



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

**DETERMINACIÓN DE MODELOS DE CRECIMIENTO CELULAR EN ANDAMIOS DE PVA/SA MEDIANTE MEDICIONES
ELECTROQUÍMICAS**

TESIS

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

PRESENTA:

KAREN ARLENE MARTÍNEZ MORENO

TUTOR PRINCIPAL

DR. MIGUEL ÁNGEL HERNÁNDEZ GALLEGOS
FACULTAD DE INGENIERÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ALBA COVELO VILLAR
FACULTAD DE INGENIERÍA

DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MEXICO,
ENERO, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A CONACYT por el apoyo de beca que me fue otorgado para el desarrollo del presente proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, al Instituto de Investigación en Materiales, a la división de estudios de posgrado de la Facultad de Ingeniería de la UNAM.

Al Dr. Miguel Ángel Hernández Gallegos, a mi comité tutor compuesto por la Dra. Alba Covelo Villar y la Dra. Cristina Piña Barba.

A la Dra. Patricia González Alva y a la Dra. Albanelly Soto.

RESUMEN	4
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
HIPÓTESIS	5
CAPÍTULO 1.	6
ANTECEDENTES	6
INTRODUCCIÓN	6
BIOMATERIALES	6
INGENIERÍA DE TEJIDOS	7
PROPIEDADES DEL ALGINATO DE SODIO (SA) Y EL POLIVINIL ALCOHOL (PVA)	7
ALGINATO DE SODIO	7
POLIVINIL ALCOHOL	9
ELECTROHILADO (ELECTROSPINING)	11
MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)	13
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	14
ESPECTROSCOPIA ELECTROQUÍMICA DE IMPEDANCIA (EIS).	15
SEMBRADO DE CÉLULAS EN ANDAMIOS POLIMÉRICOS	19
LÍNEA CELULAR UTILIZADA	20
CARDIOMIOCITOS DE RATÓN	20
MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	21
ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y ADHERENCIA CELULAR	22
ENSAYO DE RESAZURINA (CITOTOXICIDAD)	22
TINCIÓN CON CALCEÍNA (ADHERENCIA)	23
CAPÍTULO 2.	24
SECCIÓN EXPERIMENTAL	24
PREPARACIÓN DE DISOLUCIÓN DE PVA	24
PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES DE SA	24
PREPARACIÓN DE MEZCLAS PVA-SA	24
FORMACIÓN DE LOS ANDAMIOS MEDIANTE ELECTROHILADO	24
PARÁMETROS UTILIZADOS	26
PROCESO DE ENTRECruzAMIENTO DE FIBRAS EN ANDAMIOS	27
PREPARACIÓN DE DISOLUCIÓN DE CaCl ₂ AL 2%.	27
ENTRECruzADO DE FIBRAS	27

