



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Cuajimalpa

Departamento de Procesos y Tecnología
División de Ciencias Naturales e Ingeniería

**Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro
para funcionalizar andamios de alginato-quitosano
para el cultivo de células cardíacas**

Idónea Comunicación de Resultados
que para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias Naturales e Ingeniería

Presenta:

I.B. María del Rosario Marcial Becerril

Directora

Dra. Nohra Elsy Beltrán Vargas

Asesores

Dr. José Campos Terán

Dra. Izlia Jazheel Arroyo Maya

noviembre 2024, 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 agosto de 2021 a diciembre de 2023 en el Laboratorio de Superficies e Interfaces del Departamento de Procesos y Tecnología (DPT), de la DCNI.

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, el día 30 de noviembre del año 2024, la que suscribe, María del Rosario Marcial Becerril, alumna 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 autora intelectual de la tesis titulada “Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro para funcionalizar andamios de alginato-quitosano para el cultivo de células cardíacas” realizada bajo la dirección de la Dra. Nohra Elsy 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.



María del Rosario Marcial Becerril

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“La que suscribe, María del Rosario Marcial Becerril, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta tesis son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, 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 éste 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 mis directores y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”



María del Rosario Marcial Becerril

DECLARACIÓN DE NO LUCRO

La que suscribe, María del Rosario Marcial Becerril, alumna 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 María del Rosario Marcial Becerril.



María del Rosario Marcial Becerril

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana por la oportunidad de desarrollarme académica y profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, CONAHCYT, por el otorgamiento de la beca con número CVU: 1144657 para la realización de los estudios de maestría.

A mi directora, la Dra. Nohra Elsy Beltrán Vargas, cuya pasión por la investigación y la innovación ha sido una fuente constante de inspiración. Su liderazgo, orientación y dedicación han sido fundamentales para el logro de los objetivos establecidos.

Al Dr. José Campos Terán y a la Dra. Izlia Jahzeel Arroyo Maya por su orientación experta y apoyo constante. Al Dr. Juan Carlos Ruiz Bucio por su apoyo, enseñanza y asesoría.

A todos los que conforman el grupo de Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa, el espacio que compartimos para discutir ideas y conocimientos fue invaluable durante la realización de este proyecto. Me alegra haber tenido la oportunidad de aprender y crecer profesionalmente junto a ustedes, y siempre es un honor compartir los logros que hemos alcanzado juntos.

A mi madre, Angélica, por su apoyo, esfuerzo y motivación en cada paso de mi vida académica. A mi querida abuelita, Blanca: aunque ya no estés físicamente entre nosotros, agradezco todo tu amor y presencia en mi vida. Gracias por toda la motivación, fuerza y enseñanzas, cada lección ha contribuido a formar la persona que soy hoy.

A mis amigos, Fer y Mitzi: Gracias por estar tanto en los momentos de alegría como en los desafíos. Su amistad, compañía, risas y apoyo han sido un gran soporte en mi vida.

A Manu, mi compañero y confidente. Agradezco infinitamente tu constante aliento, paciencia y amor. Gracias por acompañarme en este viaje, por sostenerme cuando estoy a punto de rendirme y por ser mi mayor fan y celebrar cada uno de mis éxitos por pequeño que sea. Este logro también es tuyo. Te amo.

Abreviaturas

ALG	Alginato
ATP	Adenosín trifosfato
AuNP	Nanopartículas de oro
CS	Quitosano
CM	Cardiomiocitos
CNT	Nanotubos de carbono / Carbon nanotubes
DDA	Grado de desacetilación
DLS	Dynamic light scattering / Dispersión dinámica de luz
ECV	Enfermedades cardiovasculares
GO	Óxido de grafeno
HAP	Hidroxiapatita
HEMA	Material hidroxietilmetraquilato - hidrófilo
HS	Suero de caballo
H&E	Tinción de hematoxilina y eosina
IAM	Infarto agudo de miocardio
IT	Ingeniería de tejidos
ITC	Ingeniería de tejidos cardiacos
MEC/ECM	Matriz extracelular / Extracellular matrix
M199	Medio de cultivo para células cardíacas
NP	Nanopartículas
SEM	Scanning electron microscopy /Microscopía electrónica de barrido
SFB	Suero Fetal Bovino
SPR	Surface plasmon resonance / Plasmón de resonancia superficial
STEMI	Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST
TEM	Transmission electron microscopy / Microscopía electrónica de transmisión
PC	Corcho pirolizado
PCL	Policaprolactona
PEG	Polietilenglicol
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
PNIPAAm	Poli(N-isopropilacrilamida)

PNPs	Partículas poliméricas
PU	Poliuretano
PVA	Ácido polivinílico
PZ	Potencial zeta
ROS	Especies reactivas de oxígeno

Índice de figuras

Figura 1. Ingeniería de tejidos cardiacos.	8
Figura 2. Tipos de biomateriales empleados en la ingeniería de tejidos.	12
Figura 3. Estructura química del alginato de sodio.	15
Figura 4. Estructura química del quitosano.	17
Figura 5. Representación esquemática de la interacción molecular alginato-quitosano.	19
Figura 6. Intervalo de plasmón de resonancia de superficie de AuNP en función de su morfología.	32
Figura 7. Usos de las nanopartículas de oro en ingeniería de tejidos cardiacos.	34
Figura 8. Esquema de configuraciones ópticas del Zetasizer Nano series para mediciones de DLS.	37
Figura 9. Esquema de configuraciones ópticas del Zetasizer Nano series para mediciones de ZP.	38
Figura 10. Configuración de un microscopio electrónico de transmisión.	40
Figura 11. Formación de núcleos de PLGA.	41
Figura 12. Núcleos de PLGA.	42
Figura 13. Núcleos de PLGA-Alginato.	43
Figura 14. Formación de nanosemillas.	43
Figura 15. Formación de precursores, núcleos de PLGA+nanosemillas de oro.	44
Figura 16. Formación de las nanopartículas de oro y oro-alginato.	45
Figura 17. Esquema general para la síntesis de nanopartículas de oro y oro-alginato.	45

Figura 18. Gráfico de distribución de tamaño obtenido por DLS para los lotes 4-7.....	54
Figura 19. Plasmón de resonancia superficial de AuNP y AuNP-ALG correspondientes a los lotes 4-7.	56
Figura 20. Fotomicrografías obtenidas por TEM para AuNP y AuNP-ALG de los lotes 1-4.	57
Figura 21. Fotomicrografías obtenidas por TEM para AuNP y AuNP-ALG a través del tiempo, correspondientes a los lotes 4-7.....	58
Figura 22. Efecto del pH sobre el tamaño de las nanopartículas de oro y oro-alginato a 2 y 24 h.	59
Figura 23. Efecto del pH sobre la carga superficial de las nanopartículas de oro y oro-alginato a 2 y 24 h.	60
Figura 24. SPR de AuNP y AuNP-ALG tras 24 horas de inmersos en medios con pH diferente.....	61
Figura 25. Fotomicrografías capturadas por SEM de los andamios de ALG-CS funcionalizados con AuNP y AuNP-ALG mediante los métodos A y B.	62
Figura 26. Porcentaje de hinchamiento a 3 meses en andamios funcionalizados por el método A.	64
Figura 27. Porcentaje de hinchamiento a 3 meses en andamios funcionalizados por el método B.	65
Figura 28. Porcentaje de hinchamiento a 3 meses en andamios funcionalizados por el método C.	66
Figura 29. Porcentaje de degradación a 7 días y 2 meses de andamios funcionalizados por el método A.	67

Figura 30. Porcentaje de degradación a 2 meses de andamios funcionalizados por los métodos A, B y C.	68
Figura 31. Fotomicrografías obtenidas mediante SEM del andamio de ALG-CS sin nanopartículas, tras haber sido sometido a estudios de degradación en agua Milli-Q durante 7 días y 2 meses	69
Figura 32. Fotomicrografías obtenidas mediante SEM para andamios de ALG-CS funcionalizados con dos concentraciones de AuNP y AuNP-ALG utilizando tres métodos diferentes.	69
Figura 33. Fotomicrografías representativas de secciones transversales de constructos por método de funcionalización con una concentración 2:50 por el método H&E.	71
Figura A1. Gráficos de correlación de las nanopartículas sintetizadas.	100
Figura A2a y A2b. Fotomicrografías obtenidas por SEM para AuNP y AuNP-ALG correspondientes a los lotes 4-6.....	100

Índice de tablas

Tabla 1. Uso de alginato en ingeniería de tejidos cardiacos.....	16
Tabla 2. Uso de quitosano en ingeniería de tejidos cardiacos.	18
Tabla 3. Andamios de alginato-quitosano aplicados en ingeniería de tejidos.....	20
Tabla 4. Métodos de síntesis de nanomateriales	24
Tabla 5. Ventajas y desventajas de los principales nanomateriales utilizados en ingeniería de tejidos*	27
Tabla 6. Investigaciones recientes en la aplicación de nanomateriales en la ingeniería de tejido cardiaco.....	29
Tabla 7. Métodos de funcionalización de andamios.....	48
Tabla 8. Mediciones tomadas a diferentes tiempos de los andamios inmersos en el medio de hinchamiento.	49
Tabla 9. Tamaños (nm) de los nanomateriales obtenidos durante el proceso de síntesis de AuNP y AuNP-ALG mediante DLS.	53
Tabla 10. Potencial Z (mV) de los nanomateriales obtenidos durante el proceso de síntesis de AuNP y AuNP-ALG mediante DLS.....	55
Tabla 11. Tamaño y potencial zeta de AuNP y AuNP-ALG respecto al tiempo.	58
Tabla 12. Características de los andamios funcionalizados	61
Tabla 13. Porcentaje de porosidad de andamios de ALG-CS funcionalizados.	63
Tabla 14. Porcentajes de hinchamiento máximos obtenidos tras 2 meses de inmersos en el medio.	64
Tabla 15. Porcentajes de degradación máximos obtenidos tras 2 meses de inmersos en el medio.	68

Contenido

1.	Introducción.....	1
2.	Antecedentes.....	4
2.1.	Enfermedades cardiovasculares e infarto agudo de miocardio.....	4
2.2.	Opciones terapéuticas.....	5
2.3.	Ingeniería de Tejidos.....	7
2.4.	Andamios en Ingeniería de Tejidos.....	8
2.4.1.	Biomateriales.....	11
2.4.1.1.	Sintéticos	12
2.4.1.2.	Naturales.....	13
2.4.1.3.	Hidrogeles.....	14
2.4.1.4.	Alginato	15
2.4.1.5.	Quitosano.....	17
2.4.2.	Andamios de alginato-quitosano.....	19
2.5.	Nanomateriales en la Ingeniería de Tejidos.....	21
2.5.1.	Propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales.....	22
2.5.1.1.	Tamaño	23
2.5.1.2.	Propiedades superficiales	23
2.5.1.3.	Forma.....	23
2.5.1.4.	Composición y pureza	24
2.5.2.	Tipos de Nanomateriales.....	24
2.5.2.1.	Nanopartículas poliméricas	24
2.5.2.2.	Nanomateriales basados en carbono.....	25
2.5.2.3.	Nanomateriales óxido-metálicos	25
2.5.2.4.	Nanomateriales metálicos.....	26
2.5.2.5.	Nanocompuestos.....	26
2.6.	Nanomateriales en Ingeniería de Tejido Cardíaco.....	27
2.6.1.	Nanopartículas de oro en la generación de tejido cardíaco.....	28
3.	Justificación.....	34
4.	Pregunta de investigación.....	35
5.	Hipótesis.....	35

6.	Objetivos.....	35
6.1.	Objetivo general.....	35
6.2.	Objetivos específicos.....	35
7.	Materiales y métodos experimentales.....	36
7.1.	Descripción de las técnicas experimentales empleadas.....	36
7.1.1.	Técnicas espectroscópicas.....	36
7.1.1.1.	Dispersión dinámica de luz y potencial Z	36
7.1.1.2.	Plasmón de resonancia superficial.....	38
7.1.2.	Técnicas de microscopía.....	39
7.1.2.1.	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	39
7.1.2.2.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	40
7.2.	Métodos experimentales.....	41
7.2.1.	Síntesis de nanopartículas de oro.....	41
7.2.2.	Caracterización de las nanopartículas de oro (AuNP) y oro-alginato (AuNP-ALG).....	45
7.2.2.1.	Medición de tamaño y potencial Z	45
7.2.2.2.	Espectroscopía de Uv-Vis	46
7.2.2.3.	Estabilidad de las AuNP y AuNP-ALG a diferentes pH.....	46
7.2.2.4.	Microscopía electrónica de barrido y de transmisión.....	46
7.2.3.	Elaboración de andamios de alginato-quitosano (ALG-CS).....	47
7.2.4.	Funcionalización de andamios de ALG-CS.....	47
7.2.5.	Caracterización de andamios de ALG-CS-AuNP y ALG-CS-AuNPALG....	48
7.2.5.1.	Microscopía electrónica de barrido	48
7.2.5.2.	Pruebas de hinchamiento	49
7.2.5.3.	Estudios de degradación	49
7.2.5.4.	Porosidad	50
7.2.6.	Pruebas biológicas.....	50
7.2.6.1.	Cultivo de cardiomiocitos.....	50
7.2.6.2.	Procesamiento histológico de los constructos	51
7.2.6.3.	Tinción hematoxilina-eosina (H&E)	52
7.2.7.	Procesamiento de datos y análisis estadístico.....	52

8.	Resultados.....	52
8.1.	Caracterización de las nanopartículas sintetizadas.....	52
8.1.1.	Tamaño, potencial Z.....	52
8.1.2.	Plasmón de resonancia superficial.....	55
8.1.3.	Morfología.....	56
8.1.4.	Estabilidad de las AuNP y AuNP-ALG.....	57
8.2.	Caracterización de los andamios de ALG-CS funcionalizados.....	61
8.2.1.	Características de los andamios de ALG-CS.....	61
8.2.2.	Microscopía electrónica de barrido.....	62
8.2.3.	Porosidad de los andamios.....	63
8.2.4.	Pruebas de hinchamiento.....	63
8.2.5.	Estudios de degradación.....	66
8.3.	Pruebas biológicas.....	70
9.	Discusión.....	71
10.	Conclusiones.....	77
11.	Perspectivas.....	78
12.	Referencias.....	79
13.	Anexos.....	100

1. Introducción

La cardiopatía isquémica ocupa el primer lugar de causas de muerte a nivel mundial con una tasa del 16% (OMS, 2020). Esta enfermedad es causada por una acumulación de grasa en la arteria coronaria que conlleva a la oclusión parcial o completa de la arteria y a su vez a una considerable reducción o pérdida del flujo sanguíneo al tejido cardíaco dando lugar a una isquemia miocárdica o una oclusión completa de la arteria coronaria que ocasiona un infarto agudo de miocardio (IAM) (Qasim et al., 2019; Steenbergen & Frangiannis, 2012).

Durante un IAM ocurre la pérdida de cardiomiocitos funcionales debido a los eventos de muerte celular (necrosis y apoptosis) que son desencadenados. La capacidad de autorrenovación o regeneración de las células cardíacas es limitada, esto impide que el tejido dañado sea reemplazado y que las personas sobrevivientes a un IAM sufran de insuficiencia cardíaca y en ocasiones una posterior muerte (Pushp & Gupta, 2021)

Aunque se tienen distintos tratamientos para tratar los daños generados tras sufrir un IAM como el tratamiento farmacológico empleando agentes trombolíticos o el uso de dispositivos de asistencia ventricular que pueden restaurar la función cardiovascular, en ocasiones no son bastos para tratar una lesión progresiva, lo que lleva a la necesidad de reemplazar el corazón por medio de un trasplante, sin embargo, esta opción presenta diferentes limitantes como la reacción inmunitaria, el rechazo del órgano y una escasez de donantes (Miller et al., 2019).

Debido a todas estas problemáticas, la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos han buscado crear terapias alternativas para la regeneración de las características estructurales y funcionales afectadas, una de estas alternativas es la terapia celular, que consiste en la inyección de células troncales y dirigirlas al sitio de la lesión con la finalidad de regenerar el tejido dañado, sin embargo, a pesar de que este tipo de células tienen una alta capacidad de proliferación se ha demostrado que posterior a la inyección de las células puede ocurrir inflamación aguda y lesión, es decir, se presenta una baja tasa de retención o supervivencia celular y arritmias debido a una integración eléctrica inadecuada (Bushkalova et al., 2019; Pushp & Gupta, 2021).

La ingeniería de tejidos se ha convertido en un enfoque prometedor al buscar la generación de tejido a partir del cultivo de células in vivo sobre un soporte o andamio para posteriormente ser implantado al paciente y con ello inducir la regeneración o reparación del corazón (Tamimi et al., 2020). Los andamios fabricados para aplicaciones de ingeniería de tejidos deben cumplir con ciertas características que permitan el adecuado crecimiento, proliferación y diferenciación celular. Deben ser altamente porosos, mecánicamente fuertes, biocompatibles y biodegradables (Li et al., 2020).

La creación de soportes celulares se logra mediante el empleo de biomateriales, ya sean naturales o sintéticos. Entre los materiales naturales, se destacan los hidrogeles, biopolímeros con una variedad de propiedades, como su capacidad para imitar la biomecánica de los tejidos blandos naturales, la capacidad de ajuste de tamaño de poro, la biocompatibilidad y la facilidad de funcionalización (Xu et al., 2022). El alginato (ALG) y el quitosano (CS) son dos biopolímeros encontrados en la naturaleza que son utilizados frecuentemente en la ingeniería de tejidos; el primero, es obtenido de algas pardas, tiene la capacidad de gelificar en condiciones fisiológicas (37 °C, pH 7.4), posee una estructura similar a la matriz extracelular, baja toxicidad y su carga negativa permite la adecuada adherencia celular; el segundo, es obtenido por desacetilación de la quitina, es de estructura cristalina y posee una alta rigidez y actividad antifúngica y antimicrobiana, además de tener la capacidad de ser modificado de manera química o enzimática (Han et al., 2010; Lee et al., 2018).

La combinación de ambos biopolímeros a través de la unión covalente o reticulación da lugar a una estructura en red tridimensional y andamios con propiedades mejoradas, superando las limitaciones asociadas con el uso de polímeros individuales, como la falta de unión celular en el CS o la baja rigidez del ALG (Tamimi et al., 2020). Si bien se ha informado ampliamente sobre el uso de andamios de ALG-CS en estudios de regeneración de tejidos óseos y cartilagosos (D. Liu et al., 2021; Phatchayawat et al., 2022; Sadeghianmaryan et al., 2022; Yousefiasl et al., 2023), su aplicación en la ingeniería de tejidos cardíacos ha sido poco explorada (Beltran-Vargas et al., 2022; Ceccaldi et al., 2014; Deng et al., 2015; Tamimi et al., 2020).

En los últimos años, se ha adoptado una estrategia para mejorar las propiedades fisicoquímicas de los andamios mediante su funcionalización. Esta técnica implica la modificación de la superficie de los andamios a través de modificaciones químicas, el empleo de moléculas bioactivas o la incorporación de partículas (Tallawi et al., 2015). Los nanomateriales o materiales nanoestructurados como nanofibras, nanotubos, nanopartículas, entre otros, tienen la capacidad al unirse a la superficie del andamio y de reemplazar algunas funciones del entorno biológico natural favoreciendo la adherencia, migración y proliferación celular al mejorar la interacción célula-material (Amnieh et al., 2023; Eftekhari et al., 2020; Fadilah et al., 2022; Yelkuvan et al., 2023)

Las nanopartículas, especialmente las metálicas, han encontrado aplicación en el ámbito de la biomedicina gracias a sus excelentes características fisicoquímicas y biológicas. Estas incluyen la capacidad de controlar su morfología, una fácil modificación química y la capacidad de ofrecer un alto grado de control sobre las propiedades de los andamios, particularmente las mecánicas, mejorando la rigidez, la flexibilidad o disminuyendo la tasa de degradación (Chen et al., 2020; H. Li et al., 2020). Particularmente, las nanopartículas de oro (AuNP) han sido catalogadas como citocompatibles, hemocompatibles y biocompatibles que, en conjunto con sus propiedades conductoras, su fácil funcionalización y ajuste a diferentes tamaños y formas, las vuelve materiales ideales para el cultivo celular (da Silva et al., 2020; P. P. P. ; Kumar et al., 2021; Patil et al., 2022).

Se ha reportado que los andamios de materiales como el quitosano, gelatina, funcionalizados con AuNP para el cultivo de cardiomiocitos exhiben mayor rigidez y durabilidad y mejoran la conductividad eléctrica del andamio favoreciendo la comunicación celular y a su vez la adhesión y viabilidad celular (Esmaeili et al., 2024a; Li et al., 2022; Nair et al., 2017; Navaei et al., 2016).

En el presente trabajo se realizó un protocolo para la síntesis estandarizada de nanopartículas con propiedades reproducibles, además de determinar sus propiedades fisicoquímicas y evaluar las propiedades de andamios funcionalizados con ellas.

2. Antecedentes

2.1. Enfermedades cardiovasculares e infarto agudo de miocardio.

Las enfermedades cardiovasculares abarcan una serie de trastornos que afectan al corazón y los vasos sanguíneos. A pesar de ser en gran medida prevenibles, constituyen la principal causa de mortalidad a nivel mundial (WHO, 2021). Dentro de las ECV encontramos principalmente la enfermedad cardíaca coronaria, la enfermedad cerebrovascular, la enfermedad arterial periférica y la cardiopatía isquémica, siendo esta última la mayor responsable de mortalidad mundial con una tasa del 16% (OMS, 2020; Pastena et al., 2024).

La cardiopatía isquémica es una patología en la que ocurre una disminución de la capacidad del corazón para bombear la sangre de manera adecuada. La formación de placa causada por la acumulación gradual de grasa, colesterol u otras sustancias conllevan a la obstrucción parcial o total de la arteria coronaria, lo que, conduce a un desequilibrio entre el suministro y la demanda de sangre en el músculo cardíaco debido a la significativa reducción del flujo sanguíneo (NHLBI, 2022; Jensen et al., 2020). Esto puede tener varias consecuencias como angina de pecho, insuficiencia cardíaca o isquemia miocárdica (Fishbein et al., 2022).

En situaciones de isquemia miocárdica, la pérdida completa de sangre en el tejido miocárdico ocasiona una disminución del metabolismo aeróbico que conlleva a un agotamiento de adenosín trifosfato (ATP) y la acumulación de sustancias nocivas como las especies reactivas de oxígeno o algunos productos del metabolismo anaerobio como el lactato. Todos estos eventos pueden resultar en cambios estructurales en los cardiomiocitos que pueden ser reversibles si el flujo es restaurado de manera inmediata, sin embargo, si esto no sucede, ocurren eventos de muerte celular y con ello la pérdida de cardiomiocitos, este proceso es denominado Infarto Agudo de Miocardio (IAM) (Steenbergen & Frangogiannis, 2012).

Los cardiomiocitos dañados poseen una baja tasa de autorrenovación o regeneración (cerca de 0.5-1% por año) (Qiu et al., 2023), por ello, tras el IAM, se produce una serie de cambios patológicos, la reacción inflamatoria desarrollada conduce a altos niveles de metaloproteinasa que degrada la matriz extracelular causando una expansión del infarto y el

adelgazamiento de la pared celular y finalizando con la cicatrización del colágeno para resistir la deformación y la ruptura (Deng et al., 2015), resultando en la pérdida de la función contráctil y conduciendo a casos de insuficiencia cardiaca o en casos avanzados el deceso del paciente (Mehrani et al., 2020; Pushp & Gupta, 2021; Xing, 2014).

La estrategia más efectiva para prevenir un episodio de infarto crítico es el restablecimiento de la perfusión sanguínea lo antes posible, generalmente mediante terapias de fibrinólisis o la intervención coronaria percutánea, lo cual puede disminuir el tamaño del infarto. Sin embargo, en algunos casos la reperfusión puede generar un mayor daño celular y una serie de complicaciones al inducir una respuesta inflamatoria acelerada y disfunción vascular, lo que resulta en hasta un 50 % del daño miocárdico final (Mehrani et al., 2020; Steenbergen & Frangogiannis, 2012).

2.2. Opciones terapéuticas

Las opciones terapéuticas actuales para el IAM incluyen la terapia de reperfusión y la farmacoterapia cardioprotectora, que se emplean para prevenir la remodelación del tejido y/o la progresión hacia la insuficiencia cardíaca.

En casos de oclusión completa o infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (STEMI, por sus siglas en ingles), el principal objetivo es restaurar el flujo sanguíneo mediante reperfusión inmediata que se logra por medio de una intervención coronaria percutánea o terapia trombolítica, donde se emplean fármacos inhibidores capaces de disolver el trombo formado y antiplaquetarios y anticoagulantes que previenen la formación de nuevos coágulos (Fathima, 2021). Por otra parte, en situaciones de oclusión parcial, se administran oxígeno, aspirina y nitratos para reducir la isquemia o a cirugía de revascularización miocárdica para suministrar sangre a zonas con bajo nivel de irrigación sanguínea (Basit et al., 2023).

Tras un IAM y con la finalidad de prevenir el aumento de daño generado o complicaciones a largo plazo se recurre al uso de medicamentos cardioprotectores como bloqueadores de los receptores β -adrenérgicos (β -AR), los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

(ECA), los bloqueadores de los receptores de angiotensina (AR), los bloqueadores de los receptores de mineralocorticoides, la hidralazina y los nitratos, que ayudan a la disminución de la presión arterial, a la mejora de la función cardíaca y a la prevención de la remodelación del tejido cardíaco (Zhao et al., 2020).

Aunque estas estrategias han demostrado ser efectivas para detener el deterioro de la función cardíaca, la mayoría de los pacientes eventualmente desarrollan insuficiencia cardíaca debido al daño irreversible, lo que puede requerir una intervención quirúrgica para implantar un dispositivo médico o un trasplante de corazón (Ghovvati et al., 2022). Sin embargo, existen diversas problemáticas asociadas.

Por ejemplo, la implantación de dispositivos médicos, como válvulas mecánicas, como alternativa para restablecer las funciones del corazón, como la restauración del ritmo cardíaco o del flujo sanguíneo, o la reducción de la tensión de cizallamiento en una arteria obstruida, conlleva algunas limitaciones, como cirugías invasivas, necesidad de tratamientos de mantenimiento y anticoagulación a largo plazo, vida útil limitada, y riesgos de infecciones y trombosis (Camci-Unal et al., 2014).

Por otra parte, cuando el daño en pacientes sobrevivientes a un infarto se encuentra en una etapa terminal, se debe recurrir al reemplazo del órgano dañado por medio de un trasplante. Sin embargo, esto presenta distintas problemáticas dentro de las cuales destaca la baja oferta de donantes que no puede satisfacer la alta demanda de trasplantes. Además, aunque la terapia inmunosupresora ha mejorado la tasa de supervivencias posterior al trasplante, aún se presentan algunos otros problemas, como el rechazo del órgano y los efectos adversos de la inmunosupresión, limitando la eficacia de este método (Gupta & Krim, 2019).

Ante las diversas problemáticas que presentan los tratamientos actuales sugeridos tras un IAM, se ha trabajado en el desarrollo de nuevas estrategias que permitan reducir la carga de este tipo de patologías. La medicina regenerativa es un área dedicada a ello y una de las estrategias que han desarrollado es la terapia celular que consiste en la inyección de células troncales y mediar su dirección hacia el sitio de la lesión con la finalidad de regenerar el

tejido dañado, sin embargo, a pesar de que este tipo de células tienen una alta capacidad de proliferación, ha sido demostrado que tras la inyección se presenta una reacción inflamatoria aguda, una baja de retención o supervivencia celular y el desarrollo de arritmias al no haber una integración eléctrica adecuada (Bushkalova et al., 2019; Pushp & Gupta, 2021).

El ambiente ácido y la matriz extracelular dañada resultantes de un IAM impiden una respuesta satisfactoria de los tratamientos basados en terapia celular, para resolver algunas de estas problemáticas, la ingeniería de tejidos y su implementación del uso de biomateriales, se ha convertido en un enfoque prometedor, el cultivo de células en un material de andamiaje puede mejorar la retención celular, mejorando la supervivencia celular y restaurando la función cardíaca (Scafa Udriște et al., 2023).

2.3. Ingeniería de Tejidos

La ingeniería de tejidos (IT) es una estrategia terapéutica cuyo objetivo se ha dirigido hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que puedan mantener, mejorar y/o restaurar la funcionalidad de tejidos que hayan sido dañados por algún tipo de patología. Involucra tres elementos principales: una fuente celular, un soporte o andamio y factores bioquímicos necesarios para la viabilidad celular o biorreactores de cultivo de tejidos (Figura 1). Este proceso es realizado generalmente *in vitro* y da como resultado tejido diseñado que puede usarse para varios tipos de implantes o reemplazos quirúrgicos (De Isla et al., 2010; Liau et al., 2012; Yartzoff, 2019).

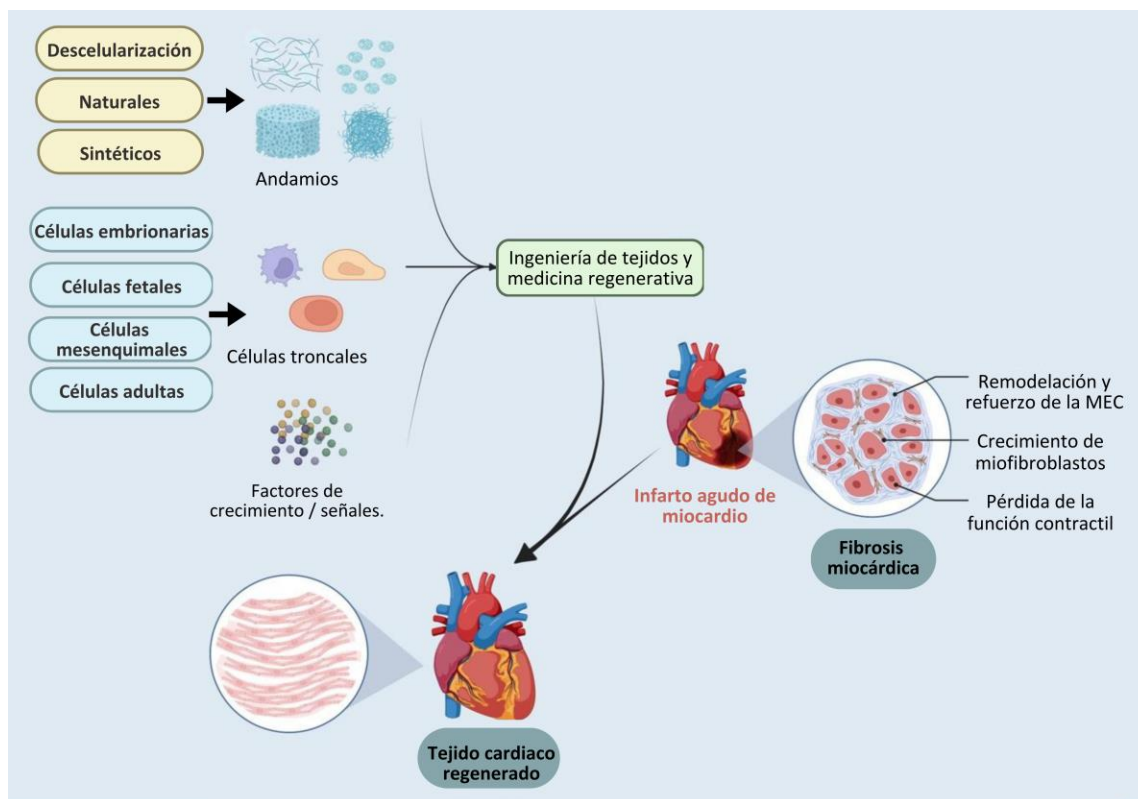


Figura 1. Ingeniería de tejidos cardíacos. (Adaptada de Akbarzadeh et al., 2023)

La ingeniería de tejidos cardíacos (ITC) tiene el objetivo de crear tejidos musculares cardíacos contráctiles, capaces de reemplazar partes faltantes o disfuncionales del corazón. Los parches cardíacos en su mayoría son creados utilizando materiales nanofibrosos e hidrogeles y cardiomiocitos o células troncales (Amiryaghoubi et al., 2024), seguidos de la aplicación de señales biológicas y físicas inductivas (mecánicas, eléctricas) para promover la maduración y función del tejido, esto último mediante el cultivo en biorreactores bajo perfusión que además facilita un transporte eficiente de nutrientes y oxígeno. (Chaudhuri et al., 2017; Majid et al., 2020; Sapir et al., 2013).

2.4. Andamios en ingeniería de tejidos

Como se mencionó anteriormente, los andamios sirven como un soporte para las células cultivadas hasta que estas secretan su propia matriz extracelular (MEC) y forman un tejido (Chaudhuri et al., 2017). Los andamios fabricados para aplicaciones de ingeniería de tejidos deben cumplir con ciertas características que permitan el adecuado crecimiento, proliferación

y diferenciación celular. Deben ser altamente porosos, mecánicamente fuertes, biocompatibles y biodegradables, además de funcionar como vehículos adhesivos para células y moléculas bioactivas (Echeverría-Molina et al., 2021; H. Li et al., 2020).

