



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES**

**“ELABORACIÓN DE ANDAMIOS DE POLI (ϵ -CAPROLACTONA) / COLÁGENO / EPICATEQUINA PARA
REGENERACIÓN DE TEJIDO CARDIACO”**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

P R E S E N T A

M en C. ELIZA MIRANDA BUENDIA

Tutor Principal:

Dr. Alfredo Maciel Cerda.

Instituto de Investigaciones en Materiales

Comité tutor:

Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez.

Facultad de Ciencias

Dra. Cristian Jiménez Martínez.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN

Ciudad Universitaria, CDMX, JUNIO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 CIENCIA E INGENIERÍA DE
MATERIALES**

**“ELABORACIÓN DE ANDAMIOS DE POLI (ϵ -CAPROLACTONA) /
COLÁGENO / EPICATEQUINA PARA REGENERACIÓN DE
TEJIDO CARDIACO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

P R E S E N T A

M en C. ELIZA MIRANDA BUENDIA

Tutor

Dr. Alfredo Maciel Cerda.

Instituto de Investigaciones en Materiales

Comité tutor:

Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez.

Facultad de Ciencias

Dra. Cristian Jiménez Martínez.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN

Ciudad Universitaria de México. CDMX

2022

1 Índice

2	Abreviaturas.....	5
3	Introducción.....	9
4	Marco Teórico.....	12
4.1	Corazón.....	12
4.2	Miocitos.....	13
4.3	El ciclo cardíaco.....	14
4.4	Infarto de Miocardio.....	14
4.5	Evolución patológica del infarto.....	15
4.6	Métodos diagnósticos de la cardiopatía isquémica.....	16
4.7	Electrocardiograma.....	16
4.8	Radiografía de tórax.....	17
4.9	Análisis de laboratorio.....	18
4.10	Ecocardiograma.....	18
4.11	Ingeniería de Tejidos.....	18
4.12	Andamios.....	18
4.13	Electrohilado.....	22
4.13.1	Interacciones celulares con andamios electrohilados.....	22
4.13.2	Modificación de los parámetros de electrohilado.....	23
4.14	Epicatequina.....	26
4.15	Poli (ε-caprolactona).....	27
4.16	Colágeno.....	29
4.17	Caracterización de polímeros y andamios.....	31
4.17.1	Espectroscopia infrarroja atenuada por transformadas de Fourier ATR-FTIR.....	31
4.17.2	Espectroscopía por absorción molecular ultravioleta y visible.....	31
4.17.3	Liberación de fármaco.....	32

4.17.4	Análisis termogravimétrico (TGA)	34
4.17.5	Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	34
4.17.6	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	36
4.17.7	Ángulo de contacto.....	37
4.17.8	Propiedades mecánicas.....	38
4.17.9	Diseño experimental robusto (Taguchi)	41
4.17.10	Cultivo celular	43
5	Estado del arte.....	44
5.1	Características del parche para regeneración del tejido.....	44
5.1.1	Biocompatibilidad	44
5.1.2	Estructura	45
5.1.3	Propiedades mecánicas.....	45
5.1.4	Biodegradación.....	45
5.1.5	Uso de andamios con epicatequina.	45
5.1.6	Uso de andamios con PCL y colágeno.....	46
5.1.7	Cardiomiocitos de pollo	47
6	Justificación	48
7	Hipótesis	50
8	Objetivo general.....	50
8.1	Objetivos particulares	50
9	Materiales.....	51
9.1	Polímeros:.....	51
9.2	Fármaco:	51
9.3	Solventes:.....	51
9.4	Reactivos para el cultivo de cardiomiocitos de corazón de pollo.....	51
10	Métodos	52

10.1	Diseño experimental robusto (Taguchi)	52
10.2	Preparación de las fibras electrohiladas.....	53
10.3	Espectroscopia infrarroja por transformación de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).....	53
10.4	Espectroscopía por absorción molecular ultravioleta y visible.	54
10.5	Análisis térmico.....	54
10.6	Goniometría del ángulo de contacto.	55
10.7	Microscopía electrónica de barrido	55
10.8	Porosidad	55
10.9	Propiedades mecánicas.....	56
10.10	Cultivo celular.....	56
10.11	Ensayo de citotoxicidad	57
10.12	Métodos estadísticos	57
11	Resultados y discusión.	58
11.1	Diseño experimental robusto (Taguchi)	58
11.2	Morfología de la fibra.....	61
11.3	Liberación de la epicatequina y el colágeno.....	65
11.4	Espectroscopia infrarroja por transformación de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).....	67
11.5	Hidrofilicidad.....	68
11.6	Análisis Térmico.....	69
11.7	Propiedades mecánicas	72
11.8	Cultivo celular	76
12	Conclusiones	81
13	Anexo A	82
14	Anexo B.....	89
15	Anexo C.....	94

16	Referencias bibliográficas	96
17	Glosario	105

2 Abreviaturas

PCL poli (ϵ -caprolactona)

COL colágena

EPI epicatequina

MUBIS muestras biológicas

CA acetato de celulosa

PVP poli (vinil pirrolidina)

SEM Microscopia electrónica de barrido

ATR- FTIR Espectroscopia infrarroja atenuada por transformada de Fourier

DSC Calorimetría diferencial de barrido

Tg Temperatura de transición vítrea

Tm Temperatura de fusión

TGA Análisis termogravimétrico

DRX Difracción de rayos X

Re Número de Reynolds

ρ Densidad ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)

l_0 longitud de cálculo

E coeficiente de proporcionalidad o módulo de elasticidad o módulo de Young

σ Tensión

ϵ Deformación

$tg \alpha$ Tangente del ángulo α

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Investigaciones en Materiales y a la Facultad de Ciencias por brindarme las herramientas necesarias para el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a CONACYT la beca otorgada para la realización de este trabajo, al proyecto “Ciencia de Frontera CF-19 No. 140617” y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico - Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM), Programa de Apoyo Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IG16100220 y UNAM-DGAPA-PAPIIT, No. IN216318.

Al Dr. Alfredo Maciel Cerda por estar al pendiente en cada una de las etapas de mi formación académica, porque siempre que requerí de su asesoría o apoyo me dio el tiempo y la dedicación para culminar este proyecto.

Al Dr. Ricardo Vera Graziano por sus enseñanzas, por sus consejos y por permitirme ser parte del grupo de investigación.

Al Dr. Filiberto Rivera Torres por su tiempo, por sus enseñanzas, por sus consejos y por tenerme la paciencia necesaria para poder presentar de la manera más adecuada mi investigación.

A la Q.F.B. María Alicia Falcón Neri. y a la Dra. María Luisa Durán Pastén por la realización de todas las pruebas biológicas, además de sus enseñanzas y asesorías.

A los miembros del jurado: Dra. Karla Karina Gómez Lizárraga y Dr. Andrés Eliú Castell, por su tiempo invertido para la revisión de este proyecto.

A los técnicos del IIM, por su aportación sumamente valiosa en el análisis de las muestras y entrega oportuna de resultados:

Al Dr. Omar Novelo Peralta y Dra. Lourdes Soledad Bazán Díaz, por las sesiones de microscopía electrónica de barrido. Al M. en C. Miguel Ángel Canseco Martínez por los análisis ATR-FTIR. A la I. Q. Karla E. Reyes Morales por la obtención de termogramas. A M. en C. Eliezer Hernández Mecinas por la ayuda en la realización de los ensayos de propiedades mecánicas.

Y a cada uno de mis compañeros de laboratorio, por sus sugerencias, enseñanzas y apoyo incondicional.

Para los que dicen que realizar un doctorado no sirve de nada, que se debió haber trabajado y contribuir al país, conocer el “mundo real” y no encerrarse en un laboratorio, les agradezco ya que debido al dinero que están produciendo, un porcentaje se nos destina para mantenernos y así nosotros podamos disfrutar de ese momento; leer, comprender, analizar y realizar experimentos, crear un pequeño proyecto que contribuirá con un grano de arena a solucionar algún problema. Esta oportunidad me ha permitido desarrollarme mental y personalmente, a crearme mis propios criterios, poder explicar por qué es que está sucediendo cierto fenómeno, ahorrarme tiempo en buscar una respuesta porque se usar la estadística a mi favor y diseñar experimentos, no depender si tengo tal o cual recurso, ya que mis análisis me han permitido buscar diferentes caminos y encontrar una solución.

¿qué no es tan sencillo encontrar un trabajo en el “mundo real” teniendo un doctorado y por tanto te vas a la docencia que no es un trabajo? Para mí es un logro educar adolescentes, que te pregunten dudas de que como es que se comporta la naturaleza, el universo y les ayudes a obtener ese conocimiento y que después te lo agradezcan, es una enorme satisfacción, Y la compensación es mutua porque al yo indagar, leer para poderles explicar, también estoy aprendiendo junto con ellos. Para mis esos momentos son y serán mis recuerdos más felices, aunque digan que eso no ayuda en mi economía o en la economía del país.

DEDICATORIA

A mis padres que siempre están ahí en cada instante y momento, apoyándome ¿qué sería yo sin ellos?

A Gerardo que estamos iniciando un camino juntos, en el cual siempre estamos acoplando metas y objetivos que nos ayuden a crecer individualmente y en pareja.

3 Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que las enfermedades cardiovasculares se encuentran entre las principales causas de muerte en el mundo, debido a factores como la inactividad física, la dieta poco saludable, el consumo de tabaco y la elevación de la glucosa en sangre [1]. La principal complicación dentro de estas patologías es la cardiopatía isquémica debido a la muerte de las células por la disminución del flujo sanguíneo y de la cantidad de oxígeno, lo que provoca gradualmente una cicatriz fibrótica que disminuye la continuidad de los latidos del corazón, reduciendo la capacidad de bombeo de la sangre hacia todo el cuerpo[2][3].

Una de las principales soluciones de la patología de la cardiopatía isquémica es el trasplante de corazón. Sin embargo, por la escasez de órganos, este proceso resulta ser inconveniente[3]. Otras alternativas son los dispositivos de asistencia mecánica y los fármacos, pero implican varios riesgos, siendo la resincronización biventricular, el mayor de ellos, que se produce en el 20-30% de los pacientes [3]. Se están explorando métodos alternativos, como la tecnología de células madre, para revertir la enfermedad mediante la regeneración del tejido dañado[4,5]. Esta técnica consiste en sustituir los cardiomiocitos muertos por cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes y reducir al máximo la angiogénesis en la región infartada del miocardio[6,7], para lo cual, es necesario generar un andamio (sustrato que imita la matriz extracelular (ECM) de un órgano o tejido). Las técnicas que existen para la generación de andamios son: la bioimpresión, el autoensamblaje de nanofibras, liofilización, el espumado con gas, la lixiviación con disolventes/partículas, la separación de fases por inducción térmica y el electrohilado[4,8].

El electrohilado es una técnica en la que se obtienen fibras a tamaño de nanoescala con orientaciones espaciales aleatorias o específicas, con grandes áreas de superficies y geometrías de poros controladas que consiste en un capilar a través del cual se expulsa una disolución polimérica y, debido a un determinado diferencial de potencial, las fuerzas eléctricas superarán las fuerzas de tensión superficial en la disolución del polímero y de esta manera saldrá un chorro que se moverá en dirección del campo eléctrico, el cual se elongará; el disolvente se evaporará y los segmentos de fibras serán depositados en un sustrato[9]. Además, el electrohilado ofrece la posibilidad de controlar la composición, la estructura y las propiedades mecánicas del andamio. Los andamios con nanofibras electrohiladas pueden guiar la adhesión, la alineación, la infiltración y la diferenciación de las células porque se pueden controlar los parámetros de proceso[10]. Los principales parámetros de proceso son: rapidez de flujo, el diferencial de potencial y la distancia entre la punta de la aguja y el colector[9]. Una ventaja de esta técnica es que producen andamios

porosos tridimensionales que contienen estructuras similares a la matriz extracelular natural[11]. Además, para la producción de nanofibras se puede utilizar una gran variedad de soluciones poliméricas [12]. Por lo tanto, el electrohilado es una de las mejores alternativas para desarrollar sistemas de regeneración de tejidos cardiovasculares [13].

La ingeniería de tejidos cardíacos ha utilizado polímeros sintéticos y naturales para fabricar andamios electrohilados. Los biomateriales deben tener tasas de degradación ajustables teniendo en cuenta la evolución patológica del infarto, (durante 24 min se produce un daño celular irreversible; a los dos días se produce necrosis coagulativa y, finalmente, a las siete semanas surge la fibrosis completa y el proceso de cicatrización [14]), una porosidad óptima, biocompatibilidad y propiedades elastoméricas [15]. Existe una preferencia por el uso de la poli (ϵ -caprolactona) (PCL) en aplicaciones biomédicas, específicamente en la ingeniería de tejidos vasculares. Este poliéster alifático tiene beneficios significativos, tales como, biodegradabilidad y biocompatibilidad. Este compuesto está aprobado por la administración de alimentos y medicamentos (FDA), tiene una alta tenacidad y cinética de degradación modificable que es una ventaja sobre otros biopolímeros [16–18]. Además, este polímero es hidrofóbico, lo que puede ser considerado una desventaja [19], por lo tanto, para resolver el problema, se ha mezclado PCL con colágeno. El colágeno es un material hidrofílico y citocompatible [20], existen diferentes tipos pero el más abundante en los mamíferos es el colágeno de tipo I, que es de donde se realiza la extracción, este tipo de colágeno es versátil debido a su estructura jerárquica que se compone de tres cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales contiene una o más regiones caracterizadas por la repetición del trímero (Gli-X-Y), donde (X) e (Y) pueden ser prolina e hidroxiprolina[21,22].

Tashakori et al. [23] descubrieron que la aplicación de un andamio de colágeno-carbono en la zona afectada por la isquemia miocárdica protege el tejido cardíaco de las lesiones, en comparación con el corazón no tratado. También se ha observado que el andamio de colágeno/quitosano utilizado en la ingeniería del tejido miocárdico presenta una alta porosidad y excelentes propiedades mecánicas, así como biocompatibilidad. En lo que respecta a la ingeniería de tejidos miocárdicos, se han fabricado andamios de poli (ϵ -caprolactona) con una disposición de microfibras orientadas al azar y alineadas en paralelo, que demuestran un papel dominante de la anisotropía del andamio que mantiene la organización y la función contráctil de los cardiomiocitos humanos derivados de células madre pluripotentes [24]. Un sustrato con poli (ϵ -caprolactona) /gelatina/quitosano muestra buenas propiedades para ser aplicado en células madre humanas cultivadas en laboratorio[8]. Los

avances en este campo implican la incorporación de componentes bioactivos en los sistemas de andamios, como los polifenoles, que podrían formar interacciones químicas con los biopolímeros o las proteínas para mejorar las actividades biológicas de los materiales[25].

Entre los polifenoles más utilizados se encuentra la epicatequina, que ha suscitado un gran interés en la comunidad debido a su actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, antitumoral y cardioprotectora; también se ha demostrado que la epicatequina ejerce efectos renoprotectores al contribuir al equilibrio del estado redox celular[26]. El uso de la epicatequina y de productos reticulados con colágeno parece ser positivo para la terapia endodóntica regenerativa[27]. Se ha sugerido que la posición de los grupos hidroxilos en su estructura molecular es un factor crucial para su actividad antioxidante[28]. Castillo-Ortega et al., realizaron la caracterización química, mecánica, térmica y morfológica de membranas con poli(vinilpirrolidona), acetato de celulosa, evaluaron la tasa de liberación de epicatequina y abrieron el camino al uso potencial del flavonoide[29]. Se descubrió que el consumo de chocolate negro (con alto contenido en flavonoides) disminuía el riesgo de cardiopatía isquémica[30]. Se ha demostrado experimentalmente que la cáscara del cacao es una fuente rica en flavonoides y alcaloides, con las epicatequinas y la teobromina como principales compuestos[31].

Las técnicas de aislamiento y cultivo de cardiomiocitos han tenido una importancia fundamental como herramienta para el estudio y la ampliación del conocimiento de la fisiología y las enfermedades cardíacas[32]. Se han estudiado varios progenitores/células madre, como los mioblastos esqueléticos, las células madre mononucleares de la médula ósea adulta, las células madre mesenquimales y las células madre pluripotentes inducidas en humanos[33]. Aunque el embrión de pollo ha sido el modelo animal más estudiado, ya que su desarrollo, anatomía y fisiología es muy similar a la del feto humano y las etapas del desarrollo embrionario del pollo se han establecido desde 1951 sin dejar de lado el bajo costo que implica [34]. En este trabajo se propone fabricar andamios de PCL, PCL-COL, PCL-EPI y PCL/COL/EPI mediante la técnica de electrohilado, evaluando los efectos de la epicatequina y el colágeno en las células embrionarias cardíacas del corazón de pollo que se monitorizan mediante un sistema de imágenes macroscópicas.

4 Marco Teórico

4.1 Corazón.

El corazón es un órgano muscular con una geometría cónica, que se localiza en la cavidad torácica entre los pulmones. El tamaño es aproximadamente entre 13-15 cm de largo, 9-10 cm de ancho y 6 cm de espesor, mientras su peso esta entre 250-300 g en adultos. Está formado por dos bombas musculares (los ventrículos izquierdo y derecho). Cada bomba tiene su propio depósito (las aurículas izquierda y derecha) (Fig. 1)[35].

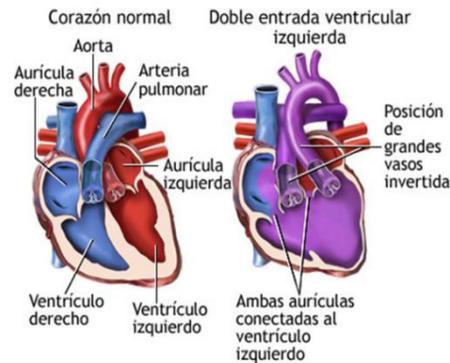


Fig. 1 Corazón en general

Cada una de las dos bombas sirve a una circulación distinta. Una célula sanguínea típica fluye primero por una circulación y luego pasa a la otra. El ventrículo derecho es la bomba de la circulación pulmonar. La sangre es bombeada a los pulmones, donde toma oxígeno y se desprende del dióxido de carbono y luego vuelve a la aurícula izquierda del corazón. Esta sangre penetra entonces en el ventrículo izquierdo. El ventrículo izquierdo es la bomba de la circulación sistémica. La sangre es bombeada desde él al resto del organismo. En los tejidos del cuerpo se intercambian nutrientes y productos de desecho. La sangre (que ahora transporta menos oxígeno y más dióxido de carbono) vuelve a la aurícula derecha y de allí al ventrículo derecho (Fig. 2)[35].

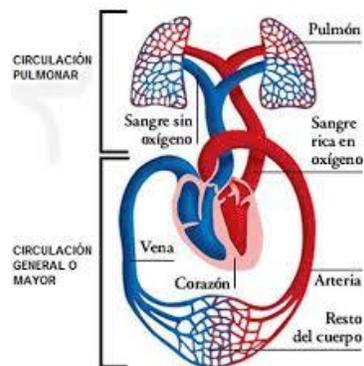


Fig. 2 Aurículas, izquierda roja, derecho azul.

Las paredes del corazón consisten en tres distintas capas (Fig. 3). 1) Pericardio: que es la cubierta que a manera de saco protege, aísla y mantiene las condiciones óptimas para que el corazón pueda movilizarse libremente durante sus contracciones[36]. 2) Miocardio: Es la capa del músculo cardiaco que constituye la masa muscular del corazón y es responsable de la contracción y relajación del ventrículo y aurículas, se compone principalmente de miocitos[37]. Y 3) Endocardio: La membrana suave de las células endoteliales que cubren las cavidades interiores del corazón, los ventrículos, aurículas y válvulas del corazón[37].

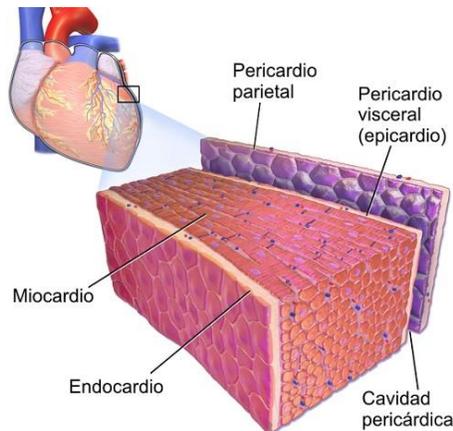


Fig. 3 Paredes del corazón.

4.2 Miocitos

Los miocitos son un tipo de músculo estriado especializado; son células alargadas que forma hileras que se anastomosan de manera irregular; en el adulto tienen un diámetro de 15 a 20 μm y alrededor de 100 μm de longitud, para fines prácticos cabe mencionar que los miocitos auriculares son más pequeños que los ventriculares, las principales características que los distinguen de las fibras musculares esqueléticas son[36]:

- Poseen sólo uno o dos núcleos de localización central
- Presencia de discos intercalares
- Carecen de células madre o satélites.

Cada célula miocárdica contiene numerosas miofibrillas, que son cadenas largas de sarcómeras independientes, las unidades contráctiles fundamentales de la célula. Cada sarcómera está integrada por dos grupos de filamentos de proteínas contráctiles sobrepuestos: miosina y actina. Las interacciones bioquímicas y biofísicas que ocurren entre estos miofilamentos producen la contracción muscular[14].

4.3 El ciclo cardíaco

El ciclo cardíaco se puede dividir en sístole y diástole. La sístole es el proceso de expulsión de la sangre hacia la circulación. La diástole, en complemento, corresponde al proceso de llenado ventricular. Desde el punto de vista hemodinámico, la sístole comienza cuando se cierran las válvulas auriculoventriculares porque en ese momento empieza la contracción ventricular. En su inicio, la contracción es isovolumétrica, es decir, aumenta la presión intracardiaca pero no varía el volumen puesto que, tanto las válvulas auriculoventriculares como las sigmoideas, permanecen cerradas. La diástole principia con el cierre de las válvulas sigmoideas; en ese momento el ventrículo empieza a relajarse en un proceso de succión que, teleológicamente hablando, sirve para el llenado ventricular (Fig. 4)[36].

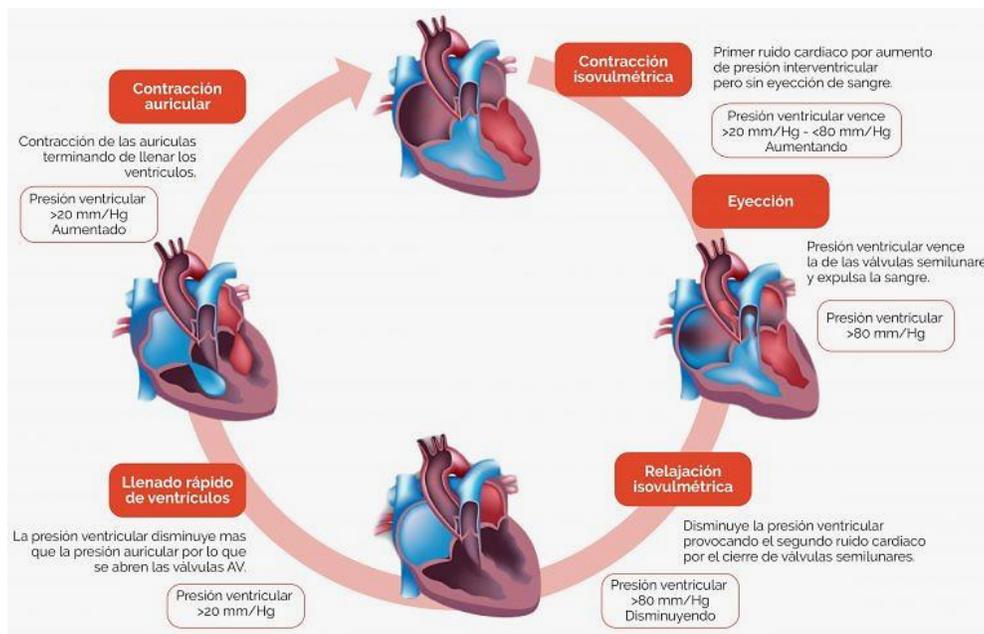


Fig. 4 Ciclo cardíaco.

4.4 Infarto de Miocardio.

El infarto de miocardio es el episodio más frecuente y también el más grave (excluida la muerte súbita) de la cardiopatía isquémica. El infarto del miocardio suele comenzar con un dolor semejante al de la angina, que se prolonga en el tiempo hasta más de media hora, tiene mayor intensidad, y suele ir acompañado de sudoración, decaimiento, náuseas o vómitos. Este cuadro es característico en los hombres. En las mujeres puede ser un cuadro diferente que a veces no se conoce como infarto. El infarto se produce cuando una arteria coronaria se obstruye totalmente, en la mayoría de los casos, por un coágulo de sangre que se forma sobre una placa de ateroma que se ha roto por

diversas circunstancias. En la mayoría de las ocasiones es un acontecimiento inesperado, si bien suele ocurrir en pacientes con varios factores de riesgo coronario no controlados[38].

Además de sus clasificaciones clínicas, los infartos pueden describirse desde la perspectiva patológica por la extensión de la necrosis que producen al interior de la pared miocárdica. Los infartos transmurales abarcan todo el grosor de la pared miocárdica y derivan de la oclusión prolongada total de una arteria coronaria epicárdica. Por el contrario, los infartos subendocárdicos afectan de modo exclusivo las capas más internas del miocardio. El subendocardio es en particular susceptible a la isquemia puesto que es la zona sujeta a la mayor presión generada por la cavidad ventricular, cuenta con pocas conexiones colaterales para su irrigación, y está perfundido por vasos que deben pasar por las capas de miocardio en contracción[14].

4.5 Evolución patológica del infarto

Las alteraciones fisiopatológicas que acontecen durante un IM ocurren en dos fases: cambios tempranos en el momento del infarto agudo, y cambios tardíos durante el proceso de cicatrización y remodelamiento (Tabla 1).

Tabla 1. Evolución patológica del infarto [14]

Tiempo	Evento
Cambios tempranos	
1 a 2 min	Decrecimiento de los niveles de ATP; pérdida de la contractilidad
10 min	Disminución de 50% del ATP; edema celular, disminución del potencial de membrana y susceptibilidad a arritmias
20 a 24 min	Daño celular irreversible
1 a 3 h	Miofibrillas onduladas
4 a 12 h	Hemorragia, edema, inicio de la infiltración por PMN
18 a 24 h	Necrosis coagulativa (núcleos picnóticos con citoplasma eosinofílico), edema
2 a 4 días	Necrosis coagulativa total (pérdida de núcleos o estriaciones, circundada por tejido hiperémico); aparición de monocitos; infiltración máxima de PMN
Cambios tardíos	
5 a 7 días	Reblandecimiento amarillo para la resorción del tejido necrótico por macrófagos
≥ 7 días	Formación de tejido de granulación, remodelamiento ventricular
7 semanas	Proceso completo de fibrosis y cicatrización

ATP, trifosfato de adenosina; PMN, leucocitos polimorfonucleares

4.6 Métodos diagnósticos de la cardiopatía isquémica

Por lo general, es posible saber, de una manera sencilla, si un enfermo sufre una angina o un infarto de miocardio, por el tipo de molestias que refiere (incluido un análisis detenido de los factores de riesgo) pero, para un diagnóstico de seguridad, son necesarias pruebas especiales que, por otra parte, nos proporcionan información útil con referencia al grado de severidad de las lesiones coronarias, así como a la extensión de las lesiones y a los diversos métodos terapéuticos a emplear en cada caso[38].

4.7 Electrocardiograma

El corazón produce una pequeña corriente con cada latido, corriente que se puede registrar mediante un aparato que se llama electrocardiógrafo, en el que se produce un gráfico, que se denomina electrocardiograma (ECG). El ECG se obtiene conectando los cables del electrocardiógrafo a la piel del paciente mediante unas placas metálicas o pegatinas (electrodos), que se sujetan a las muñecas, piernas y al pecho del enfermo. Esta prueba permite hacer el diagnóstico de la mayor parte de los infartos de miocardio, así como los trastornos de ritmo acompañantes[38].

El ECG es la representación gráfica de los cambios eléctricos que se producen en el miocardio durante el ciclo cardíaco. Las distintas ondas, su denominación y su correspondencia con el ciclo cardíaco se resumen en la Fig. 5.

- a) Ritmicidad: Establecer si el trazado es o no rítmico.
- b) Actividad auricular organizada: detectar la presencia de actividad sinusal (ondas P) o no (ondas auriculares no sinusales, ondas f u ondas F).
- c) Intervalo PR: valorar si es normal (120-210 ms) o, en su defecto, si es corto o largo.
- d) Complejo QRS: analizar si es de duración normal o aberrante (si es superior a 100-120 ms), evaluar el voltaje (bajo o aumentado) y la presencia de ondas Q patológicas.
- e) Repolarización: valorar la normalidad del segmento ST (descendido o ascendido) y de las ondas T (bien picudas, o invertidas simétricas o invertidas asimétricas).
- f) Intervalo QT: valorar si es normal o, en su defecto, largo o corto.

La toma del electrocardiograma de 12 derivaciones en pacientes con dolor torácico es clave desde los primeros 10 min del primer contacto, para identificar la elevación del segmento ST y plantear una estrategia de reperfusión temprana. Si existen cambios en la región inferior la toma de 16 derivaciones (dorsales y derechas) permite identificar la parte del ventrículo derecho. Cuando los

datos del electrocardiograma no son claros se recomienda repetirlo cada 5 o 10 min. De acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud para infarto y la redefinición de la Sociedad Europea de Cardiología y el Colegio Americano de Cardiología, los datos electrocardiográficos considerados sugestivos de infarto son cambios del segmento ST o aparición de onda Q en por lo menos dos derivaciones contiguas para hacer el diagnóstico. Aunque el electrocardiograma tiene limitaciones por la presencia de falsos positivos (hipertrofia ventricular,

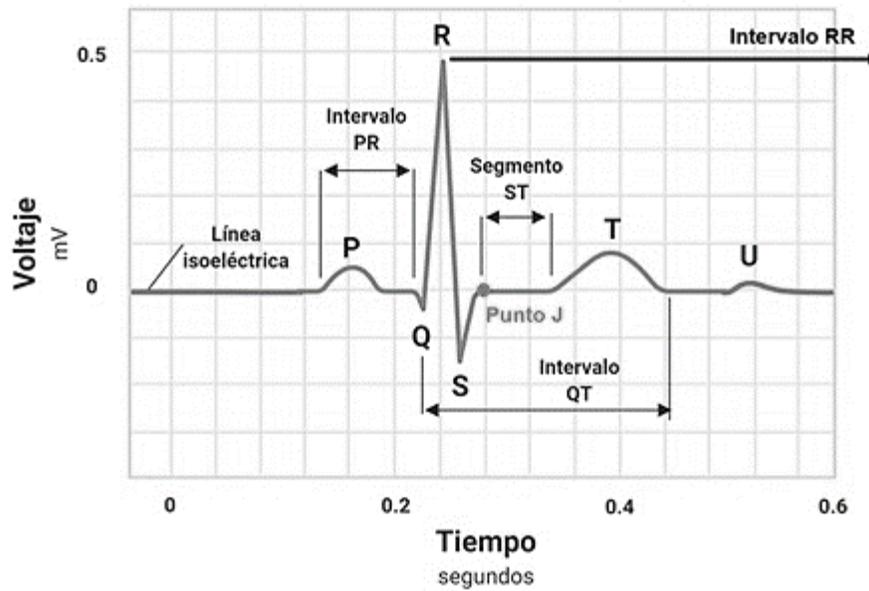


Fig. 5 Esquema electrocardiográfico del ciclo

síndromes de preexcitación, alteraciones electrolíticas, miocarditis, pericarditis, cardiomiopatías, y otros) así como falsos negativos; es de gran ayuda en el inicio de los síntomas, ya que los cambios electrocardiográficos preceden a las manifestaciones clínicas y a la elevación de marcadores de necrosis miocárdica, por lo que se considera el único elemento inmediato que apoya el diagnóstico clínico[36].

4.8 Radiografía de tórax

Es una exploración que permite obtener por medio de rayos X la imagen del corazón para valorar el tamaño de las cavidades, la aorta, estado de los pulmones, la existencia de derrame pleural, de edema intersticial, o de edema de pulmón. Es un procedimiento muy clásico, que da información útil, aunque no sirva para el diagnóstico de la angina, ni del infarto, pero sí para otras patologías como la insuficiencia cardíaca o las valvulopatías[38]

4.9 Análisis de laboratorio

El análisis de sangre es otra prueba sencilla que puede dar información de los niveles de ciertas sustancias presentes en la sangre: la glucosa elevada [diabetes], el colesterol, proteína reactiva C y determinadas enzimas nos pueden ayudar al diagnóstico de enfermedad coronaria[38].

