



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

APLICACIÓN DE ANDAMIOS POLIMÉRICOS EN LA INGENIERÍA DE TEJIDO

CARDIACO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANA GABRIELA MONTIEL MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

APLICACIÓN DE ANDAMIOS POLIMÉRICOS EN LA INGENIERÍA DE TEJIDO

CARDIACO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANA GABRIELA MONTIEL MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE, 2016

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/619/2016

ASUNTO: Oficio de Jurado

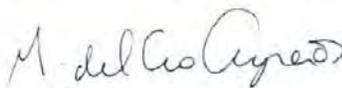
Lic. Ivonne Ramirez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **22 de agosto del año en curso** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **MONTIEL MARTÍNEZ ANA GABRIELA** con número de cuenta **515015294** con la tesis titulada "**Aplicación de andamios poliméricos en la ingeniería de tejido cardíaco**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ**:

Presidente: DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA
Vocal: DRA. ANA MARÍA FERNÁNDEZ PRESAS
Secretario: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
Suplente: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ
Suplente: DRA. CYNTHIA GEORGINA TREJO IRIARTE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 5 de octubre de 2016



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/grf*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica recibida además de los apoyos durante mis estudios de maestría.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido a través de la beca CONACYT 330514 para la realización de mis estudios de maestría. Así como el apoyo por parte de DGAPA-UNAM para el proyecto: PAPIIT IN210815 que me ha permitido la realización de estas investigaciones.

Agradezco al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez por permitirme trabajar bajo su tutoría, por la confianza, por todo el apoyo brindado, y por guiar esta investigación de la mejor manera. Al mismo tiempo agradezco a los miembros de mi comité tutoral: Dr. Luis Felipe Jiménez García y al Dr. Juan José Montesinos Montesino por estar al pendiente del desarrollo de proyecto, por sus valiosas observaciones y por todas las contribuciones realizadas a este trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Antes que nada agradezco a mis padres Elia y Eduardo por permitirme estar cumpliendo este sueño llamado vida, por estar siempre conmigo y apoyarme en este andar.

A mi hermana Brenda por ser mi confidente y estar conmigo en todo momento.

Miguel gracias por todo lo bueno que vivimos en este tiempo y por motivarme a seguir con este sueño a pesar de todo.

A mi familia adoptiva: tío Chucho, tía Niva, Monse, Nadia y Ek no tengo palabras para agradecer su apoyo y motivación en todo momento.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos Laurita, Nancy, José Luis y Osmar gracias por los buenos momentos compartidos. A Iri, Febe y Vladimir también les agradezco por la amistad y todo el apoyo en los momentos difíciles, nunca les podré terminar de agradecer.

A Talía y Abril muchas gracias por su amistad.

A mis hermanos adoptivos Ely, Paco, Tere y Vero muchas gracias porque a pesar de la distancia y el tiempo siempre están presentes.

Agradezco al Dr. Fernando Suaste Olmos por la asesoría, así como el importante y excelente apoyo técnico que me brindo durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A todas las personas que directa e indirectamente me permitieron culminar esta etapa llena de retos.

DEDICATORIA

A mi pequeño gran motor: ¡Nicolás! Porque tú me impulsas a ser una mejor persona, TE AMO.

INDICE	Página
1. RESUMEN.....	1
1. ABSTRACT.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 El sistema cardiovascular como sistema de transporte.....	3
2.2 El corazón como órgano principal del sistema cardiovascular.....	4
2.3 La matriz extracelular del miocardio.....	5
2.4 Infarto al miocardio y tratamientos actuales.....	6
2.5 La ingeniería de tejidos como disciplina para la regeneración de tejido cardiaco.....	9
2.6 El poli vinil alcohol (PVA) y su uso en la ingeniería de tejidos.....	12
2.7 El electrohilado como técnica para la obtención de fibras nanométricas.....	14
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVO GENERAL.....	16
4.1. Objetivos particulares.....	16
5. ANTECEDENTES.....	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
6.1 Diseño y caracterización de los andamios electrohilados de PVA.....	18
6.2 Entrecruzamiento de los andamios fibrilares de PVA.....	18
6.3 Caracterización morfológica y química de los andamios electrohilados de PVA.....	18
6.4 Ensayo de degradación.....	19
6.5 Cultivo celular.....	19
6.6 Ensayo de adhesión celular.....	19
6.7 Ensayo de proliferación celular.....	20
6.8 Ensayo de interacción célula-material.....	21
6.9 Expresión de moléculas específicas de tejido cardiaco.....	21
6.10 Análisis estadístico.....	22
7. RESULTADOS.....	23
7.1 Síntesis y caracterización fisicoquímica de los andamios electrohilados de PVA.....	23

7.2 Degradación de los andamios electrohilados de PVA.....	27
7.3 Adhesión celular.....	31
7.4 Proliferación celular.....	33
7.5 Interacción célula-material.....	34
7.6 Expresión de moléculas específicas de tejido cardíaco.....	34
8. DISCUSIÓN.....	36
9. CONCLUSIONES.....	40
10. BIBLIOGRAFÍA.....	41
11. ANEXO.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	Página
Fig.1. Anatomía del corazón.....	3
Fig.2. Organización histológica del corazón.....	4
Fig.3. Matriz extracelular (MEC) del miocardio.....	6
Fig.4. Remodelación patológica del miocardio.....	8
Fig.5.Principio de la bioingeniería de tejidos.....	10
Fig.6. Síntesis del Poli vinil alcohol (PVA).....	13
Fig.7. Sistema de electrohilado.....	15
Fig.8. Micrografías de Microscopía electrónica de barrido (MEB) de los andamios electrohilados de PVA.....	23
Fig.9. Histograma del diámetro de fibra de los andamios electrohilados de PVA.....	24
Fig. 10. Micrografía de Microscopia de fuerza atómica (MFA) de los andamios electrohilados de PVA.....	25
Fig.11. Espectro IR de los andamios electrohilados de PVA.....	26
Fig.12. Espectro Raman del PVA sin ningún tratamiento, de los andamios electrohilados de PVA y de los andamios electrohilados de PVA y entrecruzados con isopropanol o metanol.....	27
Fig.13. Espectro Raman de los medios de degradación de los andamios de PVA degradados en PBS.....	28
Fig.14. Espectro Raman de los medios de degradación de los andamios de PVA degradados en colagenasa al 0.01%.....	29
Fig.15. pH del ensayo de degradación de los andamios electrohilados de PVA degradados en PBS.....	30
Fig.16. pH del ensayo de degradación de los andamios electrohilados de PVA degradados en colagenasa al 0.01%.....	31
Fig.17. Adhesión celular de cardiomiocitos H9c2 a las 2, 4, 6 y 24 hrs.....	32
Fig.18. Proliferación de células H9c2 a los 3, 5 y 7 días.....	33
Fig.19. Micrografía de microscopia de fluorescencia de los cardiomiocitos H9c2 sembrados sobre los andamios electrohilados de PVA.....	34
Fig.20. Expresión de moléculas específicas de tejido cardiaco de los cardiomiocitos sembrados sobre los andamios de PVA.....	35
Tabla 1. Polímeros utilizados en la bioingeniería de tejido cardiaco.....	11

Tabla 2. Células utilizadas en la bioingeniería de tejido cardíaco.....	12
Tabla 3. Condiciones utilizadas en la RT-PCR.....	22
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en la RT-PCR.....	22

1. RESUMEN

Las enfermedades cardíacas son la principal causa de muerte en el mundo. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares generan más del 30% de todas las muertes a nivel mundial, es decir, más de 17 millones de muertes al año y se estima que para el año 2030 ocurran alrededor de 23,6 millones de decesos relacionados con estas enfermedades. En México, para el año 2014 se generaron 121,427 muertes relacionadas con enfermedades cardiovasculares. Los tratamientos más utilizados después de un episodio de infarto agudo al miocardio son los fármacos, sin embargo, estos solo se enfocan en evitar el progreso de la enfermedad, por lo tanto, en el presente trabajo se propone el uso de la ingeniería de tejidos como una alternativa al tratamiento del daño cardíaco. Con esta finalidad se diseñaron andamios nanofibrilares de PVA (poli- vinil alcohol) utilizando la técnica de electrohilado. Los andamios se caracterizaron fisicoquímicamente utilizando microscopia electrónica de barrido (MEB), microscopia de fuerza atómica (MFA), espectroscopia infrarroja (FITR) y espectroscopia Raman. Después de la caracterización fisicoquímica, los andamios fueron entrecruzados con metanol o isopropanol para retardar su degradación en medio acuoso y se realizó un ensayo de degradación en PBS y colagenasa al 0.01%. Por otro lado se realizaron ensayos biológicos sembrando células H9c2 sobre los andamios de PVA y se evaluó la adhesión celular, la proliferación celular, la interacción célula-material y la expresión de moléculas específicas de tejido muscular cardíaco. Los resultados obtenidos mostraron que la técnica de electrohilado nos permite obtener andamios nanofibrilares de PVA y el proceso de entrecruzamiento físico con metanol o isopropanol logró retardar el proceso de degradación de los andamios. Los andamios que mostraron una mejor respuesta en los ensayos de proliferación y expresión de moléculas específicas de tejido muscular cardíaco son los andamios de PVA entrecruzados con metanol, lo que sugiere que estos andamios son los candidatos para ser utilizados en estudios posteriores en el campo de la ingeniería de tejido muscular cardíaco.

1. ABSTRACT

Cardiac diseases are the number one cause of death in the world. According to World Health Organization (WHO), cardiovascular diseases generate more than 30% of all deaths in the world (more than 17 million of deaths annually) and it is estimated that by 2030 will take place around 23.6 million of deaths. In Mexico approximately 121, 427 deaths were related to cardiovascular disease in 2014. The most commonly used treatments after of acute myocardial infarction are drugs, however, this treatment is only focuses on preventing disease progression, therefore, in this thesis work we proposed use tissue engineering approach as treatment of heart damage. We designed nanofibrillar scaffolds of PVA (poly vinyl alcohol) using the electrospinning technique. Scaffolds were characterized using scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), infrared spectroscopy (FTIR) and Raman spectroscopy. After physicochemical characterization, the scaffolds were crosslinked with methanol or isopropanol to retard degradation in aqueous medium and the degradation test was performed in PBS and collagenase 0.01%. Bioassays were performed seeding H9c2 cells onto PVA scaffolds and we evaluated cell adhesion, cell proliferation, cell-material interaction and expression of specific molecules of cardiac muscle tissue. The results showed that the electrospinning technique allows make nanofibrillar scaffolds and the physical crosslinking process allows retard degradation of these scaffolds of PVA. The scaffolds that showed a better response in the assays of proliferation and expression of specific molecules of cardiac muscle tissue were the scaffolds crosslinked with methanol, therefore, these are candidates to be used in the field of cardiac tissue engineering.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 El sistema cardiovascular como sistema de transporte

El sistema circulatorio es el encargado de mantener los niveles adecuados de gases, nutrientes y desechos en el líquido intersticial por medio del intercambio continuo entre este líquido y la sangre circulante, para lograr este objetivo la sangre debe estar en constante movimiento; el órgano encargado de generar este flujo constante de sangre, es el corazón, ya que funciona como una bomba que impulsa el flujo de sangre a través de los vasos sanguíneos (Edwards *et al.*, 1997).

El corazón es un órgano hueco formado de fibras musculares estriadas y matriz extracelular. Posee cuatro cámaras: dos aurículas (izquierda y derecha) y dos ventrículos (izquierdo y derecho) que trabajan juntas y de manera coordinada para bombear la sangre a través de una red de vasos sanguíneos entre el corazón y los tejidos periféricos (figura 1). Esta red de vasos sanguíneos se divide en dos circuitos; el circuito pulmonar que transporta sangre rica en dióxido de carbono del corazón hacia la superficie de intercambio gaseoso de los pulmones y retorna sangre rica en oxígeno al corazón. El circuito sistémico se encarga de transportar sangre rica en oxígeno del corazón al resto de los tejidos del cuerpo, retornando sangre rica en dióxido de carbono al corazón. Ambos circuitos inician y terminan en el corazón, siendo las arterias las encargadas de transportar sangre del corazón mientras que las venas retornan la sangre al corazón (Edwards *et al.*, 1997).

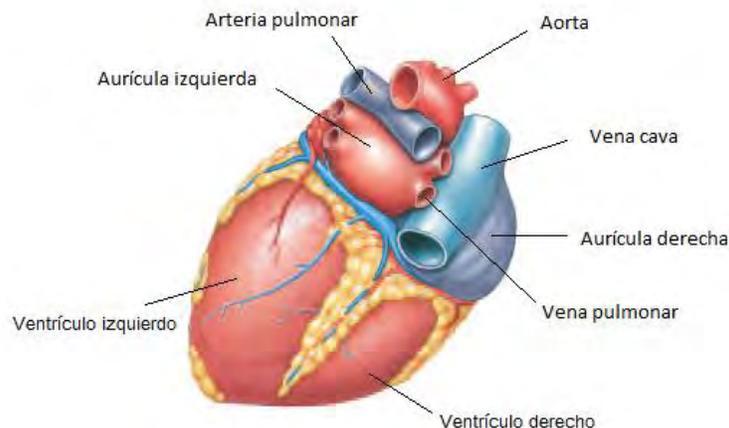


Figura 1. Anatomía del corazón. Se ilustran las cuatro cámaras del corazón y los principales vasos sanguíneos. Modificado de Stanfield *et al.*, 2008.

2.2 El corazón como órgano principal del sistema cardiovascular

El órgano del sistema circulatorio que genera la fuerza necesaria para el bombeo adecuado de la sangre, es el corazón, cuya pared está conformada por tres capas (figura 2):

- El epicardio o pericardio visceral: se encuentra formando la superficie externa del corazón, es una capa serosa que cubre al corazón.
- El miocardio: está compuesto de múltiples capas de tejido muscular cardíaco asociado a tejido conjuntivo, tejido nervioso y vasos sanguíneos.
- El endocardio: es una capa de epitelio plano y tejido conjuntivo que recubre internamente al corazón.

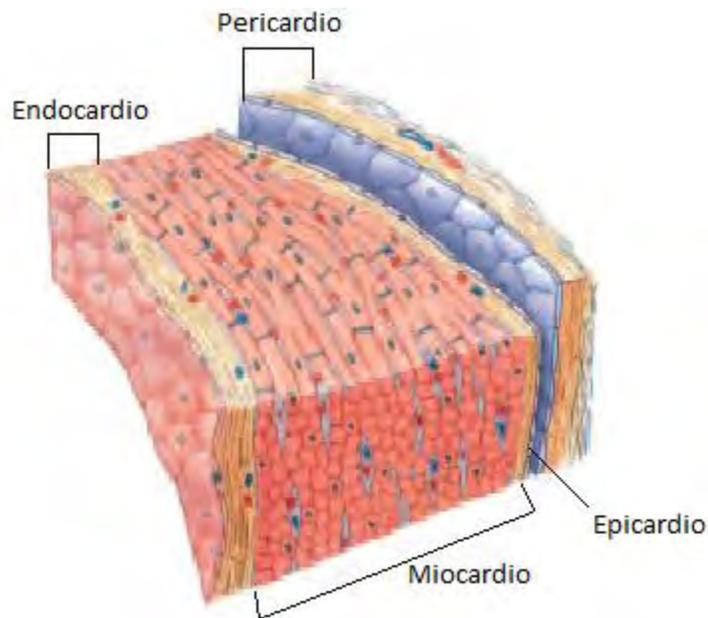


Figura 2. Organización histológica del corazón. Se ilustran las diferentes capas que conforman el tejido cardíaco. Modificado de Stanfield *et al.*, 2008.

El miocardio es la capa de tejido formado principalmente por cardiomiocitos, que son las células musculares encargadas de generar la fuerza de contracción, estas células poseen un diámetro de 10-20 μm y una longitud de 50-100 μm (Edwards *et al.*, 1997; Stanfield *et al.*, 2009).

2.3 La matriz extracelular del miocardio

La matriz extracelular (MEC) es un componente importante del medio ambiente de las células, debido a que provee señales para regular el comportamiento celular, incluyendo la proliferación, adhesión, migración y diferenciación (Watt *et al.*, 2013; Nakayama *et al.*, 2014). Dentro de la MEC del miocardio se encuentran albergadas células endoteliales, fibroblastos, leucocitos y cardiomiocitos (Stanfield *et al.*, 2009).

