. Dinámico: 5 días	CMRN	Di= 4 mm	[106]
500 mV, 1 Hz, 1 ms Estático: 3 días Dinámico: 4 días	1x10 ⁵ cels/cm ² CMRN	Colágeno	2010 [107]
5 V, 1 Hz, 2 ms Estático: 3 días Dinámico: 5 días	1.35x10 ⁸ cels/cm ³ CMRN	Colágeno	2009 [101]
5 V/cm, 1 Hz, 2 ms Estático: 1, 3 o 5 días Dinámico: 5 días	6x10 ⁶ /andamio CMRN	Colágeno Ultrafoam 6 mm x 8 mm x 1.5 mm	2004 [108]
1 V/cm, 5 Hz, 5 ms Estático: 7 días Dinámico: 21 días.	1x10 ⁶ cels/cm ² CMs de murino, línea celular	Gelatina + fibronectina	2019 [109]
3 V/cm, 1 Hz, 1 ms Estático: 7 días. Dinámico: 7 días.	5x10 ⁵ cels/andamio CMs-iPSC	Colágeno 2 cm x 0.85 cm x 0.35 cm	2017 [110]
0.3 V/mm, 1 Hz, 4 ms Estático: 4 días Dinámico: 10 días	7x10 ⁵ células Mioblastos de línea celular C2C12	Colágeno +matrigel	2014 [111]
2 V, 0.5 Hz, 2 y 4 ms, (CMRN) 2 V, 1.5 y 2 Hz, 2 y 4 ms (CM-hiPSC) Estático: 0-4 días Dinámico: 4-28 días	5x10 ⁶ cels/mL CMRN CM-hiPSC	Fibrina+ Matrigel	2014 [112]
6.6 V/cm, 1 Hz, 2 ms Dinámico: 4 días	CMs-hESC	--	2013 [113]
4.5 mV, 2-6 Hz, 2 ms Estático: 7 días Dinámico: 21 días	10x10 ⁶ cels/mL iPSC-CMs + FB	Fibrina	2018 [114]
1 y 1.5 V/cm, 5 Hz, 5 ms Estático: 7 días Dinámico: 1-30 días	CM- hiPSC (línea celular)	Vitronectina	2018 [115]
5 mA, 1.5, 10 y 20 Hz, 10 ms	10 ⁷ cels/mL Mioblastos de murino C2C12	Colágeno + matrigel	2018 [116]
74.4 mA/cm ² , 1 Hz, 2 ms Dinámico: 4 días	CMRN	Alginato Di=5 mm h= 2 mm	2010 [97]
5 V, 1 Hz, 2 ms	CMs de humano	Policaprolactona, silicona	2017 [117]
1 V/mm, 1 Hz, 5 ms Estático: 4 y 8 días Dinámico: 19 días.	CMs-hESC línea H13	--	2009 [118]
E. Eléctrica: 5 V, 1 Hz, 2 ms E. Mecánica: 20 %, 1 Hz, onda triangular	Células mesenquimales de rata Lewis. 10⁷células/mL.	Miocardio de cerdo descelularizado	2013 [119]

*Valores determinados como los mejores para cultivo de células cardíacas *in vitro* ** Valores característicos del miocardio nativo

2.4.6 Uso de nanopartículas en la Ingeniería de Tejido Cardíaco

Es común añadir nanopartículas al andamio para potenciar la estimulación eléctrica en el constructo. La adición de Np aumenta la conductividad intrínseca del andamio y favorece en mayor grado la adhesión celular [120]. Por definición, las nanopartículas son todas aquellas partículas cuyas dimensiones rondan los 100 nm. Las nanopartículas poseen una elevada relación superficie/volumen, no son invasivas, son compatibles con diferentes materiales, no presentan toxicidad a ciertas concentraciones y aumentan la adhesión y proliferación celular [121]. En el andamio las Np pueden favorecer el flujo de corrientes eléctricas de manera análoga a los canales de Cx43 en el tejido muscular cardíaco nativo [120].

En la ITC se utilizan nanopartículas de materiales que poseen una elevada conductividad eléctrica, por ejemplo, oro, carbono y plata. El uso de oro y plata es cada vez más frecuente en aplicaciones biomédicas debido a que presentan actividad antimicrobiana y han mostrado buenos resultados en el tratamiento de tumores cancerígenos y de enfermedades reumáticas como la artritis reumatoide [122], [123]. Además, las nanopartículas de oro (NpAu) tienen baja citotoxicidad y son altamente biocompatibles con sistemas vivos [124]. Con una conductividad de 4.5×10^7 S/m el oro es el quinto material más conductivo del mundo, solo después del grafeno (9.8×10^7 S/m), plata (6.3×10^7 S/m), cobre (5.9×10^7 S/m) y cobre recocido (5.8×10^7 S/m). Cabe mencionar que la conductividad eléctrica del tejido muscular cardíaco tiene un valor aproximado de 0.16 S/m en dirección longitudinal y de 0.005 S/m en dirección transversal.

En la Tabla 5 se enlistan trabajos donde se han utilizado Np para el cultivo de células cardíacas *in vitro*.

Tabla 5. Cultivo de células cardíacas con nanopartículas

Tipo de Np	Andamio	Resultado	Referencia
Np Au (Di= 4-10 nm)	MEC descelularizada	<ul style="list-style-type: none"> • Aumenta la expresión de Cx43 • Células alineadas • Contracciones uniformes 	[125] 2014
Np Au	Quitano	<ul style="list-style-type: none"> • Aumenta la viabilidad celular • Promueve la migración y proliferación celular • Promueve la diferenciación de células troncales a CMs 	[126] 2016
Np Au	Policaprolactona	<ul style="list-style-type: none"> • Células alargadas • Contracciones fuertes • Mejor respuesta a estímulos eléctricos 	[127] 2014
Au (2, 4, 14 nm)	Gelatina	<ul style="list-style-type: none"> • Alineación celular • Mayor expresión de actinina 	[128] 2013
Au (30 nm)	Alginato	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor expresión de Cx43 	[129] 2011
Au	Quitano	<ul style="list-style-type: none"> • Conductividad ~ 0.13 S/m • Mayor expresión de marcadores cardíacos: Nkx-2.5 y a-MHC • Proliferación celular 	[126] 2016
Carbono (10-100 nm)	Gelatina	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor expresión de Cx43 • Organización celular • Sensibilidad a estimulación eléctrica 	[130] 2013
Carbono (30-70 nm diámetro, 100-400 nm longitud)	etanol polivinílico/quitano	<ul style="list-style-type: none"> • Mejoran la adhesión y proliferación de FB de ratón 	[131] 2011
Nanotubos de carbono (8 nm diámetro, 262 nm longitud)	gelatina/quitano	<ul style="list-style-type: none"> • contracciones uniformes, mayor expresión de marcadores cardíacos (Cx43) y acoplamiento eléctrico • velocidad de conducción 22 ± 9 cm/s 	[132] 2014
Nanotubos de carbono	Placas de cultivo	<ul style="list-style-type: none"> • diferenciación de células troncales al linaje óseo 	[133] 2015

2.5 ANTECEDENTES DEL PROYECTO

En el grupo de investigación en Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa dirigido por la Dra. Nohra Elsy Beltrán Vargas del Departamento de Procesos y Tecnología de la UAM Cuajimalpa estamos trabajando en el desarrollo de parches cardíacos a partir de células cardíacas autólogas cultivadas en andamios de alginato/quitosano con estimulación electromecánica para su posible aplicación terapéutica. Los avances al día de hoy incluyen la caracterización y validación de un biorreactor electromecánico para generar tejido muscular cardíaco [22], el cultivo de CMRN en andamios de alginato-quitosano (1-1%p/v) bajo tres condiciones de cultivo: estático (E), con perfusión (P) y con estimulación eléctrica (EE) [23], una metodología para elaborar andamios de alginato-quitosano 0.75-1.25% (p/v) y para calcular su porcentaje de hinchamiento y permeabilidad [76], la adición de dos tipos de nanopartículas a los andamios de alginato-quitosano para evaluar su efecto en el porcentaje de hinchamiento y permeabilidad: nanopartículas de oro (Np Au) y nanopartículas oro recubiertas con alginato (Np Au+Alg) [25]. El estudio de la modificación de la metodología para elaborar andamios de alginato-quitosano y el cultivo de células cardíacas en andamios funcionalizados con NpAu y Np Au+Alg [24]. También se ha solicitado la patente de la metodología de la elaboración de andamios de alginato-quitosano funcionalizados con nanopartículas de oro y alginato [21] y están en curso diversos proyectos de licenciatura y posgrado relacionados con el proyecto.

2.5.1 Biorreactor electromecánico-UAM Cuajimalpa.

El biorreactor electromecánico para el cultivo de células cardíacas desarrollado en la UAM Cuajimalpa está constituido por una cámara de cultivo, un sistema de perfusión, un sistema de estimulación eléctrica y un sistema de estimulación mecánica (no utilizado en este trabajo). Los tres sistemas se montan para armar el biorreactor y una vez armado se introduce en una incubadora de cultivo celular. La cámara de cultivo, el sistema de perfusión y el sistema de estimulación mecánica (excepto la caja de control) van dentro de la incubadora de cultivo celular. El sistema de estimulación eléctrica permanece fuera y se conecta a la cámara de cultivo con un cable que tiene un par de pinzas caimán en su extremo que se sujetan a los electrodos insertados en la cámara de cultivo. Este biorreactor esta patentado ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial [22].

El biorreactor electromecánico funciona de la siguiente manera. El medio de cultivo almacenado en el reservorio del medio de cultivo es transportado por una bomba peristáltica a un oxigenador el cual cuenta en su interior con una manguera de silicón dispuesta en forma de serpentín (de 65 cm de largo) que se conecta a su vez con una bomba de aire para oxigenar el medio. El medio de cultivo en ningún momento tiene contacto con el ambiente exterior y la oxigenación se logra mediante

difusión a través de la manguera. El medio pasa del oxigenador a la cámara de cultivo donde entra por un orificio que está en la parte superior de la cámara y sale por otro que está a un lado del orificio de entrada y se recircula al reservorio. Los estímulos eléctricos son aplicados por el electroestimulador a través de una par de electrodos. En la base de la cámara de cultivo hay un actuador lineal que ejerce presión sobre una membrana de silicón que a su vez entra en contacto con el constructo sometiéndolo a estimulación mecánica por compresión, el cual es controlado a través de una interfase diseñada específicamente para el sistema. Todo el sistema está conectado con una manguera de silicón de 5 mm de diámetro externo y 1.6 mm de diámetro interno.

La cámara de cultivo (Figura 10) tiene forma de cilindro, tiene un diámetro exterior de 5 cm y una altura de 8.2 cm, el volumen interior es de 2.4 cm³ y en la parte central se encuentra una hendidura donde se coloca el andamio. Está constituida por dos partes, una base y una tapa donde se insertan en dirección vertical dos electrodos de carbono que miden 5.8 cm de largo y están separados uno de otro por una distancia de 1.3 cm. La parte inferior de los electrodos tiene contacto con el medio de cultivo y con el constructo cuando éste mide más de 1.3 cm de diámetro. La parte superior de los electrodos sobresale de la tapa de la cámara de cultivo y se une a un par pinzas caimán que están conectadas al electroestimulador. La base y la tapa de la cámara de cultivo están unidas y selladas mediante un anillo de silicón que se coloca entre ambas piezas. Para mantener unidas ambas partes se sujetan con unas pinzas tipo abrazaderas que no tienen contacto con el constructo ni con el medio de cultivo. El material de la cámara de cultivo no permite que sea esterilizada por calor húmedo por lo que la base y la tapa de la cámara de cultivo, el anillo de silicón y los electrodos se lavan con jabón grado quirúrgico, se limpian con etanol al 70% (v/v), se dejan reposar en una solución de agua con hipoclorito de sodio (en este paso, excepto los electrodos) y se radian con luz UV para asegurar su esterilidad.

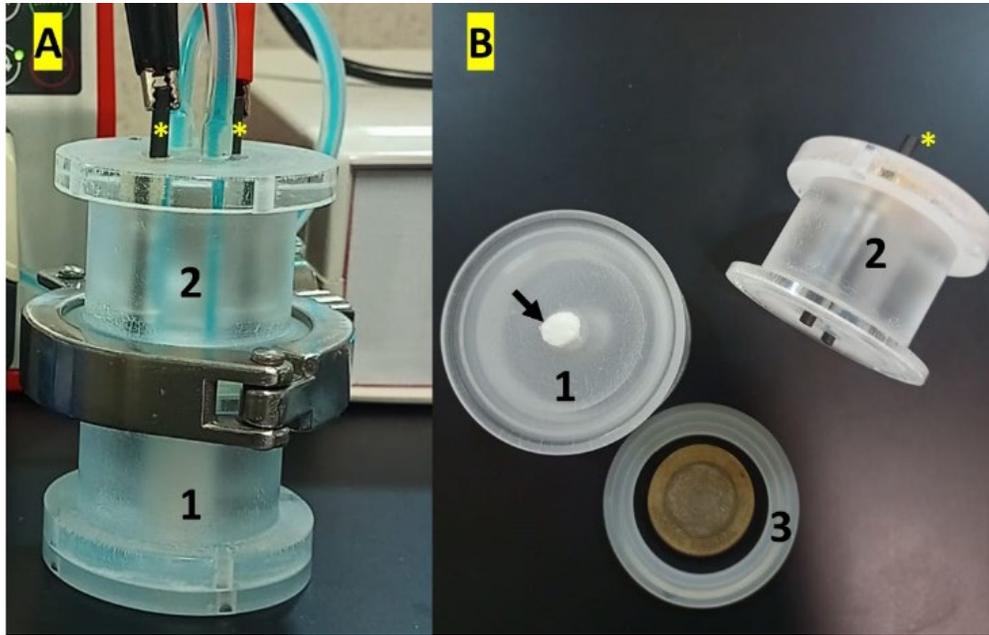


Figura 10. Cámara de cultivo del biorreactor electromecánico-UAM Cuajimalpa. A) Cámara de cultivo armada. B) Cámara de cultivo desarmada. 1) Base de la cámara de cultivo, 2) Tapa de la cámara de cultivo, 3) Anillo de silicón que se introduce entre la base y la tapa para sellar la cámara de cultivo, Flecha) Andamio colocado en su posición, Asterisco) Electrodo del sistema de estimulación eléctrica insertados en la tapa de la cámara de cultivo.

En este trabajo no se utiliza el sistema de estimulación mecánica ni el sistema de oxigenación porque el diseño experimental no incluye estimulación mecánica y la demanda de oxígeno del constructo puede ser proporcionada por el medio de cultivo sin oxigenar. Por tal razón el biorreactor para el cultivo de CMRN se denomina biorreactor eléctrico y está constituido por la cámara de cultivo, el sistema de perfusión y el sistema de estimulación eléctrica (Figura 11).

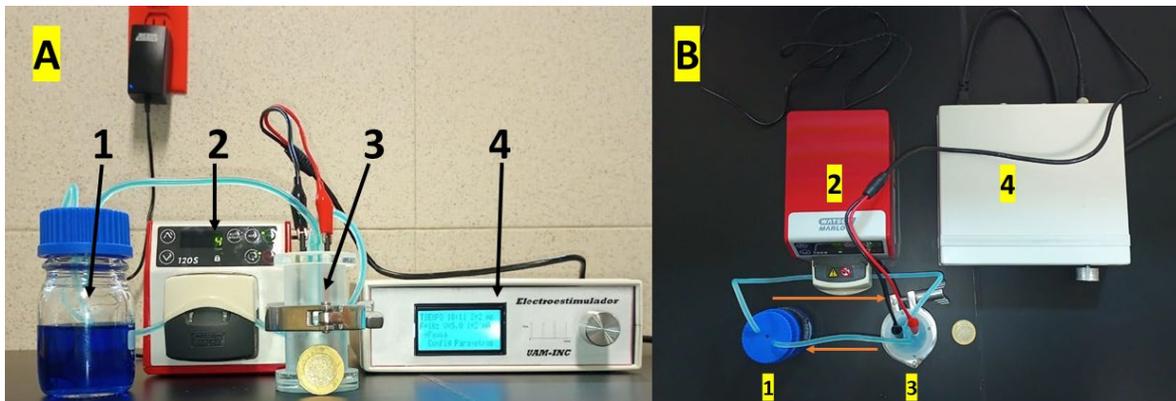


Figura 11. Biorreactor eléctrico para cultivo de células cardíacas. A) Vista frontal. B) Vista superior. 1) Reservorio del medio de cultivo, 2) Bomba peristáltica del sistema de perfusión, 3) Cámara de cultivo, 4) Electroestimulador. Se utiliza una moneda de 10 pesos mexicanos M/N como referencia de tamaño. Biorreactor montado con fines ilustrativos.

El constructo en forma de pastilla se coloca en el centro de la base de la cámara de cultivo. El medio almacenado en el reservorio se mueve con una bomba peristáltica Watson-Marlow para flujos pequeños. Los estímulos eléctricos llegan al constructo a través del par de electrodos que lo flanquean (el tamaño del constructo no permite que haya contacto entre el constructo y los electrodos). Los pulsos eléctricos son generados por un electroestimulador construido por ingenieros del Instituto Nacional de Cardiología - Ignacio Chávez, específicamente para nuestro biorreactor y el cual permite estimular 3 cámaras de cultivo simultáneamente. El estimulador eléctrico permite aplicar pulsos eléctricos en un rango de valores de voltaje (1-10 V), frecuencia (1-10 Hz), ancho de pulso (1-10 ms) y corriente (1-20 mA). La cámara de cultivo se esteriliza de la manera previamente mencionada; la bomba peristáltica, cables y abrazadera se limpian con jabón grado quirúrgico, etanol al 70 % (v/v) (v/v) y se radian con luz UV para asegurar su esterilidad; el reservorio del medio de cultivo y las mangueras se esterilizan con calor húmedo.

3 JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades cardíacas son la principal causa de muerte y de morbilidad en el mundo. La enfermedad cardíaca más común es el IAM. Después de sufrir un IAM el estado de salud del paciente se considera crítico debido al riesgo latente de muerte causado principalmente por la pérdida de tejido muscular cardíaco por necrosis. A la fecha de hoy no existe un tratamiento eficaz para el IAM lo cual ha motivado la búsqueda de tratamientos alternativos.

La Ingeniería de Tejido Cardíaco utiliza células, biomateriales y biorreactores para generar tejido muscular cardíaco *in vitro* con posibles usos clínicos para tratar el IAM. El tejido muscular cardíaco *in vitro* para usos clínicos requiere que el tejido sea desarrollado a partir de células de origen autólogo. La fuente celular autóloga ideal para desarrollar tejido muscular cardíaco *in vitro* son células troncales que pueden aislarse de diferentes tejidos del propio paciente con la necesidad ulterior de ser diferenciadas al linaje cardíaco.

El tejido muscular cardíaco desarrollado *in vitro* debe poseer actividad contráctil, expresar proteínas específicas del tejido muscular cardíaco y desarrollar una estructura similar a la del tejido muscular cardíaco nativo (células comunicadas, alineadas y alargadas) para considerarse tejido muscular cardíaco funcional. El desarrollo de tejido muscular cardíaco funcional *in vitro* en biorreactores requiere de parámetros específicos de cultivo para proporcionar la cantidad suficiente de oxígeno y de nutrientes y promover la maduración del tejido a través de la aplicación de estimulación eléctrica y mecánica. La perfusión del medio ayuda a aumentar la

transferencia de masa (oxígeno y nutrientes) y la estimulación eléctrica promueve la comunicación y organización de las células, por lo que el cultivo de CMRN con perfusión y estimulación eléctrica en un biorreactor puede ayudar a desarrollar tejido muscular cardíaco funcional *in vitro*. Por tal razón el objetivo de este trabajo es encontrar las condiciones de cultivo (perfusión y estimulación eléctrica) para desarrollar tejido muscular cardíaco *in vitro* a partir de CMRN para posteriormente aplicar tales parámetros al cultivo de células troncales para diferenciarlas a células cardíacas y desarrollar tejido muscular cardíaco *in vitro* para usos clínicos para tratar el IAM.

4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los valores de estimulación eléctrica y el flujo de operación de un biorreactor eléctrico para cultivar células cardíacas y promover la formación de tejido muscular cardíaco *in vitro*?

5 HIPÓTESIS

- El cultivo de células cardíacas con perfusión genera constructos cardíacos con mayor expresión de proteínas cardíacas respecto a aquellos generados en condiciones estáticas.
- La estimulación eléctrica de cardiomiocitos en un rango de 3-5 V, 1-3 Hz y 2 ms promueve el crecimiento de tejido muscular cardíaco con mayor expresión de proteínas cardíacas respecto a aquellos generados sin estimulación eléctrica.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVOS GENERALES

- Estandarizar el cultivo de cardiomiocitos de rata neonatal en andamios de alginato/quitosano para el desarrollo de tejido muscular cardíaco *in vitro*.
- Estandarizar el cultivo de cardiomiocitos de rata neonatal en un biorreactor con diferentes estímulos eléctricos.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer una metodología de cultivo de cardiomiocitos de rata neonatal en monocapa.
- Definir el flujo de operación del biorreactor que permite generar tejido muscular cardíaco funcional *in vitro*.
- Desarrollar tejido muscular cardíaco *in vitro* mediante el cultivo de cardiomiocitos de rata neonatal en condiciones estáticas en andamios funcionalizados con nanopartículas de oro y alginato.
- Desarrollar tejido muscular cardíaco *in vitro* en un biorreactor eléctrico a través del cultivo de cardiomiocitos de ratas neonatales en andamios funcionalizados con nanopartículas de oro y alginato.
- Analizar histológica e inmunohistoquímicamente los constructos generados para definir las mejores condiciones de estimulación para el desarrollo de tejido muscular cardíaco *in vitro*.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

El esquema de la Figura 12 resume la metodología seguida para cultivar CMRN en un biorreactor eléctrico, generar constructos cardíacos y analizarlos.