Además de la fuente celular y del microambiente proporcionado para inducir el crecimiento celular, la elección del biomaterial y el diseño del andamio juegan un papel vital. Un andamio adecuado debe de imitar la estructura de la MEC y tener una porosidad adecuada que promueva la vascularización, la difusión de oxígeno y nutrientes. A pesar de la diversidad existente de los andamios estudiados para aplicaciones en IT, todos deben de cumplir con ciertos criterios fundamentales que son brindados por los biomateriales que los componen.

Biocompatibilidad

La biocompatibilidad se refiere a la capacidad de un material para funcionar con una respuesta adecuada del huésped. Los andamios deben de ser altamente biocompatibles con la finalidad de evitar una respuesta inmune e inflamatoria aguda que pudiera llevar al rechazo o a un mayor índice de lesión. También debe de resistir a la colonización bacteriana y al desarrollo de coágulos sanguíneos que pudieran provocar un infarto tisular proximal o distal (Chaudhuri et al., 2017; Reis et al., 2016).

Biodegradabilidad

La degradación *in vivo* de los andamios por mecanismos de hidrólisis, oxidación y degradación enzimática o física debe ocurrir sin dejar restos en el cuerpo que pudieran causar cierto grado de toxicidad. Por otro lado, también debe considerarse la tasa de degradación de los materiales del andamio, la cual debe de ser compatible con la formación del nuevo tejido, es decir, debe ser la idónea para cumplir la función soporte celular hasta ser reemplazado por un tejido viable (Chaudhuri et al., 2017). Haciendo énfasis en el tejido cardíaco, tras un IAM la regeneración tisular tarda entre 6 y 8 semanas, por lo que el andamio desarrollado debería permanecer por al menos 2 meses (Boroumand et al., 2021).

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas, tales como la rigidez, elasticidad, resistencia o estabilidad de los andamios deberán ser similares a las del tejido al que será aplicado (Roacho-Pérez et al., 2022), en ITC, por ejemplo, los andamios deben de imitar las propiedades del tejido cardiaco nativo y ser capaz de soportar las tensiones ejercidas por el proceso de contracción, además de favorecer la diferenciación y/o maduración de las células cultivadas (Nguyen-Truong et al., 2020).

Porosidad

La arquitectura de los andamios debe tener una estructura de poros interconectados y una porosidad en un rango de 50 a 90% para asegurar la migración y penetración celular, la vascularización, la difusión adecuada de agua, nutrientes y moléculas bioactivas, promover la transferencia de oxígeno y facilitar la salida de los productos de desecho (Eltom et al., 2019; O'Brien, 2011; Shimojo et al., 2020; Trombino et al., 2021).

Propiedades químicas

Las interacciones entre los materiales, las células y el entorno determinan el rendimiento y el resultado de los andamios de ingeniería de tejidos (Al Thaher et al., 2020). La superficie del andamio debe presentar propiedades que permitan una adecuada interacción célula-material facilitando la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular. La composición química de la superficie tiene papel en esta interacción debido a grupos funcionales que afectan la hidrofobicidad y carga (Shimojo et al., 2020). Por ejemplo, una superficie más hidrófila del material resulta en una mayor adhesión celular en la superficie y en el caso de la carga superficial, se ha observado que a medida que aumenta la cantidad de cargas superficiales de los polímeros, se observa una mayor adhesión y proliferación celular (Habibzadeh et al., 2022).

Diseño adecuado

La forma y el tamaño del andamio deben ser adecuados permitiendo tener una estructura con propiedades similares a las necesidades del tejido receptor para ser reparado o regenerado (Rodríguez-Vázquez et al., 2015).

2.4.1. Biomateriales

Los biomateriales son materiales destinados a interactuar con los sistemas biológicos con la finalidad de evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido o función del cuerpo.

En ingeniería de tejidos, los andamios son preparados mediante la fabricación de microambientes artificiales derivados de materiales naturales o sintéticos (figura 2) o por medio de la eliminación de componentes celulares de los tejidos mediante manipulación mecánica y química para producir matrices tisulares a base de colágeno (S. J. Lee et al., 2018).

Los materiales empleados para la generación de andamios tienen que cumplir con una serie de características que favorezcan la diferenciación y proliferación celular y minimicen las respuestas indeseadas al ser implantado en el paciente. Por ejemplo, para no inducir una respuesta inflamatoria y evitar el rechazo deben ser biodegradables y bioabsorbibles.

En la ingeniería de tejidos cardiacos (ITC) además deben poseer unas propiedades mecánicas fuertes para permitir la contracción; deben ser electrofisiológicamente estables para favorecer la unión celular y la integración electromecánica con el tejido huésped. También deben apoyar la revascularización *in vivo* y degradarse de forma segura a un ritmo adecuado para soportar lo suficiente hasta la formación del nuevo tejido (Vu & Kofidis, 2014).

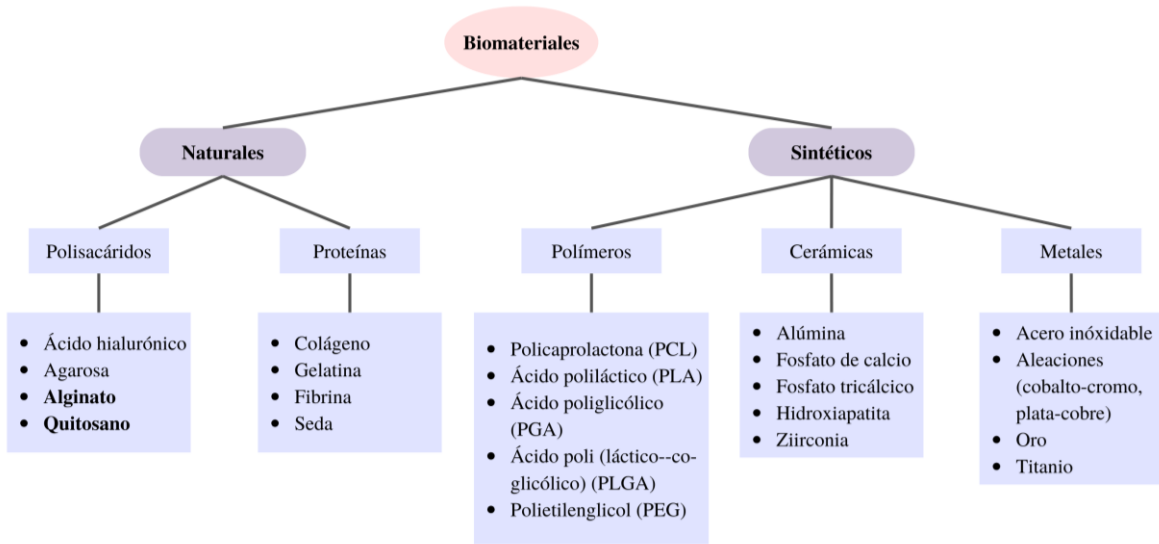


Figura 2. Tipos de biomateriales empleados en la ingeniería de tejidos. Imagen propia.

2.4.1.1. Sintéticos

Los polímeros sintéticos son macromoléculas de alto peso molecular que consisten en monómeros unidos covalentemente, tienen la ventaja de poseer una microestructura, propiedades de degradación y de resistencia mecánica controlables, lo que permite realizar su síntesis con controles de calidad reproducibles y alta pureza, además de ser fabricados en varias formas con características de volumen y superficie anticipadas (Lee et al., 2018).

Los polímeros sintéticos pueden clasificarse según su origen químico (termoplásticos, termoestables, elastómeros) o por mecanismo de polimerización (adición o condensación). En algunos polímeros utilizados en IT como el PLA, los enlaces éster se rompen por hidrólisis no enzimática, formando ácido láctico que puede ser metabolizado, produciendo finalmente dióxido de carbono y agua que son eliminados de forma natural del organismo. La tasa de degradación de este tipo de polímeros se puede controlar mediante la alteración de su cristalinidad, peso molecular y la relación de copolímero de los monómeros. Los elastómeros, son materiales flexibles y brindan propiedades mecánicas similares a las del corazón (Lee et al., 2018; Vu & Kofidis, 2014).

Dentro de los materiales sintéticos más estudiados para el desarrollo de andamios, particularmente para el tejido cardíaco, son polímeros como la poli(ϵ -caprolactona) (PCL),

poli(sebacato de glicerol) (PGS), polietilenglicol (PEG) y ácido poliláctico (PLA); y copolímeros como el poli(L-láctico-co-ε-caprolactona) (PLCL) y el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) (Amiryaghoubi et al., 2024; Ghaziof et al., 2022; Ruther et al., 2022; Vogt et al., 2019; S. Wu et al., 2022). Sin embargo, aunque presentan diferentes virtudes, exhiben diferentes problemáticas como una adhesión celular insuficiente, superficies hidrófobas que dificultan el crecimiento celular, baja biodegradabilidad, inestabilidad térmica y además de requerir disolventes tóxicos para la formación de estructuras porosas (Reddy et al., 2021).

2.4.1.2. Naturales

Los polímeros naturales como su nombre lo indica son aquellos producidos en la naturaleza por las células de un organismo vivo. Los materiales naturales pueden clasificarse en tres grupos según su composición: a) proteínas y péptidos, como el colágeno o la elastina; b) polisacáridos como el alginato, la quitina o la celulosa; y c) ácidos nucleicos (ADN y ARN) (Gomez-Florit et al., 2020).

Este tipo de polímeros destacan por su alta biocompatibilidad y su capacidad para ofrecer dominios naturales que facilitan la unión de moléculas bioactivas. Estas características promueven adhesión, proliferación y diferenciación celular. Además, su similitud estructural con los componentes de la matriz extracelular (MEC), versatilidad química, desempeño biológico e interacciones celulares específicas en conjunto con su susceptibilidad a las enzimas del organismo, los convierten en materiales ideales para el desarrollo de andamios (Gomez-Florit et al., 2020; S. J. Lee et al., 2018; Shimojo et al., 2020).

Dentro de los biomateriales naturales más utilizados en ITC encontramos el colágeno, la gelatina, la fibroína de seda, el alginato (ALG), el quitosano, el ácido hialurónico (HA) o matrices extracelulares descelularizadas, los cuales han mostrado mejoras en el crecimiento celular, mayor expresión de marcadores cardíacos, la formación de vasos sanguíneos y una respuesta inmune baja (Cetin et al., 2021; Fang et al., 2020; X. P. Li et al., 2020; Oropeza et al., 2022; Tamimi et al., 2020).

A pesar de las ventajas que ofrecen los materiales naturales para la generación de andamios en IT, presentan diferentes limitaciones que impiden su potencial aplicación, como la variabilidad entre lotes, una rápida degradación, débiles propiedades mecánicas, limitaciones en su funcionalización y su procesamiento a gran escala (S. Liu et al., 2023). Para solucionar las distintas problemáticas, a menudo se realiza la combinación de dos o más materiales tanto naturales como sintéticos, permitiendo la síntesis de andamios con propiedades físicas o químicas específicas para imitar el tejido de interés y así obtener respuestas favorables.

2.4.1.3. Hidrogeles

Los hidrogeles son redes de cadenas poliméricas reticuladas, poseen grupos hidrófilos que les permite tener una gran capacidad de absorción de agua, que, junto con su estructura blanda y alta porosidad, imitan características similares a las de los tejidos nativos, lo que los convierte en una clase de materiales favorable para la generación de andamios en ingeniería de tejidos (Ho et al., 2022).

Pueden ser generados a partir de polímeros naturales, sintéticos o una mezcla de ambos mediante reticulación física o química, y tienen la capacidad de favorecer la adhesión y crecimiento celular al brindar un soporte mecánico similar a la MEC para que las células cardíacas formen el tejido a medida que se degradan. Otra ventaja es el fácil ajuste de sus propiedades químicas y físicas que permite controlar parámetros como el grado de reticulación, módulo elástico, la tasa de degradación o química superficial para favorecer varios comportamientos celulares como la migración, la proliferación y la diferenciación (Camci-Unal et al., 2014; Elkhoury et al., 2021; S. Liu et al., 2023). Sin embargo, pueden presentar también diferentes desventajas como una mala estabilidad, pueden ser mecánicamente débiles, presentar una rápida degradación y dificultades de esterilización, manipulación y afinidad celular pobre (Radulescu et al., 2022).

El alginato (ALG), el quitosano (CS) el ácido hialurónico (HA), el colágeno, la fibrina y la gelatina son los hidrogeles naturales que hasta el momento han sido de los más estudiados para fines de ITC, mientras que dentro del grupo de los sintéticos se encuentran el

polietilenglicol (PEG), el acetato de polivinilo (PVA), el poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) y el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA).

2.4.1.4. Alginato

El alginato (ALG, pKa= 3.4-3.7) es un polisacárido no ramificado de naturaleza aniónica que puede ser extraído de algas marinas, algas pardas y algunas bacterias. Puede encontrarse como formas de sal del ácido algínico, siendo los más utilizados el alginato de sodio y calcio (Hasnain et al., 2020). Está conformado por copolímeros de bloques lineales de ácido β -D-manurónico (M) y el ácido α -L-gulurónico (G) unidos covalentemente (figura 3) y puede reticularse iónicamente mediante la adición de cationes divalentes como el Ca^{2+} en solución acuosa, los cuales interactúan de manera cooperativa con los monómeros G formando un puente iónico entre diferentes cadenas de polímeros (Han et al., 2010; S. J. Lee et al., 2018).

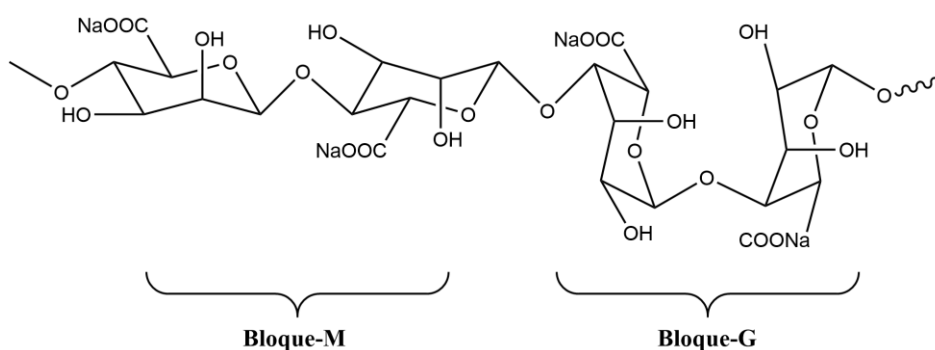


Figura 3. Estructura química del alginato de sodio.

Dentro de sus propiedades, el peso molecular es una de las más importantes y varía dependiendo de la fuente de obtención. El alginato de sodio comprende un peso de entre 32 y 400 kDa, su viscosidad y capacidad de gelificación dependerán de su estructura molecular y peso, aquellos con un alto peso molecular producen geles altamente viscosos que son ideales para aplicaciones industriales tales como agente espesante, gelificante y emulsionante en la elaboración de alimentos, cosméticos o la industria textil (Hasnain et al., 2020; S. J. Lee et al., 2018).

La propiedad de gelificación de los alginatos depende de la afinidad de estos hacia la unión con varios cationes metálicos divalentes y trivalentes, lo cual va relacionada con los residuos

G, el peso molecular, la longitud de los bloques G o la relación M/G en la estructura molecular.

Su empleo en la ingeniería de tejidos está justificada por las diferentes ventajas que presenta, como su alta biocompatibilidad, buenas propiedades mecánicas, capacidad de gelificación en condiciones fisiológicas (37 °C, pH= 7.4), adaptabilidad, y naturaleza no trombogénica, sin embargo, también posee una baja capacidad de adhesión celular y en medios fisiológicos, el intercambio iónico con iones monovalentes provoca su desestabilización y ruptura, por lo que a menudo requieren de modificaciones, especialmente mediante la combinación con otros biomateriales naturales o sintéticos (Deng et al., 2015; Kazemi Asl et al., 2023; W. Zhang et al., 2015). En los últimos años el alginato ha sido uno de los principales materiales estudiado dentro de la ITC debido a sus diversas ventajas, la Tabla 1 enlista los resultados de investigaciones recientes en ITC que han utilizado alginato como material de estudio.

Tabla 1. Uso de alginato en ingeniería de tejidos cardíacos.

<i>Andamio</i>	<i>Resultados</i>	<i>Referencia</i>
ALG/GO/PCL	Alta conductividad, resistencia a la tracción, mejora en la viabilidad, adhesión y proliferación celular.	(Karimi et al., 2022)
ALG/HA/Gel	Porosidad entre 45-60%, hinchamiento mayor al 90%, degradación completa al día 30, viabilidad superior al 85%.	(Safikhani et al., 2024)
PEDOT/ALG	Alta conductividad, mejor capacidad de absorción de proteínas, favorece la unión y proliferación de células	(Yang et al., 2020)
MEC/OALG	Tamaño de poro de ~148 nm, resistencia a la tracción, degradación de ~50% a 14 d, hinchamiento menor al 250%, viabilidad celular >80%	(Mousavi et al., 2021)
ALG/Gel/Elastina	Porosidad superior al 60%, degradación del 45% a 7d, % de hinchamiento ~ 45% tras 48h, mejor adherencia y diferenciación celular.	(Rosellini et al., 2020)
ALG/Pec/SeNPs	Andamios amorfos con distribución de SeNPs uniforme, actividad antioxidante, buena resistencia mecánica, buena viabilidad celular.	(Naveenkumar et al., 2023)

2.4.1.5. Quitosano

El quitosano (CS, $pK_a = 6.3$) es un biopolímero derivado de la desacetilación parcial o total de la quitina, un polisacárido que, después de la celulosa, es uno de los más abundantes en la naturaleza. Su estructura está formada por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces glucosídicos β (1-4) (figura 4) (S. J. Lee et al., 2018). El quitosano es insoluble en solución acuosa por encima de pH 7, en su forma cristalina, pero, en ácidos diluidos con un pH menor a 6, los grupos amino libres protonados de la glucosamina facilitan su solubilidad convirtiéndolo en un polielectrolito (Vunain et al., 2017).

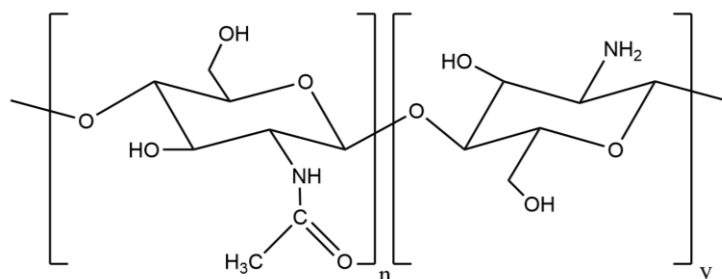


Figura 4. Estructura química del quitosano.

Las propiedades fisicoquímicas y el comportamiento del quitosano están relacionadas con su peso molecular (PM) y grado de acetilación (DA) o grado de desacetilación (DDA). El peso molecular, por ejemplo, puede afectar sus propiedades mecánicas, la viscosidad, solubilidad, transiciones térmicas y la cristalinidad. DA, refleja la cantidad de unidades de N-acetil-D-glucosamina respecto al número total de unidades y tiene influencia en el tamaño de la cadena del CS, su solubilidad, viscosidad y la resistencia a la tracción; además también repercute en sus propiedades biológicas, como la resistencia a la degradación por lisozima o sus propiedades de cicatrización (Kazemi Asl et al., 2023). Mientras que, la DDA puede determinar el efecto antimicrobiano, el cual, es mayor con un grado de desacetilación alto (Vunain et al., 2017). Por ejemplo, el quitosano de bajo peso molecular presenta una baja viscosidad, lo que limita su uso en ciertas aplicaciones, ya que sus oligómeros no son capaces de formar películas. Sin embargo, puede ser aplicable en áreas como la formación de nanopartículas y la liberación controlada de fármacos (Aibani et al., 2021; Bruinsmann et al., 2019).

El quitosano es muy susceptible a la modificación química a través de uno de sus tres grupos funcionales reactivos: el grupo amino y los grupos hidroxilo primarios y secundarios, que permiten un amplio ajuste de las propiedades biológicas y mecánicas de los dispositivos médicos basados en quitosano. Además, tiene propiedades biológicas que permiten su aplicación en andamios, nanopartículas, membranas, entre otros; dentro de las que se destacan su biodegradabilidad, biocompatibilidad y sus propiedades antifúngicas y antimicrobianas, así mismo, su superficie hidrofílica promueve la adhesión, proliferación y diferenciación celular, y provoca una mínima reacción en la implantación (Z. Li et al., 2005; Vunain et al., 2017). Sin embargo, el quitosano es mecánicamente débil e inestable, e incapaz de mantener una forma predefinida, por lo que a menudo suele ser combinado con otros biomateriales como el alginato. En años recientes y debido a sus propiedades, el quitosano ha sido de particular interés para fines de ITC, la tabla 2 reúne trabajos recientes dentro de esta disciplina en los que se hace uso de quitosano.

Tabla 2. Uso de quitosano en ingeniería de tejidos cardiacos.

<i>Andamio</i>	<i>Resultados</i>	<i>Referencia</i>
CS/GO	Propiedades porosas y conductivas, hinchamiento de 1000%, conductividad similar al del tejido nativo, buena viabilidad celular, promueve la adhesión celular, regulación positiva expresión de genes cardiacos y proteínas Cx43.	(Jiang et al., 2019)
ECM/GEL/CS	Alta porosidad, incremento de la viabilidad celular y mejora en la proliferación y diferenciación celular.	(Lv et al., 2020)
CS/PC	Conductividad similar al tejido nativo, estabilidad térmica, biocompatible	(Scalera et al., 2021)
PU/CS/CNT	Diámetro de 169 nm, buena conductividad, hidrófilos y resistentes, pérdida de ~10% en peso a las 8 semanas, el uso de Cs y CNT favorece la unión y proliferación celular.	(Ahmadi et al., 2021)
CS/PEG	Alta porosidad, resistencia mecánica, hemocompatibles y citocompatibles, viabilidad >94%, formación de neotejidos.	(Keklikian et al., 2024)

2.4.2. Andamios de alginato-quitosano

Como se mencionó anteriormente, el alginato a menudo es combinado con otros polímeros para mejorar sus propiedades, con el quitosano tiene la capacidad de entrecruzarse mediante interacciones electrostáticas (figura 5), formando complejos polielectrolitos de carga opuesta (Deng et al., 2015). La combinación de ambos biopolímeros mediante reticulación genera andamios con mejores propiedades mecánicas y biológicas atribuidas a la formación de una estructura compleja, superando las problemáticas observadas con el uso de los polímeros puros, como la escasa unión celular o la escasa rigidez del alginato (Z. Li et al., 2005; Tamimi et al., 2020).

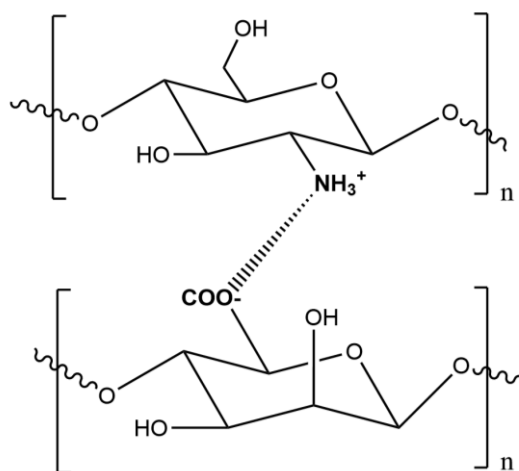


Figura 5. Representación esquemática de la interacción molecular entre alginato y quitosano.

El uso de andamios de ALG-CS han sido reportados principalmente en estudios para la regeneración de tejidos óseos, cartilagosos y recientemente cardiacos, entre otros. Bushkalova et al., (2019) Desarrolló un complejo polielectrolito de CS y ALG, el cuál mostró una estructura tridimensional con óptimas propiedades mecánicas que permitieron la retención y viabilidad de células mesenquimales de médula ósea de ratas.

Recientemente, Mohabatpour et al. (2022) desarrollaron una biotinta de alginato y carboximetilquitosano (CMC) para la formación de un andamio utilizando bioimpresión 3D con la finalidad de regenerar tejido del esmalte dental. Los andamios con una mayor

proporción de CMS mostraron proporciones de hinchamiento más altas, tasas de degradación más rápidas y alta viabilidad de células HAT-7 después de 1, 7 y 14 días de cultivo. Algunas otras aplicaciones y beneficios de los andamios de alginato-quitosano son descritos en la tabla 3.

Tabla 3. Andamios de alginato-quitosano aplicados en ingeniería de tejidos

<i>Tejido/fuente celular</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Referencias</i>
Tejidos blandos	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Estabilidad. ✓ Hinchamiento alto. ✓ Poros grandes. ✓ Comportamiento elástico. ✓ Buena viabilidad, adhesión y proliferación celular. ✓ Apoyan la vascularización. 	(Baysal et al., 2013; Bushkalova et al., 2019)
Óseo	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Poros heterogéneos y definidos. ✓ Biodegradables. ✓ Adsorción de proteínas. ✓ No tóxicos. ✓ Hinchamiento alto. ✓ Adhesión celular. ✓ Mejoramiento de la osteogénesis. 	Sowjanya et al. (2013); L. Zhang et al. (2018)
Cardiaco	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Poros heterogéneos. ✓ Buenas propiedades mecánicas. ✓ Estimulación de la proliferación celular y la actividad metabólica. ✓ Promoción de la angiogénesis. 	(Beltran-Vargas et al., 2022; Ceccaldi et al., 2014; Tamimi et al., 2020)
Células troncales mesenquimales	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Buena porosidad. ✓ Biodegradables. ✓ Buena adhesión y proliferación celular. 	Kumbhar & Pawar. (2016)
Piel	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Porosidad. ✓ Adecuadas propiedades mecánicas. ✓ Cicatrización de heridas acelerada. 	(Zhu et al., 2019)
Cartílago	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Estructura porosa tridimensional. ✓ Buena viabilidad y proliferación celular. 	(W. Zhang et al., 2023)
Esmalte dental	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Alta porosidad. ✓ Integridad estructural alta. ✓ Hinchamiento alto. ✓ Tasa de degradación rápidas. ✓ Alta viabilidad celular. 	(Mohabatpour, et al., 2022)
Tejido nervioso	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Estructura porosa. ✓ Superficie hidrófila. ✓ Buena adhesión y proliferación celular. 	(G. Wang et al., 2017)

2.5. Nanomateriales en la Ingeniería de Tejidos

En el apartado 2.4 son descritos los andamios utilizados en IT, sin embargo, aunque ellos brindan soporte mecánico hasta la formación del nuevo tejido, la mayoría de los andamios no recapitulan adecuadamente el entorno extracelular, dado que es un compuesto nanoescalado dinámico, es decir, tiene componentes de tamaño nanométrico que presentan una remodelación y respuesta al entorno constante. Además, los materiales poliméricos solos a menudo presentan elasticidad y resistencia deficientes a la tensión mecánica, conduciendo a fallas y/o a una adhesión y proliferación celular inadecuadas, lo que conlleva a la necesidad de explorar nanomateriales para mejorar las propiedades mecánicas y la biocompatibilidad de los andamios .

La aplicación de la nanotecnología en la biomedicina permite el diseño de biomateriales destinados a la ingeniería de tejidos, particularmente los que serán empleados en tejidos biológicos con propiedades complejas. El estudio y aplicación de la nanociencia se vuelve importante debido a que las interacciones que se producen entre los biomateriales y las células ocurren a nanoescala y además los componentes de los tejidos biológicos son nanomateriales en sí mismos (N. J. Kim et al., 2013; Mistry et al., 2007). En ese sentido, los materiales nanoestructurados pueden imitar el ambiente específico de los tejidos mediante el desarrollo de bioconstrucciones con adecuadas propiedades mecánicas, eléctricas y bioquímicas (Hudita et al., 2019).

Una parte importante de la investigación sobre andamios se ha centrado más en el uso de la nanotecnología para el diseño y la síntesis de estas bioconstrucciones mediante la funcionalización o generación de biomateriales inteligentes con mejores propiedades que puedan promover interacciones deseables, como mejorar las interacciones célula-material y célula-célula para la regeneración de tejidos (Kim et al., 2013; X. Liu et al., 2012; Y. Zhao et al., 2021).

La Comisión Europea (2011) definió a los nanomateriales como aquellos materiales naturales, incidentales o manufacturados que contienen partículas, en estado libre, agregados o aglomerados con el 50% o más de las partículas en un rango de distribución de tamaño de

1 a 100 nm en una o más dimensiones externas. Sin embargo, en ciertos contextos científicos las partículas con tamaños menores a 500 nm pueden ser consideradas dentro del término “nano” (Vert et al., 2012).

Los nanomateriales pueden ser adaptados a diferentes tamaños y formas (Al Thaher et al., 2020) e incluyen nanopartículas, nanoesferas, nanocorazas, nanoláminas, nanofibras, nanotubos, nanocables y cualquier otro material o dispositivo a nanoescala, y han sido estudiados cada vez más para la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa porque pueden imitar de cerca los microambientes biológicos naturales y mejorar la adhesión, proliferación y diferenciación celular (Hudita et al., 2019; Kim et al., 2013).

En comparación con los materiales de gran escala o a granel los nanomateriales poseen propiedades físicas, químicas y biológicas únicas (Zheng et al., 2021) y, dado que, son materiales fabricados a nanoescala puede aumentar sus características como la relación superficie-volumen y la rugosidad de la superficie, lo que contribuye a mejorar las propiedades ópticas, mecánicas, eléctricas, magnéticas y catalíticas (Qiu et al., 2023).

2.5.1. Propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales

Un factor importante a considerar en la aplicación de nanomateriales en aplicaciones biomédicas y particularmente en la ingeniería de tejidos son sus propiedades fisicoquímicas. Estas propiedades en términos de forma, tamaño, composición, propiedades superficiales, peso molecular, solubilidad y estabilidad son un factor crítico que determinan su comportamiento fisiológico, como su interacción, citotoxicidad, absorción y distribución (Al Thaher et al., 2020; Yadid et al., 2019). Por lo tanto, la caracterización adecuada de las nanopartículas (NP) es esencial para confirmar su calidad y seguridad.

La caracterización de los nanomateriales se centra en parámetros que no se encuentran en los materiales convencionales. Estos parámetros incluyen tamaño de partícula, tamaño de poro, distribución de tamaño, forma, área superficial, potencial zeta, humectabilidad y agregación (Al Thaher et al., 2020).

2.5.1.1. Tamaño

El tamaño de los nanomateriales juega un papel importante en la determinación de su destino *in vivo* modulando las interacciones con las entidades biológicas, regula la distribución y su navegación en el torrente sanguíneo y entre los diferentes tejidos (Al Thaher et al., 2020).

2.5.1.2. Propiedades superficiales

Las interacciones de los nanomateriales con las especies circundantes están determinadas por las características de la superficie (composición superficial, energía superficial, humectabilidad, carga superficial) que se rigen por la estructura superficial atómica o física.

La composición superficial y la energía son relevantes para la disolución, agregación y acumulación de nanomateriales. La carga superficial tiene un efecto potencial sobre la unión del receptor y la distribución fisiológica que es determinada por el potencial zeta, una propiedad superficial ampliamente utilizada para partículas de tamaño nanométrico; la magnitud y el signo de la carga tendrán un efecto significativo en el destino, la toxicidad y la interacción de las nanopartículas en los sistemas fisiológicos.

La tasa de disolución del nanomaterial es un parámetro importante que puede influir en gran medida en su destino y potencial de toxicidad en fluidos ambientales o fisiológicos y depende de diferentes factores como el pH o los ligandos. La aglomeración es una inestabilidad termodinámica inherente de las suspensiones coloidales de nanopartículas, se basa en el tamaño, la carga o el tipo de recubrimiento y juega un papel clave en la determinación de la toxicidad, el destino de las nanopartículas y el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas (Al Thaher et al., 2020).

2.5.1.3. Forma

La geometría o forma de los nanomateriales puede afectar tanto sus propiedades fisicoquímicas como sus interacciones con el entorno fisiológico como el destino biológico, absorción celular, biocompatibilidad y retención en tejidos y órganos (Al Thaher et al., 2020; Yadid et al., 2019).

2.5.1.4. Composición y pureza

La composición define sus propiedades y afecta su toxicidad, entrega, transporte y biodistribución (Al Thaher et al., 2020). La formación de nanopartículas presenta dos enfoques: top-down y bottom-up. El primero se enfoca en los métodos físicos de síntesis y consiste en la formación de las nanopartículas a partir de materiales macroscópicos; el segundo, consiste en la formación de las nanopartículas a partir de átomos o moléculas más pequeñas y comprende principalmente los métodos químicos y biológicos (Ramanathan et al., 2021). La tabla 4 presenta una clasificación de los diferentes tipos y métodos de síntesis. Algunos de los agentes empleados comprenden metales, carbono, polímeros, cerámicas o nanocompuestos.