En el miocardio, la MEC es una red compleja formada por diferentes componentes moleculares que tiene una función importante en la transferencia de fuerza mecánica necesaria para las fases de contracción y relajación del ciclo cardiaco (figura 3). La cantidad y composición de proteínas que forman la MEC se adaptan a los requerimientos funcionales del corazón (Rienks *et al.*, 2014). Diferentes tipos de colágena, glucoproteínas (principalmente fibronectina), proteoglicanos y elastinas, están involucradas en la organización y soporte de los cardiomiocitos. Mientras que los glucosaminoglicanos, proteoglicanos y ácido hialurónico permiten la hidratación de la MEC y actúan como lubricantes de la maquinaria cardiaca contráctil (Pelouch *et al.*, 1993).

La MEC del corazón está formada principalmente por fibras de colágena tipo I y tipo III, aproximadamente el 80% de la colágena pertenece a estos tipos. La triple hélice de la colágena tipo I está compuesta de dos cadenas de colágena $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$, que forma fibras muy rígidas con diámetros de hasta 3 μm y un peso molecular de 130-140 kDa. La colágena tipo III está formada de tres cadenas $\alpha 1$, tiene un peso molecular aproximado de 140 kDa, forma fibras pequeñas y flexibles que rodean a los componentes celulares del tejido (Hein *et al.*, 2001). Estas fibras de colágena tienen una función muy importante en la estructura y función del miocardio, debido a que funciona como soporte de la fuerza contráctil generada por los cardiomiocitos (Pelouch *et al.*, 1993).

La fibronectina es una glucoproteína compuesta de dos cadenas, posee diversos sitios de unión para factores de crecimiento, heparina, colágena y diversas integrinas. Esta proteína fibrilar tiene la capacidad de estirarse y contraerse, lo que le permite al tejido ser elástico. Por otro lado la laminina es una proteína que pertenece a la familia de las proteínas adhesivas y se encuentra principalmente en las membranas basales (Pelouch *et al.*, 1993).

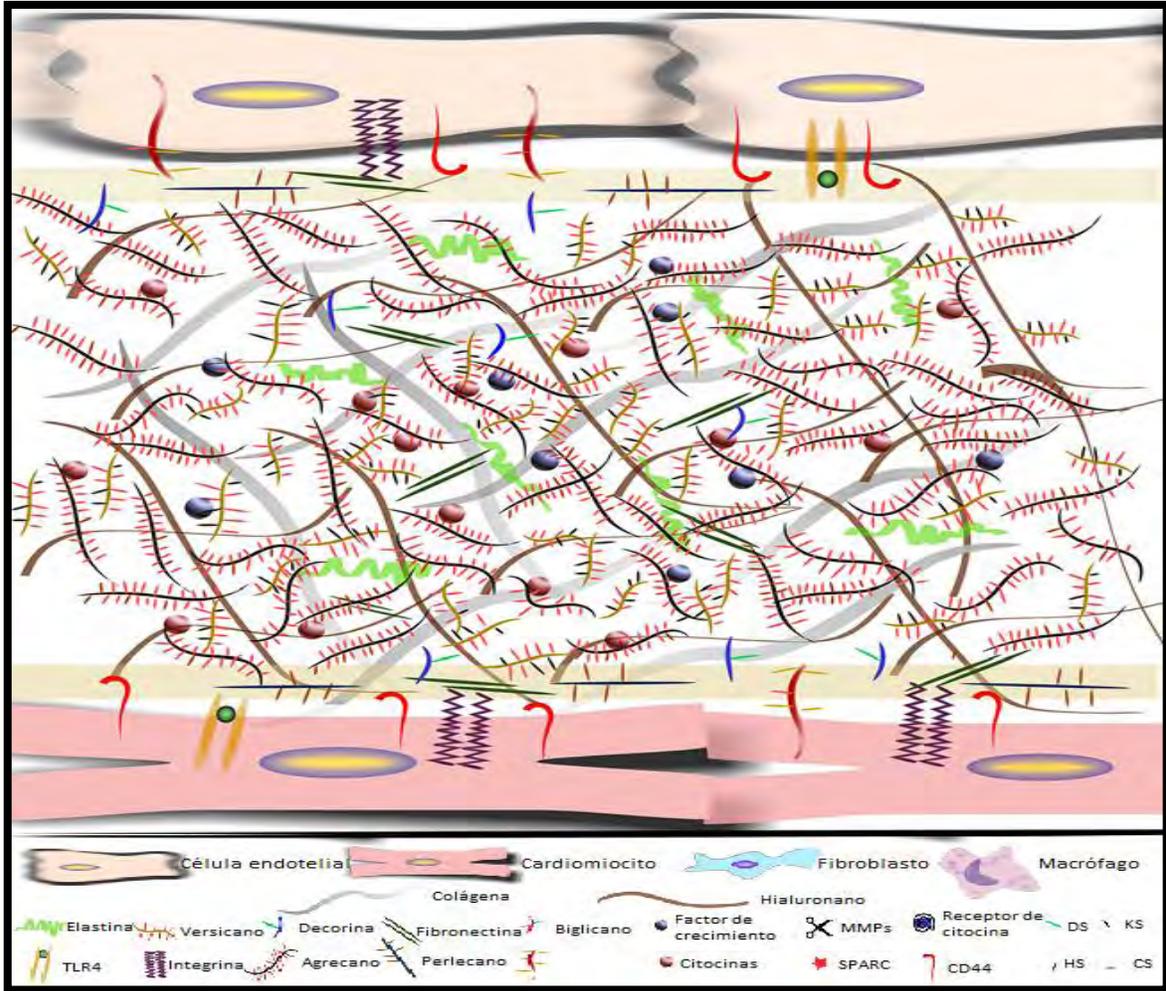


Figura 3. Matriz Extracelular (MEC) del miocardio en condiciones normales. Modificado de Rienks *et al.*, 2014.

2.4 Infarto al miocardio y los tratamientos actuales

Las enfermedades cardiacas son la principal causa de muerte en el mundo. Según datos de Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares generan más del 30% de todas las muertes a nivel mundial, es decir, más de 17 millones de muertes al año y se estima que para el año 2030 ocurran alrededor de 23,6 millones de muertes. El aumento en la incidencia de estas enfermedades está estrechamente relacionado con los cambios en el estilo de vida a los que están sometidos la mayoría de la población. Estos cambios involucran dietas altas en grasas, estrés, tabaquismo, obesidad y alcoholismo (Mendis *et al.*, 2011). México es un país que no se encuentra exento de estos cambios en el estilo de vida, según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), las

cardiopatías son la primera causa de muerte, específicamente en el año 2014 se generaron 121,427 muertes relacionadas con enfermedades cardiovasculares (INEGI, 2014).

La causa más común de daño cardíaco es la enfermedad de la arteria coronaria relacionada con un episodio de infarto agudo al miocardio, que genera un daño permanente en la pared del músculo cardíaco dando como resultado una condición de insuficiencia en el bombeo sanguíneo, debido a la formación de tejido cicatrizal, pérdida masiva de cardiomiocitos y la falta de capacidad de regeneración del tejido. Este proceso es conocido como remodelación patológica (figura 4) y se puede dividir en cuatro etapas principales:

-La primera consiste en la muerte de los cardiomiocitos debido a una falta de oxigenación y nutrientes.

-La segunda es la fase de inflamación, donde existe una migración de los monocitos y neutrófilos a la zona necrótica para remover los desechos de los cardiomiocitos muertos.

-La tercera está caracterizada por la presencia de fibroblastos, macrófagos, miofibroblastos, la formación de nuevos vasos sanguíneos y el depósito de proteínas de MEC.

-La fase final es la formación de cicatriz, que son regiones con pocas células y ricas en colágenas altamente entrecruzadas (Cleutjens *et al.*, 1995).

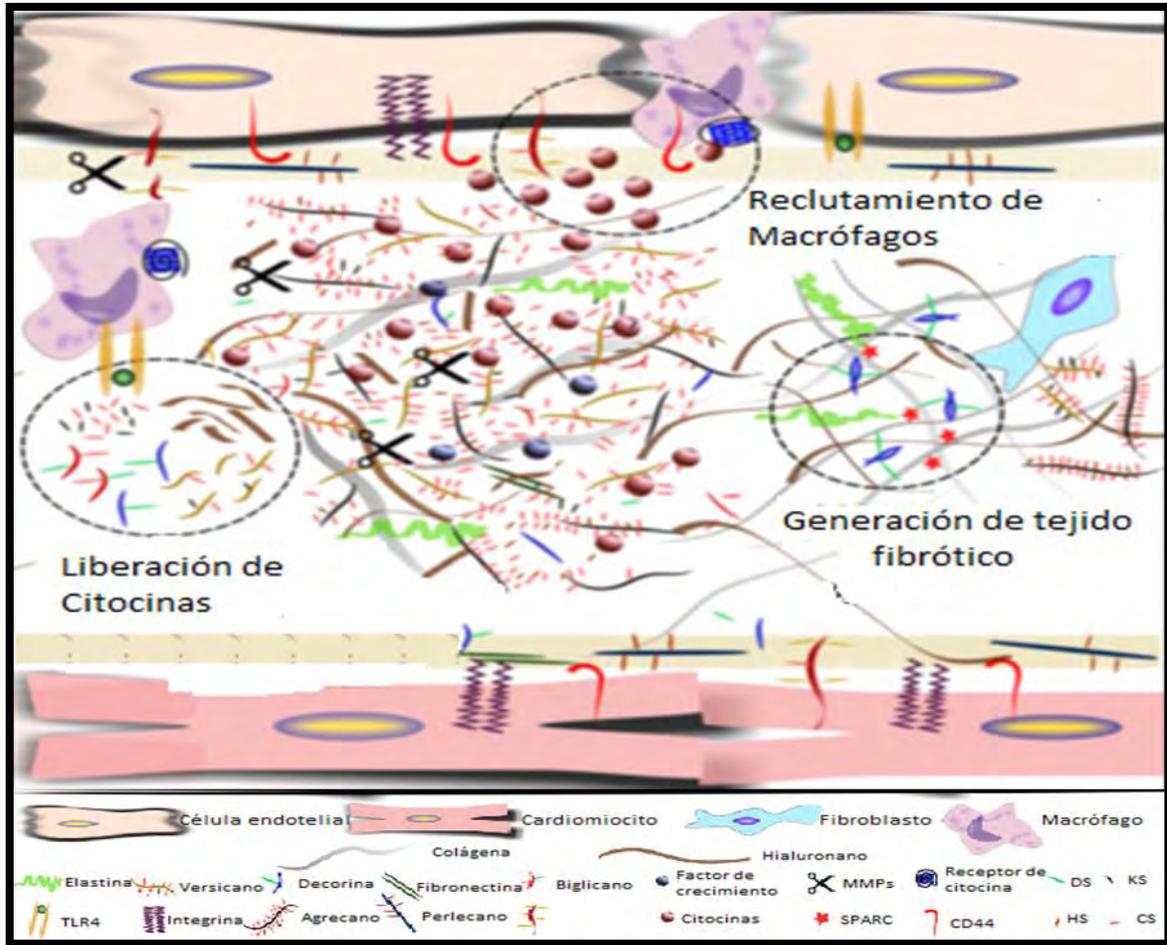


Figura 4. Después de un episodio de infarto al miocardio, se lleva a cabo una remodelación patológica del tejido cardíaco. Este proceso está caracterizado por el reclutamiento de macrófagos, la liberación de citocinas inflamatorias y la síntesis excesiva de fibras de colágena por la activación de fibroblastos. Modificado de Rienks *et al.*, 2014.

El tratamiento más utilizado es la revascularización mediante angioplastia primaria y la colocación de stent. Cuando esta tecnología no está disponible, se recurre al tratamiento fibrinolítico acompañado de anticoagulantes y antiagregantes que pueden generar hemorragia y otros efectos secundarios severos. Otro tipo de fármacos utilizados están enfocados en disminuir la carga de trabajo y proporcionar protección contra factores humorales tóxicos sobreactivados en el daño cardíaco, sin embargo no pueden controlar adecuadamente la progresión de la enfermedad (Chen *et al.*, 2008). En presencia de daño miocárdico importante, por insuficiencia cardíaca, el trasplante de corazón es la única opción curativa, sin embargo, es una terapia invasiva y costosa. El número de órganos disponibles para ser trasplantados es muy escaso y pueden existir complicaciones

relacionadas con la respuesta inmune (Aguilar y Garabito, 2008). Dentro de los tratamientos más novedosos se encuentra la terapia celular que consiste en la transferencia de células exógenas a un miocardio enfermo para tratar de suplir con células nuevas parte del tejido cicatrizado y fibroso, el objetivo de esta técnica es reparar, reemplazar o estimular células alteradas, así como restituir la masa miocárdica funcional para mejorar la contractilidad (Laflamme *et al.*, 2005). Este tratamiento ya se ha aplicado en ensayos clínicos utilizando células troncales mesenquimales (Quevedo *et al.*, 2009) y células troncales cardíacas (Hosoda, 2012), sin embargo se ha observado que no se obtiene un resultado exitoso en todos los casos, lo que está relacionado con la magnitud del daño en el tejido, ya que cuando el daño es de gran extensión, las células no son capaces de regenerar el tejido. Por otro lado, las células no tiene un medio ambiente adecuado para adherirse, proliferar y diferenciarse debido a que en la zona dañada, se encuentra tejido fibrótico y una gran cantidad de citocinas inflamatorias (Laflamme *et al.*, 2008). Por lo tanto en el presente trabajo se propone la utilización de la ingeniería de tejidos como una opción para el tratamiento de daño cardíaco por medio del diseño de andamios cardíacos que eviten la formación del tejido fibrótico y reestablezcan la función del tejido dañado en el paciente.

2.5 La Ingeniería de tejidos como disciplina para la regeneración de tejido cardíaco

La ingeniería de tejidos es un campo nuevo que tiene como objetivo desarrollar sustitutos biológicos funcionales para restaurar o reemplazar tejidos dañados por enfermedades o lesiones a través del empleo de los principios de la biología celular, la ciencia de los materiales, y la biomedicina (Ye *et al.*, 2014; Drury *et al.*, 2003). Se basa en un concepto relativamente simple: comienza con el desarrollo de un andamio (por ejemplo, un andamio de polímero biodegradable), cuya forma puede ser a manera de película delgada o fibrilar, que se pone en contacto con células en cultivos celulares *in vitro*, y se puede adicionar o no factores de crecimiento (figura 5). Cuando las células se multiplican proliferando, interaccionan con el andamio llenando los poros interconectados de los andamios; desarrollándose posteriormente un tejido tridimensional y una vez implantados en el cuerpo, las células podrán recrear sus funciones en el tejido deseado (Kam *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2012).