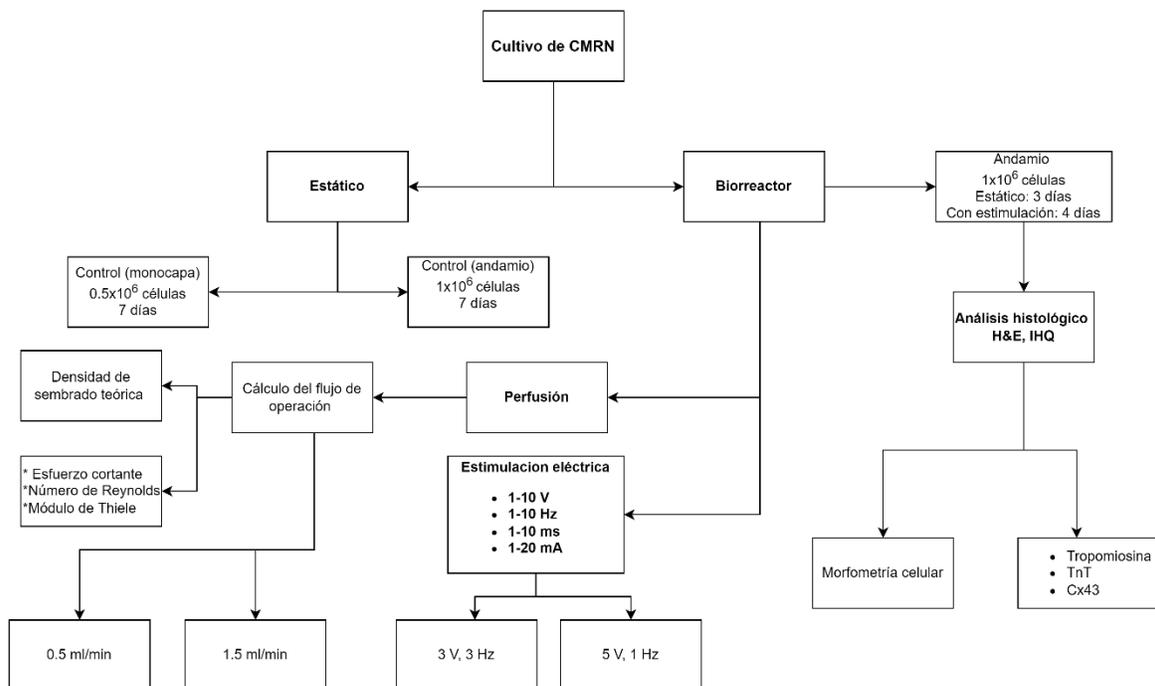


Figura 12. Metodología del cultivo de CMRN para generar constructos cardíacos.

7.1 PRUEBA DE ESTERILIDAD DEL BIORREACTOR

Los biorreactores que operan en modo continuo se enfrentan al riesgo latente de contaminación debido a la circulación continua del medio. Por tal razón se propuso un protocolo de esterilización para comprobar que nuestro biorreactor podía operar en condiciones estériles durante al menos 7 días continuos.

El protocolo se realizó de la siguiente manera. El reservorio del medio de cultivo, la cámara de cultivo, los anillos de silicón, el empaque de los electrodos y las mangueras se lavaron con agua y jabón, se limpiaron con etanol al 70 % (v/v) y luego se lavaron con Surgisan concentrado. Se mantuvieron reposando en una mezcla de agua con hipoclorito de sodio durante 24 h. Transcurridas las 24 h el interior de las mangueras se enjuagó 5 veces con una mezcla de agua con hipoclorito de sodio, en seguida todo el material se lavó con agua de grifo, se secó y se limpió con etanol al 70 % (v/v) y se radiaron con luz UV durante 2 h en una campana de flujo laminar. El reservorio del medio, las mangueras y los empaques de los electrodos fueron esterilizados en autoclave. El biorreactor se armó en una campana de flujo laminar, el reservorio del medio se llenó con 30 mL de medio M199 suplementado (10% SFB, 5% HS, 1% antibiótico) y se llevó a una incubadora de cultivo celular (37 °C, 5% CO₂). El biorreactor operó con un flujo de 0.5 mL/min durante 7 días. A los 7 días se tomaron alícuotas del medio de cultivo de la cámara de cultivo y del reservorio y se sembraron por estriado en una placa de agar nutritivo. Las placas fueron mantenidas en una incubadora durante 7 días. Se realizaron dos pruebas independientes de esterilidad, la primera con caldo nutritivo y la segunda con medio M199.

7.2 GENERACIÓN DE NP AU Y NP AU+ALG

El proceso para elaborar Np Au y Np Au+Alg consistió de tres etapas: generación de núcleos de ácido poliláctico-co-glicólico o PGLA por sus siglas en inglés, elaboración de nanosemillas de oro y crecimiento de coraza. Para generar los núcleos de PGLA, se preparó una mezcla de acetona con PLGA 10% m/v y se añadió a una solución de F-127 (1% m/v) en proporción 1:20, la mezcla se llevó a sonicar para asegurar homogeneidad. Para eliminar la acetona se hicieron tres ciclos de lavados que consistieron en centrifugar la mezcla, recuperar el pellet y resuspender en agua mili Q. Para hacer nanopartículas de alginato, a la solución resultante de los lavados se le añadió alginato 1% m/v en proporción 1:20.

Para elaborar nanosemillas se mezclaron 0.125 mL de HAuCl₄ 0.01 M con 10 mL de citrato trisódico 0.0256 mM, y en un cuarto con temperatura de 4 °C se agregaron 0.3 mL de NaBH₄ 0.1 M, luego se midió el tamaño de partícula y el potencial Z. En

seguida se preparó la mezcla de núcleos de PGLA con nanosemillas. En un cuarto oscuro se mezclaron los núcleos de PGLA con las nanosemillas en una proporción 1:1, la mezcla se lavó y se llevó a sonicar y después se midió el tamaño de partícula y el potencial Z.

Para terminar, se realizó el crecimiento de coraza para lo cual se añadieron 2.025 mL de la mezcla PLGA/nanosemillas a 45 mL de la solución de crecimiento ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.025M) y se mantuvieron en agitación, finalmente se añadió abruptamente 225 μL de solución iniciadora (ácido ascórbico 0.5M, $\text{pH} \approx 1.95$). La solución de Np se almacenó en un frasco ámbar a 4 °C.

7.3 GENERACIÓN DE ANDAMIOS DE ALGINATO-QUITOSANO (0.75-1.25 % P/V)

Se mezclaron alginato y quitosano en polvo, se añadió agua mili Q y se ajustó el pH a un valor entre 5 y 6 con ácido acético. La solución se colocó en una caja de cultivo de 24 pozos, se congeló durante 12 h y se liofilizó durante 8 horas. Al finalizar la liofilización, los andamios fueron entrecruzados con gluconato de calcio al 1% p/v durante 30 min, se retiró el exceso de gluconato de calcio y se llevaron a un segundo ciclo de congelación seguido de una segunda liofilización. Finalmente, los andamios fueron almacenados en un tubo de 50 mL a temperatura ambiente, en un lugar fresco y seco.

7.4 CONDICIONES DE OPERACIÓN DEL BIORREACTOR

Se realizó un balance de materia en estado estacionario para el flujo molar de oxígeno en el constructo considerando un sistema de transferencia de masa líquido-sólido. Se calculó la velocidad del flujo molar del oxígeno consumido por las células y la velocidad del flujo molar de oxígeno de entrada en el constructo para definir dos flujos de perfusión. Se estimó el esfuerzo cortante asociado a los flujos de perfusión y se evaluó la transferencia de masa interna en el constructo. Se realizó una revisión bibliográfica de cultivos de células cardíacas con estimulación eléctrica y se propuso un par de estímulos eléctricos para operar nuestro biorreactor.

7.4.1 Cálculo de la cantidad de células a sembrar

En ingeniería de tejidos se utiliza la regla de 10 como criterio para el diseño de tejidos *in vitro*. La regla de 10 establece que se requieren al menos 10 unidades funcionales de tejido con densidad celular fisiológica (7×10^8 células/ cm^3) para generar un tejido *in vitro* con relevancia fisiológica. Se define a la unidad funcional de un tejido como el grupo de células que recapitula la función de un órgano en escala micro. En el contexto fisiológico 3D de un tejido, la unidad funcional o vóxel (unidad cúbica que compone una estructura tridimensional, equivalente a un pixel en un objeto 2D) que puede sobrevivir sin vasos sanguíneos es un cubo de 0.2 mm de lado ($V = 8 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$) [134]. Siguiendo el criterio de la regla de 10, la cantidad

mínima de células de un esferoide u organoide que representa la función fisiológica de un órgano son 56,000 células (es decir, la cantidad de células en 10 unidades funcionales de tejido).

La regla de 10 también se utiliza para calcular la densidad de sembrado mínima para generar tejido *in vitro*. La densidad de sembrado mínima en tejidos generados *in vitro* corresponde al 10% de la densidad celular promedio de un tejido fisiológico (7×10^7 células/cm³). El cultivo de tejidos *in vitro* con densidades celulares equivalente al 10% de la densidad celular fisiológica promedio presenta características similares a las del tejido nativo [135], [136].

Se calculó la cantidad de células a sembrar en el andamio cuyas dimensiones eran 5 mm de diámetro y 1.5 mm de espesor y cuya densidad celular debía ser 7×10^7 células/cm³.

7.4.2 Cálculo del flujo de operación del biorreactor

Para calcular el flujo de operación del biorreactor se realizó un balance de materia en estado estacionario para el flujo molar de oxígeno en el constructo considerando lo siguiente

1. El andamio es isotérmico. No hay gradientes de temperatura en el andamio. Puesto que los parámetros cinéticos y reacciones celulares dependen fuertemente de la temperatura.
2. La difusividad del oxígeno en el andamio es constante e independiente de la concentración del oxígeno.
3. La distribución celular es uniforme en el andamio.
4. El oxígeno no reacciona con el medio de cultivo, tampoco con el andamio.
5. La tasa de consumo de oxígeno celular es constante.
6. Los CMRN consumen todo el oxígeno que entra al constructo. Hay entrada de oxígeno, pero no salida.

El valor de la tasa específica de consumo de oxígeno (q_o) de células cardíacas se consultó en la literatura. Existen reportados 2 valores de q_o para cardiomiocitos ventriculares.

$$q_o = 5.44 \times 10^{-8} \text{ nmol O}_2/\text{célula} \cdot \text{s} \quad [137]$$

$$q_o = 3.8 \times 10^{-8} \text{ nmol O}_2/\text{célula} \cdot \text{s} \text{ y } 1.4 \times 10^{-7} \text{ nmol O}_2/\text{célula} \cdot \text{s} \text{ para CMs con actividad contráctil} \quad [134]$$

De éstos se utilizó el valor de mayor magnitud, 1.4×10^{-7} nmol O₂/célula*s, lo cual supone el elevado consumo de oxígeno de las células cardíacas. Se tomó el valor de mayor magnitud para asegurar que el cálculo del flujo de perfusión no minimiza el consumo de oxígeno en el constructo.

La concentración de saturación de oxígeno en el medio por efectos de la presión del aire del ambiente (20% O₂) es 2.2×10⁻⁴ mol O₂/L [12] y la concentración de oxígeno crítica de células cardíacas es 0.08 mM (8×10⁻⁵ mol O₂/L) [138].

7.4.3 Transferencia de masa por convección

Se calculó el número de Reynolds y se consideró que tiene el mismo valor en el flujo de las mangueras y en el flujo de la cámara de cultivo. En seguida se calculó el número de Schmidt (Sc) y el número de Sherwood (Sh). Los números Re, Sc y Sh permitieron calcular el número de Stanton (St) que a la vez permitió calcular el coeficiente promedio de transferencia de masa convectiva ecuación (1).

$$St = \frac{h_{masa}}{v} \quad (1)$$

Donde h_{masa} es el coeficiente promedio de transferencia de masa por convección en m/s y v es la velocidad del flujo en m/s.

En seguida se calculó la velocidad de transferencia de O₂ desde el medio al constructo.

7.4.4 Estrés hidrodinámico generado por el flujo de operación

La perfusión del medio de cultivo genera cierto esfuerzo cortante que es experimentado por los CMRN. Un esfuerzo cortante de ~1 dina/cm² induce alienación y estiramiento en las células cardíacas [139] pero un esfuerzo cortante ≥ 2.4 dina/cm² desencadena vías de señalización que conducen a apoptosis celular [84]. Por tal razón se buscó que el esfuerzo cortante generado por el flujo tuviera un valor mayor o igual a 1 dina/cm² pero menor o igual a 2.4 dina/cm².

Se utilizó la metodología reportada por Radisic M. *et al* (2008) [12] para calcular el esfuerzo cortante generado por el flujo de perfusión.

Primero, se calculó la velocidad promedio del fluido a través del andamio, U , con la siguiente ecuación.

$$U = \frac{2rQ}{\varepsilon V} \quad (2)$$

Donde r , es el radio del andamio, Q es el flujo volumétrico en, ε es el porcentaje de porosidad el andamio y V es el volumen del andamio en cm³. Esta ecuación tiene la misma forma que la ecuación de la tasa de flujo volumétrico en una tubería, $Q = Av$ donde $v=Q/A$, sin embargo, en la ecuación 2 hay un término en el numerador que representa el camino tortuoso del fluido ($2r$) a través del andamio poroso, y un término en el denominador que representa la porosidad del andamio ($\varepsilon \cdot V$).

El esfuerzo cortante experimentado por las células dentro del andamio se calculó con la siguiente ecuación que está basada en el flujo de Poiseuille donde se considera el medio de cultivo como un fluido newtoniano.

$$\tau = \eta \frac{4U}{R} \quad (3)$$

Donde η es la viscosidad dinámica del medio de cultivo calculada con la ecuación de Vand, U es la velocidad media del fluido entre cada poro y R es el radio medio de los poros del andamio.

Ecuación de Vand.

$$\eta = \eta_L (1 + 2.5\phi + 7.25 \phi^2) \quad (4)$$

donde η_L es la viscosidad del diluyente 1.002×10^{-2} (dina*s)/cm² que se considera que es agua para medio de cultivo M199 y ϕ es la fracción de sólidos. Se ha reportado que la fracción de sólidos en medios de cultivo es ~14 % [140].

También se calculó el esfuerzo cortante experimentado en la superficie del andamio para lo cual se utilizó la metodología reportada por Boycott *et al.* (2013) [82].

$$\tau = \frac{4\mu Q}{\pi \times r^3} \left(\frac{\text{dina}}{\text{cm}^2} \right) \quad (5)$$

Donde τ (dina/cm²) es el esfuerzo cortante, Q es el flujo de alimentación, μ es la viscosidad dinámica del medio de cultivo y r es el radio interno de la manguera de alimentación.

7.4.5 Transferencia de masa interna

Se cálculo el módulo de Thiele para conocer si había limitaciones de transferencia de masa interna en el constructo. Se utilizó la ecuación general del Módulo de Thiele observable.

$$\phi = \left(\frac{V}{S} \right)^2 \left(\frac{r_{obs}}{D_e \cdot O_m} \right) \quad (6)$$

Donde ϕ es el módulo de Thiele observable, V es el volumen del constructo, S es el área superficial del constructo, r_{obs} es la velocidad de reacción del oxígeno, D_e es la difusividad efectiva del oxígeno en el hidrogel de alginato-quitosano y O_m es la concentración de oxígeno del medio de cultivo.

7.5 CULTIVO DE CARDIOMIOCITOS DE RATA NEONATAL

El cultivo primario de CMRN se realizó en el Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

Se utilizaron camadas de ratas Wistar neonatales (1-3 días). Los procedimientos se realizaron siguiendo las normas mexicanas de cuidado y uso de animales de laboratorio: NOM-062-ZOO-1999 y NOM-033-ZOO-1995.

El procedimiento consistió de la extracción del corazón, disgregación mecánica y enzimática, recuperación celular y sembrado. Para la extracción del corazón se limpió la cabeza y el torso del neonato con etanol al 70 % (v/v), se cortó la cabeza y se extrajo el corazón. Se retiraron las aurículas, las válvulas, el pericardio.

Para la disgregación mecánica y enzimática, los ventrículos se cortaron a la mitad, se lavaron de 10 a 15 veces con solución Hank fría y se cortaron en finos trozos. Enseguida, el tejido se pasó a un matraz Erlenmeyer de 25 mL, se añadió 10 mL de tripsina 0.125 % atemperada a 37 °C y se realizaron 3 ciclos de disgregación enzimática (20 minutos de incubación a 37°C + 5 minutos de agitación lenta). En cada ciclo se recuperaron 7 mL de la suspensión celular y se filtraron con un filtro de 70 µm, después se agregó el mismo volumen de tripsina 0.125 % al matraz Erlenmeyer.

Al finalizar los 3 ciclos de disgregación enzimática se añadió el mismo volumen de neutralizador de tripsina a la suspensión celular. En seguida se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se recuperó el botón y se añadieron 3 mL de medio M199 suplementado (10% SFB, 5% HS, 1% antibiótico) atemperado a 37 °C. La suspensión celular se vertió en una caja Petri sin gelatina (preplaqueo) durante 90 min. Después se recuperó la suspensión y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. El botón se resuspendió en 3 mL de medio M199 suplementado y se realizó el conteo celular. Finalmente, los CMRN fueron sembrados en los andamios y en una caja de cultivo celular de 6 pozos con gelatina (control). Los andamios se colocaron en cajas de cultivo celular de 96 pozos. Se realizó cambio de medio cada 24 h. Los constructos fueron cultivados 3 días en condiciones de cultivo estático seguidos de 4 días en el biorreactor.

7.6 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Inmediatamente después de retirar los constructos del biorreactor se realizaron 3 lavados con PBS para retirar el exceso de medio y se fijaron con formaldehído al 4% durante 24 h. En seguida se realizaron 3 lavados con PBS de 30 minutos cada uno, se deshidrataron en una serie de etanoles: etanol al 40% (30 minutos, x1), etanol al 50% (30 min, x1), etanol al 60% (30 minutos, x1), etanol al 70% (12 h, x1), etanol al 80% (30 min, x1), etanol al 90% (30 min, x1), etanol al 96% (30 min, x2), etanol absoluto (30 min, x1), etanol-xileno (30 min, x1), xileno (30 min, x2) y se incluyeron en parafina a 60 °C durante 1 h. Los constructos fueron ordenados en un

histoarreglo y se realizaron cortes de 5 µm que se premontaron en portaobjetos tratados con silano.

7.6.1 Tinción Hematoxilina - Eosina

Se realizó la tinción con hematoxilina y eosina de tal manera que las estructuras celulares fueran visibles al microscopio. Las laminillas fueron procesadas de la siguiente manera: xilol (10 minutos, x1), etanol absoluto (10 minutos, x1), etanol-éter (2 minutos, x1), etanol al 96 % (2 minutos, x1), etanol al 70% (2 minutos,x1), agua destilada (lavado, x1), hematoxilina (4 minutos, x1), agua de grifo (lavado, x1), etanol-ácido (lavado, x1), agua destilada (lavado, x1), solución Scott (8 minutos, x1), agua destilada (lavado, x1), eosina (40 segundos, x1), agua destilada (lavado, x1), etanol al 96% (lavado rápido, x1), etanol absoluto (lavado rápido, x1), xileno (tiempo necesario, x1). Al final se realizó el montaje con Entellan.

7.6.2 Inmunohistoquímica

Se realizó la estandarización inmunohistoquímica para los siguientes anticuerpos Troponina T (TnT), Conexina 43 (Cx43) y tropomiosina (TPM). En los tres casos se llevó a cabo el siguiente procedimiento: desparafinado, hidratación, recuperación antigénica, eliminación de peroxidasa endógena, bloqueo de uniones específicas, incubación de anticuerpo primario, incubación de anticuerpo secundario, revelado con diaminobencidina (DAB), contratinción, montaje (Tabla 6).

Tabla 6. Estandarización de marcadores cardíacos

Paso	Tiempo	Ciclos
Desparafinar	60 min	1
Xileno	5 min	3
Etanol absoluto	5 min	2
Etanol 96°	5 min	2
Etanol 70°	5 min	1
Agua destilada	5 min	1
Recuperación de antígenos Con buffer de citrato de sodio pH 6 (0.01 %)		
Lavado PBS+Tween 20	5 min	3
Bloqueo de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno H ₂ O ₂	30 min	1
Lavado PBS+Tween 20	5 min	3
Bloqueo de uniones inespecíficas con albúmina 4%	60 min	1
Lavado PBS+Tween 20	5 min	1
Incubar con anticuerpo primario a 4°C Tropomiosina SC-74480 1:150	1 noche	1
Lavado PBS+Tween 20	5 min	3
Incubar con anticuerpo. secundario	2 horas	1
Revelado con DAB Lavado con PBS	2 min	2
Contratinción con Hematoxilina	1 min	1
Lavar con agua de grifo	10 segundos	1
Etanol 70°	3 min	1
Etanol 96°	3 min	1
Etanol absoluto	3 min	1
Xileno	3 min	1
Montaje con Entellan		

7.6.3 Morfometría celular y expresión de marcadores cardíacos.

Las laminillas de los histoarreglos fueron escaneadas y digitalizadas con el microscopio digital Aperio ScanScope con los objetivos 20X y 40X con apoyo de la Unidad de Investigación en Enfermedades Hematooncológicas del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Se midió el área celular (μm^2) y se cuantificó la expresión de los marcadores cardíacos (intensidad total/ μm^2) con el visualizador de imágenes ImageScope.

Análisis estadístico

El análisis estadístico y las gráficas fueron realizados con el paquete estadístico GraphPad Prism 7. Para comparar las diferencias entre los grupos se realizó un ANOVA de un factor seguida de una prueba post hoc de Tukey con un valor de significancia de $p < 0.05$. Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media (ESM).