4.10 Ecocardiograma

Está basada en el empleo de los ultrasonidos, una especie de radar que nos dibuja exactamente como son las cavidades cardíacas: aurículas, ventrículos; así como las válvulas, tamaño, grosor, etc. [38]. Con ecocardiografía bidimensional y Doppler se pueden identificar alteraciones en la movilidad regional y global de ambos ventrículos, conocer la extensión y localización del infarto, la función biventricular, cardiopatías asociadas, complicaciones mecánicas, derrame pericárdico, datos de taponamiento cardíaco, trombos intracarvitaros[36].

4.11 Ingeniería de Tejidos.

La regeneración del tejido dañado debido a infarto al miocardio puede llevarse a cabo mediante la ingeniería de tejidos. Ésta es una disciplina científica dirigida a la restauración de tejidos vivos dañados por enfermedad o por accidente, cuando la magnitud del daño supera a la capacidad de respuesta de nuestro organismo. La principal meta de la ingeniería de tejidos incluye reparar tejidos que están dañados o quedaron fuera de uso como resultado de una anomalía congénita. Esta disciplina, mediante el cultivo controlado de células, pretende contribuir a regenerar los tejidos, para lo cual se ayuda de estructuras artificiales llamados andamios. La ingeniería de tejidos actúa mediante la combinación de células del cuerpo con andamios de biomateriales altamente porosos, los cuales actúan como moldes y soportes para el crecimiento o proliferación de la regeneración de tejido; sus funciones principales son sostener a las células y guiar el crecimiento de tejido nuevo[39].

4.12 Andamios.

Un andamio es un sustituto que provee una plataforma estructural para un nuevo microambiente celular que soporta la nueva formación de tejido. Esto permite la adhesión, migración, diferenciación y organización de las células[40]. En la ingeniería de tejidos para la regeneración de tejido infartado se han utilizado diversas técnicas para la realización el andamio, así como varios biomateriales que se pueden ver en la Tabla 2 y Tabla 3.

Tabla 2. Técnicas de fabricación del andamio para tejido infartado.

Técnicas de fabricación del andamio.	Ventajas	Limitaciones
Descelularización de tejidos y órganos [41].	Matriz extracelular pura. Estructura a nivel micrométrico y nanométrico igual al tejido a reparar.	Células inmaduras con una matriz madura. Protocolos de descelularización no uniforme. Sin estándares de éxito en la descelularización. Composición de la muestra variable.
Electrohilado [41].	Diversidad de materiales y solventes. Control de la morfología de la fibra. Fabricación de la fibra a escala macro o nano.	Se requieren que los polímeros y los solventes sean conductores. Es necesario alto voltaje para la formación de la fibra. Para la reproducción de la fibra se requiere un adecuado control del ambiente.
Impresión en 3D [42]	Se obtiene una estructura detallada del andamio. Alta calidad en la interconexión de los poros. Reproducibilidad.	El tamaño de poro depende de la resolución de la impresora. Alto costo.

En la ingeniería de tejidos para la regeneración de tejido cardíaco se utilizan principalmente tres tipos de células, puesto que son las que constituyen las tres paredes del corazón (endocardio, miocardio y pericardio): células endoteliales y cardiomiocitos [2]. Las de especial particularidad son los cardiomiocitos que son células musculares que constituyen el miocardio de ambos ventrículos y aurículas, además de ser las afectadas debido a un infarto cardíaco. Muestran estriaciones como los mioblastos, pero a diferencia de las células esqueléticas multinucleadas, estas solo contienen un núcleo. Los cardiomiocitos tienen una alta densidad mitocondrial más que todas

las células del cuerpo, lo que les permite producir rápidamente ATP (trifosfato de adenosina), que permite una alta resistencia a la fatiga. Además, pueden extraer más del doble de oxígeno de la sangre a comparación de otras células del cuerpo, pues contienen mioglobina en abundancia[37].

Tabla 3. Biomateriales para tejido infartado.

Biomateriales	Ventajas	Desventajas
Hidrogeles [2]	Naturales, sintéticos o una mezcla. La inyección de las células es “ <i>in situ</i> ”. La respuesta inmune es eliminada.	Es vulnerable a que se fracture antes de la formación del tejido.
Poli (ácido glicólico) PGA [43]	En el cuerpo se degrada en glicina, se puede excretar por la orina o convertirse en dióxido de carbono y agua por el ciclo de ácido cítrico. Presentan baja incidencia de aneurisma, probablemente debido a la baja razón de degradación del andamio. Andamios tubulares pueden soportar músculo liso vascular y células endoteliales.	Es propenso a dilatación aneurismática y ruptura. Alto módulo de tensión y cristalinidad. Es menos soluble en solventes orgánicos.
Poli (ácido lactico-co-glicólico) PLGA [43]	Buenas propiedades mecánicas Biocompatible Soluble en solventes orgánicos comunes	Apenas se está probando
Poli (ácido láctico) [43]	Se degrada por hidrólisis por el mecanismo de erosión en masa por escisión al azar del éster. Se degrada en ácido láctico como un bioproducto normal metabólico del cuerpo humano, que se descomponen en agua y dióxido de	Alto esfuerzo de tensión, baja extensión y alto módulo. Baja citocompatibilidad

	carbono, por vía ciclo del ácido cítrico.	
Poli (ácido láctico-co-caprolactona) [43]	Se puede variar la razón de (PCL/PLGA) para obtener las mejores propiedades.	No hay buena proliferación Pobres propiedades mecánicas
Poli (p-dioxanona)	Se degrada completamente El reemplazo es viable	Apenas se está probando
Polímeros naturales (Colágeno, fibrina, alginato, matrigel, quitosano, ácido hialurónico) [40]	Poseen una estructura similar al componente de la matriz extracelular del tejido.	Tienen bajas propiedades mecánicas. Se biodegradan rápidamente.
Poli (glicerol sebacato)[44]	Buenas propiedades mecánicas, biodegradable y biocompatible.	Difícil de solubilizar y procesar.

4.13 Electrohilado

La técnica de electrohilado permite obtener membranas constituidas por nanofibras, las cuales se forman al lanzar un chorro delgado de una solución polimérica por medio de una jeringa un chorro delgado de una solución polimérica hacia una placa metálica o colector. Durante el proceso se aplica una diferencia de potencial eléctrico (ΔV) entre la aguja y el colector para producir las fibras, que se depositan al azar sobre la placa formando una malla de dimensiones adecuadas para el crecimiento celular; esta técnica permite crear membranas porosas de diversos tipos de polímeros y con propiedades específicas[45]. Esta tecnología ofrece muchas ventajas, entre las cuales se incluye la producción de fibras a nanoescala con orientaciones espaciales específicas, altas áreas de superficie y geometrías de poro controladas. Además, el electrohilado ofrece la habilidad de controlar la composición, estructura y propiedades mecánicas del andamio. Los andamios con nanofibras electrohiladas pueden guiar la adhesión celular, alineamiento, infiltración y diferenciación; debido a que se pueden controlar varios parámetros de fabricación[10].

4.13.1 Interacciones celulares con andamios electrohilados

4.13.1.1 Adhesión celular.

La adhesión celular es un proceso complejo que involucra interacciones físicas, eventos de enlaces químicos y procesos biológicos. Ésta juega un rol central en la regulación de comportamientos celulares, tales como; proliferación, diferenciación y la modulación de migración celular. La topografía de la superficie de un biomaterial puede influir en la adhesión y proliferación celular. El proceso de electrohilado provee la oportunidad de fabricar andamios con topografía a nanoescala y alta porosidad, muy similar a la matriz extracelular. Estas nanofibras proveen un adecuado material y ambiente para la ingeniería de tejidos, puesto que el diámetro de las fibras son de órdenes de magnitud más pequeñas que el tamaño de la mayoría de las células; las células son capaces de organizarse alrededor de las fibras o esparcirse y adjuntarse para absorber proteínas o iones en múltiples puntos focales [10].

4.13.1.2 Alineamiento celular.

Las nanofibras fabricadas por electrohilado proveen un ambiente controlado que permite optimizar la orientación celular y favorecer la función del tejido. La orientación de la fibra electrohilada puede influir en la proliferación celular, además de controlar la orientación celular y el crecimiento del tejido[10]. En el campo de la regeneración de tejido en los músculos, huesos, cartílago y células neuronales, muestra que varios grupos de cultivos celulares en andamios de nanofibras alineadas

uniaxiales se elongan de manera preferencial a lo largo del eje longitudinal de la fibra. En el campo de la fotónica, las mayas de nanofibras uniaxialmente alineadas también se utilizan para polarizadores ópticos y para desacoplamiento de emisión de la muestra y señales de excitación en dispositivos de chip de laboratorio, sin embargo, en composites de las muestras que contienen nanofibras de poliimidias sulfonadas alineadas se utilizan en la membrana de intercambiador de protones de células combustibles para convertirla en energía química a energía eléctrica con alta eficiencia y baja emisión de contaminantes[46].

4.13.1.3 Infiltración celular.

Los diámetros de la fibra electrohilada pueden afectar la infiltración celular con el tiempo, en cultivos “*in vitro*”. El diámetro de la fibra está íntimamente relacionado con el área del poro. En general, la obtención de una adecuada infiltración celular en los andamios electrohilados, mientras se mantienen sus propiedades mecánicas e integridad estructural, sigue siendo un gran desafío[10].

4.13.2 Modificación de los parámetros de electrohilado.

Las formas más sencillas de incrementar el tamaño de poro en los andamios mediante electrohilado involucran modificaciones al equipo o a los parámetros del proceso durante el electrohilado[47]. (Ver Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros de electrohilado. [47]

Parámetros del sistema	Parámetros del proceso
<ul style="list-style-type: none"> • Peso molecular del polímero. • Distribución del peso molecular y arquitectura del polímero en la solución. • Propiedades de la solución polimérica como la viscosidad, la conductividad y la tensión superficial. 	<ul style="list-style-type: none"> • Potencial eléctrico • Razón de flujo del polímero a través de la aguja. • Distancia entre la punta de la aguja y el colector. • Forma del colector. • Parámetros ambientales, tales como la humedad, temperatura.

De los parámetros de la disolución del sistema se hace una rápida revisión de algunos de ellos:

- 1) **Concentración de la solución:** Es uno de los parámetros determinantes del tamaño y la morfología de las fibras. La concentración de polímero en la solución influye tanto como la viscosidad como o la tensión superficial de ésta. El diámetro de las fibras tiende a aumentar con la viscosidad[48]. A bajas concentraciones se genera una mezcla de fibras y gotas; a altas concentraciones se dificulta pasar la solución a través del capilar[49].
- 2) **Tensión superficial:** La tensión superficial es la cantidad de energía necesaria para estirar o aumentar la superficie de un líquido por unidad de área[50]. Doshi y Reneker concluyeron que reduciendo la tensión superficial de una solución de polímero podrían obtenerse fibras sin presencia de cuentas (deformación de la fibra en forma redondeada)[48].
- 3) **Conductividad de la solución:** Soluciones con alta conductividad tendrán mayor capacidad de transportar las cargas de la solución que aquellas con baja conductividad. Se ha encontrado que con el aumento de la conductividad eléctrica de la solución hay una disminución significativa en el diámetro de las fibras, mientras que cuando la conductividad es baja se observa un alargamiento insuficiente del chorro, lo que impide la producción de fibras uniformes[48].

Parámetros del proceso.

- 1) **Flujo de salida:** Un flujo de salida menor podría ser benéfico, ya que el disolvente tendría más tiempo para evaporarse y evitar la formación de defectos en las fibras. Cuando el flujo de salida se incrementa, ocurre un incremento en el diámetro de las fibras y, posiblemente, en el tamaño de los defectos[48].
- 2) **Distancia entre la punta de la aguja y el plato colector:** Dependiendo de las propiedades de la solución, el efecto de la variación de la distancia puede o no, tener efecto en la morfología de las fibras. Al trabajar con distancias muy grandes, las fibras electrohiladas podrían romperse debido a su propio peso, especialmente si las fibras son de diámetro pequeño. Se requiere una distancia mínima para dar a las fibras el tiempo suficiente para que el disolvente se evapore antes de alcanzar el plato colector. Con distancias muy grandes o demasiado pequeñas se ha observado la aparición de cuentas o fibras húmedas (el disolvente no se alcanza a evaporar en su totalidad) que promueven la obtención de fibras aplanadas o con forma de cintas[48].

- 3) **Diferencial de potencial:** La morfología de la fibra se relaciona con la diferencia de potencial. A bajos diferenciales de potencial de voltaje, la solución se encuentra en forma de gota al final de la aguja, y al estar sometido bajo un campo eléctrico, se origina un chorro que inicia en forma de cono. Las fibras que se obtienen bajo estas condiciones presentan una morfología cilíndrica con una baja cantidad de cuentas. A altos diferenciales de potencial de voltaje no se nota la formación de una gota o cono al final de la aguja: el chorro de la solución sale directamente de la aguja. Las fibras que se obtienen bajo estas condiciones poseen un notable número de cuentas y defectos. [49]

El tamaño de poro y el diámetro de la fibra están altamente correlacionados; al reducir el diámetro de la fibra decrece el tamaño del poro, lo que dificulta la infiltración o migración de las células[51]. De manera contraria, es posible aumentar el tamaño del poro cuando se incrementa el diámetro de la fibra[47].

Sin embargo, históricamente ha sido aceptado que las nanofibras aceleran e incrementan la adhesión celular y proliferación a diferencia de las microfibras[47].

- 4) **Forma del colector:** Un enfoque diferente para incrementar el tamaño del poro en los andamios es modificar los parámetros del electrohilado, como puede ser un cambio en la forma del colector[47]. Recientemente, se determinó que la naturaleza del colector influye significativamente en la morfología y características físicas de la fibra. Además, el tipo de colector determina en gran medida la disposición y densidad de empaquetamiento de las fibras. Existen sistemas con colectores diseñados especialmente para obtener fibras alineadas o hileras de fibras[52].
- 5) **Colector cilíndrico rotatorio:** Este método se utiliza comúnmente con el fin de obtener fibras parcialmente alineadas. Además, el diámetro de la fibra se puede adaptar y controlar en función de la rapidez de rotación del cilindro. Si la rapidez de rotación es más baja que la rapidez de electrohilado, se obtienen fibras orientadas al azar en el cilindro. A rapidezces altas se crea una fuerza centrífuga en las inmediaciones de la circunferencia del cilindro rotatorio, por lo cual se elongan las fibras antes de que sean colectadas en el cilindro[52].
- 6) **Colector de disco rotatorio:** El colector de disco rotatorio se usa para obtener fibras alineadas uniaxialmente. La ventaja de utilizar un colector de disco rotatorio, en vez de utilizar un colector cilíndrico es que la mayoría de las fibras son depositadas en el borde del disco y las nanofibras son colectadas en un patrón alineado[52].

4.14 Epicatequina

Las primeras evidencias de la presencia de la epicatequina (Fig. 6) fueron reportadas por Ozawa, Hiroto, & Imagawa (1990) cuando aisló procianidinas diastereoisómeros de la médula de la palma metroxylon sagu, la cual fue previamente sintetizada en 1983 por Foo and Porter [28]. La epicatequina es un antioxidante natural que pertenece al grupo de los flavonoides, específicamente a los flavan-3-oles. Estos componentes están presentes en el té verde, en frutas como la uva y el cacao [53]. Este componente se considera por ejercer un efecto de protección contra el cáncer,

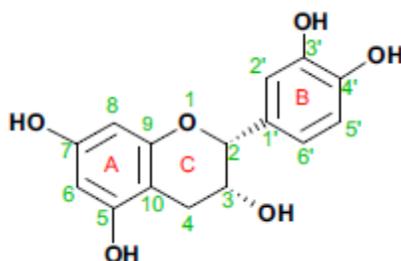


Fig. 6 Estructura química de la (-)-Epicatequina.

inflamación y enfermedades cardiovasculares en el cuerpo humano. El mecanismo por el cual los flavonoides llevan a cabo su actividad antioxidante aún no ha sido elucidada; la actividad antioxidante se considera por la habilidad de atrapar en su cadena los radicales libres por donación del átomo de hidrógeno fenólico en los anillos A y B[54].

Estudios epidemiológicos indican que el modesto consumo de chocolate negro se asocia con una reducción al 37% de riesgo cardiovascular, que incluye la cardiopatía coronaria e infarto. Los efectos parecen ser mediados por el flavonoide (-)-epicatequina y diversos estudios confirman la utilidad potencial clínica de su administración [55]. Por otro lado, se ha demostrado en modelos de ratas con lesión isquémica y oclusión permanente coronaria que un pre-tratamiento con una dosis de (1 mg/kg/día) con epicatequina reduce el tamaño del infarto del miocardio en un 44% y el efecto se mantiene durante 3 semanas. Recientemente, también se ha reportado que dar una dosis de 10 mg/kg antes de la reperfusión, incrementa la reducción del tamaño del infarto al miocardio y el efecto resulta aún ser mejor con una segunda dosis 12h después de la reperfusión[30].

La epicatequina ha ganado un interés inmenso por los investigadores debido a su excelente actividad antioxidante, la cual es eficiente para llevar a cabo beneficios “*in vivo*”. Esto sugiere que la posición de los grupos hidroxilo en la estructura de la molécula es un tipo de factor para sus actividades antioxidantes [28]. En un estudio se evaluaron ratas Wistar albinas macho con infarto al miocardio, inducidas por isoprotenol. Fueron pretratadas con epicatequina (20 mg / kg de peso corporal) diariamente durante un periodo de 21 días. Después del período de pretratamiento, se

inyectó subcutáneamente en las ratas isoproterenol (100 mg / kg de peso corporal) a un intervalo de 24 h durante dos días para inducir infarto de miocardio. El estudio “*in vitro*” reveló la potente acción antioxidante de la epicatequina. El pretratamiento con epicatequina, durante un período de 21 días impidió la excreción de glicohidrolasas lisosomales cardiacas catepsinas y redujo el tamaño del infarto, protegió de este modo las membranas lisosomales contra los cambios inducidos por isoproterenol [56].

Recientes búsquedas sugieren que las concentraciones de la epicatequina “*in vivo*” son a menudo más bajas comparadas con los estudios “*in vitro*” como resultado de una baja bioviabilidad. La razón por lo cual se elucidó esto fue en uno de los estudios “*in vivo*”, que mostró una baja absorción de la epicatequina que se encuentra en la circulación en formas de glucurónidos, formas metiladas y sulfatadas. A menudo, la absorción en el metabolismo se considera crítica, ya que es el primer paso en el proceso de la farmacocinética. Con esta información, los aspectos beneficiosos de la epicatequina pueden ser comprobados por el conocimiento del nivel y mecanismo de absorción en humanos. Se concluye que la epicatequina se absorbe poco en los seres humanos, pero a pesar de su pobre absorción “*in vivo*” hay estudios que determinan sus beneficios en el metabolismo humano[28].

4.15 Poli (ε-caprolactona)

La poli (ε-caprolactona) [PCL] fue uno de los primeros polímeros sintetizados por el grupo de Carothers, 1930. La PCL se obtiene por la polimerización de apertura de anillo del monómero cíclico ε-caprolactona. Se utiliza como catalizador el octoato de estaño y se pueden utilizar alcoholes de bajo peso molecular para el control del peso molecular del polímero. La PCL es un polímero semicristalino que posee una temperatura de transición vítrea (Tg) de -60 °C y un punto de fusión entre 59 y 64 °C[57].

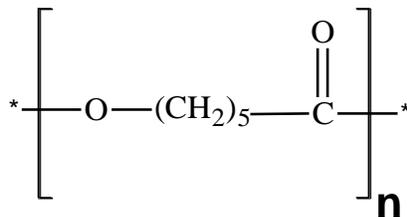


Fig. 7 Estructura química de la poli (ε-Caprolactona)

La PCL es soluble en cloroformo, diclorometano, tetracloruro de carbono, benceno, tolueno, ciclohexanona y 2-nitropropanona a temperatura ambiente. Tiene baja solubilidad en acetona, 2-butanona, acetato de etilo, dimetilformamida y acetonitrilo, es insoluble en alcohol y diétil éter[57].

La poli (ϵ -caprolactona) es un poliéster alifático biocompatible y biodegradable, tiene una excelente elasticidad, se puede procesar en muchas formas y se considera como un potencial biomaterial en la ingeniería de tejidos. Sin embargo, como otros polímeros sintéticos, es hidrofóbico e impide la penetración de suspensiones de células acuosas en el interior de la estructura del andamio, por lo cual hay pobre adhesión y afinidad celular[58].

La PCL se degrada lentamente por hidrólisis de enlaces éster y por ello es más conveniente comparado con PGA y PLA para el diseño de sistemas de implantes de largo termino. El homopolímero PCL tiene una degradación total de 2-4 años (dependiendo del peso molecular inicial del dispositivo o implante). La rapidez de hidrólisis puede ser alterada por copolimerización con otras lactonas o glicoles/láctidos. Los extensos estudios realizados por el grupo de autores sobre la degradación “*in vitro*” e “*in vivo*” de los andamios de PCL no detectaron evidencia de catálisis interna que se muestran por la distribución uniforme del peso molecular a lo largo del tiempo y el examen transversal de los andamios durante un período de 6 y 36 meses. Otros estudios de degradación que utilizaron PCL en condiciones “*in vitro*” (solución salina) e “*in vivo*” (conejo) de manera independiente, informaron que las tasas de degradación hidrolítica eran similares y, por lo tanto, llegaron a la conclusión de que la participación enzimática en la primera fase de degradación (0-12 meses) no era un factor significativo en el proceso de degradación. En conclusión, la degradación de la PCL en comparación con el PLA, PGA, sus copolímeros y muchos otros polímeros reabsorbibles es lenta, lo que la hace mucho más adecuada para aplicaciones de degradación a largo plazo, como la liberación de moléculas encapsuladas que se extienden durante un período de más de un año.[57].

La PCL es adecuada para la liberación controlada de fármacos, debido a su alta permeabilidad a muchos de ellos, su excelente biocompatibilidad y su capacidad de ser excretado completamente del cuerpo una vez que ha sido clasificado como biorreceptor. La biodegradación del PCL es lenta en comparación con otros polímeros, por lo que es más adecuada para liberaciones a largo plazo que se extienden durante un período de más de un año. La PCL también tiene la capacidad de formar mezclas compatibles con otros polímeros, lo que puede afectar la cinética de degradación, pero permite cumplir con el perfil de liberación deseado[57].

4.16 Colágeno

El colágeno es una proteína orgánica insoluble que se encuentra en la piel, en los tendones, en los ligamentos y en los huesos. Se compone de tres cadenas polipeptídicas con una estructura de triple helicoidal [59]. El colágeno se caracteriza por poseer una estructura que contiene un trímero repetido glicina-X-Y, donde X y Y son a menudo prolina o hidroxiprolina (Fig. 8)[60].

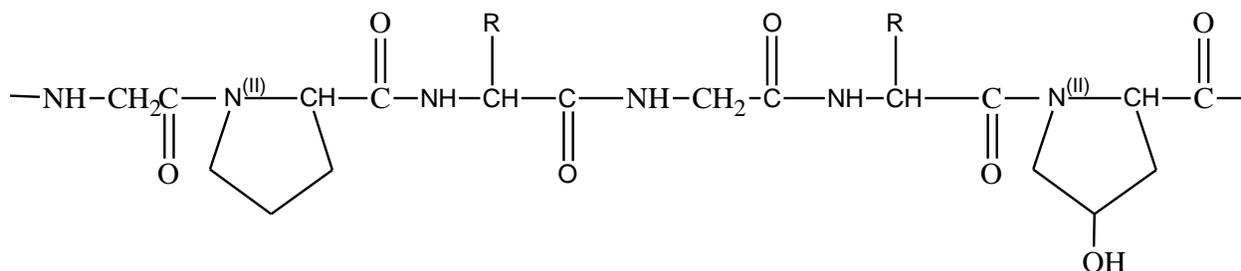


Fig. 8 Estructura del segmento de colágeno que contiene la secuencia Gli-Pro-Y-X-Hip

Las fibrillas de colágeno proporcionan el soporte mecánico que permitió que grandes animales multicelulares evolucionaran en la tierra. El esfuerzo de tensión del colágeno depende de la formación de enlaces intermoleculares covalentes entrecruzados entre las subunidades individuales de la proteína. Todos los tipos de colágeno que forman fibrillas en los vertebrados superiores (tipos I, II, III, V y XI) están entrecruzados a través de un mecanismo basado en las reacciones de los aldehídos, generados enzimáticamente a partir de las cadenas laterales de lisina (o hidroxilisina) por la lisiloxidasas. Esta vía opera en las fibrillas de colágeno de las esponjas, los animales multicelulares existentes más primitivos, hasta los mamíferos[61].

El colágeno es un excelente candidato en la ingeniería de tejidos, ya que mejora la adhesión y crecimiento de las células; existe cierta restricción a su uso en su forma nativa, debido a su pobre estabilidad térmica y susceptibilidad a la degradación proteolítica[62]. El colágeno es uno de los principales componentes de las matrices extracelulares, el número de trímeros repetidos oscila entre unas pocas docenas y 510, dependiendo del tipo de colágeno. Algunos tipos de colágeno son proteínas homotriméricas que consisten en tres α -cadenas idénticas, tales como las de tipo II y III, mientras que otras son heterotriméricas de diferentes α -cadenas. Por ejemplo, el colágeno de tipo I consiste de dos cadenas $\alpha 1(I)$ y una cadena de $\alpha 2(I)$ [63].

Debido a su conformación, el colágeno es mucho más rígido y resistente a la degradación enzimática que la gelatina, esto es, la contraparte que se desnaturaliza resulta de una degradación hidrolítica de la triple hélice nativa. Aunque la gelatina puede retener algunas de las estructuras de

poliprolina-II, dependiendo de las condiciones de desnaturalización y puede mostrar un contenido limitado de la triple hélice, la desnaturalización se considera usualmente como una transición de hélice a una forma espiral, lo que lleva al colágeno a una pérdida significativa del orden estructural. La desnaturalización del colágeno es, por lo tanto, considerado como un posible obstáculo para las aplicaciones de ingeniería de tejidos, donde los andamios requieren ser mecánicamente funcionales para un determinado tiempo y que dependerá de la razón de regeneración del tejido[64].

Mientras los efectos opuestos de entrecruzamiento y desnaturalización en la rigidez y degradación enzimática de los andamios que son elaborados con colágeno se han abordado en gran medida, sus efectos directos sobre la unión de las células a menudo se descuidan y su comprensión parece ser incompleta. Sin embargo, la mayoría de los tipos de células reconocen y se atan a ambos tipos de colágeno, ya sea el nativo o desnaturalizado, lo que sugiere que la conformación es independiente de los sitios de enlace que existan. La adhesión celular del colágeno desnaturalizado se debe a la interacción de varios receptores de integrinas, por ejemplo, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, y $\alpha_2\beta_1$, con RGD (Arg-Gli-Asp) y DGEA (Asp-Gli-Glu-Ala) ligando, los cuales son restringidos y enmascarados en la conformación de una triple helicoidal, pero pueden ser viables para la adhesión por el desdoblamiento molecular. Aunque el entrecruzamiento se puede llevar a cabo por métodos físicos y químicos, típicamente involucran grupos carboxílicos localizados en los residuos del glutamato (E) y aspartato (D), ambos presentes en lo que respecta a adhesividad celular. El número de sitios funcionales de enlace se espera que disminuya al entrecruzarse. Por otro lado, la desnaturalización del colágeno parece mostrar nuevas adhesiones, que no son accesibles en la conformación de triple hélice y que son expuestos hacia las células[64].

4.17 Caracterización de polímeros y andamios.

El mundo de la química de materiales requiere de técnicas de caracterización con el fin de verificar la identidad del material o determinar porque ciertos materiales no son los adecuados para mejorar ciertas tecnologías. Por lo tanto, a continuación, se presenta un resumen de las técnicas de caracterización que se van a utilizar para evaluar las estructuras/propiedades de los materiales que se van a utilizar.

4.17.1 Espectroscopia infrarroja atenuada por transformadas de Fourier ATR-FTIR

En esta técnica se varía la frecuencia de radiación incidente y se obtiene la radiación que se absorbe o transmite de la muestra. Es un proceso básico: los fotones de radiación infrarroja son absorbidos por los enlaces de una molécula, por lo que pasan niveles vibracionales superiores[65]. La energía vibracional es cuantizada y las transiciones entre los niveles de energía vibracional corresponden a la región infrarroja del espectro. Por esta razón, la espectroscopia vibracional se denomina espectroscopia infrarroja[66]. Muchos agrupamientos funcionales de las moléculas orgánicas muestran vibraciones características, a los que les corresponden bandas de absorción en regiones definidas del espectro infrarrojo. Estas vibraciones moleculares están circunscritas, en gran parte, al grupo funcional y no abarcan al resto de la molécula. De esta forma se pueden identificar estos grupos funcionales por su banda de absorción. Este hecho, unido a la sencillez de la técnica de registro, hace de la espectroscopia IR el método más sencillo, rápido y fiable para asignar una sustancia a una clase de compuestos en particular. Por regla general se puede decidir a primera vista si se trata de un alcohol, una amina o cetona, un compuesto alifático o uno aromático[67].

4.17.2 Espectroscopía por absorción molecular ultravioleta y visible

La espectroscopía por absorción molecular se basa en la medición de la transmitancia T o de la absorbancia A de soluciones que están en celdas transparentes que tienen una longitud de trayectoria de b cm. Normalmente, la concentración de un analito absorbente se relaciona en forma lineal con la absorbancia según la ley de Beer[68]:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (1)$$

Donde:

Potencia radiante incidente, P_0

Potencia radiante transmitida, P

Absorbancia, A

Transmitancia, T

Longitud de trayectoria de la muestra, b

Concentración del absorbente, c

Absortividad molar ϵ

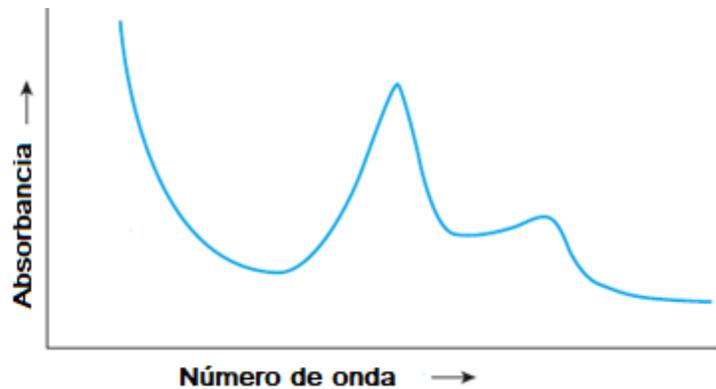


Fig. 9 Esquema típico de un espectro por absorción molecular ultravioleta y visible.

La espectroscopía por absorción molecular ultravioleta y visible tiene una variedad de aplicaciones asociadas con la estructura de los materiales. Esto es por las posiciones de las bandas de absorción que son sensibles al ambiente de coordinación y al carácter del enlace. También se utiliza ampliamente en química analítica para determinar las concentraciones de iones/moléculas/grupos funcionales que producen un pico de absorción en particular[69], un espectro típico de esta técnica se muestra en la Fig. 9.