Tabla 4. Métodos de síntesis de nanomateriales descrita por Zheng et al. (2021)

<i>Métodos de síntesis tradicionales</i>		<i>Métodos de síntesis verde</i>
<i>Químicos</i>	<i>Físicos</i>	<i>Biológicos</i>
Reducción química	Arco de descarga	Bacterias
Coprecipitación	Molienda con bolas	Hongos
Electroquímica	Evaporación-condensación	Extractos de plantas
Emulsificación-difusión	Descarga de alambre de pulso	Enzimas y biomoléculas
Pirólisis	Interfaz líquido-líquido	
Descomposición térmica	Pirólisis por pulverización	
Sonoquímica	Fase vapor y gas	
	Evaporación de disolvente	

2.5.2. Tipos de Nanomateriales

2.5.2.1. Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas (PNP) poseen alta área superficial, características modificables, baja citotoxicidad y buena biocompatibilidad, además permiten modificarse con fármacos y biomoléculas. Dentro de los principales polímeros utilizados en la síntesis de nanopartículas encontramos el ácido poliláctico (PLA), la poliamida (PA), el ácido poli(D, L-láctico-co-glicólico) (PLGA), el poliéster de policaprolactona, el ácido poliglicólico (PGA), polisacáridos y proteínas (Zheng et al., 2021). Algunos de los tipos de PNP más

estudiados son nanoesferas, nanocápsulas, nanogeles, micelas poliméricas, entre otros. Por ejemplo, Zhang et al., (2021) desarrollaron un sistema híbrido de nanofibras de ácido poliláctico (PLLA) con nanogeles de poli(N-isopropilacrilamida-ácido acrílico) (PNA) para mejorar la capacidad de cicatrización de heridas al mediar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS).

2.5.2.2. Nanomateriales basados en carbono

Los nanomateriales basados en carbono presentan un tamaño pequeño (1-100 nm) y alta relación área superficial/volumen. Los tipos en las que los podemos encontrar son en forma de nanotubos de carbono (CNT), nanodiamantes; láminas de carbono enrollados de forma cilíndrica; grafeno, una lámina 2D de átomos de carbono; y fullereno, un conjunto esférico de átomos de carbono.

Este tipo de nanomateriales poseen buenas propiedades mecánicas, alta conductividad y propiedades ópticas únicas, además, tienen propiedades análogas a algunos componentes encontrados en la MEC lo que los vuelve ideales para su aplicación en Ingeniería de tejidos (Bianchi et al., 2022) y, aunque pueden presentar problemas de citotoxicidad, estos pueden resolverse mediante su modificación superficial. Los nanotubos, fullerenos y grafenos han sido los más estudiados.

2.5.2.3. Nanomateriales óxido-metálicos

Las biocerámicas y biovidrios, presentan una alta resistencia mecánica, biocompatibilidad y biodegradabilidad, por lo cual, a menudo son utilizadas en andamios para mejorar las propiedades mecánicas. Pueden ser clasificadas en bioinertes, es decir, mantienen sus propiedades mecánicas y fisicoquímicas dentro del huésped; bioactivas, que pueden interactuar con los tejidos induciendo respuestas biológicas específicas; y bioabsorbibles, que son completamente absorbidos sin producir ningún efecto tóxico (Bianchi et al., 2022). Algunos ejemplos de ellos son la zirconia, la alumina, los biovidrios o la hidroxiapatita.

Por otro lado, el uso de nanopartículas magnéticas en andamios para ingeniería de tejidos permite el control de la señalización celular, la mecano estimulación y la manipulación celular. Algunos ejemplos de ellas son las desarrolladas con óxido de hierro como la magnetita (Fe_3O_4) y maghemita (Fe_2O_3), .

2.5.2.4. Nanomateriales metálicos

Los nanomateriales o nanopartículas (NP) metálicas son aplicadas ampliamente en el campo de la biomedicina debido a sus propiedades fisicoquímicas y biológicas únicas: propiedades antibacterianas, actividad catalítica, tamaños pequeños, gran área superficial y conductividad eléctrica (Zheng et al., 2021).

Han sido estudiados diferentes nanomateriales metálicos como el cobre, el titanio, la plata y el oro; en diferentes formas, incluidas esferas, conchas y varillas. Las principales ventajas de usar metales incluyen su capacidad de ajuste óptico, conductividad eléctrica, química superficial y facilidad de fabricación. Debido a sus propiedades ópticas altamente sintonizables, se fabrican fácilmente en longitudes de onda electromagnéticas deseables en función de su forma, tamaño y composición. La química superficial de los nanomateriales metálicos hace posible su modificación funcional al unirlos a anticuerpos, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros (Kim et al., 2013).

A pesar de la diversidad funcional de los nanomateriales metálicos, tienen una aplicación limitada debido a sus características no biodegradables, lo que restringe las aplicaciones de dosis altas. Muchos metales no biodegradables pueden causar toxicidad en el tejido adyacente, lo que a su vez puede provocar resultados no deseados. La toxicidad potencial de los nanometales se puede reducir recubriendo el metal con un material más biocompatible o modificando la superficie (Kim et al., 2013).

2.5.2.5. Nanocompuestos

Los nanocompuestos se componen de dos o más materiales que generalmente consisten en la combinación de materiales orgánicos e inorgánicos; los materiales nanocompuestos poseen

una biodegradabilidad y propiedades mecánicas mejoradas y una buena estabilidad dimensional (Zheng et al., 2021).

Tabla 5. Ventajas y desventajas de los principales nanomateriales utilizados en ingeniería de tejidos*.

<i>Tipo de nanomaterial</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>	<i>Aplicaciones</i>
Poliméricos	Características ajustables Biocompatibilidad Baja toxicidad Biodegradables	Inestabilidad Conductividad pobre Baja dureza	Tejido óseo, neural, cartilaginoso, cardiaco, piel.
Metálicos	Biocompatibilidad Propiedades ópticas específicas Alta conductividad Antibacterianas Características ajustables	Inestabilidad Citotoxicidad en función del tamaño y concentración	Tejido óseo, neural, cartilaginoso, cardiaco.
Basados en carbono	Estabilidad química Resistencia térmica Promueven angiogénesis Conductores Flexibilidad Biocompatibles	Citotoxicidad	Tejido óseo, neural, músculo liso, piel.
Óxidos metálicos	Propiedades magnéticas Conductivas Estabilidad coloidal Biocompatibles Polimorfes	Citotoxicidad en función del tamaño y concentración	Tejido óseo, cardiaco.

*Información recabada de: (Alamdari et al., 2022; Y. Li et al., 2022)

2.6. Nanomateriales en Ingeniería de Tejido Cardíaco

La matriz extracelular cardíaca posee una topografía a micro y nanoescala que repercute en las características mecánicas y eléctricas y en las funciones bioquímicas del corazón. Un andamio funcional para el tejido cardíaco debe de cumplir con ciertas características que aseguren su éxito, debe de ser eléctricamente conductor, mecánicamente estable, biocompatible, y poseer una elasticidad similar a la del tejido nativo (Ashtari et al., 2019).

El uso de un andamio conductor puede asegurar la capacidad del material para la propagación de impulsos eléctricos que sean traducidas en contracciones que permitan el bombeo de sangre.

Una de las formas de desarrollar andamios conductores es cuando los nanomateriales se incorporan en andamios se puede imitar la estructura y arquitectura de la MEC al mejorar su rendimiento eléctrico, mecánico y biológico satisfaciendo a su vez las necesidades del tejido cardiaco (Alamdari et al., 2022; Sapir et al., 2013) y mejorando la regeneración de las células cardíacas. Algunos de los nanomateriales más estudiados en la generación de tejido cardiaco son los basados en carbono y metales. En la tabla 6 se resumen los trabajos recientemente encontrados en ITC y los principales resultados obtenidos.

2.6.1. Nanopartículas de oro en la generación de tejido cardiaco

Las nanopartículas de oro (AuNP) pueden ser encontradas en forma de nanoesferas, nanovarillas, nanocáscaras, nanocubos, nanojaulas y ramificadas. Poseen una serie de propiedades únicas: pueden ser sintetizadas en diversos tamaños y formas; se pueden funcionalizar a través de distintos tipos de moléculas biológicas debido a la gran superficie y la presencia de una carga negativa superficial; son estables a la oxidación, altamente biocompatibles y no citotóxicas; tienen características ópticas y electrónicas únicas que se relacionan notablemente con la forma, el tamaño y el estado de agregación de las nanopartículas y que pueden mejorar significativamente el crecimiento celular (Bianchi et al., 2022; Borzenkov et al., 2018; Nejati et al., 2022). Las propiedades antes mencionadas en conjunto con su buena conductividad eléctrica las convierte en plataformas versátiles para diferentes aplicaciones, principalmente aplicaciones médicas.

Las propiedades ópticas de las AuNP se definen a través de su resonancia de plasmón superficial localizado, que está relacionada con la excitación colectiva de los electrones de conducción y se concentra en las regiones del visible al infrarrojo, según la estructura, la forma y el tamaño de la partícula (Figura 6) (Nejati et al., 2022; Tréguer-Delapierre et al., 2008).

Tabla 6. Investigaciones recientes en la aplicación de nanomateriales en la ingeniería de tejido cardíaco

<i>Tipo de andamio</i>	<i>Nanomaterial</i>	<i>Tamaño</i>	<i>Resultados principales</i>	<i>Referencia</i>
Quitosano	Nanopartículas de oro recubiertas con quitosano (CS-AuNP)	6 - 9.3 nm	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento de las conductividades eléctricas. - Propiedades eléctricas cercanas al miocardio nativo. - Tasa de degradación lenta. - Distribución celular uniforme dentro de los poros. - Mayor densidad celular. 	(Baei, et al., 2016)
Hidrogel de gelatina metacrilato (GelMA).	Nanorods de oro (GNR)	4 nm	<ul style="list-style-type: none"> - Rigidez mayor en función de la conc. de GNR. - Mayor número, distribución más compacta y homogénea de cardiomiocitos. - Aumento de retención y viabilidad celular. - Nivel de supervivencia alto. - Integración adecuada con el miocardio nativo. 	(Navaei, et al., 2016)
Matriz extracelular coleccística porcina	Nanopartículas de oro (AuNP)	15 nm	<ul style="list-style-type: none"> - Células viables y más prominentes en el andamio funcionalizado. - Las AuNPs proporcionaron un microambiente agradable para la unión, el crecimiento y la proliferación de cardiomiocitos. 	(Nair et al., 2017)
Quitosano	Nanopartículas de selenio (SeNP)	500-600 nm	<ul style="list-style-type: none"> - Tasa de degradación mayor de las películas de quitosano-SeNP. - Mayor resistencia a la tracción y similar al del tejido cardíaco sano. - Mayor conductividad. - Mayor unión y proliferación celular. 	(Kalishwaralal et al., 2018)
Metacrilato de gelatina (GelMA).	Nanotubos de carbono (CNT) y óxido de grafeno (GO).	15-45 nm	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento de la expresión de marcadores cardíacos. - Los tejidos cardíacos diseñados mostraban distintos fenotipos de cardiomiocitos y diferentes niveles de 	(J. Lee et al., 2019)

			madurez según el sustrato (CNT-GelMA: similar a ventricular, GO-GelMA: similar a auricular. - Niveles de expresión comparables de marcadores de maduración.	
Quitosano-Carragenano	Nanopartículas de oro (GNP/AuNP)	50-70 nm	- Proliferación y unión de MG-63 mejoradas mediante la adición de GNP.	
Metacrilato de gelatina (GelMA)	Nanopartículas de sílice-oro		- Resistencia a la compresión. - Mejores propiedades conductivas. - Estabilidad mecánica. - Mejor adhesión y proliferación celular. - Crecimiento celular uniforme.	(Maharjan et al., 2019)
Gel térmico inyectable	Nanopartículas de oro	35 nm	- Gel biocompatible y conductor. - Apoyo en la supervivencia celular. - Aumento en la expresión de conexina 43.	(Peña et al., 2019)
MEC - fibroína de seda	Nanoesferas de oro	15 nm	- Distribución en la superficie porosa. - Mejora de la conductividad. - Mayor compatibilidad celular. - Mayor viabilidad celular. - Reducción de la zona de infarto.	(Dong et al., 2020)
Policaprolactona	Nanopartículas de oro (AuNP)	15 ± 0.7 nm	- Los andamios Au-PCL exhibieron mejora notable en las propiedades mecánicas. - Buena adherencia de las células. - No mejora la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-8 e IL- β .L1	(Joseph et al., 2021)

Policaprolactona - gelatina	Nanopartículas de óxido de cerio	~300 nm	- Citocompatibilidad. - Disminución de los niveles de ROS. - Supresión de la hipertrofia cardiaca.	(Jain et al., 2021)
Fluoruro de polivinilideno-gelatina	Nanopartículas de óxido de grafeno	379 ± 73 nm	- Resistencia a la tracción - Morfología de cardiomiocitos alargada - No tóxico - Alta viabilidad - Incremento de la expresión de conexina 43 y troponina T.	(Dorkhani et al., 2022)
Sulfato de condroitina	Nanovarillas de oro	58 ± 5 nm	- Andamio ligeramente más fuerte. - Degradación del 3% después de 7 días. - Crecimiento celular en estímulos eléctricos bajos. - Biocompatibles.	(Malki et al., 2022)
Acrilamida y ácido 2- acrilamida-2- metilpropanosulfónico	Nanopartículas de Fe ₃ O ₄	---	- Mejor rendimiento mecánico. - Aumento del grado de reticulación. - Disminución del tamaño de poro. - Resistencia a la tracción. - Disminución de la tasa de hinchamiento. - Alta biocompatibilidad.	(Ma et al., 2023)
Fibroina de seda- quitosano	Nanopartículas de oro	---	- Mejora de las interacciones intermoleculares del hidrogel. - Biocompatible. - Restauración de la fibra de cardiomiocitos.	(Z. Wu et al., 2023)

Existen diferentes técnicas para sintetizar AuNP, las cuales se categorizan en técnicas químicas, físicas y biológicas. La técnica comúnmente utilizada se basa en la síntesis de reducción de citrato para generar AuNP esféricas con una distribución de tamaño de 10 a 20 nm. El tamaño de las AuNP se puede controlar variando la concentración de sal, la velocidad de adición de los reactivos y la temperatura. En cambio, para generar diferentes formas de AuNP, generalmente se emplea la técnica de crecimiento de semillas, en el que las primeras semillas de tamaño pequeño son posteriormente llevadas a una solución de crecimiento que contiene HAuCl_4 y los agentes estabilizantes y reductores (Borzenkov et al., 2018; Herizchi et al., 2014; Nejati et al., 2022).

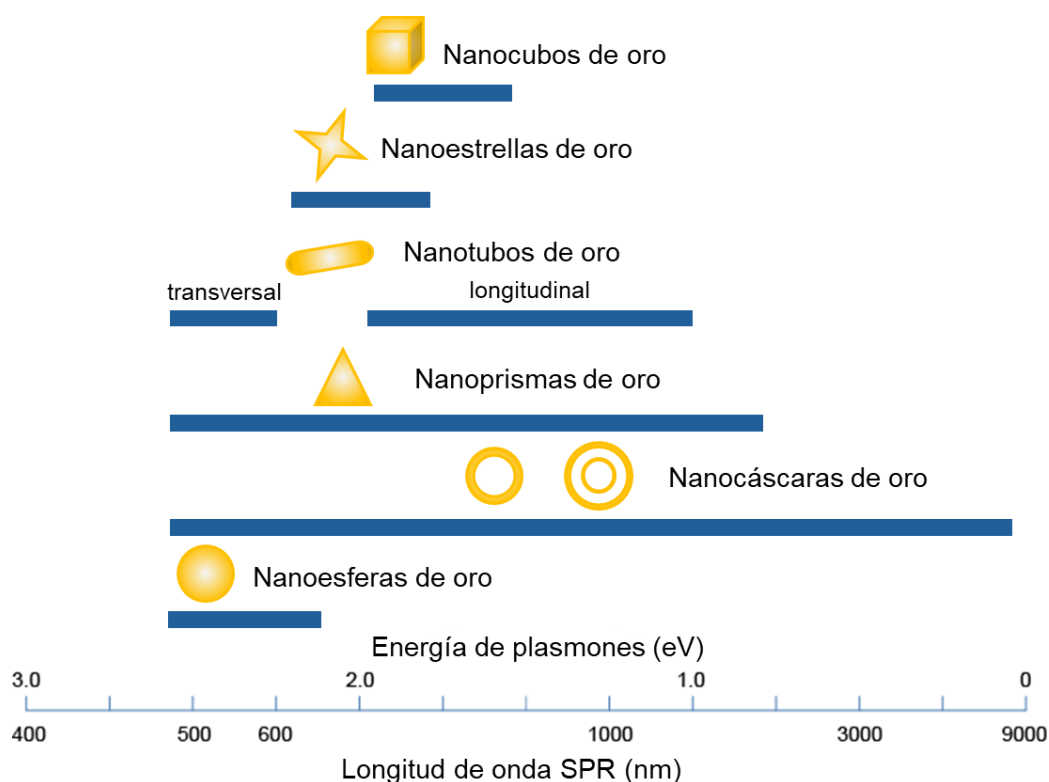


Figura 6. Intervalo de plasmón de resonancia de superficie de AuNP en función de su morfología. Adaptada de Tréguer-Delapierre et al., (2008).

En la ingeniería de tejidos, el objetivo principal de las AuNPs consiste en actuar como una herramienta multimodal para mejorar las propiedades del andamio y la diferenciación celular; dentro de IT han sido desarrolladas diferentes estrategias que utilizan AuNP. Las AuNP

incorporadas a andamios han mostrado resultados prometedores en la mejora de las propiedades mecánicas de los biomateriales, la proliferación y diferenciación celular y la comunicación celular (Tabla 6) (Vial et al., 2017).

Las AuNP se han integrado con diferentes tipos de andamios para mejorar su rendimiento y obtener tejidos que puedan imitar la estructura y función de los tejidos nativos. Generalmente, la integración de AuNP en los andamios se puede realizar utilizando varias técnicas como la formación *in situ* de las partículas en el material del andamio preformado, la dispersión dentro del hidrogel o la introducción en la solución peptídica que puede mediar la reticulación del material de andamiaje y formar enlaces con las AuNP (Yadid et al., 2019).

Uno de los principales retos en la generación de parches cardíacos es la estimulación eléctrica, los cardiomiocitos son células que responden a señales eléctricas, por lo tanto, el desarrollo de un andamio que genere estímulos eléctricos se vuelve atractivo para mejorar la comunicación eléctrica entre las células cardíacas adyacentes (Vial et al., 2017).

El uso de nanopartículas de oro ha sido estudiado para mejorar las propiedades mecánicas y eléctricas de los andamios o el acoplamiento eléctrico entre las células, la adhesión celular y, para promover la proliferación, diferenciación y maduración de las células troncales, además de usarse como adhesivos tisulares para permitir la integración de parches de tejidos modificados genéticamente con órganos nativos (Yadid et al., 2019). En un trabajo realizado por You et al. (2011) se construyó un andamio compuesto de AuNP e hidroximetilmetraquilato – hidrófilo (HEMA) obteniendo niveles mejorados en la expresión de conexina 43 (Cx43), una proteína ubicada entre las células cardíacas y responsable de la transferencia de señales eléctricas.

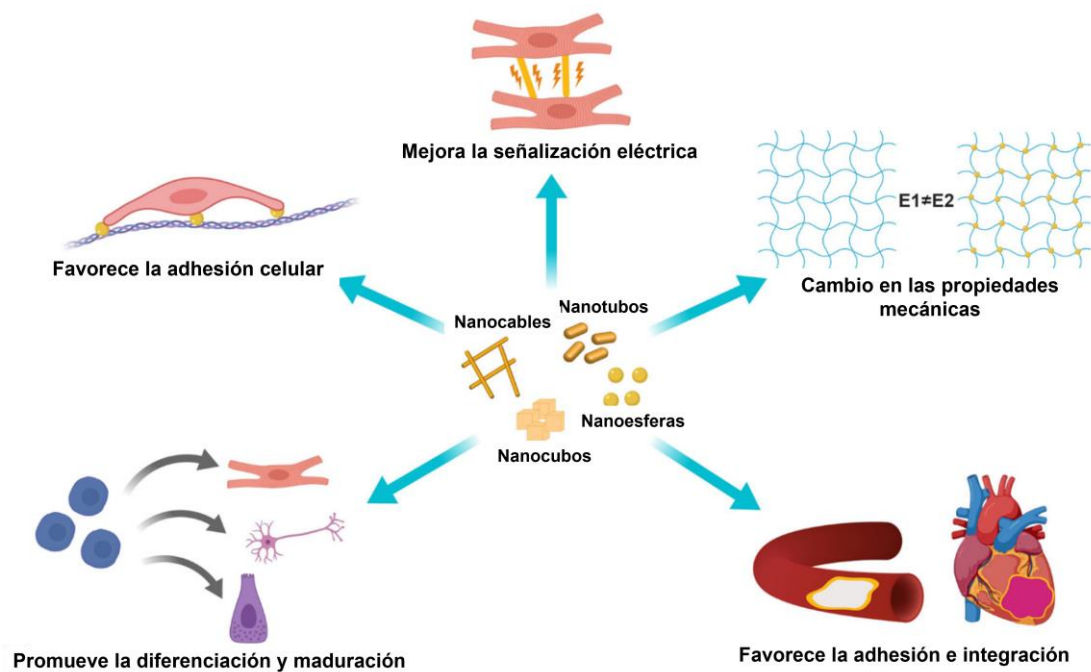


Figura 7. Usos de las nanopartículas de oro en ingeniería de tejidos cardíacos (adaptada de Yadid et al., 2019).

3. Justificación

Ante la ineficacia de los tratamientos existentes para tratar los daños generados tras sufrir un infarto, se ha trabajado en el desarrollo de andamios que permitan el cultivo de células cardíacas con la finalidad de generar un tejido *in vitro* que posteriormente pueda ser implantado en pacientes y favorezcan a la restauración y la función del tejido dañado, hasta el momento el uso de andamios de alginato-quitosano han mostrado propiedades idóneas para la proliferación celular, sin embargo, se debe trabajar en mejorar la propiedad de conductividad eléctrica que favorezcan la comunicación celular y por tanto la funcionalidad correcta de las células cardíacas.

Un enfoque novedoso es la generación de andamios funcionalizados con nanomateriales metálicos como las nanopartículas de oro (AuNP) con la finalidad de mejorar las propiedades conductivas. Los efectos positivos de su aplicación en el cultivo celular han sido determinados en diferentes proyectos de la UAM Cuajimalpa, sin embargo, se ha observado cierta variabilidad durante el proceso de síntesis, además, existe la necesidad de estudiar la

forma en la que interaccionan las AuNP con los biomateriales utilizados. Por lo anterior, la finalidad del presente proyecto fue evaluar y mejorar distintos aspectos de la metodología empleada para la síntesis de las nanopartículas de oro y obtener un protocolo estándar y reproducible para su generación, además de la evaluación de las interacciones que tienen lugar entre los materiales y las nanopartículas y con ello dar una descripción de los posibles efectos positivos en el cultivo de cardiomiocitos.

4. Pregunta de investigación

¿Cómo afecta el uso de nanopartículas de oro las propiedades fisicoquímicas de los andamios de alginato-quitosano?

5. Hipótesis

La incorporación de nanopartículas de oro en los andamios de alginato-quitosano mejorará sus propiedades fisicoquímicas, creando un entorno más eficaz para la ingeniería de tejidos.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Realizar la síntesis de nanopartículas de oro y evaluar su efecto sobre las propiedades físicas de andamios de alginato-quitosano con potencial aplicación en el cultivo de células cardíacas.

6.2. Objetivos específicos

- 1) Estandarizar una metodología para obtener nanopartículas de oro con propiedades reproducibles.
- 2) Realizar la síntesis de nanopartículas de oro con y sin con alginato (AuNP y AuNP-ALG).
- 3) Evaluar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas sintetizadas.

- 4) Realizar la funcionalización de andamios de alginato-quitosano (ALG-CS) con AuNP y AuNP-ALG.
- 5) Evaluar el efecto del uso de nanopartículas, concentración y método de funcionalización, mediante pruebas de porosidad, hinchamiento y degradación de los andamios.

7. Materiales y métodos experimentales

7.1. Descripción de las técnicas experimentales empleadas

7.1.1. Técnicas de espectroscopia

7.1.1.1. Dispersión dinámica de luz y potencial Z

La dispersión dinámica de luz (DLS) y el potencial zeta (ZP) son dos herramientas que permiten la determinación del tamaño de partícula y de la carga superficial que son responsables de una variedad de efectos biológicos de las NP, incluida la absorción celular, la toxicidad y la disolución (Bhattacharjee, 2016).

La dispersión dinámica de luz, también conocida como espectroscopía de correlación de fotones o dispersión de luz cuasi-elástica es empleada para medir el tamaño de partículas que se encuentran dispersas en un líquido a partir del monitoreo de las fluctuaciones causadas por el movimiento browniano aleatorio de las partículas, el cual se vincula a un diámetro hidrodinámico equivalente que se define como el diámetro de una esfera dura hipotética que se difunde con la misma velocidad que las partículas ensayadas bajo DLS.

Esta técnica puede medir el tamaño de partículas pequeñas desde un nanómetro hasta una escala submicrónica en solución o suspensión mediante una fuente de luz monocromática. En este caso, un haz de luz láser se enfoca en una solución de muestra y un detector de fotones determina la intensidad del desplazamiento Doppler de la radiación incidente dependiente del tiempo de las fluctuaciones. Posteriormente, la señal del detector pasa a una placa de procesamiento digital denominada correlador que comparará la intensidad de dispersión en intervalos de tiempos sucesivos para determinar la velocidad a la que varía la intensidad. La

información obtenida pasará al equipo de cómputo para que el software analice los datos y brinde la información del tamaño (figura 8) (Al Thaher et al., 2020; Bhattacharjee, 2016; Malvern Instruments, 2017)

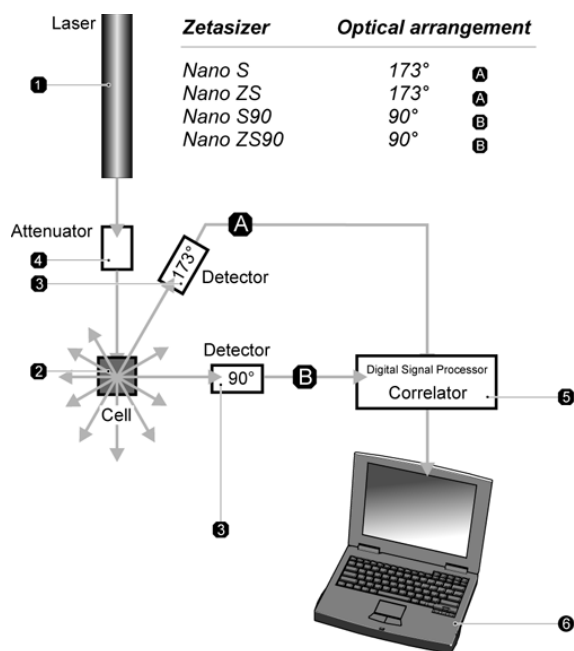


Figura 8. Esquema de configuraciones ópticas del Zetasizer Nano series para mediciones de DLS. (Malvern Instruments, 2017)

Por otra parte, el potencial zeta (ZP) de una partícula coloidal determina el estado electrónico de la superficie de las partículas. Los valores ZP encontrados entre 20–30 mV y $\geq \pm 30$ mV son referidos a dispersiones moderadamente estables y altamente estables, respectivamente (Al Thaher et al., 2020; Bhattacharjee, 2016)

Para medir el potencial Z de las partículas en suspensión se emplea un láser como fuente de luz la cual se divide para proporcionar un haz de luz incidente y un haz de referencia. El haz incidente pasa a través de la muestra, detectando la luz dispersada en un ángulo de aproximadamente 13°. Después, un campo eléctrico es aplicado a la celda donde se encuentra la muestra, aquellas partículas que se muevan dentro del volumen de medición harán que la intensidad de la luz detectada fluctúa con una frecuencia proporcional a la velocidad de la partícula y la información resultante es enviada a un procesador digital y posteriormente al software (figura 9) (Malvern Instruments, 2015).

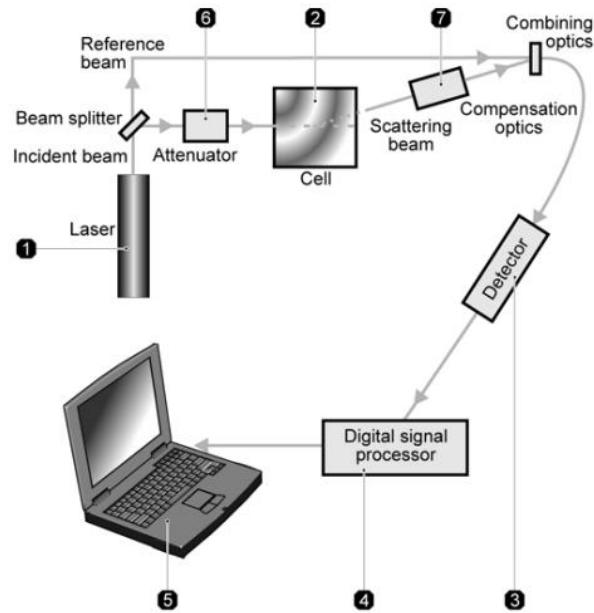


Figura 9. Esquema de configuraciones ópticas del Zetasizer Nano series para mediciones de ZP. (Malvern Instruments, 2015)

Se empleó el equipo Zetasizer Nano ZS ZEN 3500 de Malvern Instruments para la evaluación de las muestras y la versión de software 7.03 para el análisis de datos encontrado en el Laboratorio de Química, Farmacia Molecular y de Materiales de la UAM-C.

7.1.1.2. Plasmón de resonancia superficial

El plasmón de resonancia superficial es un fenómeno óptico que surge de la interacción entre una onda electromagnética y los electrones de conducción que contiene una nanopartícula. Los electrones de nanopartículas de oro son impulsados por el campo eléctrico para oscilar colectivamente a una frecuencia resonante relativa a la red de iones positivos. A esta frecuencia de resonancia, la luz incidente es absorbida por la nanoestructura. Algunos de estos fotones se liberan con la misma frecuencia en todas las direcciones, un proceso conocido como dispersión, y algunos se convierten en fonones o vibraciones de la red, un proceso denominado absorción. En general, el pico SPR de las nanoestructuras de oro incluye componentes de dispersión y absorción, que pueden diferir sustancialmente según el tamaño y la forma de la nanoestructura. Por lo tanto, los picos SPR de AuNP se pueden ajustar desde

la región visible hasta la del infrarrojo cercano (NIR) (800-1200 nm) controlando su forma y estructura.

7.1.2. Técnicas de microscopía

7.1.2.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) nos permite obtener una imagen detallada de una partícula con alta calidad y resolución espacial mediante un haz de electrones acelerados que poseen una longitud de onda más corta que los fotones de luz visible y lentes electrostáticos o electromagnéticos que brindan una mayor profundidad de campo y un aumento de hasta 100 000x, lo cual permite la visualización de partículas nanométricas (Akhtar et al., 2018; Al Thaher et al., 2020).

La optimización del análisis depende del tipo de electrones emitidos, los cuales pueden ser secundarios o retrodispersados. Los electrones secundarios (SE) son producidos por interacciones inelásticas entre el haz de electrones primario y la muestra y tienen menor energía que los electrones retrodispersados (5kV). Por otra parte, los electrones retrodispersados (BSE) se reflejan después de las interacciones inelásticas entre el haz y la muestra, es decir, provienen de regiones más profundas (Nanakoudis, 2019).

Los electrones secundarios permiten la visualización de la morfología y la topografía de la muestra, mientras que los retrodispersados se utilizan para mostrar los contrastes de la composición de la muestra, las imágenes de BSE muestran una alta sensibilidad a las diferencias en el número atómico; cuanto mayor sea el número atómico, más brillante aparecerá el material en la imagen. (Akhtar et al., 2018; Al Thaher et al., 2020).

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido TM3030 Plus del Laboratorio de Química, Farmacia Molecular y de Materiales de la UAM-C, para obtener imágenes de los andamios sometidos a pruebas de degradación. El equipo se configuró con un detector de electrones secundarios y un voltaje de 5 kV, se obtuvieron capturas a aumentos de 130x y 250x. Los andamios funcionalizados con AuNP y AuNP-ALG fueron observados en un microscopio

electrónico de barrido (JSM-7600F, Jeol Ltd.), disponible en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, empleando electrones retrodispersados y 5 kV.

7.1.2.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es la herramienta más eficaz para la caracterización de nanomateriales a una resolución espacial desde el nivel atómico (1–100 nm) hasta el nivel micrométrico (Al Thaher et al., 2020). A diferencia de SEM, TEM utiliza electrones transmitidos de alto voltaje (60-300 kV). Un cañón de electrones en la parte superior de un TEM emite electrones que viajan a través del tubo de vacío del microscopio, la lente electromagnética enfoca los electrones en un haz muy fino y luego este haz atraviesa la muestra, los electrones se dispersan o golpean una pantalla fluorescente en la parte inferior del microscopio y generan una imagen de la muestra (Figura 10).