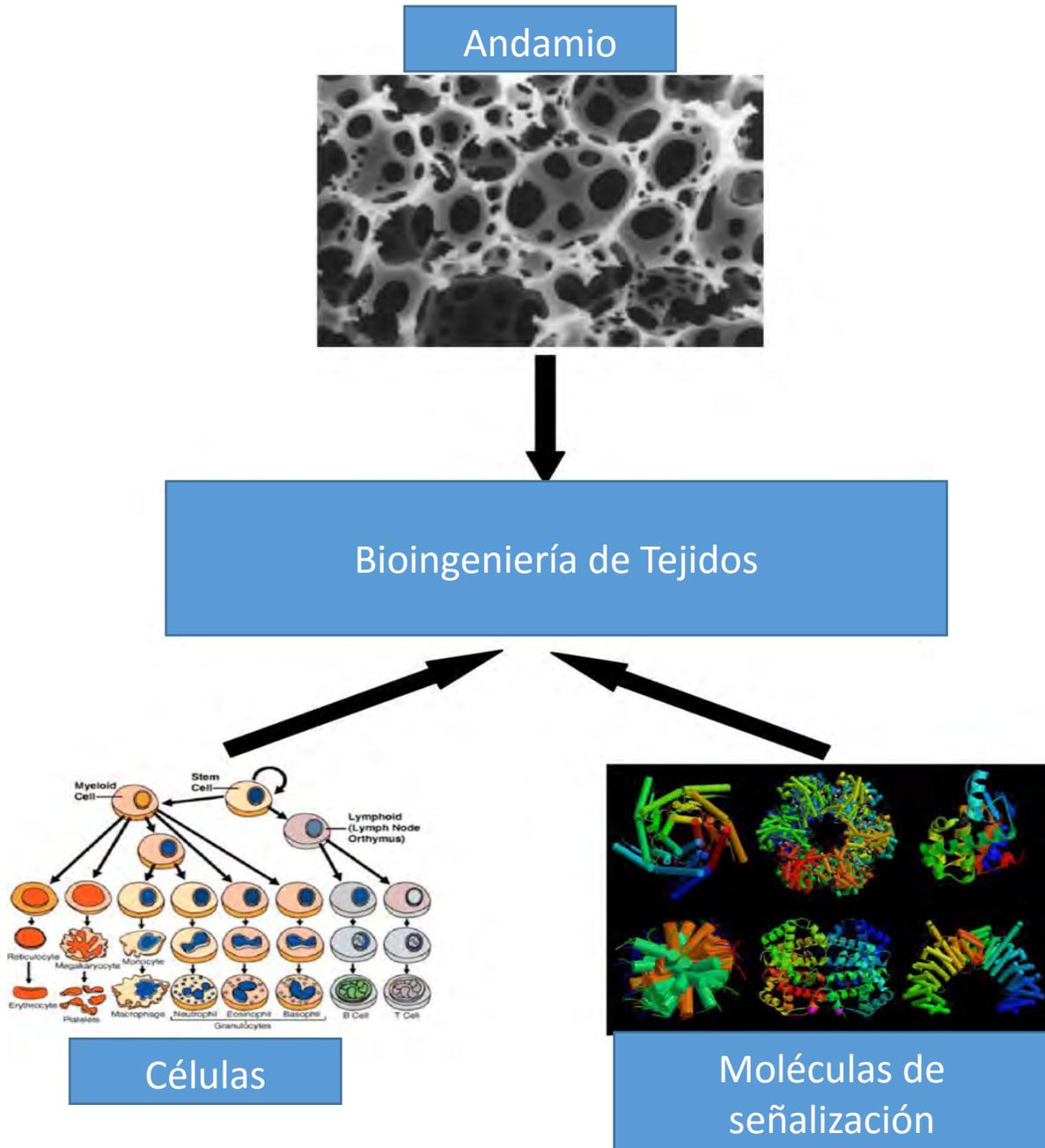


Figura 5. Principio de la bioingeniería de tejidos. Modificado de Chen *et al.*, 2008.

En el caso de la ingeniería de tejido muscular cardiaco el objetivo es reparar la región cardiaca infartada a través de la producción de un tejido funcional que se integre plenamente dentro del órgano (Muscarello *et al.*, 2014). Por lo tanto, el tejido construido debe cumplir con cinco características:

- 1) Debe ser contráctil.
- 2) Ser fisiológicamente estable.
- 3) Mecánicamente fuerte y a la vez flexible.
- 4) Permitir la vascularización lo más rápido posible.
- 5) No inmunogénico (Zimmermann W.H. *et al.*, 2004).

Con la finalidad de lograr este objetivo se han utilizado diversos materiales para la construcción de andamios en donde se ha evaluado la respuesta de diversos tipos celulares. Dentro de los materiales utilizados destacan los polímeros naturales y los polímeros sintéticos (Tabla 1).

Tabla 1. Polímeros utilizados en la bioingeniería de tejidos de corazón	
Polímeros Naturales	
Nombre	Referencia
Gelatina	Akhyari P. <i>et al.</i> , 2002
Colágena	Eschenhagen T. <i>et al.</i> , 2002 y Kofidis T. <i>et al.</i> , 2002
Fibrina	Christman KL. <i>et al.</i> , 2004
Alginato	Chandy T. <i>et al.</i> , 2003
Polímeros Sintéticos	
Nombre	Referencia
Poli (ácido láctico)	Leor J. <i>et al.</i> , 2000
Poli (ácido glicólico)	Leor J. y Cohen S., 2004
Poli (ϵ -caprolactona)	Pego A <i>et al.</i> , 2003
Poli (hidroxibutirato)	Ramsay B. <i>et al.</i> , 1993
Poli (uretano)	McDevitt T. <i>et al.</i> , 2003

Para poder cumplir con el objetivo anteriormente mencionado es necesario que los materiales utilizados para la construcción de los andamios posean las siguientes características:

- 1) Biocompatible (no tóxico)
- 2) Biodegradable
- 3) No inmunogénico (no despertar respuesta inmune)
- 4) Bioactivo (promover la adhesión, proliferación y diferenciación).

Tratando de cumplir con estas características, en el presente trabajo se propone la utilización de un polímero soluble como el poli vinil alcohol.

Otro componente importante de la ingeniería de tejidos son las células utilizadas para construir el tejido *in vitro*. En el caso de la bioingeniería de tejido muscular cardiaco se han utilizado diversos tipos celulares (Tabla 2).

Tabla 2. Células utilizadas en la bioingeniería de tejidos de corazón	
Tipo celular	Referencia
Células de cordón umbilical	Kadner A. <i>et al.</i> , 2004
Células troncales mesenquimales	Devine, 2001
Células troncales embrionarias	Zhang D. <i>et al.</i> , 2013
Cardiomiocitos fetales	Li R.K. <i>et al.</i> , 2000
Fibroblastos	Li R.K. <i>et al.</i> , 2000
Células de músculo liso	Matsubayashi, 2003
Cardiomiocitos neonatales	Zimmermann W.H. <i>et al.</i> , 2000 y Hussain A. <i>et al.</i> , 2013

2.6 El Poli (vinil alcohol) y su uso en la ingeniería de tejidos

El poli (vinil alcohol) o PVA es un polímero sintético ampliamente utilizado en la industria textil, de adhesivos, alimentos y biomédicos (de Merlis *et al.*, 2003). Se obtiene por la hidrólisis alcalina o ácida del poli- acetato de vinilo, para remover los grupos acetato (figura 6). El grado de hidrolisis determina las características físicas, propiedades químicas y

mecánicas (Baker *et al.*, 2012). El PVA es un material hidrosoluble, esto se debe a que su estructura corresponde a un polímero altamente polar que le confiere la posibilidad de formar puentes de hidrogeno *inter e intra* moleculares, lo que hace que este polímero posea una fracción cristalina importante. La existencia de estos enlaces de hidrógeno también implica que posea un comportamiento mecánico apto para la fabricación de fibras sintéticas que además de una alta resistencia mecánica, tienen la capacidad de difundir agua rápidamente (Perrilla, 1998).

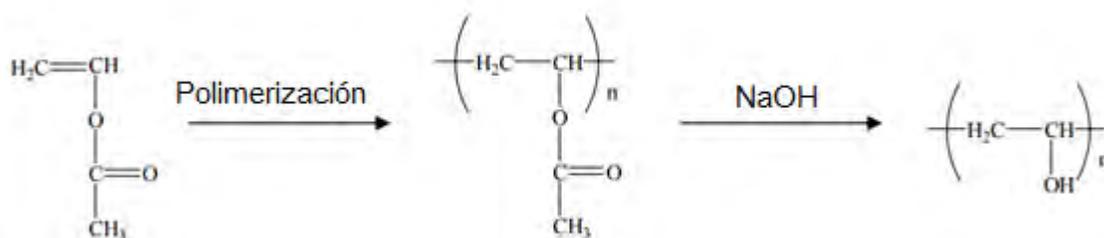


Figura 6. Reacción de polimerización del acetato de vinilo e hidrólisis del poli-acetato de vinilo para la obtención de poli-vinil alcohol. Modificado de Jiang, Y., 2009.

Por sus características como son: la alta biocompatibilidad, no toxicidad, buena estabilidad térmica y mecánica, este polímero ha sido ampliamente utilizado para la fabricación de membranas que permiten la liberación prolongada de fármacos como: diclofenaco de sodio, naproxeno, indometacina y rifampicina, entre otros (Shen *et al.*, 2014). Otras aplicaciones son la fabricación de nanofibras con partículas de plata que poseen actividad antimicrobiana en modelos *in vitro e in vivo*, así como en sistemas de purificación de agua (Voigt, 2009) y en diseño de andamios utilizados en modelos *in vitro o in vivo* para la regeneración de diversos tejidos como hueso (Chang *et al.*, 2013), cartílago (Shafiee *et al.*, 2011) y piel (Chandrasekaran *et al.*, 2011).

Otra característica importante del PVA es la alta solubilidad en agua. Por lo tanto este polímero necesita ser entrecruzado para ser utilizado como hidrogel en diversas aplicaciones. El entrecruzamiento puede ser físico o químico y ambos proporcionan estabilidad estructural al polímero cuando entra en contacto con agua o fluidos corporales. El grado de entrecruzamiento dicta la cantidad de fluido que es capaz de absorber el polímero, lo que está estrechamente relacionado con sus características, físicas, químicas y biológicas (Hassan *et al.*, 2000). En diversos trabajos se han investigado diferentes agentes entrecruzantes, entre los que destacan: aldehídos (glutaraldehído,

paraformaldehído) (Shaikh *et al.*, 2012), ácido cítrico (Hidber *et al.*, 1995) y ácido bórico (Manna *et al.*, 2009) para el caso del entrecruzamiento químico. Sin embargo, una desventaja que presentan estos agentes es su alta toxicidad. Para el entrecruzamiento físico se han utilizado la radiación gama, ciclos de congelamiento y descongelamiento y agentes como isopropanol (Alves *et al.*, 2011) y metanol (Yao *et al.*, 2003) los cuales no tienen toxicidad.

Una vez dentro del cuerpo, el PVA puede ser excretado por la vía renal o hepática. Para el caso de PVA de bajo peso molecular la excreción se da de manera rápida a través de los glomérulos renales para ser eliminado por la orina. Mientras que el PVA de mayor tamaño se excreta a través del hígado: las células del parénquima del hígado endocitan el PVA para ser transportado a través de los conductos biliares y la vesícula biliar hacia el intestino y finalmente ser eliminado en las heces (Kaneo *et al.*, 2005).

2.7 El electrohilado como técnica para la obtención de fibras manométricas

La técnica de electrohilado es conocida desde 1987 pero ha ganado popularidad en los últimos años debido a un aumento en el interés sobre la nanotecnología. Con este método se obtienen fibras de polímero con diámetros que varían de 3nm hasta 5 μ m. Dentro de las aplicaciones de esta técnica están las nanofibras catalíticas, sensores basados en fibras, sistemas de filtración y con numerosas aplicaciones en la ingeniería de tejidos (Subbiah *et al.*, 2005).

La simplicidad y el bajo costo son características que hacen atractiva a esta técnica. El sistema consta de tres componentes principales; una fuente de poder de alimentación continúa de alto voltaje, un colector con conexión a tierra y una jeringa conectada a una bomba para un suministro constante del polímero (figura 7). Para poder realizar el electrohilado del polímero, primero es necesario encontrar el disolvente apropiado para el polímero y preparar la solución a una concentración adecuada. Después la solución es depositada en la jeringa, cuyo flujo está regulada por una bomba de infusión. La solución de polímero es sometida a un campo eléctrico, cuando el campo eléctrico aplicado alcanza un valor crítico, las fuerzas eléctricas de repulsión superan las fuerzas de tensión superficial del polímero y se forma un cono de Taylor en la punta de la aguja de la jeringa del cual se eyecta el polímero que es depositado en el colector, en este punto es cuando ocurre la evaporación del disolvente y la formación de fibras (Bhardwaj *et al.*, 2010).

En el electrohilado existen varios parámetros que nos permiten modificar la morfología de las fibras, entre estos parámetros podemos encontrar: el peso molecular del polímero, concentración del polímero, el solvente utilizado, el voltaje aplicado, la velocidad de flujo del polímero, la distancia de la punta de la aguja al colector y la humedad del medio ambiente (Bhardwaj, *et al.*, 2010).

Mediante el uso de esta técnica se han logrado obtener andamios fibrilares de diferentes polímeros que han sido utilizados en la bioingeniería de diversos tejidos. El interés en la fabricación de andamios nanofibrilares radica en el objetivo de mimetizar la matriz extracelular, además de que se ha observado que la topografía fibrilar permite tener un área de superficie mayor que aumenta la unión celular (Bhardwaj *et al.*, 2010).

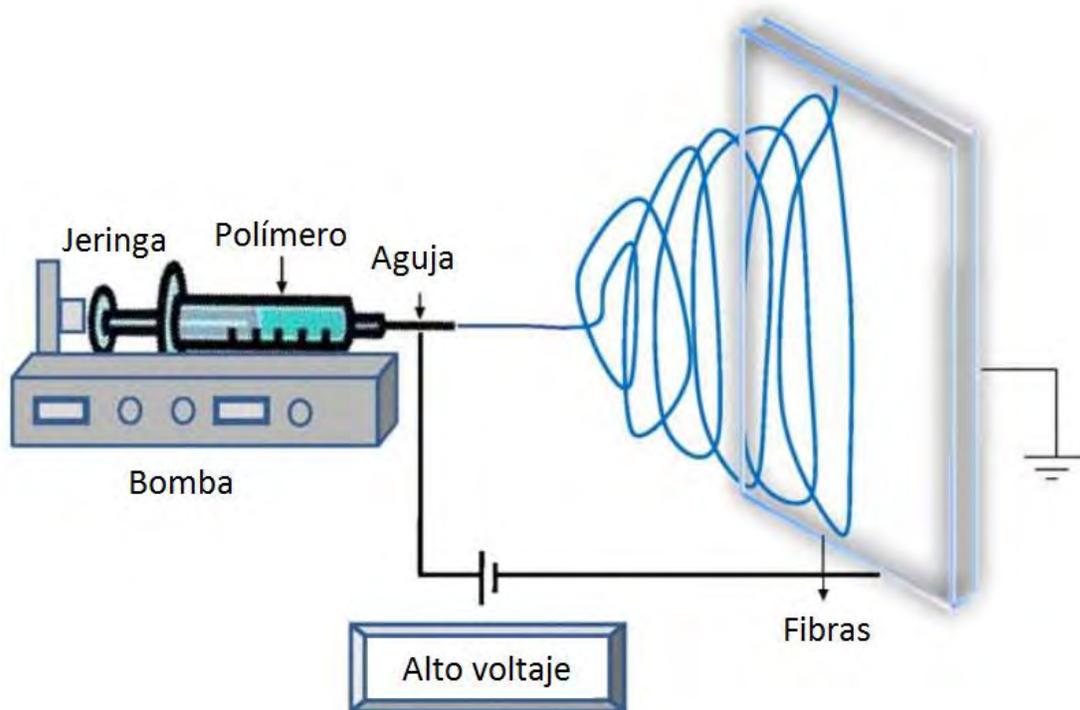


Figura 7. Sistema de electrohilado. Se basa en la formación un circuito eléctrico cerrado al cual se le aplica alto voltaje.

3. HIPOTESIS

La utilización de un andamio fibrilar de poli vinil alcohol (PVA) sintetizado a partir de la técnica de electrohilado inducirá la adhesión, proliferación y expresión moléculas específicas de cardiomiocitos cultivados sobre él.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la adhesión, proliferación y expresión de moléculas específicas de cardiomiocitos al ser al ser cultivados sobre un andamio electrohilado de PVA.

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

-Fabricar andamios fibrilares poliméricos de PVA que favorezcan la adhesión, proliferación y expresión de moléculas propias de músculo cardíaco.

-Evaluar la degradación de los andamios electrohilados de PVA después de ser sometidos a dos diferentes procesos de entrecruzamiento físico.

-Establecer el efecto de la morfología superficial de los andamios poliméricos de PVA en la adhesión y proliferación de cardiomiocitos embrionarios de ratón en cultivos celulares *in vitro*.

-Evaluar la interacción célula-material de los cardiomiocitos embrionarios de ratón sembrados sobre los andamios electrohilados de PVA, utilizando microscopía de fluorescencia.

-Determinar la expresión de moléculas específicas de tejido muscular cardíaco en cultivos celulares de cardiomiocitos embrionario de ratón, sembrados sobre los andamios electrohilados de PVA por medio de RT-PCR.

5. ANTECEDENTES

La ingeniería de tejido cardíaco se basa principalmente en el uso de materiales sintéticos o biológicos y de células del corazón para reconstituir el tejido muscular cardíaco *in vitro* que posteriormente puede utilizarse para la sustitución de miocardio enfermo *in vivo*. Este enfoque está basado en los principios generales de la ingeniería de tejidos propuestos por Langer y Vacanti a principios de la década de 1990. La construcción de tejido cardíaco idealmente debe mostrar propiedades funcionales y morfológicas del músculo cardíaco nativo y permanecer viable después de la implantación. La integración mecánica, eléctrica, y funcional en la arquitectura de órganos debería resultar en una mejor función sistólica y diastólica del miocardio enfermo. Durante los últimos diez años, diferentes grupos han contribuido al campo de la ingeniería de tejido cardíaco (Zimmermann *et al.*, 2004).