8 RESULTADOS

8.1 PRUEBA DE ESTERILIDAD DEL BIORREACTOR

El biorreactor fue ensamblado correctamente y operó durante 7 días continuos sin fugas. El caldo nutritivo del reservorio no mostró cambio de coloración al final del cultivo y conservó el mismo aspecto que tenía cuando fue retirado estéril de la autoclave.

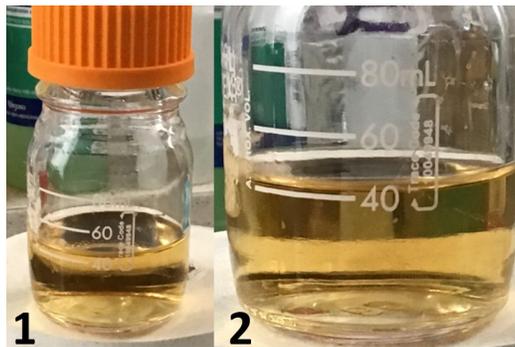


Figura 13. Caldo nutritivo del biorreactor. El caldo nutritivo del día 7 tenía la misma apariencia que tenía al momento de sacarlo de la autoclave. 1) Caldo nutritivo al día 7. 2) Caldo nutritivo al día 1 (inmediatamente después de sacarlo de la autoclave).

Las placas sembradas con alícuotas de caldo nutritivo tomadas del biorreactor no mostraron evidencia de formación de colonias a los 5 días ni a los 10 días, momento en el que fueron desechadas (Figura 14).

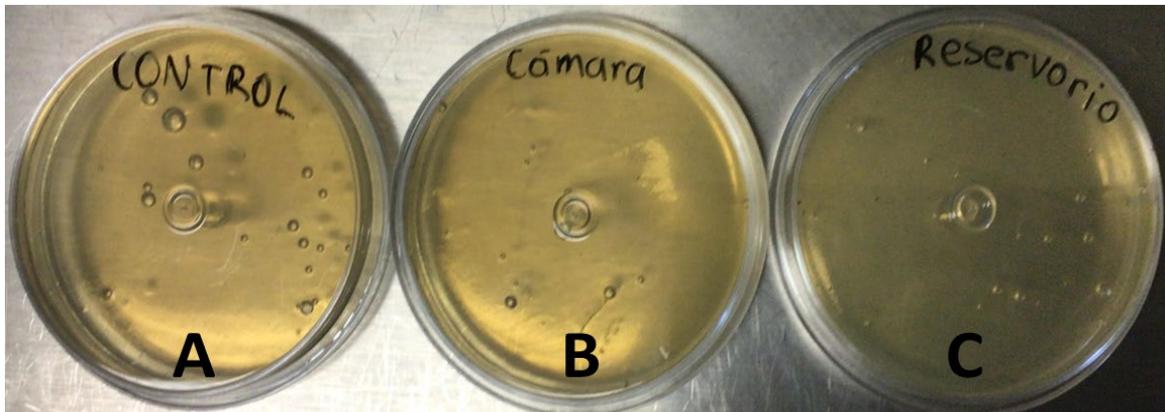


Figura 14. Placas de agar sembradas con alícuotas de caldo nutritivo del biorreactor. Al día 5 no había evidencia de formación de colonias o contaminación. A) Control, B) Cámara de cultivo, C) Reservorio. Los círculos presentes en las placas son burbujas de aire formadas durante la elaboración de las placas.

Las placas de la segunda prueba de esterilización (con medio M199 suplementado) no mostraron evidencia de contaminación o formación de colonias, excepto la placa control positivo (Figura 15). Donde la presencia de colonias de bacterias se confirmó a simple vista.

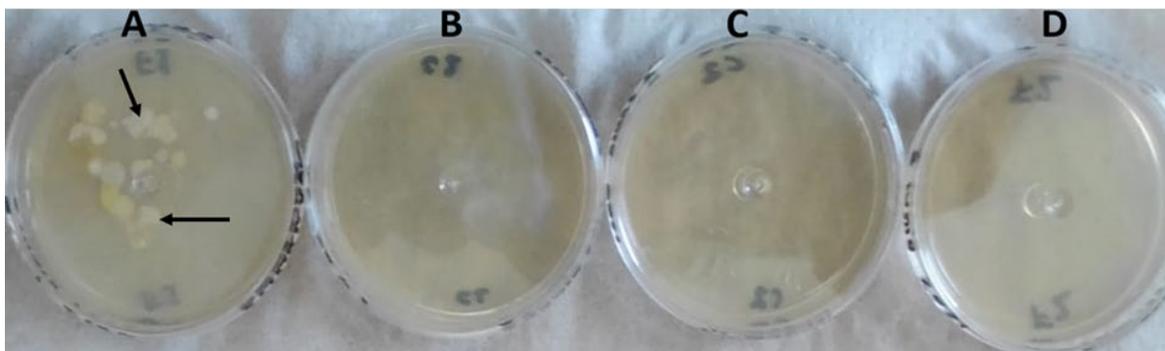


Figura 15. Placas de agar (día 7) sembradas con alícuotas de medio M199 suplementado tomadas del biorreactor. A) Control positivo, B) Control negativo, C) Cámara de cultivo, D) Reservorio. Las placas B, C y D permanecieron libres de colonias. En la placa A se observan colonias de bacterias.

Estos resultados indicaron que el biorreactor operó en condiciones de esterilidad durante 7 días continuos en una incubadora de cultivo celular (37° C, 5% CO₂).

8.2 GENERACIÓN DE NP AU Y NP AU+ALG.

Se generó un lote de nanopartículas cuyas características físicas se resumen en la Tabla 7. De acuerdo con el potencial Z, las Np Au+Alg son más estables que las Np Au. Valores altos de potencial Z, tanto negativo como positivo, indican que las nanopartículas son estables, mientras que un potencial Z bajo, indica que las nanopartículas tienden a aglomerarse. Los valores cercanos a 0 del índice de

polidispersidad (IPD) de ambos tipos de nanopartículas indican homogeneidad de tamaños en ambos tipos de nanopartículas.

Tabla 7. Características físicas de Np Au y Np Au+Alg

Tipo de Np	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)	IPD
Au	83.13±0.83	-16.1±1	0.29±0.005
Au+Alg	88.36±0.85	-36±0.81	0.27±0.006

Valores del IPD cercanos a 0 indican que las Np tienen homogeneidad de tamaño y valores cercanos a 1 indican que las Np tienen gran variedad de tamaño.

8.3 GENERACIÓN DE ANDAMIOS DE ALGINATO-QUITOSANO (0.75-1.25 %P/V)

Se elaboraron 2 lotes de andamios de alginato-quitosano (0.75-1.25 % p/v). Cada lote tenía 48 andamios con las siguientes dimensiones: ~13 mm de diámetro y ~1.5 mm de grosor (Figura 16). Los andamios utilizados en el cultivo de CMRN fueron cortados en círculos de 5 mm de diámetro. Éstos fueron colocados en un tubo de 1.5 mL, se añadió 1 mL de solución de nanopartículas y se esterilizaron con luz UV durante 4 h inmediatamente antes de realizar el sembrado de CMRN.



Figura 16. Andamios de alginato-quitosano 0.75-1.25 % p/v elaborados en la UAM Cuajimalpa

8.4 CONDICIONES DE OPERACIÓN DEL BIORREACTOR

El cultivo de CMRN se llevó a cabo con un par de flujos de perfusión y un par de estímulos eléctricos que fueron calculados y consultados en la literatura, respectivamente.

8.4.1 Cálculo de la cantidad de células a sembrar

De acuerdo con el criterio de la regla de 10 la densidad de sembrado para el desarrollo de tejidos *in vitro* debe aproximarse al 10% ($\sim 7 \times 10^7$ células/cm³) de la densidad celular promedio del tejido fisiológico [134]. Se calculó el volumen del andamio y se calculó la cantidad de células a sembrar.

Dimensiones del andamio

Diámetro = 5 mm

Altura = 1.5 mm

Volumen del andamio: $V = \pi \times r^2 \times h$ (7)

Densidad de sembrado: $\rho_{celular} = \frac{\# \text{ células}}{V_{constructo}}$ (8)

células a sembrar: $\# \text{ células} = \rho_{celular} \times V_{constructo}$ (9)
 $V = 0.029 \text{ cm}^3$

Al sustituir los valores de $\rho_{celular}$ y $V_{constructo}$ en la ecuación (9)

$$\# \text{ células a sembrar} = 7 \times 10^7 \frac{\text{células}}{\text{cm}^3} \times 0.029 \text{ cm}^3$$

$$\text{Cantidad de células a sembrar} = 2,030,000 \text{ células}$$

De acuerdo con el cálculo anterior los andamios deben sembrarse con $\sim 2 \times 10^6$ células.

8.4.2 Cálculo del flujo de operación del biorreactor

El esquema de la Figura 17 representa el constructo poroso sometido al flujo de perfusión donde se lleva a cabo la transferencia de masa por convección liquido-sólido.

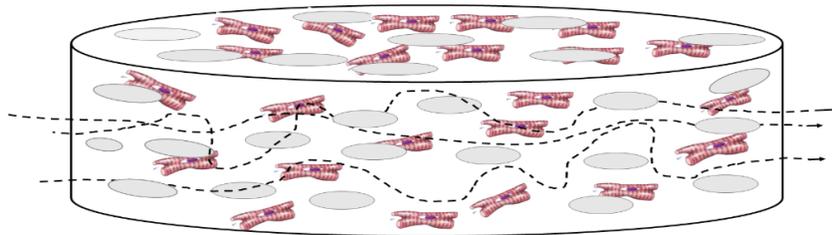


Figura 17. Esquema del constructo cardíaco sometido al flujo de perfusión.

Se realizó un balance general de materia en estado estacionario en el constructo en términos del flujo molar del oxígeno, \dot{n}_{O_2} (mol O₂/s).

$$\text{Entrada} - \text{Salida} + \text{Generación} - \text{Consumo} = 0 \quad (10)$$

$$(\dot{n}_{O_2})_{\text{que entra al constructo}} - (\dot{n}_{O_2})_{\text{que sale del constructo}} + (\dot{n}_{O_2})_{\text{que se genera en el constructo}} - (\dot{n}_{O_2})_{\text{que se consume en el constructo}} = 0 \quad (11)$$

Considerando que:

El flujo molar de O_2 en la entrada del constructo es igual al producto del flujo de perfusión y la concentración de oxígeno en el medio:

$$\dot{n}_{O_2 \text{ que entra al constructo}} = f \times [O_2]_{\text{medio}}$$

Las células agotan todo oxígeno que entra al constructo. Por lo tanto, no existe un flujo molar de oxígeno en la salida del constructo. Esto no significa que el medio circundante y el medio del reservorio se quedan sin oxígeno. El constructo tampoco carece de oxígeno porque en todo momento existe un flujo molar de oxígeno en la entrada.

$$\dot{n}_{O_2 \text{ que sale del constructo}} = 0$$

No existe mecanismo alguno por el cual se genera O_2 en el constructo:

$$\dot{n}_{O_2 \text{ que se genera en el constructo}} = 0$$

El flujo molar de consumo de O_2 es igual al producto de la tasa específica de consumo de oxígeno de células cardíacas y la cantidad de células sembradas:

$$\dot{n}_{O_2 \text{ que se consume en el constructo}} = q_o \times X$$

En estado estacionario no hay acumulación, por lo tanto, la ecuación (10) se iguala a cero.

Se considera que la concentración de O_2 en el medio de cultivo, cuyo volumen es constante durante el tiempo de cultivo (4 días), permanece constante, de esta manera el flujo de perfusión no requiere ajustarse en función del tiempo para suministrar el oxígeno demandado por el constructo. Si la concentración de O_2 del medio disminuyera con el tiempo el flujo tendría que incrementar de manera proporcional al agotamiento de O_2 . Se considera que la disminución de O_2 en el medio (consumido por las células) es recuperado con el O_2 del aire que se disuelve en el medio.

Al reescribir la ecuación (11) tenemos una expresión que indica que el flujo molar de O_2 que entra al constructo es igual al flujo molar de oxígeno consumido por las células del constructo.

$$(\dot{n}_{O_2})_{\text{que entra al constructo}} - (\dot{n}_{O_2})_{\text{que se consume en el constructo}} = 0 \quad (12)$$

que es equivalente a

$$f \times [O_2]_{\text{medio}} = q_o \times X \quad (13)$$

La manipulación algebraica de la ecuación (13) permite obtener una expresión para el flujo de perfusión en función del flujo molar de oxígeno consumido y la concentración de oxígeno en el medio.

$$f = \frac{q_o \times X}{[O_2]_{\text{medio}}} \quad (14)$$

Al sustituir los valores de q_o , $[O_2]_{\text{medio}}$ y X en la ecuación (14). La cantidad de células sembradas fue 1×10^6 células debido a la necesidad de generar constructos por triplicado.

$$q_o = 1.4 \times 10^{-16} \text{ mol } O_2/\text{célula} \times \text{s} \quad [134]$$

$$[O_2] = 2.2 \times 10^{-4} \text{ mol/L} \quad [141]$$

$$X = 1 \times 10^6 \text{ células}$$

$$f = \frac{\frac{1.4 \times 10^{-16} \text{ mol}}{\text{célula} \cdot \text{s}} \times \frac{1 \times 10^6 \text{ células}}{1}}{\frac{2.2 \times 10^{-4} \text{ mol}}{\text{L}}} = 0.04 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$$

Flujo de operación del biorreactor = 0.04 mL/min

A continuación, se calcula la transferencia de O_2 en el constructo, (\dot{n}_{O_2} que entra al constructo) considerando un sistema de transferencia de masa líquido-sólido.

8.4.3 Transferencia de masa por convección

Se calculó la transferencia de masa por convección en el constructo con la siguiente ecuación

$$\dot{m}_{\text{conv}} = h_{\text{masa}} A_s ([O_2]_m - [O_2]_s) \quad (15)$$

donde

\dot{m}_{conv} = razón de transferencia de O_2 hacia el constructo (mol O_2 /s)

h_{masa} = coeficiente promedio de transferencia de O_2 (m/s)

A_s = área superficial del constructo (m^2)

$[O_2]_m$ = concentración de O_2 en el medio (mol O_2 /L)

$[O_2]_s$ = concentración de O_2 en la superficie del constructo (mol O_2 /L)

El área superficial del constructo, A_s , susceptible a la transferencia de masa por convección es la suma del área de la cara superior y la cara lateral del constructo,

el cual se considera un cilindro aplanado. Se considera que la cara inferior del constructo (base) no participa en la transferencia de masa porque está en contacto con el suelo de la cámara de cultivo y no se ve sometida al flujo de perfusión. Por lo tanto, $A_s = 2\pi rh + \pi r^2$.

Se considera que la concentración de O_2 en la superficie del constructo tiene un valor igual a la concentración crítica de oxígeno de las células cardíacas, $8 \times 10^{-5} \text{ mol } O_2/L$. Debido a que el constructo debe mantener en todo momento una concentración de oxígeno \geq concentración crítica de oxígeno de las células cardíacas, para evitar muerte celular.

El valor de h_{masa} se calcula a partir de correlaciones expresadas con números adimensionales para la transferencia de masa por convección forzada. Para ello se calculan los siguientes números adimensionales: Reynolds (Re), Schmidt (Sc), Sherwood (Sh) y Stanton (St).

Número de Reynolds

$$Re = \frac{\rho V D_i}{\mu} \quad (16)$$

V = velocidad del fluido (cm/s)

D_i = diametro interno de la manguera: 1.6 mm (0.16 cm)

ρ = densidad del medio de cultivo, se considera $\left(1 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}\right)$

μ = viscosidad dinámica del medio, $\left(0.015 \frac{\text{dina} \times \text{s}}{\text{cm}^2}\right)$, $0.015 \frac{\text{g}}{\text{s} \times \text{cm}}$

Se calcula la velocidad lineal del flujo en la manguera, y se considera que el medio fluye en la cámara de cultivo con una velocidad igual a la velocidad de la manguera.

$$Q = V \times A \quad (17)$$

Q = flujo $\left(\frac{\text{cm}^3}{\text{s}}\right)$

V = velocidad del fluido $\left(\frac{\text{cm}}{\text{s}}\right)$

A = área transversal de la manguera (cm^2)

Al manipular algebraicamente la ecuación (17) y sustituir los valores

$$V = \frac{6.66 \times 10^{-4} \frac{\text{cm}^3}{\text{s}}}{\pi \times (0.08 \text{ cm})^2} = 0.033 \frac{\text{cm}}{\text{s}}$$

Luego, de la ecuación (16)

$$Re = \frac{1 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \times 0.033 \frac{\text{cm}}{\text{s}} \times 0.16 \text{ cm}}{0.015 \frac{\text{dina} \times \text{s}}{\text{cm}^2}} = 0.352$$

$$Re = 0.352$$

De acuerdo con el rango de valores para el número de Reynolds, el biorreactor opera con flujo laminar (Flujo laminar: $Re \leq 2300$, flujo turbulento: $Re \geq 4000$).

Número de Schmidt

$$Sc = \frac{\mu}{\rho D_e} \quad (18)$$

Sustituyendo valores en la ecuación (18) y considerando la difusividad del O_2 en hidrogeles de alginato, $1.88 \times 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$ [142].

$$Sc = \frac{0.015 \frac{\text{dina} \times \text{s}}{\text{cm}^2}}{1 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \times 1.88 \times 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}} = 798$$

$$Sc = 798$$

Número de Sherwood

Dado que la geometría del constructo (cilindro aplanado) implica que la mayor transferencia de masa ocurre a través de su cara superficial, se utiliza la relación del número de Sherwood para convección forzada sobre una placa plana

$$Sh = 0.664 Re^{0.5} Sc^{1/3} \quad (19)$$

La ecuación (19) es válida para $Sc > 0.5$ y $Re < 5 \times 10^5$.

Sustituyendo valores en la ecuación (19)

$$Sh = 0.664 (0.352)^{0.5} (798)^{1/3} = 3.65$$

$$Sh = 3.65$$

Número de Stanton

$$St = \frac{Sh}{Re Sc} \quad (20)$$

Sustituyendo valores en la ecuación (20)

$$St = \frac{3.65}{0.352 \times 798} = 0.013$$

$$St = 0.013$$

Y de la ecuación (1), $St = \frac{h_{masa}}{V}$, donde V es la velocidad el flujo, en m/s:

$$h_{masa} = 0.013 \times 3.3 \times 10^{-4} \text{ m/s} = 4.29 \times 10^{-6} \text{ m/s}$$

$$h_{masa} = 4.29 \times 10^{-6} \text{ m/s}$$

Al sustituir valores en la ecuación (15) para calcular la tasa de transferencia de oxígeno desde el medio al constructo por efectos de un flujo de perfusión de 0.04 mL/min.

$$\dot{m}_{conv} = h_{masa} A_s ([O_2]_m - [O_2]_s)$$

$$\dot{m}_{conv} = 4.29 \times 10^{-6} \frac{\text{m}}{\text{s}} \times 5.1 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \times \left(2.2 \times 10^{-4} \frac{\text{mol O}_2}{\text{L}} - 8 \times 10^{-5} \frac{\text{mol O}_2}{\text{L}} \right) = 3.063 \times 10^{-11} \frac{\text{mol O}_2}{\text{s}}$$

Este valor es equivalente al flujo molar de oxígeno que entra al constructo

$$\dot{n}_{O_2 \text{ que entra al constructo}} = 3.063 \times 10^{-11} \frac{\text{mol O}_2}{\text{s}}$$

Por otra parte, el flujo molar de oxígeno consumido en el constructo es equivalente a $q_o X$.

$$\dot{n}_{O_2 \text{ que se consume en el constructo}} = q_o X = 1.4 \times 10^{-10} \frac{\text{mol O}_2}{\text{s}}$$

Se observa que hay un desbalance entre la velocidad de entrada y la velocidad de consumo de O_2 en el constructo, $\dot{n}_{O_2E} \neq \dot{n}_{O_2S}$, siendo menor el flujo molar de O_2 de entrada que el flujo molar de O_2 consumido por los CMRN en el constructo.

$$3.063 \times 10^{-11} \frac{\text{mol O}_2}{\text{s}} < 1.4 \times 10^{-10} \frac{\text{mol O}_2}{\text{s}}$$

Esto indica que el flujo de perfusión no alcanza a superar la barrera de transferencia de masa líquido-sólido que existe en el constructo para igualar el flujo molar de consumo de O_2 de los CMRN. Por tal razón se proponen 4 flujos de mayor magnitud de los cuales se calcula su velocidad de transferencia de O_2 hacia el constructo (Tabla 8).

Tabla 8. Tasa de transferencia de O₂ hacia el constructo de flujos propuestos

Flujo (mL/min)	Re	Sc	Sh	St	h _{masa} (m/s)	m _{conv} (mol O ₂ /s)
0.04	0.352	798	3.65	0.013	4.29x10 ⁻⁶	3.063x10 ⁻¹¹
0.105	0.93	798	5.93	8x10 ⁻³	6.96x10 ⁻⁶	4.97x10 ⁻¹¹
0.5	4.41	798	12.94	3.67x10 ⁻³	1.52x10 ⁻⁵	1.08x10 ⁻¹⁰
1	8.8	798	18.27	2.6x10⁻³	2.15x10⁻⁵	1.53x10⁻¹⁰
1.5	13.22	798	22.4	2.12x10⁻³	2.63x10⁻⁵	1.87x10⁻¹⁰

Los flujos de 1 mL/min y 1.5 mL/min transfieren oxígeno a una velocidad mayor a la velocidad de consumo de oxígeno de los CMRN y un flujo de 0.5 mL/min ayuda a generar una velocidad de transferencia de oxígeno dentro del mismo orden de magnitud a la velocidad de consumo de oxígeno en el constructo. A continuación, se calcula el esfuerzo cortante asociado a estos flujos.