4.17.3 Liberación de fármaco

El término liberación engloba varios procesos que contribuyen a la transferencia en dosis del fármaco en su medio. Dependiendo del mecanismo de liberación se puede clasificar en[70]:

- Difusión controlada
- Químicamente controlada
- Hinchamiento controlado

El modelo matemático de liberación del sistema de difusión controlada sigue la ley fundamental de Fick con coeficientes de difusión independientes o dependientes de la concentración[70]. La primera ley de difusión de Fick establece que:

$$J = -Da \frac{\Delta c}{\Delta x} \quad (2)$$

Donde:

J= tasa neta de difusión (en moles o gramos por segundo)

D=coeficiente de difusión del soluto que difunde en la membrana (cm²/s)

A= área de la membrana (cm²)

Δc =área de la membrana (cm²)

Δx = diferencia de concentración entre ambos lados de la membrana (moles/cm³)

Modelo Higuchi

En 1961 Higuchi analizó la cinética de liberación de la droga que se aplica con mayor exactitud a aquellas matrices unidimensionales tales como películas de polímeros poco solubles que no sufran hinchamiento[71]. La ecuación es de la siguiente forma [70]:

$$\frac{q(t)}{q_{\infty}} = k\sqrt{t} \quad (3)$$

Donde:

q_{∞} cantidad de droga acumulada en un tiempo infinito

k es la constante de velocidad de liberación de Higuchi en mg/min^{1/2}

t tiempo

Modelo de orden cero

En la cinética de orden cero, la liberación del agente activo es únicamente función del tiempo, y el proceso toma lugar a razón constante e independiente de la concentración del agente activo. La constante de liberación del fármaco es debido a la saturación en el centro, lo que produce un gradiente de concentración estacionario a través de la membrana. Cuando la concentración decae por debajo de la saturación, la razón de liberación de la droga decae a cero [72]. La ecuación puede ser descrita en términos de la concentración:

$$C_t = C_0 + K_0 t \quad (4)$$

Donde:

C_t : Representa la cantidad de agente activo que se libera durante un tiempo t

C_0 : Es la concentración inicial del activo liberado

K_0 : Constante de orden cero

4.17.4 Análisis termogravimétrico (TGA)

En el análisis termogravimétrico se mide el cambio de masa de la sustancia como función de la temperatura o el tiempo. Los resultados aparecen como se presentan en la Fig. 10. La muestra se calienta a temperatura y masa constante, M_i , hasta que el material empieza a descomponerse a cierta temperatura T_i . Bajo estas condiciones de calentamiento dinámico, la descomposición

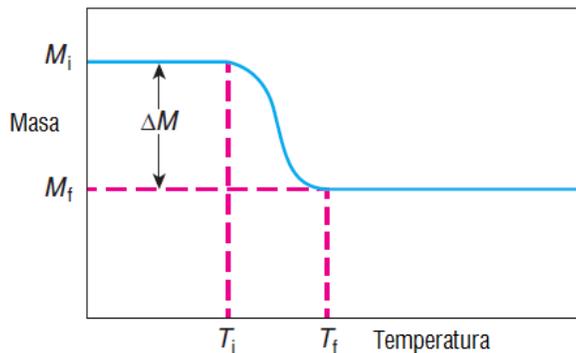


Fig. 10 Análisis termogravimétrico

usualmente toma lugar en un rango de temperaturas, T_i a T_f , y un segundo rango de masa constante se observa por debajo de T_f , que corresponde a la masa residual M_f . Las masas M_i y M_f y la diferencia ΔM son propiedades fundamentales de la muestra y se utilizan para cálculos cuantitativos en los cambios de composición. Por otro lado, las temperaturas T_i y T_f dependen de la razón de calentamiento, la naturaleza del sólido y la atmósfera a la que está sometida la muestra[65].

4.17.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En esta técnica, a la muestra se le aplica un flujo de calor a razón constante y se detectan transiciones endotérmicas y exotérmicas, así como la energía asociada con las transiciones térmicas, como lo son fusión, cristalización, transición vítrea y reacciones de descomposición. Existen numerosos beneficios asociados con el método; la cantidad de muestra es pequeña, el

amplio rango de temperaturas (típicamente -120 a 600 °C), la simplicidad y la rapidez de medida[73].

El procedimiento involucra colocar la muestra (usualmente en cantidades de 5-10 mg) en un platillo junto a otro platillo como referencia (usualmente vacío) en un horno y se procede a calentar o enfriar a una razón controlada, usualmente de 5 a 10 °C/min. Cuando la muestra se encuentra sometida a una transición térmica tal como fusión o cristalización, se mide la temperatura y la energía asociada a tal evento[73].

Transiciones térmicas en polímeros, Temperatura de transición vítrea (T_g), Temperatura de fusión (T_m).

Todos los polímeros son sólidos rígidos duros a ciertas bajas temperaturas, pero conforme aumenta la temperatura, un polímero termoplástico eventualmente adquiere la energía térmica suficiente que permite que sus cadenas se muevan lo suficientemente libres para que el comportamiento del polímero sea como un líquido viscoso (asumiendo que no existe degradación). Hay muchas maneras en las cuales el polímero puede pasar de una fase sólida a una líquida, dependiendo de la estructura de las cadenas poliméricas y su arreglo en la muestra. Los diferentes tipos de respuestas térmicas en esta transición de sólido rígido hacia un eventual estado líquido se puede ilustrar de diferentes maneras. Una de las más simples y más satisfactoria es trazar el cambio del volumen específico, como se muestra en la Fig. 11[74].

En las transiciones de primer orden, tal como la fusión, hay una discontinuidad en el diagrama volumen-temperatura (Fig. 11). La transición vítrea no es una transición de primer orden: no se observan discontinuidades en la T_g cuando el volumen específico o la entropía del polímero se mide como una función de la temperatura[74].

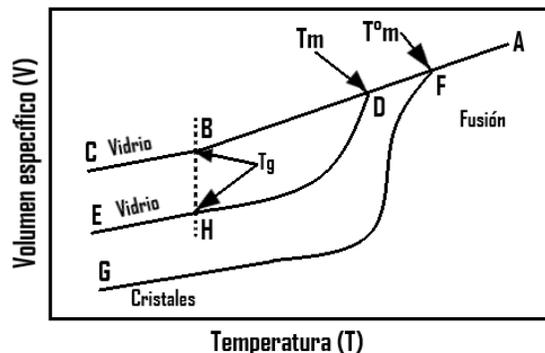


Fig. 11 Representación esquemática del cambio de volumen específico de un polímero con respecto a la temperatura para una muestra completamente amorfa (A-B-C), una muestra semicristalina (A-D-E), y un material perfectamente cristalino (A-F-G).

Un polímero termoplástico puede ser completamente amorfo en estado sólido, lo cual significa que las cadenas moleculares del polímero en el espécimen están arregladas en forma completamente aleatoria. Con respecto a la Fig. 11, el cambio de volumen en un polímero amorfo sigue la curva ABC. En la región C-B, el polímero es un sólido vítreo y tiene las características de los vidrios, incluyendo dureza, rigidez y fragilidad. En la región vítrea, la energía térmica viable es insuficiente para permitir la rotación de enlaces simples en el esqueleto de polímero que supera las barreras energéticas intramoleculares, lo que no permite el movimiento de segmentos grandes (cerca de unas 10-50 cadenas de átomos consecutivos) de cadenas poliméricas. Pero como la muestra se calienta, este pasa a través de la Tg. Una vez que esto sucede, el polímero se comporta como un caucho. La Tg marca un punto en el cual el movimiento molecular extensivo se refleja en marcados cambios de propiedades, tal como el volumen específico, índice refractivo, rigidez y dureza. Por arriba de la Tg, el material puede ser más fácilmente deformado o dúctil. A medida que incrementa la temperatura a lo largo de B-A viene el cambio de polímero de caucho a líquido viscoso sin ninguna transición abrupta[74].

4.17.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido es una innovación. Es una herramienta de investigación extremadamente útil; se utiliza para medir las características microscópicas, la clasificación de las fracturas, los estudios de la microestructura, las evaluaciones del recubrimiento de poco espesor, el examen de la contaminación de la superficie y el análisis de fallas en los materiales. En contraposición a la microscopía óptica, en la cual la superficie es expuesta a la luz visible incidente, el microscopio electrónico de barrido dirige un haz de electrones enfocado a un punto de la superficie de una muestra a analizar y recoge y muestra las señales electrónicas emitidas por la muestra[75].

En esta técnica, suele usarse una punta muy afilada, fabricada con metales como tungsteno, níquel, platino-iridio u oro, y, recientemente, con nanotubos de carbono, la cual se usa para sondear la superficie de una muestra. A una distancia tan pequeña, las nubes de electrones de los átomos que se encuentran en la punta de la sonda interactúan con las nubes de electrones de los átomos de la superficie de la muestra. Si en este punto se aplica una pequeña diferencia de potencial de voltaje a través de la punta y la superficie, los electrones harán que la brecha se transforme en un “túnel” y, por lo tanto, producirán una pequeña corriente que puede detectarse y registrarse[76].

4.17.7 Ángulo de contacto

De forma general, se define el ángulo de contacto como el ángulo que forma la superficie de un líquido al entrar en contacto con una superficie sólida. El valor del ángulo de contacto depende principalmente de la relación existente entre las fuerzas adhesivas del líquido y del sólido y las fuerzas cohesivas del propio líquido. Cuando una fase líquida y una fase sólida entran en contacto, forman una interfase común. La mojabilidad de un determinado sólido por un líquido viene determinada por el ángulo de contacto θ . El perfil que adopta la gota es el resultado del balance entre las fuerzas de la superficie y de la interfase, que tienden a minimizar la energía superficial libre del sistema[77].

Por convenio, cuando $\theta < 90^\circ$ se dice que el líquido moja al sólido o que el sistema moja. El sistema no moja cuando $\theta > 90^\circ$; es decir, el líquido no moja al sólido. Un caso extremo ocurre cuando θ se aproxima a cero; entonces el líquido se expande sobre el sólido y se dice que el mojado es perfecto[77].

El método más común y conveniente para medir el ángulo de contacto es el método de la gota fija. Este método involucra colocar una gota del líquido, aproximadamente $5 \mu\text{L}$, en la superficie sólida y se mide el ángulo entre la base de la gota y la tangente de la frontera de la gota mediante la óptica. Por lo tanto, este método se llama ángulo de contacto estático, el cual es ideal para sólidos que tienen diferentes propiedades en diferentes superficies y se puede medir el promedio de θ en función del tiempo y la temperatura[78]. En el método de ángulo de contacto dinámico, el volumen de la gota se va incrementando en pasos mientras θ se va midiendo hasta que la meseta llamada “ángulo de contacto en avance” (θ_A) se alcanza. De forma similar, el “ángulo de contacto en retroceso” (θ_B) se determina inmediatamente por la medición de θ equivalente al volumen del líquido retirado de la gota. La histéresis del ángulo de contacto es la diferencia de $\theta_A - \theta_B$, donde el ángulo de contacto de avance es significativamente más grande que el de retroceso. Debido al ángulo de contacto de histéresis, una gota de líquido puede permanecer sujeta en un plano inclinado, a pesar de la gravedad[78].

4.17.8 Propiedades mecánicas.

Para la determinación de las propiedades mecánicas de los andamios se realiza un ensayo de tracción, el cual, se efectúa en unas máquinas especiales de ensayo que aplican a la probeta una deformación que aumenta gradualmente y registran el valor de la fuerza que actúa sobre la probeta (Ver Fig. 12). Durante el ensayo a tracción, se utilizan probetas planas, de longitud $l_0=50$ mm. [79].

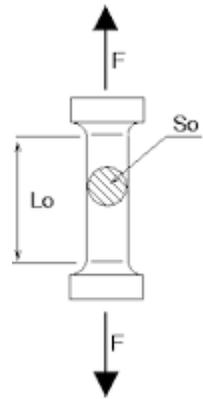


Fig. 12 Probeta para ensayo de tracción.

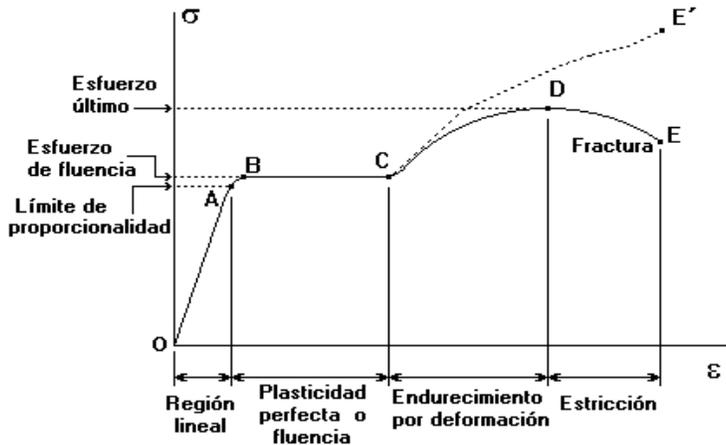


Fig. 13 Diagrama de tracción.

deformación de la probeta (Véase Fig. 13)[79].

El punto A caracteriza la tensión máxima hasta la cual se mantiene la dependencia lineal entre la carga y el alargamiento de la probeta. El punto B corresponde al esfuerzo máximo, durante el cual la probeta conserva las propiedades elásticas, es decir, al quitarle el esfuerzo, no se observa todavía la deformación permanente; el punto C corresponde al esfuerzo con la cual la probeta se deforma sin crecer el esfuerzo o, como se dice, el material empieza a “fluir”, formando en el diagrama el llamado escalón de fluencia CD. Pasada la etapa de fluencia, el material vuelve a obtener la propiedad de aumentar la resistencia al incrementar posteriormente la deformación. El punto D corresponde al esfuerzo máximo, después de la cual empieza la reducción local

obtener automáticamente, a escala determinada, el gráfico del esfuerzo contra la deformación de la probeta o el llamado diagrama de tracción. En el diagrama hay una serie de tramos y puntos característicos que corresponden a diferentes etapas de la

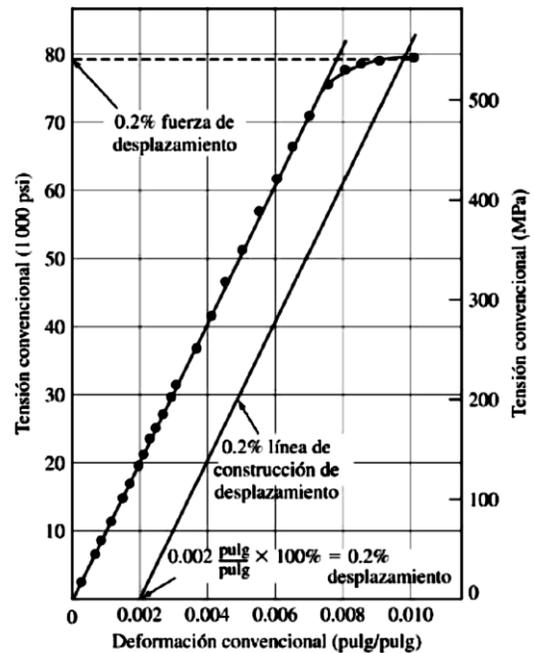


Fig. 14 Parte lineal del diagrama de tracción.

de la probeta en forma de cuello, como resultado de lo cual ocurre la caída del esfuerzo. El punto E corresponde a la carga con la cual la probeta se rompe[79].

El límite elástico es un valor muy importante para el diseño estructural en ingeniería, pues es el nivel de tensión al que un material muestran una deformación plástica significativa. Debido a que no hay un punto definido de la curva esfuerzo-deformación donde acaba la deformación elástica y empieza la deformación plástica, se determina el límite elástico como la tensión a la que se produce una deformación elástica definida. En muchas ocasiones se determina el límite cuando se produce una deformación de 0.2% [75].

El límite elástico de 0.2%, también denominado límite elástico convencional de 0.2%, se determina a partir del diagrama convencional, como se muestra en la Fig. 14. Primero se traza una línea paralela a la zona elástica (lineal) del diagrama convencional a una deformación de 0.002 pulg/pulg(m/m), como se indica en la Fig. 14. Después se traza una línea horizontal desde el punto de intersección entre la línea anterior y la parte superior de la curva esfuerzo-deformación hasta que alcance el eje de las tensiones. Es necesario puntualizar que el valor de 0.2% es arbitrario y puede determinarse el límite elástico para cualquier valor de deformación permanente siempre que sea pequeño; por ejemplo, en el Reino Unido es usual el límite elástico de 0.1% [75].

Del ensayo de tracción se puede obtener el módulo de Young, el cual se deriva de la Ley de Hooke que expresa la dependencia lineal entre las deformaciones y las tensiones;

$$\varepsilon = \frac{\sigma}{E} \text{ o bien } \sigma = E\varepsilon \quad (5)$$

Es E el coeficiente de proporcionalidad llamado módulo de elasticidad durante la tracción o módulo de Young. Del diagrama de tracción (Fig. 13) se ve que:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\sigma}{\varepsilon} = E \quad (6)$$

Es decir, el módulo de elasticidad durante la tracción es numéricamente igual a la tangente del ángulo de inclinación del tramo rectilíneo del diagrama de tensiones con respecto al eje de las

abscisas. Precisamente en ello consiste el sentido geométrico del módulo de elasticidad durante la tracción[79].

Del diagrama de tracción (Fig. 13) con referente a la región lineal, como ya se había mencionado, el comportamiento del material es de sólido elástico, y la deformación es recuperable. Esta deformación, la cual es pequeña, se asocia con la flexión o estiramiento de los enlaces interatómicos entre los átomos de las moléculas poliméricas (Véase Fig. 15). Este tipo de deformación es casi instantánea y recuperable. El desplazamiento de las moléculas unas respecto a otras no es permanente.

Las deformaciones entre la sección AB de la Fig. 13, se han asociado con el estiramiento de una parte torcida o enrollada de las cadenas moleculares (Véase Fig. 15), si se mantiene la tensión, lo cual puede ocurrir sin deslizamiento intermolecular. La deformación es recuperable en última instancia, pero no instantáneamente y, por lo tanto, es análoga a la de un resorte no lineal. Si bien la deformación se produce en tensiones que exceden la tensión en el límite proporcional, no hay un cambio permanente en la disposición intermolecular. Este tipo de deformación, caracterizada por la capacidad de recuperación y la no linealidad, es muy pronunciada en el estado del caucho.

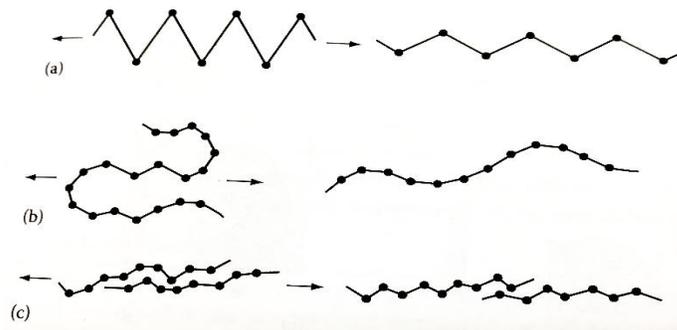


Fig. 15 Deformación en plásticos. (a) Estiramiento de una molécula polimérica (b) Desdoblamiento de una parte torcida o enrollada de una cadena molecular (c) Deslizamiento intermolecular

La mayor extensión que es recuperable marca el límite elástico para el material. Más allá de este punto, las extensiones se producen por el desplazamiento de moléculas entre sí (Fig. 15), como en el flujo newtoniano de un líquido. Las moléculas desplazadas no tienen tendencia a retroceder a sus posiciones originales, por lo tanto, estas deformaciones son permanentes y no recuperables.

4.17.9 Diseño experimental robusto (Taguchi)

El diseño robusto tiene su origen en las ideas del ingeniero japonés Genichi Taguchi, quien desarrolló su propia filosofía y métodos de ingeniería de la calidad desde la década de 1950. Fue a partir del éxito de los japoneses en industrias tan importantes como la automotriz y la electrónica que Occidente comienza a fijarse en los métodos utilizados por ellos. De esta manera, los métodos de Taguchi y de otros autores japoneses se introducen en Estados Unidos a partir de la década de 1980[80].

Decimos que un producto o proceso es robusto cuando su funcionamiento es consistente al exponerse a las condiciones cambiantes del medio. El objetivo del diseño robusto de parámetros es, precisamente, lograr productos y procesos robustos. El concepto parámetro se refiere a los parámetros del sistema, es decir, son los factores o variables del proceso. La metodología Taguchi establece tres metas[80]:

- Diseños robustos (insensibles) ante el medio ambiente para productos y procesos.
- Diseño y desarrollo de productos, de modo que sean robustos a la variación de componentes.
- Minimización de las variaciones con respecto a su valor objetivo.
- Estas tres metas se concretan en tres etapas del desarrollo de un producto:
- Diseño del sistema: el ingeniero utiliza principios científicos y de ingeniería para determinar la configuración básica.
- Diseño de parámetros: se determinan los valores específicos para los parámetros del sistema, minimizando la variabilidad aportada por las variables de ruido.
- Diseño de tolerancias: se determinan las mejores tolerancias para los parámetros.

En un diseño experimental robusto existen factores de ruido (no controlables), considerados de manera explícita o implícita, cuyo efecto se pretende minimizar de forma indirecta (o sea, sin controlarlos directamente), mediante la elección de la combinación de niveles de los factores de proceso que sí se pueden controlar. Dicho de otra manera, en un experimento robusto se trata de lograr que el producto/proceso tenga el desempeño deseado sin que le afecten las fuentes de variación no controladas, y para ello la clave será determinar la combinación de niveles de los factores controlables. El significado de la palabra robusto es en el sentido de hacer el proceso o producto insensible o resistente a factores de ruido que bajo las condiciones vigentes no se pueden controlar[80].

Factores de control, de ruido y de señal

En un proceso existen básicamente dos tipos de factores: controlables y no controlables (o de ruido). Por lo regular, los factores de estudio eran controlables. Sin embargo, en diseño robusto es conveniente tener una clasificación más detallada del tipo de factores controlables que puedan influir el proceso, en cuanto a su efecto sobre la media y la variabilidad de la respuesta de interés. Se distinguen cuatro tipos de factores, a saber[80]:

- Afecta la media y la variabilidad
- Afecta sólo la variabilidad
- Afecta sólo la media
- No afecta la media ni la variabilidad

Cuando en el diseño clásico se afirma que un factor tiene efecto sobre la respuesta, por lo general se quiere decir que el factor tiene efecto sobre la media de la característica de calidad. En cambio, en el diseño robusto se tiene más presente que el efecto de un factor también puede ser sobre la variabilidad, o sobre la media y la variabilidad de manera simultánea. En la medida que se conoce la relación entre los factores controlables y no controlables con la variable respuesta, se está en posición de establecer mejores condiciones de operación del proceso[80].

Para este trabajo se utilizó el programa Minitab el cual calcula las tablas de respuesta, los resultados del modelo lineal y genera gráficas de efectos principales y de interacciones para[81]:

- Relaciones de señal a ruido (relaciones S/N, las cuales proveen una medida del carácter robusto) vs los factores de control.
- Pendientes vs los factores de control
- Desviaciones estándar vs los factores del control
- Logaritmo natural de las desviaciones estándar vs los factores de control

¿Qué es la relación de señal a ruido en un diseño de Taguchi?

En los diseños de Taguchi, una medida de robustez utilizada para identificar los factores de control que reducen la variabilidad de un producto o proceso al minimizar los efectos de los factores que no se pueden controlar (factores de ruido). Los factores de control son aquellos parámetros de diseño y proceso que pueden ser controlados. Los factores de ruido no se pueden controlar durante la producción o el uso de un producto, pero sí se pueden controlar durante la experimentación. En un experimento diseñado de Taguchi, los factores de ruido se manipulan para hacer que haya variabilidad y, con base

en los resultados, identificar la configuración óptima de los factores de control que haga que el proceso o producto sea robusto o resistente ante la variación provocada por los factores de ruido. Valores más altos en la relación de señal a ruido (S/N) identifican configuraciones de factores de control que minimizan los efectos de los factores de ruido[81]. Para diseños de Taguchi, Minitab provee una relación señal a ruido que se calcula de la siguiente manera:

$$S/N = -10 * \log (\sigma^2) \quad (7)$$

Donde:

S/N: Relación de señal a ruido

σ^2 : Desviación estándar

¿Qué es la pendiente en un diseño de Taguchi?

En un diseño de Taguchi, la pendiente es la tasa de cambio para la respuesta en relación con el factor de señal. Por lo general, lo que se busca es elegir niveles de los factores que alcancen un pendiente objetivo. Para cada combinación de factores en un experimento dinámico, Minitab calcula la pendiente de la línea ajustada de mínimos cuadrados para los datos de señal-respuesta que pasan por el punto de referencia (si se especifica)[81].

4.17.10 Cultivo celular

Las células ventriculares fueron aisladas de los corazones de los embriones de los pollitos White Leghorn después de 7 días de incubación en ovo. Los ventrículos se disociaron en células individuales y se recubrieron a densidades de 4.0×10^4 células/ml en platos de plástico. Las células se mantuvieron en el medio a 5% de CO₂, a 36 °C durante 3-4 días antes de que se llevaran a cabo los experimentos[82].

Se realizan registros de las fluctuaciones de Ca²⁺ mediante microscopía de fluorescencia e imagenología del indicador sensible a Ca²⁺ Calcium Green-1 con una cámara digital CCD (Princeton instrument Inc.) y en un microscopio de fluorescencia invertido Leica (DM-IRB)[82].

La contracción de cada miocito es consecuencia de un conjunto de fenómenos que comienzan con la despolarización de la membrana celular o sarcolema (PA) y culmina a nivel de los miofilamentos, con la contracción. Este proceso, tiene como nexos y principal protagonista al ión Ca²⁺[83].

5 Estado del arte

Según estudios del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) entre los periodos de enero y agosto del 2020, las defunciones por enfermedades del corazón ocupan el primer lugar a nivel global con 141 873 casos [84]. Por ello es tanto el interés científico del estudio cuyas alternativas permitan combatir esta enfermedad. Los protocolos de tratamiento de enfermedades cardiovasculares tienen como principal objetivo mejorar el suministro de sangre o prevenir la presión que se presentan en las paredes cardiacas con el fin de minimizar el daño al tejido y la ruptura de los capilares[85]. Algunos fármacos utilizados para el tratamiento de este padecimiento son: estatina, aspirina, bloqueadores de los receptores β -adrenérgicos o nuevos candidatos como el sacubitril/valsartan, sin embargo, por lo general tienden a ser tóxicos para el organismo, lo que limita la dosis óptima de administración. Enfermedades crónicas del corazón terminan en un trasplante, no obstante, surgen varias limitaciones como lo es la falta de donantes, desordenes autoinmunes y la probabilidad del rechazo del órgano[85].

Recientes avances en el campo de la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa proveen soluciones promisorias para elaborar substitutos de tejido del corazón que minimicen al tejido nativo, usando células madre y biomateriales. Algunas de las técnicas que se han utilizado para crear tejido cardiaco funcional son: bioimpresión, hidrogeles, “cell sheets”, lixiviado y electrohilado.

La construcción de un tejido cardiaco ideal debe mostrar propiedades morfológicas y funcionales del corazón nativo y debe permanecer viable después de la implantación. La integración funcional mecánica y eléctrica en la arquitectura del órgano debe resultar en un óptimo funcionamiento de la sístole y diástole en la enfermedad del miocardio. Por lo tanto, el constructo debe ser: 1) contráctil 2) estable electrofisiológicamente 3) mecánicamente robusto y flexible[43].

5.1 Características del parche para regeneración del tejido.

5.1.1 Biocompatibilidad

En el momento que se realice el trasplante del andamio al cuerpo, se deben tomar en cuenta dos factores: inmunogenicidad y coagulabilidad. La respuesta inmune del huésped debe ser mínima para que el andamio pueda ser aceptado “*in vivo*”. Además, el biomaterial debe ser resistente a la formación de coágulos, que puede resultar en un infarto del tejido distal o proximal[2].

5.1.2 Estructura

El tejido del miocardio muestra una estructura jerárquica de células fibrosas alineadas incrustadas como un micro-patrón de panal de abejas, que se forman por fibras de colágeno perimisial y diferentes proteínas de la matriz extracelular. Varios estudios han demostrado que la presencia de una superficie alineada facilita la orientación y organización de los cardiomiocitos [3]. Los andamios deberán tener una estructura de poros interconectados para la penetración celular y vascularización, así como la administración de nutrimentos. El tamaño de poro debe ser mayor a 50 μm , para que permita una interacción entre célula-célula y exista vascularización después del implante[43].

5.1.3 Propiedades mecánicas.

Con respecto a las propiedades mecánicas, éstas deben poseer un módulo de Young entre decenas de kPa y 1 MPa. Se reportó que el ventrículo izquierdo tiene una rigidez de entre 10-20 kPa al inicio de la diástole y un rango de 0.2-0.5 MPa al final de la diástole[3]. La resistencia del material debe ser suficiente para soportar el esfuerzo aplicado sin fallar. En la ingeniería de tejidos, el andamio debe tener las propiedades mecánicas que contengan y protejan las células que se sembraron y mantener su estructura bajo perturbaciones mecánicas que existan durante el cultivo y el implante en el sitio. Al mismo tiempo, sus propiedades mecánicas deberán ser compatibles con el tejido del huésped y permitir la integración sin interferir con las funciones normales del órgano[43].

5.1.4 Biodegradación

La biodegradación de los materiales poliméricos se puede llevar a cabo, de forma pasiva (hidrólisis) debido a la sensibilidad de algunos enlaces en la estructura polimérica o activamente por reacciones enzimáticas. Idealmente, cuando la regeneración del tejido se haya llevado a cabo y las funciones normales se hayan restaurado, el andamio deberá desaparecer del huésped. Sin embargo, la biodegradación no siempre es esencial para la ingeniería en tejido cardíaco [43].

Por todo esto usaremos estos antecedentes metodológicos:

5.1.5 Uso de andamios con epicatequina.

La epicatequina pertenece a un grupo de compuestos denominados polifenoles y en los últimos años han sido de gran interés, debido a sus propiedades antioxidantes y al rol que desempeñan en la prevención de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Los polifenoles son

biomoléculas que provienen de las plantas y tienen efectos antioxidantes y antiinflamatorios, los cuales pueden modular la actividad de un amplio tipo de enzimas y células receptoras[86].

Se prepararon soluciones de acetato de celulosa (CA)- poli (vinil pirrolidina) (PVP) - (-) epicatequina (EPI), primero se preparó la solución de CA, utilizando como solvente una mezcla de acetona -agua a una concentración de 8% p/v y por otro lado una solución de PVP-EPI con una mezcla de solventes Agua-Etanol a una concentración de 8% p/v. Se utilizó como técnica el electrohilado coaxial a una razón de flujo de 0.3-4.0 mL/h, una diferencia de potencial de 11-18 kV y una distancia entre la aguja y el colector de 15 cm. Se realizaron análisis de SEM, FTIR, propiedades mecánicas y análisis térmico. Para el análisis de FTIR se encontraron los picos característicos de los compuestos, por las técnicas de SEM y FTIR se pudo observar que los diámetros de las fibras fue de 0.7 μm , en propiedades mecánicas se obtuvo una resistencia a la tensión de 1.49 ± 0.31 MPa y un módulo de Young de 16.79 ± 7.43 MPa, por lo cual también se concluye que la adición de epicatequina no afecta en esta propiedades[29].

5.1.6 Uso de andamios con PCL y colágeno

El material sintético que se utilizado con frecuencia ha sido el PCL. Las fibras de la malla de PCL tienen en promedio un diámetro de fibra de 250 nm, se realizó con la técnica de electrohilado pero el colector era un anillo de alambre de cromo-níquel. Al tercer día de haber sembrado los cardiomiocitos, la contracción suele ser irregular y no hay una sincronización. Las contracciones y sincronización suelen ser más fuertes al paso del tiempo. Existe adherencia, proliferación y se establece comunicación eléctrica entre las láminas, por lo que hay sincronización de las células, no obstante la rigidez e hidrofobicidad del polímero no permite una significativa adherencia y proliferación en la ingeniería de tejido cardiaco[3]. Por lo cual, se ha realizado una combinación de PCL con diferentes polímeros naturales, tal como el colágeno, la elastina y la gelatina, que han mostrado tener una alta fuerza de tensión cuando se compara con otros andamios híbridos[3].

Se obtuvo una película a base de fibras con doble capa, la capa interna posee catequina que provee a la película actividad antioxidante y gelatina que brinda propiedades de biocompatibilidad. La capa externa es de PCL y se utilizó como técnica el hilado de chorro de aire. Las técnicas de caracterización que usaron fue SEM y se hicieron pruebas de citotoxicidad y evaluación de proliferación de las células. Se hicieron concentraciones de gelatina 1, 7 y 10% , la película de 1% exhibió toxicidad pero las otras presentaron buenas propiedades de cicatrización de las heridas y capacidad antioxidante[87]

Por otro lado, se hizo una estructura en 3D de cinco capas de nanofibras electrohiladas y fueron evaluadas con cardiomiocitos y las capas fueron viables de crear conexiones eléctricas, además de que hubo sincronización. Se hizo igual un andamio poroso biodegradable con poli (glicólido-co-caprolactona) (PGCL) que se utilizó en modelo de miocardio de una rata infartada para distribuir células de médula ósea y se pudo observar el desarrollo de vasos sanguíneos nuevos[12].