Ye *et al.*, en 2014 plantearon el uso de un andamio construido de PVA para ser aplicado en la bioingeniería de tejidos suaves. Ellos proponen el uso de PVA debido a su alta solubilidad en agua, no toxicidad, biocompatibilidad y su capacidad de biodegradación; remarcando que una estructura altamente porosa permite la adhesión, proliferación y migración celular, además de un suministro adecuado de nutrientes, factores de regulación y oxígeno a las células.

Tobita *et al.*, en 2006 construyeron un andamio 3D en forma cilíndrica a partir de MEC de tejido cardíaco embrionario y evaluaron la respuesta de cardiomiocitos embrionarios al ser sembrados sobre estos andamios, debido a que se ha observado que estas células tienen la capacidad de regular la proliferación, función contráctil y arquitectura miocárdica como respuesta al medio ambiente. Por otra parte Pego *et al.*, en 2003 diseñaron un andamio de un co-polímero de carbonato de trimetileno y D,L-lactida altamente poroso en el que se sembraron cardiomiocitos embrionarios y observaron que estos andamios poseen propiedades mecánicas adecuadas y promueven la adhesión y proliferación de dichas células. Tomando en consideración estos resultados, en el presente trabajo se propuso la utilización del PVA como material para la construcción de un andamio nanofibrilar, lo que nos permitió generar una gran cantidad de poros; estos andamios también fueron evaluados biológicamente utilizando cardiomiocitos embrionarios de rata.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Diseño y caracterización morfológica y química de los andamios electrohilados de PVA.

La elaboración de los andamios poliméricos se realizó utilizando una solución de PVA (Elvanol® 50-42), parcialmente hidrolizado al 5% en peso, el cual se disolvió en 40% etanol absoluto (J.T. Baker®): 60% agua bidestilada [vol:vol] bajo agitación magnética a 80°C hasta su disolución.

Una vez preparada la solución polimérica, se fabricaron las nanofibras por la técnica de electrohilado, para lo cual, se agregaron 5 ml de la solución polimérica dentro de un inyector con aguja hipodérmica de 0,5 mm de diámetro; la solución polimérica fue inyectada a una velocidad de 0.70 ml/h utilizando una bomba de infusión KD scientific®. La aguja fue conectada a la terminal positiva del generador de alta tensión (Spellman®) a 15 kV y el colector de las fibras fue conectado a tierra, cuya separación fue de 15 cm opuesta a la aguja.

6.2 Entrecruzamiento de las nanofibras de PVA

Los andamios electrohilados de PVA fueron sometidos a un proceso de entrecruzamiento (cross-linking) para evitar su rápida degradación. Como agentes entrecruzantes se utilizaron metanol (J.T. Baker ®) e isopropanol (J.T. Baker ®). Los andamios fueron sumergidos en los entrecruzantes durante 24 horas, para después realizar su esterilización con luz UV por media hora y permitir la completa evaporación del entrecruzante en una campana de flujo laminar durante 24 horas para su posterior utilización en las técnicas de caracterización y ensayos biológicos.

6.3 Caracterización morfológica y química de los andamios electrohilados de PVA

Los andamios de PVA fueron recubiertos con polvo de oro y la morfología fue analizada utilizando microscopía electrónica de barrido (MEB) (Field Emission Jeol JSM-7600f). Para analizar el diámetro de las fibras de los andamios de PVA a partir de las micrografías de MEB, se utilizó el software Image J (National Institutes of Health, USA).

Se utilizó un microscopio de fuerza atómica (MFA) en la modalidad de contacto (JEOL, JSPM-3210) para obtener los mapeos y rugosidad de la interconexión porosa de las membranas electrohiladas.

Finalmente se evaluó la estructura química de los andamios de PVA utilizando espectroscopia Infrarroja (FITR) y espectroscopia Raman (Microscopio Confocal Raman Alpha 300AR, WITEC®), esto con la finalidad de evaluar si la técnica de electrohilado o el método de entrecruzamiento modificaron la estructura química del polímero.

6.4 Ensayo de degradación

Se evaluó la degradación de los andamios electrohilados de PVA y entrecruzados con isopropanol o metanol. Como medios de degradación se utilizaron PBS (SIGMA®) y colagenasa al 0.01% (SIGMA®); los andamios fueron sumergidos en estos medios durante 15, 30, y 45 min a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad.

Después de los tiempo de degradación establecidos, se recolectó el medio para medir el pH y analizarlo por espectroscopia Raman (Microscopio Confocal Raman Alpha 300AR, WITEC®). El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se compararon con PVA electrohilado sin entrecruzar, como referencia del patrón de bandas en espectroscopia Raman se utilizó el PVA electrohilado sin entrecruzar.

6.5 Cultivo Celular

Para caracterizar la biocompatibilidad de los andamios hilados de PVA se utilizó la línea celular de cardiomiocitos embrionarios de rata H9c2 (ATCC). Los cardiomiocitos se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (CORNING®) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, CORNING®), una solución de antibióticos (penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y fungisona (0.3 µg/ml), 2mM de glutamina y 50mM de aminoácidos no esenciales. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en un ambiente con 100% de humedad.

6.6 Ensayo de Adhesión Celular

Para establecer el efecto de los andamios fibrilares de PVA sobre la adhesión celular, los cardiomiocitos embrionarios fueron cultivados en contacto directo sobre los andamios a una

densidad celular de 1×10^4 células/mL y se cultivaron durante 2, 4, 6, y 24 horas. Las células adheridas a las membranas de PVA se evaluaron por medio del ensayo de cristal violeta. Pasado el tiempo de cultivo experimental, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% por 20 minutos. Después se lavaron con PBS y se incubaron con una solución de 0.1% de cristal violeta durante 10 minutos. Finalmente las células se lavaron con agua bidestilada y el colorante se extrajo con 300 μ L de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%. De la solución obtenida se tomaron 100 μ L que se colocaron en una placa de 96 pozos para ensayos de ELISA y se leyó en un espectrofotómetro (ChroMate, AWARENESS®) a 550 nm. Los cultivos controles positivos fueron las células sembradas sobre el plato de cultivo, mientras que los controles negativos fueron las células sembradas sobre películas delgadas de PVA

6.7. Ensayo de Proliferación Celular

Para poder correlacionar el papel regulador de la viabilidad de los cardiomiocitos con la interconexión porosa de las membranas poliméricas de PVA, se realizó el ensayo de naranja de formazan CCK-8 (DOJINDO®), basado en la habilidad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial para oxidar una sal de tetrazolio [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] a un producto soluble de color naranja. Los cardiomiocitos embrionarios de ratón (H9c2) fueron cultivados a una densidad celular de 1×10^4 células/mL durante 3, 5, y 7 días de cultivo. Después de cada periodo experimental, las células fueron incubadas con WST-8 a 10% del volumen total del pozo, a 37°C por 4 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se retiró el sobrenadante y se llevó a cabo la lectura de absorbancias en un lector de ELISA (ChroMate, AWARENESS®), para obtenerse la densidad óptica a una longitud de onda de 450 nm. Debido a que la generación del producto naranja es (directamente) proporcional a la actividad oxidativa de la enzima deshidrogenasa, los valores que se obtuvieron de absorbancia a 450 nm se correlacionaron al valor con la actividad metabólica de las células vivas.

6.8. Ensayo de interacción célula – material

Para poder observar como las células H9c2 interaccionan sobre los andamios electrohilados de PVA, se realizó el ensayo de cell tracker (Thermo Fisher Scientific®). Para este ensayo, se sembraron los cardiomiocitos embrionarios de ratón sobre los andamios de PVA durante 24 horas, posteriormente se les retiró el medio de cultivo y se les agregó la solución colorante previamente calentada con la que se incubó durante 45 min. Se retiró la solución colorante y se incubó con medio de cultivo por 30 min. Finalmente las células se fijaron con PFA al 4 % durante 15 min, para ser observadas con microscopia de fluorescencia (Axio Imager A2 Zeiss). Cabe señalar que las incubaciones se llevaron a cabo bajo condiciones de cultivo estándar y entre cada paso se realizó un lavado con PBS.

6.9. Expresión de moléculas específicas de tejido cardíaco

Con la finalidad de poder cuantificar la expresión de genes específicos de tejido cardíaco, se llevó a cabo la técnica de RT-PCR con el kit ONESTEP RTPCR (Invitrogen®). Para este fin se sembraron cardiomiocitos embrionarios de ratón H9c2 sobre andamios electrohilados de PVA entrecruzados con metanol o isopropanol a una confluencia del 80% durante 24 horas. Posteriormente se extrajo el RNA total de los cultivos utilizando el método de extracción fenólica con Trizol (Invitrogen Life technologies®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la extracción del RNA total con cloroformo, formando dos fases, una orgánica y una acuosa, esta última a partir de la cual se precipita el RNA con isopropanol. Finalmente se llevó a cabo la RT-PCR de un solo paso con los siguientes parámetros (tabla 3) para la amplificación de los genes de: α MHC, colagena I, GATA4, pleiotropina, troponina T y como gen constitutivo GAPDH. Los oligos utilizados se muestran en la tabla 4. La expresión se verificó mediante la visualización de los productos de PCR en gel de agarosa al 2%, finalmente se midió la densidad de las bandas obtenidas en la RT-PCR para obtener los resultados cuantitativos.

Tabla 3. Condiciones utilizadas en la RT-PCR.		
Etapa	Temperatura	Tiempo
Transcripción Reversa	45°	45 min
Desnaturalización inicial	94°	2 min
Desnaturalización*	94°	30 seg
Hibridación*	50°	1 min
Extensión*	68°	2 min
*Esta programación se repitió por 40 ciclos		
Extensión final	68°	10 min
Preservación	4°	∞

Tabla 4. Secuencias de oligos utilizados en la RT-PCR.	
Nombre	Secuencia
Pleiotropina	Fw: 5'-GGATGACCCCAAATAGC-3' Rv: 5'-GAAAGGCAGGATGATGACC-3'
GAPDH	FW: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3' RV: 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
Colágena I	Fw: 5'-AAAGAAGACCACCACCAAATTCC-3' Rv: 5'-TAGTCATAGTTCCCGATGC-3'
Troponina T	Fw: 5'-GCGGAAGAGTGGGAAGAGACA-3' Rv: 5'-CCACAGCTCCTTGGCCTTCT-3'
α MHC	Fw: 5'-GATGCCCAGATGGCTGACTT-3' Rv: 5'-GGTCAGCATGGCCATGTCCT-3'
GATA4	Fw: 5'-CTGTGCCAACTGCCAGAC-3' Rv: 5'-TGATGTCTGACTGACAGGAGATG-3'

6.10 Análisis estadístico

Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se muestran como figuras representativas o como promedios \pm desviación estándar. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías y la prueba post Tukey para determinar la significancia estadística de los resultados, considerándose como significativo un $p < 0,05$. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism 7.

7. RESULTADOS

7.1. Síntesis y caracterización fisicoquímica de los andamios electrohilados de PVA

El uso de andamios electrohilados de PVA en la ingeniería de tejido cardiaco debe cumplir con ciertos requerimientos, uno de los más importantes es la morfología y el diámetro de las fibras. Para poder cumplir con este requerimiento se realizaron diferentes ensayos para establecer las condiciones adecuadas de electrohilado, así como la concentración adecuada del polímero.

Se utilizó microscopia electrónica de barrido (MEB) para observar la morfología y el diámetro de las fibras de los andamios. Las micrografías nos permitieron observar que con las condiciones utilizadas para la síntesis como: 15 kV, 15 cm de distancia entre la punta de la aguja y el colector, una velocidad de flujo de 0.7 ml/hr y una solución de PVA al 5% se pueden obtener andamios fibrilares (figura 8) con diámetros que van de 25 a 250 nm y un promedio de fibra de 104 nm (figura 9).

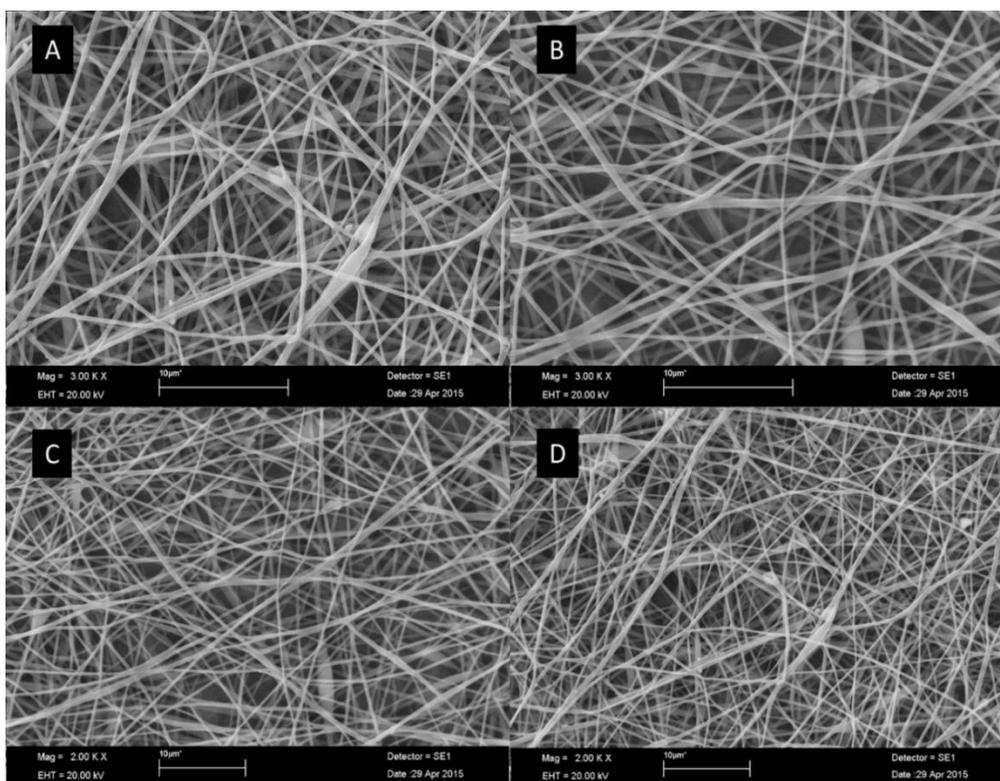


Figura 8. Micrografías de MEB de los andamios electrohilados de PVA al 5%. A y B muestran los andamios electrohilados de PVA a un aumento de 3000X. C y D muestran los andamios electrohilados de PVA a 2000X.

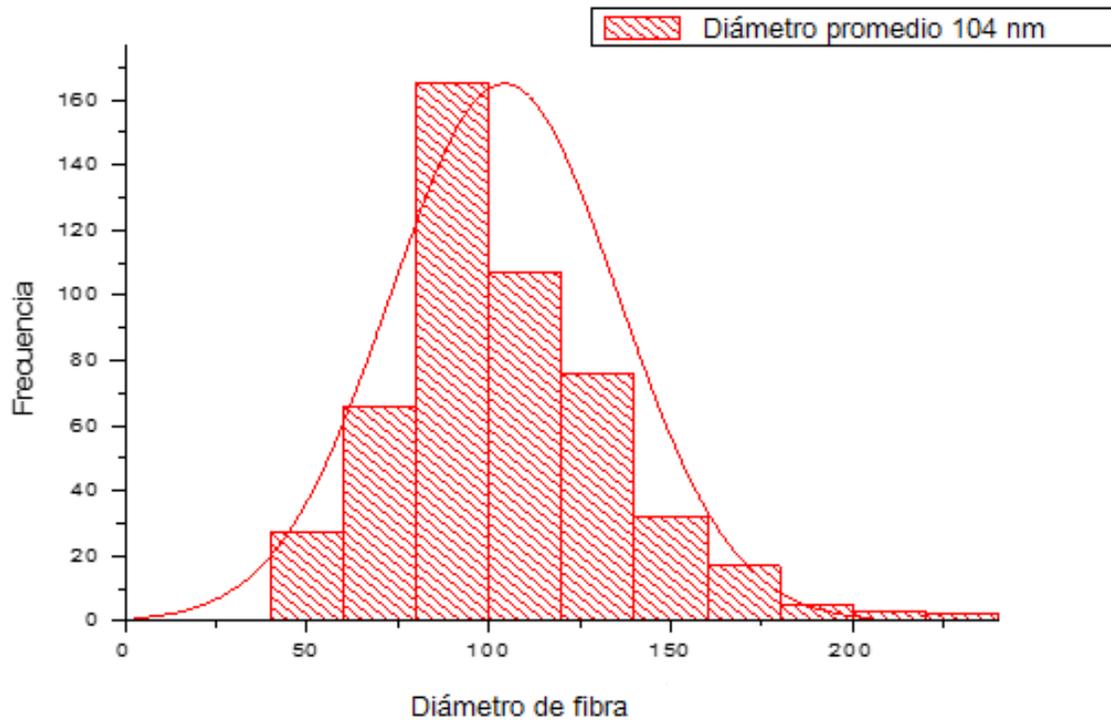


Figura 9. Histograma que muestra la distribución y el diámetro promedio de los andamios electrohilados de PVA al 5%.