8.4.4 Estrés hidrodinámico generado por el flujo de operación

Se utilizó la ecuación reportada en [12] para calcular el esfuerzo cortante en el interior del constructo. Como ejemplo se utiliza un flujo de 0.5 mL/min.

$$\tau_{\text{interno}} = \eta \frac{4U}{R} \quad (21)$$

Donde la velocidad promedio del fluido a través del andamio, U, se calculó con la siguiente ecuación

$$U = \frac{2rQ}{\varepsilon V} \quad (22)$$

$$r = 0.25 \text{ cm}$$

$$Q = 0.5 \frac{\text{mL}}{\text{minuto}} = 8.33 \times 10^{-3} \frac{\text{cm}^3}{\text{s}}$$

$$V = 0.0294 \text{ cm}^3$$

$$\varepsilon = 90 \%$$

Sustituyendo valores en la ecuación (22):

$$U = \frac{2 (0.25 \text{ cm}) \left(8.33 \times 10^{-3} \frac{\text{cm}^3}{\text{s}} \right)}{(0.9)(0.0294 \text{ cm}^3)} = 0.157 \frac{\text{cm}}{\text{s}}$$

Luego, sustituyendo los siguientes valores en la ecuación (21):

$$\eta = 0.015 \frac{\text{dina} \times \text{s}}{\text{cm}^2}$$

$$U = 0.157 \frac{\text{cm}}{\text{s}}$$

$$R = 0.005 \text{ cm (50 } \mu\text{m)}$$

$$\tau = 0.015 \frac{\text{dina} \times \text{s}}{\text{cm}^2} \times \frac{4 \left(\frac{0.157 \text{ cm}}{\text{s}} \right)^3}{0.005 \text{ cm}} = 1.89 \frac{\text{dina}}{\text{cm}^2}$$

$$\tau_{\text{interno}} = 1.89 \frac{\text{dina}}{\text{cm}^2}$$

El esfuerzo cortante experimentado en la superficie del constructo se calcula a partir de la siguiente ecuación

$$\tau_{\text{superficial}} = \frac{4\mu Q}{\pi r^3} \quad (23)$$

$$\tau = \frac{4 \times 0.015 \frac{\text{dina} \times \text{s}}{\text{cm}^2} \times 8.33 \times 10^{-3} \frac{\text{cm}^3}{\text{s}}}{\pi \times (0.08 \text{ cm})^3} = 0.3 \frac{\text{dina}}{\text{cm}^2}$$

$$\tau_{\text{superficial}} = 0.3 \frac{\text{dina}}{\text{cm}^2}$$

El esfuerzo cortante generado por un flujo de 0.5 mL/min es menor al esfuerzo cortante máximo reportado para células cardíacas en cultivos *in vitro* (2.4 dina/cm²) [84]. En la Tabla 9 se enlistan los esfuerzos cortantes asociado a los flujos de perfusión propuestos.

Tabla 9. Esfuerzo cortante de flujos propuestos para cultivar CMRN

Flujo (mL/min)	Re	τ_{interno} (dina/cm ²)	$\tau_{\text{superficial}}$ (dina/cm ²)
0.105	0.93	0.4	0.065
0.5	4.4	1.89	0.3
1	8.8	3.7	0.6
1.5	13.2	5.6	0.9

Se observa que el flujo de 0.5 mL/min genera un esfuerzo cortante interno menor al esfuerzo cortante máximo. En cambio 1 mL/min y 1.5 mL/min rebasan el valor máximo: (2.4 dina/cm²) [84].

De acuerdo con el criterio del esfuerzo cortante el flujo de operación del biorreactor debe tener un valor de 0.5 mL/min por lo que se optó utilizar este flujo, a pesar de que su velocidad de transferencia de oxígeno es ligeramente menor a la velocidad de consumo por los CMRN (1.08x10⁻¹⁰ Vs 1.4x10⁻¹⁰). Para comparar 0.5 mL/min se utilizó un flujo de 1.5 mL/min pues este genera una velocidad de transferencia de oxígeno superior a la velocidad de consumo (1.87 x10⁻¹⁰ Vs 1.4 x10⁻¹⁰), sin embargo no se desprecia el hecho de que el esfuerzo cortante es superior al máximo tolerado por células cardíacas (5.6 dina/cm² Vs 2.4 dina/cm²). De esta manera se estará observando el efecto de un flujo que genera un esfuerzo cortante

tolerable por las células, pero con una tasa de transferencia de oxígeno ligeramente menor a la necesaria y el efecto de un flujo que suministra la cantidad suficiente de O₂ pero que es agresivo para las células pues el esfuerzo cortante es alto. En la Tabla 10 se resumen algunas características importantes de los flujos de operación del biorreactor.

Tabla 10. Flujos de operación del biorreactor

Flujo (mL/min)	Re	h_{masa} (m/s)	τ_{interno} (dina/cm ²)	\dot{m}_{conv} (mol O ₂ /s)
0.5	4.4	1.52×10^{-5}	1.89	1.08×10^{-10}
1.5	13.2	2.63×10^{-5}	5.6	1.87×10^{-10}
			Valor máximo: 2.4	Valor necesario: 1.4×10^{-10}

8.4.5 Transferencia de masa interna

De acuerdo con la condición de no deslizamiento de un fluido en movimiento, la velocidad del medio es cero en la superficie del constructo y en virtud de que ambos flujos generan un flujo laminar (Re= 4.4 y 13.2) se puede considerar que la transferencia de O₂ al interior del constructo se da esencialmente por difusión. Por tal razón se calcula el módulo de Thiele para determinar si hay limitaciones de transferencia de masa interna en el constructo.

Se considera la ecuación general del Módulo de Thiele observable

$$\phi = \left(\frac{V}{S}\right)^2 \left(\frac{r_{\text{obs}}}{D_{\text{ef}} \cdot O_s}\right) \quad (24)$$

Donde

ϕ = módulo de Thiele observable

V= volumen del constructo

S= área superficial del constructo

r_{obs} = velocidad de reacción del oxígeno

D_{ef} = difusividad efectiva del oxígeno en el hidrogel

O_s = concentración del oxígeno en la superficie del constructo

$$A_{\text{constructo}} = 2\pi r h + 2\pi r^2 \quad (25)$$

$$V_{\text{constructo}} = \pi r^2 h \quad (26)$$

Al reescribir la ecuación 24 después de sustituir los términos de volumen y área del constructo

$$\phi = \left(\frac{r h}{2h + 2r}\right)^2 \left(\frac{r_{\text{obs}}}{D_{\text{ef}} \cdot O_s}\right) \quad (27)$$

Donde

$$r = 2.5 \text{ mm}, 0.0025 \text{ m}$$

$$h = 1.5 \text{ mm}, 0.0015 \text{ m}$$

$$V = 2.9 \times 10^{-8} \text{ m}^3$$

$$D_e = 1.88 \times 10^{-9} \frac{\text{m}^2}{\text{s}} \quad (1.88 \times 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}) \quad (\text{se considera } D_e \text{ en geles de alginato}) \quad [142]$$

$$O_s = 8 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} = 0.08 \frac{\text{mol}}{\text{m}^3} \quad (\text{se considera la concentración crítica de } O_2 \text{ de CMs})$$

$$r_{\text{obs}} = q_o \times \frac{\# \text{ células}}{V} \quad (28)$$

Al sustituir valores en la ecuación (28):

$$r_{\text{obs}} = \frac{1.4 \times 10^{-16} \text{ mol}}{\text{células} \times \text{s}} \times \frac{1,000,000 \text{ células}}{2.9 \times 10^{-8} \text{ m}^3} = 4.82 \times 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{s} \times \text{m}^3}$$

Luego en la ecuación (27):

$$\phi = \left(\frac{rh}{2h+2r} \right)^2 \left(\frac{r_{\text{obs}}}{D_{\text{ef}} \cdot O_s} \right)$$

$$\phi = \left(\frac{0.0025 \text{ m} \times 0.0015 \text{ m}}{2(0.0015 \text{ m}) + 2(0.0025 \text{ m})} \right)^2 \times \left(\frac{4.82 \times 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{s} \times \text{m}^3}}{1.88 \times 10^{-9} \frac{\text{m}^2}{\text{s}} \times 0.08 \frac{\text{mol}}{\text{m}^3}} \right) = 7.01$$

$$\phi = 7.01$$

De acuerdo con los criterios de Weisz para el módulo de Thiele observable

- Si $\phi < 0.3$, $\eta \sim 1$, y las limitaciones de transferencia interna de masa son insignificantes.
- Si $\phi > 3$, η es sustancialmente < 1 y las limitaciones de transferencia interna de masa son significantes.

Por lo que se espera que la transferencia de oxígeno en el interior del constructo se vea obstaculizada para ambos flujos de operación.

8.5 CULTIVO DE CARDIOMIOCITOS DE RATA NEONATAL

Fueron generados 3 tipos de constructos en 5 cultivos independientes. Los constructos fueron nombrados de acuerdo a las condiciones de cultivo bajo las cuales fueron generados: estático (E), perfusión (P) y perfusión + estimulación eléctrica (EE). Los CMRN fueron cultivados bajo combinaciones de los siguientes parámetros.

Perfusión:

- 1) 0.5 mL/min
- 2) 1.5 mL/min

Estimulación eléctrica

- 1) 3 V, 3 Hz, 2 ms
- 2) 5 V, 1 Hz, 2 ms

Tipo de nanopartícula:

- 1) Np Au
- 2) Np Au+Alg

La Tabla 11 resume los cultivos realizados y presenta los constructos cardíacos generados.

Tabla 11. Constructos cardíacos generados

Cultivo	Tipo	# células sembradas (x10 ⁶)	Nanopartícula	Flujo (mL/min)	Estímulo eléctrico
1	EE	0.4	Au+Alg	0.5	3 V, 3 Hz, 2 ms
	P	0.4	Au+Alg	0.5	
	E	0.4	Au+Alg		
2	EE	1.4	Au+Alg	0.5	3 V, 3 Hz, 2 ms
	P	1.4	Au+Alg	0.5	
	E	1.4	Au+Alg		
3	EE	0.7	Au+Alg	1.5	5 V, 1 Hz, 2 ms
	P	0.7	Au+Alg	1.5	
	E	0.7	Au+Alg		
4	EE	1	Au	0.5	5 V, 1 Hz, 2 ms
	P	1	S/Np	0.5	
	P	1	Au	0.5	
	E	1	Au		
	E	0.6	S/Np		
5	EE	1	Au+Alg	0.5	5 V, 1 Hz, 2 ms
	P	1	Au	0.5	
	P	1	Au+Alg	0.5	
	E	1	Au+Alg		
	E	1	S/Np		
	E	0.5	Au		

EE= eléctrico, P = perfusión, E= estático

El cultivo control (monocapa) de cada cultivo mostró células con actividad contráctil a partir del día 1 hasta el día 7 (Figura 18). En algunos casos la actividad contráctil se mantuvo hasta el día 14, momento en el que se desecharon las placas. En los constructos estáticos se observaron células contráctiles alrededor del fondo del pozo. Las células estaban localizadas en la periferia del andamio y fueron visibles a 20X y 40X con un microscopio invertido. Después de retirar los constructos estáticos del pozo (día 7), quedaron grupos de células con actividad contráctil en el fondo y fueron visibles hasta el día 14, momento en el que las placas fueron desechadas.

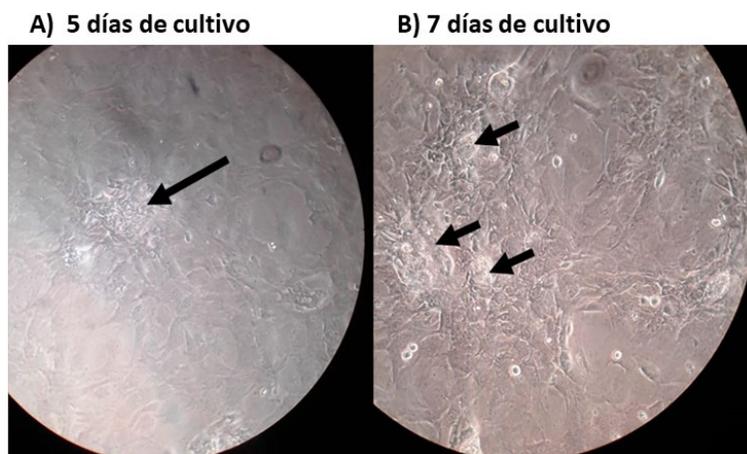


Figura 18. Fotomicrografía representativa de cultivo de CMRN en monocapa. A) Día 5, B) Día 7. Las flechas indican grupos de células con actividad contráctil. Fotomicrografía tomada con microscopio invertido. Objetivo 40X.

8.6 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

El acomodo de los constructos en el histoarreglo permitió examinar las mismas secciones transversales en cada uno de ellos, es decir los cortes fueron realizados a la misma altura (Figura 19). El histoarreglo también eliminó diferencias de tonalidad que suelen existir cuando las muestras se tiñen por separado, especialmente debido a variaciones en los tiempos de tinción con hematoxilina y eosina. El andamio se comportó como acidófilo y adquirió una coloración rojiza. En los constructos generados en condiciones de cultivo estático, la mayoría de las células agrupadas en forma de esferoides (marcas verdes y azules), se localizaron en la periferia del andamio. Únicamente en los constructos generados con perfusión (0.5 mL/min) se observó migración celular a una profundidad radial de $\sim 150 \mu\text{m}$. Los constructos P y EE mostraron integridad estructural indicando que el flujo y la estimulación eléctrica no alteran la estructura del andamio. La flecha en la Figura 19 señala un constructo generado con perfusión y Np Au donde la migración celular hacia el centro del andamio es evidente. El constructo generado con la misma clase de nanopartícula, es decir Np Au, en condiciones de cultivo estático carece de células agrupadas en el centro del andamio. Esto evidencia el efecto de la perfusión sobre el aumento de la densidad celular del constructo que es uno de los objetivos por los cuales se aplica perfusión.

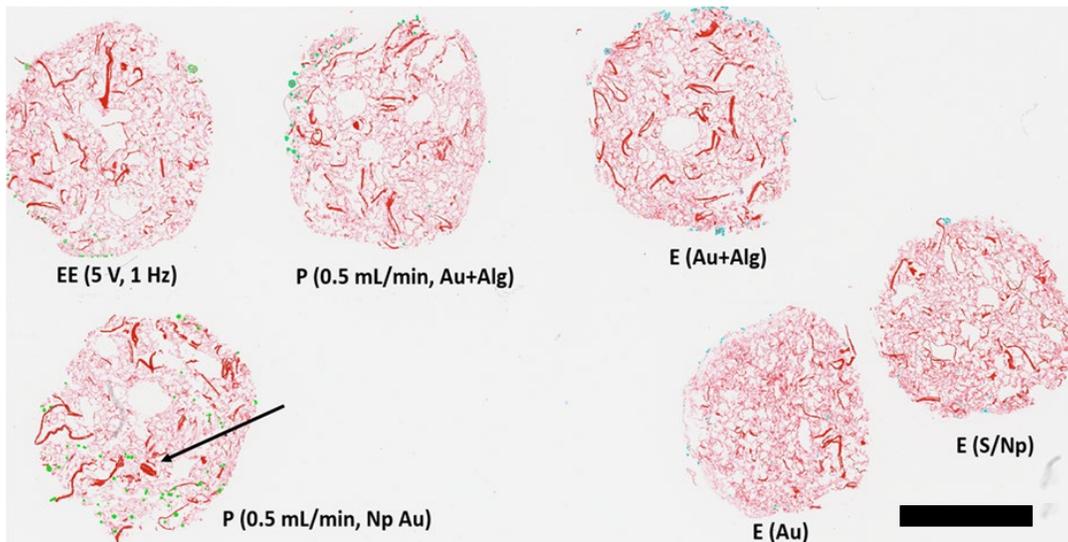


Figura 19. Fotomicrografía representativa de un corte transversal de un histoarreglo de constructos cardíacos. EE=estimulación eléctrica, P= perfusión, E=estático, Au=Nanopartículas de oro, Au+Alg=Nanopartículas de oro, S/Np=sin nanopartículas. Tinción H&E. Barra de escala: 3 mm.

La fotomicrografía de la Figura 20 muestra cortes transversales de esferoides representativos de constructos estáticos generados con y sin nanopartículas. En los 3 casos las células se agruparon en esferoides (considerando la estructura 3D del constructo), sin embargo, únicamente aquellos generados con Np Au+Alg (panel B) y Np Au (panel C) tienen integridad estructural caracterizada por un contorno definido. En los 3 tipos de esferoides se observan puntos de tonalidad oscura (flechas verdes) que sugieren muerte celular por apoptosis, específicamente picnosis, pues la picnosis se caracteriza por una reducción del tamaño del núcleo y una mayor basofilia, sin embargo, el alcance de la tinción H&E no permite aseverar muerte celular. En el esferoide E (Np Au+Alg) los puntos negros están en la región central lo cual podría estar asociado a problemas de transferencia de masa (panel B). Por el contrario, en el esferoide E (Np Au) los puntos negros se localizan en diferentes regiones del esferoide, incluso cerca del borde (panel C). En el esferoide E (Np Au) se observan secciones basófilas amorfas (flecha negra) que podrían indicar núcleos en proceso de desintegración (cariólisis).

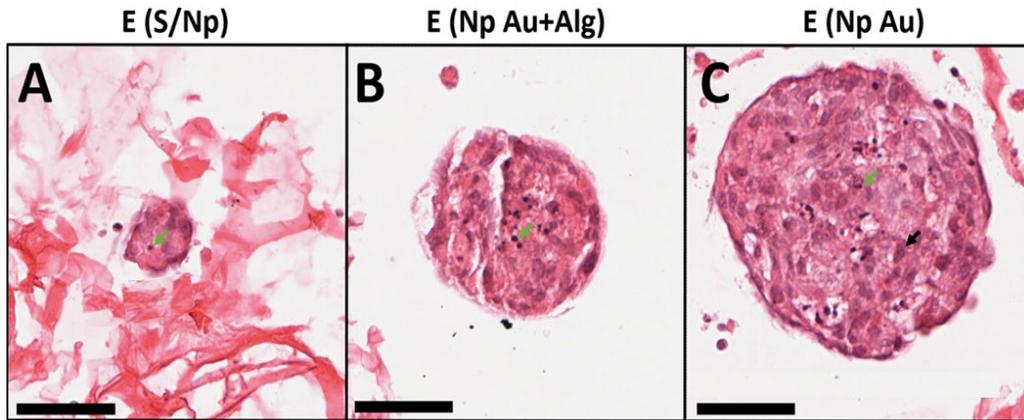


Figura 20. Fotomicrografía representativa de esferoides de CMRN cultivados en estático con diferentes tipos de nanopartículas. H&E, Barra de escala: 50 μm .

La cuantificación del tamaño de los esferoides generados en cultivo estático muestra que las nanopartículas ayudan a generar esferoides de mayor tamaño (Figura 21). Los esferoides generados con Np Au y Np Au+Alg son más grandes que los esferoides generados sin nanopartículas, $1811 \pm 162.9 \mu\text{m}^2$, $1472 \pm 114.6 \mu\text{m}^2$ y $1251 \pm 126.2 \mu\text{m}^2$, respectivamente. Sin embargo, solo existe diferencia estadísticamente significativa entre los tamaños medios de los esferoides E (S/Np) y E (Np Au) (Figura 21).

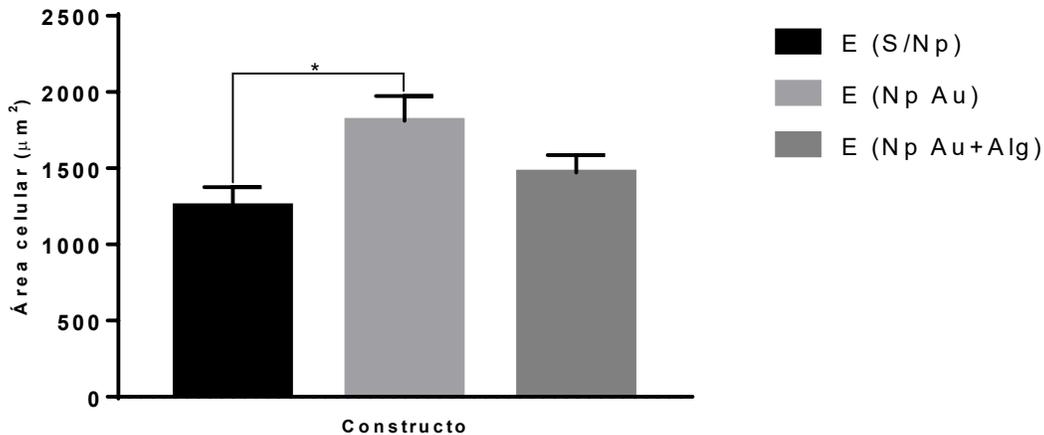


Figura 21. Tamaño medio de esferoides de CMRN en constructos estáticos con diferentes tipos de nanopartículas. $p \leq 0.05$. *diferencias estadísticamente significativas. Media \pm ESM.

En condiciones de cultivo dinámico, los esferoides generados con P (0.5 mL/min, Np Au) y P (1.5 mL/min, Np Au+Alg) tienen una estructura compacta, Figura 22-B y 22-D, respectivamente. Se destaca que los esferoides de los constructos P (1.5 mL/min, Np Au+Alg) son los únicos en los que no se observan puntos negros (Figura 22-D). Por otra parte, en los esferoides generados con P (0.5 mL/min, Np Au+Alg) se observan puntos negros cerca del centro del esferoide (Figura 22-C).