Jain Aditi et. al [88] elaboró un andamio de PCL y gelatina, al último agregó nanopartículas de óxido de cerio y demostraron que hubo citocompatibilidad con cardiomiocitos primarios, fibroblastos y cardiomioblastos de rata. El hecho de haber agregado nanopartículas de óxido de cerio impidió la producción de radicales libres

Wang Yanan et. al [89] elaboró andamios electrohilados de PCL y después los funcionalizó con poli (etilendiamina) también los mezcló con heparina y epigallocatequina, para el cultivo celular se utilizaron células endoteliales del cordón umbilical de humanos, los ensayos indicaron que la modificación de la PCL le proporcionó al andamios cualidades anticoagulantes e inhibió la inflamación.

5.1.7 Cardiomiocitos de pollo

La anatomía y fisiología del corazón humano posee etapas de desarrollo similares a las del corazón de las aves, es por ello que sirven como modelo en cardiogénesis y embriología[34]. La mayoría de los investigadores utilizan embriones de aves, debido a que su extracción es reproducible y precisa, ya que lleva años de estudio, es éticamente aceptado y su experimentación implica costos bajos[90]. Asimismo, los trabajos realizados para lograr los cardiomiocitos derivados de células pluripotentes humanas, han mostrado que éstas exhiben un fenotipo embrionario o inmadurado, por lo que sigue siendo relevante estudiar las características de las células embrionarias.

6 Justificación

Las enfermedades cardiovasculares han incrementado progresivamente su prevalencia en el mundo, de tal modo que han llegado a ser la primera causa de mortalidad entre los países de altos ingresos, medianos y bajos ingresos, según se desprende de los últimos datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS)[91].

Específicamente, en México, según el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, las cardiopatías son la primera causa de muerte, con casi 80, 000 defunciones por año, de las cuales más de 60, 000 son consecuencia de la cardiopatía isquémica [92]. La población mexicana con cardiopatía isquémica corresponde a 43% de pacientes diabéticos y 50% de hipertensos, además de que la tercera parte son de sexo femenino, grupo que debe considerarse de alto riesgo, ya que su mortalidad es mayor. Además, observamos en este grupo de pacientes la alta frecuencia de tabaquismo. Hay que agregar que recientemente en el ENSANUT 2012, la prevalencia de obesidad o sobrepeso en población mayor de 20 años es de 80%[91].

Aunque el trasplante del corazón permanece como el único tratamiento radical en la etapa final del fallo del corazón, se limita al tiempo corto de vida del órgano, así como a las complicaciones asociadas como lo es la inmunosupresión. Los dispositivos de asistencia mecánica aún se utilizan en primera instancia como puentes para el trasplante y aunque esto da un alivio sintomático, la resincronización biventricular falla en un 20-30% de los pacientes. Finalmente, ninguno de los grandes intentos que se implementaron en la última década para investigar nuevos medicamentos tuvo un rendimiento positivo para incrementar la supervivencia en pacientes con fallo del corazón, excepto por un reciente intento en el que se reportó los beneficios del compuesto LCZ696. Debido a esto, se han explorado nuevas opciones terapéuticas, entre las cuales se encuentra la “regeneración” del fallo crónico del corazón con células madre [3].

Entre las alternativas en la búsqueda de solucionar el problema del tejido infartado, se encuentra, la ingeniería de tejidos cardiovascular que es un área que combina esfuerzos multidisciplinarios; en la ingeniería, ciencia de materiales y tecnologías médicas, con un último objetivo de acercarse a crear un sustituto autólogo vivo con estructura y funciones similares a los órganos humanos nativos[43].

En una primera etapa se probarán los andamios con células ventriculares embrionarias de pollo pues se conoce su gran viabilidad y sobrevivencia. (González et. Al, 2000, Durán et. Ala, 2019).

Asimismo, se sabe que modelos de células de mamíferos y humanas inducidas a cardiomiocitos presentan fenotipos de cardiomiocitos inmaduros o embrionarias.

Los biopolímeros han realizado su incursión en el área de ingeniería de tejidos de una manera formidable, por ello en aras de obtener una matriz extracelular que no sea rechazada y sea funcional para regenerar el área del tejido infartado, se ha utilizado la poli (ϵ - caprolactona) (PCL) debido a sus excelentes propiedades mecánicas que ayudará a la resistencia del desarrollo de coágulos, el biopolímero también es permeable a los fármacos, con ello refiriéndose a que se utilizará epicatequina, ya que incrementa la reducción del tamaño del infarto al miocardio, además de su excelente actividad antioxidante y para mejora de la adhesión de las células, se empleará colágeno.

7 Hipótesis

Un andamio electrohilado adicionado de colágena y epicatequina, resultará en un sustrato adecuado para la adhesión, supervivencia y crecimiento de cardiomiocitos embrionarios de pollo o inducidos desde células de mamífero. Este ensayo permitirá la pertinencia del diseño del andamio.

8 Objetivo general

Obtener un andamio mediante electrohilado que simulen a la matriz extracelular del miocardio, a partir de: poli (ϵ -caprolactona), colágeno tipo I y epicatequina, para evaluar la viabilidad y actividad los cardiomiocitos embrionarios de pollo.

8.1 Objetivos particulares

- Determinar el diámetro, porosidad y calidad de las fibras por microscopía electrónica de barrido, que favorezca una adecuada proliferación, adhesión y filtración de cardiomiocitos embrionarios de pollo.
- Determinar las propiedades físicas y químicas de los componentes del andamio.
- Comprobar la viabilidad celular de los andamios con cardiomiocitos ventriculares embrionarios de pollo en función de las condiciones de electrohilado.
- Obtener los patrones de actividad de los cardiomiocitos de embrión de pollo en los andamios de PCL, EPI y COL.

9 Materiales

9.1 Polímeros:

Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (Sigma Aldrich) CAS: 24980-41-4 ($C_6H_{10}O_2$) n, Mn= 70,000-90,000 por GPC. Colagéna (COL) (Elastin Products Company).

9.2 Fármaco:

(L-) Epicatequina (EPI) (Sigma Aldrich) CAS: 490-46-0 $C_{15}H_{14}O_6$ MW: 290.27 g/mol mp:240 °C Assay \geq 90% (HPLC).

9.3 Solventes:

2-2-2 Trifluoroetanol (TFE) (Sigma Aldrich), Etanol (Meyer) Acetona (Sigma Aldrich)

9.4 Reactivos para el cultivo de cardiomiocitos de corazón de pollo.

Composición de la solución salina de Hanks mM (125 NaCl, 0.9 KCl, 3.6 $NaHCO_3$, 0.3 Na_2HPO_4 , 0.4 KH_2PO_4 , 0.5 $MgCl_2$, 0.4 $MgSO_4$, 10 Glucosa, 2.9 Sacarosa 9.9, HEPES y 2.2 $CaCl_2$, pH 7,2). Medio de cultivo nutritivo 199 Gibco BRL 10468-018, con inhibidores de la actividad proteolítica celular para evitar el daño celular, suero bovino fetal (FBS) como suplemento de crecimiento para las células y suero de caballo (HS), suplemento para potenciar el crecimiento celular en cultivo y gentamicina (Gibco Life Technologies) y 17 mM de HEPES (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Los huevos de gallina fecundados y libres de patógenos se obtuvieron de un proveedor local y cumplen las directrices de calidad (USDA Memo 800.65). El colorante Calcium-Green-1 es de Molecular Probes® (Eugene, Oregón, EE.UU.).

10 Métodos

10.1 Diseño experimental robusto (Taguchi)

El experimento factorial que se elaboró para el desarrollo de esta investigación fue el Taguchi con 5 factores y 2 niveles (Tabla 9). Se realizaron 2 réplicas, dando un total de 16 corridas (Tabla 6). La variable respuesta fue el diámetro y la morfología de la fibra y el factor de ruido fue la humedad relativa. Se utilizó un arreglo ortogonal L_8 .

Tabla 5. Nivel de los factores

Factores	Niveles	
Distancia de la aguja al colector (cm)	8	15
Diferencial de potencial (kV)	15	18
Concentración %(m/v)	12	17
Rapidez de flujo (mL/h)	0.2	0.6
Tamaño de la aguja (G)	22	1.65

Tabla 6. Diseño Taguchi del experimento L_8 .

Orden	Distancia de la aguja al colector (cm)	Diferencial de potencial (kV)	Concentración %(m/v)	Rapidez de flujo (mL/h)	Tamaño de la aguja (G)
1	8	15	12	0.2	22.00
2	8	15	12	0.2	22.00
3	8	15	12	0.6	1.65
4	8	15	12	0.6	1.65
5	8	18	17	0.2	22.00
6	8	18	17	0.2	22.00
7	8	18	17	0.6	1.65
8	8	18	17	0.6	1.65
9	15	15	17	0.2	1.65
10	15	15	17	0.2	1.65
11	15	15	17	0.6	22.00
12	15	15	17	0.6	22.00
13	15	18	12	0.2	1.65

14	15	18	12	0.2	1.65
15	15	18	12	0.6	22.00
16	15	18	12	0.6	22.00

10.2 Preparación de las fibras electrohiladas

La solución de PCL se preparó en TFE a una concentración del 13% en peso. La solución de PCL/COL se preparó en TFE a una concentración del 13.4% en peso disolviendo 0.65 g de PCL en 5 mL de TFE, seguido de la adición de 20 mg de COL, agitando la solución durante 24 h. La solución de PCL/EPI se preparó añadiendo 0.65 g de PCL y 40 mg de EPI en 5 mL de TFE para obtener una solución del 13.8% (p/v). El PCL/COL/EPI se preparó añadiendo 0.65g de PCL. 20 mg de COL y 40 mg de EPI en 5 mL de TFE para obtener una solución del 14.2% (p/v). Las mejores condiciones que se utilizaron para obtener los andamios del presente trabajo con base en su morfología fueron: flujo volumétrico de 0.4 mL/h, distancia del colector de 20 cm y un diferencial de potencial de 15 kV.

10.3 Espectroscopia infrarroja por transformación de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

El FTIR-ATR es una herramienta utilizada para identificar las señales características de diferentes andamios y probar la presencia o ausencia de colágeno, epicatequina y PCL. Las muestras se analizaron en el equipo Thermo Scientific, Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) acoplado con el accesorio de diamante para reflexión total atenuada (ATR) Smart Orbit a temperatura y presión ambiente. Los andamios se cortaron en secciones de 1 cm², se colocó la muestra en el soporte y se ajustó con un tornillo. Los espectros se escanearon en un rango de números de onda de 500-4000 cm⁻¹ con una resolución de 4 cm⁻¹. Se obtuvieron al menos 3 mediciones por muestra, y se analizaron con el software OriginPro 9.0 (Northampton, EE.UU.).

10.4 Espectroscopía por absorción molecular ultravioleta y visible.

Los andamios construidos con un volumen de 1 mL de disolución electrohilada se sumergió en 50 mL de buffer salino de fosfatos (PBS) con pH 7.3 a 37 °C (Fig. 16). Se tomaron 3 mL de muestra a 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24h y la muestra se volvía a retornar. El instrumento que se midió para calcular



Fig. 16 Liberación de la epicatequina y el colágeno en PBS a 37 °C.

la absorptividad de las muestras fue el UV-2600 SHIMADZU a 202 nm para el colágeno y a 278 nm para la epicatequina. Se realizaron tres repeticiones por tipo de andamio PCL, PCL-COL, PCL-EPI y PCL-EPI-COL.

10.5 Análisis térmico

El equipo utilizado para el análisis termo gravimétrico (TGA) fue el TA Instruments SDT Q600 Module DSC-TGA Standard (USA) en el intervalo de temperatura de (25-600) °C, a una rapidez de calentamiento de 10 °C/min, bajo una atmósfera de gas nitrógeno. Los termogramas obtenidos se analizaron con el software TA Universal Analysis. El equipo utilizado para el análisis térmico fue TA Instruments DSC Q100, y para el análisis de los resultados se utilizó el programa TA Universal Analysis. La calorimetría diferencial de barrido se realizó bajo una atmósfera de gas nitrógeno de 25 a 100°C a 10°C/min. Cada muestra (n=3) se colocó en una bandeja de aluminio. Se calculó el grado de cristalinidad como [34][35]:

$$X_c = \frac{\Delta H_f(T_m)}{g * \Delta H_f^0(T_m^0)} \times 100\% \quad (8)$$

Donde:

X_c : Grado de cristalinidad

$\Delta H_f(T_m)$: Entalpía de fusión

g = Fracción en peso del PCL en el andamio

$\Delta H_f^0(T_m^0)$: Entalpía de fusión del polímero con una completa cristalización, 142 J/g

10.6 Goniometría del ángulo de contacto.

El ángulo de contacto es necesario para conocer el carácter hidrofóbico o hidrofílico de los andamios fabricados. Se cortaron seis secciones de 1 cm² del andamio como muestras de ensayo. Se utilizó el goniómetro Ramé hart, Inc. Model 100-07-00, USA, adaptado con un sistema óptico para observar la interacción de la gota de agua con la superficie del andamio. El análisis de las imágenes se realizó con el programa ImageJ para determinar el ángulo de contacto.

10.7 Microscopía electrónica de barrido

Para este análisis, los andamios fueron cortados en secciones de 0.8 cm², luego las muestras fueron recubiertas con oro por sputter con un equipo JEOL JPC-1100, y la morfología de la superficie fue observada con un microscopio de emisión de campo JSM-7600F, USA. El diámetro de la fibra se midió con el software ImageJ. Se determinaron al menos 100 mediciones de ocho micrografías diferentes para cada parámetro de electrohilado.

10.8 Porosidad

Para la medición de la porosidad se utilizó el método por intrusión de un líquido[93]. Se cortaron andamios en forma circular de 1 cm de diámetro (6 muestras por cada andamio PCL, PCL-COL, PCL-EPI y PCL-COL-EPI) y se midió el espesor (repetibilidad=3), de esta manera ya se pudo calcular el volumen total del andamio que se ocupa en la Ec. 7. Para calcular el volumen de alcohol introducido (Ec. 9) se necesita la masa del andamio húmedo (m_2) y la masa del andamio seco (m_1); para obtener la masa del andamio seco únicamente bastó con pesar el andamio seco en una balanza analítica Precisa, XT 120A (repetibilidad=3), para obtener el peso del andamio húmedo, primero se agregó el andamio a un matraz aforado con 5 mL de etanol, después con una bomba de vacío se retiró todo el aire, hasta que ya no se vieran burbujas y se asegurara de que el etanol hubiera penetrado en el andamio y se pesó el matraz aforado. Después se retiró el andamio y se pesó nuevamente el matraz aforado con la cantidad de etanol sobrante y se calculó m_2 con la Ec. 10.

Para calcular la densidad del etanol Ec. 8, se utilizó un picnómetro KIMAX (USA) de 10 mL y finalmente la porosidad ε entre los andamios se calculó con la Ec. 7 [93], para el cálculo de las incertidumbres puede consultar el Anexo A:

$$\varepsilon = \frac{\text{Volumen del alcohol introducido}}{\text{Volumen del alcohol introducido} + \text{Volumen total del andamio}} \quad (9)$$

$$\rho_{alcohol} = \frac{m_{alcohol}}{v_{alcohol}} \quad (10)$$

$$V_{\text{volumen de alcohol introducido}} = \left(\frac{m_2 - m_1}{\rho_{Etanol}} \right) \quad (11)$$

$$m_2 = \text{masa del matraz aforado con andamio y etanol} - \text{masa del matraz aforado con etanol} \quad (12)$$

10.9 Propiedades mecánicas

Se aplicó el método de prueba estándar de la norma ASTM D1708 para medir la resistencia a la tracción, el módulo de Young y la deformación a la ruptura. El equipo que se utilizó fue una máquina de ensayos universal AGS-X Shimadzu. Se probaron tres especímenes a temperatura ambiente, y la rapidez de la prueba fue de 10 mm/min.

10.10 Cultivo celular

Los cultivos celulares primarios se prepararon siguiendo el procedimiento establecido por Bub et al.,[36], y González et al.,[37]. Las células ventriculares se aislaron de los corazones del embrión de pollo leghorn blanco después de siete días de incubación. Los ventrículos se disociaron en células individuales por acción enzimática y se recubrieron a densidades de $4,0 \times 10^4$ células/mL en placas de plástico. Las células se mantuvieron en el medio al 5% de CO_2 , a 37 °C durante 3-4 días

antes de realizar los experimentos [4]. Los andamios se cortaron en trozos de 0,5 cm² y se esterilizaron con luz UV durante 25 minutos dentro de las placas de Petri. Las células se depositaron suavemente con una micropipeta (20 µL) sobre los andamios, esperando unos 20 min para que las células se precipitaran y se adhirieran; después, se añadió el medio M199. Una vez completado este procedimiento, las placas de Petri se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ por 24 h a 37 °C.

El registro de las fluctuaciones de Ca²⁺ se evaluó mediante microscopía de fluorescencia, y la obtención de imágenes del indicador sensible al Ca²⁺ Calcium Green-1 se realizó con una cámara de microscopio Leica DFC360FX (Leica, Wetzlar, Alemania) y un estereomicroscopio (Leica, Wetzlar, Alemania) [4]. Utilizando el software Micro-Manager, disponible gratuitamente, se establecieron los parámetros de grabación (número de imágenes y rapidez de captura) y se realizaron fichas. Las imágenes se tomaron durante 1 minuto con un tiempo de exposición de 50 a 130 ms para su posterior análisis con el programa NIH Image-J, de libre acceso.

10.11 Ensayo de citotoxicidad

Para el ensayo de citotoxicidad, las células se prepararon como se menciona en la sección de cultivo celular. Después de 24 horas, las células se incubaron a 37 °C en la oscuridad con Calceína-verde AM (Molecular Probes®; Eugene, OR, USA) y Yoduro de Propidio (PI) 1 µM (Molecular Probes®; Eugene, OR, USA) durante 15 minutos, y luego se lavaron con solución de Hank. Las células se expusieron a Triton X-100 0,1% como controles negativos. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de epifluorescencia automatizado ImageXpress® MicroXLS (Molecular Devices, San José, CA) y se visualizaron con un objetivo de 10X. Los colorantes se excitaron a 488 nm (Calceína verde-AM) y 545 nm (Yoduro de propidio). Para cada condición y cada colorante, se adquirieron 5 imágenes cada 20 micras en el plano z y se realizó una reconstrucción con la suma de las 5 imágenes. Las imágenes se analizaron mediante el programa MetaXpress® (Molecular Devices, San José, CA).

10.12 Métodos estadísticos

Los resultados de los análisis se representan como media ± desviación estándar de la media (SEM). Las comparaciones de los análisis de datos se realizaron con el ANOVA no paramétrico de una vía y comparaciones múltiples con la prueba post-hoc de Tukey. Para el análisis de los datos se utilizó el software GraphPad Prism versión 9. La diferencia entre medias se consideró ns p≤0.05, *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001, ****p≤0.0001.

11 Resultados y discusión.

11.1 Diseño experimental robusto (Taguchi)

El proceso de electrohilado conlleva varias causas de variabilidad (ruidos) como lo puede ser temperatura y humedad relativa del medio ambiente que no permiten obtener fibras sin defectos (cuentas) o que permita un electrohilado uniformes (Fig. 17).



Fig. 17 Defectos del proceso de electrohilado.

El diseño Taguchi propone la optimización en dos pasos[80].

1. Maximizar el valor de la respuesta S/R (o S/N así lo interpreta el programa minitab)
2. Los factores que sólo afectan a la media se utilizan como factores de ajuste para llevar a ésta a su valor objetivo.

Tomando en cuenta el punto número 1, el valor que más maximiza el valor S/R es la concentración del polímero Fig. 18.

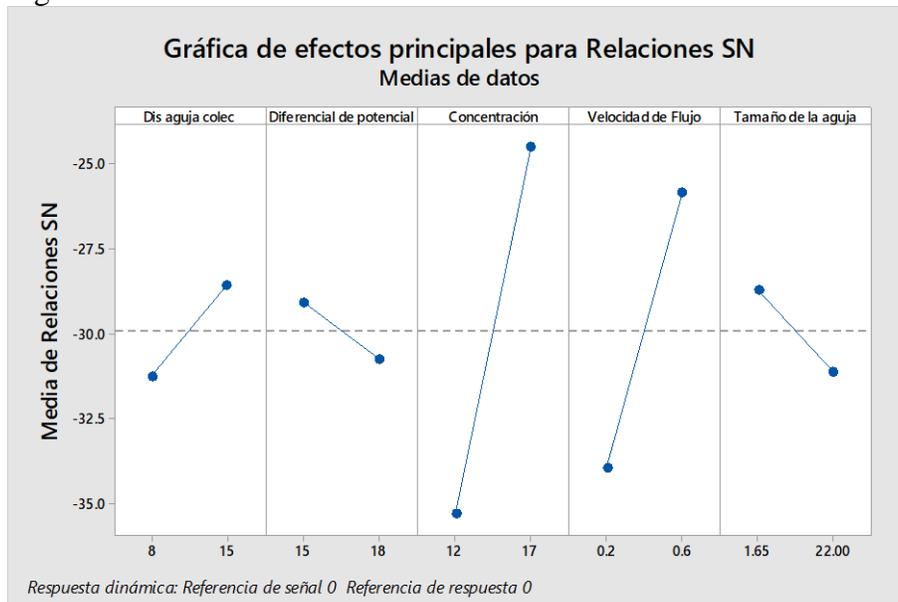


Fig. 18 Gráfica de efectos principales, S/R.

Ahora hay que observar si el valor es estadísticamente significativo (Valor $p \leq \alpha$: La asociación es estadísticamente significativa, Valor de $p > \alpha$: la asociación no es estadísticamente significativa) y finalmente determinar si existe una asociación entre la variable respuesta y el factor. Como se puede observar en la Tabla 7, la concentración tiene un valor de $p=0.043$, por lo cual sí hay una asociación estadísticamente significativa.

Tabla 7 Análisis de Varianza de Relaciones S/N

Fuente	Grados de libertad	Suma secuencial de cuadrados.	Suma de cuadrados ajustada.	Cuadrados de medios ajustados.	Valor F	Valor P
Distancia de la aguja al colector	1	14.482	14.482	14.482	1.35	0.37
Diferencial de potencial	1	5.611	5.611	5.611	0.52	0.55
Concentración	1	233.652	233.652	233.652	21.70	0.04
Rapidez de Flujo	1	131.348	131.348	131.348	12.20	0.07
Tamaño de la aguja	1	11.663	11.663	11.663	1.08	0.41
Error residual	2	21.532	21.532	10.766		
Total	7	418.288				

Se establecieron dos niveles para el factor de la concentración del polímero de 12% m/v y de 17% m/v, al observar la gráfica de desviación estándar Fig. 19 se muestra que el valor más bajo 12% m/v, presentó menor desviación estándar.

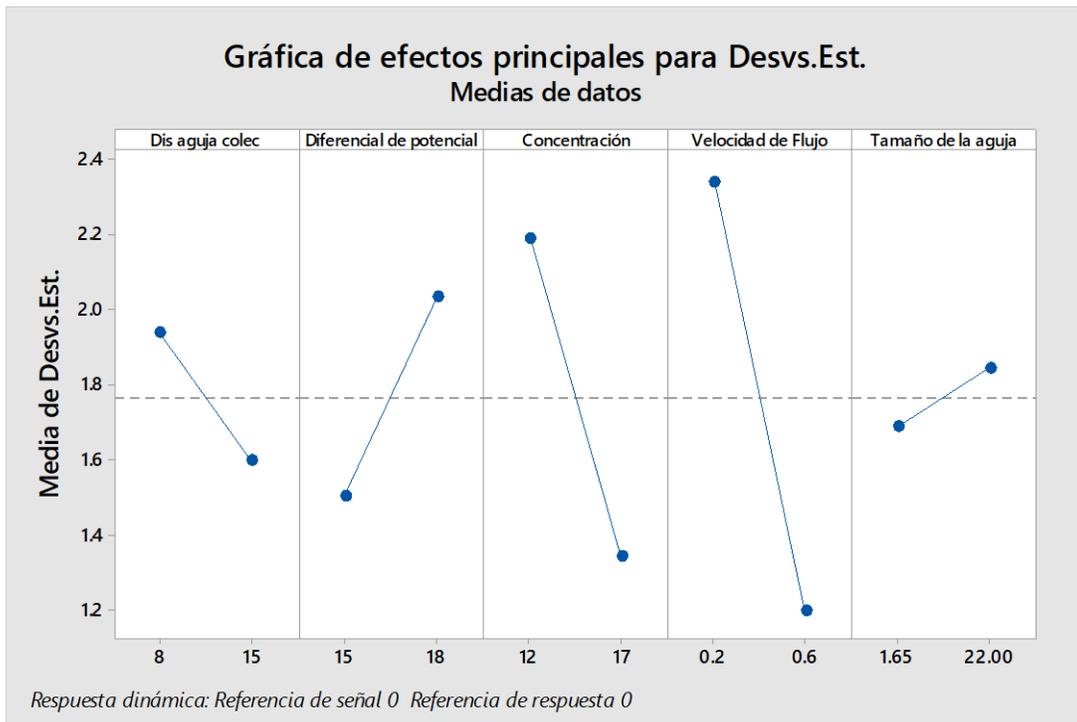


Fig. 19 Gráfica de efectos principales para desviación estándar.

Por lo tanto, tomando en cuenta el análisis de diseño Taguchi, se establece que la concentración es un factor importante que ayuda a hacer robusto al proceso de electrohilado a condiciones ambientales y el nivel más bajo de concentración que se puede utilizar es 12% m/v. Haciendo uso de estos datos y tomando en cuenta los análisis del Anexo B, se determinan las siguientes condiciones de electrohilado:

Tabla 8 Condiciones de electrohilado

Factores de electrohilado	
Distancia de la aguja al colector (cm)	20
Razón de flujo (mL/h)	0.4
Tamaño de la aguja (G)	22
Concentración del polímero % (m/v)	13
Diferencial de potencial	15

11.2 Morfología de la fibra

Todos los andamios presentan fibras, como puede verse en la Fig. 20. En la **Tabla 9** se observa que los diámetros de las fibras de PCL presenta el valor más alto con una diferencia significativa con respecto a los demás sustratos. El histograma de distribución de los diámetros del andamio de PCL es simétrico; las fibras de PCL-COL junto con las de PCL-COL-EPI son las más pequeñas, aunque el histograma del andamio de PCL-COL presenta una distribución ligeramente sesgada a la izquierda (Fig. 21), mientras que el histograma de las fibras del andamio de PCL-COL-EPI, Fig. 21, presenta una distribución relativamente simétrica y son las más delgadas debido a que el colágeno y la epicatequina tienen grupos funcionales que aumentan el número de cargas por unidad de superficie (Fig. 22)[7].

Tabla 9. Morfología de las fibras de los diferentes andamios.

Solución	Diámetro de la fibra¹ (μm)	Área entre fibras (μm^2)	Porosidad
PCL	$1.20 \pm 5.3 \times 10^{-3}$	50.21 ± 1.68	0.603 ± 0.184
PCL-COL	$0.48 \pm 4.6 \times 10^{-3}$	19.23 ± 0.66	0.736 ± 0.162
PCL-EPI	0.76 ± 0.04	15.38 ± 0.97	0.634 ± 0.169
PCL-COL-EPI	$0.45 \pm 2.7 \times 10^{-3}$	37.94 ± 1.04	0.715 ± 0.174

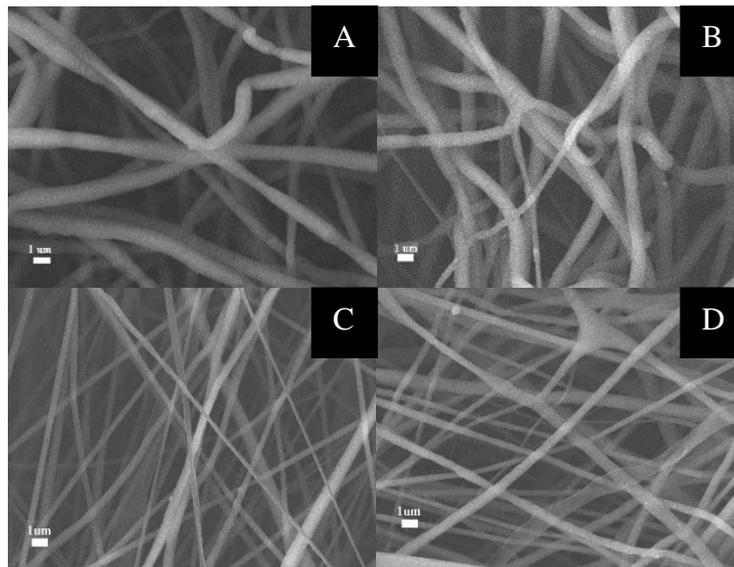


Fig. 20 Morfología de las fibras. A) PCL B) PCL-EPI C) PCL-COL D) PCL-COL-EPI X= 5000 Escala bar= 1 μm

¹ Promedio \pm SEM, al menos 100 mediciones de 8 diferentes micrográficas fueron determinadas.

A pesar de que no hubo un cambio en los parámetros del proceso de electrohilado, en la disolución se utilizó colágeno que es un polielectrolito, y que es llamado así debido a los grupos cargados a lo largo de la cadena[94] (Fig. 22) y que permite el aumento en densidad de carga en los chorros expulsados, lo que favorece la formación de fibras de menor diámetro, como se observa en los andamios obtenidos (Fig. 20), dando mayor homogeneidad en los diámetros, ya que únicamente

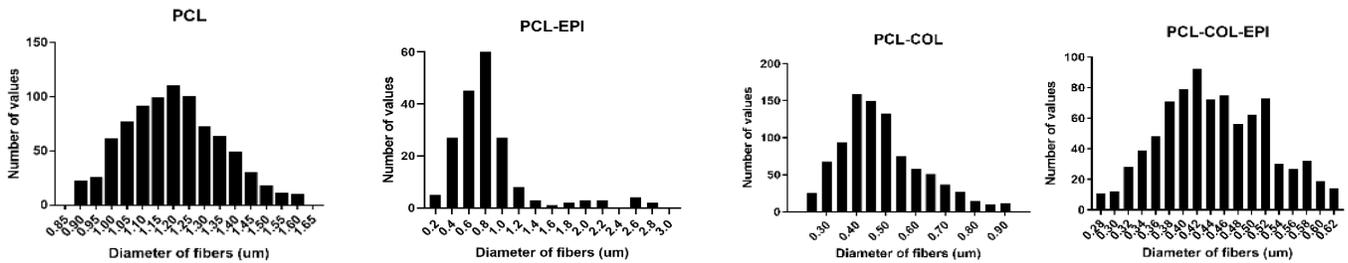


Fig. 21. Histograma de los diferentes andamios electrohilados.

unas pocas fibras mostraron mayor diámetro (0,6-0,9 μm) que coincide con lo reportado en otros trabajos [7,95]. El histograma de PCL-EPI (Fig. 25) presenta una distribución sesgada a la izquierda, con una que otra fibra con un valor del diámetro muy grande (2.8 μm). Por su parte, la estructura de la epicatequina contiene grupos hidroxilo (Fig. 22), que es probablemente la razón por la que aumenta la densidad de carga de la disolución, reflejándose en la disminución del diámetro de la fibra [94,96]. Por otro lado, no hay una suficiente compatibilidad entre la PCL y la EPI, lo que da lugar a soluciones no homogéneas que provocan diámetros de fibra no uniformes.

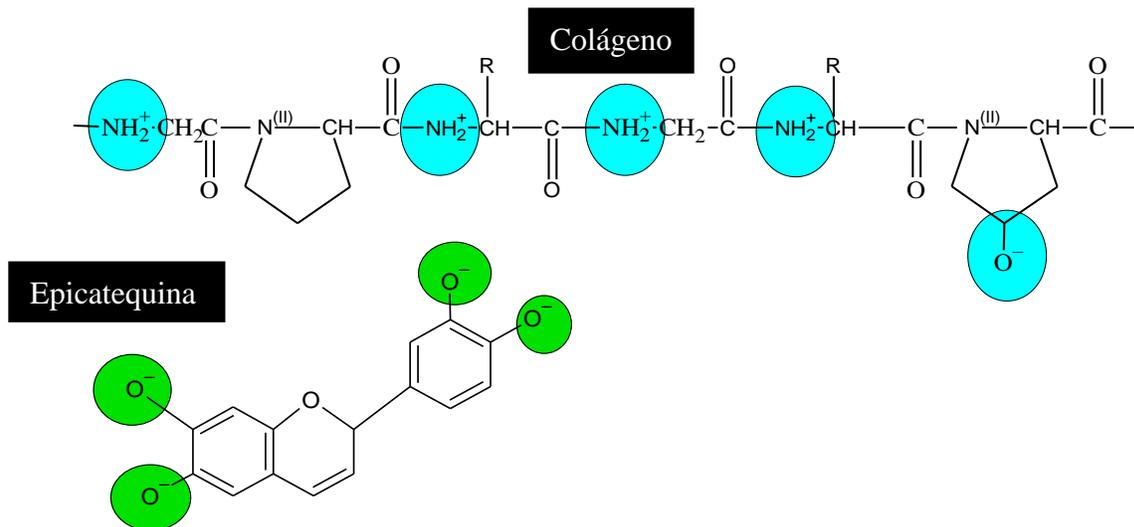


Fig. 22 Estructuras químicas de la epicatequina y el colágeno.