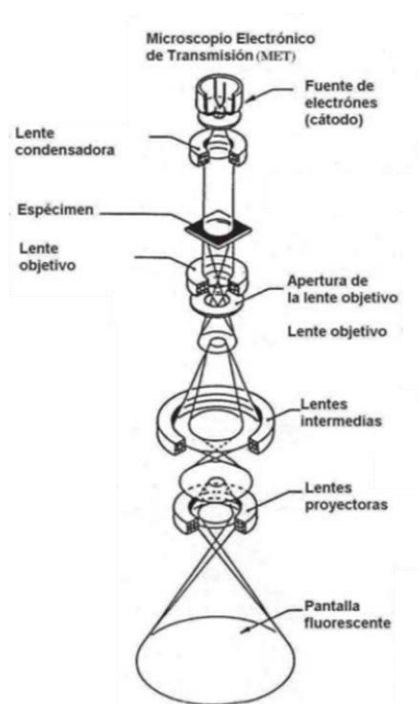


Figura 10. Configuración de un microscopio electrónico de transmisión. Adaptada de González Mancera & Noguez Amaya, 2006.

La observación de las nanopartículas de oro y oro-alginato fueron obtenidas en el microscopio electrónico de transmisión JEM-2100Plus (Jeol™) del Centro de Nanociencias, Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional y el microscopio JEM2100F (Jeol™) del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

7.2. Métodos experimentales

7.2.1. Síntesis de nanopartículas de oro

La síntesis de nanopartículas de oro se realizó mediante la formación de una nanocoraza de oro a partir de un núcleo polimérico de acuerdo con el procedimiento de Topete et al. (2014), con algunas modificaciones.

Formación de núcleos de PLGA

Para la formación de núcleos de PLGA, se prepararon 5 mL de una solución de PLGA al 10% p/v en acetona y se añadió por goteo en una solución acuosa de copolímero Pluronic F-127 al 1% en una proporción 1:20 que fungió como tensoactivo para la formación de partículas uniformes, hasta lograr un volumen final de 20 mL. Lo anterior fue realizado en agitación a 250 rpm y en un cuarto frío ($T= 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) (figura 11).



Figura 11. Formación de núcleos de PLGA.

La solución resultante fue homogeneizada mediante sonicación en una chaqueta de hielo con una punta sonicadora de 750 W y frecuencia de 20 kHz a 40% de amplitud durante 10 min, posteriormente se dejó en agitación por 4 horas. Una vez pasado el tiempo de agitación se realizaron 3 ciclos de lavado mediante centrifugación a 5,500 x g por 30 min, retirando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet formado en agua Milli-Q, igualando el volumen inicial (figura 12). Posteriormente los núcleos se sometieron a homogeneización mediante sonicación con las condiciones antes descritas y se dejó en agitación a temperatura ambiente por una noche.

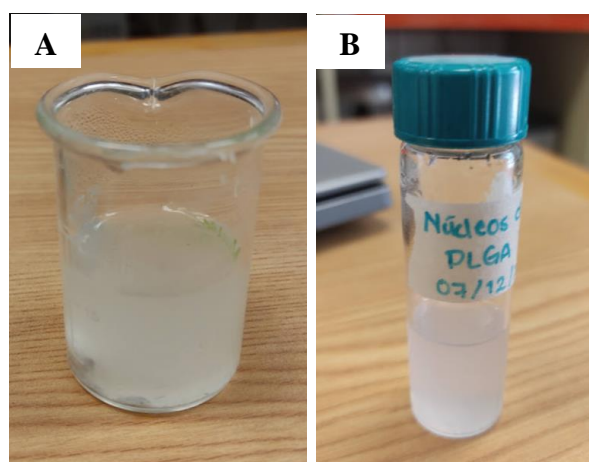


Figura 12. Núcleos de PLGA. A) previo a los lavados, B) posterior a los lavados.

Funcionalización de núcleos de PLGA con alginato (PLGA-ALG)

Los núcleos de PLGA resultantes fueron sonicados durante 10 minutos en una punta de 750 W, 20 kHz y 40% de amplitud. Se tomaron 10 mL y se le agregó en agitación una solución acuosa de alginato de sodio al 1% p/v en una relación 1:20 permaneciendo en agitación por un lapso de 2 a 4 horas a 250 rpm.

Una vez pasado el tiempo de agitación, fueron realizados 3 ciclos de lavados y posteriormente fueron homogeneizados mediante sonicación (figura 13).

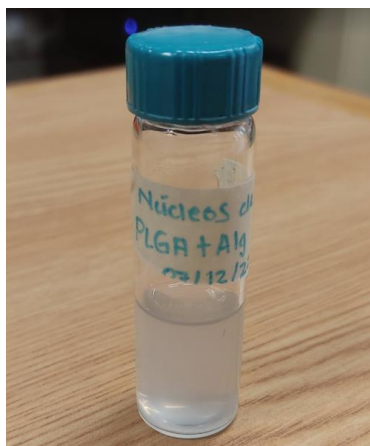


Figura 13. Núcleos de PLGA-ALGinato.

Preparación de Nanosemillas de oro (nanoseeds)

La formación de las nanopartículas de oro fue realizada por medio de nanosemillas de oro generadas de acuerdo con la metodología descrita por Jana et al. (2001). En resumen, 25 mL de una solución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ al 0.01 M y se vertieron 0.125 mL a 10 mL de una solución acuosa de citrato trisódico 2.56×10^{-5} M. Posteriormente se añadieron 0.3 mL de NaBH_4 al 0.1 M frío (4°C). La solución resultante adquirió un color rosa anaranjado de manera inmediata (figura 14A). Finalmente se dejó reposar un día en agitación a 250 rpm y en ausencia de luz, con la finalidad de garantizar la uniformidad de las nanosemillas y permitir la degradación completa del borohidruro de sodio. Al día siguiente la solución adquirió un tono rosado fuerte (figura 14B).

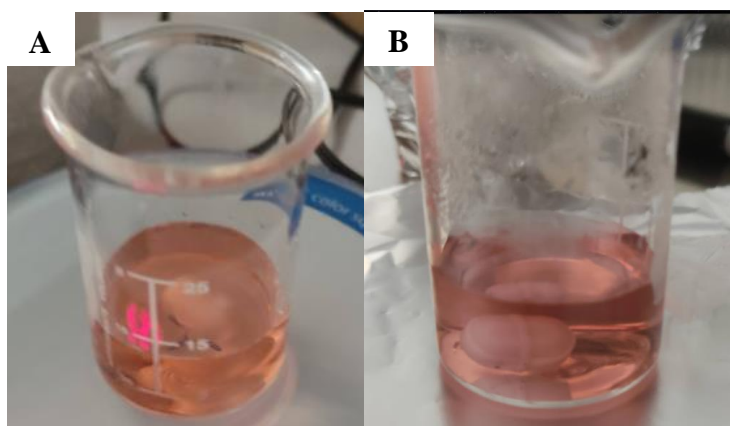


Figura 14. Formación de nanoseeds. A) Solución inicial. B) Posterior a 1 noche de agitación.

Generación de precursores

Los núcleos de PLGA y PLGA-ALG se mezclaron con la solución de nanosemillas en una relación 1:1 hasta obtener un volumen final de 6 mL (figura 15) y se mantuvieron en agitación por 18 horas protegiéndolos de la luz.

Los precursores generados fueron lavados mediante centrifugados a 7000 x g por 30 min y resuspendidos en agua milliQ, posteriormente fueron sonicados por 5 minutos en una punta sonicadora.



Figura 15. Formación de precursores, núcleos de PLGA+nanosemillas de oro.

Crecimiento de la coraza de oro

Para llevar a cabo el crecimiento de las nanosemillas de oro unidas a los núcleos de PLGA, se preparó una solución de crecimiento. Se agregaron 2 mL de una solución acuosa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.025M a 98 mL de solución de K_2CO_3 , se deja sin agitación durante 24 horas en oscuridad, evitando foto-oxidación. La solución resultante debe ser transparente indicando la solubilización de los iones Au^{3+} y la presencia de especies AuCl_4^- .

Se agregaron 2.025 mL de precursores (núcleos con Nseeds) a 45 mL de solución de crecimiento en agitación. Finalmente 225 μL de solución de ácido ascórbico de manera abrupta para la reducción de sal de oro, obteniendo finalmente ~47 mL de solución con nanopartículas de cada tipo (figura 16).



Figura 16. Formación de las nanopartículas de oro y oro-alginato.

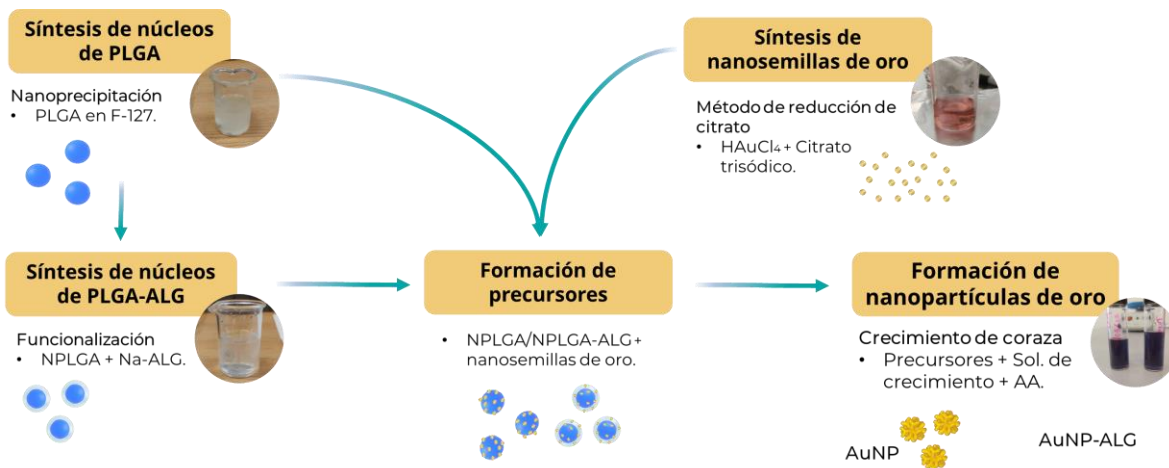


Figura 17. Esquema general para la síntesis de nanopartículas de oro y oro-alginato.

7.2.2. Caracterización de las nanopartículas de oro (AuNP) y oro-alginato (AuNP-ALG)

7.2.2.1. Medición de tamaño y potencial Z

De las soluciones resultantes de núcleos de PLGA, PLGA-ALG, nanosemillas, precursores y AuNP y AuNP-ALG fueron realizadas diluciones en agua Milli-Q en una relación 1:100. Posteriormente las soluciones fueron depositadas en una celda Zeta Cell (Malvern Instruments) previamente filtradas con ayuda de una jeringa y de una membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) con 0.45 μm de tamaño de poro y 25 mm de diámetro (Fluoropore™), finalmente se midieron en el equipo Zetasizer Nano ZS ZEN 3500 (Malvern

Instruments) disponible en el laboratorio de Química, Farmacia Molecular y de Materiales de la UAM-C. Se tomaron mediciones al término de la síntesis y posterior a 3 y 6 meses.

7.2.2.2. Espectroscopía de Uv-Vis

Se realizó un lavado de las AuNP y AuNP-ALG mediante centrifugación a 5500 x g por 30 min y posterior resuspensión en agua Milli-Q. Posteriormente se vertió 1 mL de la solución en una celda de cuarzo para su observación en un espectrómetro UV-vis (GenesysTM 10S, Thermo Scientific) del laboratorio de docencia de la UAM-C, mediante un barrido de 200 a 1100 nm. Se empleó agua Milli-Q como blanco.

7.2.2.3. Estabilidad a diferentes pH

La estabilidad de las nanopartículas se analizó mediante el empleo de buffers con pH diferente (3, 6, 7.4 y 9). Los buffers con pH 3 y 9 se prepararon mediante la combinación de dos soluciones, una de ácido cítrico 0.1 M (C₆H₈O₇) y otra de fosfato de sodio dibásico 0.2 M (Na₂HPO₄*7H₂O). Como pH 6 se empleó agua Milli-Q y PBS como pH fisiológico (pH=7.4).

Las AuNP y AuNP-ALG fueron homogeneizadas con una punta sonicadora de 750W, 20 kHz y 40% de amplitud durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron a las soluciones buffer en una relación 50:50 con un volumen final de 2 mL para las mediciones mediante DLS y 50:50 con un volumen de 2 mL para las mediciones por UV-vis siguiendo el procedimiento descrito en las secciones 7.2.2.1 y 7.2.2.2. Las mediciones se realizaron a las 2 y 24 h.

7.2.2.4. Microscopía electrónica de barrido y de transmisión

Para los análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM), se realizó una dilución 1:100 de AuNP y AuNP-ALG, posteriormente las diluciones fueron homogeneizadas mediante sonicación por 10 minutos (apartado 7.2.1) y enseguida se depositaron 50 µL de cada muestra en una placa de silicon wafer. Las muestras permanecieron en secado a temperatura ambiente y una vez secas se realizó su observación por SEM en un microscopio TM3030Plus (Hitachi

High-tech, America) disponible en el laboratorio de Química, Farmacia Molecular y de Materiales de la UAM-C. Las observaciones fueron realizadas a 5000x, 10000x y 30000x utilizando un voltaje de 15 kV y electrones retrodispersados.

Para la observación por TEM, las muestras fueron preparadas y depositadas en una rejilla de cobre para TEM. Las rejillas con la muestra permanecieron en secado a temperatura ambiente y posteriormente fueron llevadas para su observación en el microscopio electrónico de transmisión JEM-2100Plus (Jeol™) del Centro de Nanociencias del IPN. Las imágenes correspondientes a los lotes 5-7 se obtuvieron en el microscopio electrónico JEM2100F (Jeol™) del laboratorio de Microscopía Electrónica de la UAM-I.

7.2.3. Elaboración de andamios de alginato-quitosano (ALG-CS)

Se elaboraron andamios de alginato y quitosano (Beltran-Vargas et al., 2022). Alginato de sodio y quitosano en polvo fueron agregados a un vaso de precipitado en una relación 0.75-1.25% (p/v), permanecieron en agitación en seco durante 1 minuto, posteriormente fue agregado el volumen de agua Milli-Q correspondiente y se agitó durante 30 minutos a 2000 rpm, posteriormente fue agregado ácido acético para ajustar el pH de la solución a un valor entre 5-6 y permaneció en agitación por 3 horas. La solución, fue vertida en una caja de 24 pozos y congelada a -20 °C por una noche, posteriormente fueron secados mediante liofilización durante 7 horas (0.050 mBar y -49 °C). Se vertió gluconato de calcio al 1% (p/v) en los andamios secos y luego de 30 minutos fue retirado, seguido de una serie de 5 lavados con agua Milli-Q, el agua agregada en el 5° lavado permaneció hasta el día siguiente y luego fue retirada, los andamios se llevaron a congelación a -20 °C por una noche y liofilización durante 7 horas (0.050 mBar y -49 °C).

7.2.4. Funcionalización de andamios de alginato-quitosano

La solución de nanopartículas con y sin alginato (V= 2 mL) fue lavada mediante centrifugación a 5,500 x g durante 30 minutos, resuspendiendo en el volumen original y homogeneizada por sonicación durante 10 minutos a 20 kHz y 40% de amplitud. De las

muestras resultantes se realizaron diluciones para cada tipo de nanopartículas, tal como se indica:

- A) 10 μ L de AuNP/AuNP-ALG en 10 mL de agua Milli-Q.
- B) 2 μ L de la solución A en 50 mL de agua Milli-Q.
- C) 10 μ L de la dilución A en 50 mL de agua Milli-Q.

A los andamios previamente preparados le fueron añadidos 2.5 mL de las diluciones con NP B y C y permanecieron en el medio con nanopartículas durante 1 h y 24 h, tal como se muestra en la tabla 7, posteriormente fueron retirados del medio, congelados a -20 °C y liofilizados durante 3 horas (0.050 mBar y -49 °C).

Tabla 7. Métodos de funcionalización de andamios.

<i>Andamios</i>	<i>Tiempo de inmersión</i>	<i>Observaciones</i>
A	24 h	Andamios preparados
B	1 h	Andamios preparados
C	24 h	Previo a la segunda liofilización, posterior al 4° lavado

Con la finalidad de comprobar que las nanopartículas se incorporaban a andamios de ALG-CS, los andamios fueron funcionalizados mediante los métodos A y B. Las AuNP y AuNP-ALG fueron preparadas y se realizó una dilución 1:1 empleando agua Milli-Q.

7.2.5. Caracterización de andamios de ALG-CS-AuNP y ALG-CS-AuNPAlg

7.2.5.1. Microscopía electrónica de barrido

Los andamios sin NP y los funcionalizados por el método A y B con la mayor concentración, fueron observados en un microscopio electrónico de barrido (JSM-7600F, Jeol Ltd.), disponible en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la UAM-Iztapalapa, empleando electrones retrodispersados y 5 kV. Se realizaron vistas superficiales y laterales.

7.2.5.2. Pruebas de hinchamiento

Los andamios con NP o funcionalizados secos fueron pesados en una balanza analítica y posteriormente se introdujeron al medio de hinchamiento (Milli-Q). Se tomaron mediciones gravimétricas a distintos tiempos, tal como se indica en la tabla 8.

Tabla 8. Mediciones tomadas a diferentes tiempos de los andamios inmerso en el medio de hinchamiento.

<i>Tiempo de inmersión</i>	<i>Tiempo de medición</i>
7 días	1, 2 y 3 h / 1-7 d
2 meses	1, 2 y 3 h / 1-7 d / día 14, 21, 30, 45 y 60.

Los porcentajes de hinchamiento fueron calculados de acuerdo con la siguiente relación:

$$S(\%) = \frac{W_s - W_0}{W_0} * 100 \quad (1)$$

Donde S es el porcentaje de hinchamiento, W_0 es el peso en seco del andamio y W_s es el peso del andamio hinchado al tiempo t .

7.2.5.3. Estudios de degradación

Posterior al tiempo de inmersión de las pruebas de hinchamiento los andamios fueron retirados del medio y posteriormente secados mediante liofilización durante 5 horas (0.05 mBar y -49 °C). Una vez secos fueron pesados y fue calculado el porcentaje de degradación de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$D(\%) = \frac{W_0 - W_f}{W_0} * 100 \quad (2)$$

Donde D es el porcentaje de degradación, W_0 y W_f es el peso del andamio seco previa y posteriormente a las pruebas de degradación, respectivamente.

Una vez realizadas las pruebas, los andamios fueron observados mediante microscopía electrónica de barrido a 25x, 100x y 250x.

7.2.5.4. Porosidad

La porosidad de los andamios se determinó mediante el método de desplazamiento de líquido utilizando etanol como medio penetrante. Se registró el peso seco de los andamios y enseguida cada andamio se colocó en un tubo falcón con 3 mL de etanol absoluto y permaneció inmerso durante 48 h. Posterior a ese tiempo el andamio se retiró del medio y con ayuda de un paño de seda se retiró el etanol superficial para la obtención del peso húmedo. Se registró también el volumen final y finalmente se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Porosidad}(\%) = \frac{W_s - W_0}{\rho V} * 100 \quad (3)$$

Donde W_0 y W_s es el peso del andamio seco previa y posteriormente a su inmersión, respectivamente; ρ es la densidad del etanol y V corresponde a la diferencia del volumen inicial menos el final del etanol desplazado.

7.2.6. Pruebas biológicas

7.2.6.1. Cultivo de cardiomiocitos

Las pruebas biológicas fueron realizadas por compañeros del grupo de ITMR de la UAMC. Para realizar el cultivo primario de cardiomiocitos se utilizaron ratas Wistar de 2-3 días de edad. En un entorno sanitizado se limpió con etanol al 70% el torso del ejemplar y se realizó una incisión en el tórax para exponer y extraer el corazón. Se utilizó un estereoscopio para retirar el pericardio y hacer un corte transversal diagonal para separar aurículas y ventrículos. Las aurículas fueron descartadas y los ventrículos se almacenaron en solución Hanks fría hasta completar 9-12 corazones. En seguida, se hicieron tres lavados con solución salina de Hanks fría y se continuó con la disgregación mecánica realizando cortes finos al tejido ventricular hasta obtener secciones sumamente pequeñas.

Se realizaron 3 ciclos (de disgregación enzimática con 10 mL de tripsina 0.125%, v/v a 37 °C (tripsina 0.25% v/v diluida en solución Hanks). Cada ciclo de disgregación enzimática consistió en 5 minutos de agitación lenta más 25 minutos de incubación (37 °C, 5% CO₂). La solución de tripsina recuperada se filtró (filtro de 70 µm) para eliminar restos de matriz extracelular y fibroblastos, en seguida se añadió neutralizador de tripsina en una relación de volumen 1:1. Inmediatamente después, la solución celular se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en medio M199 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 5% de suero de caballo (HS) y 1% penicilina. En seguida, se realizó un paso de preplaqueo para eliminar fibroblastos y otros tipos celulares, para lo cual las células fueron sembradas en cajas de 6 pozos durante 90 minutos en 3 mL de medio M199 suplementado en una incubadora de cultivo celular. Al finalizar el preplaqueo, se recuperó el medio y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos; se recuperó el botón y se realizó el conteo celular con una cámara de Neubauer; en seguida las células cardíacas fueron sembraron por goteo en los andamios previamente esterilizados con radiación UV.

Se generaron diferentes tipos de constructos, de andamios funcionalizados por cada método (A, B y C). Cada constructo fue sembrado con 2×10^6 CM. Todos los constructos fueron cultivados durante 7 días en condiciones de cultivo estándar (37 °C, 5% CO₂), en una caja de 96 pozos con cambio de medio cada 24 horas.

7.2.6.2. Procesamiento histológico de los constructos

Después de 7 días de cultivo, se realizó el procesamiento histológico de los constructos. Se realizaron 3 lavados rápidos con PBS frío y se fijaron con formaldehído al 4% durante 24 horas a 4 °C. En seguida se deshidrataron e incluyeron en parafina con el siguiente protocolo: OH-40% (15 min), OH-50% (15 min), OH-60% (15 min), OH-70% (1 noche), OH-80% (15 min), OH-90% (15 min), OH-96% (15 min x 2), OH-100% (15 min x 2), OH-xileno (15 min), xileno (15 min x 2), parafina a 60 °C (30 min x 2). Al final del segundo paso de parafina, los constructos fueron orientados en un histoarreglo el cual se dejó enfriar 1 hora en una placa fría y después se realizaron cortes consecutivos de 5 micras.

7.2.6.3. Tinción hematoxilina-eosina (H&E)

Las laminillas obtenidas fueron desparafinadas 15-20 min en una estufa a 60 °C y se aplicó el siguiente protocolo para hacer la tinción H&E: xileno (15 baños x 2), OH-100% (15 baños), OH-96% (15 baños), OH-80% (15 baños), OH-70% (15 baños), dH₂O (15 baños), hematoxilina (90 segundos), H₂O grifo (enjuagar), OH-70% (15 baños), eosina amarillenta (30 segundos), OH-96% (15 baños x 2), OH-100% (15 baños x 2), xileno (15 baños), xileno (mientras se monta con Entellan). Al día siguiente, las laminillas fueron escaneadas con el microscopio digital Aperio.

7.2.7. Procesamiento de datos y análisis estadístico

El análisis estadístico y gráfico de datos fue realizado en el software Origin 2018 de OriginLab®. Los resultados se presentan como la media \pm SD de los datos. Para el análisis estadístico, se emplearon pruebas ANOVA de dos vías, pruebas de Tukey y pruebas de Friedman, realizadas con el software GraphPad Prism 8.

8. Resultados

Se realizó la estandarización del protocolo para la síntesis de nanopartículas de oro y oro-alginato. Para la modificación de andamios de alginato-quitosano se utilizaron dos tipos de nanopartículas de oro sin y con alginato. En esta sección se exponen los resultados obtenidos, los cuales se dividen en dos partes principales: la caracterización fisicoquímica (DLS, UV-vis, SEM y TEM) de los dos tipos de nanopartículas y la caracterización de los andamios funcionalizados (SEM, estudios de hinchamiento, degradación y porosidad).

8.1. Caracterización de las nanopartículas sintetizadas

8.1.1. Tamaño y potencial Z de AuNP y AuNP-ALG.

Las tablas 9a y 9b muestran los valores de los tamaños promedio de las nanopartículas con y sin alginato durante cada paso de la síntesis. Se realizaron 7 lotes, en los cuales del 4-7 se aumentaron pasos de sonicación en cada etapa durante la síntesis (posterior a la formación

de núcleos, antes y después de la funcionalización con alginato y previo a la incorporación de nanosemillas), se siguió el mismo procedimiento en cada lote (tabla 9b). Para el caso de las AuNP (lotes 4-7), los núcleos de PLGA generados presentaron tamaños de entre 167-303 nm y al unirse a nanosemillas con tamaño de entre 109-254 nm formaron precursores en un rango de 153-296 nm, resultando en AuNP de 77-134 nm. Por otra parte, para el caso de AuNP-ALG los núcleos se encontraron entre 218-254 nm y al unirse a nanosemillas formaron precursores con un tamaño de 218-331 nm, resultando en AuNP de 66-81 nm. Respecto a los lotes 1-3, se logró disminuir el tamaño de ambos tipos de NP de ~180 nm a ~80 nm.

Tabla 9. Tamaño (nm) de los nanomateriales obtenidos durante el proceso de síntesis de AuNP y AuNP-ALG mediante DLS. Se muestra la media \pm SD de los datos. A) Metodología inicial. B) Metodología final.

A) Previo a los pasos extra de sonicación

<i>Muestra</i>	<i>Tamaño (nm)</i>		
	<i>Lote 1</i>	<i>Lote 2</i>	<i>Lote 3</i>
Núcleos PLGA	455.5 \pm 72.4	272.0 \pm 11.2	445.0 \pm 111.2
Núcleos PLGA-ALG	636.3 \pm 105.8	599.8 \pm 7.3	451.5 \pm 53.1
Nanoseeds	316.0 \pm 104.4	320.7 \pm 84.6	455.6 \pm 43.9
Precursores	---	---	581.4 \pm 32.3
Precursores-ALG	---	---	511.2 \pm 58.5
AuNP	161.9 \pm 6.9	134.0 \pm 3.1	244.5 \pm 9.1
AuNP-ALG	165.3 \pm 8.4	105.0 \pm 6.6	263.1 \pm 8.8

B) Siguiendo la metodología final (pasos extra de sonicación)

<i>Muestra</i>	<i>Tamaño (nm)</i>			
	<i>Lote 4</i>	<i>Lote 5</i>	<i>Lote 6</i>	<i>Lote 7</i>
Núcleos PLGA	302.73 \pm 4.23	167.17 \pm 46.12	219.13 \pm 24.16	293.0 \pm 9.94
Núcleos PLGA-ALG	228.03 \pm 10.76	218.17 \pm 15.18	253.53 \pm 26.07	344.47 \pm 42.55
Nanoseeds	254.43 \pm 14.93	133.07 \pm 50.45	109.24 \pm 38.61	161.33 \pm 25.52
Precursores	235.93 \pm 13.57	153.47 \pm 16.43	296.13 \pm 29.35	259.8 \pm 14.14
Precursores-ALG	208.0 \pm 39.24	216.03 \pm 5.65	330.83 \pm 28.44	214.47 \pm 19.62
AuNP	81.72 \pm 2.57	85.91 \pm 2.05	77.31 \pm 1.37	133.07 \pm 1.33
AuNP-ALG	81.18 \pm 1.31	73.95 \pm 2.89	66.54 \pm 1.82	76.3 \pm 0.66

La figura 18 muestra las distribuciones de tamaño obtenidas por DLS, el pico representa el tamaño de partícula que predomina en la muestra y se puede observar una distribución de tamaños estrecha y homogénea de las NPs generadas para los lotes 4-6, en el caso del lote 7 se observa una mayor variabilidad en el tamaño de las NPs obtenidas, probablemente debido a la interferencia de un pico externo. El índice de polidispersidad arrojado por el equipo al realizar las mediciones fue de 0.24 ± 0.02 , este valor indica una baja dispersión o distribución homogénea de tamaños en comparación con el tamaño promedio observado.

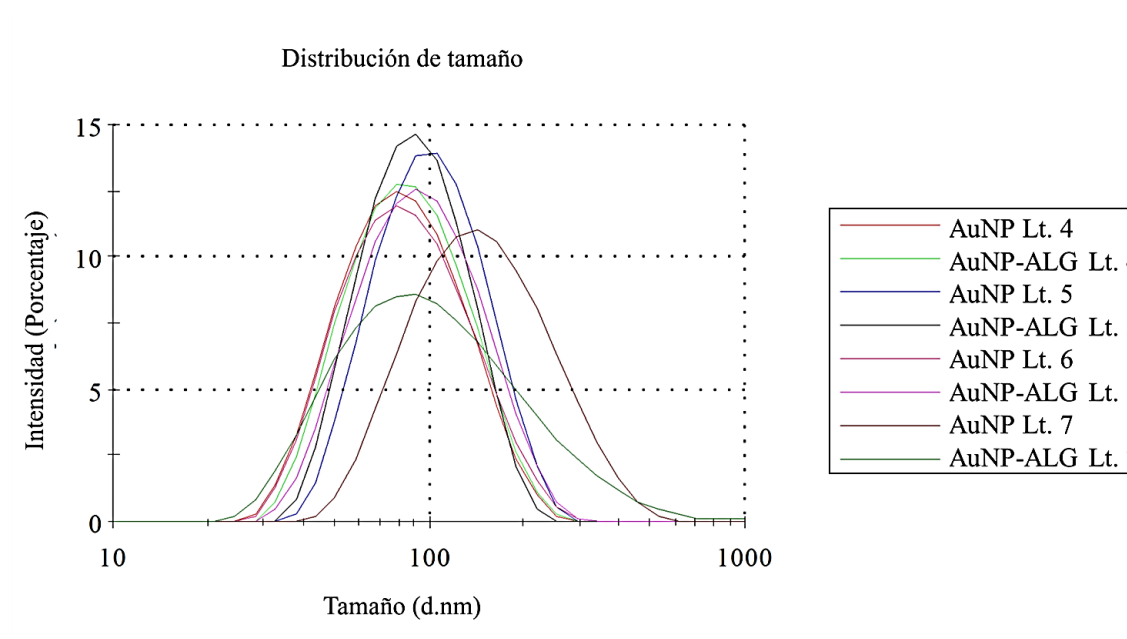


Figura 18. Gráfico de distribución de tamaño obtenido por DLS para los lotes 4-7.

En la tabla 10 se muestran los valores de potencial Z de ambos tipos de nanopartículas, durante el proceso de síntesis de los lotes 4-6, los núcleos de PLGA y PLGA-ALG presentaron valores de entre -10mV a -30 mV y de -9 mV a -26 mV, respectivamente. El potencial Z de las nanosemillas sintetizadas se encontró entre -2 a -13 mV y al unirse a los núcleos con y sin alginato formaron precursores con un PZ de entre -9 a -21 mV y -11 mV, respectivamente. Finalmente, posterior a la síntesis se obtuvieron AuNP y AuNP-ALG con valores de PZ entre -30 mV y -35 mV para ambos casos (tabla 10).

Tabla 10. Potencial Z (mV) de los nanomateriales obtenidos durante el proceso de síntesis de AuNP y AuNP-ALG mediante DLS. Se muestra la media \pm SD de los datos. A) Metodología inicial. B) Metodología final.

A) Previo a los pasos extra de sonicación

<i>Muestra</i>	<i>Potencial Z (mV)</i>		
	<i>Lote 1</i>	<i>Lote 2</i>	<i>Lote 3</i>
Núcleos PLGA	-16.3 \pm 1.40	-25.73 \pm 0.98	-32.23 \pm 3.27
Núcleos PLGA-ALG	-42.47 \pm 5.80	-27.67 \pm 1.75	-39.53 \pm 0.31
Nanoseeds	-29.07 \pm 8.73	-34.03 \pm 1.36	-38.80 \pm 3.80
Precursores	---	---	-22.23 \pm 3.37
Precursores-ALG	---	---	-22.23 \pm 2.01
AuNP	-34.57 \pm 3.91	-23.27 \pm 1.14	-15.80 \pm 3.46
AuNP-ALG	-33.43 \pm 1.91	-31.4 \pm 0.20	-19.97 \pm 5.0

B) Siguiendo la metodología final

<i>Muestra</i>	<i>Potencial Z (mV)</i>			
	<i>Lote 4</i>	<i>Lote 5</i>	<i>Lote 6</i>	<i>Lote 7</i>
Núcleos PLGA	-16.13 \pm 4.15	-10.63 \pm 4.71	-30.03 \pm 3.71	0.97 \pm 2.04
Núcleos PLGA-ALG	-10.02 \pm 5.20	-8.52 \pm 0.65	-26.20 \pm 4.68	-6.92 \pm 4.54
Nanoseeds	-12.61 \pm 5.45	-7.80 \pm 1.17	-2.19 \pm 0.58	-3.39 \pm 4.10
Precursores	-9.30 \pm 1.12	-14.24 \pm 7.52	-21.37 \pm 2.65	-35.13 \pm 13.83
Precursores-ALG	-11.77 \pm 2.67	-11.97 \pm 4.77	-11.77 \pm 1.36	-10.02 \pm 0.21
AuNP	-30.47 \pm 3.65	-33.53 \pm 1.84	-34.67 \pm 0.78	-26.07 \pm 0.21
AuNP-ALG	-29.27 \pm 1.79	-35.10 \pm 0.70	-34.13 \pm 1.6	-33.33 \pm 3.65

8.1.2. Plasmón de resonancia superficial

Las nanopartículas metálicas presentan propiedades ópticas únicas, una de ellas es el plasmón de resonancia superficial (SPR) que nos brinda información valiosa sobre su tamaño, su forma y su concentración. Las nanopartículas generadas fueron analizadas mediante espectroscopía de UV-vis, obteniéndose un SPR a partir de \sim 500 nm y alcanzando una longitud de onda máxima a 579 nm para AuNP y a 586 nm para AuNP-ALG para el lote 4, 584 nm y 567 nm para el lote 5 y 584 nm y 557 para el lote 6. En la figura 19 se presenta el SPR para los 3 lotes mencionados con comportamiento similar, confirmando la presencia de las nanopartículas de oro.