ESTUDIOS POR SEM Y AFM	28
ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y ADHERENCIA CELULAR	28
CULTIVO CELULAR	29
ENSAYO DE CITOTOXICIDAD	29
ENSAYO DE ADHERENCIA CELULAR	30
PRUEBAS DE IMPEDANCIA	30
CAPÍTULO 3.	32
<hr/>	
RESULTADOS	32
<hr/>	
ESTUDIOS POR SEM PARA ANDAMIOS SIN LÍNEA CELULAR	32
MUESTRA CORRESPONDIENTE A 3.5% DE CONCENTRACIÓN	32
MUESTRA CORRESPONDIENTE A 4.0% DE CONCENTRACIÓN	33
MUESTRA CORRESPONDIENTE A 5.0% DE CONCENTRACIÓN	34
ESTUDIOS POR SEM PARA ANDAMIOS CON LÍNEA CELULAR	36
MUESTRA CORRESPONDIENTE AL 3.5% DE CONCENTRACIÓN CON LÍNEA CELULAR	36
MUESTRA CORRESPONDIENTE AL 4.0% DE CONCENTRACIÓN CON LÍNEA CELULAR	37
MUESTRA CORRESPONDIENTE AL 5.0% DE CONCENTRACIÓN CON LÍNEA CELULAR	38
ESTUDIOS POR AFM	40
MUESTRAS CORRESPONDIENTES AL 3.5% DE CONCENTRACIÓN	40
MUESTRAS CORRESPONDIENTES AL 4.0% DE CONCENTRACIÓN	41
MUESTRAS CORRESPONDIENTES AL 5.0% DE CONCENTRACIÓN	43
ENSAYO DE ADHERENCIA CELULAR	44
MICROGRAFÍAS OBTENIDAS PARA LA MUESTRA DE 3.5%	44
MICROGRAFÍAS OBTENIDAS PARA LA MUESTRA DE 4.0%	44
MICROGRAFÍAS OBTENIDAS PARA LA MUESTRA DE 5.0%	45
ENSAYO DE CITOTOXICIDAD	45
PRUEBAS DE IMPEDANCIA	48
GRÁFICOS OBTENIDOS PARA LA MUESTRA CORRESPONDIENTE A 3.5% MONTADA EN CHIP	48
GRÁFICOS OBTENIDOS PARA LA MUESTRA CORRESPONDIENTE A 4.0% MONTADA EN CHIP	49
GRÁFICOS OBTENIDOS PARA LA MUESTRA CORRESPONDIENTE A 5.0% MONTADA EN CHIP	50
IMPEDANCIA TOTAL DEL SISTEMA	51
CIRCUITO EQUIVALENTE	51
CAPACITANCIAS OBTENIDAS DEBIDO A LAS CÉLULAS ($C_{CÉLULAS}$) PARA LOS SISTEMAS ESTUDIADOS	52
RESISTENCIAS OBTENIDAS DEBIDO A LAS CÉLULAS ($R_{CÉLULAS}$) PARA LOS SISTEMAS ESTUDIADOS	53
CAPACITANCIAS OBTENIDAS DEBIDO AL ANDAMIO ($C_{ANDAMIO}$) PARA LOS SISTEMAS ESTUDIADOS	54
RESISTENCIAS OBTENIDAS DEBIDO AL ANDAMIO ($R_{ANDAMIO}$) PARA LOS SISTEMAS ESTUDIADOS	54
DETERMINACIÓN DE MODELOS MATEMÁTICOS DE RESISTENCIA Y CAPACITANCIA	55
ECUACIONES CORRESPONDIENTES AL SISTEMA PVA/SA 3.5%	56
ECUACIONES CORRESPONDIENTES AL SISTEMA PVA/SA 4.0%	57
ECUACIONES CORRESPONDIENTES AL SISTEMA PVA/SA 5.0%	58

MODELOS DE CRECIMIENTO CELULAR RESPECTO A LOS VALORES DE RESISTENCIA	59
MODELO DE CRECIMIENTO CELULAR PARA MUESTRA DE PVA/SA 3.5%	59
MODELO DE CRECIMIENTO CELULAR PARA MUESTRA DE PVA/SA 4.0%	60
MODELO DE CRECIMIENTO CELULAR PARA MUESTRA DE PVA/SA 5.0%	62
CONCLUSIONES	63
REFERENCIAS	64

Resumen

Para el presente trabajo de investigación se generaron andamios poliméricos a partir de mezclas a diferentes concentraciones de los biopolímeros Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (SA) a 3.5%, 4.0% y 5.0%, mediante la técnica de electrohilado, sobre las cuales se sembraron cardiomiocitos de ratón. Posteriormente, se estudió la morfología del material antes y después del sembrado celular mediante técnicas de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM por sus siglas en inglés) y Microscopia de Fuerza Atómica (AFM por sus siglas en inglés). Se llevaron a cabo pruebas de citotoxicidad y adherencia celular en los andamios a partir de ensayos de rezasurina y tinción con Calceína AM. Se realizaron estudios de impedancia por microscopía electroquímica de impedancia (EIS) para determinar la capacitancia y resistencia de los andamios celulares. Finalmente, a partir de los datos obtenidos por EIS y los ensayos biológicos, se determinaron modelos matemáticos capaces de predecir el crecimiento celular en estos andamios, proyectando a mayores tiempos de experimentación.