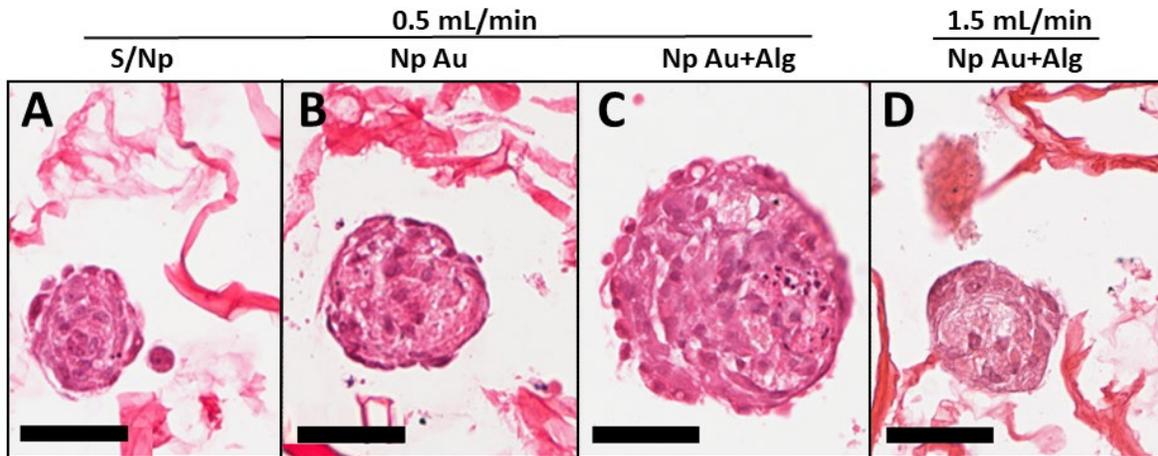


Figura 22. Fotomicrografía representativa de esferoides de CMRN cultivados con perfusión y diferentes tipos de nanopartículas. H&E, Barra de escala: 50 μm .

La cuantificación del área celular muestra un incremento en el tamaño medio de los esferoides de la siguiente manera $P(0.5 \text{ mL/min, Au+Alg}) > P(0.5 \text{ mL/min, Np Au}) > P(0.5 \text{ mL/min, S/Np})$, cuyas magnitudes son $1979 \pm 325.1 \mu\text{m}^2$, $1531 \pm 130.9 \mu\text{m}^2$ y $920.1 \pm 120.5 \mu\text{m}^2$, respectivamente (Figura 23). Se observa que $P(0.5 \text{ mL/min, Au+Alg})$ genera esferoides significativamente más grandes que $P(0.5 \text{ mL/min, Sin/Np})$ lo cual evidencia la relevancia de las Np Au+Alg. También se destaca que $P(1.5 \text{ mL/min, Au+Alg})$ genera esferoides significativamente más pequeños ($1023 \pm 99.34 \mu\text{m}^2$ Vs $1979 \pm 325.1 \mu\text{m}^2$) que los generados con $P(0.5 \text{ mL/min, Au+Alg})$ lo cual evidencia la relevancia del flujo de perfusión de 0.5 mL/min.

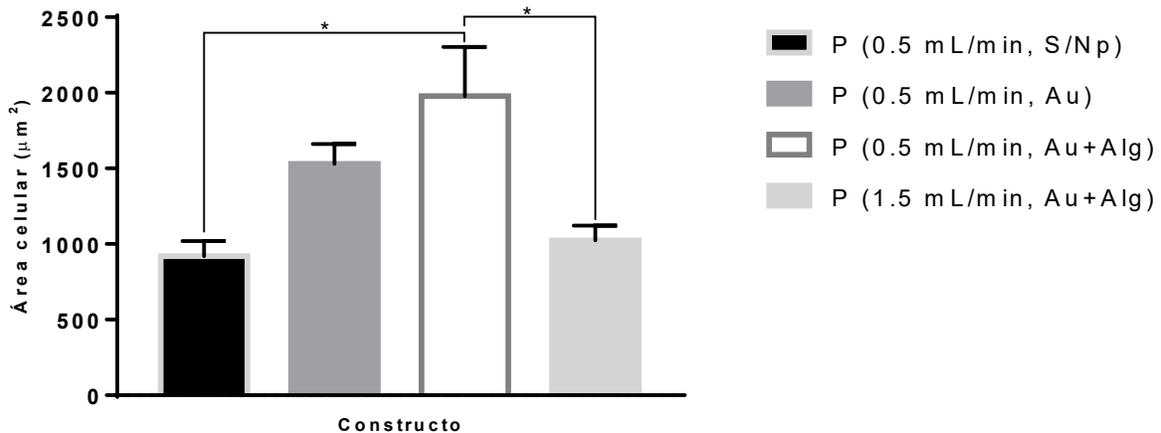


Figura 23. Tamaño medio de esferoides de CMRN en constructos generados con perfusión y diferentes tipos de nanopartículas. $p \leq 0.05$. *diferencias estadísticamente significativas. Media \pm ESM.

En la Figura 24 se muestran esferoides generados con Np Au+Alg en condiciones de cultivo estático y con perfusión. El esferoide generado con 1.5 mL/min (Figura 24-C) está fragmentado en un costado, pero del lado opuesto las células muestran un elevado grado de compactación. Este comportamiento es inverso en el esferoide generado con 0.5 mL/min donde el esferoide es integro, pero no del todo compacto

en su región periférica (Figura 24-B). Por su parte en el esferoide generado en cultivo estático se observan regiones no compactas que inician en la periferia y continúan al centro del mismo (Figura 24-A).

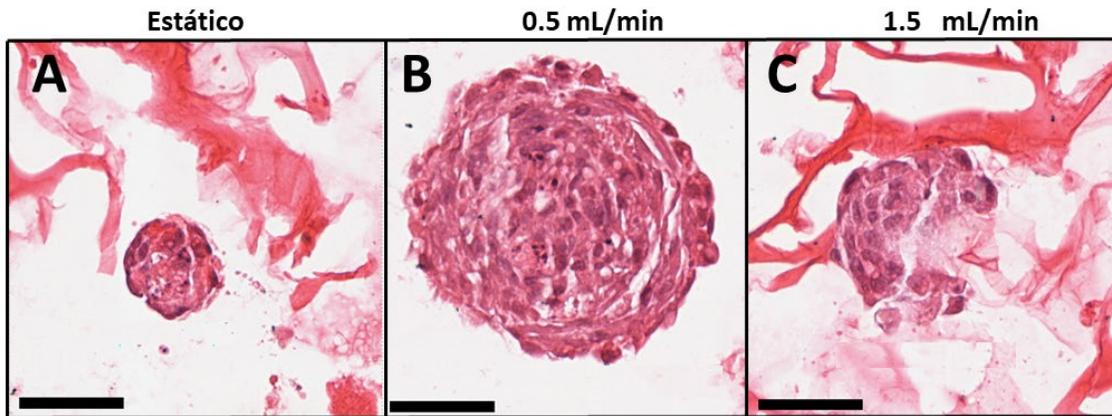


Figura 24. Fotomicrografía representativa de esferoides de CMRN cultivados con perfusión y Np Au+Alg. H&E, Barra de escala: 50 μm

Los esferoides generados con perfusión, P (0.5 mL/min, Au+Alg), son estadísticamente más grandes que los esferoides generados en cultivo estático y que los esferoides generados con P (1.5 mL/min, Au+Alg), ($1979 \pm 325.1 \mu\text{m}^2$ Vs $1309 \pm 153.8 \mu\text{m}^2$ Vs $1023 \pm 99.34 \mu\text{m}^2$), lo cual evidencia la bondad de la perfusión del medio y el efecto perjudicial de someter al constructo a un esfuerzo cortante superior al máximo tolerado por células cardíacas en cultivos *in vitro* (5.6 dina/cm^2 Vs 2.4 dina/cm^2) (Figura 25), es decir cuando son cultivadas con un flujo de 1.5 mL/min.

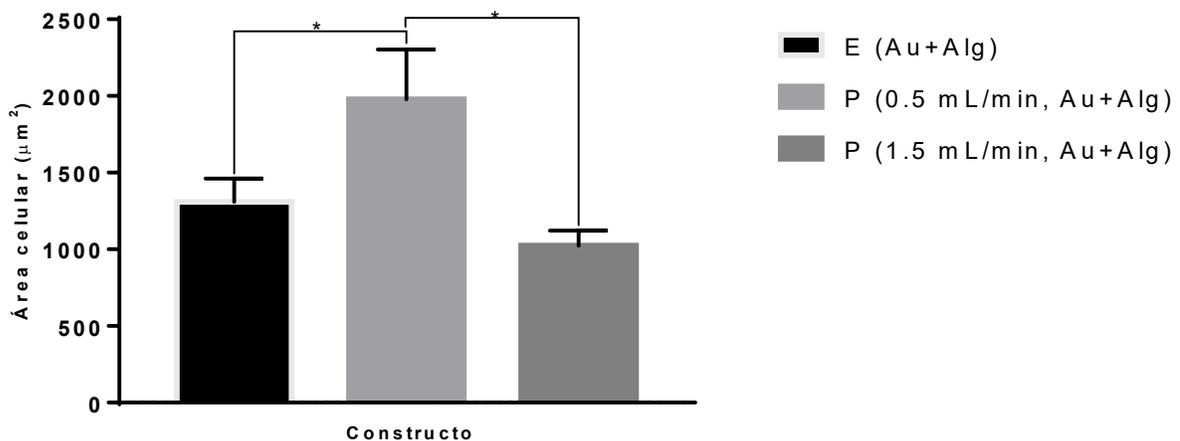


Figura 25. Tamaño medio de esferoides de CMRN en constructos generados con perfusión y Np Au+Alg. $p \leq 0.05$. *diferencias estadísticamente significativas. Media \pm ESM.

En los esferoides generados con estimulación eléctrica se observan núcleos celulares definidos (Figura 26-B y 26-C). Los esferoides generados con 3 V, son

más compactos e íntegros que los esferoides generados con 5 V (Figura 26-C). Estos hallazgos evidencian el efecto de la estimulación eléctrica en la maduración de las células cardíacas, independientemente de su valor. El esferoide generado con 3 V no tiene puntos negros que pueden indicar cariólisis, sin embargo, el esferoide generado con 5 V si los tiene, probablemente debido a su mayor tamaño. En el esferoide generado con 5 V, se distinguen células cuya morfología alargada asemeja a las fibras musculares del tejido muscular cardíaco nativo.

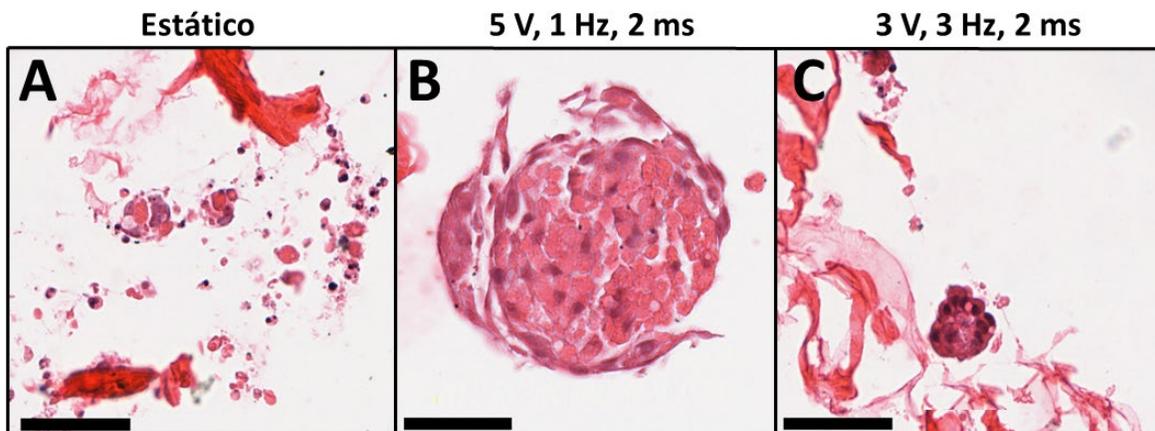


Figura 26. Fotomicrografía representativa de esferoides de CMRN cultivados con estimulación eléctrica (0.5 mL/min, Np Au+Alg). H&E, Barra de escala: 50 μ m.

Los esferoides más grandes generados en este trabajo tienen un tamaño medio de $1979 \pm 325.1 \mu\text{m}^2$ y fueron generados con P (0.5 mL/min, Au+Alg). Por tal razón, la comparación de los estímulos eléctricos se realizó con este flujo y este tipo de nanopartículas (Figura 27). La adición de estimulación eléctrica al cultivo de perfusión redujo el tamaño medio de los esferoides. Se encontró que pulsos eléctricos de 5 V, 1 Hz, 2 ms, ayudan a generar esferoides 3 veces más grandes que pulsos eléctricos de 3 V, 3 Hz, 2 ms ($1594 \pm 275.9 \mu\text{m}^2$ Vs $572 \pm 73 \mu\text{m}^2$), sin embargo, la diferencia de tamaños no es estadísticamente significativa. Se destaca que los esferoides generados con 3 V, 3 Hz, 2 ms son los esferoides de menor tamaño generados en este trabajo con un valor medio de $572 \pm 73 \mu\text{m}^2$.

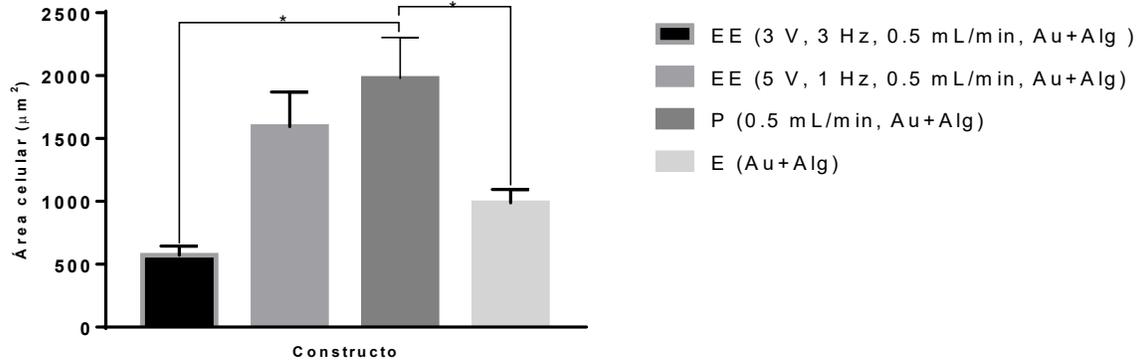


Figura 27. Tamaño medio de esferoides de CMRN en constructos generados con estimulación eléctrica y 0.5 mL/min + Np Au+Alg. $p \leq 0.05$. *diferencias estadísticamente significativas. Media \pm ESM.

En la Figura 28 se muestra la comparación cuantitativa de los tamaños medios de esferoides generados con la combinación del mejor voltaje (5 V), ambos tipos de nanopartículas y ambos flujos de perfusión. Las Np Au+Alg siguen favoreciendo la formación de esferoides de mayor tamaño respecto a las Np Au en cultivos con EE, donde se observa que EE (5 V, 0.5 mL/min, Au+Alg) Vs (5 V, 0.5 mL/min, Au) generan esferoides de tamaño medio de $1594 \pm 276 \mu\text{m}^2$ y $1089 \pm 166 \mu\text{m}^2$, respectivamente, sin diferencia estadísticamente significativa.

Del mismo modo el flujo de 0.5 mL/min sigue favoreciendo la formación de esferoides de mayor tamaño respecto al flujo de 1.5 mL/min. Al comparar EE (5 V, 0.5 mL/min, Au+Alg) con (5 V, 1.5 mL/min, Au+Alg) se observa que generan esferoides con un tamaño medio de $1594 \pm 276 \mu\text{m}^2$ y $953.4 \pm 93 \mu\text{m}^2$, respectivamente, cuya diferencia es estadísticamente significativa.

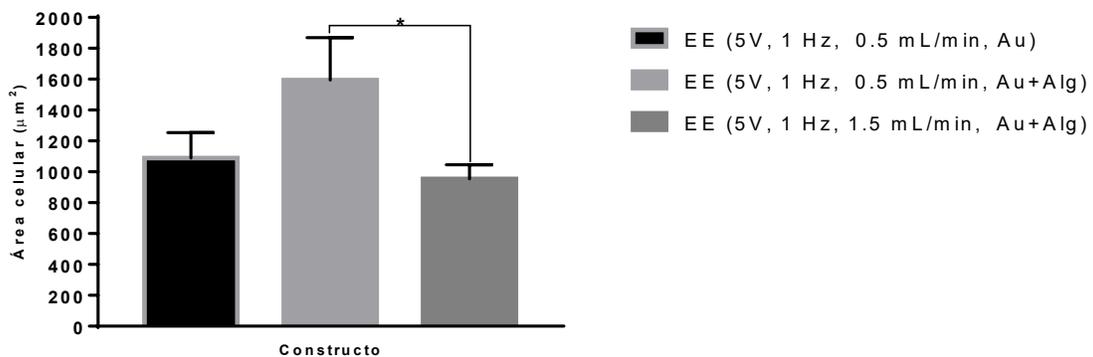


Figura 28. Tamaño de esferoides de CMRN en constructos generados con estimulación eléctrica + perfusión. $p \leq 0.05$. *diferencias estadísticamente significativas. Media \pm ESM

Estos resultados indican que las dos mejores combinaciones de parámetros para el cultivo de CMRN, en términos del tamaño medio y la morfología de los esferoides que generan son:

1. P (0.5 mL/min, Au+Alg): $1979 \pm 325.1 \mu\text{m}^2$

2. EE (5 V, 0.5 mL/min, Au+Alg): $1594 \pm 276 \mu\text{m}^2$

8.6.1 Análisis inmunohistoquímico

Se estandarizaron los marcadores, TPM, Cx43 y TnT, sin embargo, únicamente fue posible realizar un análisis cuantitativo con las fotomicrografías de TPM. Las fotomicrografías de Cx43 y TnT resultaron tenues y borrosas, lo cual impidió realizar una cuantificación confiable de la intensidad del marcador con el software ImageScope. En la Figura 29 se muestra una imagen representativa de las IHQ de Cx43 y TnT donde a pesar de la poca resolución se distinguen esferoides positivos a los marcadores (flechas).

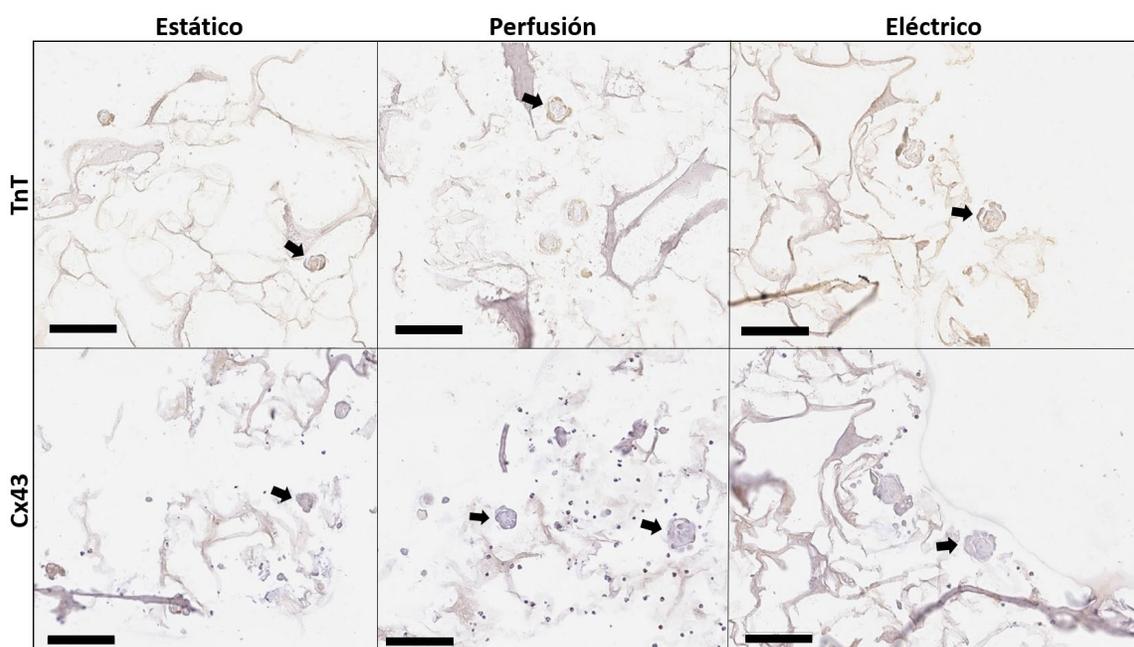


Figura 29. Fotomicrografía representativa de IHQ de TnT y Cx43. Las flechas indican esferoides cardíacos. Barra de escala: $100 \mu\text{m}$.

Las IHQ de tropomiosina muestran que todos los esferoides expresan la proteína (Figura 30), pero la expresión es mayor en la periferia. La expresión del marcador en la periferia de los esferoides forma una especie de coraza que indica que los CMRN se agrupan alrededor de los esferoides. En la fotomicrografía de la Figura 30 se observan esferoides de diferente tamaño (flechas negras) y se observa que tanto los esferoides pequeños (4) como los grandes (3) poseen la coraza de CMRN. Esto sugiere que la disposición de los CMRN en la periferia del esferoide no tiene relación con su tamaño o con posibles limitaciones de transferencia masa sino es una característica intrínseca de la organización y estructura de los esferoides.

La ausencia o nula presencia de células positivas a TPM en el centro del esferoide sugiere que el interior está constituido por una mezcla de diferentes tipos de células,

que pueden ser fibroblastos y células endoteliales, que forman una especie de matriz extracelular que sirve como sostén a las células cardíacas con actividad contráctil que están en la superficie.