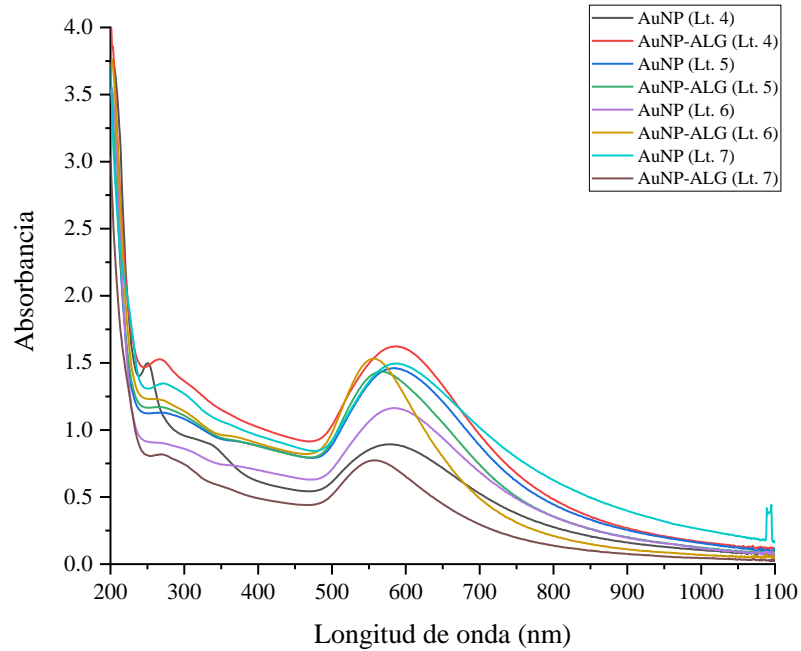


Figura 19. Plasmón de resonancia superficial de AuNP y AuNP-ALG correspondientes a los lotes 4, 5 y 6.

8.1.3. Morfología

Para conocer la morfología de las nanopartículas sintetizadas se realizaron estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM), el Lt. 4 fue analizado en el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías (CNMN) del Instituto Politécnico Nacional, mientras que los lotes 5-7 fueron analizados en el laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Las micrografías de las nanopartículas con y sin alginato obtenidas por TEM se presentan en las figuras 20 y 21, en las que se demuestra una morfología espiculada o tipo estrella y las diferentes poblaciones de tamaño obtenidos por DLS. La dispersión de las partículas sobre sustratos de silicio cristalino fue observada mediante micrografías obtenidas por SEM (Anexo 2), en las que, las partículas de oro se distinguen por presentar mayor brillo que el resto de la imagen. Los tamaños de las partículas brillosas concuerdan con los tamaños obtenidos por DLS.

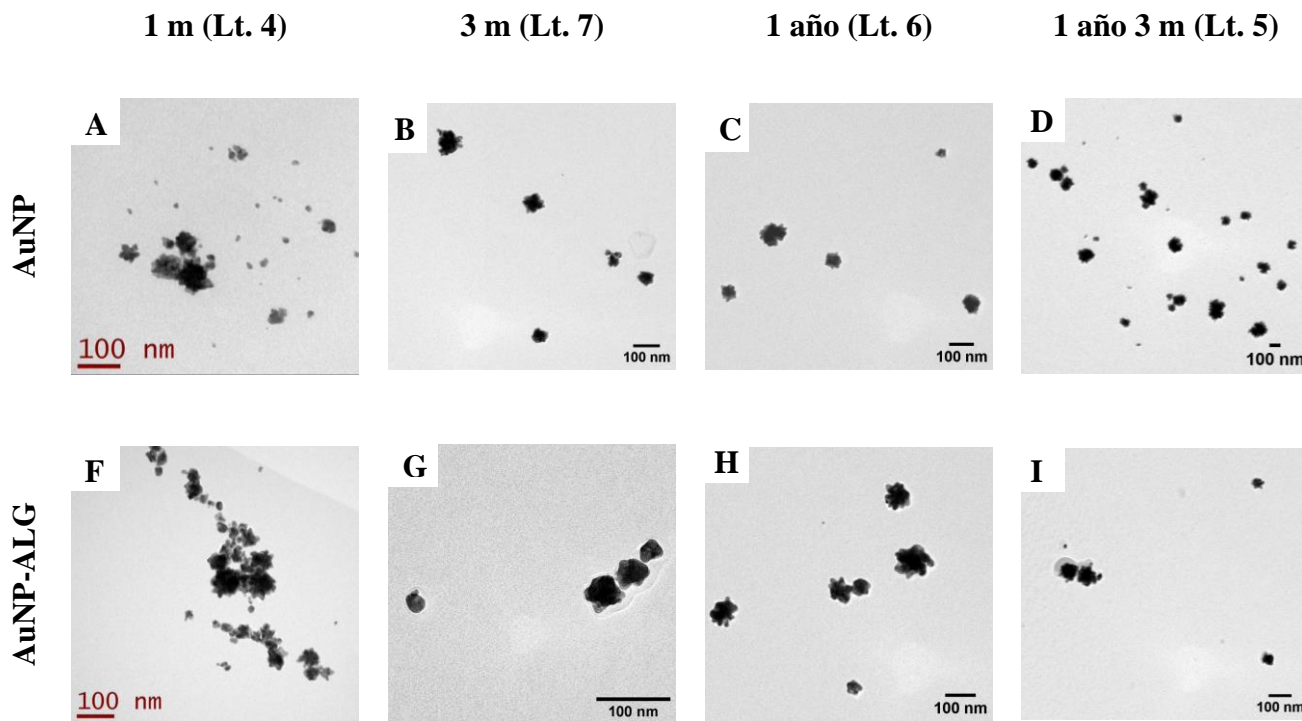


Figura 20. Fotomicrografías obtenidas por TEM para AuNP (A-D) y AuNP-ALG (F-I) de los lotes 1-4. Barra de escala mostrada en color negro.

8.1.4. Estabilidad de las nanopartículas

La estabilidad de las nanopartículas se evaluó de dos formas. La primera, mediante la medición y observación de las nanopartículas en diferentes momentos y la segunda, suspendiéndolas en medios con distintos valores de pH.

En primer lugar, se realizaron mediciones por DLS del lote 4 de AuNP y AuNP-ALG a los 3 y 6 meses de la síntesis. Como se observa en la tabla 11, las nanopartículas presentan una disminución de tamaño de hasta un ~20% tras 6 meses de sintetizadas, mientras que los valores de PZ presentan un ligero aumento, lo que indica su estabilidad. Asimismo, las imágenes obtenidas por TEM (figura 21) indican que la forma de las NP no presenta cambios respecto al tiempo de síntesis o el lote elaborado, asegurando que el tiempo no tiene un efecto negativo en las nanopartículas y que el método utilizado es el adecuado para obtener nanopartículas estables y con características reproducibles.

Tabla 11. Tamaño y potencial zeta de AuNP y AuNP-ALG respecto al tiempo.

<i>Tiempo (meses)</i>	<i>Tipo de NP</i>	<i>Tamaño (nm)</i>	<i>Potencial Z (mV)</i>
0	AuNP	82 ± 2	-30 ± 4
	AuNP-ALG	81 ± 1	-29 ± 2
3	AuNP	65 ± 2	-39 ± 1
	AuNP-ALG	70 ± 1	-37 ± 1
6	AuNP	64 ± 2	-36 ± 1
	AuNP-ALG	68 ± 2	-38 ± 1

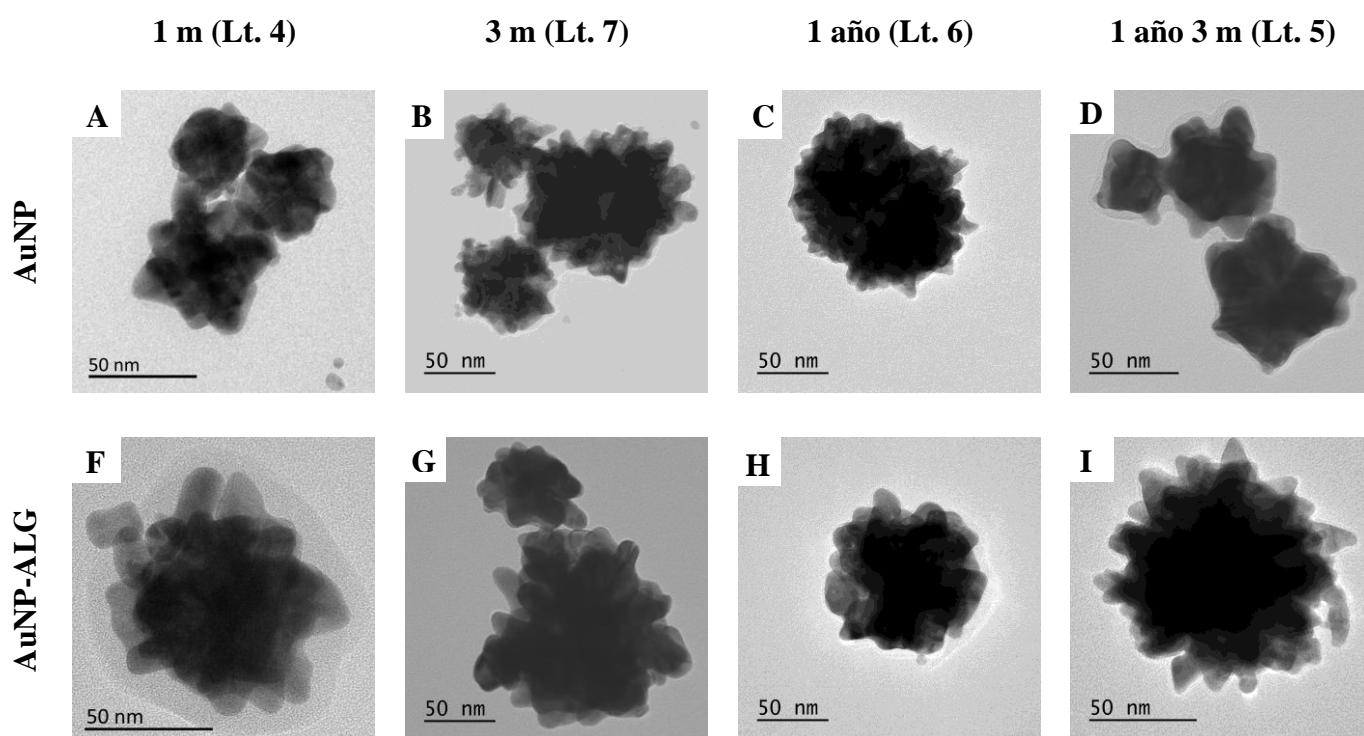


Figura 21. Fotomicrografías obtenidas por TEM para AuNP (A-D) y AuNP-ALG (F-I) a través del tiempo, correspondientes a los lotes 4-7.

En cuanto a las pruebas de pH, posterior a las 24 horas, ambos tipos de AuNP presentaron cambios en el tamaño y potencial Z (figuras 22 y 23). Los valores iniciales de tamaño fueron de 71.5 ± 2.2 nm y 75.4 ± 1.4 nm para AuNP y AuNP-ALG, respectivamente. Las AuNP mostraron un incremento de tamaño desde las 2 horas de suspensión en los buffers con pH 3 y 9; se percibió un incremento de hasta 3.5 veces posterior a las 24 h. Por el contrario, en pH

6 las AuNP mostraron un incremento 1.2 veces mayor a las 2 horas de suspensión y se mantuvieron estables tras 24 h, mientras que, a pH fisiológico (7.4) se notó un aumento en el tamaño de 1.3 veces a las 24 h.

Por otra parte, el pH en las AuNP-ALG tuvo un efecto mayor, las nanopartículas presentaron una mayor aglomeración tras 24 horas mostrado por un aumento en el valor de tamaño de hasta ~5 y ~7 veces mayor a pH 3 y 9, respectivamente. Contrariamente a pH 6 se mantuvieron estables y a pH fisiológico presentaron un incremento de casi dos veces mayor respecto al valor inicial.

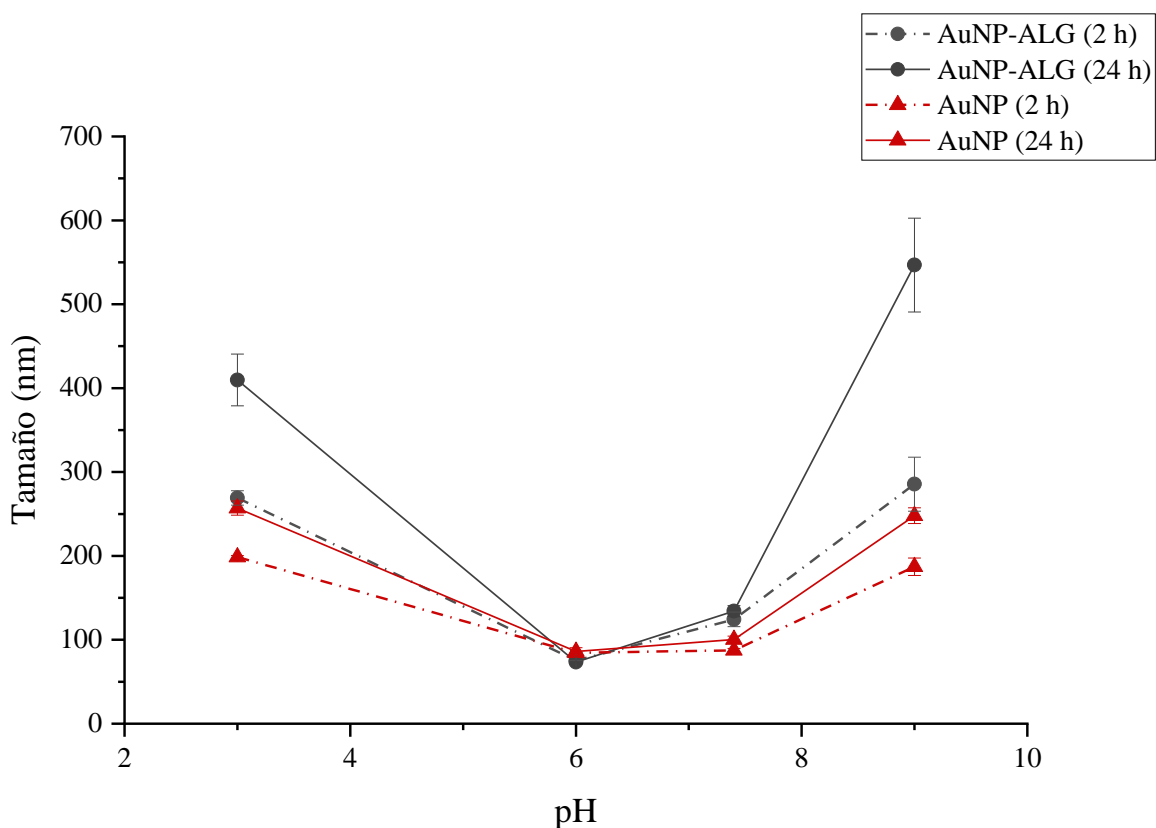


Figura 22. Efecto del pH sobre el diámetro de las nanopartículas de oro (rojo) y oro-alginato (negro) a 2 h (líneas punteadas) y 24 h (líneas completas). Se grafica la media \pm SE.

Como puede apreciarse en la figura 23. Los valores de PZ también se ven afectados posterior a la suspensión en los diferentes buffers. Tras 24 horas, los valores de PZ disminuyen, lo que indica la susceptibilidad a la aglomeración de las NPs y a su vez el cambio en el tamaño.

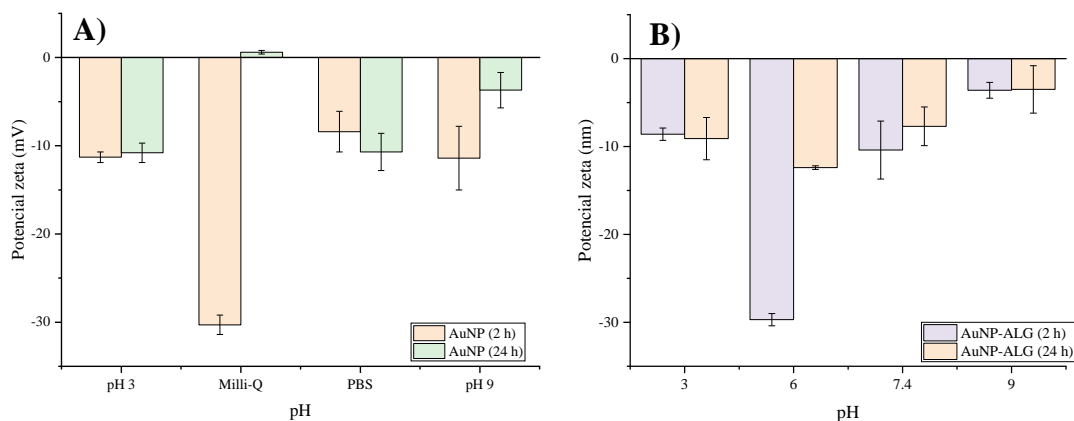


Figura 23. Efecto del pH sobre la carga superficial de las nanopartículas de oro (A) y oro-alginato (B) a 2 y 24 h. Se grafica la media \pm SE.

Tras las 24 horas de experimentación se obtuvieron los SPR de cada muestra. Los cambios en el SPR demuestran las transformaciones que presentan las NP debido a los efectos del pH sobre ellas. Como se puede observar en la figura 24. El ancho y la intensidad del pico se ve afectado y va en aumento hasta su desaparición, todo esto debido a la aglomeración de las nanopartículas. Los SPR de las AuNP y AuNP-ALG a pH 6 y 7.4 presentan menos cambios, lo que comprueba los resultados obtenidos por DLS y asegura que las nanopartículas se mantienen estables en medios con pH cercanos al neutro. Por otra parte, la forma de las NP puede no verse afectada debido a que el pico se muestra siempre en la misma posición (500-600 nm) en comparación con el pico original.

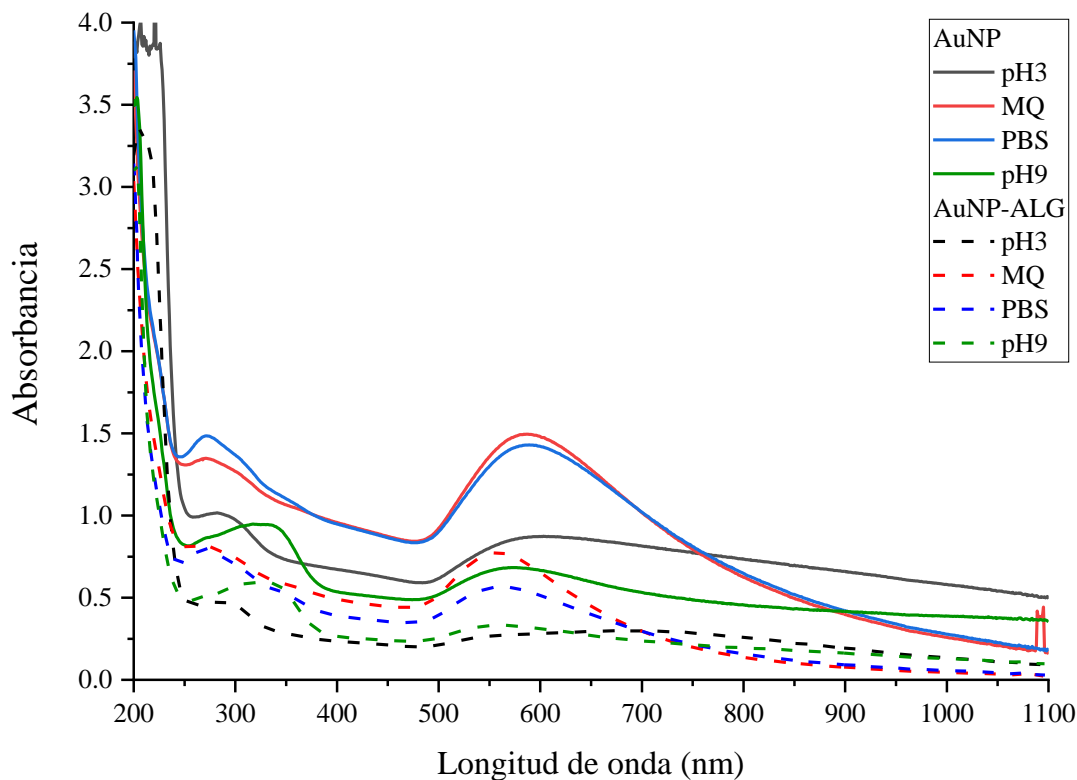


Figura 24. SPR de AuNP (línea continua) y AuNP-ALG (línea punteada) tras 24 horas de inmersos en medios con pH diferente.

8.2. Caracterización de los andamios funcionalizados

8.2.1. Características de los andamios de ALG-CS

Los andamios presentaron un peso de ~ 0.011 g y un diámetro y espesor de 1.4 cm y 0.4 cm, respectivamente. Estos andamios corresponden a los lotes mostrados en la tabla 12, mismos que fueron utilizados para la funcionalización y la realización de pruebas de hinchamiento y degradación.

Tabla 12. Características de los andamios funcionalizados

<i>Pruebas</i>	<i>Lote</i>	<i>Peso (g)</i>	<i>Diámetro (cm)</i>	<i>Espesor (cm)</i>	<i>No. de andamios</i>
Observaciones por SEM	19	0.011 ± 0.001	1.4	0.4	96
Método de funcionalización A	17	0.011 ± 0.002	1.4	0.4	72
Método de funcionalización B	20	0.01 ± 0.001	1.4	0.4	72
Método de funcionalización C	20	0.011 ± 0.001	1.4	0.4	72

8.2.2. Microscopía electrónica de barrido

Se obtuvieron microfografías electrónicas de barrido a diferentes resoluciones para cada tipo de andamio y método de funcionalización (figura 25). No se observó un efecto de las NP sobre el tamaño de poros de los andamios. Las microfografías obtenidas por SEM muestran la unión y distribución uniforme de AuNP y AuNP-ALG a la superficie de los andamios, particularmente en zonas lisas que pudieran ser las formadas por el quitosano presente, lo que conformaría la unión mediante interacciones electrostáticas. Así mismo, la cantidad de NPs encontradas en el andamio es mayor en los andamios funcionalizados por el método A. Lo que sugiere que entre más tiempo pasen los andamios inmersos en el tiempo mayor será el número de nanopartículas que se unan a la superficie.

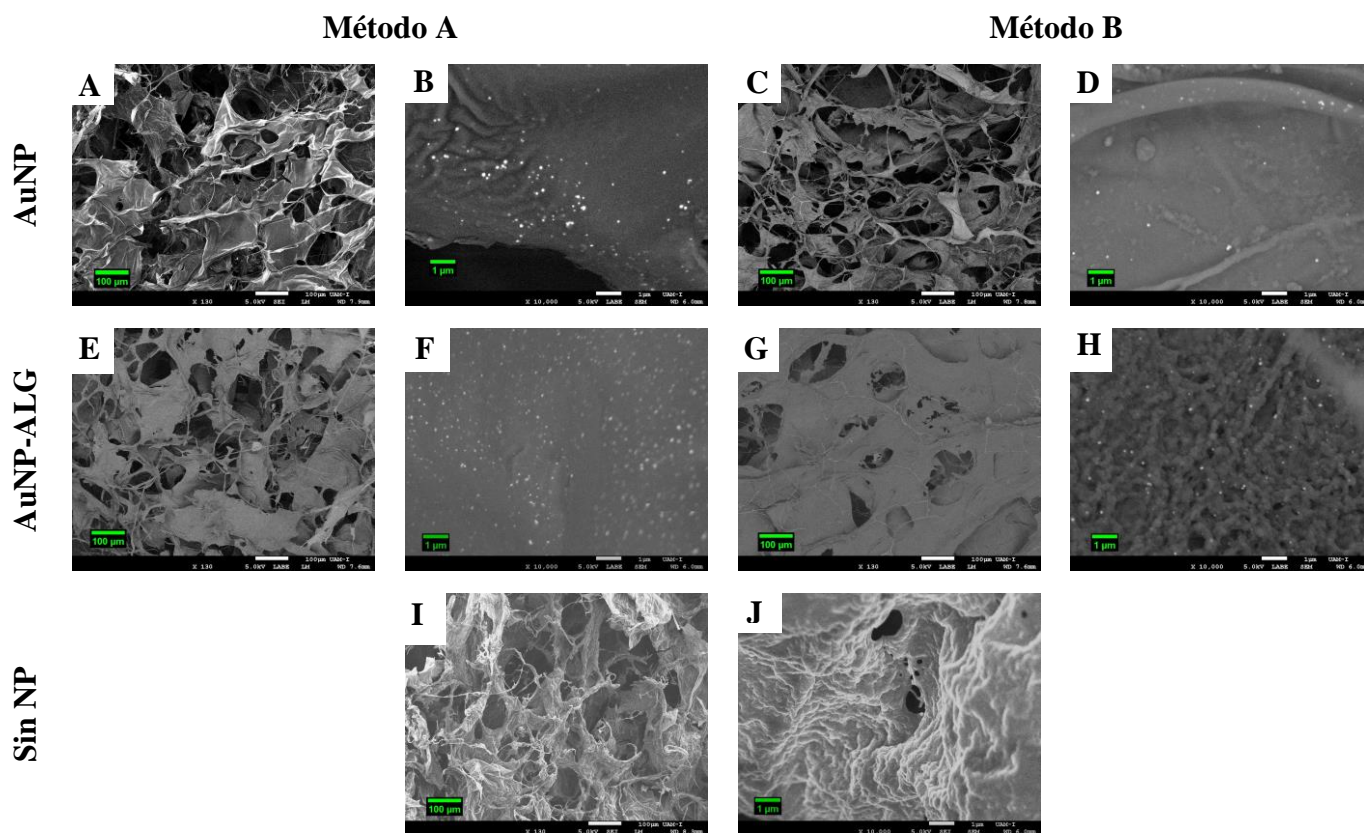


Figura 25. Fotomicrografías capturadas por SEM de los andamios de ALG-CS funcionalizados con AuNP (A-D) y AuNP-ALG (E-H) mediante los métodos A (24h) y B (1h), se muestran también los andamios sin nanopartículas (I, J). Las imágenes fueron adquiridas a aumentos de 130x y 10000x.

8.2.3. Porosidad de los andamios.

La porosidad de los andamios se caracterizó por el método de desplazamiento de líquido. Posterior a las 48 h se pudo apreciar una ligera disminución en la porosidad de los andamios (10%). No se encontraron diferencias entre los métodos analizados. Los andamios que contenían NP mostraron valores de ~65% en los tres métodos de funcionalización (Tabla 13).

Tabla 13. Porcentaje de porosidad de andamios de ALG-CS funcionalizados.

<i>Método</i>	<i>Tipo de NP</i>	<i>%Porosidad</i>
Sin NP	---	79.3 ± 7.0
A	AuNP	61.3 ± 4.1
	AuNP-ALG	68.0 ± 1.0
B	AuNP	64.0 ± 8.1
	AuNP-ALG	63.1 ± 6.3
C	AuNP	66.0 ± 7.0
	AuNP-ALG	66.4 ± 6.0

8.2.4. Pruebas de hinchamiento

Los porcentajes de hinchamiento máximo obtenidos para cada método de funcionalización se enlistan en la tabla 14. A 1h de inmersos en los medios se alcanzaron porcentajes de hinchamiento del 78 al 86% respecto al valor máximo obtenido. Los porcentajes máximos para el método A se encontraron entre 3272% y 3935%, siendo el mayor el mostrado en andamios con una concentración de AuNP (10:50), los tiempos de obtención de %S_{max} fue posterior a los 30 días de inmersos en el medio a excepción de los andamios con AuNP-ALG (2:50) que lo alcanzó a los 7 días (figura 26).

Tabla 14. Porcentajes de hinchamiento máximos obtenidos tras 2 meses de inmersos en el medio.

Tipo de NP	Andamios					
	A		B		C	
	% S max	tiempo (d)*	% S max	tiempo (d)*	% S max	tiempo (d)*
AuNP (2:50)	3680.3 ± 183.1	30	3122.1 ± 512.7	2	3400.0 ± 274.9	14
AuNP (10:50)	3934.7 ± 80.7	30	3198.7 ± 247.9	5	3032.8 ± 168.0	14
AuNP-ALG (2:50)	3891.5 ± 118.8	7	3256.6 ± 334.2	6	3468.8 ± 74.9	14
AuNP-ALG (10:50)	3271.9 ± 145.7	45	3130.1 ± 206.9	5	3483.0 ± 721.4	14
Sin NP	2389.7 ± 231.7	1				

* Día en el que fue observado el porcentaje de hinchamiento máximo

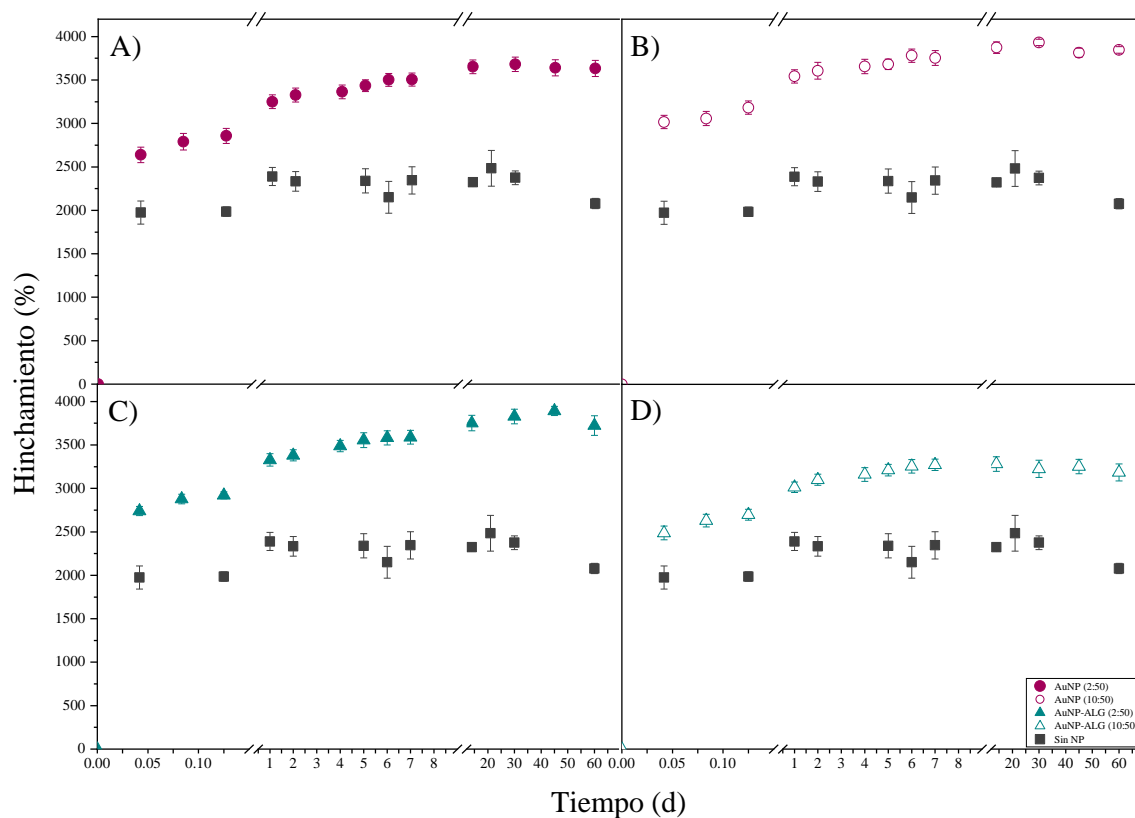


Figura 26. Porcentaje de hinchamiento a 2 meses en andamios funcionalizados por el método A: A) AuNP (2:50), B) AuNP (10:50), C) AuNP-ALG (2:50) y D) AuNP-ALG (10:50). Los datos de andamios sin funcionalizar son mostrados por cuadros negros. Se muestra la media de los datos y el error estándar.

En el caso de las pruebas realizadas en el método **B**, los porcentajes de hinchamiento máximos alcanzados se encontraron entre 3100% y 3260% y fueron alcanzados a las 48 h en el caso de los andamios con AuNP (2:50), a los 6 días para AuNP-ALG (2:50) y a los 5 días para los andamios con AuNP y AuNP-ALG en una concentración 10:50 (figura 27).