El andamio de PCL tiene la mayor área entre fibras, en contraste con el andamio de PCL-EPI, que tiene un área menor entre fibras. El área entre fibras se midió entre las fibras de primer plano de los andamios, Fig. 23. Micrografía de PCL, medición del área entre fibras. Se puede observar en la Fig. 25 que no hay diferencia significativa entre el andamio de PCL-EPI y PCL-COL, en lo que respecta al área entre fibras. Al parecer la proteína y el flavonoide están presentando una función parecida al interactuar con el polímero y pasar por un proceso de electrohilado haciendo que las fibras estén más juntas y por tanto presentar una menor área entre éstas. Cabe destacar que únicamente se está realizando una medición del primer plano, no obstante, también se realizó una medición de la porosidad del andamio, que involucra en su totalidad la porosidad del andamio.

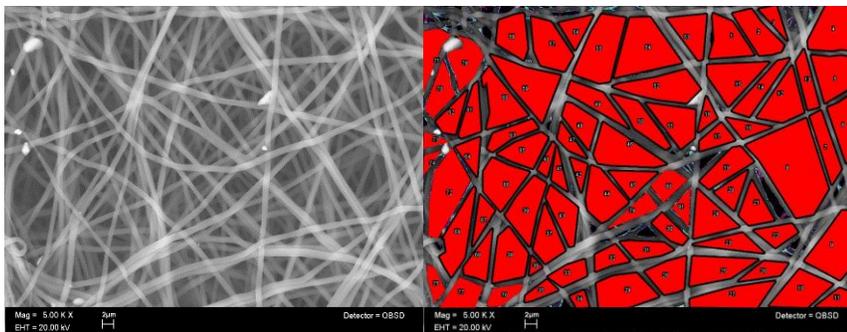


Fig. 23. Micrografía de PCL, medición del área entre fibras.

El área entre fibras, la porosidad, así como el diámetro de las fibras se presentan en la Fig. 24. Los andamios de PCL muestran que, a mayor área entre fibras, mayor es su diámetro y tienen una menor porosidad. De forma contraria, los andamios de PCL-COL presentan menor diámetro de las

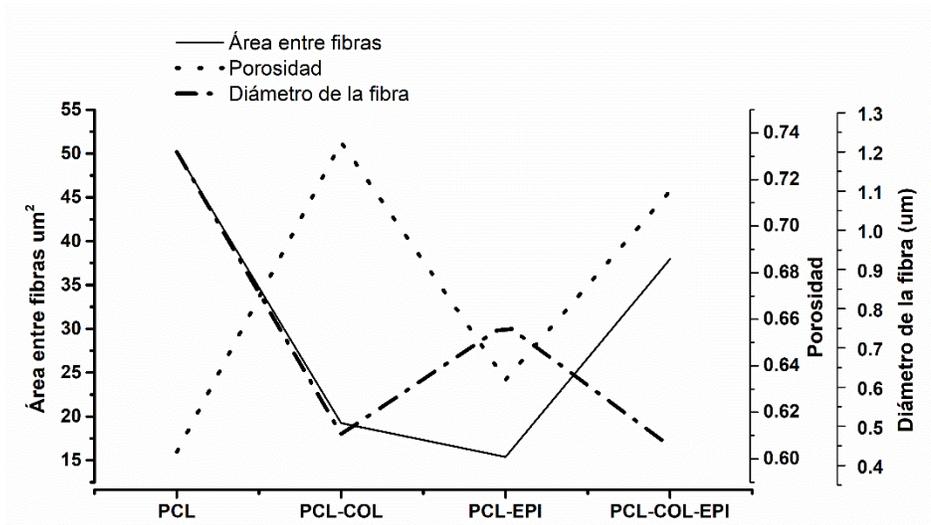


Fig. 24 Relación del diámetro y área entre fibras, así como la porosidad

fibras y también menor su área entre estas, pero poseen una mayor porosidad. No obstante, al agregar la epicatequina se presenta la menor área entre fibras con bajo diámetro de la fibra y porosidad. En cambio, al agregar los tres componentes, PCL, COL, EPI, el diámetro de fibra disminuye, pero aumentan la porosidad y el área entre fibras.

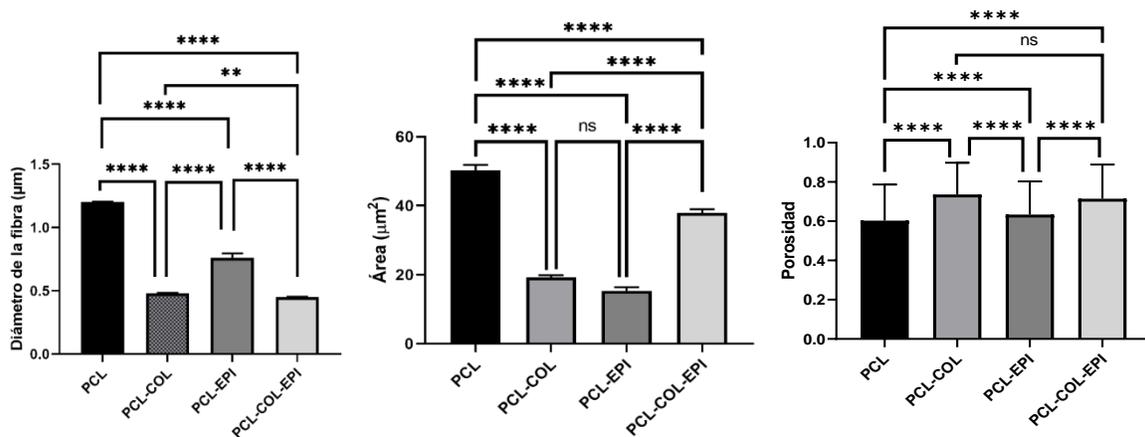


Fig. 25 Análisis estadístico del diámetro de la fibra, área y porosidad. No significativa (ns) $p \leq 0,05$, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$.

11.3 Liberación de la epicatequina y el colágeno

Con el fin de conocer el perfil de liberación de la epicatequina y colágeno se aplicaron dos modelos matemáticos. El de orden cero y el modelo de Higuchi; esto para ver a qué modelo se ajusta más. Los perfiles de comportamiento de liberación de la epicatequina en PBS se estudiaron por 24h. El perfil del andamio de PCL-COL se muestran en la Fig. 26. Peipei Huo et. al [97] realizaron pruebas de liberación de fibras electrohiladas de PCL-COL, variando las cantidades de PCL y COL. El perfil que ellos obtuvieron se asemeja al del presente estudio con el que contiene una mayor

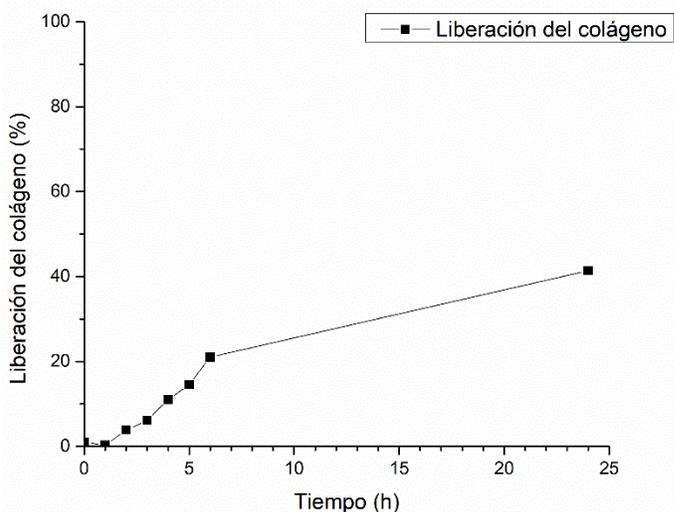


Fig. 26 Perfil de liberación del colágeno.

cantidad de PCL, en el cual la liberación del colágeno es largo y lento, después de 48 h ellos reportan un porcentaje de liberación del 37.8%, en este estudio, en 24h la liberación fue de 39%.

El perfil de liberación de la epicatequina se muestra en la Fig. 27. Como se puede observar, a las 24h apenas se liberó el 0.9% del flavonoide. I. Y. López Peña et. al [98] realizaron un estudio de la liberación de la epicatequina en agua ultrapura de un andamio electrohilado coaxialmente con poli (pirrolidona de vinilo). Sus resultados muestran una liberación del 45% del flavonoide alcanzando el equilibrio en un tiempo de 200 minutos. Existen dos diferencias importantes entre el método aplicado por López Peña et. al [98] y el aquí mostrado, una de ellas es el polímero, ya que en nuestro estudio se utilizó PCL y la otra diferencia es que ellos desarrollaron fibras coaxiales, lo que hace que el flavonoide se encuentre por dentro de la fibra. Cabe destacar que la poli (pirrolidona de vinilo) es soluble en agua, en este caso la PCL no lo es. Es probable que la alta solubilidad de la poli (pirrolidona de vinilo) explique la razón por la cual la epicatequina se libere en menor tiempo. Para el desarrollo de este estudio, el análisis se hizo por la técnica de UV-vis y se midió la absorción a 278 nm, que es su λ_{\max} [99,100]. Meng Shi et. al [101] mostraron que la epicatequina tiene baja fotoestabilidad cuando se aplica radiación ultravioleta B (UVB) por 6 h. Este tipo de

radiación es comparable a la radiación solar, lo cual genera fotoproductos amarillos. Ciertamente, durante el presente estudio también hubo una coloración amarilla, lo que indica la epimerización de la epicatequina y por tanto, también el bajo porcentaje de liberación. Al obtener estos resultados, una de las propuestas para hacer más estable a la epicatequina es estabilizarlo con epigallocatequina[102].

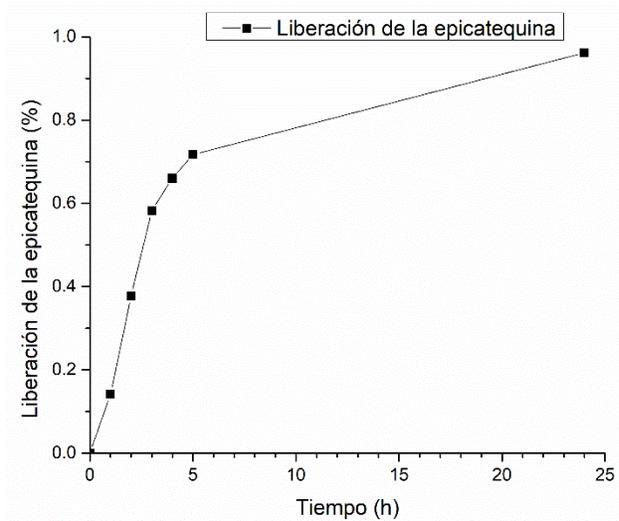


Fig. 27 Perfil de liberación de la epicatequina.

El modelo que más se ajusta a la liberación del colágeno es el de Higuchi (Tabla 10). En el andamio de PCL-EPI el que más se ajusta es el de orden cero, pero con una R^2 baja. En el modelo de orden cero, la liberación está en función del tiempo y el proceso toma lugar a razón constante, independientemente de la concentración del agente activo[72].

Tabla 10. Modelos de liberación de los andamios electrohilados

		PCL-COL	PCL-EPI
Modelo de orden cero	k_0	0.03	0.04
	R^2	0.91	0.58
Modelo de Higuchi	k	1.21	1.64
	R^2	0.93	0.56

11.4 Espectroscopia infrarroja por transformación de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

El espectro ATR-FTIR de la PCL se muestra en la Fig. 28 y muestra cuatro bandas características críticas: un pico de estiramiento muy fuerte de C=O a 1726 cm^{-1} , estiramiento de grupos alifáticos como CH a 2938 y 2853 cm^{-1} , y estiramiento de C-O (1293 cm^{-1}) [17,19]. Los picos característicos de la (-) epicatequina se observaron en 3431 cm^{-1} y 2924 cm^{-1} , que se atribuyen a las vibraciones de estiramiento de los grupos -OH y -C=CH [98]. Los espectros ATR-FTIR del colágeno mostraron bandas de absorción en 1246 para la amida III (estiramiento C-N), en 1541 cm^{-1} para la amida II (flexión N-H), en 1639 cm^{-1} para la amida I (estiramiento C=O) y, finalmente, en 3281 cm^{-1} para la amida A [62]. A una longitud de onda de 1010 cm^{-1} , el andamio de PCL-COL no presenta una banda, la cual sí está presente en los andamios de PCL-EPI y PCL-EPI-COL; esta banda es característica en grupos aromáticos, que están presentes en la estructura de la epicatequina. Los andamios de PCL-EPI y PCL-COL-EPI, presentan una banda ancha iniciando aproximadamente a 3300 cm^{-1} y terminando en 3500 cm^{-1} , que es característico de enlaces de hidrógeno intermoleculares, en el andamio de PCL-COL, también se presenta esta banda, pero en menor intensidad que es atribuido a la amida tipo A [103]. A una longitud de onda de 1616 cm^{-1} , en los andamios que tienen epicatequina se alcanza a percibir una ligera banda, debido a las vibraciones de estiramiento -C=C- (aromático) y -C-C- (aromático). A una longitud de onda de 1164 cm^{-1} , las diferentes combinaciones de los andamios presentan una banda atribuible al estiramiento C-O [104]. Estas observaciones validaron la presencia de PCL, colágeno y epicatequina

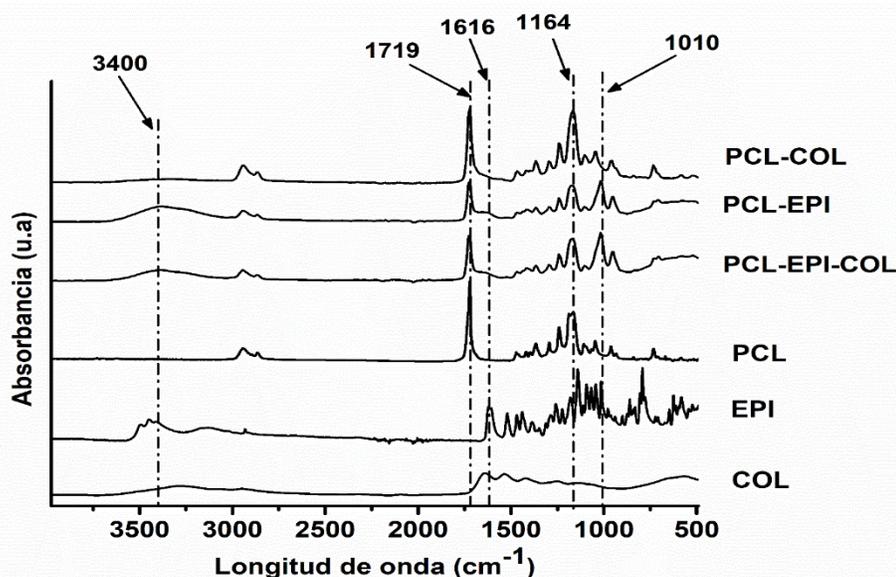


Fig. 28. ATR-FTIR espectro del colágeno, la epicatequina, PCL y de los diferentes andamios, PCL, PCL-COL, PCL-EPI y PCL-COL-EPI.

11.5 Hidrofilicidad

La capacidad del andamio de interactuar con el agua se midió a través del ángulo de contacto (Fig. 29). Los andamios de PCL, PCL-EPI y PCL-COL-EPI son hidrofóbicos y el andamio de PCL-COL es hidrofílico. El sustrato de PCL mostró un mayor ángulo de contacto que los otros andamios electrohilados; esto se debe en gran medida a la naturaleza hidrofóbica del PCL, que no tiene grupos funcionales afines al agua en su cadena principal, lo que provoca una escasa afinidad celular[105]. Los andamios fabricados con PCL/COL y PCL/EPI/COL tenían ángulos de contacto más pequeños que los andamios de PCL. Estos resultados sugieren que la adición de colágeno mejoró la humectabilidad del sustrato, porque las cadenas de colágeno tienen grupos finales hidrofílicos como los grupos NH_2 y COOH de los péptidos glicina, prolina e hidroxiprolina que interactúan con las gotas de agua para hacer enlaces de hidrógeno [106]. Esto, en principio, puede mejorar la fijación de las células, como consecuencia de las interacciones entre los receptores de integrinas en la membrana celular y los dominios RGD en las moléculas de colágeno[107]. De igual manera es notable que conforme pasa el tiempo, el ángulo de la gota que se forma en contacto con el andamio de PCL-COL va disminuyendo, haciendo que aumente de manera significativa la diferencia entre los ángulos de contacto con los demás andamios. A pesar de que la epicatequina influyó para que el ángulo de contacto disminuyera, no se presentó una diferencia significativa con el andamio que únicamente contenía PCL.

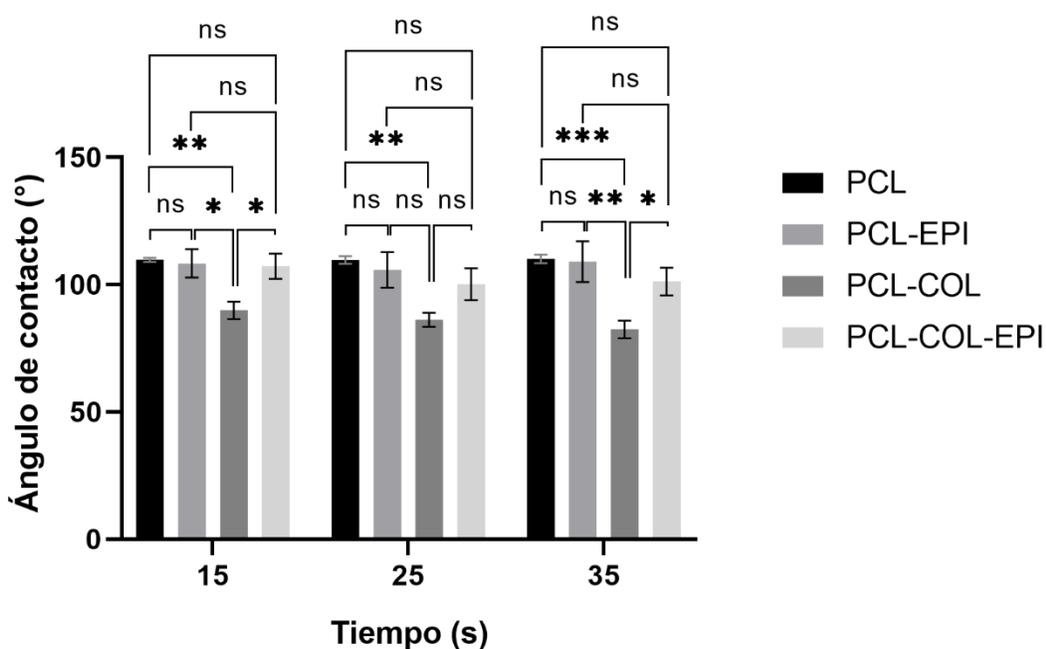


Fig. 29. Ángulo de contacto de los diferentes andamios

11.6 Análisis Térmico

Los termogramas TGA del PCL, la epicatequina y el colágeno obtenidas por separado se muestran en la Fig. 30 y se observa estabilidad térmica de la epicatequina permaneció sin cambio hasta los 214 °C [108], se presenta un siguiente cambio aproximadamente a 250 °C y el último hasta los 328 °C degradándose gradualmente hasta los 1000 °C, que se le puede atribuir a los principales productos de la pirolisis de la epicatequina que son catecol y 4-metilcatecol [109]. La pérdida de masa del colágeno comprende tres etapas: la eliminación del agua absorbida físicamente de 30 a 98 °C; la degradación de la estructura de la molécula del colágeno que corresponde de 230 a 372 °C; y la combustión de componentes residuales orgánicos que inicia a 380 °C y Batista Thelma et. al [110] menciona que esta última etapa comprende hasta los 650 °C, sin embargo en el presente trabajo se llevó a cabo el proceso hasta los 500 °C y es quizá por ello que se tiene un residuo del 27% (Ver Anexo C) [62].

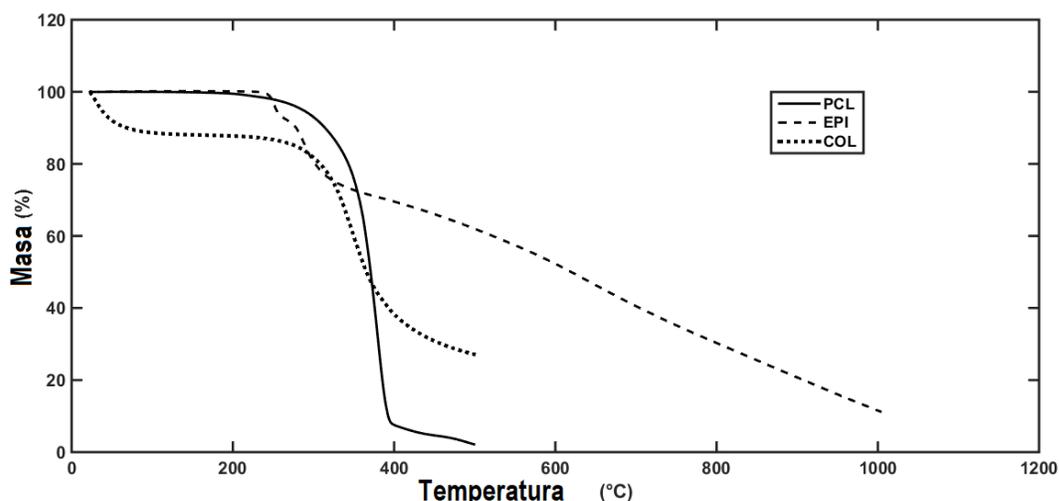


Fig. 30 Termograma de la pérdida de masa de PCL, EPI y COL.

El PCL presenta un único paso de la descomposición a 380 °C que corresponde a la ruptura de la cadena de poliéster vía reacción de cis-eliminación y despolimerización de los extremos de la cadena polimérica [16]. Las temperaturas de descomposición de los andamios PCL, PCL-COL, PCL-EPI y PCL-EPI-COL se muestran en la Fig. 31. La adición de epicatequina, colágeno o ambos al andamio dio lugar a un desplazamiento de la temperatura en lo que refiere a la pérdida de masa, de 317 a 362 °C, el incremento en las temperaturas de degradación también fue encontrado por Aguirre et. al [111] cuando añadió colágeno y elastina a la PCL. Este incremento se podría explicar debido a la interacción de PCL con la estructura del colágeno que se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno inter e intra-cadena, y los compuestos fenólicos de los vegetales que pueden

establecer enlaces cruzados con la PCL a través de múltiples enlaces de hidrógeno [112]. El tratamiento con polifenoles conduce a la mejora de la estabilidad hidrotérmica del colágeno y se asocia a las interacciones entre las moléculas de polifenol y de colágeno; también se producen interacciones más fuertes, que proporcionan una gran estabilidad a las matrices de colágeno [113].

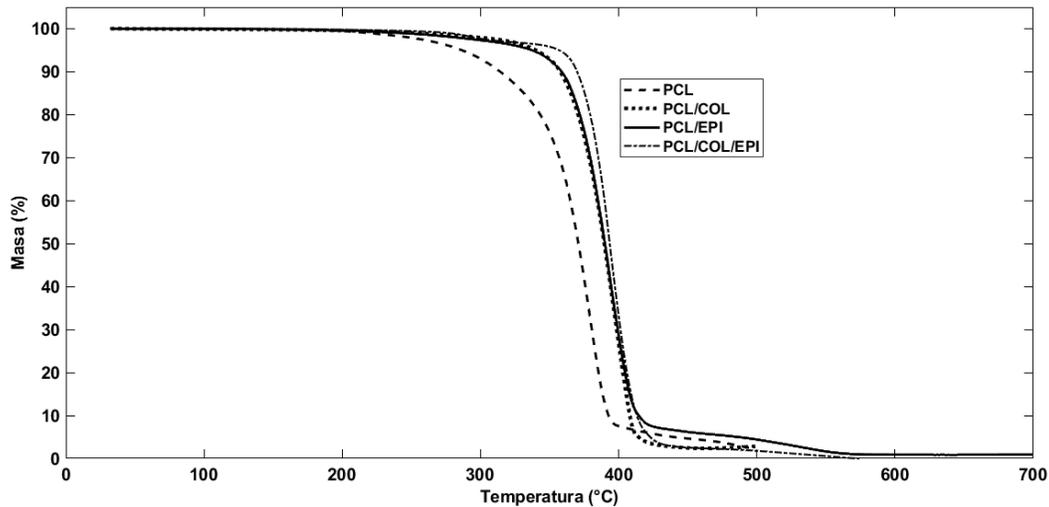


Fig. 31. Termograma de las diferentes pérdidas de masa de los andamios PCL, PCL-COL, PCL-EPI y PCL-COL-EPI.

Se cree que las regiones amorfas de la PCL se caracterizan por su elasticidad debido a la naturaleza semicristalina de la PCL. El polímero prístino es frágil, rígido y sólido por debajo del punto de fusión. Cabe destacar que antes del análisis por DSC, la PCL pasó por un proceso de electrohilado y se ha reportado que durante el electrohilado se forman esferulitas dendríticas ortorrómbicas en las fibras de los andamios [114]. La Fig. 32 muestra los termogramas por DSC de los andamios de PCL, PCL/COL, PCL/EPI/COL, y PCL/EPI. Las propiedades térmicas del termograma DSC del PCL son similares a las reportadas por otros autores [115–117]. Se encontró que la temperatura de fusión (T_m) aumenta ligeramente cuando el PCL se mezcla con COL, EPI, o ambos. Cuando se mezcla con PCL-COL-EPI, las posibles interacciones de hidrógeno entre las moléculas de EPI y COL (Fig. 28) mejoran la estabilidad hidrotérmica [118]. Los andamios de PCL-COL tuvieron el mayor calor de fusión y cristalinidad (Tabla 11). La naturaleza de la proteína puede explicar este hallazgo, porque su estructura contiene fibrillas de colágeno como bloques de construcción elementales, y fue un microdespliegue que permitió la interacción con el PCL igual cabe destacar que en el termograma del TGA del colágeno (

Fig. 30) se muestra una pérdida de masa por el residuo de agua de 30-98 °C y lo más probable es que por eso se tenga un alto calor de fusión[21,22].

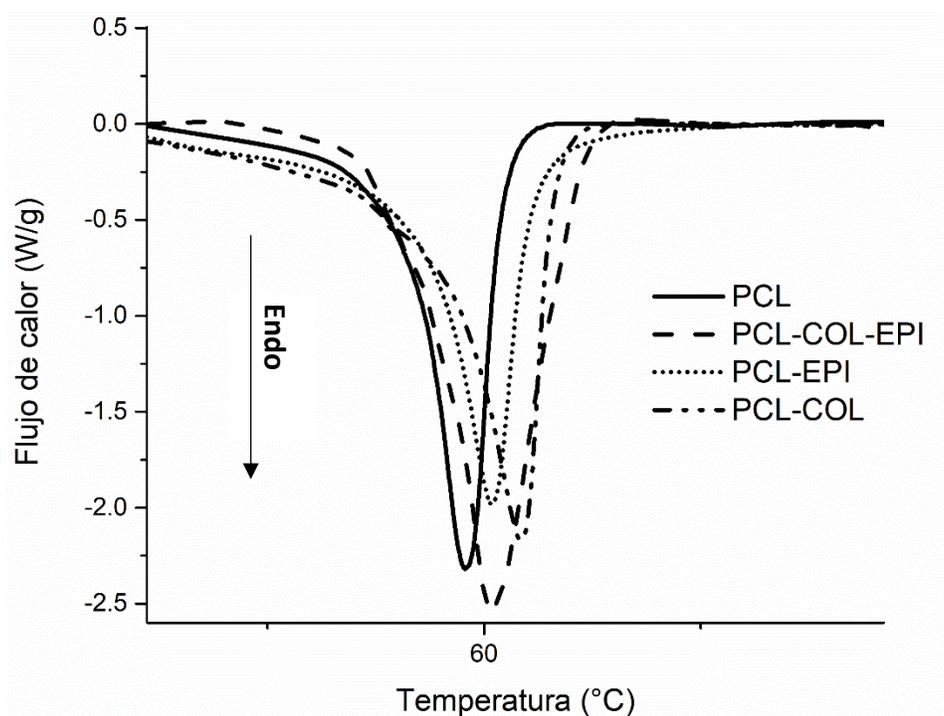


Fig. 32. Termogramas por DSC de los diferentes andamios obtenidos con PCL, PCL-COL, PCL-EPI y PCL-COL-EPI

Tabla 11. Punto de fusión, entalpía y cristalinidad de los andamios electrohilados

Muestra	T _m (°C) ²	ΔH (J/g) ³	X _c (%)
PCL	59.34 ± 0.22	58.47 ± 5.52	41.18
PCL-COL	62.23 ± 0.51	67.76 ± 2.03	49.20
PCL-COL-EPI	60.21 ± 0.47	59.07 ± 4.6	45.46
PCL-EPI	60.20 ± 0.12	58.67 ± 0.96	43.86

² Promedio ± SEM

³ Promedio ± SEM

11.7 Propiedades mecánicas

Con el fin de conocer las propiedades mecánicas de los andamios electrohilados se realizaron ensayos de tensión (Fig. 34). Es posible observar en la Fig. 33 que no hay diferencia significativa en la tensión de carga última entre los andamios de PCL, PCL-EPI, PCL-COL y PCL-COL-EPI. Entre los andamios de PCL-EPI, PCL-COL y PCL-COL-EPI no existe diferencia significativa en el módulo de Young, no obstante, si existe una diferencia significativa entre los andamios de PCL, PCL-COL y entre los de PCL, PCL-COL-EPI. Donde realmente se nota una diferencia significativa es en el gráfico de deformación de carga última. Se perciben dos grupos, uno representa a los andamios de PCL y PCL-EPI y por el otro se tienen los andamios de PCL-COL y PCL-COL-EPI, esto podría explicarse, en parte, porque tanto la proteína hizo más rígido y resistente a los andamios, pero redujeron su deformación, mientras que el flavonoide actuó como un lubricante entre las moléculas de PCL. Los diámetros de las fibras fueron más delgadas para los andamios de PCL-COL y PCL-COL-EPI, ya que el colágeno es un polielectrolito que ayuda a producir fibras más delgadas. Por lo tanto, en la prueba de tensión estos andamios presentaron menor deformación a la ruptura (Fig. 33) [114,119].