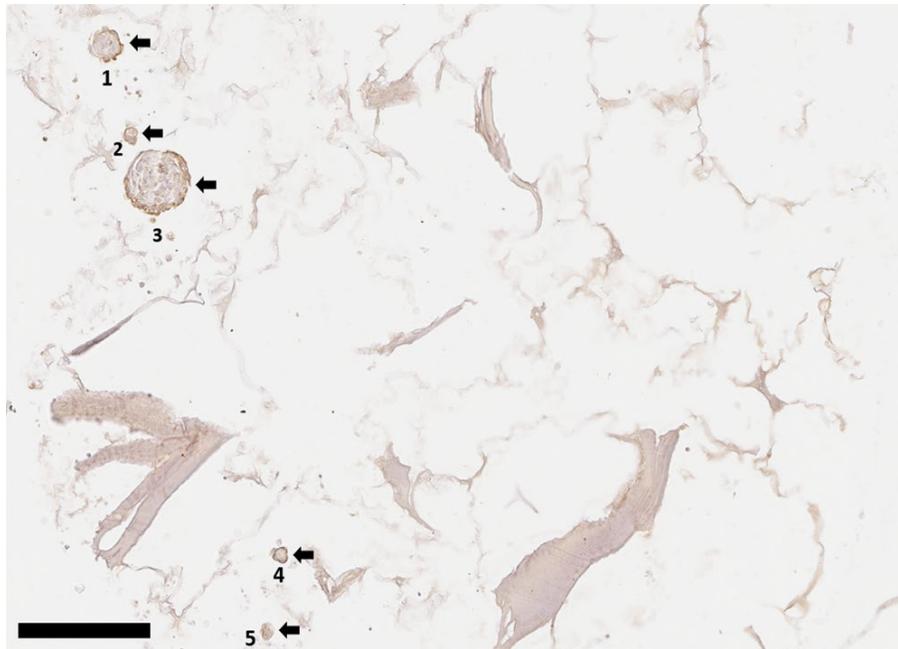


Figura 30. Fotomicrografía representativa de IHQ-Tropomiosina. Las flechas indican esferoides cardíacos. Barra de escala: 200 μ m. P (0.5 mL/min, Au+Alg).

Los esferoides generados con Np Au+Alg en cultivo estático expresan TPM en gran parte del esferoide, no tienen una coraza definida y hay regiones internas que no expresan el marcador lo cual sugiere la presencia de matriz extracelular (Figura 31-C). El esferoide generado con Np Au pareciera estar constituido mayormente por MEC (Figura 31-B) y el esferoide generado sin Np tienen células que son positivas al marcador dispersas y desorganizadas (Figura 31-A)

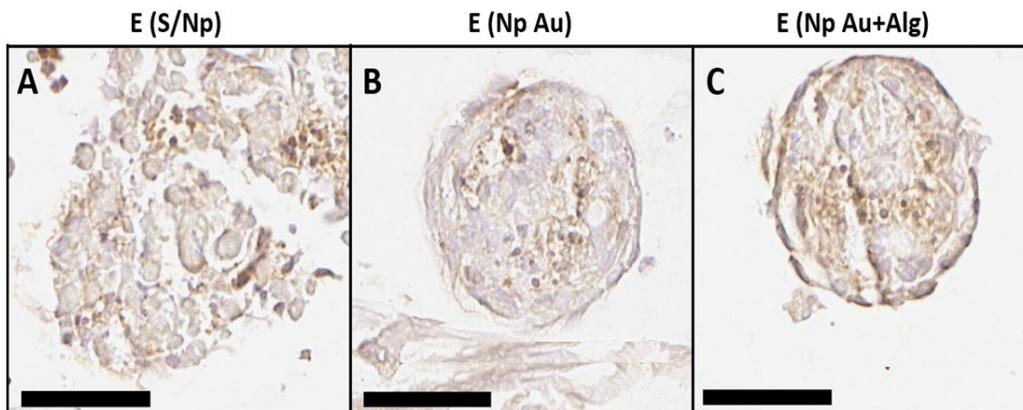


Figura 31. Fotomicrografía representativa de esferoides cardíacos estáticos. IHQ-Tropomiosina, barra de escala: 50 μ m

El análisis cuantitativo de la expresión de TPM en cultivos estáticos (Figura 32) muestra que la expresión de la proteína en los constructos generados con Np Au+Alg es más del doble de la expresión en constructos generados sin nanopartículas (38406 ± 5202 intensidad total/ μm^2 Vs 16885 ± 3086 intensidad total/ μm^2). Las Np Au tiene un valor medio de expresión de la proteína (27180 ± 5099 intensidad total/ μm^2), sin diferencia estadísticamente significativa en ambos casos.

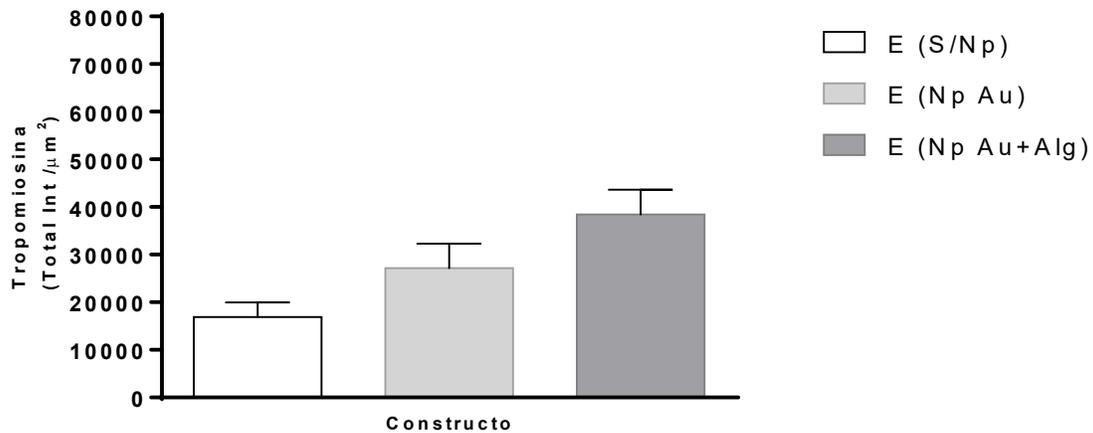


Figura 32. Expresión de TPM en constructos estáticos (intensidad total/ μm^2). $p \leq 0.05$. *diferencias estadísticamente significativas. Media \pm ESM.

Los esferoides generados con P (0.5 mL/min, Au+Alg) expresan TPM en la mayor parte de su estructura (Figura 33-B). En cambio, los esferoides generados sin perfusión son positivos al marcador solo en algunas regiones periféricas, lo cual indica que si bien las células tienden a agruparse en esferoides la mayoría no son células cardíacas o son CMRN inmaduros, lo cual puede explicarse por la falta de nutrientes y oxígeno (Figura 33-A). El mismo comportamiento se observa en los esferoides generados con P (1.5 mL/min, Au+Alg), que además están fragmentados. Este comportamiento se asocia al estrés hidrodinámico generado por el esfuerzo cortante que genera el flujo de 1.5 mL/min, que es mayor al máximo tolerado por células cardíacas en cultivos *in vitro* (Figura 33-C),

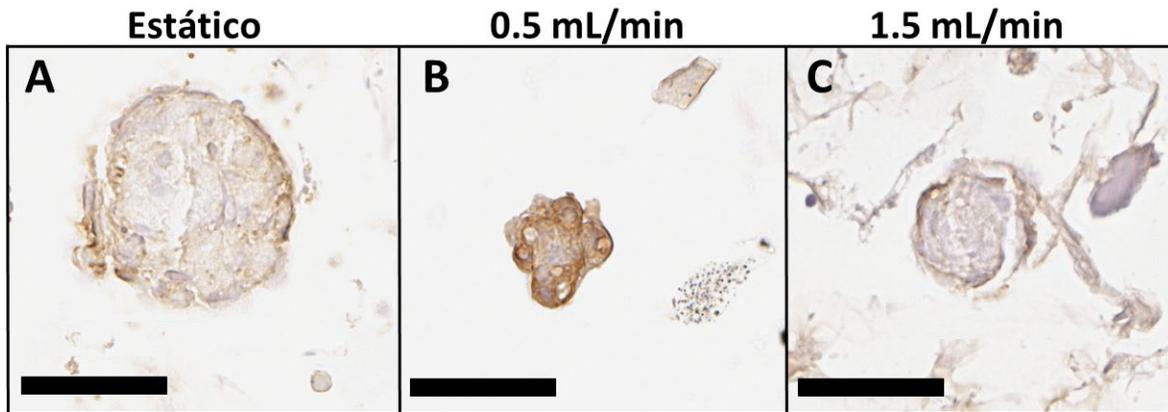


Figura 33. Fotomicrografía representativa de esferoides cardíacos con perfusión. IHQ-Tropomiosina, Barra de escala: 50 μm

Los esferoides generados con P (0.5 mL/min, Au+Alg) expresan el doble de TPM (62601 \pm 9413 intensidad total/ μm^2) que los esferoides generados con el mismo flujo, pero con Np Au, P (0.5 mL/min, Au), (33415 \pm 2825 intensidad total/ μm^2). Además, expresan 3 veces más TPM que los esferoides generados con el mismo flujo, pero sin Np, P (0.5 mL/min, S/Np), (23405 \pm 3303 intensidad total/ μm^2), (Figura 34).

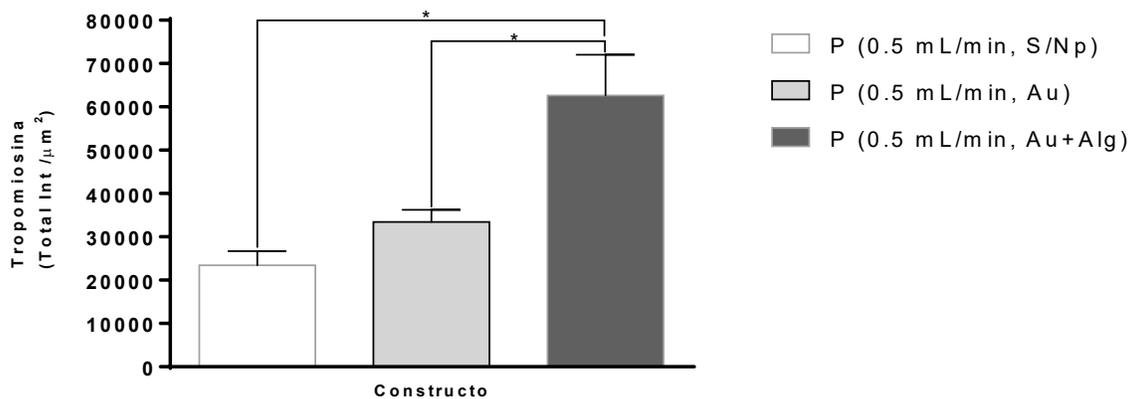


Figura 34. Expresión de TPM en constructos con perfusión (intensidad total/ μm^2). $p \leq 0.05$. *diferencias estadísticamente significativas. Media \pm ESM.

Los esferoides generados con estimulación eléctrica fueron positivos a TPM en la mayor parte de su superficie. Pero los esferoides generados con 5 V tenían una coraza definida y bien marcada (Figura 35-B). Lo cual no se observó en los esferoides generados con 3 V (Figura 35-C). Los esferoides generados con 5 V tienen una coraza similar a la de los esferoides generados con 0.5 mL/min, pero estos últimos en ocasiones están fragmentados (Figura 35-A).

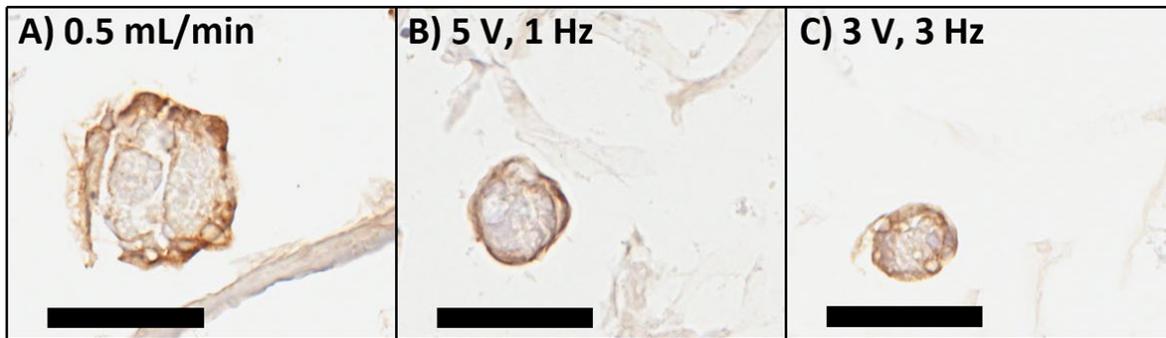


Figura 35. Fotomicrografía representativa de esferoides cardíacos con estimulación eléctrica. IHQ-Tropomiosina, x400, barra: 50 μm .

La expresión de TPM en esferoides generados con P (0.5 mL/min, Np Au+Alg) es la más alta (62601 ± 9413 intensidad total/ μm^2), solo después de la que se genera en los esferoides EE (5 V, 0.5 mL/min, Au+Alg) con un valor medio de 39160 ± 6132 intensidad total/ μm^2 (Figura 36).

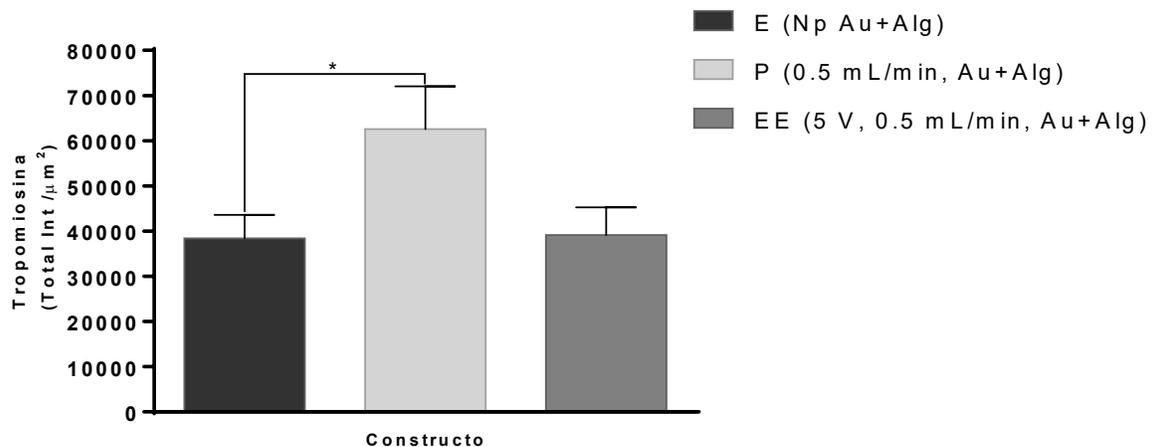


Figura 36. Expresión de TPM en constructos dinámicos (intensidad total/ μm^2). $p \leq 0.05$. *diferencias estadísticamente significativas. Media \pm ESM.

Estos resultados sugieren que las dos mejores condiciones para el cultivo de CMRN, en términos de expresión de TPM son:

1. P (0.5 mL/min, Np Au+Alg) = 62601 ± 9413 intensidad total/ μm^2
2. EE (5 V, 0.5 mL/min, Au+Alg) = 39160 ± 6132 intensidad total/ μm^2

9 DISCUSIÓN

En este trabajo generamos esferoides cardíacos *in vitro* a partir de CMRN cultivados en andamios de alginato/quitosano con nanopartículas de oro y alginato. Con el objeto de estandarizar el cultivo de CMRN se probaron dos condiciones de cultivo en un biorreactor eléctrico: 1) Perfusión (P) y 2) Estimulación eléctrica (EE) (perfusión + estimulación eléctrica).

En la ITC se aprovecha la biocompatibilidad de materiales de origen sintético y natural para elaborar andamios para el cultivo de células cardíacas (Tabla 2). Los andamios promueven la adhesión y proliferación celular y facilitan la integración morfológica de las células como lo hace la MEC en el tejido muscular cardíaco nativo [61]. La integración de las células en el andamio está influenciada por sus características fisicoquímicas [61]. Una manera de aumentar sus propiedades fisicoquímicas es añadirles nanopartículas de oro, carbono, selenio o plata [120], [143]. Particularmente, las nanopartículas de oro aumentan su conductividad eléctrica y favorecen la organización celular, promueven la sobreexpresión de Cx43, mejoran la actividad contráctil de las células y promueven la maduración de los CMs [125], [126], [15].

Los hidrogeles son un tipo de andamio en forma de red tridimensional que se utilizan para el cultivo de células cardíacas. El hidrogel es capaz de retener muchas moléculas de agua sin solvarse por lo que puede absorber grandes cantidades de líquidos y nutrientes y ayudan a generar un ambiente ideal para el crecimiento celular [144], [145]. En este trabajo utilizamos hidrogeles de alginato-quitosano (0.75-1.25 % p/v). El alginato y el quitosano son polisacáridos de origen natural biocompatibles de uso común en la medicina regenerativa y en la ITC [146], [147], (Tablas 2-5), donde se ha comprobado que su uso mezclado tiene efectos sinérgico sobre su uso individual [148]. Para mejorar la conductividad y biocompatibilidad de los hidrogeles de alginato-quitosano se les añadió Np Au y dado que las nanopartículas tienden a ser más estables e interactuar de mejor manera con sistemas biológicos cuando están recubiertas con materiales de origen biológico como alginato [149], [150], albumina [151], [152], hidroxiapatita [153] o pectina [143], también utilizamos Np Au+Alg.

Los CMRN fueron cultivados con dos flujos de perfusión. Para determinar los flujos de perfusión se realizó un balance de materia en estado estacionario para el flujo molar de oxígeno en el constructo y se calculó el flujo de alimentación del biorreactor con base en la tasa de transferencia de masa por convención y el esfuerzo cortante generado en el constructo (Tabla 10). También se calculó el módulo de Thiele para evaluar si había limitaciones de transferencia de masa interna.

El flujo calculado para un constructo de 1×10^6 células fue 0.04 mL/min cuyo valor es comparable con flujos utilizados previamente para el cultivo *in vitro* de células cardíacas [14], [49], [99], [85]. De acuerdo con los valores del número de Reynolds ($Re = 0.93$), módulo de Thiele ($\phi = 7.01$), esfuerzo cortante ($\tau = 0.4$ dina/cm²) y factor de efectividad (~ 1) el sistema operaba con flujo laminar, la transferencia de masa por convección era mínima y había limitaciones de transferencia de masa interna en el constructo. Además, el flujo molar de O₂ en la entrada del constructo era menor a la velocidad de consumo de oxígeno. Por tal razón se aumentó el flujo de perfusión a 0.5 mL/min y 1.5 mL/min cuyos flujos molares de oxígeno satisfacían la velocidad de consumo de oxígeno en las células del constructo

El biorreactor operó con flujo laminar en ambos casos pero con 1.5 mL/min se generaba un esfuerzo cortante superior al máximo tolerado por células cardíacas

en cultivos *in vitro* (2.4 dina/cm^2) [84]: 0.5 mL/min ($Re = 4.4, \tau = 1.88 \text{ dina/cm}^2$) y 1.5 mL/min ($Re = 13.2, \tau = 5.6 \text{ dina/cm}^2$).

Se ha reportado que flujos iguales o similares a 0.5 mL/min reducen el porcentaje de muerte celular a un 14% respecto a cultivos estáticos, 54%, aumentan la expresión de Tnl (31% Vs 1.7 %), Cx43 (39% Vs 18%) [88] y generan constructos con densidades celulares altas que expresan TPM y actina- α [89], [90], [78], [98].

Por otra parte, un flujo de 1.1 mL/min ayuda a generar constructos con células distribuidas homogéneamente en el andamio [13] y un flujo de 3 mL/min incrementa hasta 4.5 veces la tasa de respiración celular y promueve alineación celular [154]. En otro trabajo un flujo de 1.5 mL/min ayudó a establecer contracciones más fuertes y redujo el umbral de excitación eléctrica de células cardíacas comparado con un flujo de 0.32 mL/min [95]. Incluso un flujo tan grande como 25 mL/min combinado con estimulación eléctrica aumenta la expresión de Cx43 [97].

Dos parámetros de estimulación eléctrica fueron seleccionados de la literatura (Tabla 4). El primero consistió de pulsos eléctricos de 3 V, 3 Hz y 2 ms. Los pulsos eléctricos de 3 V estimulan lo suficiente a CMRN en cultivos *in vitro* para generar potenciales de acción con relevancia fisiológica ($\sim 0.5\text{--}5 \text{ mV}$) [155], y una frecuencia de 3 Hz y un ancho de pulso de 2 ms son los valores óptimos para cultivar CMRN debido a que generan contracciones de mayor amplitud y fuerza y aumentan la expresión de Tnl y Cx43 [105]. En la literatura diversos trabajos han reportado el cultivo de células cardíacas con pulsos eléctricos iguales o similares a 3 V, 3 Hz, 2 ms. La estimulación eléctrica con estos parámetros induce la expresión de genes que codifican canales de sodio (Nav1.5, SCN7a) y aumentan la expresión de Cx43 y TnT [102], promueven la maduración de CMs derivados de células troncales [110] inducen alineación y comunicación celular a través de la sobreexpresión de Cx43 [112]. El segundo parámetro de estimulación eléctrica consiste de pulsos eléctricos de 5 V, 1 Hz y 2 ms. Este parámetro de estimulación y valores similares han sido utilizados para cultivar células cardíacas *in vitro* y a diferencia de los pulsos de 3 V, 3 Hz, 2 ms los constructos muestran células mejor comunicadas, morfología alargada, sarcómeros definidos y mejor actividad contráctil además de la expresión de Cx43, TnT, y otras proteínas reguladoras de la actividad contráctil [100], [106], [101], [108], [108], [119], (Tabla 4).