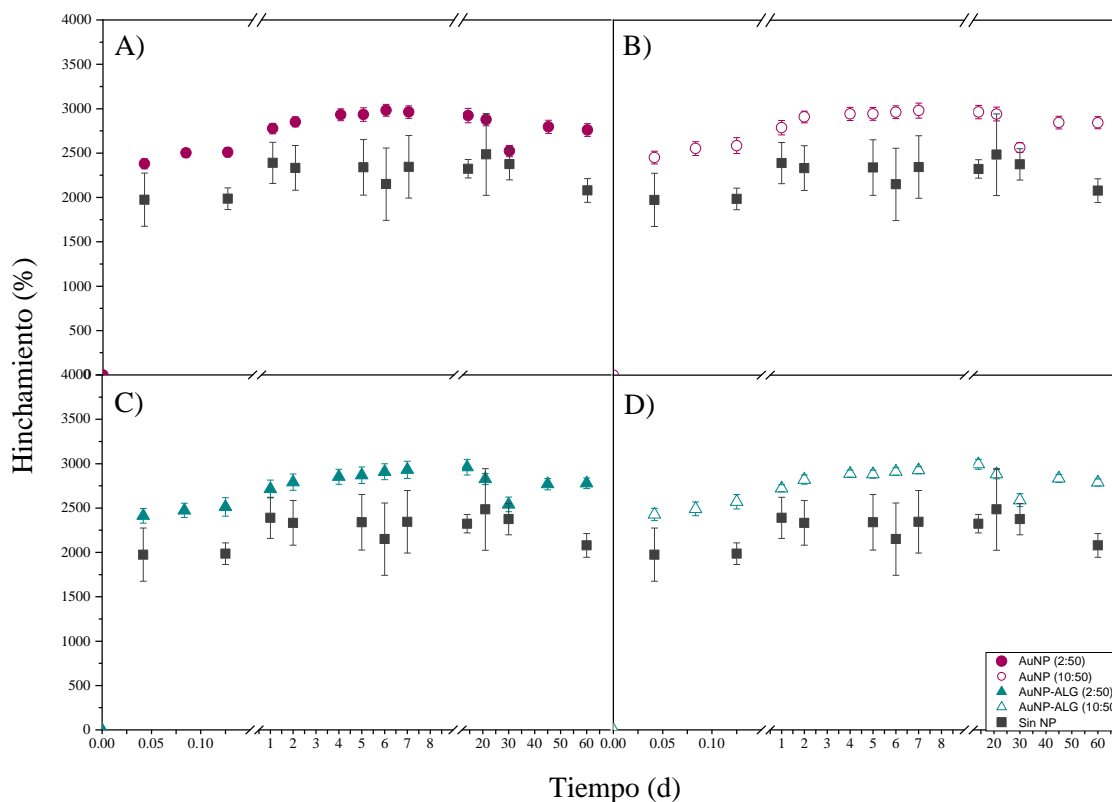


Figura 27. Porcentaje de hinchamiento a 2 meses en andamios funcionalizados por el método B: A) AuNP (2:50), B) AuNP (10:50), C) AuNP-ALG (2:50) y D) AuNP-ALG (10:50). Los datos de andamios sin funcionalizar son mostrados por cuadros negros. Se muestra la media de los datos y el error estándar.

Para los andamios funcionalizados utilizando con el método **C**, se obtuvieron valores de $\%S_{max}$ entre 3033% y 3483% siendo el mayor el obtenido en andamios con AuNP-ALG (10:50) y fueron alcanzados a 14 días de inmersos en el medio (figura 28).

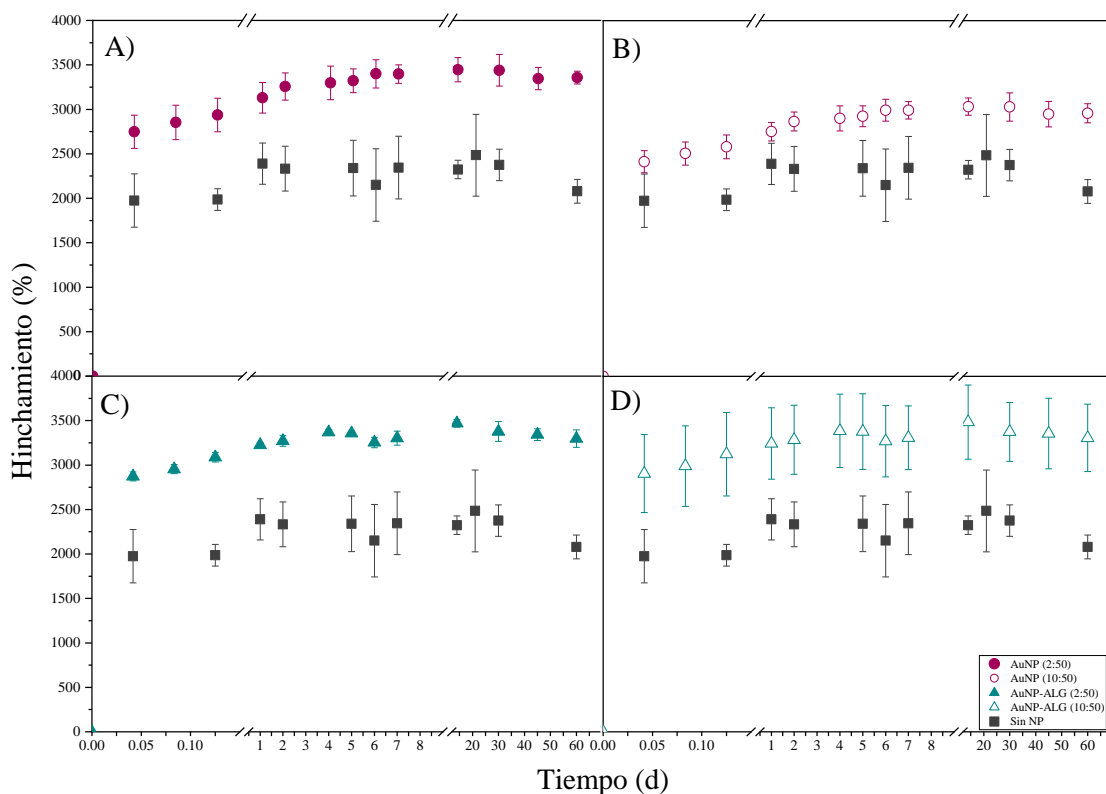


Figura 28. Porcentaje de hinchamiento a 2 meses en andamios funcionalizados por el método C: A) AuNP (2:50), B) AuNP (10:50), C) AuNP-ALG (2:50) y D) AuNP-ALG (10:50). Los datos de andamios sin funcionalizar son mostrados por cuadros negros. Se muestra la media de los datos y el error estándar.

Por el contrario, el valor máximo de hinchamiento para los andamios sin funcionalizar fue de 2389% y se alcanzó a las 24 h. No se presentan diferencias significativas entre cada tipo o concentración de NP utilizadas y todas presentan un hinchamiento gradual hasta las 48 h. Así mismo se alcanzan valores de hinchamiento hasta un 65%, 36% y 45% mayor en los andamios A, B y C, respectivamente con respecto al porcentaje máximo obtenido en andamios sin NPs.

8.2.5. Estudios de degradación

Posterior a los 7 días de inmersos en el medio, los andamios del método **A** mostraron porcentajes de degradación de entre ~11% a 14%, los cuales fueron menores en comparación al obtenido en andamios sin NP (~20%). El porcentaje más bajo de degradación fue notado en los andamios funcionalizados con AuNP-ALG en una concentración 10:50. Posterior a

los dos meses de inmersión los andamios mostraron %D de 7 a 13%, los valores más bajos de degradación se observaron en andamios con AuNP y AuNP-ALG con una concentración 10:50 (figura 29, tabla 15).

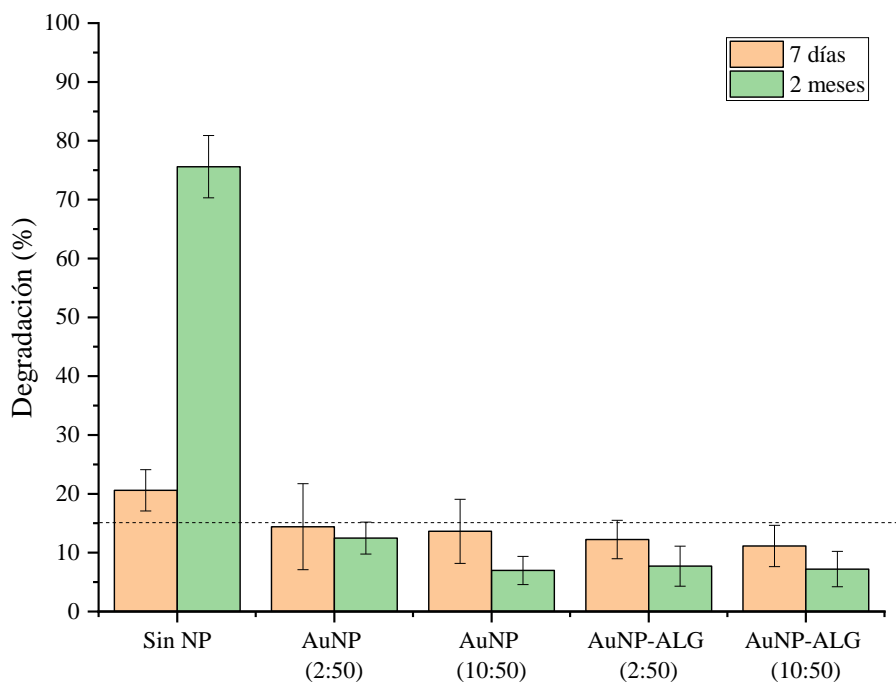


Figura 29. Porcentaje de degradación a 7 días y 2 meses de andamios funcionalizados por el método A. Se grafican la media de los datos \pm la desviación estándar.

En las pruebas con andamios **B** y **C** posterior a los 7 días de inmersos en el medio, se notaron porcentajes de degradación de entre 8% y 15% en ambos casos, siendo los menores los observados en andamios funcionalizados con AuNP-ALG (10:50) (tabla 15).

Posterior a dos meses, los porcentajes de degradación obtenidos fueron en promedio de 7-12% en los andamios funcionalizados mediante el método A, 10-20% en el caso del método B y 11-16% en el método C. Los menores porcentajes de degradación se encontraron al utilizar AuNP (10:50) en las pruebas A y B y en andamios con AuNP-ALG (10:50) en el método C (figura 30).

Tabla 15. Porcentajes de degradación máximos obtenidos tras 2 meses de inmersos en el medio.

<i>Muestra</i>	<i>% Degradación</i>					
	<i>7 días</i>			<i>2 meses</i>		
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
Sin NP	20.6 ± 3.5	---	---	75.6 ± 5.3	---	---
AuNP (2:50)	14.4 ± 7.3	14.42 ± 4.9	14.99 ± 4.9	12.5 ± 2.7	16.3 ± 7.5	12.4 ± 2.1
AuNP (10:50)	13.6 ± 5.4	12.36 ± 1.9	11.82 ± 2.3	7.0 ± 2.4	10.2 ± 4.3	13.8 ± 1.3
AuNP-ALG (2:50)	12.2 ± 3.3	12.37 ± 8.0	13.55 ± 1.1	7.7 ± 3.4	15.5 ± 6.6	15.7 ± 4.9
AuNP-ALG (10:50)	11.1 ± 3.5	8.41 ± 2.7	8.32 ± 0.8	7.2 ± 3.0	19.7 ± 5.2	11.3 ± 1.8

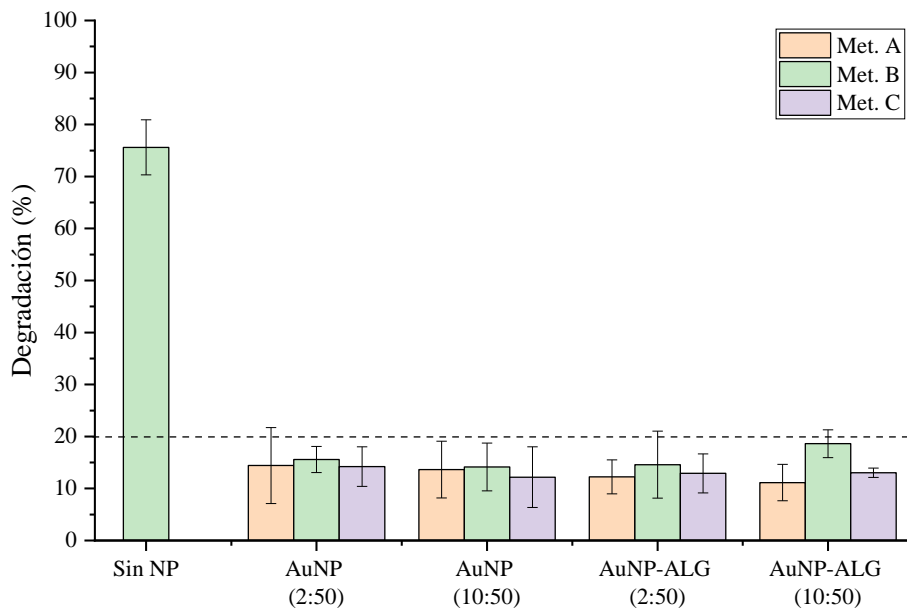


Figura 30. Porcentaje de degradación a 2 meses de andamios funcionalizados A, B y C. Se grafican la media de los datos ± la desviación estándar.

Se tomaron imágenes de los andamios después de ser sometidos a estudios de degradación durante 2 meses, las imágenes obtenidas muestran que la pérdida de material de los andamios es mínima y que estos aún mantienen su estructura porosa compacta y uniforme (figura 32), contrario a lo que se observó en estudios previos (figura 31) (Rodríguez-Reyes, 2022) en la que se observó una pérdida de material considerable y de la estructura porosa después dos meses, esto sugiere que la incorporación de nanopartículas mejora las propiedades mecánicas haciéndolo menos susceptible a la degradación y permitiendo que cumpla su función de soporte celular durante periodos prolongados.

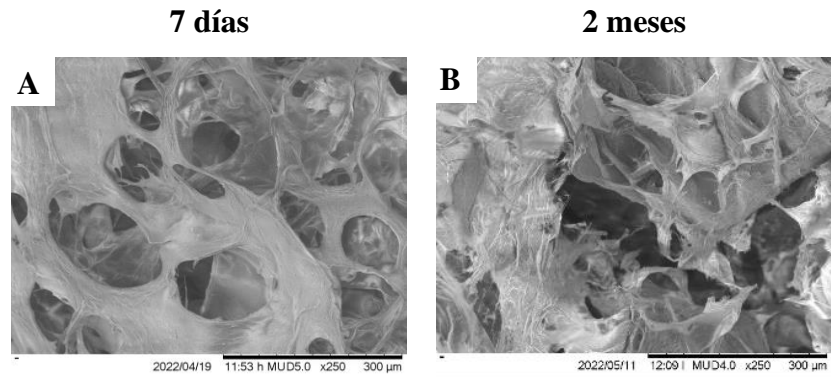


Figura 31. Fotomicrografías obtenidas mediante SEM del andamio de ALG-CS sin nanopartículas, tras haber sido sometido a estudios de degradación en agua Milli-Q durante 7 días (A) y 2 meses (B), como parte de estudios previos. (Rodríguez-Reyes, 2022)

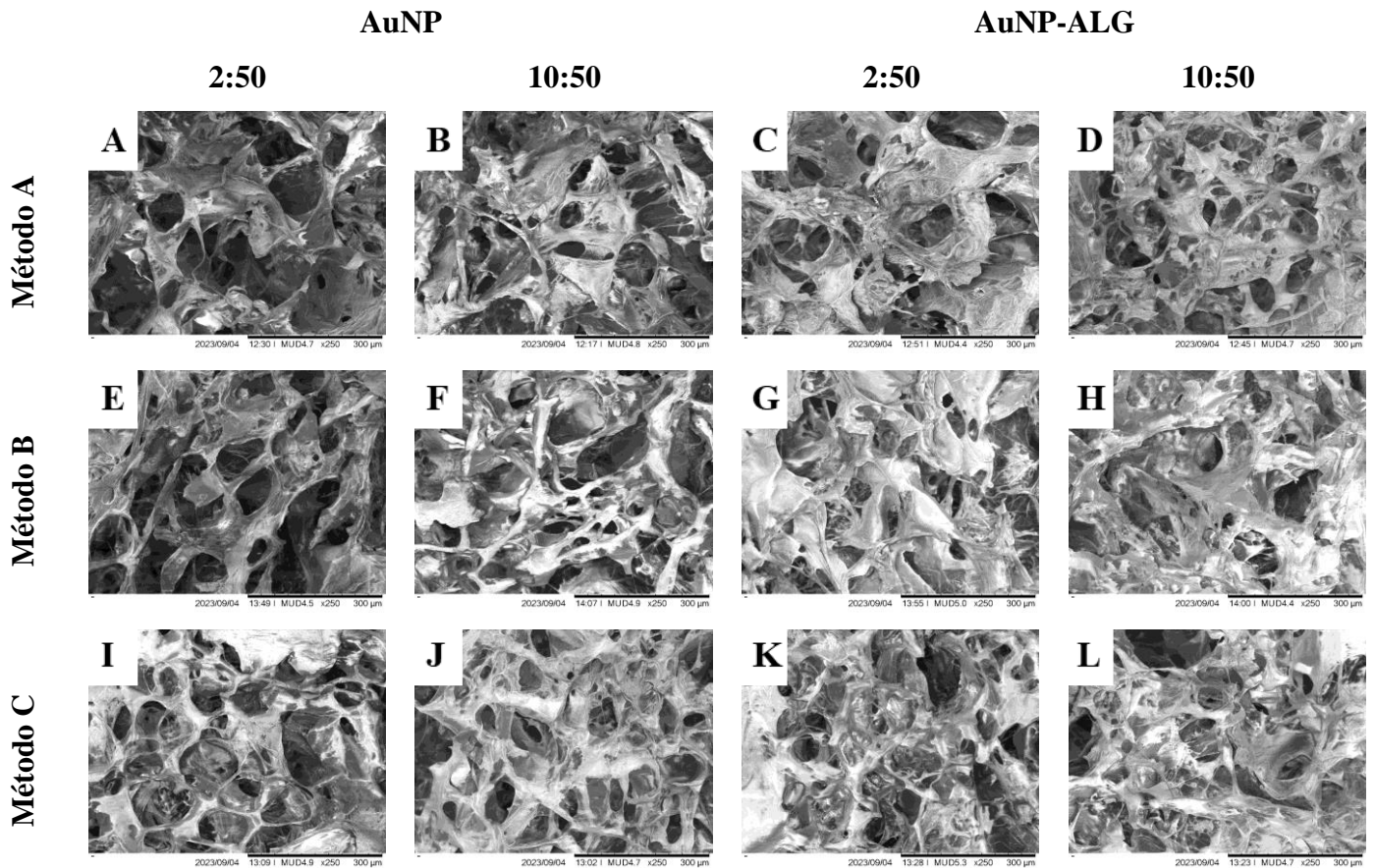
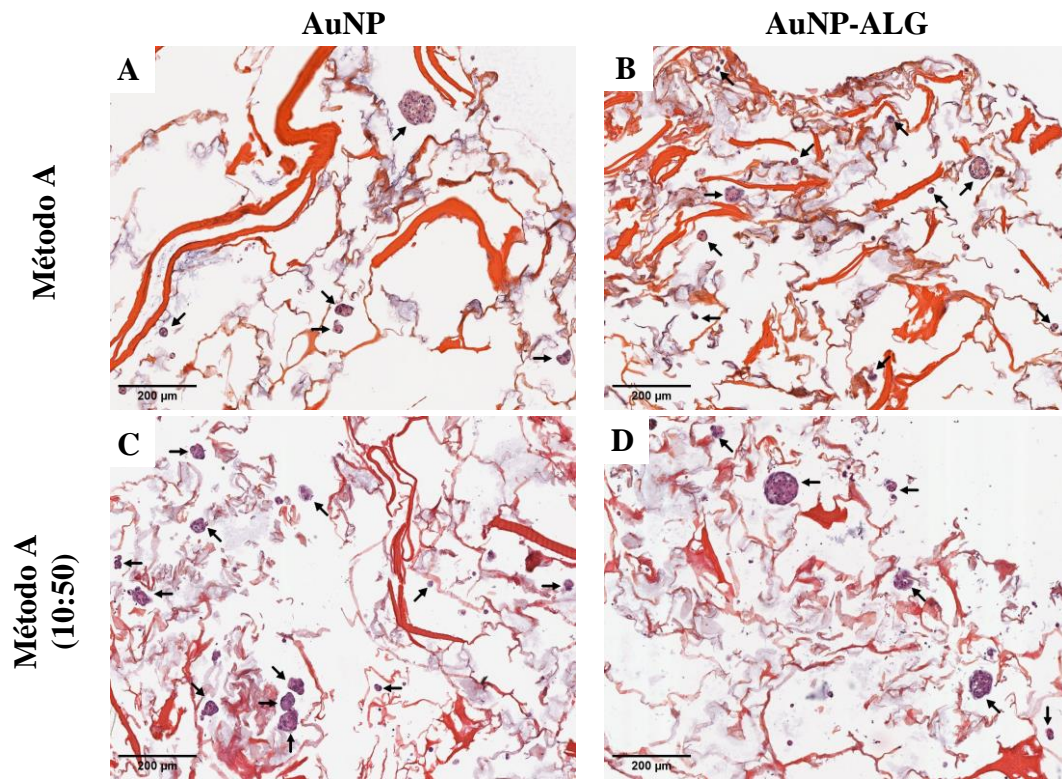


Figura 32. Fotomicrografías obtenidas por SEM para andamios de ALG-CS funcionalizados con dos concentraciones de nanopartículas de oro y oro-alginato utilizando tres métodos diferentes: método A (A-D), método B (E-H) y método C (I-L); tras someterse a estudios de degradación en agua Milli-Q durante 2 meses.

8.3. Pruebas biológicas

El análisis histológico muestra que ocurrió una migración y adhesión celular en los andamios (figura 33). Se observaron una mayor cantidad de esferoides celulares en los andamios funcionalizados por el método A (24 hrs) en comparación con los métodos B y C y presentaron tamaños de entre 18-80 μm de diámetro. Así mismo, los andamios funcionalizados con AuNP-ALG en una concentración 2:50 mostraron esferoides pequeños y dispersos en el andamio. También se pudo notar este efecto en andamios con AuNP en una concentración 10:50. Mientras que los esferoides más grandes fueron observados en andamios con AuNP (2:50). Los andamios obtenidos por el método C fueron aquellos que presentaron una menor cantidad de esferoides.



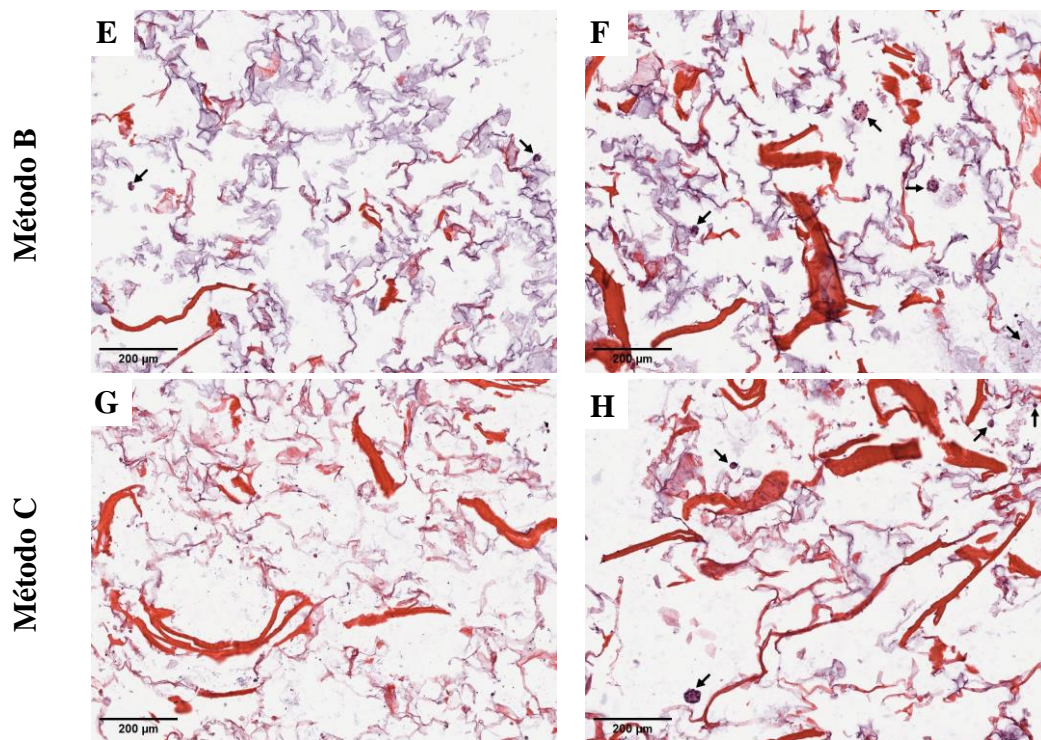


Figura 33. Fotomicrografías representativas de secciones transversales de constructos por método de funcionalización con una concentración 2:50 por el método H&E. AuNP (A, C, E y G), AuNP-ALG (B, D, F y H). Indicador: flecha (esferoides). Barra de escala: 200 µm, aumento x100.

9. Discusión

La ingeniería de tejidos tiene la finalidad de generar un tejido funcional que pueda restaurar o reemplazar tejidos dañados debido a diferentes patologías. Las nanopartículas de oro debido a sus propiedades únicas y ajustables han emergido como una herramienta versátil para mejorar y potenciar las estrategias de ingeniería de tejidos al presentar diferentes ventajas como la mejora de la proliferación celular, la conductividad eléctrica y las propiedades mecánicas de los andamios utilizados (Nejati et al., 2022; Yadid et al., 2019). Sin embargo, para aprovechar al máximo su potencial, es fundamental realizar una caracterización precisa con la finalidad de garantizar su integración efectiva y segura en entornos biológicos (Al Thaher et al., 2020).

En el presente trabajo se realizó la síntesis y caracterización de nanopartículas de oro (AuNP) y nanopartículas de oro con alginato (AuNP-ALG), las cuales presentaron un tamaño entre

65 y 82 nm, fueron elaborados 7 lotes de nanopartículas, agregando pasos de sonicación entre los diferentes pasos de síntesis en los lotes 4-6. Se realizó un análisis ANOVA de dos vías para determinar las diferencias entre cada uno de los lotes elaborados, se encontró una diferencia significativas entre cada uno de los lotes ($p < 0.0001$), mientras que las pruebas Tukey realizadas revelaron que los lotes 4-6 presentaban tamaños significativamente menores que los lotes 1-3 ($p < 0.0001$), lo cual validó la eficacia de los pasos extras de sonicación. Se ha reportado que nanopartículas de oro con un tamaño entre 6-80 nm favorecen la proliferación y viabilidad celular (Baei et al., 2016; Joseph et al., 2021; Pourjavadi et al., 2019). Shen et al. (2019) reportaron una viabilidad de hasta 95% empleando nanopartículas de oro con alginato dialdehído (AuNP-ADA) con un tamaño de 253 nm, lo que podría indicar que el tamaño no afecta la biocompatibilidad de las nanopartículas de oro en entornos fisiológicos. El índice de polidispersidad (PDL) obtenido fue de ~ 0.24 , un PDL menor a 0.5 es generalmente asignado a sistemas monodispersos y estables (Danaei et al., 2018), el valor obtenido en el presente estudio indica que las nanopartículas presentan una ligera variabilidad en los tamaños, pero se mantiene estable y homogénea.

El potencial Z de las nanopartículas se ha empleado como un indicador de estabilidad mediante la medición de la carga eléctrica en la superficie. Las nanopartículas con un valor de potencial zeta entre -10 y +10 mV se consideran aproximadamente neutras, mientras que las nanopartículas con un potencial zeta superior a +30 mV o inferior a -30 mV son consideradas estables (Clogston & Patri, 2011). Los valores de los lotes 4-6 de las AuNP y AuNP-ALG generadas se encontraron en valores ≤ -30 mV, estos resultados indican que las nanopartículas presentan una buena estabilidad, algo que es confirmado durante el seguimiento de las nanopartículas sintetizadas durante 6 meses (tabla 11).

Las nanopartículas metálicas presentan la aparición de una banda característica de resonancia de plasmón superficial localizado (SPR) que puede estar determinado por el ancho, la posición y el número de SPRs (Amendola et al., 2017). Se ha reportado que las nanopartículas de oro presentan un pico de SPR a longitudes de onda superiores a 500 nm, por ejemplo, (Pourjavadi et al., 2019) reportaron un SPR a 553 nm para AuNPs esféricas con un tamaño promedio de las nanopartículas de 60 a 70 nm; mientras que, He et al., 2015, reportan picos

de 584-789 nm para nanoestrellas de oro. Las nanopartículas de oro obtenidas en el presente estudio tienen una longitud de onda máxima a 579 nm para AuNP y a 586 nm para AuNP-ALG, lo que nos brindó una primera aproximación de la forma de las nanopartículas obtenidas, misma que fue confirmada mediante la obtención de imágenes de TEM de cada tipo de NP. La aparición de un SPR característico podría permitir seguir los cambios en el sistema, es decir, permitiría el monitoreo de sus características (tamaño y forma) durante diferentes tiempos o al exponerse a diferentes entornos. Además, esta característica óptica permite la absorción y dispersión de luz de manera eficiente, lo cual, puede tener un gran potencial en imagenología o en terapia fototérmica (Hang et al., 2024; H. M. Kim et al., 2023; Y. Wu et al., 2019).

La forma espiculada o de estrella de las NP podría ser una ventaja en su aplicación en andamios desarrollados para cultivo celular, ya que proporcionan una mayor área de contacto que puede favorecer la interacción con el material y las células. Este tipo de nanopartículas presenta algunas otras ventajas como actividad antibacteriana (Kaul et al., 2022) y baja toxicidad. La citotoxicidad de las nanopartículas puede ser dependiente de la forma (Steckiewicz et al., 2019; Xie et al., 2017). Pakravan et al., 2021 demostraron que las nanoestrellas de oro presentan un menor índice de toxicidad en células de cáncer de mama MCF7 en comparación con otras formas de nanopartículas. Estas características las vuelven ideales para su uso en el cultivo celular. Por otra parte, las imágenes de TEM también indicaron la presencia de poblaciones de NP de diferentes tamaños (~40-200 nm) algo que se puede observar en el gráfico de distribución obtenido por DLS (figura 18), el pico obtenido indica un tamaño de ~80 nm para la mayor cantidad de nanopartículas, además se ha reportado que tamaños cerca de los 200 nm, no tienen un efecto negativo sobre la viabilidad celular (Shen et al., 2019).

Las nanopartículas de oro son conocidas por su estabilidad coloidal, pero su comportamiento puede cambiar en diferentes entornos. La estabilidad de las nanopartículas sintetizadas se estudió mediante dos variables, el tiempo y el pH del medio. Posterior a 6 meses no se encontraron cambios significativos en la forma y tamaño de las NPs, lo que comprueba su alta estabilidad y sugiere un uso seguro sin perder funcionalidad. Por otra parte, el análisis

de la estabilidad de las AuNPs en medios con pH diferente puede brindarnos información útil sobre su comportamiento y seguridad para aplicaciones biomédicas.

Al realizar la dispersión de las NPs en medios con pH 3 y 9 se observó una tendencia a la aglomeración, la disminución de la carga superficial causada por la alta concentración de sales contribuyó a la reducción de la fuerza de repulsión y por tanto favoreció la agregación y precipitación (Sangwan & Seth, 2022), además, la absorción de los grupos H^+ y OH^- en medios ácidos y básicos, respectivamente, puede alterar las propiedades superficiales y su estabilidad. En el caso de las AuNP-ALG, la protonación de los grupos carboxilato del alginato en un entorno ácido pudo contribuir a la disminución de su carga y a su vez, disminuir la repulsión electrostática, provocando una mayor agregación (Hu & McClements, 2015), en el caso de pH básico, se espera que el alginato presente en las nanopartículas favorezca la estabilidad al presentar un mayor índice de desprotonación, sin embargo, en los resultados obtenidos se observa un efecto contrario, esto puede deberse a un efecto de apantallamiento debido a la gran cantidad de iones presentes en el medio, lo que podría afectar la repulsión electrostática al neutralizar la carga de las nanopartículas. Por otra parte, A pH 6 y pH 7.4 (fisiológico), las NPs presentaron pequeños cambios en la carga superficial y tamaño, al aumentar aproximadamente ~40 nm de diámetro. Sin embargo, los cambios podrían no afectar en la respuesta biológica ya que no superan los tamaños reportados como no tóxicos para las células (Maharjan et al., 2019; Malki et al., 2022; Pourjavadi et al., 2019; Shen et al., 2019), lo cual podría asegurar su seguridad para aplicaciones biomédicas.