A través de uso de la MFA logramos obtener información acerca de la topografía superficial de los andamios electrohilados de PVA. En la figura 10 podemos observar la topografía de dos fibras de PVA electrohilado cuyas dimensiones en el eje Z son aproximadamente de 300 y 600 nm.

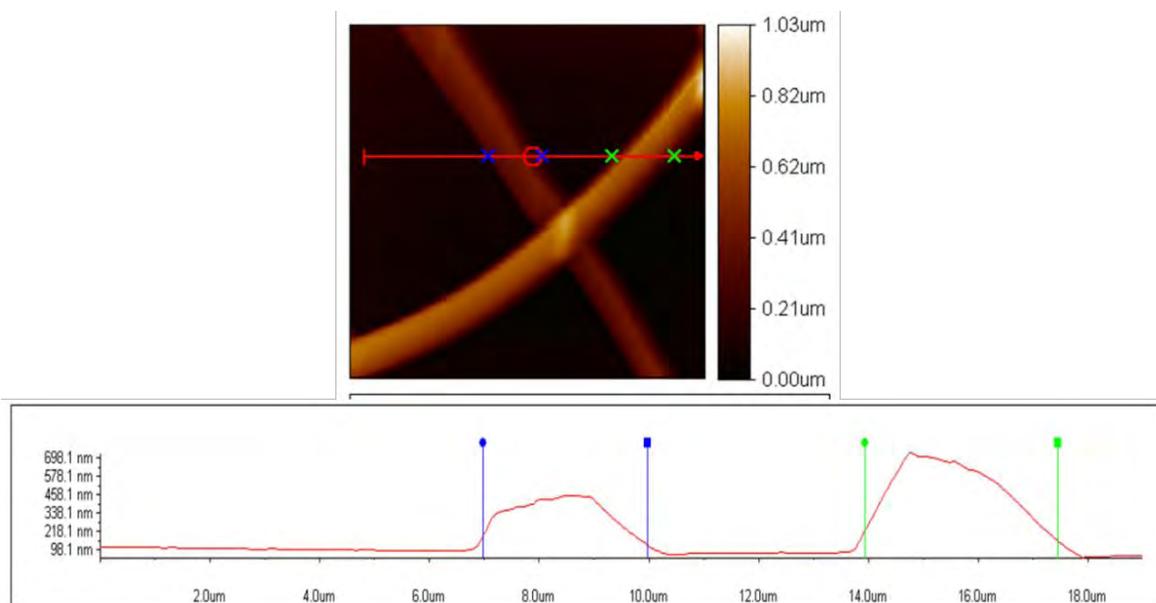


Figura 10. Micrografía de MFA donde se muestran los patrones de rugosidad de los andamios electrohilados de PVA.

Los resultados del análisis de espectroscopia infrarroja nos permiten observar las bandas características de los grupos funcionales del PVA. La banda presente en los rangos de $3,550\text{--}3,200\text{ cm}^{-1}$ corresponde a los grupos O-H, en los rangos $2,840\text{--}3,000\text{ cm}^{-1}$ se encuentran los grupos C-H, en los rangos $1,750\text{--}1,735\text{ cm}^{-1}$ se encuentran los grupos C=O, en $1,141\text{ cm}^{-1}$ están los grupos C-O, la banda presente en el rango de $1,150\text{--}1,085\text{ cm}^{-1}$ corresponde a los grupos C-O-C y finalmente la banda en el rango de $1,461\text{--}1,417\text{ cm}^{-1}$ corresponde a los grupos CH_2 (Mansur, *et al.*, 2008) con lo cual pudimos comprobar que la técnica de electrohilado no afectó la estructura química del polímero (figura 11).

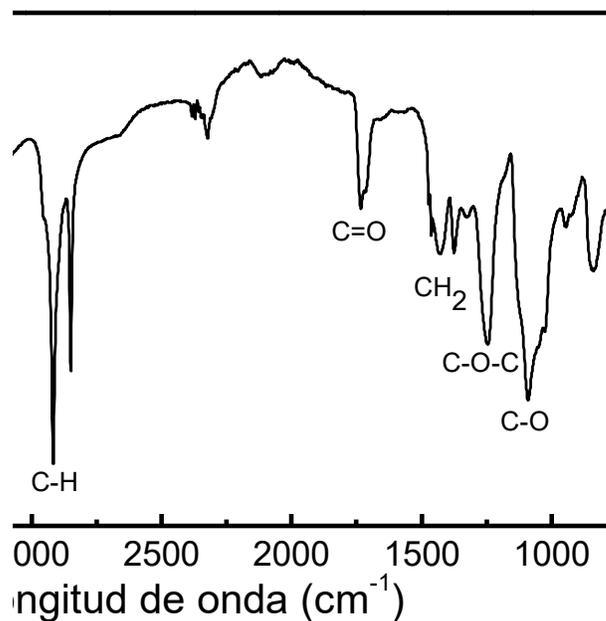


Figura 11. Espectro IR de los andamios electrohilados de PVA. Se muestran las bandas de los enlaces característicos del PVA.

Una vez obtenidos los andamios electrohilados de PVA con las características adecuadas fue necesario probar diferentes procesos de entrecruzamiento que nos permitiera evitar la rápida degradación del polímero en solución acuosa. Se utilizaron dos métodos de entrecruzamiento físico, los andamios se entrecruzaron utilizando isopropanol o metanol. Con la finalidad de verificar que los métodos de entrecruzamiento no afectaran la estructura química de los andamios obtenidos, estos también se sometieron a análisis de espectroscopia Raman (figura 12).

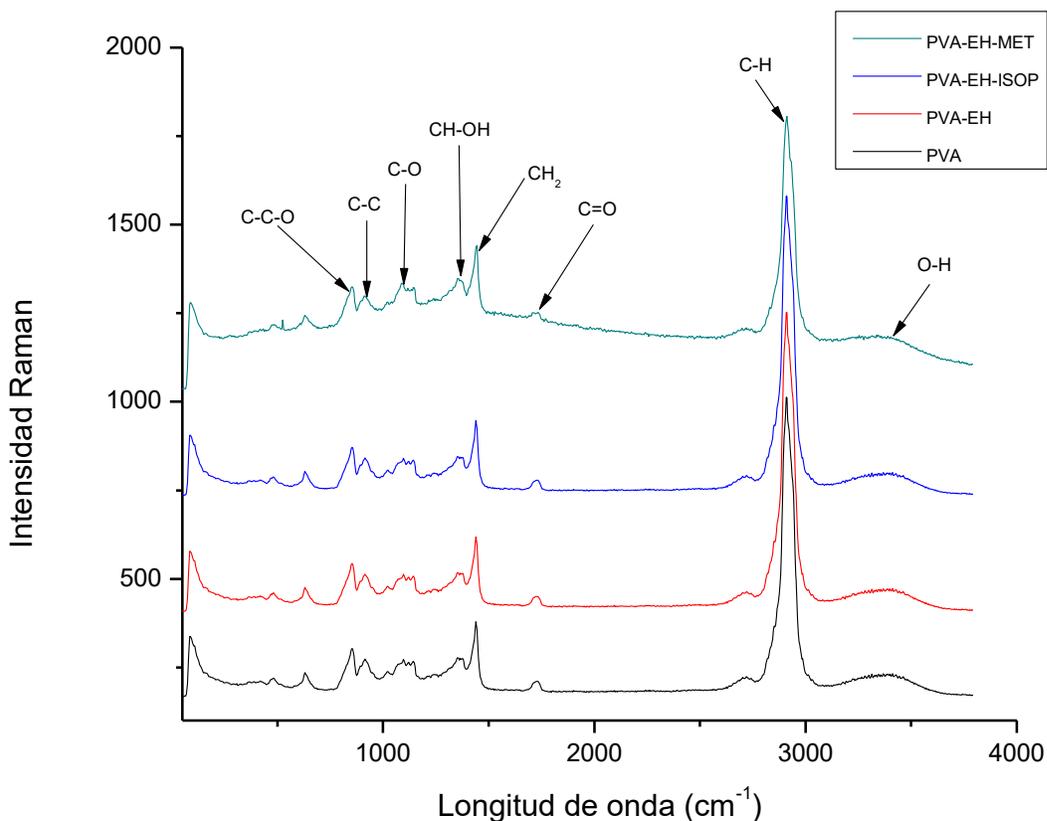


Figura 12. Espectro Raman del PVA sin tratamiento (PVA), del PVA electrohilado sin entrecruzar (PVA-EH), del PVA electrohilado y entrecruzado con isopropanol (PVA-EH-ISOP) y del PVA electrohilado y entrecruzado con metanol (PVA-EH-MET).

7.2. Degradación de los andamios electrohilados de PVA

Con la finalidad de evaluar cual método de entrecruzamiento permitía retardar la degradación de los andamios de PVA, se realizó el ensayo de degradación a los 15, 30, y 45 min. Se utilizaron dos medios de degradación (PBS y colagenasa al 0.01%) donde fueron colocados los andamios tratados con diferentes agentes entrecruzantes. Finalmente, los andamios fueron retirados del medio para medir el pH en el medio de degradación y se analizó el medio de degradación a los 45 min por espectroscopia Raman. Como control se utilizaron los andamios electrohilados sin entrecruzar.

Después de someter estos andamios al proceso de degradación pudimos observar diferencias en la presencia de algunas bandas, lo cual relacionamos con la presencia de ciertos grupos funcionales del PVA en el medio de degradación.

Para los andamios degradados en PBS se puede observar la presencia de bandas correspondientes a los enlaces C-H, CH₂ y C-C lo cual relacionamos con la presencia de moléculas de PVA en el medio de degradación, también pudimos observar que existe una mayor intensidad de las bandas mencionadas en los andamios sin entrecruzar, lo cual está relacionado a un proceso de degradación más rápido en estos andamios (PVA-EH). Por lo anterior pudimos deducir que los métodos de entrecruzamiento utilizados nos permitieron retardar la degradación de los andamios electrohilados de PVA en PBS (figura 13).

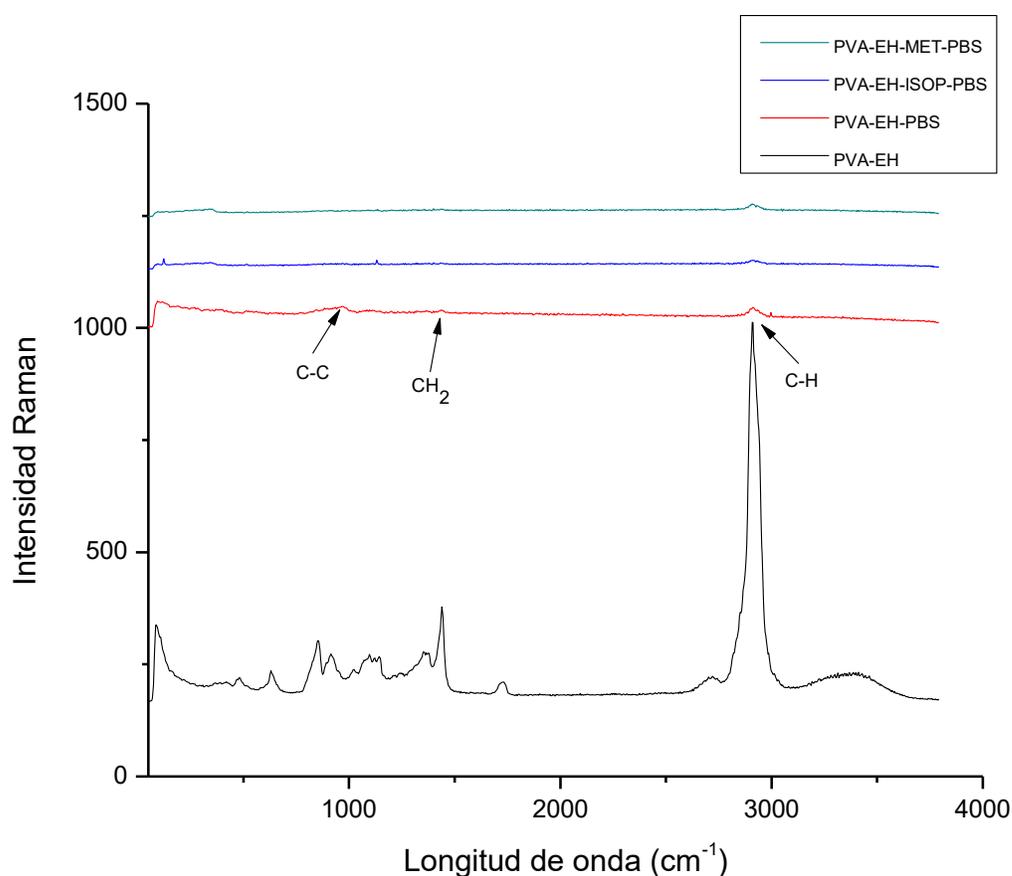


Figura 13. Espectro Raman del medio de degradación de los andamios de PVA degradados en PBS. PVA electrohilado sin entrecruzar (PVA-EH); PVA electrohilado sin entrecruzar y degradado en PBS (PVA-EH- PBS); PVA electrohilado, entrecruzado con isopropanol y degradado en PBS (PVA-EH-ISOP- PBS); PVA electrohilado, entrecruzado con metanol y degradado en PBS (PVA-EH-MET- PBS).

En los andamios degradados en colagenasa al 0.01% se observó que la degradación es más rápida en los andamios sin entrecruzar ya que no se obtuvo ningún espectro, además de que los andamios se disolvieron completamente a los 45 minutos de incubación en colagenasa al 0.01%, lo que relacionamos con una degradación total de la molécula polimérica de PVA. Para el caso de los andamios entrecruzados se observa la presencia de bandas correspondientes a los grupos: C-H, CH₂, C-O y C-C-O, lo que nos indica la presencia de moléculas del PVA en el medio de degradación (figura 14).

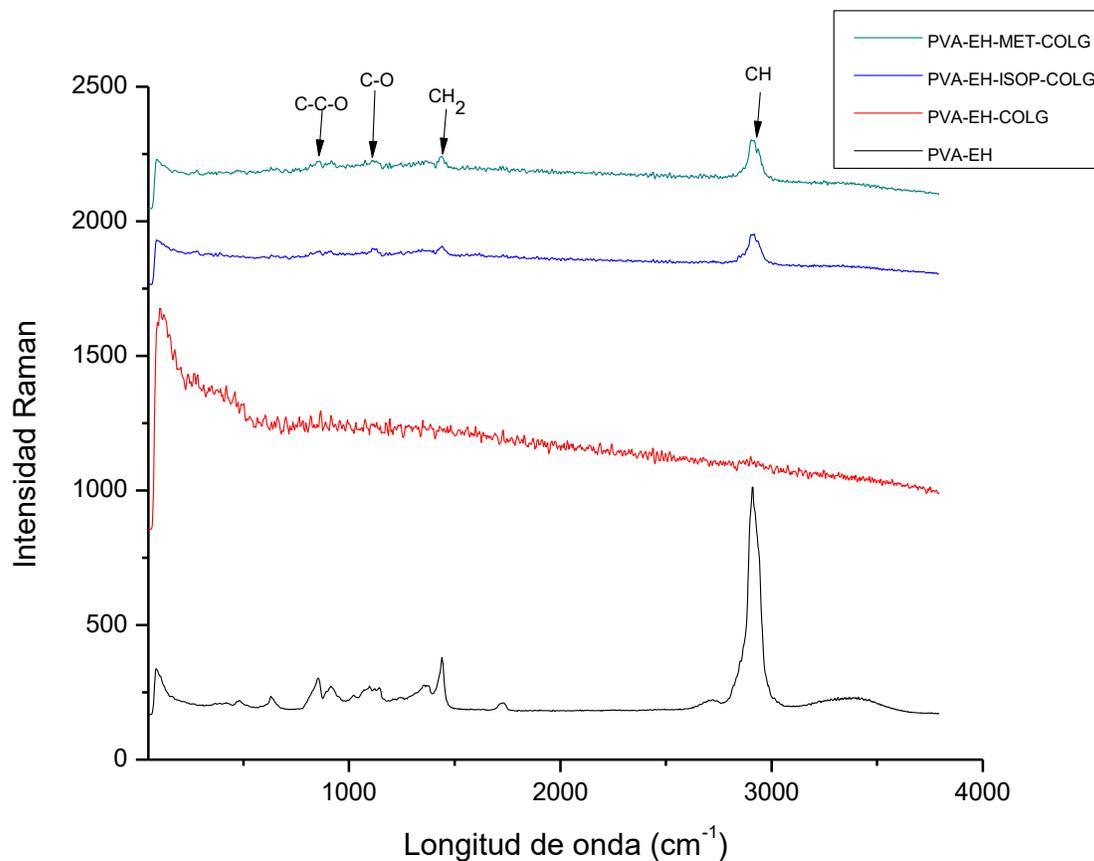


Figura 14. Espectro Raman del medio de degradación de los andamios de PVA degradados en colagenasa al 0.01%. PVA electrohilado sin entrecruzar (PVA-EH); PVA electrohilado sin entrecruzar y degradado en colagenasa (PVA-EH-COLG); PVA electrohilado, entrecruzado con isopropanol y degradado en colagenasa (PVA-EH-ISOP- COLG); PVA electrohilado, entrecruzado con metanol y degradado en colagenasa (PVA-EH-MET- COLG).