La efectividad de la estimulación eléctrica depende de las propiedades fisicoquímicas del constructo [18]. Por ejemplo, cuando el andamio tiene baja conductividad los pulsos eléctricos incluyen voltajes altos para compensar la carencia de conductividad. Pretorius D., *et al* (2022) [156] generaron un parche cardíaco de $1 \text{ cm} \times 2 \text{ cm} \times 2.1 \text{ mm}$ a partir de CMs derivados de células troncales cultivados en andamios de Polidimetilsiloxano, que tiene baja conductividad, con pulsos eléctricos que incluían voltajes tan altos como 15 V y 22 V, ambos con 2 Hz y 2 ms, y encontraron que los pulsos eléctricos de mayor voltaje (22 V) aumentaban la expresión de marcadores cardíacos (TnT, Tnl, actina- α) y las células tenían morfología alargada con sarcómeros definidos (líneas Z definidas, $1.91 \pm 0.02 \mu\text{m}$), similar a las células del tejido muscular cardíaco nativo. En nuestro trabajo la adición de Np Au+Alg puede tener un efecto favorable en la conductividad eléctrica de los

hidrogeles de alginato-quitosano de tal manera que no es necesario aplicar pulsos eléctricos con voltajes altos.

Las nanopartículas utilizadas en nuestro trabajo tienen un potencial Z (Np Au+Alg = -36 mV, Np Au = -16.1 mV) similar al potencial Z de nanopartículas de oro (Np Au=-51.5 mV), nanopartículas de oro recubiertas con cisteína (Np Au+cisteína=-23.5 mV) y nanopartículas de oro recubiertas con glutatión (Np+glutatión=-12.5 mV), elaboradas por Nair, R., *et al.*(2017) [157]. Estas nanopartículas eran estables a pH fisiológico y favorecieron el crecimiento y proliferación de células cardíacas. El potencial Z es un parámetro que indica qué tan estables son las nanopartículas en soluciones acuosas. Las nanopartículas estables no se aglomeran y ayudan a mejorar la conductividad eléctrica del andamio. Valores grandes del potencial Z, tanto negativos (Np Au+pectina=-43 mV) [143] como positivos (Np ZnO=+30.4 mV) [146] indican que las nanopartículas son estables. Particularmente, nuestras Np Au+Alg tiene un potencial Z (-36 mV) similar a las Np Au+Alg (-30 mV) elaboradas por Shen, K, *et al.* (2019) [150] que eran estables y ayudaron a generar porcentajes de viabilidad celular alrededor del 95%.

Las nanopartículas utilizadas en ITC tienen tamaños entre 10 y 253 nm de diámetro (Tabla 5, [158], [150]). Se ha encontrado que nanopartículas pequeñas ($D_i=20$ nm) [159] y grandes (156 nm) [158] aumentan la viabilidad celular hasta en un 60% lo cual sugiere que el tamaño de las Np no influye en su biocompatibilidad. Este comportamiento se atribuye a que las nanopartículas, independientemente de su tamaño, aumentan la conductividad eléctrica del andamio. Por ejemplo, añadir nanopartículas de selenio, Np Se ($D_i\sim 500$ nm), a un hidrogel de quitosano eleva su conductividad de 0.00017 S/cm a 0.0055 S/cm, la cual es 3 veces más grande que la conductividad del miocardio nativo ~ 0.0016 S/cm [15]. De acuerdo con estos criterios las nanopartículas generadas en este trabajo: Np Au ($D_i=83.13$ nm, potencial Z= -16.1 mV) y Np Au+Alg ($D_i=88.3$ nm, potencial Z=-36 mV), bien podrían favorecer el crecimiento de CMRN. Esta hipótesis concuerda con la información experimental donde se encontró que las nanopartículas favorecieron la formación de esferoides más grandes respecto al grupo control, Np Au ($1811 \pm 162.9 \mu\text{m}^2$), Np Au+Alg ($1472 \pm 114.6 \mu\text{m}^2$), S/Np ($1251 \pm 126.2 \mu\text{m}^2$) (Figura 21). En condiciones de cultivo con perfusión (Figura 23) las Np Au+Alg generan esferoides más grandes que las Np Au ($1979 \pm 325.1 \mu\text{m}^2$ Vs $1531 \pm 130.9 \mu\text{m}^2$) y el efecto se repite en el cultivo con estimulación eléctrica (Figura 28), donde las Np Au+Alg generan esferoides más grandes que las Np Au ($1594 \pm 276 \mu\text{m}^2$ Vs $1089 \pm 166 \mu\text{m}^2$). Esto sugiere que las Np Au+Alg favorecen en mayor grado el crecimiento de CRMN, lo cual se atribuye a la mayor estabilidad que tienen respecto a las Np Au. Este efecto también se asocia a una posible interacción entre la capa de alginato de las nanopartículas de oro y los enlaces (puente de hidrogeno) entre los grupos hidroxilo del quitosano y los grupos carboxilo del alginato los cuales son los principales enlaces químicos en el hidrogel de alginato-quitosano [145]. La estabilidad de las nanopartículas determinada por un potencial Z alto y su efecto en la viabilidad celular ha sido reportada por Nair, R., *et al.* (2017) [157] donde Np Au+cisteína ($pZ=-23.5 \pm 3.19$ mV), Np Au+glutatión ($pZ=-12.5 \pm 5.39$ mV) generan porcentajes de viabilidad celular de 87 %, 73 %, respectivamente.

Los constructos generados en este trabajo están constituidos por esferoides localizados principalmente en la periferia del andamio (Figura 19). La densidad de esferoides es baja (no medido) y se asocia a la baja densidad celular de sembrado utilizada (3.45×10^7 células/cm³) que es la mitad de la densidad de sembrado teórica (6.9×10^7 células/cm³). Una densidad de sembrado alta es fundamental para generar constructos con densidades celulares altas [160]. Radisic, M. *et al.* (2004) [89] generaron tejido muscular cardíaco *in vitro* a partir de CMRN sembrados a una densidad celular alta (1.35×10^8 células/cm³), similar a la densidad fisiológica. Este tejido tenía elevada densidad celular y una morfología similar a la del tejido muscular cardíaco nativo. No obstante, constructos generados con una baja densidad celular de sembrado, similar a la nuestra, también pueden ser funcionales. Un parche generado con 4×10^7 células/cm³ ayudó a regenerar el miocardio dañado por IAM en rata. El constructo se integró al tejido nativo y promovió la formación de vasos sanguíneos en el injerto y en el tejido nativo. Pero el parche estaba constituido de una mezcla de CM (40%), células endoteliales (40%) y fibroblastos (20%) [161].

El tamaño medio de nuestros esferoides, $E = 1381 \pm 348.4 \mu\text{m}^2$, $P = 1363 \pm 489.7 \mu\text{m}^2$ y $EE = 1052 \pm 422.3 \mu\text{m}^2$, es similar al tamaño de los esferoides generados por Moon, S. *et al.*, (2020) [100] a partir de CMRN (50 000 células/pozo) cultivados con estimulación eléctrica (5 V, 2 Hz, 10 ms). Al día 7 de cultivo sus esferoides median $\sim 1000 \mu\text{m}^2$ (EE) y $\sim 700 \mu\text{m}^2$ (E) y al día 14 alcanzaron tamaños de $\sim 2200 \mu\text{m}^2$ (EE) y $\sim 1000 \mu\text{m}^2$. En el trabajo de Moon, S. *et al.*, (2020), los esferoides generados con estimulación eléctrica son más grandes que los generados en cultivo estático; en nuestro caso los esferoides generados con estimulación eléctrica son más pequeños que los generados en cultivo estático ($1052 \pm 422.3 \mu\text{m}^2$ Vs $1381 \pm 348.4 \mu\text{m}^2$), sin diferencia estadísticamente significativa. Este comportamiento lo atribuimos a la configuración del sistema de estimulación eléctrica, pues en el trabajo de Moon, S. *et al.*, (2020) las células fueron cultivadas sobre una placa de óxido de indio que permitía estimular directamente a la mayoría de las células en cambio en nuestro trabajo la corriente eléctrica no era proporcionada directamente al constructo, ésta llegaba a través del medio de cultivo. No obstante, la comparación de tamaño de los esferoides al mismo tiempo de cultivo (7 días) indica que nuestros esferoides EE son ligeramente más grandes que los esferoides EE generados por Moon, S. *et al.*, (2020) ($1052 \mu\text{m}^2$ Vs $1000 \mu\text{m}^2$). Lo cual sugiere que la madurez de nuestros constructos estaba en proceso y que podrían alcanzar estadios más maduros a un mayor tiempo de cultivo. Los esferoides EE generados por Moon, S. *et al.*, (2020) expresaron significativamente más genes de TnT y Mylk3 (enzima que fosforila las cadenas de miosina durante la contracción) que los esferoides E.

La organización celular de nuestros esferoides donde las células cardíacas se localizan en la superficie y en el interior hay otros tipos de células que probablemente podrían ser una mezcla de fibroblastos y células endoteliales es similar a la organización de los esferoides generados por Beaucham, P. *et al.*, (2020) [162]. Estos esferoides generados con una mezcla de CM y FB expresaron de 2 a 4 veces más marcadores cardíacos (TnI, miomesina) que esferoides generados únicamente con CMs y que el cultivo en monocapa. Además, se observó

que estaban constituidos por células cardíacas localizadas en la superficie y fibroblastos en la parte central del andamio, como nuestros esferoides.

10 CONCLUSIONES

Se cultivaron CMRN en monocapa y en andamios de alginato/quitosano.

El cultivo de CMRN con un flujo de perfusión cuyo esfuerzo cortante es menor al máximo tolerado por células cardíacas ($1.9 \text{ dina/cm}^2 < 2.4 \text{ dina/cm}^2$) favorece la formación de esferoides de mayor tamaño con mayor expresión de TPM respecto a CMRN cultivados con un flujo cuyo esfuerzo cortante es superior al máximo tolerado por células cardíacas in vitro (5.6 dina/cm^2).

Pulsos eléctricos de 5 V, 1 Hz, 2 ms ayudan a generar esferoides cardíacos tres veces más grandes que pulsos eléctricos de 3 V, 3 Hz, 2 ms ($1594 \pm 275.9 \mu\text{m}^2$ Vs $572 \pm 73 \mu\text{m}^2$).

El cultivo de CMRN con P (0.5 mL/min, 5 V, 1 Hz, 2 ms y Np Au+Alg) genera esferoides con un tamaño medio de $1979 \pm 325.1 \mu\text{m}^2$ y una expresión de TPM de 62601 ± 9413 intensidad total/ μm^2 , cuyos valores más grandes que los generados con EE ($1594 \pm 275.9 \mu\text{m}^2$, 39160 ± 6132 intensidad total/ μm^2).

Np Au+Alg, 0.5 mL/min y 5 V, 1 Hz, 2 ms parecen promover la formación de esferoides cardíacos de tamaño considerable con mayor expresión de proteínas cardíacas.

El cultivo con EE (5 V, 0.5 mL/min, Au+Alg) genera esferoides cardíacos con un tamaño medio más bajo que los generados con P (0.5 mL/min, Au+Alg).

11 PERSPECTIVAS

Con el fin de corroborar que la combinación de 0.5 mL/min, 5 V, 1 Hz, 2 ms y Np Au+Alg son los mejores parámetros para cultivar células cardíacas es preciso cuantificar la expresión de Cx43 y TnT, proteínas presentes en células cardíacas organizadas con actividad contráctil.

También es preciso utilizar otra técnica para cuantificar los niveles de proteínas cardíacas, por ejemplo, Western Bolt, donde se espera que los constructos generados con la combinación propuesta tengan los mayores niveles de proteína.

Por otro lado, se sugiere aumentar la densidad celular de sembrado para evidenciar de mejor manera el efecto de la perfusión y la estimulación eléctrica.

Tal como lo reportan otros trabajos, cultivar CRMN en conjunto con otras células, por ejemplo, fibroblastos y/o células endoteliales puede ayudar a generar esferoides cardíacos con mayor expresión de proteínas cardíacas y ofrecer la regeneración en un corazón con IAM. Por tal razón se propone añadir FB y/o células endoteliales al constructo cardíaco.

12 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Organization, World Health, «Global Health Estimates (GHE),» 2021. [En línea]. Available: <https://www.who.int/data/global-health-estimates>.
- [2] Talman V. & Heikki R., «Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration,» *Cell and tissue research*, vol. 365, n° 3, p. 563–581, 2016.
- [3] Laflamme, M. A. & Murry C. E., «Regenerating the heart,» *Nature biotechnology*, vol. 23, n° 7, pp. 845-56, 2005.
- [4] Laflamme, M. A. & Murry, C. E., «Heart regeneration,» *Nature*, vol. 473, n° 7347, pp. 326-335., 2011.
- [5] Bergmann, O., et al., «Evidence for cardiomyocyte renewal in humans,» *Science*, vol. 324, n° 5923, pp. 98-102, 2009.
- [6] Morrow, D. A., *Myocardial Infarction: A companion to Braunwald's Heart Disease E-Book*, 2016.
- [7] Mahmoud, A. I. & Lee, R. T., «Past and Future of Cell-Based Heart Repair,» de *Cardiac Regeneration*, Cham, Springer, 2017, pp. 1-17.
- [8] Garbern J. C. & Lee, R. T., «Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration,» *Cell stem cell*, vol. 12, n° 6, pp. 689-698, 2013.
- [9] Sui, R., et al., «The current status of engineering myocardial tissue,» *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 7, n° 1, pp. 172-180, 2011,.
- [10] Christidi E. et al., «CRISPR/Cas9-mediated genome editing in human stem cell-derived cardiomyocytes: applications for cardiovascular disease modelling and cardiotoxicity screening,» *Drug Discovery Today: Technologies*, vol. 28, pp. 13-21, 2018.
- [11] Chaudhuri R. et al., «Biomaterials and cells for cardiac tissue engineering: current choices,» *Materials Science and Engineering*, vol. 79, pp. 950-957, 2017.
- [12] Radisic, M., et al., «Cardiac tissue engineering using perfusion bioreactor systems,» *Nature protocols*, vol. 3, n° 4, p. 719, 2008.
- [13] Maidhof, R., et al., «Perfusion seeding of channeled elastomeric scaffolds with myocytes and endothelial cells for cardiac tissue engineering,» *Biotechnology progress*, vol. 26, n° 2, pp. 565-572, 2010.
- [14] Zohar, B., et al., «Multi-flow channel bioreactor enables real-time monitoring of cellular dynamics in 3D engineered tissue,» *Communications biology*, vol. 2, n° 1, pp. 1-10, 2019.
- [15] Kalishwaralal K., et al., «A novel biocompatible chitosan–Selenium nanoparticles (SeNPs) film with electrical conductivity for cardiac tissue engineering application,» *Materials Science and Engineering: C*, vol. 92, pp. 151-160, 2018.
- [16] Chaudhuri, J. & Al-Rubeai, M., *Bioreactors for tissue engineering*, The Netherlands: Springer, 2005.
- [17] Rodrigues, I. C, et al., «Cardiac tissue engineering: current state-of-the-art materials, cells and tissue formation,» *Einstein (Sao Paulo)*, vol. 16, n° 3, 2018.
- [18] Stoppel W. L., et al., «Electrical and mechanical stimulation of cardiac cells and tissue constructs,» *Advanced drug delivery reviews*, vol. 96, pp. 135-155, 2016.
- [19] Wendel, J. et al., «Functional consequences of a tissue-engineered myocardial patch for cardiac repair in a rat infarct model,» *Tissue Engineering Part A*, vol. 20, n° 7-8, pp. 1325-1335, 2014.
- [20] Labarge, W., et al., «Maturation of three-dimensional, hiPSC-derived cardiomyocyte spheroids utilizing cyclic, uniaxial stretch and electrical stimulation,» *PLoS One*, vol. 14, n° 7, p. e0219442, 2019.
- [21] N. E. B. Vargas, «Soporte de hidrogel de alginato y quitosano para crecimiento de tejidos». México Patente MX/a/2020/012621 Solicitud en tramite, 24 11 2020.

- [22] N. E. B. Vargas, «Sistemas y métodos para biorreactor». México Patente MX/a/2017/004364. 2017, 2017.
- [23] Lastiri, Angélica Reyes, «CARACTERIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN BIORREACTOR DE PERFUSIÓN PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS CARDIACAS.» CDMX, México, 2017.
- [24] Alba, Y., et al. , «Pruebas de verificación y validación de plataformas para el cultivo de células cardíacas.» CDMX, México, 2020.
- [25] Vaquero D. , «Apoyo en la realización de pruebas de caracterización y funcionalización de andamios de alginato-quitosano para su utilización en ingeniería de tejidos.» CDMX, México, 2019.
- [26] Beltran-Vargas, N. E., Peña-Mercado, E., Sánchez-Gómez, C., Garcia-Lorenzana, M., Ruiz, J. C., Arroyo-Maya, I., ... & Campos-Terán, J., «Sodium Alginate/Chitosan Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering: The Influence of Its Three-Dimensional Material Preparation and the Use of Gold Nanoparticles.» *Polymers*, vol. 14, n° 16, p. 3233, 2022.
- [27] OMS, «Las 10 principales causas de defunción.» OMS, 2018.
- [28] ROGER, Véronique L., «Epidemiology of Heart Failure.» *Circulation research*, vol. 113, n° 6, pp. 646-659, 2013.
- [29] Ritchi, Max Roser & Hannah, «Burden of Disease.» *Our World in Data*, 2016.
- [30] Tombesi, C. & Cecilia, «Coronavirus: cómo se comparan las muertes por covid-19 con las mayores causas de mortalidad en el mundo y en América Latina.» BBC News Mundo, 2020.
- [31] Bowen, R., et al., «Statistics of heart failure and mechanical circulatory support in 2020.» *Annals of Translational Medicine*, vol. 8, n° 13, 2020.
- [32] RAMÍREZ, Erick Méndez., «Dispositivos de asistencia ventricular.» *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, vol. 70, n° 607, pp. 551-558, 2013.
- [33] INEGI, «Mortalidad ¿De qué mueren los mexicanos?.» <https://www.inegi.org.mx/temas/mortalidad/>, 2019.
- [34] Medicine, U.S. National Library of, «Enfermedades del corazón.» U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, 2020.
- [35] Fernández-Ortiz, A., «¿Qué es el infarto agudo de miocardio?.» de *Libro de la salud cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos y la Fundación BBVA*, Fundación BBVA, 2009, pp. 259-268.
- [36] saludcastillayleon, «Principales medicamentos utilizados para el tratamiento del IAM.» 2018.
- [37] Lázaro R. J., et al., «Trasplante cardíaco.» *Cirugía cardiovascular*, vol. 18, n° 2, pp. 91-102, 2011.
- [38] SADAHIRO, Taketaro., «Cardiac regeneration with pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and direct cardiac reprogramming.» *Regenerative therapy*, vol. 11, pp. 95-100., 2019.
- [39] GAO, Ling; ZHANG, Jianyi Jay., «Efficient Protocols for Fabricating a Large Human Cardiac Muscle Patch from Human Induced Pluripotent Stem Cells.» *Cardiac Regeneration*, pp. 187-197.
- [40] Talman, V., & Ruskoaho, H., «Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration.» *Cell and tissue research*, vol. 365, n° 3, pp. 563-581., 2016.
- [41] Ross, M. & Pawlina, W. 7a ed., *Histología: Texto y Atlas*, Médica Panamericana, 2016.
- [42] Taegtmeier, H., Young, M. E., Lopaschuk, G. D., Abel, E. D., Brunengraber, H., Darley-Usmar, V., ... & Gropler, R. J., «Assessing cardiac metabolism: a scientific statement from the American Heart Association.» *Circulation research*, vol. 118, n° 10, pp. 1659-1701, 2016.
- [43] Eynard, Aldo, *Histología y embriología del ser humano : bases celulares y moleculares*, 4a. ed. edición, Buenos Aires ; Madrid: Panamericana, 2008.
- [44] Hoskins, P. R., et al., «Introduction to Cardiovascular.» de *Cardiovascular biomechanics*, Springer, 2017, pp. 25-27.
- [45] Pinto, Alexander R., et al., «Revisiting cardiac cellular composition.» *Circulation research*, vol. 118, n° 3, pp. 400-409, 2016.
- [46] Hoskins, P. R., Lawford, P. V., & Doyle, B. J., *Cardiovascular biomechanics*, Springer, 2017.
- [47] Wojciech, P., «Tejido muscular/ Músculo cardíaco.» de *Histología Texto y Atlas Correlación con biología celular y molecular*, Philadelphia, PA, Wolters Kluwer, 2015, pp. 361-366.
- [48] Forough, R., et al. , «Cardiac biomarkers: a focus on cardiac regeneration.» *The Journal of Tehran Heart Center*, vol. 6, n° 4, p. 179, 2011.
- [49] Valls-Margarit, M., et al., «Engineered macroscale cardiac constructs elicit human myocardial tissue-like functionality.» *Stem cell reports*, vol. 13, n° 1, pp. 207-220, 2019.
- [50] Wahed, A. & Amer, «Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control. A Comprehensive Review for Board Preparation, Certification and Clinical Practice.» de *Clinical Chemistry, Immunology and*

Laboratory Quality Control. A Comprehensive Review for Board Preparation, Certification and Clinical Practice, Elsevier, 2014, pp. 127-144.