La funcionalización de andamios de ALG-CS fue realizada mediante 3 métodos. Se realizó su funcionalización empleando una dilución 1:1 de la solución de NPs. Las imágenes obtenidas por SEM mostraron puntos dispersos de alta luminosidad que confirmaron la presencia de las nanopartículas de oro sobre los andamios de alginato-quitosano (figura 25) ya que estas NP metálicas tienen una densidad electrónica mayor que la del polímero y por lo tanto dispersan el haz electrónico con mayor intensidad. La incorporación de las NPs al material tiene lugar debido a la interacción de las AuNP y AuNP-ALG con los grupos amino del quitosano presente en la composición del andamio. La mayor cantidad de nanopartículas observadas en las superficies de los andamios se contempla en aquellos que permanecieron

inmersos por 24 h en la solución con NPs y una vez asegurando que ocurre la unión de las nanopartículas al andamio se realizaron pruebas de porosidad, hinchamiento y degradación.

La porosidad es una característica esencial en los andamios desarrollados para aplicaciones de la ingeniería de tejidos, ya que permite crear una estructura que se asemeje a la arquitectura de los tejidos nativos. Una porosidad mayor al 50% asegura una mayor difusión de oxígeno y nutrientes y mejora la infiltración y adhesión celular (Y. F. Wang et al., 2017). En los estudios realizados el porcentaje más alto se registró en los andamios que no contenían nanopartículas (79%). Sin embargo, se observó una ligera disminución en la porosidad al incorporar nanopartículas de oro (AuNP) y de oro-alginato (AuNP-ALG) al alcanzar valores entre el 60% y el 70%, lo cual podría afectar en el paso de nutrientes y oxígeno y afectar la infiltración/migración celular, por el contrario, podría beneficiar las propiedades mecánicas como la rigidez. Algunos estudios reportan una disminución en la porosidad al incorporar nanopartículas de oro, por ejemplo, Tenório et al (2021), reportaron una disminución de aproximadamente un 40% tras la incorporación de AuNP en un hidrogel de quitosano, esto debido a la mejora en las propiedades mecánicas o estructurales del andamio que a su vez afecta la capacidad de hinchamiento (Nezhad-Mokhtari et al., 2020; Tenório et al., 2021; Yousefiasl et al., 2023). En ese sentido, la disminución en la porosidad en este estudio pudo ocurrir debido a cambios estructurales en los andamios tras la modificación con AuNP y AuNP-ALG.

Hay algunos otros factores que pueden disminuir el porcentaje de hinchamiento debido a la incorporación de nanopartículas de oro. Por ejemplo, Baei et al. (2016) reportaron que la adición de nanopartículas de oro a un hidrogel de quitosano causa la disminución de grupos funcionales hidrofílicos, debido a que, estos grupos pueden interactuar con la superficie de las AuNP, lo que conlleva a la disminución de los valores de hinchamiento. Contrariamente, los estudios aquí realizados demuestran valores superiores al 3000% que concuerdan con lo reportado anteriormente por Beltran-Vargas et al. (2022). Independientemente del tipo o concentración de nanopartículas, la incorporación de AuNP y AuNP-ALG aumentan en un 65% la capacidad de absorción de líquido, a pesar de la ligera disminución en la porosidad; esto también puede deberse al alginato presente en la composición del andamio y a los bajos

cambios estructurales que sufre tras la funcionalización, debido a que, la incorporación de NPs es posterior a la elaboración. También se observaron valores mayores de %Smax en los andamios funcionalizados mediante el método C, dentro del proceso de elaboración (previo al segundo paso de liofilización), en el cual se alcanza el equilibrio posterior a los 30 días inmersos en el medio, lo cual, podría favorecer al cultivo celular en estos andamios, al asegurar la absorción del medio o de las células en este lapso. Estos valores de hinchamiento (>3000%) presentan diversos beneficios al mejorar la difusión de nutrientes y generar un entorno favorable para el crecimiento y la viabilidad celular, además de imitar un entorno similar al de los tejidos naturales.

La degradación de los andamios es otra de las características clave para su uso en ingeniería de tejidos. La tasa de degradación debe ser controlada de tal manera que se complemente con la tasa de regeneración tisular. El uso de nanomateriales en andamios desarrollados para cultivo celular puede mejorar sus propiedades mecánicas y a su vez afectar la tasa de degradación. Yousefiasl et al. (2023) demostraron una disminución de aproximadamente un 20% en la biodegradabilidad de andamios de alginato-quitosano al aumentar la concentración de nanopartículas de sílice en un 30% (p/v). Tenório et al. (2021) reportaron también una disminución de hasta 9 veces en la degradación de un hidrogel de quitosano al incorporar nanopartículas de oro esféricas. En el presente estudio, se realizaron estudios de degradación dejando los andamios en Milli-Q durante 2 meses, los estudios realizados demostraron que el uso de nanopartículas de oro, principalmente en andamios funcionalizados con AuNP-ALG en una concentración 10:50, disminuye la degradación de los andamios al obtener valores de %D de ~8% en comparación con el 75% obtenido en andamios no funcionalizados.

Aunque no se presentaron diferencias significativas entre los diferentes métodos de funcionalización analizados. Los datos de hinchamiento recabados y las imágenes obtenidas por SEM (figura 25) nos dicen que los andamios funcionalizados por el método A (24 h) podrían ser los ideales para el cultivo celular, al presentar una mayor cantidad de NPs unidas a la superficie y valores de hinchamiento ligeramente mayores en comparación con los métodos B (1 h) y C (durante la elaboración de andamios).

Se realizaron cultivos en los andamios obtenidos por los tres métodos, con el objetivo de evaluar con mayor precisión el efecto de las nanopartículas en los andamios. Los resultados indicaron que la estructura porosa de los andamios permitió una adecuada penetración y adhesión celular. Se observó la formación de pequeños esferoides en todos los andamios, lo cual nos sugiere una adecuada interacción célula-célula y célula-material. Los esferoides de mayor tamaño fueron observados en los andamios funcionalizados por el método A, lo cual, se podría atribuir a las propiedades eléctricas proporcionadas por las nanopartículas (Esmaeili et al., 2024b; Maharjan et al., 2019), confirmando que estos pueden ser los mejores para el crecimiento de tejidos artificiales.

Los resultados nos indican que ambos tipos de nanopartículas permiten la formación de esferoides celulares y de acuerdo con el método de funcionalización se puede tener una mejor dispersión de los estos sobre el andamio. La formación de esferoides pequeños aseguran una mejor viabilidad, se ha reportado que esferoides de gran tamaño pueden presentar un núcleo necrótico debido a un bajo suministro de oxígeno al interior, además de presentar una menor viabilidad celular (Barisam et al., 2018; Murphy et al., 2017), por lo tanto en esferoides de menor tamaño se podría tener una mejor difusión de nutrientes y oxígeno evitando que ocurran eventos de muerte celular, por otra parte, la dispersión de los esferoides puede proporcionar un ambiente uniforme y con ello asegurar la formación del tejido.

Así mismo, al aumentar la concentración de las nanopartículas en los andamios se observó un incremento en el número de esferoides en comparación con la concentración 2:50, sin embargo, esto debe ser mejor explorado.

10. Conclusiones

Los pasos extras de sonicación incorporados entre los diferentes pasos durante el proceso de síntesis, permitió la generación de nanopartículas con menor tamaño (~80 nm) y con ello la obtención de un método estándar para la síntesis de nanopartículas con propiedades reproducibles y altamente estables ($PZ \leq -30$). El tamaño y forma de las nanopartículas

pueden ser beneficiosos para la ingeniería de tejidos. La morfología de estrella influye positivamente en la interacción célula-material.

Los resultados de nuestro estudio indican mejoras significativas en el porcentaje de hinchamiento de los andamios cuando se incorporan nanopartículas de oro (NPs). Se observó un aumento en la capacidad de absorción de agua, lo cual es esencial para la difusión de nutrientes en aplicaciones de ingeniería de tejidos.

Adicionalmente, se observó que los andamios con nanopartículas de oro presentaron una menor tasa de degradación en comparación con los andamios sin nanopartículas. Esta menor degradación podría ser ventajosa para preservar la integridad estructural del andamio durante un período prolongado, permitiendo cumplir su función como soporte celular hasta la regeneración tisular.

Es notable que no se observaron cambios significativos en los porcentajes de hinchamiento y degradación al variar el tipo de nanopartículas o su concentración. Esto sugiere que el efecto positivo de las nanopartículas de oro es independiente de estos factores.

En conjunto, estos resultados respaldan el potencial de la incorporación de nanopartículas de oro en andamios para aplicaciones de ingeniería de tejidos, enfatizando la importancia de considerar cuidadosamente factores como tamaño, forma y concentración de las nanopartículas para optimizar las propiedades de los andamios. Los resultados presentados abren nuevas oportunidades para el diseño de andamios mejorados con aplicaciones prometedoras en el campo de la regeneración de tejidos.

11. Perspectivas

En este estudio, nos limitamos a caracterizar el material utilizando agua Milli-Q como medio para evaluar el hinchamiento y la degradación. Recomendamos, llevar a cabo experimentos adicionales que involucren medios de cultivo, enzimas y condiciones fisiológicas. Estas evaluaciones más completas permitirán una comprensión más detallada del comportamiento del material a nivel fisiológico.

Es necesario llevar a cabo validaciones mediante pruebas biológicas para confirmar la efectividad y la biocompatibilidad de los andamios funcionalizados. Estas pruebas proporcionarán información valiosa sobre la interacción de los andamios con células y tejidos. Asimismo, se propone realizar pruebas utilizando diferentes concentraciones y ambos tipos de nanopartículas para determinar cuál de ellas ofrece un mejor desempeño.

Finalmente, es necesario consultar la normatividad existente con la finalidad de realizar y cumplir con las pruebas necesarias para la aplicación clínica de estos materiales.

12. Referencias

- Ahmadi, P., Nazeri, N., Derakhshan, M. A., & Ghanbari, H. (2021). Preparation and characterization of polyurethane/chitosan/CNT nanofibrous scaffold for cardiac tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, *180*, 590–598. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.03.001>
- Aibani, N., Rai, R., Patel, P., Cuddihy, G., & Wasan, E. K. (2021). Chitosan Nanoparticles at the Biological Interface: Implications for Drug Delivery. *Pharmaceutics* *2021*, Vol. *13*, Page 1686, *13*(10), 1686. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13101686>
- Akbarzadeh, A., Sobhani, S., Soltani Khaboushan, A., & Kajbafzadeh, A. M. (2023). Whole-Heart Tissue Engineering and Cardiac Patches: Challenges and Promises. *Bioengineering* *2023*, Vol. *10*, Page 106, *10*(1), 106. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING10010106>
- Akhtar, K., Khan, S. A., Khan, S. B., & Asiri, A. M. (2018). Scanning electron microscopy: Principle and applications in nanomaterials characterization. *Handbook of Materials Characterization*, 113–145. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2_4/FIGURES/9
- Al Thaher, Y., Chandrasekaran, B., & Panchu, S. J. (2020). The Importance of Nanomaterials Characterization Techniques. *Engineering Materials*, 19–37. https://doi.org/10.1007/978-3-030-36260-7_2
- Alamdari, S. G., Alibakhshi, A., de la Guardia, M., Baradaran, B., Mohammadzadeh, R., Amini, M., Kesharwani, P., Mokhtarzadeh, A., Oroojalian, F., & Sahebkar, A. (2022).

Conductive and Semiconductive Nanocomposite-Based Hydrogels for Cardiac Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials*, 11(18), 2200526. <https://doi.org/10.1002/ADHM.202200526>

Amendola, V., Pilot, R., Frascioni, M., Maragò, O. M., & Iatì, M. A. (2017). Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 29(20), 203002. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/AA60F3>

Amiryaghoubi, N., Fathi, M., & Javadzadeh, Y. (2024). Recent advances in polymer-based scaffolds for cardiac tissue engineering. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. <https://doi.org/10.1080/00914037.2023.2299799>

Amnieh, Y. A., Ghadirian, S., Mohammadi, N., Shadkhast, M., & Karbasi, S. (2023). Evaluation of the effects of chitosan nanoparticles on polyhydroxy butyrate electrospun scaffolds for cartilage tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 249, 126064. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.126064>

Ashtari, K., Nazari, H., Ko, H., Tebon, P., Akhshik, M., Akbari, M., Alhosseini, S. N., Mozafari, M., Mehravi, B., Soleimani, M., Ardehali, R., Ebrahimi Warkiani, M., Ahadian, S., & Khademhosseini, A. (2019). Electrically conductive nanomaterials for cardiac tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 144, 162–179. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2019.06.001>

Atherosclerosis - What Is Atherosclerosis? | NHLBI, NIH. (n.d.). Retrieved February 28, 2024, from <https://www.nhlbi.nih.gov/health/atherosclerosis>

Baei, P., Jalili-Firoozinezhad, S., Rajabi-Zeleti, S., Tafazzoli-Shadpour, M., Baharvand, H., & Aghdami, N. (2016). Electrically conductive gold nanoparticle-chitosan thermosensitive hydrogels for cardiac tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 63, 131–141. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.02.056>

Barisam, M., Saidi, M. S., Kashaninejad, N., & Nguyen, N. T. (2018). Prediction of Necrotic Core and Hypoxic Zone of Multicellular Spheroids in a Microbioreactor with a U-Shaped Barrier. *Micromachines* 2018, Vol. 9, Page 94, 9(3), 94. <https://doi.org/10.3390/MI9030094>

Basit, H., Malik, A., & Huecker, M. R. (2023). Non–ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513228/>

- Baysal, K., Aroguz, A. Z., Adiguzel, Z., & Baysal, B. M. (2013). Chitosan/alginate crosslinked hydrogels: Preparation, characterization and application for cell growth purposes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 342–348. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2013.04.073>
- Beltran-Vargas, N. E., Peña-Mercado, E., Sánchez-Gómez, C., Garcia-Lorenzana, M., Ruiz, J. C., Arroyo-Maya, I., Huerta-Yepe, S., & Campos-Terán, J. (2022). Sodium Alginate/Chitosan Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering: The Influence of Its Three-Dimensional Material Preparation and the Use of Gold Nanoparticles. *Polymers*, 14(16), 3233. <https://doi.org/10.3390/POLYM14163233/S1>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.06.017>
- Bianchi, E., Vigani, B., Viseras, C., Ferrari, F., Rossi, S., & Sandri, G. (2022). Inorganic Nanomaterials in Tissue Engineering. *Pharmaceutics* 2022, Vol. 14, Page 1127, 14(6), 1127. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14061127>
- Boroumand, S., Haeri, A., Nazeri, N., & Rabbani, S. (2021). Review Insights In Cardiac Tissue Engineering: Cells, Scaffolds, and Pharmacological Agents. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 20(4), 467. <https://doi.org/10.22037/IJPR.2021.114730.15012>
- Borzenkov, M., Chirico, G., Collini, M., & Pallavicini, P. (2018). *Gold Nanoparticles for Tissue Engineering*. 343–390. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76090-2_10
- Bruinsmann, F. A., Pigana, S., Aguirre, T., Souto, G. D., Pereira, G. G., Bianchera, A., Fasiolo, L. T., Colombo, G., Marques, M., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., & Sonvico, F. (2019). Chitosan-Coated Nanoparticles: Effect of Chitosan Molecular Weight on Nasal Transmucosal Delivery. *Pharmaceutics* 2019, Vol. 11, Page 86, 11(2), 86. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS11020086>
- Bushkalova, R., Farno, M., Tenailleau, C., Duployer, B., Cussac, D., Parini, A., Sallerin, B., & Girod Fullana, S. (2019). Alginate-chitosan PEC scaffolds: A useful tool for soft tissues cell therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 571, 118692. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2019.118692>

- Camci-Unal, G., Annabi, N., Dokmeci, M. R., Liao, R., & Khademhosseini, A. (2014). Hydrogels for cardiac tissue engineering. *NPG Asia Materials* 2014 6:5, 6(5), e99–e99. <https://doi.org/10.1038/am.2014.19>
- Ceccaldi, C., Bushkalova, R., Alfarano, C., Lairez, O., Calise, D., Bourin, P., Frugier, C., Rouzaud-Laborde, C., Cussac, D., Parini, A., Sallerin, B., & Fullana, S. G. (2014). Evaluation of polyelectrolyte complex-based scaffolds for mesenchymal stem cell therapy in cardiac ischemia treatment. *Acta Biomaterialia*, 10(2), 901–911. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2013.10.027>
- Cetin, Y., Sahin, M. G., & Kok, F. N. (2021). Application potential of three-dimensional silk fibroin scaffold using mesenchymal stem cells for cardiac regeneration. *Journal of Biomaterials Applications*, 36(4), 740–753. <https://doi.org/10.1177/08853282211018529>
- Chaudhuri, R., Ramachandran, M., Moharil, P., Harumalani, M., & Jaiswal, A. K. (2017). Biomaterials and cells for cardiac tissue engineering: Current choices. *Materials Science and Engineering: C*, 79, 950–957. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2017.05.121>
- Chen, X., Zhao, X., & Wang, G. (2020). Review on marine carbohydrate-based gold nanoparticles represented by alginate and chitosan for biomedical application. *Carbohydrate Polymers*, 244, 116311. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.116311>
- Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). Zeta potential measurement. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 697, 63–70. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6
- da Silva, A. B., Rufato, K. B., de Oliveira, A. C., Souza, P. R., da Silva, E. P., Muniz, E. C., Vilsinski, B. H., & Martins, A. F. (2020). Composite materials based on chitosan/gold nanoparticles: From synthesis to biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 977–998. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.06.113>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* 2018, Vol. 10, Page 57, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS10020057>

- De Isla, N., Huseltein, C., Jessel, N., Pinzano, A., Decot, V., Magdalou, J., Bensoussan, D., & Stoltz, J. F. (2010). Introduction to tissue engineering and application for cartilage engineering. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 20(3), 127–133. <https://doi.org/10.3233/BME-2010-0624>
- Deng, B., Shen, L., Wu, Y., Shen, Y., Ding, X., Lu, S., Jia, J., Qian, J., & Ge, J. (2015). Delivery of alginate-chitosan hydrogel promotes endogenous repair and preserves cardiac function in rats with myocardial infarction. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(3), 907–918. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.35232>
- Dong, Y., Hong, M., Dai, R., Wu, H., & Zhu, P. (2020). Engineered bioactive nanoparticles incorporated biofunctionalized ECM/silk proteins based cardiac patches combined with MSCs for the repair of myocardial infarction: In vitro and in vivo evaluations. *Science of The Total Environment*, 707, 135976. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.135976>
- Dorkhani, E., Noorafkan, Y., Salehi, Z., Ghiass, M. A., Tafti, S. H. A., Heirani-Tabasi, A., & Tavafoghi, M. (2022). Design and fabrication of polyvinylidene fluoride-graphene oxide/gelatine nanofibrous scaffold for cardiac tissue engineering. <https://doi.org/10.1080/09205063.2022.2161779>
- Echeverria-Molina, M. I., Malollari, K. G., & Komvopoulos, K. (2021). Design Challenges in Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 617141. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.617141/BIBTEX>
- Eftekhari, A., Dizaj, S. M., Sharifi, S., Salatin, S., Saadat, Y. R., Vahed, S. Z., Samiei, M., Ardalan, M., Rameshrad, M., Ahmadian, E., & Cucchiari, M. (2020). The Use of Nanomaterials in Tissue Engineering for Cartilage Regeneration; Current Approaches and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 536, 21(2), 536. <https://doi.org/10.3390/IJMS21020536>
- Elkhoury, K., Morsink, M., Sanchez-Gonzalez, L., Kahn, C., Tamayol, A., & Arab-Tehrany, E. (2021). Biofabrication of natural hydrogels for cardiac, neural, and bone Tissue engineering Applications. *Bioactive Materials*, 6(11), 3904–3923. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2021.03.040>

- Eltom, A., Zhong, G., & Muhammad, A. (2019). Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3429527>
- Esmaeili, H., Patino-Guerrero, A., Nelson, R. A., Karamanova, N., M. Fisher, T., Zhu, W., Perreault, F., Migrino, R. Q., & Nikkhah, M. (2024a). Engineered Gold and Silica Nanoparticle-Incorporated Hydrogel Scaffolds for Human Stem Cell-Derived Cardiac Tissue Engineering. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. https://doi.org/10.1021/ACSBIOMATERIALS.3C01256/SUPPL_FILE/AB3C01256_SI_004.PDF
- Esmaeili, H., Patino-Guerrero, A., Nelson, R. A., Karamanova, N., M. Fisher, T., Zhu, W., Perreault, F., Migrino, R. Q., & Nikkhah, M. (2024b). Engineered Gold and Silica Nanoparticle-Incorporated Hydrogel Scaffolds for Human Stem Cell-Derived Cardiac Tissue Engineering. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 10(4), 2351–2366. https://doi.org/10.1021/ACSBIOMATERIALS.3C01256/ASSET/IMAGES/LARGE/AB3C01256_0007.JPEG
- Fadilah, N. I. M., Isa, I. L. M., Zaman, W. S. W. K., Tabata, Y., & Fauzi, M. B. (2022). The Effect of Nanoparticle-Incorporated Natural-Based Biomaterials towards Cells on Activated Pathways: A Systematic Review. *Polymers*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/POLYM14030476>
- Fang, Y., Zhang, T., Song, Y., & Sun, W. (2020). Assessment of various crosslinking agents on collagen/chitosan scaffolds for myocardial tissue engineering. *Biomedical Materials*, 15(4), 045003. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/AB452D>
- Fathima, S. N. (2021). An Update on Myocardial Infarction. In D. Kumar (Ed.), *Current Research and Trends in Medical Science and Technology* (Vol. 1, pp. 1–33). Scripown Publications.
- Fishbein, G. A., Fishbein, M. C., Wang, J., & Buja, L. M. (2022). Myocardial ischemia and its complications. *Cardiovascular Pathology*, 407–445. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822224-9.00022-0>
- Ghaziof, S., Shojaei, S., Mehdikhani, M., Khodaei, M., & Jafari Nodoushan, M. (2022). Electro-conductive 3D printed polycaprolactone/gold nanoparticles nanocomposite scaffolds for myocardial tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 132, 105271. <https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2022.105271>

- Ghovvati, M., Kharaziha, M., Ardehali, R., & Annabi, N. (2022). Recent Advances in Designing Electroconductive Biomaterials for Cardiac Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials*, 11(13), 2200055. <https://doi.org/10.1002/ADHM.202200055>
- Gomez-Florit, M., Pardo, A., Domingues, R. M. A., Graça, A. L., Babo, P. S., Reis, R. L., & Gomes, M. E. (2020). Natural-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 5858, 25(24), 5858. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245858>
- González Mancera, G., & Noguez Amaya, M. E. (2006). *Principios de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis por Rayos X Característicos*.
- Gupta, T., & Krim, S. R. (2019). Cardiac Transplantation: Update on a Road Less Traveled. *The Ochsner Journal*, 19(4), 369. <https://doi.org/10.31486/TOJ.19.0022>
- Habibzadeh, F., Sadraei, S. M., Mansoori, R., Singh Chauhan, N. P., & Sargazi, G. (2022). Nanomaterials supported by polymers for tissue engineering applications: A review. *Heliyon*, 8(12). <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2022.E12193>
- Han, J., Zhou, Z., Yin, R., Yang, D., & Nie, J. (2010). Alginate–chitosan/hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds: Preparation and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(2), 199–205. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2009.11.004>
- Hang, Y., Wang, A., & Wu, N. (2024). Plasmonic silver and gold nanoparticles: shape- and structure-modulated plasmonic functionality for point-of-care sensing, bio-imaging and medical therapy. *Chemical Society Reviews*, 53(6), 2932–2971. <https://doi.org/10.1039/D3CS00793F>
- Hasnain, M. S., Jameel, E., Mohanta, B., Dhara, A. K., Alkahtani, S., & Nayak, A. K. (2020). Alginates: sources, structure, and properties. *Alginates in Drug Delivery*, 1–17. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817640-5.00001-7>
- He, S., Kang, M. W. C., Khan, F. J., Tan, E. K. M., Reyes, M. A., & Kah, J. C. Y. (2015). Optimizing gold nanostars as a colloid-based surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrate. *Journal of Optics*, 17(11), 114013. <https://doi.org/10.1088/2040-8978/17/11/114013>

- Herizchi, R., Abbasi, E., Milani, M., & Akbarzadeh, A. (2014). Current methods for synthesis of gold nanoparticles. *Https://Doi.Org/10.3109/21691401.2014.971807*, 44(2), 596–602. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.971807>
- Ho, T. C., Chang, C. C., Chan, H. P., Chung, T. W., Shu, C. W., Chuang, K. P., Duh, T. H., Yang, M. H., & Tyan, Y. C. (2022). Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. *Molecules*, 27(9). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27092902>
- Hu, K., & McClements, D. J. (2015). Fabrication of biopolymer nanoparticles by antisolvent precipitation and electrostatic deposition: Zein-alginate core/shell nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 44, 101–108. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2014.09.015>
- Hudita, A., Galateanu, B., & Costache, M. (2019). Nanobiomaterials for tissue engineering. *Materials for Biomedical Engineering: Nanobiomaterials in Tissue Engineering*, 1–21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816909-4.00001-4>
- Jain, A., Behera, M., Mahapatra, C., Sundaresan, N. R., & Chatterjee, K. (2021). Nanostructured polymer scaffold decorated with cerium oxide nanoparticles toward engineering an antioxidant and anti-hypertrophic cardiac patch. *Materials Science and Engineering: C*, 118, 111416. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2020.111416>
- Jana, N. R., Gearheart, L., & Murphy, C. J. (2001). Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods. *Journal of Physical Chemistry B*, 105(19), 4065–4067. https://doi.org/10.1021/JP0107964/SUPPL_FILE/JP0107964_S.PDF
- Jensen, R. V., Hjortbak, M. V., & Bøtker, H. E. (2020). Ischemic Heart Disease: An Update. *Seminars in Nuclear Medicine*, 50(3), 195–207. <https://doi.org/10.1053/J.SEMNUCLMED.2020.02.007>
- Jiang, L., Chen, D., Wang, Z., Zhang, Z., Xia, Y., Xue, H., & Liu, Y. (2019). Preparation of an Electrically Conductive Graphene Oxide/Chitosan Scaffold for Cardiac Tissue Engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 188(4), 952–964. <https://doi.org/10.1007/S12010-019-02967-6>
- Joseph, B., Ninan, N., Visalakshan, R. M., Denoual, C., Bright, R., Kalarikkal, N., Grohens, Y., Vasilev, K., & Thomas, S. (2021). Insights into the biomechanical properties of plasma treated 3D printed PCL scaffolds decorated with gold nanoparticles. *Composites Science and Technology*, 202, 108544. <https://doi.org/10.1016/J.COMPSCITECH.2020.108544>

- Karimi, S. N. H., Aghdam, R. M., Ebrahimi, S. A. S., & Chehrehsez, Y. (2022). Tri-layered alginate/poly(ϵ -caprolactone) electrospun scaffold for cardiac tissue engineering. *Polymer International*, *71*(9), 1099–1108. <https://doi.org/10.1002/PI.6371>
- Kaul, S., Sagar, P., Gupta, R., Garg, P., Priyadarshi, N., & Singhal, N. K. (2022). Mechanobactericidal, Gold Nanostar Hydrogel-Based Bandage for Bacteria-Infected Skin Wound Healing. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *14*(39), 44084–44097. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.2C10844/SUPPL_FILE/AM2C10844_SI_001.PDF
- Kazemi Asl, S., Rahimzadegan, M., & Ostadrahimi, R. (2023). The recent advancement in the chitosan hybrid-based scaffolds for cardiac regeneration after myocardial infarction. *Carbohydrate Polymers*, *300*, 120266. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2022.120266>
- Keklikian, A., de Barros, N. R., Rashad, A., Chen, Y., Tan, J., Sheng, R., Sun, D., Liu, H., & Thankam, F. G. (2024). Chitosan–Polyethylene Glycol Inspired Polyelectrolyte Complex Hydrogel Templates Favoring NEO-Tissue Formation for Cardiac Tissue Engineering. *Gels*, *10*(1). <https://doi.org/10.3390/GELS10010046>
- Kim, H. M., Baek, Y., Ha, T., Choi, D., Lee, W. J., Cho, Y., Park, J., Kim, S., & Doh, J. (2023). Gold Nanoparticle-Carrying T Cells for the Combined Immuno-Photothermal Therapy. *Small*, *19*(47), 2301377. <https://doi.org/10.1002/SMLL.202301377>
- Kim, N. J., Lee, S. J., & Atala, A. (2013). Biomedical nanomaterials in tissue engineering. *Nanomaterials in Tissue Engineering: Fabrication and Applications*, 1–25e. <https://doi.org/10.1533/9780857097231.1>
- Kumar, P. P. P. ;, Lim, D.-K., Prabhakaran, P., Kumar, P., & Lim, D.-K. (2021). Gold-Polymer Nanocomposites for Future Therapeutic and Tissue Engineering Applications. *Pharmaceutics* 2022, Vol. 14, Page 70, *14*(1), 70. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14010070>
- Kumbhar, S., & Pawar, S. H. (2016). Synthesis and characterization of chitosan-alginate scaffolds for seeding human umbilical cord derived mesenchymal stem cells. *Bio-Medical Materials and Engineering*, *27*(6), 561–575. <https://doi.org/10.3233/BME-161609>
- Lee, J., Manoharan, V., Cheung, L., Lee, S., Cha, B. H., Newman, P., Farzad, R., Mehrotra, S., Zhang, K., Khan, F., Ghaderi, M., Lin, Y. D., Aftab, S., Mostafalu, P., Miscuglio,

- M., Li, J., Mandal, B. B., Hussain, M. A., Wan, K. T., ... Shin, S. R. (2019). Nanoparticle-Based Hybrid Scaffolds for Deciphering the Role of Multimodal Cues in Cardiac Tissue Engineering. *ACS Nano*, *13*(11), 12525–12539. https://doi.org/10.1021/ACSNANO.9B03050/SUPPL_FILE/NN9B03050_SI_001.PDF
- Lee, S. J., Yoo, J. J., & Atala, A. (2018). Biomaterials and Tissue Engineering. *Clinical Regenerative Medicine in Urology*, 17–51. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2723-9_2
- Li, H., Pan, S., Xia, P., Chang, Y., Fu, C., Kong, W., Yu, Z., Wang, K., Yang, X., & Qi, Z. (2020). Advances in the application of gold nanoparticles in bone tissue engineering. *Journal of Biological Engineering* 2020 14:1, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S13036-020-00236-3>
- Li, X. P., Qu, K. Y., Zhang, F., Jiang, H. N., Zhang, N., Nihad, C., Liu, C. M., Wu, K. H., Wang, X. W., & Huang, N. P. (2020). High-aspect-ratio water-dispersed gold nanowires incorporated within gelatin methacrylate hydrogels for constructing cardiac tissues in vitro. *Journal of Materials Chemistry. B*, *8*(32), 7213–7224. <https://doi.org/10.1039/D0TB00768D>
- Li, Y., Wei, L., Lan, L., Gao, Y., Zhang, Q., Dawit, H., Mao, J., Guo, L., Shen, L., & Wang, L. (2022). Conductive biomaterials for cardiac repair: A review. *Acta Biomaterialia*, *139*, 157–178. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2021.04.018>
- Li, Z., Ramay, H. R., Hauch, K. D., Xiao, D., & Zhang, M. (2005). Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, *26*(18), 3919–3928. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2004.09.062>
- Liau, B., Zhang, D., & Bursac, N. (2012). Functional cardiac tissue engineering. *Http://Dx.Doi.Org/10.2217/Rme.11.122*, *7*(2), 187–206. <https://doi.org/10.2217/RME.11.122>
- Liu, D., Liu, Z., Zou, J., Li, L., Sui, X., Wang, B., Yang, N., & Wang, B. (2021). Synthesis and Characterization of a Hydroxyapatite-Sodium Alginate-Chitosan Scaffold for Bone Regeneration. *Frontiers in Materials*, *8*, 648980. <https://doi.org/10.3389/FMATS.2021.648980/BIBTEX>

- Liu, S., Yu, J. M., Gan, Y. C., Qiu, X. Z., Gao, Z. C., Wang, H., Chen, S. X., Xiong, Y., Liu, G. H., Lin, S. E., McCarthy, A., John, J. V., Wei, D. X., & Hou, H. H. (2023). Biomimetic natural biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine: new biosynthesis methods, recent advances, and emerging applications. *Military Medical Research*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/S40779-023-00448-W>
- Liu, X., Holzwarth, J. M., & Ma, P. X. (2012). Functionalized Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience*, *12*(7), 911–919. <https://doi.org/10.1002/MABI.201100466>
- Lv, J., Liu, W., Shi, G., Zhu, F., He, X., Zhu, Z., & Chen, H. (2020). Human cardiac extracellular matrix-chitosan-gelatin composite scaffold and its endothelialization. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *19*(2), 1225. <https://doi.org/10.3892/ETM.2019.8349>
- Ma, Y., Ma, A., Luo, T., Xiao, S., & Zhou, H. (2023). Fabrication of anisotropic nanocomposite hydrogels by magnetic field-induced orientation for mimicking cardiac tissue. *Journal of Applied Polymer Science*, *140*(1), e53248. <https://doi.org/10.1002/APP.53248>
- Maharjan, B., Kumar, D., Awasthi, G. P., Bhattarai, D. P., Kim, J. Y., Park, C. H., & Kim, C. S. (2019). Synthesis and characterization of gold/silica hybrid nanoparticles incorporated gelatin methacrylate conductive hydrogels for H9C2 cardiac cell compatibility study. *Composites Part B: Engineering*, *177*, 107415. <https://doi.org/10.1016/J.COMPOSITESB.2019.107415>
- Majid, Q. A., Fricker, A. T. R., Gregory, D. A., Davidenko, N., Hernandez Cruz, O., Jabbour, R. J., Owen, T. J., Basnett, P., Lukasiewicz, B., Stevens, M., Best, S., Cameron, R., Sinha, S., Harding, S. E., & Roy, I. (2020). Natural Biomaterials for Cardiac Tissue Engineering: A Highly Biocompatible Solution. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *7*, 192. <https://doi.org/10.3389/FCVM.2020.554597/BIBTEX>
- Malki, M., Shapira, A., & Dvir, T. (2022). Chondroitin sulfate-AuNRs electroactive scaffolds for on-demand release of biofactors. *Journal of Nanobiotechnology*, *20*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12951-022-01261-8/FIGURES/5>