Asimismo, se midió el pH de los medios de degradación a los diferentes tiempos evaluados, con la finalidad de saber cómo se iba modificando el pH de los medios en el proceso de degradación debido a que estos cambios de pH podrían modificar la respuesta biológica de los cardiomiocitos embrionarios.

En la figura 15 se puede observar como el pH del PBS tiende a disminuir conforme aumenta en tiempo de degradación. En los andamios que no están entrecruzados se observa una acidificación mayor y más rápida del pH, mientras que en los andamios entrecruzados con isopropanol o metanol el medio es menos ácido y los valores de pH son muy similares, lo cual podría estar relacionado con un proceso de degradación más lento en los andamios entrecruzados. La acidificación del medio podría deberse a los grupos que se liberan del PVA hacia el medio de degradación.

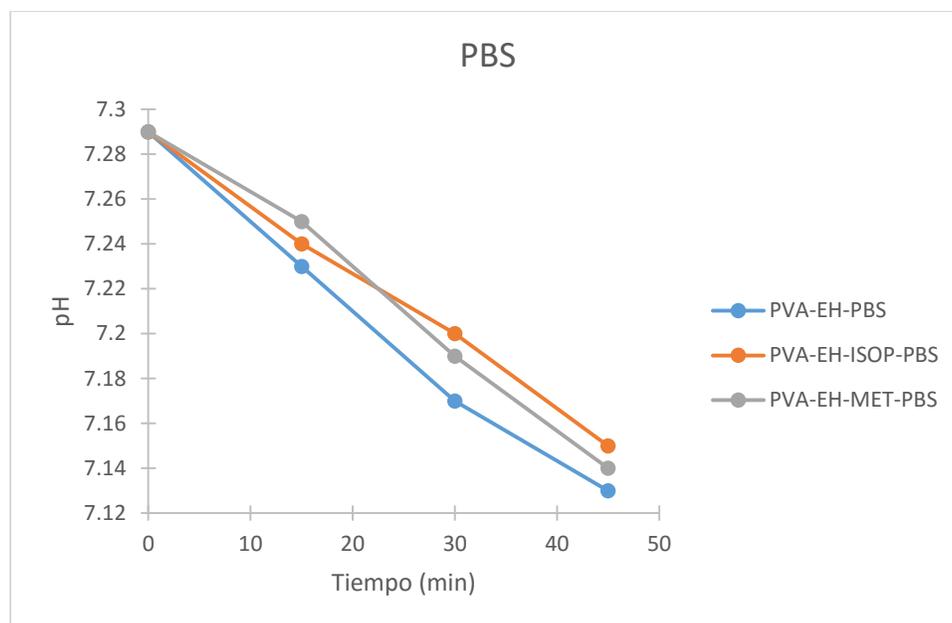


Figura 15. Ensayo de degradación a los 15, 30 y 45 min. pH del medio de degradación (PBS) de los andamios de PVA sin entrecruzar (PVA-EH-PBS), de los andamios de PVA entrecruzados con isopropanol (PVA-EH-ISOP-PBS) y de los andamios entrecruzados con metanol (PVA-EH-MET-PBS).

En la figura 16 se puede observar que los grupos de andamios presentan un comportamiento diferente. En los andamios sin entrecruzar el pH disminuye hasta los 30 min y a los 45 min se estabiliza. Para los andamios entrecruzados con isopropanol el pH se mantiene a los 15 min, sin embargo a tiempos mayores el pH sigue una tendencia a disminuir. Los andamios entrecruzados con metanol a los 15 min aumentan el pH del medio, mientras que a los 30 disminuye y a los 45 min se mantiene.

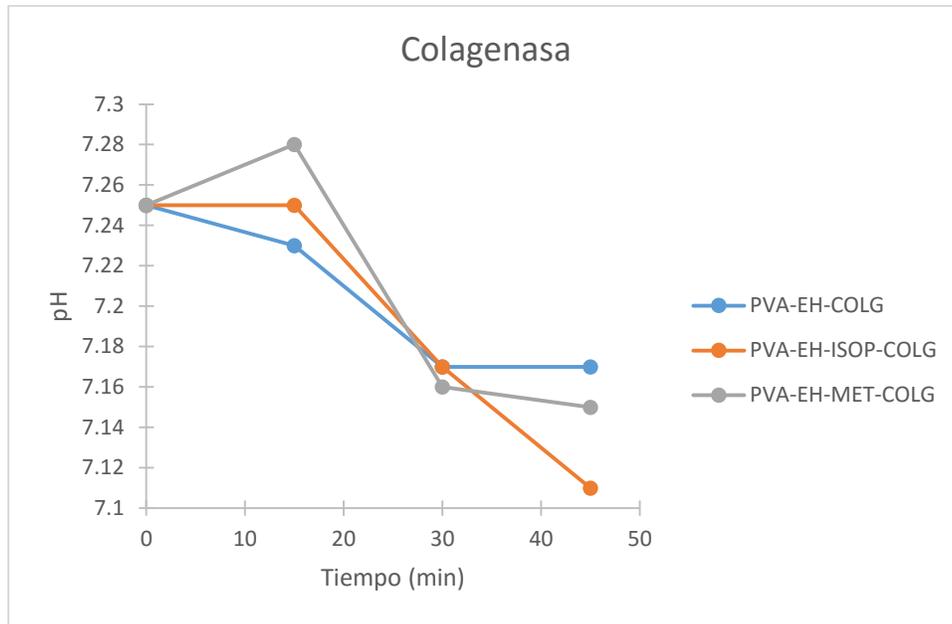


Figura 16. Ensayo de degradación de los andamios electrohilados de PVA en colagenasa al 0.01%, a los 15, 30 y 45 min. pH del medio de degradación de los andamios de PVA sin entrecruzar (PVA-EH-COLG), de los andamios de PVA entrecruzados con isopropanol (PVA-EH-ISOP-COLG) y de los andamios entrecruzados con metanol (PVA-EH-MET-COLG).

7.3. Adhesión celular

Después de la caracterización fisicoquímica de los andamios electrohilados de PVA, se realizó la caracterización biológica, la cual consistió en ensayos de adhesión, proliferación, interacción célula-material y expresión de moléculas específicas de tejido cardíaco.

Para evaluar si nuestros andamios eran capaces de promover la adhesión de los cardiomiocitos embrionarios de rata (H9c2), se realizó el ensayo de cristal violeta, el cual es un método que indirectamente nos permite medir colorimétricamente las células adheridas.

Se evaluó la adhesión a 2, 4, 6, y 24 horas de cultivo sobre los andamios electrohilados de PVA entrecruzados con metanol (M) o entrecruzados con isopropanol (I), como control positivo se utilizó el plato de cultivo y como control negativo una película delgada de PVA a la que nombramos film (figura 17). Se puede observar que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el control (Film: película delgada de PVA) y el andamio electrohilado de PVA, en los andamios entrecruzados con metanol a las dos horas de cultivo, a las 4 horas esta diferencia ya no se mantiene, sin embargo a las 8 horas la

diferencia vuelve a hacerse significativa y se mantiene hasta las 24 horas haciéndose más evidente. Cuando se compararon los andamios entrecruzados con isopropanol con su control negativo pudimos observar que se presenta una diferencia significativa hasta las 4 horas, mientras que a las 6 horas esta diferencia ya no se presenta. Sin embargo a las 24 horas la diferencia se hace más evidente.

Por otra parte no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los andamios electrohilados de PVA entrecruzados con metanol y los entrecruzados con isopropanol en ningún tiempo evaluado. Sin embargo, a las 24 horas de cultivo se puede observar una tendencia de aumento en la adhesión en los andamios entrecruzados con isopropanol, teniendo valores de adhesión cercanos a los que se presentaron en las células sembradas sobre el plato de cultivo.

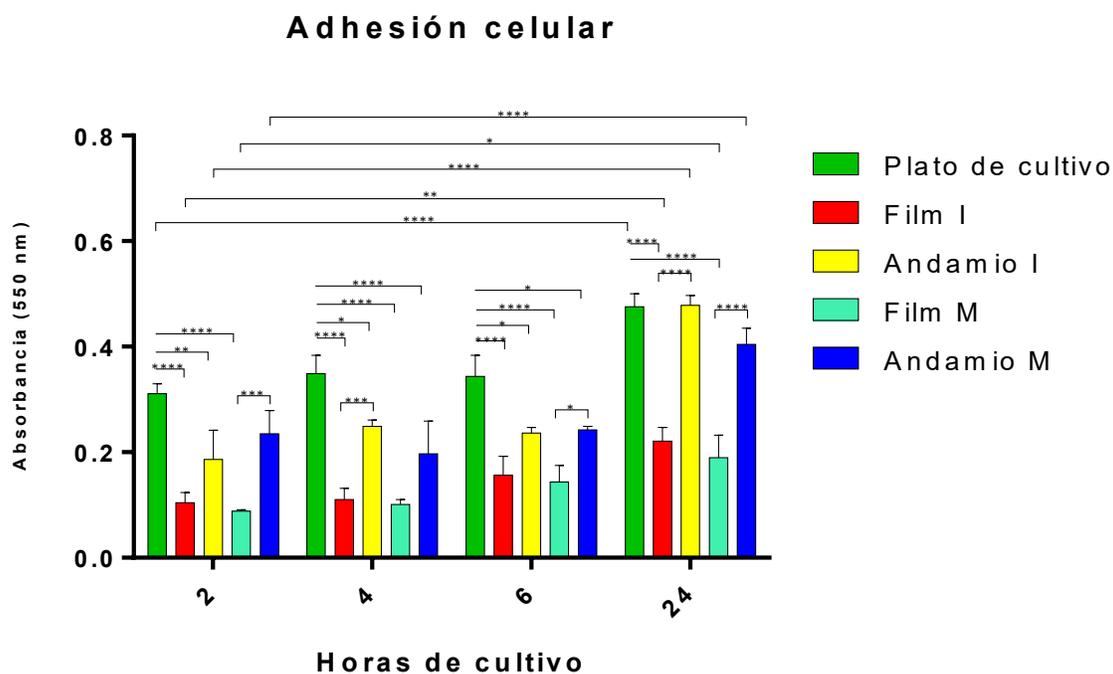


Figura 17. Adhesión celular de cardiomiocitos H9c2 a las 2, 4, 6 y 24 horas de cultivo sobre los andamios electrohilados de PVA entrecruzados con isopropanol (Andamio I), entrecruzados con metanol (Andamio M) y sus respectivos controles. Film I (tratado con isopropanol) y Film M (tratado con metanol). Como control positivo se utilizó el plato de cultivo. ANOVA de dos vías y post Tukey. ($p < 0.05$). $p < 0.0001$ (****); $p < 0.001$ (***); $p < 0.01$ (**) y $p < 0.05$ (*).

7.4. Proliferación celular

Se evaluó la proliferación de los cardiomiocitos H9c2 sembrados sobre los andamios electrohilados de PVA utilizando el ensayo de CCK-8, el cual es un método colorimétrico que nos permite evaluar la proliferación celular de manera indirecta a través de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial. Se realizaron ensayos de proliferación a los 3, 5, y 7 días de cultivo. La figura 18 muestra que al tercer día de cultivo se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre los andamios entrecruzados con isopropanol y su control (Film I), siendo la proliferación mayor en los andamios electrohilados de PVA entrecruzados con isopropanol. En el día 5 esta diferencia ya no se mantuvo. Sin embargo pudimos observar una diferencia más evidente entre los andamios entrecruzados metanol y su respectivo control en el mismo día. Para el día 7 ya no se observa una diferencia estadísticamente significativa en ningún grupo, solo se observa una tendencia a aumentar la proliferación en los andamios entrecruzados con metanol.

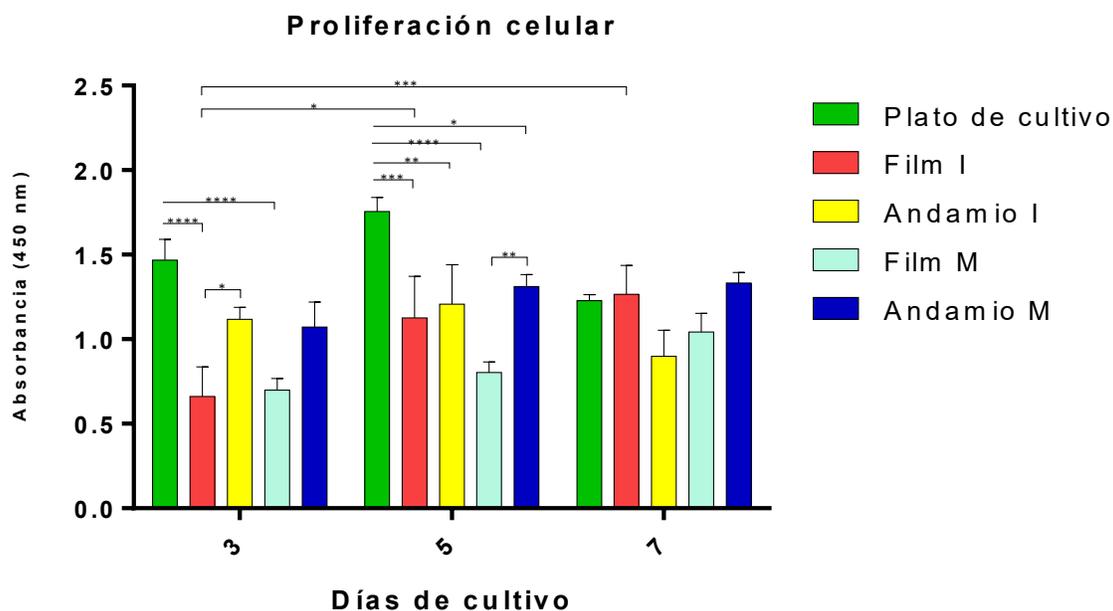


Figura 18. Proliferación de células H9c2 al ser cultivadas sobre andamio electrohilados de PVA a los 3, 5 y 7 días. Andamio I (Andamio entrecruzado con isopropanol), Andamio M (andamio entrecruzado con metanol), Film I (Película delgada tratada con isopropanol), Film M (Película delgada tratada con metanol). Como control positivo se utilizó el plato de cultivo. ANOVA de dos vías y post Tukey. ($p < 0.05$). $p < 0.0001$ (****); $p < 0.001$ (***); $p > 0.01$ (**) y $p < 0.05$ (*).

7.5. Interacción célula-material

Los cardiomiocitos embrionarios de rata fueron cultivados sobre los andamios electrohilados de PVA para conocer de qué manera estaban interactuando las células con el andamio, con esta finalidad se utilizó el ensayo de cell tracker, en el cual las células son teñidas para poder observar su morfología. En la figura 19 podemos observar como los cardiomiocitos embrionarios de rata se encuentran adheridos a los andamios de PVA y presentan un ligero alargamiento del núcleo y de la membrana celular.