- [51] Lu, G., Haider, H. K., Jiang, S., & Ashraf, M., «Sca-1+ stem cell survival and engraftment in the infarcted heart: dual role for preconditioning-induced connexin-43.» *Circulation*, vol. 119, n° 19, pp. 2587-96, 19 mayo 2009.
- [52] Pérez, F. C., et al., *Fundamentos físicos de los procesos biológicos. Volumen II*, Editorial Club Universitario, 2013.
- [53] Sun, L. S., et al., «Sympathetic innervation modulates ventricular impulse propagation and repolarisation in the immature rat heart.» *Cardiovascular research*, vol. 27, n° 3, pp. 459-463, 1993.
- [54] Shepherd, N. E. A. L., et al., «Force measurements from voltage-clamped guinea pig ventricular myocytes.» *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 258, n° 2, pp. H452-H459, 1990.
- [55] BHATIA, Sujata K. (ed.), *Engineering biomaterials for regenerative medicine: novel technologies for clinical applications*, Springer Science & Business Media, 2011..
- [56] <https://www.nibib.nih.gov>, «Ingeniería de Tejidos y Medicina.» *Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa*, 2021.
- [57] Lin, Y., et al., «Cardiac adipose tissue contributes to cardiac repair: A review.» *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 17, n° 4, pp. 1137-1153, 2021.
- [58] Lensch, M. W., & Mummery, C. L., «From stealing fire to cellular reprogramming: a scientific history leading to the 2012 Nobel Prize.» *Stem cell reports*, vol. 1, n° 1, pp. 5-17, 2013.
- [59] SKALOVA, Stepanka, et al., «Induced pluripotent stem cells and their use in cardiac and neural regenerative medicine.» *International journal of molecular sciences*, vol. 16, n° 2, pp. 4043-4067, 2015.
- [60] Gálvez-Montón, C., et al., «Cardiac tissue engineering and the bioartificial heart.» *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, vol. 66, n° 5, pp. 391-399, 2013.
- [61] Pagliarosi, O., et al., «Building an artificial cardiac microenvironment: A focus on the extracellular matrix.» *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 8, p. 919, 2020.
- [62] Majid, Q. A., et al., «Natural Biomaterials for Cardiac Tissue Engineering: A Highly Biocompatible Solution.» *Frontiers in cardiovascular medicine*, vol. 7, p. 192, 2020.
- [63] Guarino, Vincenzo & Gloria, Antonio & Raucci, Maria & Ambrosio, Luigi., «Hydrogel-Based Platforms for the Regeneration of Osteochondral Tissue and Intervertebral Disc.» *Polymers*, vol. 4, pp. 1590-1612, 2012.
- [64] Amedo, A., «Diseño y caracterización de matrices 3D de alginato para la encapsulación de células madre mesenquimales como un sistema potencial de diferenciación celular.» Universidad de los Andes, 2018.
- [65] COSTA, Kevin D.; LEE, Eun Jung; HOLMES, Jeffrey W., «Creating alignment and anisotropy in engineered heart tissue: role of boundary conditions in a model three-dimensional culture system.» *Tissue engineering*, vol. 9, n° 4, pp. p. 567-577, 2003.
- [66] Ratner, B. D., et al., «Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.» *MRS Bull*, vol. 31, p. 59, 2006.
- [67] Kang, Y. & Chang, J., «Channels in a porous scaffold: a new player for vascularization.» *Regenerative medicine*, vol. 13, n° 06, pp. 705-715, 2018.
- [68] Chang, S. et al., «Injection molding of chondrocyte/alginate constructs in the shape of facial implants.» *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, vol. 55, n° 4, pp. 503-511, 2001.
- [69] Chang, T., et al., «Biomaterials based cardiac patches for the treatment of myocardial infarction.» *Journal of Materials Science & Technology*, 2021.
- [70] Tormos, C. J., & Madhally, S. V., «Chitosan for cardiac tissue engineering and regeneration.» *Chitosan Based Biomaterials Volume 2. Woodhead Publishing*, pp. 115-143, 2017.
- [71] Brondani D., et al., «A label-free electrochemical immunosensor based on an ionic organic molecule and chitosan-stabilized gold nanoparticles for the detection of cardiac troponin T.» *Analyst*, vol. 139, n° 20, pp. 5200-5208, 2014.
- [72] SARAVANAN, Sekaran, et al., «Graphene oxide-gold nanosheets containing chitosan scaffold improves ventricular contractility and function after implantation into infarcted heart.» *Scientific reports*, vol. 8, n° 1, pp. 1-13, 2018.
- [73] Zhang, H., et al., «Antibacterial and hemostatic performance of chitosan-organic rectorite/alginate composite sponge.» *RSC Advances*, vol. 5, n° 62, pp. 50523-50531, 2015.

- [74] DENG, Biyong, et al., «Delivery of alginate-chitosan hydrogel promotes endogenous repair and preserves cardiac function in rats with myocardial infarction.» *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 103, nº 3, pp. 907-918, 2015.
- [75] CUI, Zhi, et al., «Polypyrrole-chitosan conductive biomaterial synchronizes cardiomyocyte contraction and improves myocardial electrical impulse propagation.» *Theranostics*, vol. 8, nº 10, p. 2752, 2018.
- [76] Francisco, E. & Beltrán N., «Evaluación de permeabilidad y porcentaje hinchamiento en andamios de alginato- quitosano para cultivo de cardiomiocitos.» UAM, CDMX, México, 2018.
- [77] BURSAC, Nenad, et al., «Cultivation in rotating bioreactors promotes maintenance of cardiac myocyte electrophysiology and molecular properties.» *Tissue engineering*, vol. 9, nº 6, pp. 1243-1253, 2003.
- [78] Carrier, R. L. et al., «Perfusion improves tissue architecture of engineered cardiac muscle.» *Tissue engineering*, vol. 8, nº 2, pp. 175-188, 2002.
- [79] Brown, D. A., et al., «Hypoxic cell death is reduced by pH buffering in a model of engineered heart tissue.» *Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology*, vol. 36, nº 2, pp. 94-113, 2008.
- [80] SHIMIZU, Tatsuya, et al., «Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues.» *The FASEB journal*, vol. 20, nº 6, pp. 708-710, 2006.
- [81] Lorenzen-Schmidt, I., et al., «Chronotropic response of cultured neonatal rat ventricular myocytes to short-term fluid shear.» *Cell biochemistry and biophysics*, vol. 46, nº 2, pp. 113-122, 2006.
- [82] Boycott, H. E., et al., «Shear stress triggers insertion of voltage-gated potassium channels from intracellular compartments in atrial myocytes.» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, nº 41, pp. E3955-E3964, 2013.
- [83] NG, Chee Ping; HINZ, Boris; SWARTZ, Melody A., «Interstitial fluid flow induces myofibroblast differentiation and collagen alignment in vitro.» *Journal of cell science*, vol. 118, nº 20, pp. 4731-4739, 2005.
- [84] Dvir, T., et al., «Activation of the ERK1/2 cascade via pulsatile interstitial fluid flow promotes cardiac tissue assembly.» *Tissue engineering*, vol. 13, nº 9, pp. 2185-2193, 2007.
- [85] Pagliari S., et al., «A multistep procedure to prepare pre-vascularized cardiac tissue constructs using adult stem cells, dynamic cell cultures, and porous scaffolds.» *Frontiers in physiology*, vol. 5, p. 210, 2014.
- [86] Puente, B. N., et al., «The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response.» *Cell*, vol. 157, nº 3, pp. 565-579, 2014.
- [87] Pritchett-Corning, K. R., «Euthanasia of neonatal rats with carbon dioxide.» *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, vol. 48, nº 1, pp. 23-27, 2009.
- [88] CHENG, Mingyu, et al., «Insulin-like growth factor-I and slow, bi-directional perfusion enhance the formation of tissue-engineered cardiac grafts.» *Tissue Engineering Part A*, vol. 15, nº 3, pp. 645-653, 2009.
- [89] Radisic, M. et al., «Medium perfusion enables engineering of compact and contractile cardiac tissue.» *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 286, nº 2, pp. H507-H516, 2004.
- [90] Radisic, M., et al., «High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering.» *Biotechnology and bioengineering*, vol. 82, nº 4, pp. 403-414, 2003.
- [91] Carrier R. L., et al., «Effects of oxygen on engineered cardiac muscle.» *Biotechnology and bioengineering*, vol. 78, nº 6, pp. 617-625, 2002.
- [92] Jackman, C. P., et al., «Engineered cardiac tissue patch maintains structural and electrical properties after epicardial implantation.» *Biomaterials*, vol. 159, pp. 48-58, 2018.
- [93] Jackman, C. P., et al., «Dynamic culture yields engineered myocardium with near-adult functional output.» *Biomaterials*, vol. 111, pp. 66-79, 2016.
- [94] Bhaskar, B., et al., «Design and assessment of a dynamic perfusion bioreactor for large bone tissue engineering scaffolds.» *Applied biochemistry and biotechnology*, vol. 185, nº 2, pp. 555-563, 2018.
- [95] Brown, M. et al., «Pulsatile perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering.» *Biotechnology progress*, vol. 24, nº 4, pp. 907-920, 2008.
- [96] Papadaki, M., et al., «Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies.» *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 280, nº 1, pp. H168-H178, 2001.
- [97] Barash Y., et al., «Electric field stimulation integrated into perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering.» *Tissue Engineering Part C: Methods*, vol. 16, nº 6, pp. 1417-1426, 2010.
- [98] LU, Liang, et al., «Design and validation of a bioreactor for simulating the cardiac niche: a system incorporating cyclic stretch, electrical stimulation, and constant perfusion.» *Tissue Engineering Part A*, vol. 19, nº 3-4, pp. 403-414, 2013.

- [99] Visone, R. et al., «Enhancing all-in-one bioreactors by combining interstitial perfusion, electrical stimulation, on-line monitoring and testing within a single chamber for cardiac constructs,» *Scientific reports*, vol. 8, n° 1, pp. 1-13, 2018.
- [100] Moon, S., et al., «Electrically stimuable indium tin oxide plate for long-term in vitro cardiomyocyte culture,» *Biomaterials research*, vol. 24, n° 1, pp. 1-8, 2020.
- [101] Tandon N. et al., «Electrical stimulation systems for cardiac tissue engineering,» *Nature protocols*, vol. 4, n° 2, p. 155, 2009.
- [102] Mohamed M. A., et al., «Electrical Stimulation of Artificial Heart Muscle: a look into the electrophysiological and genetic implications,» *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)*, vol. 63, n° 3, p. 333, 2017.
- [103] Balint R., et al., «Electrical stimulation: a novel tool for tissue engineering,» *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 19, n° 1, pp. 48-57, 2013.
- [104] Lasher RA, Pahnke AQ, Johnson JM, Sachse FB, Hitchcock RW., «Electrical stimulation directs engineered cardiac tissue to an age-matched native phenotype.,» *Journal of tissue engineering.*, n° 3, p. 1–15, 2012.
- [105] Tandon, N., et al., «Optimization of electrical stimulation parameters for cardiac tissue engineering,» *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, vol. 5, n° 6, pp. e115-e125, 2011.
- [106] Chiu, L., et al., «Biphasic electrical field stimulation aids in tissue engineering of multicell-type cardiac organoids,» *Tissue Engineering Part A*, vol. 17, n° 11-12, pp. 1465-1477, 2011.
- [107] Tandon, N., et al., «Surface-patterned electrode bioreactor for electrical stimulation,» *Lab on a Chip*, vol. 10, n° 6, pp. 692-700, 2010.
- [108] Radisic, M., et al., «Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101, n° 52, pp. 18129-18134, 2004.
- [109] Song, S. Y., et al., «Cardiac-mimetic cell-culture system for direct cardiac reprogramming,» *Theranostics*, vol. 9, n° 23, p. 6734, 2019.
- [110] SUN, Xuetao; NUNES, Sara S., «Maturation of human stem cell-derived cardiomyocytes in biowires using electrical stimulation,» *Journal of visualized experiments: JoVE*, n° 123, 2017.
- [111] ITO, Akira, et al., «Induction of functional tissue-engineered skeletal muscle constructs by defined electrical stimulation.,» *Scientific reports*, vol. 4, n° 1, pp. 1-7, 2014.
- [112] HIRT, Marc N., et al., «Functional improvement and maturation of rat and human engineered heart tissue by chronic electrical stimulation,» *Journal of molecular and cellular cardiology*, vol. 74, pp. 151-161, 2014.
- [113] CHAN, Yau-Chi, et al., «Electrical stimulation promotes maturation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells.,» *Journal of cardiovascular translational research*, vol. 6, n° 6, pp. 989-999, 2013.
- [114] Ronaldson-Bouchard, K., et al., «Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells,» *Nature*, vol. 556, n° 7700, pp. 239-243, 2018.
- [115] MA, Ruilian, et al., «Electrical stimulation enhances cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells for myocardial infarction therapy.,» *Antioxidants & redox signaling*, vol. . 28, n° 5, pp. 371-384, 2018.
- [116] Nagamine, K., et al., «Contractile skeletal muscle cells cultured with a conducting soft wire for effective, selective stimulation,» *Scientific reports*, vol. 8, n° 1, pp. 1-9, 2018.
- [117] Adams, S., et al., «Integrated 3D printed scaffolds and electrical stimulation for enhancing primary human cardiomyocyte cultures,» *Bioprinting*, vol. 6, pp. 18-24, 2017.
- [118] Serena, E., et al., «Electrical stimulation of human embryonic stem cells: cardiac differentiation and the generation of reactive oxygen species.,» *Experimental cell research*, vol. 315, n° 20, pp. 3611-3619, 2009.
- [119] Wang, B. et al., «Myocardial scaffold-based cardiac tissue engineering: application of coordinated mechanical and electrical stimulations,» *Langmuir*, vol. 29, n° 35, pp. 11109-11117, 2013.
- [120] Ashtari, K., et al., «Electrically conductive nanomaterials for cardiac tissue engineering,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 144, pp. 162-179, 2019.
- [121] SHI, Huaiyu; WANG, Chenyan; MA, Zhen, «Stimuli-responsive biomaterials for cardiac tissue engineering and dynamic mechanobiology,» *APL bioengineering*, vol. 5, n° 1, p. 011506, 2021.
- [122] Tang, J., et al., «Ultrasmall Au and Ag nanoclusters for biomedical applications: a review,» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, p. 1019, 2020.
- [123] MESSORI, Luigi; MARCON, Giordana., «Gold complexes in the treatment of rheumatoid arthritis,» *Metal ions in biological systems*, vol. 41, pp. 279-304, 2004.

- [124] Pérez-Juste, J., et al., «Gold nanorods: synthesis, characterization and applications,» *Coordination chemistry reviews*, vol. 249, n° 17-18, pp. 1870-1901, 2005.
- [125] SHEVACH, Michal, et al., «Gold nanoparticle-decellularized matrix hybrids for cardiac tissue engineering,» *Nano letters*, vol. 14, n° 10, pp. 5792-5796, 2014.
- [126] Baei, P. et al., «Electrically conductive gold nanoparticle-chitosan thermosensitive hydrogels for cardiac tissue engineering,» *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, vol. 63, pp. 131-41, 2016.
- [127] FLEISCHER, Sharon, et al., «Coiled fiber scaffolds embedded with gold nanoparticles improve the performance of engineered cardiac tissues,» *Nanoscale*, vol. 6, n° 16, pp. 9410-9414, 2014.
- [128] Shevach, M., et al., «Nanoengineering gold particle composite fibers for cardiac tissue engineering,» *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 1, n° 39, pp. 5210-5217, 2013.
- [129] Dvir, T. et al., «Nanowired three-dimensional cardiac patches,» *Nature nanotechnology*, vol. 6, n° 11, pp. 720-725, 2011.
- [130] Martinelli, V., et al., «Carbon nanotubes instruct physiological growth and functionally mature syncytia: nongenetic engineering of cardiac myocytes,» *ACS nano*, vol. 7, n° 7, pp. 5746-5756, 2013.
- [131] LIAO, Huihui, et al., «Improved cellular response on multiwalled carbon nanotube-incorporated electrospun polyvinyl alcohol/chitosan nanofibrous scaffolds,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 84, n° 2, pp. 528-535, 2011.
- [132] Pok, S., et al., «Biocompatible carbon nanotube–chitosan scaffold matching the electrical conductivity of the heart,» *ACS nano*, vol. 8, n° 10, pp. 9822-9832, 2014.
- [133] Elkhenany, H., et al., «Graphene supports in vitro proliferation and osteogenic differentiation of goat adult mesenchymal stem cells: potential for bone tissue engineering,» *Journal of Applied Toxicology*, vol. 35, n° 4, pp. 367-374, 2015.
- [134] MATTEI, Giorgio; GIUSTI, Serena; AHLUWALIA, Arti., «Design criteria for generating physiologically relevant in vitro models in bioreactors,» *Processes*, vol. 2, n° 3, pp. 548-569, 2014.
- [135] FRANCIOLI, Silvia E., et al., «Effect of three-dimensional expansion and cell seeding density on the cartilage-forming capacity of human articular chondrocytes in type II collagen sponges,» *Journal of biomedical materials research Part A*, vol. 95, n° 3, 2010.
- [136] IWASA, Junji, et al., «Effects of cell density on proliferation and matrix synthesis of chondrocytes embedded in atelocollagen gel,» *Artificial Organs*, vol. 27, n° 3, pp. 249-255, 2003.
- [137] Brown, D. A., et al., «Analysis of oxygen transport in a diffusion-limited model of engineered heart tissue,» *Biotechnology and bioengineering*, vol. 97, n° 4, pp. 962-975, 2007.
- [138] Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons, «Cardiac Muscle Tissue Engineering,» de *Biomaterials science: An introduction to materials in Medicine*, Waltham, MA, USA, Academic Press, 2013, p. 1262–1275.
- [139] Zhang Y., et al., «Cell cultures as models of cardiac mechanoelectric feedback,» *Progress in biophysics and molecular biology*, vol. 97, n° 2-3, pp. 367-382, 2008.
- [140] Doran, Pauline M., «Fluid Flow and Mixing,» de *Bioprocess Engineering Principles*, Elsevier Science & Technology Books, 1995, pp. 140,141.
- [141] MAGLIARO, Chiara, et al., «Oxygen consumption characteristics in 3D constructs depend on cell density,» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology,.* vol. 7, p. 251, 2019.
- [142] Doran, P. M., «Heterogeneous Reactions,» de *Bioprocess engineering principles*, Elsevier, 1995, pp. 318,319.
- [143] De Almeida, D. A., et al., «Pectin-capped gold nanoparticles synthesis in-situ for producing durable, cytocompatible, and superabsorbent hydrogel composites with chitosan,» *International journal of biological macromolecules*, vol. 147, pp. 138-149, 2020.
- [144] Vashist, A., et al., «Recent advances in hydrogel based drug delivery systems for the human body,» *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 2, n° 2, pp. 147-166, 2014.
- [145] Wei, L., et al, «Chitosan/Alginate Hydrogel Dressing Loaded FGF/VE-Cadherin to Accelerate Full-Thickness Skin Regeneration and More Normal Skin Repairs,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, n° 3, p. 1249, 2022.
- [146] Zhang, M., et al., «Alginate-chitosan oligosaccharide-ZnO composite hydrogel for accelerating wound healing,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 266, p. 118100, 2021.
- [147] Qi, Quan, et al., «Local intramyocardial delivery of bioglass with alginate hydrogels for post-infarct myocardial regeneration,» *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 129, p. 110382, 2020.

- [148] Geng, Z., et al., «Preparation and characterization of a dual cross-linking injectable hydrogel based on sodium alginate and chitosan quaternary ammonium salt,» *Carbohydrate Research*, vol. 507, p. 108389, 2021.
- [149] Sood, A., et al., «Multifunctional gold coated iron oxide core-shell nanoparticles stabilized using thiolated sodium alginate for biomedical applications,» *Materials Science and Engineering: C*, vol. 80, pp. 274-281, 2017.
- [150] Shen, K., et al., «Self-Assembled Polysaccharide–Diphenylalanine/Au Nanospheres for Photothermal Therapy and Photoacoustic Imaging,» *ACS omega*, vol. 4, n° 19, pp. 18118-18125, 2019.
- [151] Prabha, G. & Raj, V., «Sodium alginate–polyvinyl alcohol–bovin serum albumin coated Fe₃O₄ nanoparticles as anticancer drug delivery vehicle: doxorubicin loading and in vitro release study and cytotoxicity to HepG2 and L02 cells,» *Materials Science and Engineering: C*, vol. 79, pp. 410-422, 2017.
- [152] Bolaños, K., et al., «Capping gold nanoparticles with albumin to improve their biomedical properties,» *International journal of nanomedicine*, vol. 14, p. 6387, 2019.
- [153] MANATUNGA, Danushika C., et al., «pH responsive controlled release of anti-cancer hydrophobic drugs from sodium alginate and hydroxyapatite bi-coated iron oxide nanoparticles,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 117, pp. 29-38, 2017.
- [154] CARRIER, Rebecca L., et al., «Effects of oxygen on engineered cardiac muscle,» *Biotechnology and bioengineering*, vol. 78, n° 6, pp. 617-625, 2002.
- [155] Liu, Z., et al., «Intracellular Recording of Cardiomyocytes by Integrated Electrical Signal Recording and Electrical Pulse Regulating System,» *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, vol. 9, 2021.
- [156] Pretorius, D., et al., «Engineering of thick human functional myocardium via static stretching and electrical stimulation,» *Iscience*, vol. 25, n° 3, p. 103824, 2022.
- [157] Nair, R. S., et al., «A gold nanoparticle coated porcine cholecyst-derived bioscaffold for cardiac tissue engineering,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 157, pp. 130-137, 2017.
- [158] Nezhad-Mokhtari, P., et al., «An injectable chitosan-based hydrogel scaffold containing gold nanoparticles for tissue engineering applications,» *International journal of biological macromolecules*, vol. 154, 2020.
- [159] TENTOR, Fabio R., et al., «Scaffolds based on chitosan/pectin thermosensitive hydrogels containing gold nanoparticles,» *International journal of biological macromolecules*, vol. 102, pp. 1186-1194, 2017.
- [160] Marsano, A. et al., «Engineering of functional contractile cardiac tissues cultured in a perfusion system,» *30th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 2008.
- [161] Lesman, Ayelet et al., «Transplantation of a tissue-engineered human vascularized cardiac muscle,» *Tissue Engineering Part A*, vol. 16, n° 1, pp. 115-125, 2010.
- [162] Beauchamp P., et al., «3D co-culture of hiPSC-derived cardiomyocytes with cardiac fibroblasts improves tissue-like features of cardiac spheroids,» *Frontiers in molecular biosciences*, vol. 7, p. 14, 2020.