- Malvern Instruments. (2015). *Zeta potential - An introduction in 30 minutes*.
<https://www.research.colostate.edu/wp-content/uploads/2018/11/ZetaPotential-Introduction-in-30min-Malvern.pdf>
- Malvern Instruments. (2017). *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes*.
- Mehrani, M., Abbasi, S. H., Amin, A., Kassaian, S. E., & Mahmoudi, M. (2020). Ischemic cardiomyopathy. *Nanomedicine for Ischemic Cardiomyopathy*, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817434-0.00001-5>
- Miller, L., Birks, E., Guglin, M., Lamba, H., & Frazier, O. H. (2019). Use of Ventricular Assist Devices and Heart Transplantation for Advanced Heart Failure. *Circulation Research*, 124(11), 1658–1678. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.313574>
- Mistry, A. S., Shi, X., & Mikos, A. G. (2007). Nanocomposite Scaffolds for Tissue Engineering. In *Tissue Engineering* (pp. 173–184). CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/9781420008333-17>
- Mohabatpour, F., Duan, X., Yazdanpanah, Z., Tabil, X. L., Lobanova, L., Zhu, N., Papagerakis, S., Chen, X., & Papagerakis, P. (2022). Bioprinting of alginate-carboxymethyl chitosan scaffolds for enamel tissue engineering in vitro. *Biofabrication*, 15(1), 015022. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ACAB35>
- Mousavi, A., Mashayekhan, S., Baheiraei, N., & Pourjavadi, A. (2021). Biohybrid oxidized alginate/myocardial extracellular matrix injectable hydrogels with improved electromechanical properties for cardiac tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 180, 692–708.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.03.097>
- Murphy, K. C., Hung, B. P., Browne-Bourne, S., Zhou, D., Yeung, J., Genetos, D. C., & Leach, J. K. (2017). Measurement of oxygen tension within mesenchymal stem cell spheroids. *Journal of the Royal Society Interface*, 14(127).
<https://doi.org/10.1098/RSIF.2016.0851>
- Nair, R. S., Ameer, J. M., Alison, M. R., & Anilkumar, T. V. (2017). A gold nanoparticle coated porcine cholecyst-derived bioscaffold for cardiac tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 157, 130–137.
<https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2017.05.056>

- Nanakoudis, A. (2019, November 21). *SEM Signal - Electron Imaging - Accelerating Microscopy*. <https://www.thermofisher.com/blog/microscopy/sem-signal-types-electrons-and-the-information-they-provide/>
- Navaei, A., Saini, H., Christenson, W., Sullivan, R. T., Ros, R., & Nikkhah, M. (2016). Gold nanorod-incorporated gelatin-based conductive hydrogels for engineering cardiac tissue constructs. *Acta Biomaterialia*, *41*, 133–146. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2016.05.027>
- Naveenkumar, S., Venkateshan, N., Kaviyarasu, K., Christyraj, J. R. S. S., & Muthukumar, A. (2023). Optimum performance of a novel biocompatible scaffold comprising alginate-pectin-selenium nanoparticles for cardiac tissue engineering using C2C12 cells. *Journal of Molecular Structure*, *1294*. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2023.136457>
- Nejati, K., Dadashpour, M., Gharibi, T., Mellatyar, H., & Akbarzadeh, A. (2022). Biomedical Applications of Functionalized Gold Nanoparticles: A Review. *Journal of Cluster Science*, *33*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/S10876-020-01955-9/FIGURES/4>
- Nezhad-Mokhtari, P., Akrami-Hasan-Kohal, M., & Ghorbani, M. (2020). An injectable chitosan-based hydrogel scaffold containing gold nanoparticles for tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *154*, 198–205. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.03.112>
- Nguyen-Truong, M., Li, Y. V., & Wang, Z. (2020). Mechanical Considerations of Electrospun Scaffolds for Myocardial Tissue and Regenerative Engineering. *Bioengineering* *2020*, *Vol. 7*, *Page 122*, *7*(4), 122. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING7040122>
- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, *14*(3), 88–95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- OMS. (2020). *The top 10 causes of death*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- Oropeza, B. P., Adams, J. R., Furth, M. E., Chessa, J., & Boland, T. (2022). Bioprinting of Decellularized Porcine Cardiac Tissue for Large-Scale Aortic Models. *Frontiers in*

- Pakravan, A., Salehi, R., & Mahkam, M. (2021). Comparison study on the effect of gold nanoparticles shape in the forms of star, hallow, cage, rods, and Si-Au and Fe-Au core-shell on photothermal cancer treatment. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 33, 102144. <https://doi.org/10.1016/J.PDPDT.2020.102144>
- Pastena, P., Frye, J. T., Ho, C., Goldschmidt, M. E., & Kalogeropoulos, A. P. (2024). Ischemic cardiomyopathy: epidemiology, pathophysiology, outcomes, and therapeutic options. *Heart Failure Reviews*, 29(1). <https://doi.org/10.1007/S10741-023-10377-4>
- Patil, T., Gambhir, R., Vibhute, A., & Tiwari, A. P. (2022). Gold Nanoparticles: Synthesis Methods, Functionalization and Biological Applications. *Journal of Cluster Science* 2022 34:2, 34(2), 705–725. <https://doi.org/10.1007/S10876-022-02287-6>
- Peña, B., Maldonado, M., Bonham, A. J., Aguado, B. A., Dominguez-Alfaro, A., Laughter, M., Rowland, T. J., Bardill, J., Farnsworth, N. L., Alegret Ramon, N., Taylor, M. R. G., Anseth, K. S., Prato, M., Shandas, R., McKinsey, T. A., Park, D., & Mestroni, L. (2019). Gold Nanoparticle-Functionalized Reverse Thermal Gel for Tissue Engineering Applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 11(20), 18671–18680.
https://doi.org/10.1021/ACSAMI.9B00666/SUPPL_FILE/AM9B00666_SI_003.AVI
- Phatchayawat, P. P., Khamkeaw, A., Yodmuang, S., & Phisalaphong, M. (2022). 3D bacterial cellulose-chitosan-alginate-gelatin hydrogel scaffold for cartilage tissue engineering. *Biochemical Engineering Journal*, 184, 108476.
<https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2022.108476>
- Pourjavadi, A., Doroudian, M., Ahadpour, A., & Azari, S. (2019). Injectable chitosan/ κ -carrageenan hydrogel designed with au nanoparticles: A conductive scaffold for tissue engineering demands. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 310–317. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.11.256>
- Pushp, P., & Gupta, M. K. (2021). Cardiac Tissue Engineering: A Role for Natural Biomaterials. *Advanced Structured Materials*, 140, 617–641.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-54027-2_18

- Qasim, M., Arunkumar, P., Powell, H. M., & Khan, M. (2019). Current research trends and challenges in tissue engineering for mending broken hearts. *Life Sciences*, 229, 233–250. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2019.05.012>
- Qiu, J., Liu, X. J., You, B. A., Ren, N., & Liu, H. (2023). Application of Nanomaterials in Stem Cell-Based Therapeutics for Cardiac Repair and Regeneration. *Small*, 19(11), 2206487. <https://doi.org/10.1002/SMLL.202206487>
- Radulescu, D. M., Neacsu, I. A., Grumezescu, A. M., & Andronescu, E. (2022). New Insights of Scaffolds Based on Hydrogels in Tissue Engineering. *Polymers 2022*, Vol. 14, Page 799, 14(4), 799. <https://doi.org/10.3390/POLYM14040799>
- Ramanathan, S., Gopinath, S. C. B., Arshad, M. K. M., Poopalan, P., & Perumal, V. (2021). Nanoparticle synthetic methods: strength and limitations. *Nanoparticles in Analytical and Medical Devices*, 31–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821163-2.00002-9>
- Reddy, M. S. B., Ponnamma, D., Choudhary, R., & Sadasivuni, K. K. (2021). A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/POLYM13071105>
- Reis, L. A., Chiu, L. L. Y., Feric, N., Fu, L., & Radisic, M. (2016). Biomaterials in myocardial tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 10(1), 11–28. <https://doi.org/10.1002/TERM.1944>
- Roacho-Pérez, J. A., Garza-Treviño, E. N., Moncada-Saucedo, N. K., Carriquiry-Chequer, P. A., Valencia-Gómez, L. E., Matthews, E. R., Gómez-Flores, V., Simental-Mendía, M., Delgado-Gonzalez, P., Delgado-Gallegos, J. L., Padilla-Rivas, G. R., & Islas, J. F. (2022). Artificial Scaffolds in Cardiac Tissue Engineering. *Life 2022*, Vol. 12, Page 1117, 12(8), 1117. <https://doi.org/10.3390/LIFE12081117>
- Rodríguez-Vázquez, M., Vega-Ruiz, B., Ramos-Zúñiga, R., Saldaña-Koppel, D. A., & Quiñones-Olvera, L. F. (2015). Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/821279>
- Rosellini, E., Madeddu, D., Barbani, N., Frati, C., Graiani, G., Falco, A., Lagrasta, C., Quaini, F., & Cascone, M. G. (2020). Development of Biomimetic Alginate/Gelatin/Elastin Sponges with Recognition Properties toward Bioactive

Peptides for Cardiac Tissue Engineering. *Biomimetics* 2020, Vol. 5, Page 67, 5(4), 67.
<https://doi.org/10.3390/BIOMIMETICS5040067>

Ruther, F., Roether, J. A., & Boccaccini, A. R. (2022). 3D Printing of Mechanically Resistant Poly (Glycerol Sebacate) (PGS)-Zein Scaffolds for Potential Cardiac Tissue Engineering Applications. *Advanced Engineering Materials*, 24(9), 2101768.
<https://doi.org/10.1002/ADEM.202101768>

Sadeghianmaryan, A., Naghieh, S., Yazdanpanah, Z., Alizadeh Sardroud, H., Sharma, N. K., Wilson, L. D., & Chen, X. (2022). Fabrication of chitosan/alginate/hydroxyapatite hybrid scaffolds using 3D printing and impregnating techniques for potential cartilage regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 204, 62–75.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.01.201>

Safikhani, M. M., Asefnejad, A., Rouhollah, ., Aghdam, M., & Rahmati, · Sadegh. (2024). Fabrication, and characterization of crosslinked sodium alginate/hyaluronic acid/gelatin 3Dprinted heparin-loaded scaffold. *Journal of Polymer Research* 2024 31:4, 31(4), 1–16. <https://doi.org/10.1007/S10965-024-03942-4>

Sangwan, S., & Seth, R. (2022). Synthesis, Characterization and Stability of Gold Nanoparticles (AuNPs) in Different Buffer Systems. *Journal of Cluster Science*, 33(2), 749–764. <https://doi.org/10.1007/S10876-020-01956-8/FIGURES/18>

Sapir, Y., Polyak, B., & Cohen, S. (2013). Nanomaterials for cardiac tissue engineering. *Nanomaterials in Tissue Engineering: Fabrication and Applications*, 244–275.
<https://doi.org/10.1533/9780857097231.2.244>

Scafa Udriște, A., Niculescu, A. G., Iliuță, L., Bajeu, T., Georgescu, A., Grumezescu, A. M., & Bădilă, E. (2023). Progress in Biomaterials for Cardiac Tissue Engineering and Regeneration. *Polymers*, 15(5). <https://doi.org/10.3390/POLYM15051177>

Scalera, F., Monteduro, A. G., Maruccio, G., Blasi, L., Gervaso, F., Mazzotta, E., Malitesta, C., & Piccirillo, C. (2021). Sustainable chitosan-based electrical responsive scaffolds for tissue engineering applications. *Sustainable Materials and Technologies*, 28.
<https://doi.org/10.1016/J.SUSMAT.2021.E00260>

Shen, K., Huang, Y., Li, Q., Chen, M., & Wu, L. (2019). Self-Assembled Polysaccharide-Diphenylalanine/Au Nanospheres for Photothermal Therapy and Photoacoustic Imaging. *ACS Omega*, 4(19), 18118–18125.

https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.9B02009/ASSET/IMAGES/LARGE/AO9B02009_0006.JPEG

- Shimojo, A. A. M., Rodrigues, I. C. P., Perez, A. G. M., Souto, E. M. B., Gabriel, L. P., & Webster, T. (2020). Scaffolds for Tissue Engineering: A State-of-the-Art Review Concerning Types, Properties, Materials, Processing, and Characterization. *Racing for the Surface: Antimicrobial and Interface Tissue Engineering*, 647–676. https://doi.org/10.1007/978-3-030-34471-9_23
- Sowjanya, J. A., Singh, J., Mohita, T., Sarvanan, S., Moorthi, A., Srinivasan, N., & Selvamurugan, N. (2013). Biocomposite scaffolds containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109, 294–300. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2013.04.006>
- Steckiewicz, K. P., Barcinska, E., Malankowska, A., Zauszkiewicz–Pawlak, A., Nowaczyk, G., Zaleska-Medynska, A., & Inkielewicz-Stepniak, I. (2019). Impact of gold nanoparticles shape on their cytotoxicity against human osteoblast and osteosarcoma in in vitro model. Evaluation of the safety of use and anti-cancer potential. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(2), 1–15. <https://doi.org/10.1007/S10856-019-6221-2/FIGURES/8>
- Steenbergen, C., & Frangogiannis, N. G. (2012). Ischemic Heart Disease. *Muscle*, 1, 495–521. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381510-1.00036-3>
- Tallawi, M., Rosellini, E., Barbani, N., Cascone, M. G., Rai, R., Saint-Pierre, G., & Boccaccini, A. R. (2015). Strategies for the chemical and biological functionalization of scaffolds for cardiac tissue engineering: a review. *Journal of the Royal Society Interface*, 12(108). <https://doi.org/10.1098/RSIF.2015.0254>
- Tamimi, M., Rajabi, S., & Pezeshki-Modaress, M. (2020). Cardiac ECM/chitosan/alginate ternary scaffolds for cardiac tissue engineering application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 389–402. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.07.134>
- Tenório, F. S., do Amaral Montanheiro, T. L., dos Santos, A. M. I., dos Santos Silva, M., Lemes, A. P., & Tada, D. B. (2021). Chitosan hydrogel covalently crosslinked by gold nanoparticle: Eliminating the use of toxic crosslinkers. *Journal of Applied Polymer Science*, 138(6), 49819. <https://doi.org/10.1002/APP.49819>

- Topete, A., Alatorre-Meda, M., Villar-Álvarez, E. M., Cambón, A., Barbosa, S., Taboada, P., & Mosquera, V. (2014). Simple control of surface topography of gold nanoshells by a surfactant-less seeded-growth method. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(14), 11142–11157. https://doi.org/10.1021/AM500989E/SUPPL_FILE/AM500989E_SI_001.PDF
- Tréguer-Delapierre, M., Majimel, J., Mornet, S., Duguet, E., & Ravaine, S. (2008). Synthesis of non-spherical gold nanoparticles. *Gold Bulletin 2008 41:2*, 41(2), 195–207. <https://doi.org/10.1007/BF03216597>
- Trombino, S., Curcio, F., Cassano, R., Curcio, M., Cirillo, G., & Iemma, F. (2021). Polymeric Biomaterials for the Treatment of Cardiac Post-Infarction Injuries. *Pharmaceutics 2021*, Vol. 13, Page 1038, 13(7), 1038. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13071038>
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K. H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., & Schué, F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84(2), 377–410. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- Vial, S., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2017). Recent advances using gold nanoparticles as a promising multimodal tool for tissue engineering and regenerative medicine. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 21(2), 92–112. <https://doi.org/10.1016/J.COSSMS.2016.03.006>
- Vogt, L., Rivera, L. R., Liverani, L., Piegat, A., El Fray, M., & Boccaccini, A. R. (2019). Poly(ϵ -caprolactone)/poly(glycerol sebacate) electrospun scaffolds for cardiac tissue engineering using benign solvents. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 103. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.04.091>
- Vu, T. D., & Kofidis, T. (2014). Biomaterials and cells for cardiac tissue engineering. *Cardiac Regeneration and Repair: Biomaterials and Tissue Engineering*, 127–179. <https://doi.org/10.1533/9780857096715.2.127>
- Vunain, E., Mishra, A. K., & Mamba, B. B. (2017). Fundamentals of chitosan for biomedical applications. *Chitosan Based Biomaterials*, 1, 3–30. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100230-8.00001-7>

- Wang, G., Wang, X., & Huang, L. (2017). Feasibility of chitosan-alginate (Chi-Alg) hydrogel used as scaffold for neural tissue engineering: a pilot study in vitro. *Http://Mc.Manuscriptcentral.Com/Tbeq*, 31(4), 766–773. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1332493>
- Wang, Y. F., Barrera, C. M., Dauer, E. A., Gu, W., Andreopoulos, F., & Huang, C. Y. C. (2017). Systematic characterization of porosity and mass transport and mechanical properties of porous polyurethane scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 65, 657–664. <https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2016.09.029>
- World Health Organization (WHO). (n.d.). *Cardiovascular diseases (CVDs)*. Retrieved February 28, 2024, from [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- Wu, S., Li, Y., Zhang, C., Tao, L., Kuss, M., Lim, J. Y., Butcher, J., & Duan, B. (2022). Tri-Layered and Gel-Like Nanofibrous Scaffolds with Anisotropic Features for Engineering Heart Valve Leaflets. *Advanced Healthcare Materials*, 11(10), 2200053. <https://doi.org/10.1002/ADHM.202200053>
- Wu, Y., Ali, M. R. K., Chen, K., Fang, N., & El-Sayed, M. A. (2019). Gold nanoparticles in biological optical imaging. *Nano Today*, 24, 120–140. <https://doi.org/10.1016/J.NANTOD.2018.12.006>
- Wu, Z., Li, W., Cheng, S., Liu, J., & Wang, S. (2023). Novel fabrication of bioengineered injectable chitosan hydrogel loaded with conductive nanoparticles to improve therapeutic potential of mesenchymal stem cells in functional recovery after ischemic myocardial infarction. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 47, 102616. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2022.102616>
- Xie, X., Liao, J., Shao, X., Li, Q., & Lin, Y. (2017). The Effect of shape on Cellular Uptake of Gold Nanoparticles in the forms of Stars, Rods, and Triangles. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04229-z>
- Xing, M. (2014). *Nanotechnology and nanomaterials for cardiac repair*. <https://doi.org/10.1533/9780857096715.1.3>
- Xu, F., Dawson, C., Lamb, M., Mueller, E., Stefanek, E., Akbari, M., & Hoare, T. (2022). Hydrogels for Tissue Engineering: Addressing Key Design Needs Toward Clinical

Translation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 849831. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.849831/BIBTEX>

Yadid, M., Feiner, R., & Dvir, T. (2019). Gold Nanoparticle-Integrated Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Nano Letters*, 19(4), 2198–2206. <https://doi.org/10.1021/ACS.NANOLETT.9B00472>

Yang, B., Yao, F., Ye, L., Hao, T., Zhang, Y., Zhang, L., Dong, D., Fang, W., Wang, Y., Zhang, X., Wang, C., & Li, J. (2020). A conductive PEDOT/alginate porous scaffold as a platform to modulate the biological behaviors of brown adipose-derived stem cells. *Biomaterials Science*, 8(11), 3173–3185. <https://doi.org/10.1039/C9BM02012H>

Yartzoff, M. A. (2019). Defining Tissue Engineering. *Encyclopedia of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1–3, 259–263. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65570-8>

Yelkuvan, E. M., Erdemli, Ö., Yilmaz, B., & Aktürk, Ö. (2023). Evaluation of photochemically cross-linked collagen/gold nanoparticle composites as potential skin tissue scaffolds. *Turkish Journal of Chemistry*, 47(1), 101–115. <https://doi.org/10.55730/1300-0527.3521>

You, J. O., Rafat, M., Ye, G. J. C., & Auguste, D. T. (2011). Nanoengineering the heart: Conductive scaffolds enhance connexin 43 expression. *Nano Letters*, 11(9), 3643–3648. https://doi.org/10.1021/NL201514A/SUPPL_FILE/NL201514A_SI_002.AVI

Yousefiasl, S., Manoochehri, H., Makvandi, P., Afshar, S., Salahinejad, E., Khosraviyan, P., Saidijam, M., Soleimani Asl, S., & Sharifi, E. (2023). Chitosan/alginate bionanocomposites adorned with mesoporous silica nanoparticles for bone tissue engineering. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 13(3), 389–403. <https://doi.org/10.1007/S40097-022-00507-Z/FIGURES/7>

Zhang, L., Fang, H., Zhang, K., & Yin, J. (2018). Homologous Sodium Alginate/Chitosan-Based Scaffolds, but Contrasting Effect on Stem Cell Shape and Osteogenesis. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(8), 6930–6941. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.7B18859/SUPPL_FILE/AM7B18859_SI_001.PDF

Zhang, S., Li, Y., Qiu, X., Jiao, A., Luo, W., Lin, X., Zhang, X., Zhang, Z., Hong, J., Cai, P., Zhang, Y., Wu, Y., Gao, J., Liu, C., & Li, Y. (2021). Incorporating redox-sensitive nanogels into bioabsorbable nanofibrous membrane to acquire ROS-balance capacity

for skin regeneration. *Bioactive Materials*, 6(10), 3461–3472.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2021.03.009>

Zhang, W., Hou, X., Wang, H., Kong, D., & Zhou, Y. (2023). Preparation of chitosan-sodium alginate/bioactive glass composite cartilage scaffolds with high cell activity and bioactivity. *Ceramics International*, 49(2), 1987–1996.
<https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2022.09.164>

Zhang, W., Zhang, K., Li, G., Zhang, D., & Yin, J. (2015). Fabrication and characterization of alginate/chitosan polyelectrolyte complex elastic scaffolds. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao/Chemical Journal of Chinese Universities*, 36(4), 758–764.
<https://doi.org/10.7503/CJCU20141094>

Zhao, W., Zhao, J., & Rong, J. (2020). Pharmacological Modulation of Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.
<https://doi.org/10.1155/2020/8815349>

Zhao, Y., Zhang, Z., Pan, Z., & Liu, Y. (2021). Advanced bioactive nanomaterials for biomedical applications. *Exploration*, 1(3), 20210089.
<https://doi.org/10.1002/EXP.20210089>

Zheng, X., Zhang, P., Fu, Z., Meng, S., Dai, L., & Yang, H. (2021). Applications of nanomaterials in tissue engineering. *RSC Advances*, 11(31), 19041.
<https://doi.org/10.1039/D1RA01849C>

Zhu, T., Jiang, J., Zhao, J., Chen, S., & Yan, X. (2019). Regulating preparation of functional alginate-chitosan three-dimensional scaffold for skin tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 8891–8903. <https://doi.org/10.2147/IJN.S210329>

13. Anexos

Anexo 1. Correlogramas de las nanopartículas de oro y oro-alginato obtenidos por DLS.

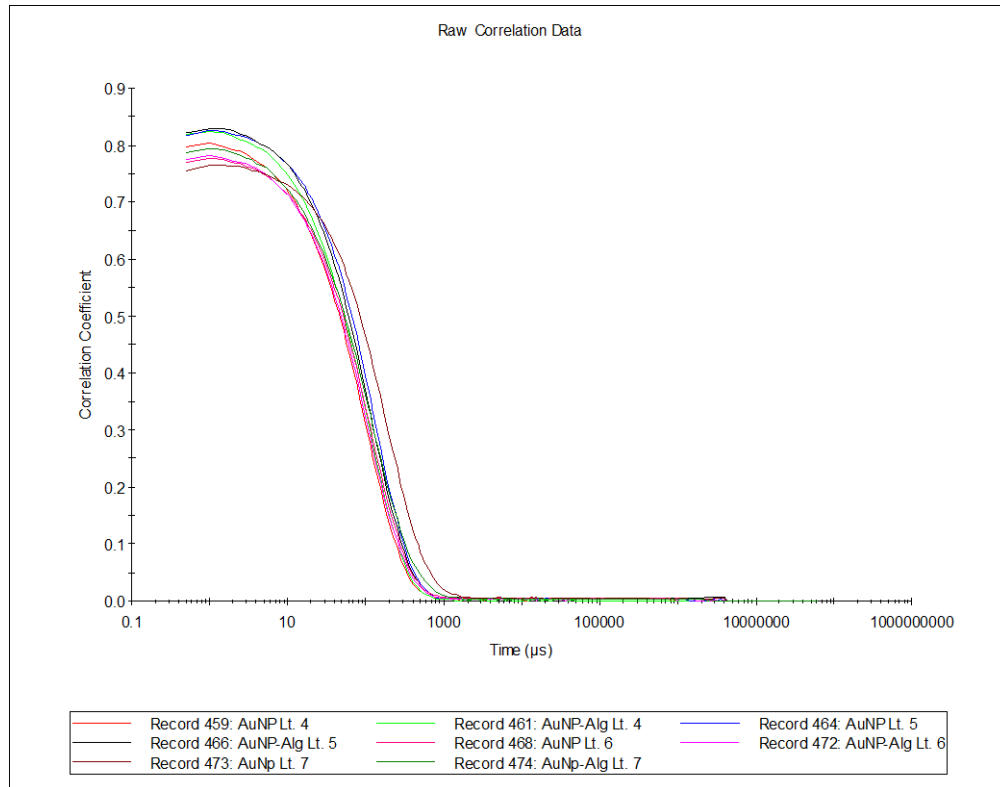
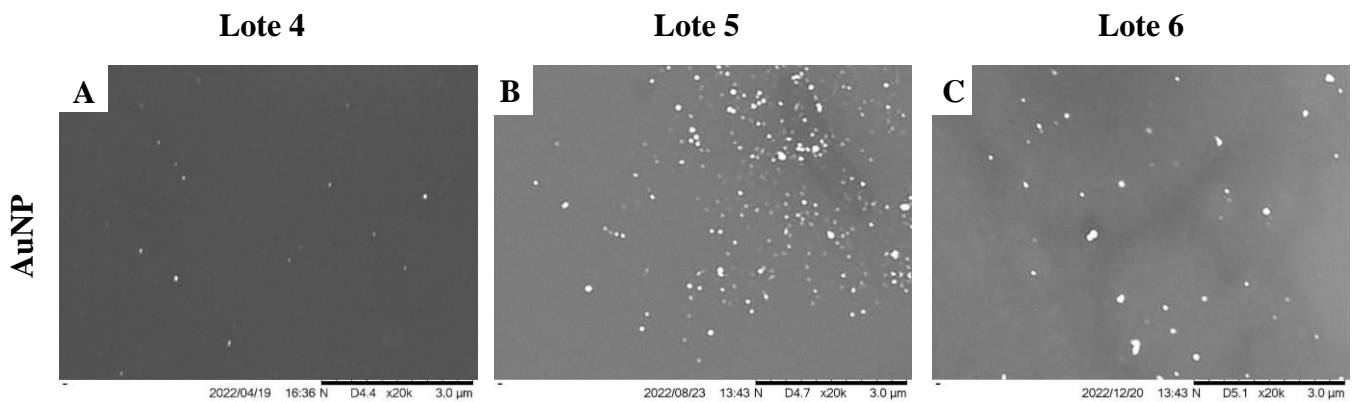


Figura A1. Gráficos de correlación de las nanopartículas sintetizadas.

Anexo 2. Imágenes obtenidas por TEM para AuNP y AuNP-ALG. Imágenes obtenidas en la UAM-Cuajimalpa.



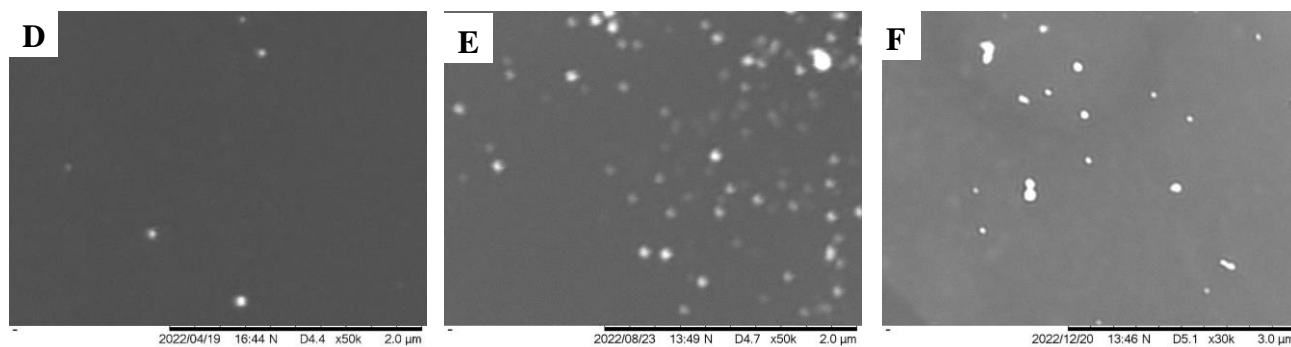


Figura A2a. Fotomicrografías obtenidas por SEM para AuNP correspondientes a los lotes 4, 5 y 6, se muestran aumentos a 20,000x (A-C) y 50,000x (D-F).

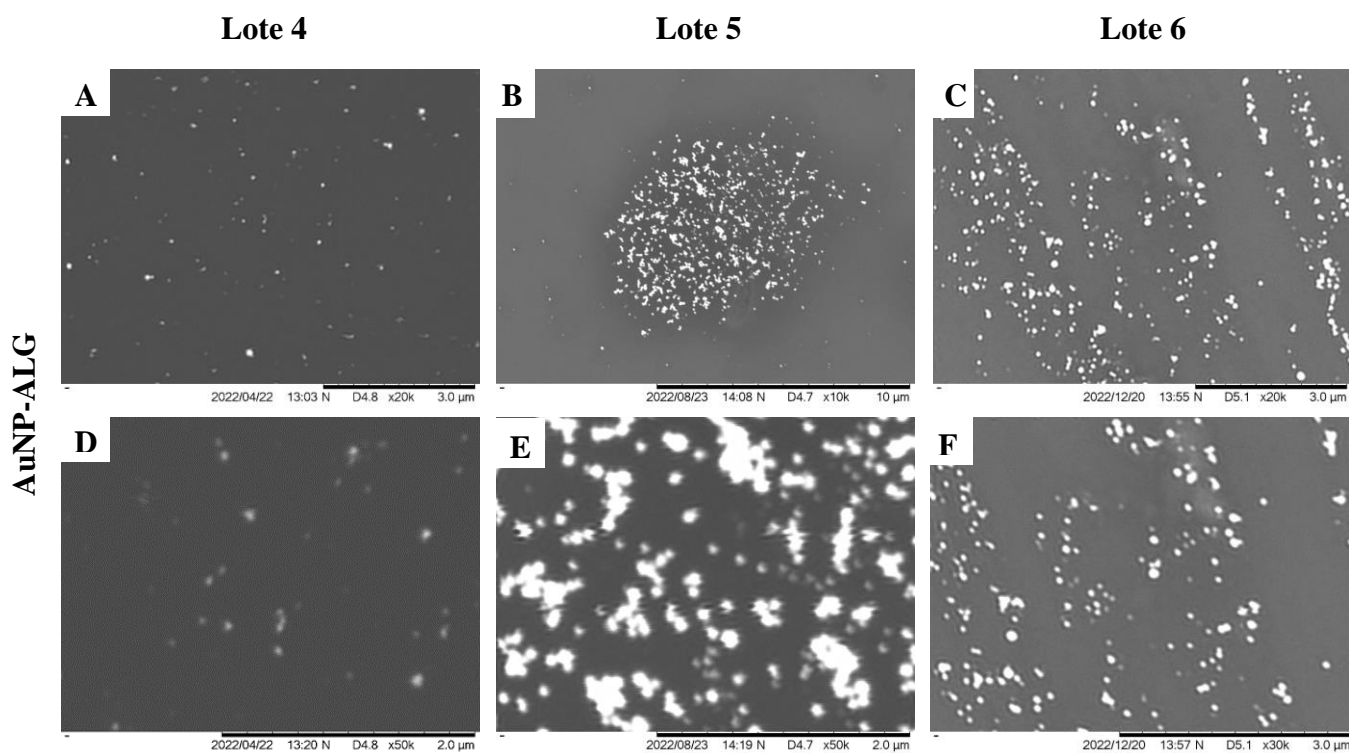


Figura A2b. Fotomicrografías obtenidas por SEM para AuNP-ALG correspondientes a los lotes 4, 5 y 6, se muestran aumentos a 20,000x (A-C) y 50,000x (D-F).