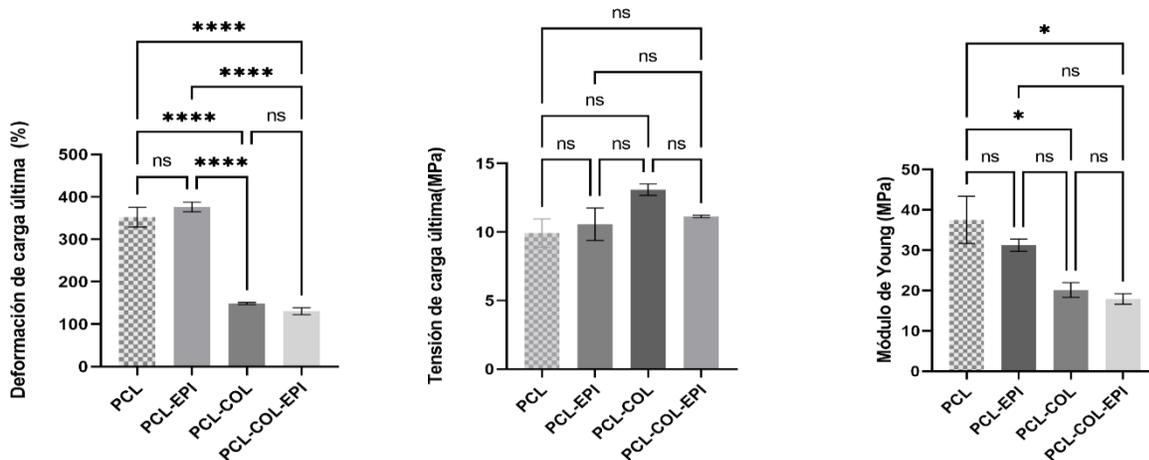


Fig. 33 Diferencias entre los andamios en la deformación de carga última, tensión de carga última y módulo de Young. No significativo (ns) $p \leq 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

En la Fig. 35 se puede apreciar que los andamios que tienen mayor deformación de carga última

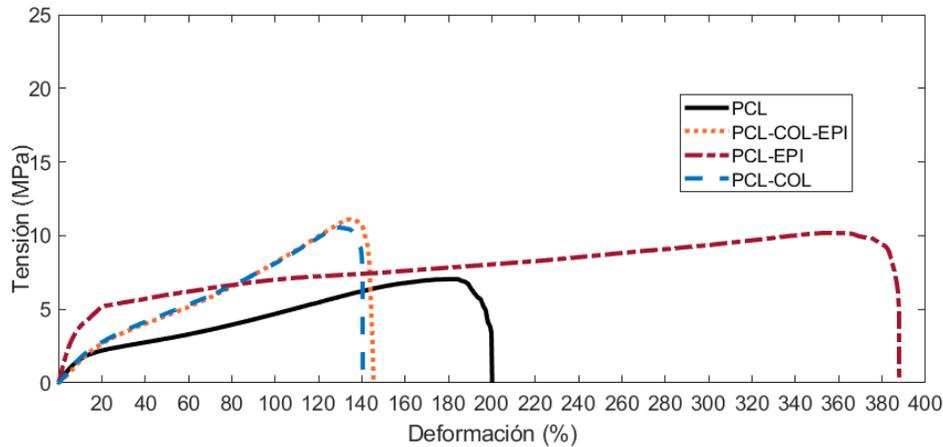


Fig. 34. Diagrama del ensayo-tensión de los diferentes andamios

tienen un diámetro de fibra alto y porosidad baja, aunque no se observa una tendencia de la deformación de carga última con el área entre fibras; el andamio de PCL posee un área entre fibras alto y también una alta deformación de carga última, el substrato de PCL-COL tiene un área entre fibras bajo y también presenta una baja deformación de carga última. No obstante, al agregar epicatequina se intercambia la tendencia, ya que, aunque presenta un área entre fibras bajo se tiene

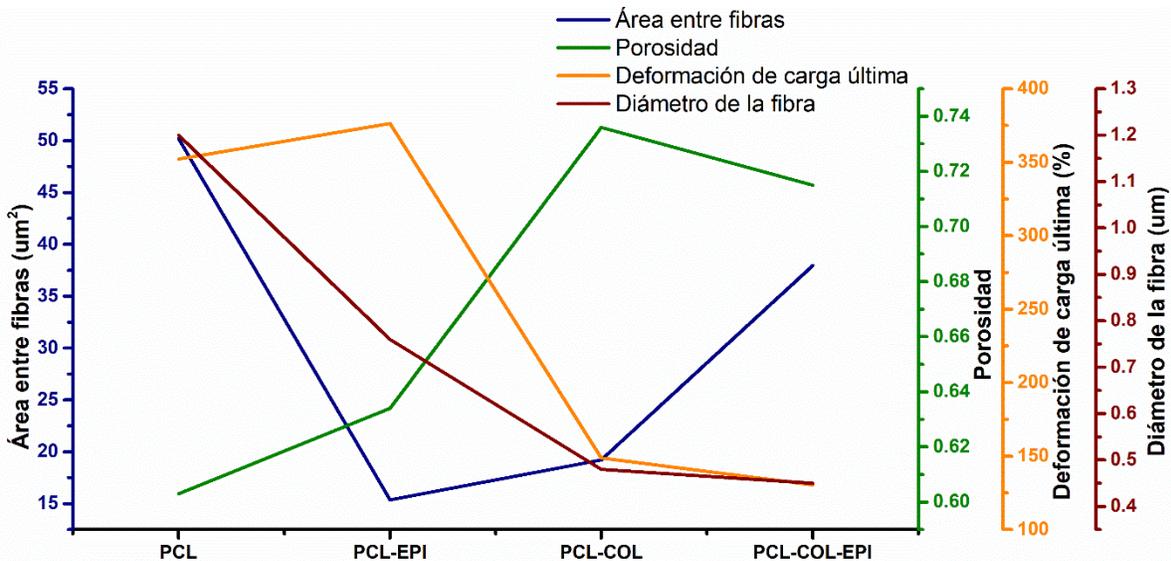


Fig. 35 Relación del diámetro y área entre fibras, porosidad y la deformación de carga última.

una alta deformación de carga última, mientras que el andamio de PCL-COL-EPI tiene un área entre fibras alto y disminuye la deformación de carga última. Es probable que la adición de epicatequina produzca un efecto plastificante en las propiedades mecánicas, provocando una alta

deformación de carga última[120]. Wong et al [121] argumenta que el efecto del diámetro en las fibras de PCL en las propiedades mecánicas es más predominante para fibras con diámetros menores a 0.7 μm . Como ya se había mencionado, la disminución de las fibras en los andamios aquí obtenidos se debió a la naturaleza polielectrolítica del colágeno y de la epicatequina. La explicación del mejoramiento de las propiedades mecánicas al disminuir el diámetro de la fibra, es debido a que al estirar la disolución polimérica en el proceso de electrohilado, se produce una alta orientación de las cadenas macromoleculares, sin embargo, en este caso no se tiene únicamente PCL, sino que también hay colágeno y epicatequina, que es probable que interactúen con la cadena polimérica no permitiendo del todo esta orientación y reducen la cohesión entre las moléculas de PCL, lo que se refleja en una disminución de la deformación de carga última.

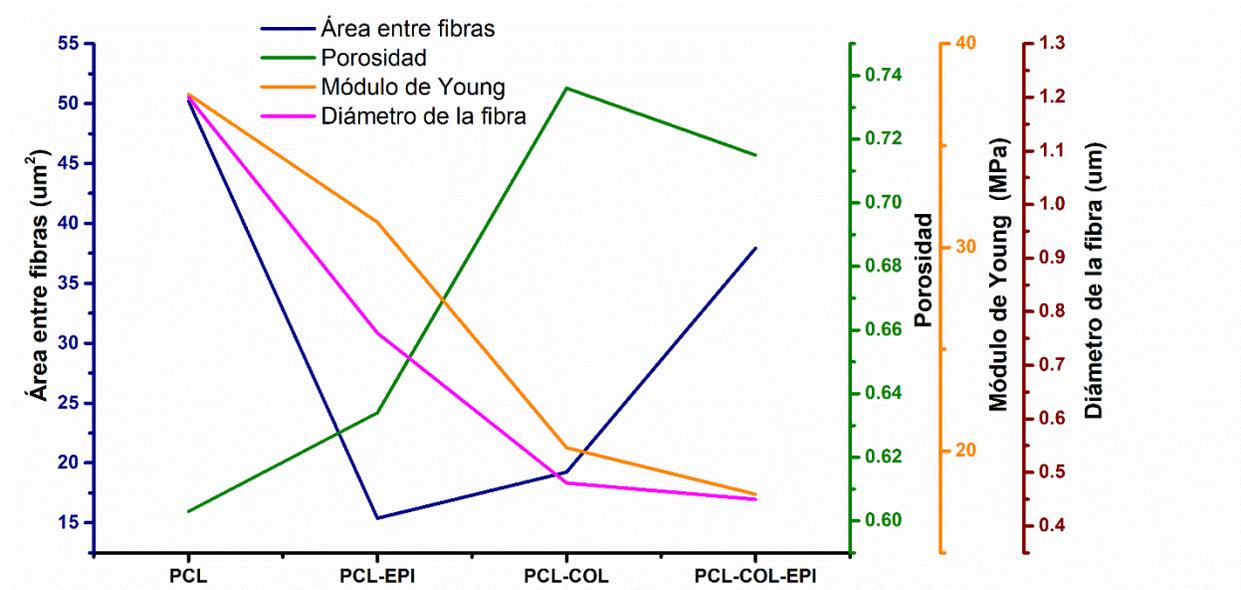


Fig. 36 Relación del diámetro y área entre fibras, porosidad y Módulo de Young.

En la Fig. 36 se puede observar que el diámetro de la fibra y el módulo de Young están relacionados: mayor diámetro de la fibra, mayor módulo de Young. El efecto contrario se observa en la porosidad, ya que se observó que a menor porosidad se presenta mayor módulo de Young. Una alta orientación en la cadena polimérica resulta en el incremento del módulo de Young, es por tanto posible que el colágeno, la epicatequina o los dos juntos, interaccionaron con las cadenas de la PCL provocando que disminuyera la orientación de estas y por lo tanto se presentara un menor módulo de Young[122]. Por otro lado, una baja porosidad resulta en una alta densidad de empaquetamiento y por tanto un incremento en el módulo de Young[122], que es la tendencia que se presenta en la Fig. 36. En el área entre fibras cuando se trata del andamio de PCL, si el área es alta, también lo es el módulo de Young, pero no es así con el andamio de PCL-COL-EPI donde el

área también es alta, pero el módulo de Young no lo es. Cuando el área es baja en el substrato de PCL-COL, también lo es en el módulo de Young. Con respecto al andamio de PCL-EPI, su área entre fibras también es baja, pero no así el módulo de Young.

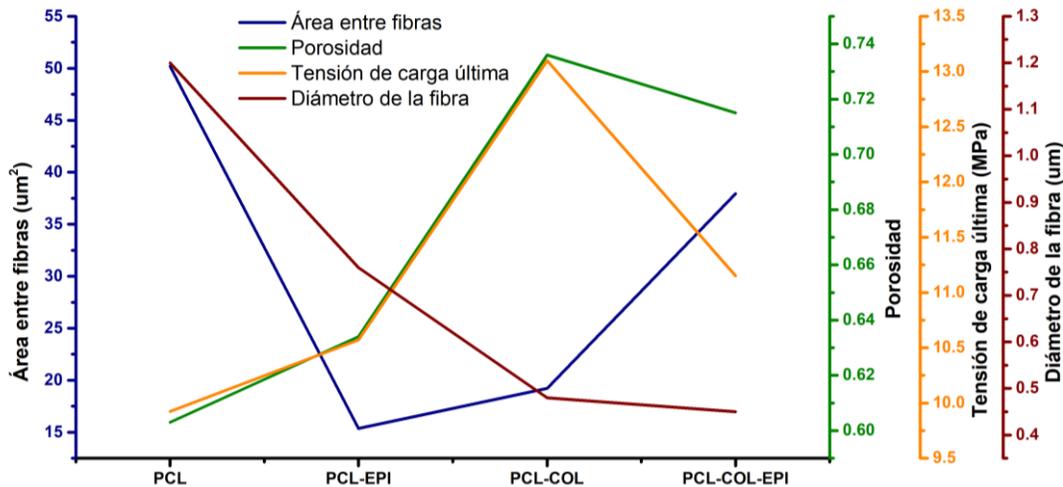


Fig. 37 Relación del diámetro y área entre fibras, porosidad y Tensión de carga última.

La tensión de carga última se relaciona con la porosidad: para los andamios de PCL-COL, a mayor tensión de carga última, mayor porosidad (Fig. 37). La tensión de carga última se comporta de forma opuesta, por lo que, una menor tensión de carga última se presenta a mayor diámetro de la fibra. Esto se puede atribuir a que con diámetros de fibra delgados, la epicatequina y el colágeno no permitieron una cierta orientación molecular durante el estiramiento de la disolución polimérica en el proceso de electrohilado, modificando sus propiedades elastoméricas, permitiendo una mayor tensión de carga última[122]. De igual manera se notan ciertas tendencias con lo que se refiere al área entre fibras; en el andamio de PCL a mayor área entre fibras menor tensión de carga última pero no sucede así con el andamio de PCL-COL-EPI, ya que igual posee un área alta, pero su tensión de carga última es baja y por el otro lado se tiene el andamio de PCL-COL que tiene un área entre fibras bajo y su tensión de carga última es alta pero el substrato de PCL-EPI igual tiene un área entre fibras bajo y su tensión de carga última es baja.

11.8 Cultivo celular

Para evaluar la biocompatibilidad de los andamios, se marcaron los cardiomiocitos con calceína-AM y yoduro de propidio (PI). La calceína-AM entra pasivamente en las células metabólicamente activas. Una vez dentro, la calceína-AM es convertida por las esterasas citosólicas en calceína verde fluorescente, etiquetando así las células vivas; en sentido contrario, el yoduro de propidio (PI) es un colorante de tinción de núcleos impermeable a la membrana celular, por lo que cuando las membranas celulares se ven comprometidas, el PI accede al ADN y entonces, la fluorescencia de las células aumenta drásticamente, por lo que se utiliza para etiquetar células muertas. La Fig. 38 muestra que en cada uno de los andamios PCL, PCL-EPI, PCL-COL, y PCL-COL-EPI las células se tiñen principalmente con calceína (Fig. 38 primera columna), y sólo una proporción muy pequeña de células se tiñen con PI (Fig. 38 segunda columna, células muertas), demostrando la biocompatibilidad de las células con los andamios. El panel inferior de la Fig. 38 muestra el control negativo con cardiomiocitos muertos expuestos a Triton X-100 0,1%, que es un detergente utilizado para desnaturalizar las membranas celulares, por lo que el PI tiñe el ADN de las células muertas.

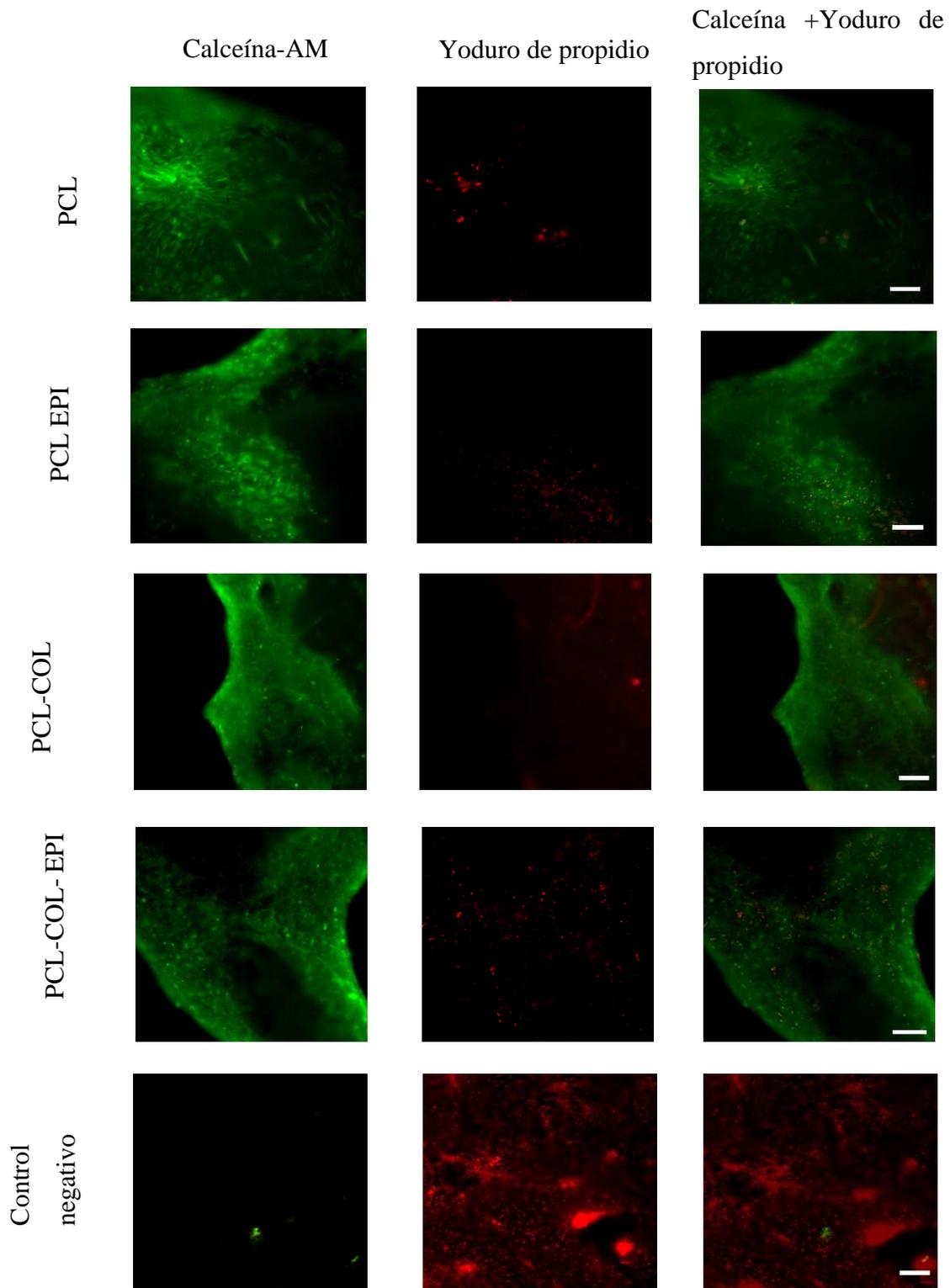


Fig. 38 Imágenes representativas de los cardiomiocitos vivos tras 24 h de cultivo marcados con calceína (primera columna) y cardiomiocitos muertos tratados con yoduro de propidio (segunda columna), la superposición de los dos colorantes para cada condición se muestra en la tercera columna. Los cardiomiocitos muertos (control negativo) etiquetados con yoduro de propidio tras ser expuestos a Triton X-100 0,1% se muestran en el panel inferior. Escala = 100 μ m

Se analizó la contractilidad de los cardiomiocitos al ser cultivados en los diferentes andamios PCL, PCL-EPI, PCL-COL y PCL-COL-EPI y se observó que la microtopografía afecta a la organización y función de estas células[24]. Se obtuvieron gráficos de la intensidad de la fluorescencia en función del tiempo para identificar las señales de calcio intracelular, y las zonas de altos valores de fluorescencia coincidían con células que tenían enormes fluctuaciones de calcio intracelular, mientras que las regiones con baja fluorescencia correspondían a zonas menos activas (Tabla 12) [32].

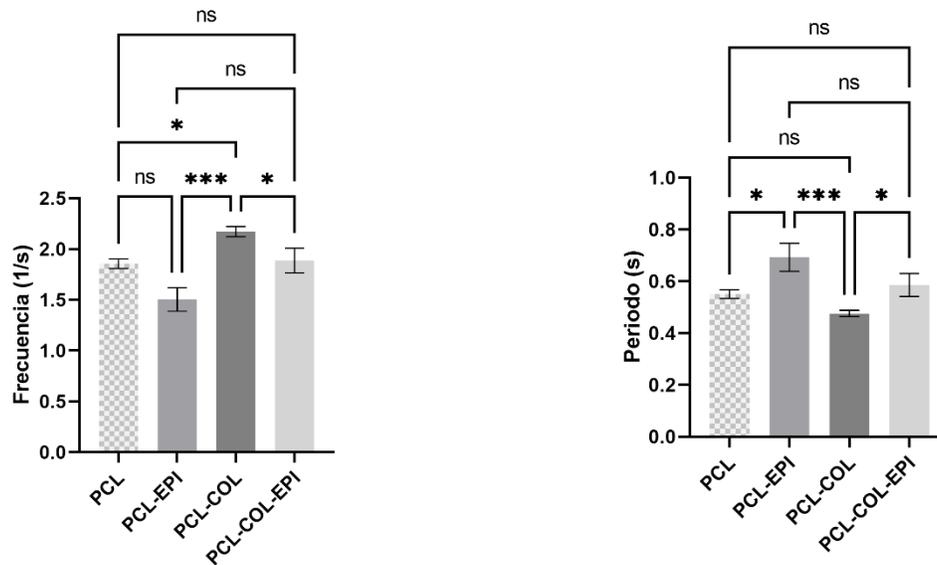


Fig. 39 Frecuencia y periodo de los cardiomiocitos en los diferentes andamios PCL, PCL-EPI, PCL-COL y PCL-COL-EPI.

En la segunda columna de la (Tabla 12) se muestra una imagen representativa del cultivo celular de cada uno de los andamios (PCL, PCL-EPI, PCL-COL y PCL-COL-EPI), y la numeración representa la secuencia de los sitios con mayor fluorescencia, mientras que en la tercera columna se representa cada numeración en un gráfico versus la fluorescencia. Las líneas punteadas en el andamio de PCL indican cómo el pico de las ondas no coincide entre las diferentes numeraciones, lo que indica que no hay sincronización en el andamio; un comportamiento similar se puede observar en el andamio PCL-EPI, además de que la adición de la epicatequina disminuyó la frecuencia de las ondas. En los andamios PCL-COL-EPI y PCL-COL, las líneas de puntos indican cómo las crestas de las ondas coinciden entre los diferentes números, lo que indica sincronía en la actividad de los cardiomiocitos. Además, se observó que el colágeno aumentaba la frecuencia de las ondas; es decir, hay una mayor actividad de los cardiomiocitos, pero la frecuencia de las ondas

volvió a disminuir cuando se añadió epicatequina. La Fig. 39 mostró el aumento significativo de la actividad de los cardiomiocitos tras la adición de colágeno al andamio.

El patrón de actividad indicó una fuerte correlación entre la morfología de las fibras y las propiedades mecánicas. Los andamios de PCL y PCL-EPI mostraron tener un módulo de Young y una deformación a la ruptura mayor. En consecuencia, las células no mostraron una actividad sincronizada, las señales de calcio no cambiaron simultáneamente y no hubo una capa continua de células conectadas en el electrohilado de PCL-COL.

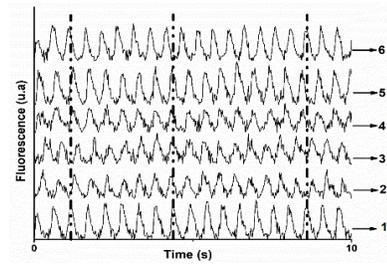
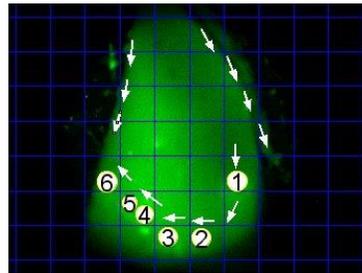
Los sustratos PCL-COL-EPI tenían el menor diámetro de fibra, módulo de Young y deformación a la ruptura; en estas estructuras se observó la actividad contráctil sincronizada de los cardiomiocitos. Además, se encontraron variaciones coordinadas de $[Ca^{+2}]_{int}$ a lo largo de toda la plataforma. Münch et al.[123] mencionaron que los cardiomiocitos in vitro funcionan mejor cuando los valores de rigidez de los sustratos son similares a los del miocardio en desarrollo, se ha reportado que la rigidez de ventrículo izquierdo es cerca de 10-20 kPa[3]. El colágeno proporciona esa rigidez [123], lo que explica el comportamiento mejor sincronizado de los cardiomiocitos de pollo en los andamios PCL-COL y PCL-COL-EPI.

El andamio con sólo PCL tiene la mayor rigidez, y la adición de colágeno, epicatequina o ambos disminuyó la rigidez que permitió un mejor rendimiento de los cardiomiocitos, pero el ángulo de contacto también fue un factor indicativo de la adhesión celular. Un ángulo de contacto menor indica una mejor interacción de los grupos funcionales con las células, y los andamios con los valores más bajos fueron PCL-COL y PCL-COL-EPI. La epicatequina con poli(caprolactona) no permitió la sincronización de la actividad de los cardiomiocitos de pollo; en cambio, las células formaron agregados dispersos. El flavonoide por sí mismo fue ineficaz para aumentar la frecuencia y la sincronización de la actividad de los cardiomiocitos de pollo; sin embargo, fue eficaz cuando se combinó con colágeno. La estructura química de la epicatequina contiene grupos hidroxilos y dobles enlaces que permiten interacciones con el colágeno [124]. Qu et al. [124] informaron de que la epicatequina sirve de protector cardiovascular al producir monóxido de nitrógeno (NO), que es un regulador de la relajación dependiente del endotelio. La actividad de los cardiomiocitos depende de las propiedades morfológicas y mecánicas y de que tan hidrófilos sean los andamios, ya que estas propiedades varían en función de si contienen colágeno, epicatequina o una combinación de ambos.

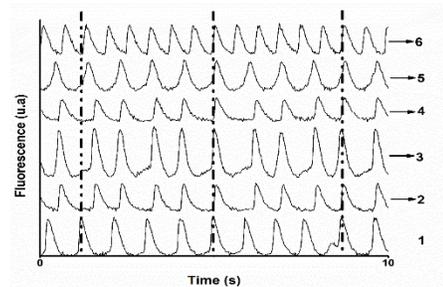
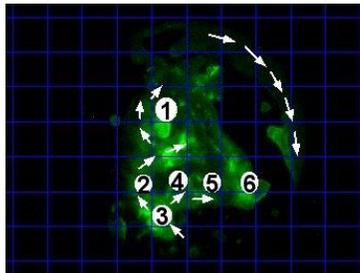
Tabla 12. Comportamiento de los cardiomiocitos embrionarios del pollo

Muestra

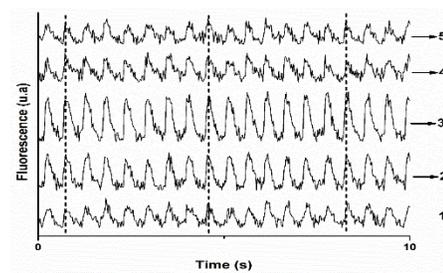
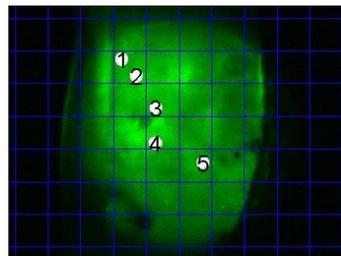
PCL



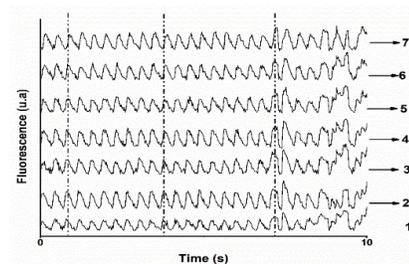
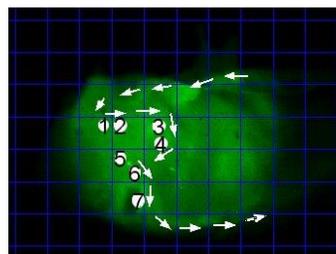
PCL-EPI



PCL-COL



PCL-COL-EPI



12 Conclusiones

- Todos los andamios resultaron biocompatibles y mostraron viabilidad celular con los cardiomiocitos de embrión de pollo.
- Se obtuvieron por primera vez los patrones de actividad espontánea de los cardiomiocitos de embrión de pollo en los andamios de poli (ϵ -caprolactona) (PCL), colágeno (COL) y epicatequina (EPI), los que mostraron diferencias en cuanto a período, frecuencia y sincronización de contracción espontánea.
- La frecuencia de actividad espontánea de los cardiomiocitos en los andamios del PCL-COL aumentó significativamente en comparación con los andamios de PCL, mientras que la EPI disminuyó significativamente la actividad de los cardiomiocitos. En tanto, los andamios que contenían COL y/o EPI mostraron una actividad intermedia entre los andamios de PCL-COL y PCL-EPI. El COL permitió la sincronización de la actividad de los cardiomiocitos mientras que en los andamios de PCL-COL y PCL-EPI no hubo sincronización.
- El diámetro de las fibras disminuyó significativamente con la adición de COL y/o EPI.
- La adición de EPI aumento el módulo de Young y la hidrofobicidad, por el contrario, el COL disminuyó significativamente la hidrofobicidad y el módulo de Young.
- De nuestros hallazgos se desprende que es posible diseñar andamios de PCL con COL y/o EPI con características de frecuencia de contracción, propiedades mecánicas e hidrofilia requeridas que permitan su aplicación en el tratamiento y prevención de las enfermedades cardiovasculares.