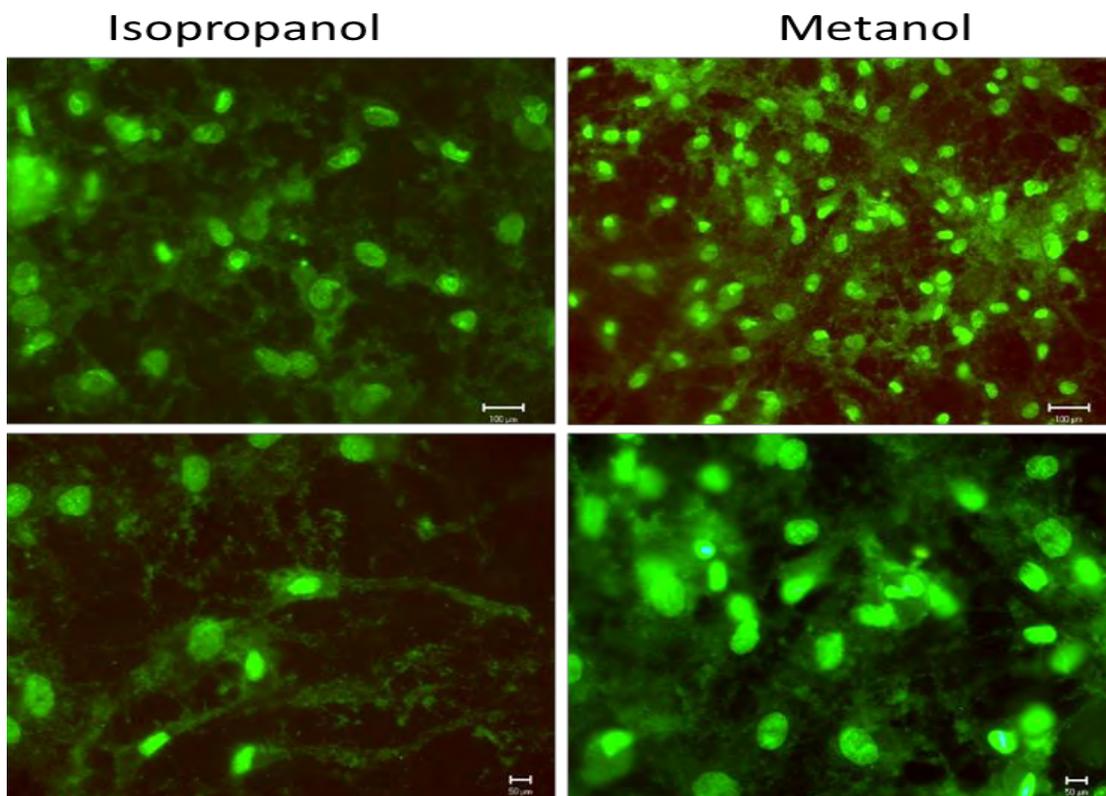


Figura 19. Micrografía de microscopia de fluorescencia que muestra las células cardiacas embrionarias de rata (H9c2) cultivadas sobre los andamios entrecruzados con isopropanol y metanol.

7.6. Expresión de moléculas específicas de tejido cardiaco

Se analizó si las células cultivadas sobre los andamios electrohilados de PVA expresaban las moléculas específicas de tejido muscular cardiaco, con esta finalidad, las células fueron sembradas sobre los andamios electrohilados de PVA entrecruzados con metanol o

isopropanol, para posteriormente evaluar la expresión de los genes de α MHC, colágena I, GATA4, pleiotrofina y troponina T. Como se puede observar en la figura 20, existe una mayor expresión de los genes de α MHC, pleiotrofina, troponina T y GATA4 en los cardiomiocitos embrionarios sembrados sobre los andamios de PVA entrecruzados con metanol. Mientras que la expresión de colágena I en ambos andamios fue muy similar.

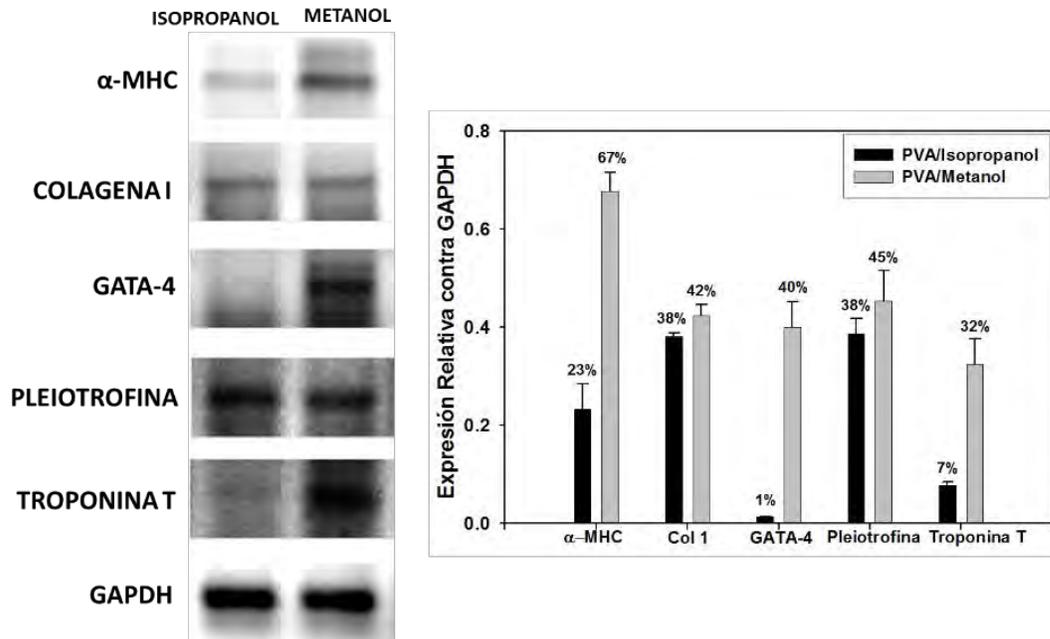


Figura 20. Expresión de moléculas específicas de tejido muscular cardíaco. α MHC (α miosina de cadena pesada), Col I (colágena I), GATA-4, pleiotrofina y troponina T en los andamios de PVA entrecruzados con isopropanol y en los andamios entrecruzados con metanol.

8. DISCUSIÓN

La ingeniería de tejidos es una disciplina reciente, cuyo objetivo es la regeneración y/o curación de los tejidos dañados. Su aplicación se basa en la utilización de andamios que nos permitan mimetizar las características de la MEC del tejido que se pretende tratar. Existen una serie de características con las que el andamio debe cumplir, entre ellas se encuentra la topografía, para el caso de tejido cardiaco se busca obtener una matriz fibrilar, con diámetros de fibra nanométricos, esto debido a que la MEC nativa del miocardio está compuesta principalmente de fibras de colágena tipo I y III cuyos diámetros van de 10 nm a 300 nm (Hein y Schaper, 2001) En el presente trabajo se obtuvieron andamios fibrilares de PVA con diámetros de fibra de 30 a 250 nm, estos diámetros nos permitieron imitar las características topográficas de la MEC del miocardio, además de que se ha observado que los andamios con estas características permiten tener un área de contacto mayor y permiten un flujo adecuado de nutrientes (Pham *et al.*, 2006).

Para poder obtener los andamios con un diámetro de fibra en rangos nanométricos se utilizó la técnica de electrohilado, se ha reportado el uso de esta técnica empleando diversos polímeros, que van desde los polímeros naturales hasta los polímero sintéticos (Bhardwaj y Kundu, 2010). Risdian *et al.*, en 2015 reportaron la obtención de fibras de PVA con diámetro promedio de 294 nm; para este trabajo se obtuvieron fibras con diámetro promedio de 104 nm, lo cual nos indica que modificando los parámetros del electrohilado podemos disminuir significativamente los diámetros de fibra de los andamios electrohilados PVA.

Una característica muy importante del PVA es su alta hidrofiliidad, esta propiedad está relacionada con una rápida degradación del PVA en medio acuoso, por lo tanto, fue necesario buscar un método que nos permitiera retardar la degradación del PVA y que no afectara su estructura química. Se ha reportado que el entrecruzamiento de fibras electrohiladas de PVA puede evitar la rápida degradación de las mismas. El entrecruzamiento del PVA puede ser físico o químico. Shaikh *et. al.*, 2012 reportaron que el entrecruzamiento químico con glutaraldehido retarda considerablemente la degradación del PVA, sin embargo cierto grado de toxicidad está relacionado con residuos del agente entrecruzante. Dentro de las ventajas de un entrecruzamiento físico, se encuentran: la no modificación de la estructura química del polímero y la baja toxicidad. Linh y Lee en 2012; y Yao *et al.*, en 2003 reportaron el entrecruzamiento físico de PVA con metanol. Mientras que Alves *et al.*, en 2011 reportaron una degradación más lenta de fibras de PVA, al entrecruzarlas físicamente con isopropanol. Considerando lo anterior decidimos evaluar

ambos métodos de entrecruzamiento, y efectivamente el tratamiento con estos agentes entrecruzantes no modificó la estructura química del PVA como lo pudimos observar a través de la espectroscopia Raman. En los ensayos de degradación pudimos observar que el entrecruzamiento con isopropanol o metanol permitió retardar la degradación de los andamios, sin embargo; se observó una disminución del pH en el medio de degradación, siguiendo una tendencia a la disminución, lo cual podría tener implicaciones en el comportamiento de las células al ser sembradas sobre los andamios, por lo tanto decidimos evaluar ambos andamios en los ensayos biológicos.

Después de verificar que nuestros andamios conservaran las características físicas y químicas adecuadas, fue necesario realizar ensayos biológicos que nos permitieran saber si estos andamios promovían la adhesión, proliferación y expresión de moléculas específicas del miocardio. En el caso de la adhesión celular se pudo ver una preferencia de los cardiomiocitos embrionarios de rata por los andamios electrohilados de PVA al compararlos con los film de PVA, esto está relacionado con la capacidad de las células de reconocer superficies con topografía fibrilar (Gupta *et al.*, 2014). Sin embargo no se puede observar una preferencia de los cardiomiocitos a adherirse a alguno de los dos tipos de andamios (entrecruzados con isopropanol o entrecruzados con metanol).

En los ensayos de proliferación observamos que a los 3 días de cultivo los andamios electrohilados y entrecruzados con isopropanol promueven una mayor proliferación al ser comparados con los films tratados con isopropanol, sin embargo al día 5 los andamios electrohilados de PVA y entrecruzados con isopropanol inhiben la proliferación celular, esto podría estar relacionado con una disminución del pH del medio debido a la degradación del PVA, como se observó en los ensayos de degradación. Esta disminución en la proliferación también podría deberse a una modificación en la estructura física del andamio al momento de entrar en contacto con el medio de cultivo, de modo que se podría estar inhibiendo el flujo adecuado de nutrientes, debido a que esta tendencia en la disminución de la proliferación se conserva hasta el día 7 de cultivo y no se observa el mismo comportamiento en los cardiomiocitos sembrados sobre el film tratado con isopropanol. Por otra parte los andamios de PVA entrecruzados con metanol que en el día 3 no muestra una diferencia significativa en los niveles de proliferación al ser comparado con el film, al día 5 si muestra una diferencia significativa y a pesar que al día 7 de cultivo esta diferencia ya no es significativa se mantienen niveles de proliferación muy similares a los observados en estos mismos andamios al día 5 de cultivo, lo cual podría deberse a que en día 7 se ha detenido

el proceso de proliferación. Tomando en cuenta estos resultados la mejor opción son los andamios entrecruzados con metanol, ya que desde el día 3 hasta el día 7 conserva una tendencia a promover una mayor proliferación celular. Sin embargo para tener unos resultados más contundentes proponemos evaluar tiempos más prolongados de cultivo.

Otro punto importante que se evaluó en el presente trabajo fue la capacidad de los cardiomiocitos embrionarios de rata de expresar moléculas específicas de tejido cardiaco, estas moléculas están relacionadas con la funcionalidad celular. La α -MHC es un gen específico de cardiomiocitos que participa en la contracción. La troponina T cardiaca forma parte del complejo troponina y participa en el proceso de contracción permitiendo la unión actina-miosina (Streng *et al.*, 2013). La colágena I forma parte de la MEC de tejido cardiaco y provee el soporte necesario para la contracción (Hein *et al.*, 2001). GATA4 es un factor de transcripción implicado en la diferenciación y función del miocardio (Chen *et al.*, 2016). Mientras que la pleiotrofina es un factor de crecimiento que se ha visto relacionado con la formación de nuevas uniones neuromusculares (Chen *et al.*, 2004). Dentro de nuestros resultados podemos observar que existe una menor expresión de α MHC, troponina T, pleiotrofina y GATA4 en los andamios entrecruzados con isopropanol lo cual se correlaciona con la disminución en la proliferación observada en estos mismos andamios que podría deberse a la muerte de los cardiomiocitos embrionarios. Sin embargo la expresión de colágena I no mostró una gran diferencia de expresión entre los andamios entrecruzados con isopropanol y los andamios entrecruzados con metanol lo cual podría deberse a que las células sembradas sobre los andamios entrecruzados con isopropanol están sometidas a un estrés y reaccionan aumentando la síntesis de colágenas, como sucede en la remodelación patológica del miocardio.

Con la finalidad de verificar que los cardiomiocitos se encontraban adheridos a nuestros andamios y evaluar la interacción entre los andamios y los cardiomiocitos se realizó el ensayo de cell-tracker, al momento de su observación en el microscopio de fluorescencia pudimos observar que efectivamente, los cardiomiocitos se encuentran adheridos a los andamios, al mismo tiempo se puede observar un ligero alargamiento del núcleo y del citoplasma de los cardiomiocitos, esto está implicado dentro de los cambios morfológicos que presentan las células como respuesta a patrones topográficos, Aubin *et al* en 2010; evaluaron la respuesta de mioblastos murinos a patrones topográficos fibrilares en andamios de gelatina para aplicaciones en la ingeniería de tejido de músculo cardiaco, donde pudieron observar que el alargamiento de núcleo y citoplasma en los mioblastos

están relacionados con un aumento en la síntesis de DNA, lo que promueve la función celular. En el presente trabajo, para los ensayos biológicos se utilizaron cardiomiocitos embrionarios de rata, una línea celular establecida, debido a que estas células son de fácil manejo además de que son el modelo *in vitro* más utilizado para daño cardíaco y se ha visto que presenta características muy similares a los cardiomiocitos adultos como son algunas vías de señalización y propiedades electrofisiológicas (Hescheler *et al.* 1991). Watkins *et al.* 2011; no encontraron diferencias a nivel morfológico y de expresión de genes entre cardiomiocitos adultos y las células H9c2 al utilizarlas en un modelo de hipertrofia cardíaca, por lo que validaron su uso como modelo cardíaco *in vitro* a pesar de que las últimas no tienen una diferenciación terminal. Otra razón para la utilización de esta línea celular son los resultados que muestran que solo células comprometidas son capaces de formar nuevo miocardio que este acoplado eléctricamente con el corazón hospedero (Laflamme *et al.*, 2007).

Finalmente cabe destacar que a pesar de las limitantes presentes en este trabajo, los resultados obtenidos nos permiten sentar las bases para conocer las características necesarias en los andamios utilizados en la ingeniería de tejido cardíaco. Como perspectivas se propone la utilización de sistemas que nos permitan tener una visión más completa de la respuesta celular sobre los andamios de PVA, como sería la utilización de moléculas de señalización que nos permitiera potenciar la función celular. También sería interesante evaluar la respuesta celular utilizando biorreactores que nos permitieran tener un flujo dinámico de nutrientes, estímulos mecánicos y eléctricos constantes. Teniendo resultados positivos utilizando estos sistemas sería necesario evaluar la respuesta a la implantación de estos andamios en un modelo de hipertrofia cardíaca *in vivo* como podría ser un modelo utilizando ratas.

9. CONCLUSIONES

- La técnica de electrohilado nos permitió obtener andamios fibrilares de PVA con un diámetro promedio de fibra de 104 nm, sin modificar la estructura química del PVA.
- El entrecruzamiento de los andamios de PVA con isopropanol o metanol permite retardar el proceso de degradación sin modificar la estructura química del polímero.
- La degradación de los andamios de PVA es más rápida en colagenasa al 0.01% que en PBS.
- Los cardiomiocitos muestran una preferencia por adherirse a los andamios nanofibrilares de PVA sin importar el agente de entrecruzamiento utilizado.
- Los andamios electrohilados de PVA y entrecruzados con metanol muestran una tendencia a aumentar la proliferación en tiempos prolongados de cultivo.
- La expresión de α MHC, troponina T, pleiotrofina y GATA4 fue mayor en los andamios de PVA entrecruzados con metanol.
- Los cardiomiocitos muestran un ligero alargamiento celular al ser sembrados sobre los andamios electrohilados de PVA.
- Se observó una mejor respuesta biológica en los andamios electrohilados de PVA entrecruzados con metanol.

10. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, J. y Garabito, R. (2008). Infarto agudo de miocardio. *Revista Paceyña de Medicina Familiar*, 5(8), 102-114.

Akhyari, P., Fedak, P. W., Weisel, R. D., Lee, T. Y. J., Verma, S., Mickle, D. A., y Li, R. K. (2002). Mechanical stretch regimen enhances the formation of bioengineered autologous cardiac muscle grafts. *Circulation*, 106 (12 suppl 1), I-137.

Alves, M. H., Jensen, B. E., Smith, A. A., y Zelikin, A. N. (2011). Poly (vinyl alcohol) physical hydrogels: new vista on a long serving biomaterial. *Macromolecular bioscience*, 11 (10), 1293-1313.

Aubin, H., Nichol, J. W., Hutson, C. B., Bae, H., Sieminski, A. L., Cropek, D. M., y Khademhosseini, A. (2010). Directed 3D cell alignment and elongation in microengineered hydrogels. *Biomaterials*, 31(27), 6941-6951.

Baker, M. I., Walsh, S. P., Schwartz, Z., y Boyan, B. D. (2012). A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 100 (5), 1451-1457.

Bhardwaj, N., y Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology advances*, 28(3), 325-347.

Chang, W., Mu, X., Zhu, X., Ma, G., Li, C., Xu, F., y Nie, J. (2013). Biomimetic composite scaffolds based mineralization of hydroxyapatite on electrospun calcium-containing poly (vinyl alcohol) nanofibers. *Materials Science and Engineering: C*, 33(7), 4369-4376.

Chandrasekaran, A. R., Venugopal, J., Sundarajan, S., y Ramakrishna, S. (2011). Fabrication of a nanofibrous scaffold with improved bioactivity for culture of human dermal fibroblasts for skin regeneration. *Biomedical Materials*, 6(1), 015001.

Chandy, T., Rao, G. H., Wilson, R. F., y Das, G. S. (2003). The development of porous alginate/elastin/PEG composite matrix for cardiovascular engineering. *Journal of biomaterials applications*, 17(4), 287-301.

Chen, H. W., Yu, S. L., Chen, W. J., Yang, P. C., Chien, C. T., Chou, H. Y., y Chen, J. J. W. (2004). Dynamic changes of gene expression profiles during postnatal development of the heart in mice. *Heart*, 90(8), 927-934.

- Chen, Q. Z., Harding, S. E., Ali, N. N., Lyon, A. R., y Boccaccini, A. R. (2008). Biomaterials in cardiac tissue engineering: ten years of research survey. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 59(1), 1-37.
- Chen, J., Qi, B., Zhao, J., Liu, W., Duan, R., y Zhang, M. (2016). A novel mutation of GATA4 (K300T) associated with familial atrial septal defect. *Gene*, 575(2), 473-477.
- Christman, K. L., Fok, H. H., Sievers, R. E., Fang, Q., Lee, R. J. (2004). Fibrin glue alone and skeletal myoblasts in a fibrin scaffold preserve cardiac function after myocardial infarction. *Tissue engineering*, 10(3-4), 403-409.
- Cleutjens, J. P., Verluyten, M. J., Smiths, J. F., y Daemen, M. J. (1995). Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *The American journal of pathology*, 147(2), 325.
- DeMerlis, C. C., y Schoneker, D. R. (2003). Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology*, 41(3), 319-326.
- Devine, S. M., Peter, S., Martin, B. J., Barry, F., y McIntosh, K. R. (2000). Mesenchymal stem cells: stealth and suppression. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 7, S76-82.
- Drury, J. L., & Mooney, D. J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24(24), 4337-4351.
- Edwards, D., Taylor, L., y Vorster, K. (1997). Anatomy and physiology of the cardiovascular system. *Journal of PeriAnesthesia Nursing*, 12(2), 134-137.
- Eschenhagen, T., Didié, M., Münzel, F., Schubert, P., Schneiderbanger, K., y Zimmermann, W. H. (2002). 3D engineered heart tissue for replacement therapy. *Basic research in cardiology*, 97(1), 1146-1152.
- Gupta, K. C., Haider, A., Choi, Y. R., y Kang, I. K. (2014). Nanofibrous scaffolds in biomedical applications. *Biomaterials research*, 18(1), 1.
- Hassan, C. M., y Peppas, N. A. (2000). Structure and applications of poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. In *Biopolymers: PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites* (pp. 37-65). Springer Berlin Heidelberg.

Hein, S., y Schaper, J. (2001). The extracellular matrix in normal and diseased myocardium. *Journal of Nuclear Cardiology*, 8(2), 188-196.

Hescheler, J. R. S. D. W. G., Meyer, R., Plant, S., Krautwurst, D., Rosenthal, W., y Schultz, G. (1991). Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circulation research*, 69(6), 1476-1486.

Hein, S., y Schaper, J. (2001). The extracellular matrix in normal and diseased myocardium. *Journal of Nuclear Cardiology*, 8(2), 188-196.

Hidber, P. C., Graule, T. J., y Gauckler, L. J. (1995). Competitive adsorption of citric acid and poly (vinyl alcohol) onto alumina and its influence on the binder migration during drying. *Journal of the American Ceramic Society*, 78(7), 1775-1780.

Hosoda, T. (2012). C-kit-positive cardiac stem cells and myocardial regeneration. *American journal of cardiovascular disease*, 2(1), 58.

Hussain, A., Collins, G., Yip, D., y Cho, C. H. (2013). Functional 3-D cardiac co-culture model using bioactive chitosan nanofiber scaffolds. *Biotechnology and bioengineering*, 110(2), 637-647.

Instituto Nacional de Estadísticas Geografía e informática (INEGI). *Estadísticas de Mortalidad*. 2014.

Jiang, Y. (2009). Poly (vinyl alcohol) for biomedical applications (*Doctoral dissertation, Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diss., 2009*).

Kadner, A., Zund, G., Maurus, C., Breymann, C., Yakarisik, S., Kadner, G., y Hoerstrup, S. P. (2004). Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study. *European journal of cardio-thoracic surgery*, 25(4), 635-641.

Kam, L. C., Shen, K., & Dustin, M. L. (2013). Micro-and nanoscale engineering of cell signaling. *Annual review of biomedical engineering*, 15, 305.

Kaneo, Y., Hashihama, S., Kakinoki, A., Tanaka, T., Nakano, T., & Ikeda, Y. (2005). Pharmacokinetics and biodisposition of poly (vinyl alcohol) in rats and mice. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 20(6), 435-442.

Kofidis, T., Akhyari, P., Boublik, J., Theodorou, P., Martin, U., Ruhparwar, A., y Leyh, R. (2002). In vitro engineering of heart muscle: artificial myocardial tissue. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 124(1), 63-69.

- Laflamme, M. A., Gold, J., Xu, C., Hassanipour, M., Rosler, E., Police, S., y Murry, C. E. (2005). Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *The American journal of pathology*, 167(3), 663-671.
- Laflamme, M. A., Zbinden, S., Epstein, S. E., y Murry, C. E. (2007). Cell-based therapy for myocardial ischemia and infarction: pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 2, 307-339.
- Leor, J., Aboulafia-Etzion, S., Dar, A., Shapiro, L., Barbash, I. M., Battler, A., y Cohen, S. (2000). Bioengineered cardiac grafts a new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation*, 102 (suppl 3), Iii-56.
- Leor, J., y Cohen, S. (2004). Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1015 (1), 312-319.
- Li, R. K., Yau, T. M., Weisel, R. D., Mickle, D. A., Sakai, T., Choi, A., y Jia, Z. Q. (2000). Construction of a bioengineered cardiac graft. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 119(2), 368-375.
- Linh, N. T. B., y Lee, B. T. (2012). Electrospinning of polyvinyl alcohol/gelatin nanofiber composites and cross-linking for bone tissue engineering application. *Journal of biomaterials applications*, 27(3), 255-266.
- Liu, W., Thomopoulos, S., y Xia, Y. (2012). Electrospun nanofibers for regenerative medicine. *Advanced healthcare materials*, 1(1), 10-25.
- Manna, U., y Patil, S. (2009). Borax mediated layer-by-layer self-assembly of neutral poly (vinyl alcohol) and chitosan. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(27), 9137-9142.
- Mansur, H. S., Sadahira, C. M., Souza, A. N., y Mansur, A. A. (2008). FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering* ,28(4), 539-548.
- Matsubayashi, K., Fedak, P. W., Mickle, D. A., Weisel, R. D., Ozawa, T., y Li, R. K. (2003). Improved left ventricular aneurysm repair with bioengineered vascular smooth muscle grafts. *Circulation*, 108 (10 suppl 1), II-219.

- McDevitt, T. C., Woodhouse, K. A., Hauschka, S. D., Murry, C. E., y Stayton, P. S. (2003). Spatially organized layers of cardiomyocytes on biodegradable polyurethane films for myocardial repair. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 66 (3), 586-595.
- Mendis, S., Puska, P., y Norrving, B. (2011). *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*. World Health Organization.
- Muscari, C., Giordano, E., Bonafè, F., Govoni, M., y Guarnieri, C. (2014). Strategies affording prevascularized cell-based constructs for myocardial tissue engineering. *Stem cells international*, 2014.
- Nakayama, K. H., Hou, L., y Huang, N. F. (2014). Role of extracellular matrix signaling cues in modulating cell fate commitment for cardiovascular tissue engineering. *Advanced healthcare materials*, 3(5), 628-641.
- Pego, A. P., Poot, A. A., Grijpma, D. W., y Feijen, J. (2003). Biodegradable elastomeric scaffolds for soft tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 87(1), 69-79.
- Pego, A. P., Siebum, B., Van Luyn, M. J. A., Gallego y Van Seijen, X. J., Poot, A. A., Grijpma, D. W., y Feijen, J. (2003). Preparation of degradable porous structures based on 1, 3-trimethylene carbonate and D, L-lactide (co) polymers for heart tissue engineering. *Tissue engineering*, 9(5), 981-994.
- Pelouch, V., Dixon, I. M., Golfman, L., Beamish, R. E., y Dhalla, N. S. (1993). Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Molecular and cellular biochemistry*, 129(2), 101-120.
- Perilla, J. E. (1998). Tendencias en la síntesis de alcohol polivinílico de alto peso molecular. *Ingeniería e Investigación*, (41), 29-32.
- Pham, Q. P., Sharma, U., y Mikos, A. G. (2006). Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue engineering*, 12(5), 1197-1211.
- Quevedo, H. C., Hatzistergos, K. E., Oskouei, B. N., Feigenbaum, G. S., Rodriguez, J. E., Valdes, D., y Heldman, A. W. (2009). Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 14022-14027.

Ramsay, B. A., Langlade, V., Carreau, P. J., y Ramsay, J. A. (1993). Biodegradability and mechanical properties of poly-(beta-hydroxybutyrate-co-beta-hydroxyvalerate)-starch blends. *Applied and environmental microbiology*, 59(4), 1242-1246.

Rienks, M., Papageorgiou, A. P., Frangogiannis, N. G., y Heymans, S. (2014). Myocardial Extracellular Matrix An Ever-Changing and Diverse Entity. *Circulation research*, 114(5), 872-888.

Risdian, C., Nasir, M., Rahma, A., y Rachmawati, H. (2015). The Influence of Formula and Process on Physical Properties and the Release Profile of PVA/BSA Nanofibers Formed by Electrospinning Technique. In *Journal of Nano Research* (Vol. 31, pp. 103-116).

Shaikh, R. P., Kumar, P., Choonara, Y. E., Du Toit, L. C., y Pillay, V. (2012). Crosslinked electrospun PVA nanofibrous membranes: elucidation of their physicochemical, physicomechanical and molecular disposition. *Biofabrication*, 4(2), 025002.

Shafiee, A., Soleimani, M., Chamheidari, G. A., Seyedjafari, E., Dodel, M., Atashi, A., y Gheisari, Y. (2011). Electrospun nanofiber-based regeneration of cartilage enhanced by mesenchymal stem cells. *Journal of biomedical materials research Part A*, 99(3), 467-478.

Shen, X., Xu, Q., Xu, S., Li, J., Zhang, N., y Zhang, L. (2014). Preparation and transdermal diffusion evaluation of the prazosin hydrochloride-loaded electrospun poly (vinyl alcohol) fiber mats. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 14(7), 5258-5265.

Stanfield, C. L. C., Joseph, G., y Germann, W. J. N. (2008). *Principles of human physiology*. Pearson Education, Inc.

Streng, A. S., de Boer, D., van der Velden, J., van Dieijen-Visser, M. P., y Wodzig, W. K. (2013). Posttranslational modifications of cardiac troponin T: an overview. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 63, 47-56.

Subbiah, T., Bhat, G. S., Tock, R. W., Parameswaran, S., y Ramkumar, S. S. (2005). Electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 96(2), 557-569.

Tobita, K., Liu, L. J., Janczewski, A. M., Tinney, J. P., Nonemaker, J. M., Augustine, S., y Keller, B. B. (2006). Engineered early embryonic cardiac tissue retains proliferative and contractile properties of developing embryonic myocardium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 291(4), H1829-H1837.

Voigt, W. V. (2009). Water stable, antimicrobial active nanofibres generated by electrospinning from aqueous spinning solutions. *Fachgruppe Chemie*.

Watkins, S. J., Borthwick, G. M., y Arthur, H. M. (2011). The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 47(2), 125-131.

Watt, F. M., y Huck, W. T. (2013). Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(8), 467-473.

Ye, M., Mohanty, P., y Ghosh, G. (2014). Morphology and properties of poly vinyl alcohol (PVA) scaffolds: Impact of process variables. *Materials Science and Engineering: C*, 42, 289-294.

Yao, L., Haas, T. W., Guiseppi-Elie, A., Bowlin, G. L., Simpson, D. G., y Wnek, G. E. (2003). Electrospinning and stabilization of fully hydrolyzed poly (vinyl alcohol) fibers. *Chemistry of Materials*, 15(9), 1860-1864.

Zhang, D., Shadrin, I. Y., Lam, J., Xian, H. Q., Snodgrass, H. R., y Bursac, N. (2013). Tissue-engineered cardiac patch for advanced functional maturation of human ESC-derived cardiomyocytes. *Biomaterials*, 34(23), 5813-5820.

Zimmermann, W. H., Fink, C., Kralisch, D., Remmers, U., Weil, J., y Eschenhagen, T. (2000). Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnology and bioengineering*, 68(1), 106-114.

Zimmermann, W. H., Melnychenko, I., y Eschenhagen, T. (2004). Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts. *Biomaterials*, 25(9), 1639-1647.

Horas cultivo	Plato de cultivo			Film I			Andamio I			Film M			Andamio M		
	Media	SD	N	Media	SD	N	Media	SD	N	Media	SD	N	Media	SD	N
2	0.3106667	0.0188768	3	0.104	0.0196723	3	0.1863333	0.0551483	3	0.0883333	0.0025166	3	0.2353333	0.043501	3
4	0.349	0.0343948	3	0.11	0.0216333	3	0.2486667	0.0123423	3	0.101	0.0091652	3	0.1966667	0.0623084	3
6	0.3436667	0.040104	3	0.1566667	0.0357957	3	0.2366667	0.0105987	3	0.144	0.031193	3	0.2423333	0.0064291	3
24	0.4756667	0.02442	3	0.2213333	0.0259294	3	0.4786667	0.0185831	3	0.1896667	0.042395	3	0.4046667	0.0305014	3

Datos de absorbancia obtenidos en el ensayo de adhesión celular. Se muestra la media de cada grupo, la desviación estándar (SD) y el número de repeticiones (N).

Días cultivo	Plato de cultivo			Film I			Andamio I			Film M			Andamio M		
	Media	SD	N	Media	SD	N	Media	SD	N	Media	SD	N	Media	SD	N
3	1.4675	0.1239395	3	0.6625	0.173156	3	1.117833	0.0716682	3	0.6998333	0.0678553	3	1.072167	0.1485811	3
5	1.7555	0.0832105	3	1.1265	0.2452183	3	1.2065	0.2339637	3	0.8028333	0.0634455	3	1.3105	0.071253	3
7	1.2285	0.0341761	3	1.264833	0.1713836	3	0.8995	0.1540487	3	1.041833	0.1104098	3	1.332833	0.0624526	3

Datos de absorbancia obtenidos en el ensayo de proliferación celular. Se muestra la media de cada grupo, la desviación estándar (SD) y el número de repeticiones (N).