13 Anexo A

Medición de la porosidad del andamio por el método de intrusión de un líquido

Para calcular la porosidad del andamio se tiene la siguiente fórmula:

$$\varepsilon = \frac{\overline{V_{AI}}}{\overline{V_{AI}} + \overline{V_{TA}}} \quad (1)$$

Donde:

$\overline{V_{AI}}$ = Volumen promedio del alcohol introducido

$\overline{V_{TA}}$ = Volumen promedio total del andamio

Se tiene:

$$\varepsilon = \bar{\varepsilon} \pm \mathcal{U}_c(\varepsilon) \quad (2)$$

Donde:

$\bar{\varepsilon}$ = Incertidumbre promedio

$\mathcal{U}_c(\varepsilon)$ = Incertidumbre combinada de la porosidad

De lo cual:

$$V_{AI} = \overline{V_{AI}} \pm \mathcal{U}_c(V_{AI}) \quad (3)$$

$$V_{TA} = \overline{V_{TA}} \pm \mathcal{U}_c(V_{TA}) \quad (4)$$

Donde:

$\mathcal{U}_c(V_{AI})$ = Incertidumbre combinada del volumen del alcohol introducido

$\mathcal{U}_c(V_{TA})$ = Incertidumbre combinada del volumen total del andamio

Al ser la porosidad una medida indirecta se tiene:

$$\mathcal{U}_c(\varepsilon) = \sqrt{\left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial \overline{V_{AI}}}\right)_{\overline{V_{TA}}}^2 \mathcal{U}_c^2(V_{AI}) + \left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial \overline{V_{TA}}}\right)_{\overline{V_{AI}}}^2 \mathcal{U}_c^2(V_{TA})} \quad (5)$$

$$\left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial \overline{V_{AI}}}\right)_{\overline{V_{TA}}} = \frac{\overline{V_{TA}}}{(\overline{V_{AI}} + \overline{V_{TA}})^2} \quad (6)$$

$$\left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial \bar{V}_{TA}}\right)_{\bar{V}_{AI}} = -\frac{\bar{V}_{AI}}{(\bar{V}_{AI} + \bar{V}_{TA})^2} \quad (7)$$

Sustituyendo (6) y (7) en (5) queda:

$$u_c(\varepsilon) = \sqrt{\left(\frac{\bar{V}_{TA}}{(\bar{V}_{AI} + \bar{V}_{TA})}\right)^2 u_c^2(V_{AI}) + \left(-\frac{\bar{V}_{AI}}{(\bar{V}_{AI} + \bar{V}_{TA})}\right)^2 u_c^2(V_{TA})} \quad (8)$$

De lo cual se deduce lo siguiente:

$$\bar{V}_{AI} = \left(\frac{\bar{m}_2 - \bar{m}_1}{\rho_{Etanol}}\right) \quad (9)$$

$$\bar{V}_{TA} = \bar{r}^2 \pi \bar{\delta} \quad (10)$$

Donde:

$\bar{m}_2 =$ Masa promedio del andamio húmedo con etanol

$\bar{m}_1 =$ Masa del andamio seco

$\bar{\rho}_{Etanol} =$ Densidad promedio del etanol

$\bar{r} =$ radio promedio del andamio

$\bar{\delta} =$ Espesor del andamio

De igual forma:

$$m_2 = \bar{m}_2 \pm U_c(m_2) \quad (11)$$

$$m_1 = \bar{m}_1 \pm U_c(m_1) \quad (12)$$

$$\rho_{Etanol} = \bar{\rho}_{Etanol} \pm U_c(\rho_{Etanol}) \quad (13)$$

$$r = \bar{r} \pm U_c(r) \quad (14)$$

$$\delta = \bar{\delta} \pm U_c(\delta) \quad (15)$$

$U_c(m_2) =$ Incertidumbre combinada de la masa del andamio humedo con etanol

$U_c(m_1) =$ Incertidumbre combinada del andamio seco

$U_c(r) =$ Incertidumbre combinada del radio del andamio

$c(\delta) =$ Incertidumbre combinada del espesor del andamio

Al ser $\overline{V_{AI}}$ una medición indirecta se tiene:

$$u_c(V_{AI}) = \sqrt{\left(\frac{\partial \overline{V_{AI}}}{\partial \overline{m_2}}\right)^2_{\overline{m_1}, \overline{\rho_{Etanol}}} u_c^2(m_2) + \left(\frac{\partial \overline{V_{AI}}}{\partial \overline{m_1}}\right)^2_{\overline{m_2}, \overline{\rho_{Etanol}}} u_c^2(m_1) + \left(\frac{\partial \overline{V_{AI}}}{\partial \overline{\rho_{Etanol}}}\right)^2_{\overline{m_2}, \overline{m_1}} u_c^2(\rho_{Etanol})} \quad (16)$$

$$\left(\frac{\partial \overline{V_{AI}}}{\partial \overline{m_2}}\right)_{\overline{m_1}, \overline{\rho_{Etanol}}} = \frac{1}{\overline{\rho_{Etanol}}} \quad (17)$$

$$\left(\frac{\partial \overline{V_{AI}}}{\partial \overline{m_1}}\right)_{\overline{m_2}, \overline{\rho_{Etanol}}} = -\frac{1}{\overline{\rho_{Etanol}}} \quad (18)$$

$$\left(\frac{\partial \overline{V_{AI}}}{\partial \overline{\rho_{Etanol}}}\right)_{\overline{m_2}, \overline{m_1}} = -\frac{\overline{m_2} - \overline{m_1}}{\overline{\rho_{Etanol}}^2} \quad (19)$$

Sustituyendo (12), (13) y (14) en (11) queda:

$$u_c(V_{AI}) = \sqrt{\left(\frac{1}{\overline{\rho_{Etanol}}}\right)^2 u_c^2(m_2) + \left(-\frac{1}{\overline{\rho_{Etanol}}}\right)^2 u_c^2(m_1) + \left(-\frac{\overline{m_2} - \overline{m_1}}{\overline{\rho_{Etanol}}^2}\right)^2 u_c^2(\rho_{Etanol})} \quad (20)$$

Las mediciones de las masas fueron mediciones directas, entonces:

$$u_c(m_2) = \sqrt{u_A^2(m_2) + u_B^2(m_2)} \quad (21)$$

Donde:

$u_A(m_2)$ = Incertidumbre Tipo A de la masa del andamio humedo con etanol

$u_B(m_2)$ = Incertidumbre Tipo B de la masa del andamio humedo con etanol

La incertidumbre Tipo A se calcula con la desviación estándar (S) de las (n) mediciones que se realicen, en este caso las mediciones de las masas tanto cuando él andamio está húmedo que cuando está seco:

$$u_A(m_2) = \frac{S(L)}{\sqrt{n}} \quad (22)$$

$$S(m_2) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (23)$$

La incertidumbre Tipo B depende del equipo con el cual se realizó la medición, para una balanza analítica digital se tiene:

$$u_{cE} = k u_B(m_2) \quad (24)$$

$$u_B(m_2) = \frac{u_{cE}}{k} \quad (25)$$

$$U_B(m_2) = \frac{0.00018}{2} = .00009 \quad (26)$$

Para la medición directa de la masa del andamio seco se tiene:

$$U_c(m_1) = \sqrt{U_A^2(m_1) + U_B^2(m_1)} \quad (27)$$

Donde:

$U_A(m_1)$ = Incertidumbre Tipo A de la masa del andamio seco

$U_B(m_1)$ = Incertidumbre Tipo B de la masa del andamio seco

Se procede de igual manera, como los cálculos que se realizaron para medir la incertidumbre combina de la masa del andamio húmedo con etanol:

$$U_A(m_1) = \frac{S(L)}{\sqrt{n}} \quad (28)$$

$$S(m_2) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (29)$$

$$U_{cE} = k U_B(m_1) \quad (30)$$

$$U_B(m_1) = \frac{U_{cE}}{k} \quad (31)$$

$$U_B(m_1) = \frac{0.00018}{2} = .00009 \quad (32)$$

Para la medición de la densidad del etanol, se realizó con un picnómetro y se procede al cálculo con la siguiente fórmula:

$$\overline{\rho_{Etanol}} = \left(\frac{\overline{m_{picEt}} - \overline{m_{picvac}}}{\overline{V_{pic}}} \right) \quad (33)$$

Donde:

$\overline{m_{picEt}}$ = Masa promedio del picnómetro con etanol

$\overline{m_{picvac}}$ = Masa promedio del picnómetro vacío

$\overline{V_{pic}}$ = Volumen del picnómetro

De igual manera:

$$m_{picEt} = \overline{m_{picEt}} \pm U_c(m_{picEt}) \quad (34)$$

$$m_{picvac} = \overline{m_{picvac}} \pm u_c(m_{picvac}) \quad (35)$$

$$V_{pic} = \overline{V_{pic}} \pm u_c(V_{pic}) \quad (36)$$

Donde:

$u_c(m_{picEt}) =$ Incertidumbre combinada del picnómetro con etanol

$u_c(m_{picvac}) =$ Incertidumbre combinada de la masa del picnómetro vacío

$u_c(V_{pic}) =$ Incertidumbre combinada del volumen del picnómetro

Para la medición indirecta de la densidad del etanol, se tiene:

$$u_c(\overline{\rho_{Etanol}}) = \sqrt{\left(\frac{\partial \overline{\rho_{Etanol}}}{\partial m_{picEt}}\right)^2 \frac{1}{\overline{m_{picvac}} \overline{V_{pic}}}^2 u_c^2(m_{picEt}) + \left(\frac{\partial \overline{\rho_{Etanol}}}{\partial m_{picvac}}\right)^2 \frac{1}{\overline{m_{picEt}} \overline{V_{pic}}}^2 u_c^2(m_{picvac}) + \left(\frac{\partial \overline{\rho_{Etanol}}}{\partial V_{pic}}\right)^2 \frac{1}{\overline{m_{picEt}} \overline{m_{picvac}}}^2 u_c^2(V_{pic})} \quad (34)$$

$$\left(\frac{\partial \overline{\rho_{Etanol}}}{\partial m_{picEt}}\right) \frac{1}{\overline{m_{picvac}} \overline{V_{pic}}} = \frac{1}{\overline{V_{pic}}} \quad (35)$$

$$\left(\frac{\partial \overline{\rho_{Etanol}}}{\partial m_{picvac}}\right) \frac{1}{\overline{m_{picEt}} \overline{V_{pic}}} = -\frac{1}{\overline{V_{pic}}} \quad (36)$$

$$\left(\frac{\partial \overline{\rho_{Etanol}}}{\partial V_{pic}}\right) \frac{1}{\overline{m_{picEt}} \overline{m_{picvac}}} = -\frac{(\overline{m_{picEt}} - \overline{m_{picvac}})}{\overline{V_{pic}}^2} \quad (37)$$

Sustituyendo (35), (36) y (37) en (34), se tiene:

$$u_c(\overline{\rho_{Etanol}}) = \sqrt{\left(\frac{1}{\overline{V_{pic}}}\right)^2 u_c^2(m_{picEt}) + \left(-\frac{1}{\overline{V_{pic}}}\right)^2 u_c^2(m_{picvac}) + \left(-\frac{(\overline{m_{picEt}} - \overline{m_{picvac}})}{\overline{V_{pic}}^2}\right)^2 u_c^2(V_{pic})} \quad (38)$$

Para las mediciones de las masas se calcula como una medición directa, para lo cual, se tiene:

$$u_c(m_{picEt}) = \sqrt{u_A^2(m_{picEt}) + u_B^2(m_{picEt})} \quad (39)$$

$$u_c(m_{picvac}) = \sqrt{u_A^2(m_{picvac}) + u_B^2(m_{picvac})} \quad (40)$$

Para el volumen del etanol, se procede a calcularlo de la siguiente manera:

$$\overline{V_{pic}} = \left(\frac{\overline{m_{picAgl}} - \overline{m_{picvac}}}{\overline{\rho_{Agl}}}\right) \quad (41)$$

Donde:

$\overline{m_{picEt}}$ = Masa promedio del picnómetro con agua desionizada

$\overline{\rho_{AgI}}$ = Densidad del agua desionizada

De igual manera:

$$m_{picEt} = \overline{m_{picEt}} \pm \mathcal{U}_c(m_{picEt}) \quad (42)$$

La densidad del agua desionizada se toma como una constante y se sacó de la literatura que tiene un valor de 0.998 gr/mL, por lo que se procede al cálculo de la incertidumbre combinada y queda:

$$\mathcal{U}_c(V_{pic}) = \sqrt{\left(\frac{\partial \overline{V_{pic}}}{\partial \overline{m_{picAgI}}}\right)_{\overline{m_{picvac}}}^2 \mathcal{U}_c^2(m_{picAgI}) + \left(\frac{\partial \overline{V_{pic}}}{\partial \overline{m_{picvac}}}\right)_{\overline{m_{picAgI}}}^2 \mathcal{U}_c^2(m_{picvac})} \quad (43)$$

$$\left(\frac{\partial \overline{V_{pic}}}{\partial \overline{m_{picAgI}}}\right)_{\overline{m_{picvac}}} = 1 \quad (44)$$

$$\left(\frac{\partial \overline{V_{pic}}}{\partial \overline{m_{picvac}}}\right)_{\overline{m_{picAgI}}} = -1 \quad (45)$$

Sustituyendo (44) y (45) en (43) queda:

$$\mathcal{U}_c(V_{pic}) = \sqrt{(1)^2 \mathcal{U}_c^2(m_{picAgI}) + (-1)^2 \mathcal{U}_c^2(m_{picvac})} \quad (46)$$

La incertidumbre combinada del picnómetro con agua desionizada es una medición indirecta, así que se procede a medirla de la siguiente manera:

$$\mathcal{U}_c(m_{picAgI}) = \sqrt{\mathcal{U}_A^2(m_{picAgI}) + \mathcal{U}_B^2(m_{picAgI})} \quad (47)$$

Por último, para la incertidumbre combinada total del andamio, se tiene:

$$\mathcal{U}_c(V_{TA}) = \sqrt{\left(\frac{\partial \overline{V_{TA}}}{\partial \overline{r}}\right)_{\delta}^2 \mathcal{U}_c^2(r) + \left(\frac{\partial \overline{V_{TA}}}{\partial \delta}\right)_{r}^2 \mathcal{U}_c^2(\delta)} \quad (48)$$

$$\left(\frac{\partial \overline{V_{TA}}}{\partial \overline{r}}\right)_{\delta} = 2\delta r \pi \quad (49)$$

$$\left(\frac{\partial \overline{V_{TA}}}{\partial \delta}\right)_{r} = r^2 \pi \quad (50)$$

Sustituyendo (50) y (49) en (48), queda:

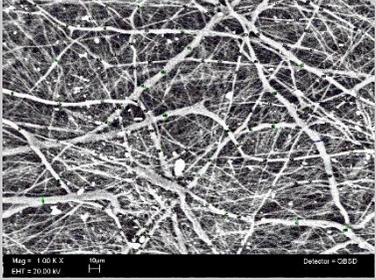
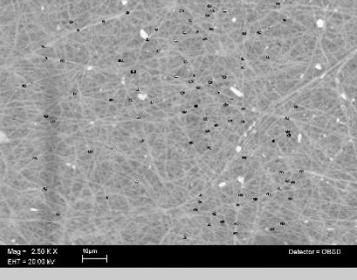
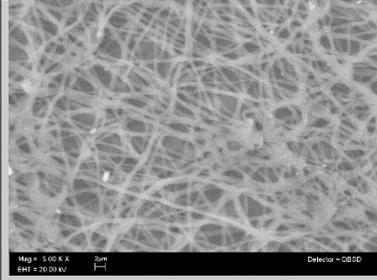
$$u_c(V_{TA}) = \sqrt{(2\bar{\delta}\bar{r}\pi)^2 u_c^2(r) + (r^2\pi)^2 u_c^2(\delta)} \quad (51)$$

El radio y espesor del andamio son mediciones indirectas, para lo cual se procede a calcular, sus respectivas incertidumbres combinadas de la siguiente manera:

$$u_c(r) = \sqrt{u_A^2(r) + u_B^2(r)} \quad (52)$$

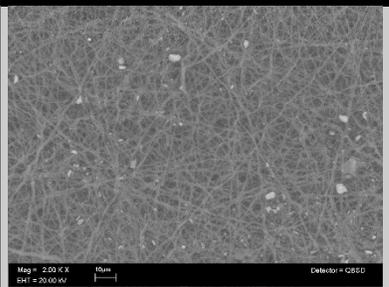
$$u_c(\delta) = \sqrt{u_A^2(\delta) + u_B^2(\delta)} \quad (53)$$

14 Anexo B

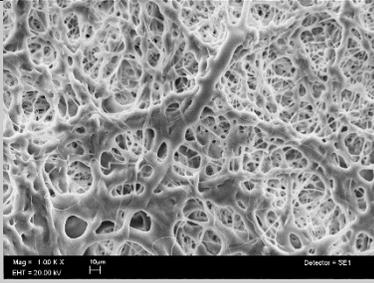
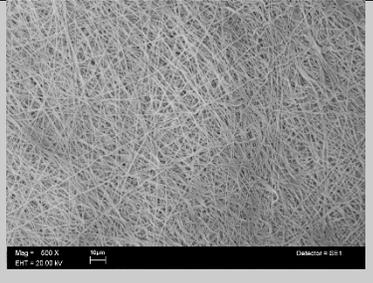
	1	2	3
			
			
Distancia de la aguja al colector (cm)	8	8	8
Diferencial de potencial (kV)	15	15	15
Concentración %(m/v)	12	12	12
Rapidez de Flujo (mL/h)	0.2	0.2	0.6
Tamaño de la aguja (G)	22	22	1.65
HR (%)	2	32	2
Diámetro de la fibra (µm)	2.9215	0.4513	1.4039
Calificación	2	3	1
Calificación (4 bueno, 3 relativamente bueno, 2 regular, 1 malo)	*Se electrohiló entre 10 y 14h *Se ve el cono de Taylor ⁴ después de cierto tiempo de hilado ¹ *El electrohilado no es uniforme *Lo dejé por cierto tiempo y se formó un hilo de polímero en la punta.	*Inicio a las 8h *El electrohilado no es uniforme*Hay pequeños grumos de polímero	*Si se forma la gota de Taylor, pero sale mucho polímero*El tiempo que tarda en llegar el chorro del polímero al sustrato, es lento *El diferencial de potencial es bajo que no permite formarse el cono de Taylor y gotea antes de que la disolución polimérica sea alargada *Hay muchos bulbos y fibras muy deformes

⁴ Cono observado en electrohilado en los que se emite un chorro de partículas cargadas.

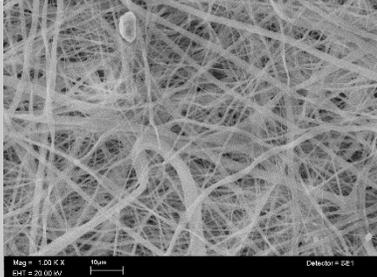
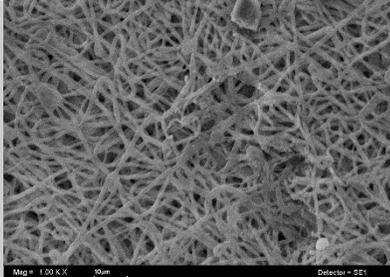
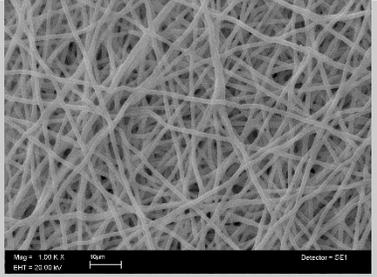
Anexo B

4		5	6
			
			
8	Distancia de la aguja al colector (cm)	8	8
15	Diferencial de potencial (kV)	18	18
12	Concentración % (m/v)	17	17
0.6	Rapidez de Flujo (mL/h)	0.2	0.2
1.65	Tamaño de la aguja (G)	22	22
32	HR (%)	2	32
1.5253	Diámetro de la fibra (µm)	2.4345	2.2581
2	Calificación	1	1
<p>*Ya no hay tanto desperdicio de polímero*Se ven cuentas, gotas de polímero en ciertos puntos*El electrohilado no es uniforme</p>	<p>Calificación (4 bueno, 3 relativamente bueno, 2 regular, 1 malo)</p>	<p>*Las fibras no son uniformes *Bastantes cuentas* El diferencial de potencial es bajo que no permite formarse el cono de Taylor y gotea antes de que la disolución polimérica sea alargada * El electrohilado no es uniforme</p>	<p>*Inicio a las 9h, está nublado* El diferencial de potencial es bajo que no permite formarse el cono de Taylor y gotea antes de que la disolución polimérica sea alargada *Se hacen grumos de polímero*La fibras no son uniformes*Muchas cuentas</p>

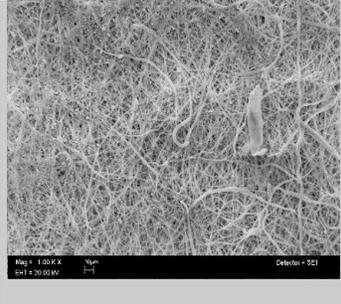
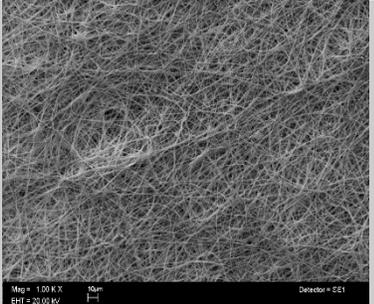
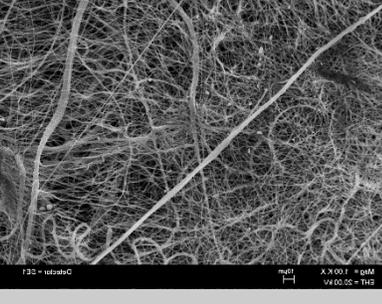
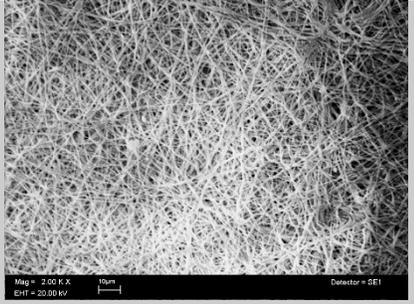
Anexo B

	7	8	9
			
			
Distancia de la aguja al colector (cm)	8	8	15
Diferencial de potencial (kV)	18	18	15
Concentración %(m/v)	17	17	17
Rapidez de Flujo (mL/h)	0.6	0.6	0.2
Tamaño de la aguja (G)	1.65	1.65	1.65
HR (%)	2	32	2
Diámetro de la fibra (µm)	1.4302	2.5815	0.9059
Calificación	1	1	3
Calificación (4 bueno, 3 relativamente bueno, 2 regular, 1 malo)	*No quiere electrohilar*Se va formando el cono de Taylor muy lentamente* El tiempo que tarda en llegar el chorro del polímero al sustrato, es lento * El diferencial de potencial es bajo que no permite formarse el cono de Taylor y gotea antes de que la disolución polimérica sea alargada	*Hay más acumulación de fibras en ciertos puntos del sustrato, debido a la poca distancia que hay entre la aguja de la jeringa y el sustrato que no permite que el disolvente se evapore en su totalidad.	*El tiempo que tarda en llegar el chorro del polímero al sustrato, es lento * El diferencial de potencial es bajo que no permite formarse el cono de Taylor y gotea antes de que la disolución polimérica sea alargada

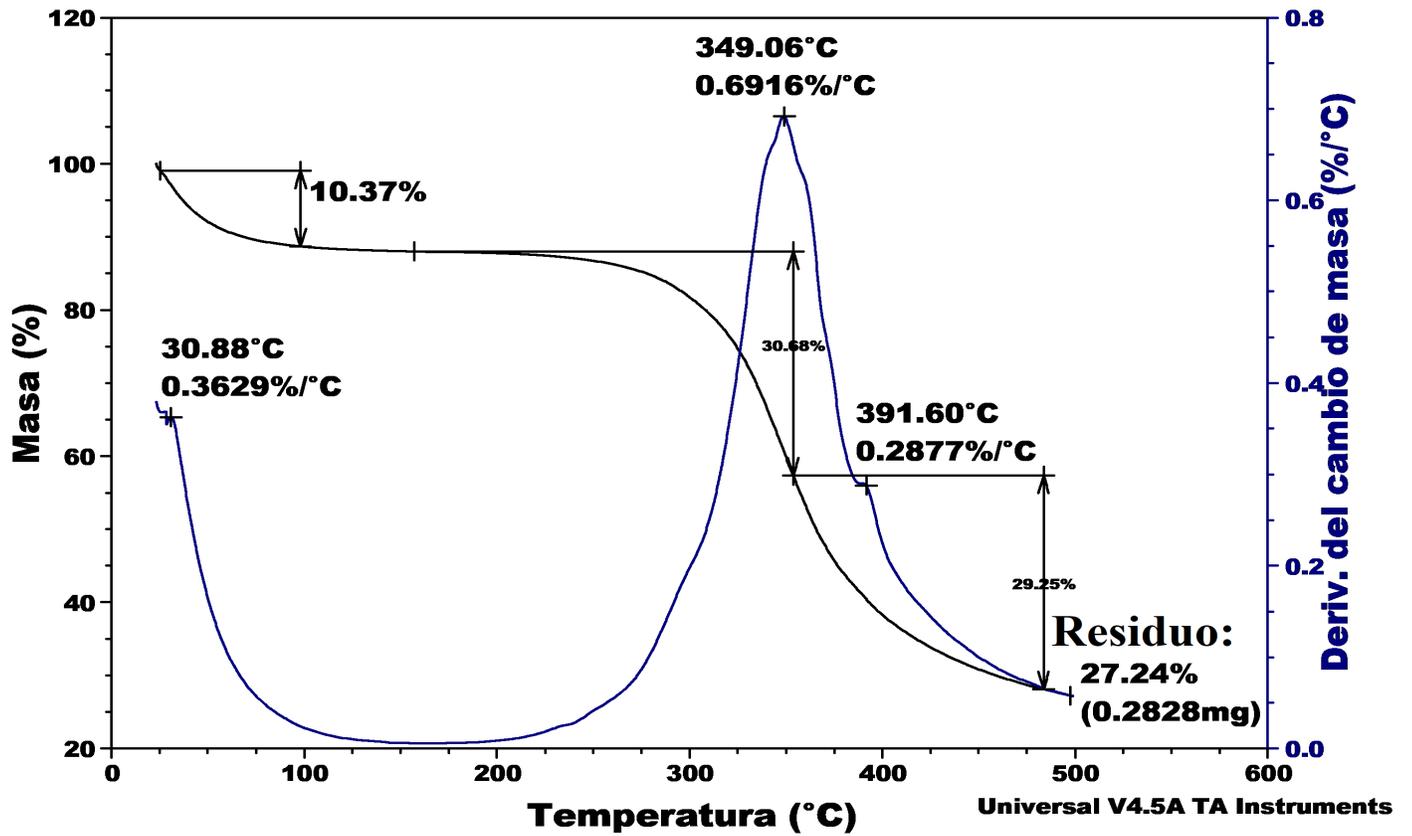
Anexo B

	10	11	12
			
			
Distancia de la aguja al colector (cm)	15	15	15
Diferencial de potencial (kV)	15	15	15
Concentración % (m/v)	17	17	17
Rapidez de Flujo (mL/h)	0.2	0.6	0.6
Tamaño de la aguja (G)	1.65	22	22
HR (%)	32	2	32
Diámetro de la fibra (μm)	1.3074	1.2181	3.5605
Calificación	2.7	2.3	2.8
Calificación (4 bueno, 3 relativamente bueno, 2 regular, 1 malo)	*No se ve que esté electrohilando, el campo eléctrico no es el suficiente para elongar la fibra*Las fibras no se ven deformes y sin tantas cuentas*Se desperdicia mucho polímero.	*Se ve relativamente bien, aunque se desperdicia polímero*No se ven tan deformes, pero hay más acumulación de fibras en ciertos puntos del sustrato. *Algunas fibras se ven uniformes y otras no, si se ve una que otra cuenta	*No se desperdicia tanto polímero como el anterior, pero hay más acumulación de fibras en ciertos puntos del sustrato. *En la micrografía el diámetro de la fibra se ve más uniforme.

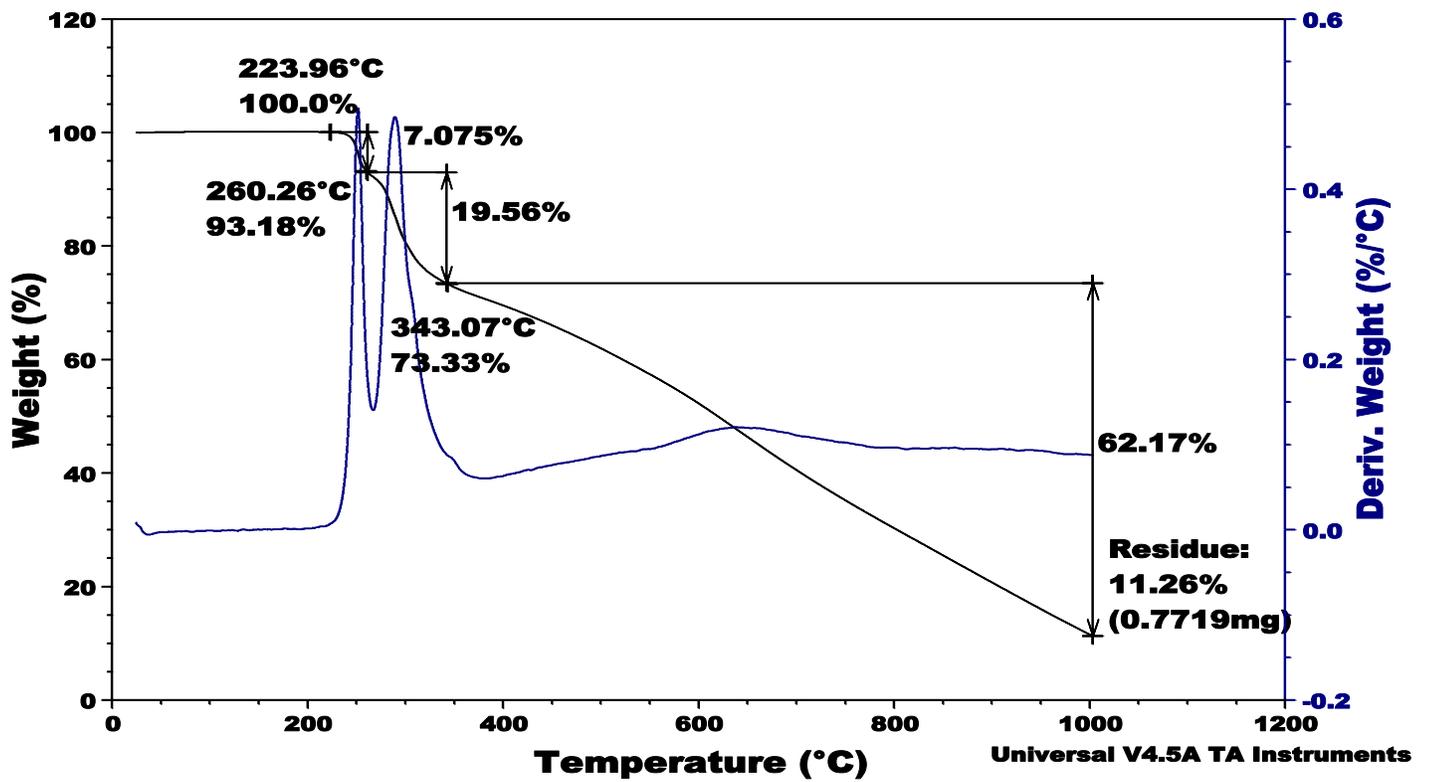
Anexo B

13	14	15	16
			
			
15	15	15	15
18	18	18	18
12	12	12	12
0.2	0.2	0.6	0.6
1.65	1.65	22	22
2	32	2	32
3.4504	1.3031	1.2647	0.8386
3.3	3.3	3.	2.7
<p>*No quiere electrohilar, se forma el cono de Taylor pero la disolución se nota muy viscosa, tomar en cuenta que únicamente dejé disolver como dos horas*Se desperdicia mucho polímero en la punta*Se ven bulbos, fibras deformes*Ya está hilando mejor pero aún se desperdicia polímero*Se está formando telaraña</p>	<p>*No hay cuentas. *No se presentaron problemas a la hora de electrohilar*El electrohilado es uniforme*Se formó el cono de Taylor</p>	<p>*Se está electrohilando fácilmente*Se acumula polímero en la punta*Los diámetros de las fibras se ven uniformes, hay pocas cuentas*Después de un tiempo ya no se desperdicia polímero</p>	<p>*Al inicio se desperdicia polímero*En la micrografía el diámetro de la fibra se ve uniforme, no se ven cuentas*No quiere electrohilar, *Hay más acumulación de fibras en ciertos puntos del sustrato. no se forma el cono de Taylor. *El diferencial de potencial es bajo que no permite formarse el cono de Taylor y gotea antes de que la disolución polimérica sea alargada</p>

Termograma del colágeno



Termograma de la epicatequina



16 Referencias bibliográficas

- [1] W.H. Organization, Risk-based CVD management, Myriad, Switzerland, 2020.
- [2] R. Chaudhuri, M. Ramachandran, P. Moharil, M. Harumalani, A.K. Jaiswal, Biomaterials and cells for cardiac tissue engineering: Current choices, *Mater. Sci. Eng. C.* 79 (2017) 950–957. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.121>.
- [3] M. Kitsara, O. Agbulut, D. Kontziampasis, Y. Chen, P. Menasché, Fibers for hearts: A critical review on electrospinning for cardiac tissue engineering, *Acta Biomater.* 48 (2017) 20–40. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.014>.
- [4] S. Cesur, S. Ulag, L. Ozak, A. Gumussoy, S. Arslan, B.K. Yilmaz, N. Ekren, M. Agirbasli, D.M. kalaskar, O. Gunduz, Production and characterization of elastomeric cardiac tissue-like patches for Myocardial Tissue Engineering, *Polym. Test.* 90 (2020) 106613. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106613>.
- [5] Iaizzo Paul A., Handbook of cardiac anatomy, physiology and devices, HUMANA PRESS, Minneapolis, 2005.
- [6] Y. Dong, M. Hong, R. Dai, H. Wu, P. Zhu, Engineered bioactive nanoparticles incorporated biofunctionalized ECM/silk proteins based cardiac patches combined with MSCs for the repair of myocardial infarction: In vitro and in vivo evaluations, *Sci. Total Environ.* 707 (2020) 135976. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135976>.
- [7] J.C. Garbern, G.O. Escalante, R.T. Lee, Pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for treatment of cardiomyopathic damage: Current concepts and future directions, *Trends Cardiovasc. Med.* (2020) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2020.01.002>.
- [8] Y. Jang, Y. Park, J. Kim, Engineering Biomaterials to Guide Heart Cells for Matured Cardiac Tissue, (2020).
- [9] J. Xue, T. Wu, Y. Dai, Y. Xia, Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications, *Chem. Rev.* 119 (2019) 5298–5415. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00593>.
- [10] G. Khang, ed., Intelligent Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., USA, 2012.
- [11] F. Tondnevis, H. Keshvari, J.A. Mohandesi, Fabrication, characterization, and in vitro evaluation of electrospun polyurethane-gelatin-carbon nanotube scaffolds for cardiovascular tissue engineering applications, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 108 (2020) 2276–2293. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34564>.
- [12] S. Sabra, D.M. Ragab, M.M. Agwa, S. Rohani, Recent advances in electrospun nanofibers for some biomedical applications, *Eur. J. Pharm. Sci.* 144 (2020) 105224. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105224>.
- [13] S. Cesur, S. Ulag, L. Ozak, A. Gumussoy, S. Arslan, B.K. Yilmaz, N. Ekren, M. Agirbasli, D.M. kalaskar, O. Gunduz, Production and characterization of elastomeric cardiac tissue-like patches for Myocardial Tissue Engineering, *Polym. Test.* 90 (2020) 106613. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106613>.
- [14] L. S. Silly, *Cardiología. Bases fisiopatológicas de las cardiopatías.*, Wolters Kluwer, China,

2016. http://thepoint.lww.com/espanol-Lilly_6e.

- [15] S.M. Nasr, N. Rabiee, S. Hajebi, S. Ahmadi, Y. Fatahi, M. Hosseini, M. Bagherzadeh, A.M. Ghadiri, M. Rabiee, V. Jajarmi, T.J. Webster, Biodegradable nanopolymers in cardiac tissue engineering: From concept towards nanomedicine, *Int. J. Nanomedicine*. 15 (2020) 4205–4224. <https://doi.org/10.2147/IJN.S245936>.
- [16] M.C.R. Simões, S.M. Cragg, E. Barbu, F.B. De Sousa, The potential of electrospun poly(methyl methacrylate)/polycaprolactone core–sheath fibers for drug delivery applications, *J. Mater. Sci.* 54 (2019) 5712–5725. <https://doi.org/10.1007/s10853-018-03261-2>.
- [17] M.A. Nazeer, E. Yilgor, I. Yilgor, Electrospun polycaprolactone/silk fibroin nanofibrous bioactive scaffolds for tissue engineering applications, *Polymer (Guildf)*. 168 (2019) 86–94. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2019.02.023>.
- [18] A. Bhaskaran, T. Prasad, T. V. Kumary, P.R. Anil Kumar, Simple and efficient approach for improved cytocompatibility and faster degradation of electrospun polycaprolactone fibers, *Polym. Bull.* 76 (2019) 1333–1347. <https://doi.org/10.1007/s00289-018-2442-7>.
- [19] S.-W. Tsai, Y.-L. Yu, F.-Y. Hsu, Fabrication of polycaprolactone tubular scaffolds with an orthogonal-bilayer structure for smooth muscle cells, *Mater. Sci. Eng. C*. 100 (2019) 308–314. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.03.013>.
- [20] A. Ehterami, M. Salehi, S. Farzamfar, A. Vaez, H. Samadian, H. Sahrapeyma, M. Mirzaii, S. Ghorbani, A. Goodarzi, In vitro and in vivo study of PCL/COLL wound dressing loaded with insulin-chitosan nanoparticles on cutaneous wound healing in rats model, *Int. J. Biol. Macromol.* 117 (2018) 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.184>.
- [21] I. Kanungo, N.N. Fathima, J.R. Rao, B.U. Nair, Influence of PCL on the material properties of collagen based biocomposites and in vitro evaluation of drug release, *Mater. Sci. Eng. C*. 33 (2013) 4651–4659. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.020>.
- [22] 林伸行, *Collagen Structure and Mechanics*, Springer, Alemania, 2017.
- [23] M. Tashakori-Miyanroudi, K. Rakhshan, M. Ramez, S. Asgarian, A. Janzadeh, Y. Azizi, A. Seifalian, F. Ramezani, Conductive carbon nanofibers incorporated into collagen bio-scaffold assists myocardial injury repair, *Int. J. Biol. Macromol.* 163 (2020) 1136–1146. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.259>.
- [24] M. Wanjare, L. Hou, K.H. Nakayama, J.J. Kim, N.P. Mezak, O.J. Abilez, E. Tzatzalos, J.C. Wu, N.F. Huang, Biomaterials Science organization and function of cardiomyocytes, (2017) 1567–1578. <https://doi.org/10.1039/c7bm00323d>.
- [25] X. Zhang, Z. Li, P. Yang, G. Duan, X. Liu, Z. Gu, Y. Li, Polyphenol scaffolds in tissue engineering, *Mater. Horizons*. (2020). <https://doi.org/10.1039/d0mh01317j>.
- [26] D. Álvarez-Cilleros, M.Á. Martín, L. Goya, S. Ramos, (–)-Epicatechin and the colonic metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid protect renal proximal tubular cell against high glucose-induced oxidative stress by modulating NOX-4/SIRT-1 signalling, *J. Funct. Foods*. 46 (2018) 19–28. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.04.051>.
- [27] E. Lim, M.-J. Lim, K.-S. Min, Y.-S. Kwon, Y.-C. Hwang, M.-K. Yu, C.-U. Hong, K.-W. Lee, E. Lim, M.-J. Lim, K.-S. Min, Y.-S. Kwon, Y.-C. Hwang, M.-K. Yu, C.-U. Hong, K.-

- W. Lee, Effects of epicatechin, a crosslinking agent, on human dental pulp cells cultured in collagen scaffolds, *J. Appl. Oral Sci.* 24 (2016) 76–84. <https://doi.org/10.1590/1678-775720150383>.
- [28] M. Prakash, B. V. Basavaraj, K.N. Chidambara Murthy, Biological functions of epicatechin: Plant cell to human cell health, *J. Funct. Foods.* 52 (2019) 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.021>.
- [29] M.M. Castillo-Ortega, A.G. Montaña-Figueroa, D.E. Rodríguez-Félix, G. Prado-Villegas, K.P. Pino-Ocaño, M.J. Valencia-Córdova, J.M. Quiroz-Castillo, P.J. Herrera-Franco, Preparation by coaxial electrospinning and characterization of membranes releasing (–) epicatechin as scaffold for tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C.* 46 (2015) 184–189. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2014.10.031>.
- [30] P. Ortiz-Vilchis, K.G. Yamazaki, I. Rubio-Gayosso, I. Ramirez-Sanchez, C. Calzada, D. Romero-Perez, A. Ortiz, E. Meaney, P. Taub, F. Villarreal, G. Ceballos, Co-administration of the flavanol (–)-epicatechin with doxycycline synergistically reduces infarct size in a model of ischemia reperfusion injury by inhibition of mitochondrial swelling, *Eur. J. Pharmacol.* 744 (2015) 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.09.042>.
- [31] D.C.G. Okiyama, I.D. Soares, M.S. Cuevas, E.J. Crevelin, L.A.B. Moraes, M.P. Melo, A.L. Oliveira, C.E.C. Rodrigues, Pressurized liquid extraction of flavanols and alkaloids from cocoa bean shell using ethanol as solvent, *Food Res. Int.* 114 (2018) 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.055>.
- [32] M.L. Durán-Pastén, D. Cortes, A.E. Valencia-Amaya, S. King, G.H. González-Gómez, M. Hautefeuille, Cell Culture Platforms with Controllable Stiffness for Chick Embryonic Cardiomyocytes, *Biomimetics.* 4 (2019) 33. <https://doi.org/10.3390/biomimetics4020033>.
- [33] K. Roshanbinfar, T.U. Esser, F.B. Engel, Stem cells and their cardiac derivatives for cardiac tissue engineering and regenerative medicine, (2020) 1–59. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8193>.
- [34] M. Alser, S. Shurbaji, H.C. Yalcin, Mechanosensitive Pathways in Heart Development: Findings from Chick Embryo Studies, *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 8 (2021) 32. <https://doi.org/10.3390/jcdd8040032>.
- [35] R.S. Fagan Toby, *Lo esencial en sistema cardiovascular.*, ELSEVIER, 2015.
- [36] E.A. Ruesga Zamora, G. Saturno Chiu, *Cardiología*, 2nd ed., Manual moderno, México, 2011.
- [37] V. Guarino, L. Ambrosio, *Electrofluidodynamic technologies (EFDTs) for biomaterials and medical devices : principles and advances*, n.d.
- [38] A. Cortina Llosa, R. Cortina Rodríguez, A.F. Del Valle Fernández, *Conoce tu corazón guía de los problemas cardiológicos*, MADÚ, España, 2005.
- [39] O. FJ., *Biomaterials and Scaffolds for tissue engineering.*, (2011).
- [40] J.M. Connell, D. Shum-tim, *Cardiac tissue engineering and regeneration using cell-based therapy*, (2015) 81–101.
- [41] A.K. Capulli, L.A. MacQueen, S.P. Sheehy, K.K. Parker, *Fibrous scaffolds for building*

- hearts and heart parts, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 96 (2016) 83–102. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.020>.
- [42] H. Lee, J.J. Yoo, H. Kang, N. Maurmann, D.P. Pereira, D. Burguez, M. Müller, J. Becher, M. Schnabelrauch, A.M. Behrens, J. Kim, N. Hotaling, L.M. Ott, T.A. Zabel, N.K. Walker, 3D printing PLGA : a quantitative examination of the effects of polymer composition and printing parameters on print resolution, (n.d.).
- [43] -Taylor & Francis Group, *Encyclopedia of biomedical polymers and polymeric biomaterials*, New York, 2015.
- [44] M. Gultekinoglu, Ş. Öztürk, B. Chen, M. Edirisinghe, K. Ulubayram, Preparation of poly(glycerol sebacate) fibers for tissue engineering applications, *Eur. Polym. J.* 121 (2019) 109297. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109297>.
- [45] R.V. Graziano, A.M. Cerda, EFECTO DEL DISOLVENTE EN LA MORFOLOGÍA DE MEMBRANAS DE POLI(ϵ -CAPROLACTONA) OBTENIDAS POR ELECTROHILADO., (n.d.).
- [46] L. Persano, A. Camposeo, C. Tekmen, D. Pisignano, Industrial upscaling of electrospinning and applications of polymer nanofibers: A review, *Macromol. Mater. Eng.* 298 (2013) 504–520. <https://doi.org/10.1002/mame.201200290>.
- [47] J. Rnjak-Kovacina, A.S. Weiss, Increasing the Pore Size of Electrospun Scaffolds, *Tissue Eng. Part B Rev.* 17 (2011) 365–372. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0235>.
- [48] L.M. Duque Sánchez, L. Rodriguez, M. López, Electrospinning: The Nanofibers Age, *Rev. Iberoam. Polímeros Vol. Iber. Polímeros.* 14 (2014) 10–27.
- [49] J.. Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, N.. Beck Tan, The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, *Polymer (Guildf).* 42 (2001) 261–272. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00250-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00250-0).
- [50] C. Raymond, *Química*, McGraw-Hil, México, 2010.
- [51] C. Vaquette, J.J. Cooper-White, Increasing electrospun scaffold pore size with tailored collectors for improved cell penetration, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2544–2557. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.02.036>.
- [52] A. Baji, Y.W. Mai, S.C. Wong, M. Abtahi, P. Chen, Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties, *Compos. Sci. Technol.* 70 (2010) 703–718. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2010.01.010>.
- [53] F. Iñiguez-Franco, H. Soto-Valdez, E. Peralta, J.F. Ayala-Zavala, R. Auras, N. Gaez-Meza, Antioxidant Activity and Diffusion of Catechin and Epicatechin from Antioxidant Active Films Made of Poly(L-lactic acid), (n.d.). <https://doi.org/10.1021/jf300668u>.
- [54] A.M. Mendoza-Wilson, D. Glossman-Mitnik, Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (–)-epicatechin related to their antioxidant ability, *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 761 (2006) 97–106. <https://doi.org/10.1016/J.THEOCHEM.2006.01.001>.
- [55] K.G. Yamazaki, A.Y. Andreyev, P. Ortiz-Vilchis, S. Petrosyan, A.S. Divakaruni, S.E. Wiley, C. De La Fuente, G. Perkins, G. Ceballos, F. Villarreal, A.N. Murphy, *Intravenous*

- (-)-epicatechin reduces myocardial ischemic injury by protecting mitochondrial function, *Int. J. Cardiol.* 175 (2014) 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.05.009>.
- [56] P. Stanely Mainzen Prince, (-) Epicatechin prevents alterations in lysosomal glycohydrolases, cathepsins and reduces myocardial infarct size in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats, *Eur. J. Pharmacol.* 706 (2013) 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.02.003>.
- [57] M.A. Woodruff, D.W. Huttmacher, The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century, *Prog. Polym. Sci.* 35 (2010) 1217–1256. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>.
- [58] M.S. Kim, G. Kim, Three-dimensional electrospun polycaprolactone (PCL)/alginate hybrid composite scaffolds, *Carbohydr. Polym.* 114 (2014) 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.008>.
- [59] A. Gennari, F.H. Mobayed, G. Volpato, C.F.V. de Souza, Chelation by collagen in the immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: A potential biocatalyst to hydrolyze lactose by batch processes, *Int. J. Biol. Macromol.* 109 (2018) 303–310. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.12.088>.
- [60] D.L. Kaplan, *Biopolymers from Renewable Resources*, Springer-V, Alemania, 1998.
- [61] D.R. Eyre, J.J. Wu, Collagen cross-links, *Top. Curr. Chem.* 247 (2005) 207–229. <https://doi.org/10.1007/b103828>.
- [62] R.K. Perumal, S. Perumal, R. Thangam, A. Gopinath, S.K. Ramadass, B. Madhan, S. Sivasubramanian, Collagen-fucoidan blend film with the potential to induce fibroblast proliferation for regenerative applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 106 (2018) 1032–1040. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.08.111>.
- [63] T. Koide, K. Nagata, Collagen biosynthesis, *Top. Curr. Chem.* 247 (2005) 85–114. <https://doi.org/10.1007/b103820>.
- [64] M. Madaghiele, E. Calò, L. Salvatore, V. Bonfrate, D. Pedone, M. Frigione, A. Sannino, Assessment of collagen crosslinking and denaturation for the design of regenerative scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 104 (2016) 186–194. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35554>.
- [65] R.W. Anthony, *Solid State Chemistry*, WILEY, New Delhi, India, 2014. <https://doi.org/10.1201/b12047>.
- [66] Andrew, Burrows, *Chemistry. Introducing inorganic, organic and physical chemistry*, OXFORD, CHINA, 2016.
- [67] Hesse, Manfred, Meier, Herbert, Zeeh, Bernd, *Métodos espectroscópicos en química orgánica, Síntesis*, España, 2005.
- [68] Douglas A. Skoog, *Principios de análisis instrumental*, CENGAGE Le, 2008.
- [69] A. R. West, *Solid state chemistry and its applications*, WILEY, New Delhi, India, 2014.
- [70] P. Macheras, A. Iliadis, *Modeling in Biopharmaceutics, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics Homogeneous and Heterogeneous Approaches*, 2006.

- [71] H.A. Andreetta, *Fármacos de Acción Prolongada: Mecanismos de Liberación. Usos de distintos modelos*, *Acta Farm. Bonaer.* 22 (2003) 355–363.
- [72] Mathematical models of drug release, *Strateg. to Modify Drug Release from Pharm. Syst.* (2015) 63–86. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100092-2.00005-9>.
- [73] Q.M. Craig, Duncan, Mike, *Thermal analysis of pharmaceuticals*, CRC Press, USA, 2007.
- [74] C. Manas, *Plastics Technology Handbook*, Taylor & Francis, USA, 2018. <http://www.taylorandfrancis.com>.
- [75] W.F. Smith, *Fundamentos de la ciencia e ingeniería de materiales*, McGraw-Hil, México, 2006.
- [76] J. William D. Callister, *Materials Science and Engineering 7th Ed. : An Introduction*, 2007. <https://doi.org/10.1007/BF01184995>.
- [77] L. Savov, *Wettability of solids by molten metals and alloys*, METALL, 1997.
- [78] S. Kumar, *Characterization of Biomaterials*, Elsevier, 2013.
- [79] G.S. Pisarenko, A.P. Yákovlev, V. V Matvéev, *Manual de resistencia de materiales*, Mir Moscú, República Socialista de Rumania, 1979.
- [80] H. Gutiérrez Pulido, R. de la Vara Salazar, *Análisis y diseño de experimentos*, McGraw-Hil, México, 2012.
- [81] Minitab, *Soporte de Minitab 18*, (2022). <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/taguchi-designs/what-is-the-slope/> (accessed June 7, 2022).
- [82] H. González, Y. Nagai, G. Bub, L. Glass, A. Shrier, *Reentrant waves in a ring of embryonic chick ventricular cells imaged with a Ca²⁺ sensitive dye*, *BioSystems.* 71 (2003) 71–80. [https://doi.org/10.1016/S0303-2647\(03\)00111-4](https://doi.org/10.1016/S0303-2647(03)00111-4).
- [83] A. Mattiazzi, *Hipertensión arterial, epidemiología, fisiología, fisiopatología, diagnóstico y terapéutica.*, (2013) 176–182.
- [84] Instituto Nacional de Estadística y Geografía, *Características de las defunciones registradas en México durante enero a agosto de 2020 [Comunicado de prensa]*, 1 (2021) 45. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020_Pnles.pdf.
- [85] F. Sabir, M. Barani, M. Mukhtar, A. Rahdar, M. Cucchiarini, M.N. Zafar, T. Behl, S. Bungau, *Nanodiagnosis and nanotreatment of cardiovascular diseases: An overview*, *Chemosensors.* 9 (2021). <https://doi.org/10.3390/chemosensors9040067>.
- [86] M. Cebova, O. Pechanova, *Protective effects of polyphenols against ischemia/reperfusion injury*, *Molecules.* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25153469>.
- [87] S. Baek, H. Park, M. Kim, D. Lee, *Preparation of PCL/(+)-catechin/gelatin film for wound healing using air-jet spinning*, *Appl. Surf. Sci.* 509 (2020) 145033. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.145033>.
- [88] A. Jain, M. Behera, C. Mahapatra, N.R. Sundaresan, K. Chatterjee, *Nanostructured polymer scaffold decorated with cerium oxide nanoparticles toward engineering an antioxidant and*

- anti-hypertrophic cardiac patch, *Mater. Sci. Eng. C.* 118 (2021) 111416. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111416>.
- [89] Y. Wang, B. Ma, A. Yin, B. Zhang, R. Luo, J. Pan, Y. Wang, Polycaprolactone vascular graft with epigallocatechin gallate embedded sandwiched layer-by-layer functionalization for enhanced antithrombogenicity and anti-inflammation, *J. Control. Release.* 320 (2020) 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.043>.
- [90] T.P. Kelder, R. Vicente-Steijn, R.E. Poelmann, C.L. Mummery, M.C. DeRuiter, M.R.M. Jongbloed, The avian embryo to study development of the cardiac conduction system, *Differentiation.* 91 (2016) 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.01.006>.
- [91] M. Martínez, Infarto Agudo del Miocardio, 2014. <http://www.anmm.org.mx/publicaciones/CAnivANM150/L12-Infarto-agudo-al-miocardio.pdf>.
- [92] J.M. Tomás, P.S. Requena, A.O. Germes, M. Sandoval, S.F. Hodgson, Terapia celular y regeneración cardíaca ¿Dónde estamos?, *Rev. Mex. Cardiol.* 20 (2012) 338–345. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-21982012000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
- [93] Q.P. Pham, U. Sharma, A.G. Mikos, Electrospun poly (??-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: Characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration, *Biomacromolecules.* 7 (2006) 2796–2805. <https://doi.org/10.1021/bm060680j>.
- [94] G.S. Manning, The field of polyelectrolyte chemistry has received relatively little attention from outside the ranks of those who specialize in it, a situation reflected in the fact that this review of the subject is the first to appear in the, (1972).
- [95] Q. Zhang, S. Lv, J. Lu, S. Jiang, L. Lin, Characterization of polycaprolactone/collagen fibrous scaffolds by electrospinning and their bioactivity, *Int. J. Biol. Macromol.* 76 (2015) 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.063>.
- [96] D.E. Rodríguez-Félix, M.M. Castillo-Ortega, A. Nájera-Luna, A.G. Montaña-Figueroa, I.Y. López-Peña, T. Del Castillo-Castro, F. Rodríguez-Félix, J.M. Quiroz-Castillo, P.J. Herrera-Franco, Preparation and Characterization of Coaxial Electrospun Fibers Containing Triclosan for Comparative Study of Release Properties with Amoxicillin and Epicatechin, *Curr. Drug Deliv.* 13 (2016) 49–56. <https://doi.org/10.2174/1567201813666151204121752>.
- [97] P. Huo, X. Han, W. Zhang, J. Zhang, P. Kumar, B. Liu, Electrospun nanofibers of polycaprolactone/collagen as a sustained-release drug delivery system for artemisinin, *Pharmaceutics.* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081228>.
- [98] I.Y. López-Peña, M.M. Castillo-Ortega, D.F. Plascencia-Martínez, A. Félix-Núñez, D.E. Rodríguez-Félix, T. Del Castillo-Castro, J.C. Encinas-Encinas, H. Santacruz-Ortega, F. Rodríguez-Félix, J. V. Cauich-Rodríguez, S. Burruel-Ibarra, D. Hernandez-Martínez, J.M. Quiroz-Castillo, Study of the release kinetics of (–) epicatechin: Effect of its location within the fiber or sphere, *J. Appl. Polym. Sci.* 136 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1002/app.47166>.
- [99] P. Number, P. Information, T. Specification, S. Information, T. Information, Product Information Product Information, *Opadry.* (1920) 1919–1920.

- [100] F.F. Bruno, L.A. Samuelson, S. Nagarajan, R. Nagarajan, J. Kumar, Biocatalysis for material science and drug discoveries, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 1065 (2008) 1–7. <https://doi.org/10.1557/proc-1065-qq01-06>.
- [101] M. Shi, Y. Nie, X.Q. Zheng, J.L. Lu, Y.R. Liang, J.H. Ye, Ultraviolet B (UVB) photosensitivities of tea catechins and the relevant chemical conversions, *Molecules*. 21 (2016). <https://doi.org/10.3390/molecules21101345>.
- [102] S.T. Huang, Y.A. Hung, M.J. Yang, I.Z. Chen, J.M.P. Yuann, J.Y. Liang, Effects of epigallocatechin gallate on the stability of epicatechin in a photolytic process, *Molecules*. (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24040787>.
- [103] P.J. Larkin, Introduction, *Infrared Raman Spectrosc.* (2018) 1–5. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804162-8.00001-x>.
- [104] A.B.D. Nandiyanto, R. Oktiani, R. Ragadhita, How to read and interpret ftir spectroscopy of organic material, *Indones. J. Sci. Technol.* 4 (2019) 97–118. <https://doi.org/10.17509/ijost.v4i1.15806>.
- [105] J. Ren, Modification of PLA, in: Springer (Ed.), *Biodegrad. Poly (Lactic Acid) Synth. Modif. Process. Appl.*, Shanghai, China, 2010: pp. 38–141. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-17596-1>.
- [106] Z. Bazrafshan, G.K. Stylios, A novel approach to enhance the spinnability of collagen fibers by graft polymerization, *Mater. Sci. Eng. C*. 94 (2019) 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.016>.
- [107] S.A. Sell, M.J. McClure, K. Garg, P.S. Wolfe, G.L. Bowlin, Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 1007–1019. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.012>.
- [108] J.G. Gujar, S. Chattopadhyay, S.J. Wagh, V.G. Gaikar, Experimental and modeling studies on extraction of catechin hydrate and epicatechin from indian green tea leaves, *Can. J. Chem. Eng.* 88 (2010) 232–240. <https://doi.org/10.1002/cjce.20271>.
- [109] S. Ohara, Y. Yasuta, H. Ohi, Structure elucidation of condensed tannins from barks by pyrolysis/gas chromatography, *Holzforschung*. 57 (2003) 145–149. <https://doi.org/10.1515/HF.2003.023>.
- [110] R. Campi, D. Amparore, E. Checucci, F. Claps, J.Y.C. Teoh, S. Serni, R.M. Scarpa, F. Porpiglia, D.M. Carrion, J.G. Rivas, S. Loeb, G.E. Cacciamani, F. Esperto, J. Lemos Almeida, C. Fiori, L.A. Hampson, G. Mantica, A. Minervini, A. Olivero, L.E. Ortega Polledo, K.H. Pang, R. Papalia, B. Pradere, F. Sandikci, J. Daniel Subiela, M. Vallée, J. Zhuang, Thermal behavior of in vitro mineralized anionic collagen matrices, *Nature*. 388 (1997) 539–547.
- [111] Y.E. Aguirre-Chagala, V. Altuzar, E. León-Sarabia, J.C. Tinoco-Magaña, J.M. Yañez-Limón, C. Mendoza-Barrera, Physicochemical properties of polycaprolactone/collagen/elastin nanofibers fabricated by electrospinning, *Mater. Sci. Eng. C*. 76 (2017) 897–907. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.118>.
- [112] M. Lucarini, F. Sciubba, D. Capitani, M. Enrica, D. Cocco, L.D. Evoli, A. Durazzo, M. Delfini, G. Lombardi, M. Lucarini, F. Sciubba, D. Capitani, M. Enrica, D. Cocco, L.D.

- Evoli, A. Durazzo, M. Delfini, G. Lombardi, B. Role, Role of catechin on collagen type I stability upon oxidation : a NMR approach Role of catechin on collagen type I stability upon, *Nat. Prod. Res.* 0 (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1570509>.
- [113] H.R. Tang, A.D. Covington, R.A. Hancock, Structure-Activity Relationships in the Hydrophobic Interactions of Polyphenols with Cellulose and Collagen, *Biopolymers*. 70 (2003) 403–413. <https://doi.org/10.1002/bip.10499>.
- [114] C. Baptista, A. Azagury, H. Shin, C.M. Baker, E. Ly, R. Lee, E. Mathiowitz, The effect of temperature and pressure on polycaprolactone morphology, *Polymer (Guildf)*. 191 (2020) 122227. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122227>.
- [115] A. Manuscript, Fabrication and characterization of forcespun polycaprolactone microfiber scaffolds, (2019) 0–18.
- [116] L. Averous, L. Moro, P. Dole, C. Fringant, Properties of thermoplastic blends: Starch-polycaprolactone, *Polymer (Guildf)*. 41 (2000) 4157–4167. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00636-9](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00636-9).
- [117] E.K. Kostakova, L. Meszaros, G. Maskova, L. Blazkova, T. Turcsan, D. Lukas, Crystallinity of Electrospun and Centrifugal Spun Polycaprolactone Fibers: A Comparative Study, *J. Nanomater.* 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/8952390>.
- [118] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 933–956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9).
- [119] Y.E. Aguirre-Chagala, V. Altuzar, E. León-Sarabia, J.C. Tinoco-Magaña, J.M. Yañez-Limón, C. Mendoza-Barrera, Physicochemical properties of polycaprolactone/collagen/elastin nanofibers fabricated by electrospinning, *Mater. Sci. Eng. C*. 76 (2017) 897–907. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.118>.
- [120] L. Jiang, Y. Jiang, J. Stiadle, X. Wang, L. Wang, Q. Li, C. Shen, S.L. Thibeault, L.S. Turng, Electrospun nanofibrous thermoplastic polyurethane/poly(glycerol sebacate) hybrid scaffolds for vocal fold tissue engineering applications, *Mater. Sci. Eng. C*. 94 (2019) 740–749. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.027>.
- [121] S.C. Wong, A. Baji, S. Leng, Effect of fiber diameter on tensile properties of electrospun poly(ϵ -caprolactone), *Polymer (Guildf)*. 49 (2008) 4713–4722. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.08.022>.
- [122] S.R. Selatile Mantsopa Koena, Sinha Ray Suprakas, Ojjo Vincent, Correlations between Fibre Diameter, Physical Parameters, and the Mechanical Properties of Randomly Oriented Biobased Polylactide Nanofibres., (2019) 100–112.
- [123] J. Münch, S. Abdelilah-Seyfried, Sensing and Responding of Cardiomyocytes to Changes of Tissue Stiffness in the Diseased Heart, *Front. Cell Dev. Biol.* 9 (2021). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.642840>.
- [124] Z. Qu, A. Liu, P. Li, C. Liu, W. Xiao, J. Huang, Z. Liu, S. Zhang, Advances in physiological functions and mechanisms of (-)-epicatechin, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 61 (2021) 211–233. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1723057>.

17 Glosario

Abiótico: Que no permite que haya vida.

Aneurisma: Dilatación anormal de las paredes de una arteria o una vena.

Apoptosis: Es una forma de muerte celular programada, o “suicidio celular”. Es diferente de la necrosis, en la cual las células mueren debido a una lesión.

Aterosclerosis: Ocurre cuando se acumulan grasa, colesterol y otras sustancias en las paredes de las arterias. Estos depósitos se denominan placas. Con el tiempo, estas placas pueden estrechar u obstruir completamente las arterias y causar problemas en todo el cuerpo.

Ateroma: Lesión de la capa interna de las arterias que se caracteriza por el depósito de grasa en forma de manchas amarillentas.

Autólogo: Que involucra un solo individuo que constituye ambos, el donante y el receptor, en un procedimiento médico como un trasplante de células madre.

Biótico: De los organismos vivos o relacionados con ellos.

Biventrículo resincronización: No hay sincronización de las contracciones del ventrículo izquierdo y derecho.

Cardiopatía coronaria (CHD, por sus siglas en inglés) es el tipo más común de enfermedad cardíaca y sucede cuando se acumula placa en las arterias que conducen al corazón. Cuando se estrechan las arterias, el corazón no puede recibir suficiente sangre y oxígeno. Una arteria bloqueada puede causar un ataque cardíaco. Con el tiempo, la cardiopatía coronaria puede debilitar el miocardio y provocar insuficiencia cardíaca o arritmias.

Cardiopatía isquémica: Situación en la cual la sangre transportada por las arterias coronarias es insuficiente para llevar el oxígeno necesario a un determinado territorio del músculo cardíaco, lo que implica una disminución en su funcionamiento.

Citocompatibilidad: Material o sustancia que no produce reacciones perjudiciales en uno o varios tipos celulares cuando interacciona con ellos.

Cizallamiento: Deformación lateral que se produce por una fuerza externa; también llamado cizallamiento, cortadura, esfuerzo cortante: Fuerza interna que desarrolla un cuerpo como respuesta a una fuerza cortante y que es tangencial a la superficie sobre la que actúa.

Coagulabilidad: Es la capacidad de forma coágulo.

Coágulo: Porción de una sustancia coagulada, especialmente de sangre.

Congénito: Que se presenta durante el periodo de gestación y puede ser hereditaria o no.

Degradación proteolítica: Es la ruptura de la proteína en pequeños polipéptidos o aminoácidos.

Diástole: Período en el que el corazón se relaja después de una contracción.

Electrofisiología: Parte de la medicina que estudia la fisiología de los procesos bioeléctricos. Su principal aplicación clínica es la electrofisiología cardíaca, subespecialidad de la cardiología que se ocupa del corazón como órgano eléctrico (estudio de los potenciales cardiacos de acción, del diagnóstico y el tratamiento de las arritmias cardiacas, etc.) y la neurofisiología clínica, que hace lo propio con el sistema nervioso.

Enfermedad cardiovascular: Es un término amplio para problemas con el corazón y los vasos sanguíneos. Estos problemas a menudo se deben a la aterosclerosis. Esta afección ocurre cuando la grasa y el colesterol se acumulan en las paredes del vaso sanguíneo (arteria). Esta acumulación se llama placa. Con el tiempo, la placa puede estrechar los vasos sanguíneos y causar problemas en todo el cuerpo. Si una arteria resulta obstruida, esto puede llevar a que se presente un ataque cardíaco o un accidente cerebrovascular.

Fetal: En humanos es el período después del segundo mes de gestación.

Infarto: Es una entidad morfológica que describe un área de tejido necrótico como resultado de una isquemia.

Inmunogenicidad: Es la capacidad que tiene el sistema inmunitario de reaccionar frente a un antígeno, un estímulo bioquímico de naturaleza generalmente proteica.

Inmunosupresión: Se define como la capacidad de decrecer la neutralización de organismos externos.

Insuficiencia cardíaca: Ocurre cuando el miocardio se vuelve rígido o débil. No puede bombear suficiente sangre oxigenada, lo cual causa síntomas en todo el cuerpo. La enfermedad puede afectar el lado derecho o el lado izquierdo del corazón.

Isquemia: Detención o disminución de la circulación de sangre a través de las arterias de una determinada zona, que comparte un estado de sufrimiento celular por falta de oxígeno y materias nutritivas en la parte afectada.

La propensión de un flavonoide a inhibir los eventos mediados por radicales libres se rige por su estructura química.

Lipofilia Capacidad de una sustancia de solubilizarse en una fase oleosa

Morbilidad: Cantidad de personas que enferman en un lugar y un período de tiempo determinados en relación con el total de la población.

Motilidad: Facultad de moverse que tiene la materia viva como respuesta a ciertos estímulos.

Múltiples grupos hidroxilo confieren a la molécula actividad antioxidante, quelante y prooxidante sustancial. Los grupos metoxi introducen efectos estéricos desfavorables y aumentan la lipofilia y la división de la membrana.

Necrosis: Muerte de las células y los tejidos de una zona determinada de un organismo vivo.

Neonatal: Comprende las primeras cuatros semanas de la vida de un bebé.

Razón de replicación: Es el proceso por el cual una doble cadena de DNA de una molécula se copia para producir dos idénticas moléculas de DNA.

Regeneración endógena: Es la capacidad de las células para participar en el proceso de reparación y regeneración.

Rigidez: Es la propiedad de una estructura o de sus elementos de oponerse a las cargas exteriores en lo que se refiere a las deformaciones.

Sintomático: Que presenta síntomas de una particular enfermedad.

Sus efectos cardioprotectores provienen de la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica, quelar metales activos redox y atenuar otros procesos que involucran especies reactivas de oxígeno.

Tejido perimisial: Está compuesto de fibras de colágeno y elastina embebidos en una base de mucopolisacáridos.

Una función de doble banda y carbonilo en el heterociclo o polimerización de la estructura nuclear aumenta la actividad al proporcionar un radical flavonoide más estable a través de la conjugación y la deslocalización de electrones

Viable: Es capaz de sobrevivir o que viva con éxito, especialmente bajo particulares condiciones ambientales.