De las pruebas de adherencia y citotoxicidad, se comprobó que los andamios son biocompatibles con los cardiomiocitos, ya que permiten su proliferación y su distribución sobre el material, siendo la muestra PVA/SA al 4.0% la que presenta un crecimiento más cercano al de la muestra control.

Por otro lado, se demostró que es posible predecir el crecimiento celular en los andamios de PVA/SA a tiempos de experimentación altos a partir de los resultados obtenidos por EIS, siendo la muestra del 4.0% la que presenta los menores porcentajes de error a partir de los 6 días.

Objetivo General

Determinar modelos de crecimiento celular en andamios de PVA/SA a partir mediciones de espectroscopia de impedancia electroquímica, así como demostrar la biocompatibilidad de dichos andamios con cardiomiocitos de ratón.

Objetivos Específicos

1. Generar andamios poliméricos a partir de mezclas de PVA y diferentes concentraciones de SA (3.5%, 4.0% y 5.0%) a partir de la técnica de electrohilado.
2. Sembrar cardiomiocitos de ratón en los andamios obtenidos.
3. Estudiar la morfología de dichos andamios antes y después del sembrado a partir de técnicas SEM y AFM.
4. Realizar ensayos de citotoxicidad y adherencia celular en dichos andamios
5. Realizar ensayos de impedancia por EIS
6. A partir de los resultados experimentales, determinar modelos matemáticos capaces de predecir el crecimiento celular en dichos andamios y comparar dichas predicciones con resultados experimentales.

Hipótesis

De acuerdo con estudios previamente realizados dentro del grupo de investigación, se ha demostrado que el andamio de PVA/SA 4.0% ha sido el más favorable para estudios con medios biológicos y otro tipo de células (mesenquimales), por lo que se espera que esta muestra permita un mayor crecimiento celular de los cardiomiocitos de ratón sobre el material. Se espera que esta concentración obtenga los valores más altos de resistencia eléctrica con la menor capacitancia faradaica con las mediciones de Impedancia de Espectroscopia Electroquímica. Con lo anterior, se podrá proponer un modelo matemático que prediga el crecimiento celular a largos tiempos de experimentación.

Capítulo 1.

Antecedentes

Introducción

En esta sección serán descritos los antecedentes teóricos necesarios para la comprensión del proyecto.

El proyecto está enfocado en el desarrollo de andamios celulares los cuales pueden llegar a tener un impacto importante en el área de los biomateriales e ingeniería de tejidos, por lo tanto, es importante la revisión general de estos conceptos.

Posteriormente se discutirá la importancia del Alginato de sodio (SA) y el Polivinil alcohol (PVA) para el desarrollo del proyecto, seguido de la descripción de la técnica de Electrohilado (electrospinning), la cual ha sido utilizada para generar los andamios de PVA/SA, así como las técnicas SEM y AFM, la técnica de Espectroscopia Electroquímica de Impedancia (EIS) y Microscopía de Fluorescencia utilizadas en el monitoreo de la biocompatibilidad del andamio celular con las células implantadas en el mismo. De igual manera, se discute la importancia del estudio de los cardiomiocitos de ratón, los cuales fueron las células estudiadas en el proyecto.

Es importante mencionar que, si bien el desarrollo de los andamios celulares es un tema ampliamente estudiado en la actualidad, la importancia del proyecto radica en la búsqueda por establecer un modelo matemático capaz de predecir el crecimiento celular en los andamios poliméricos, ya que de esta manera se busca seguir la proliferación celular en tiempo real, así como predecir dicho crecimiento en los materiales estudiados a largo plazo, a partir de unos cuantos valores experimentales.

Biomateriales

Un biomaterial es cualquier material, superficie o producto que tiene una interacción con un sistema biológico y cuya interacción busca reemplazar, mejorar o regenerar tejidos humanos dañados, así como recuperar la funcionalidad de algún sistema en el cuerpo humano de manera segura.¹

Los biomateriales deben ser biocompatibles, es decir, no deben generar ninguna respuesta celular o tisular, local o sistémica indeseada en el huésped al ser implantados, no deben generar la muerte celular, por el contrario, deben favorecer su crecimiento y no deben ser tóxicos ni carcinogénicos.¹

Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario que integra conocimientos médicos, biológicos e ingenieriles. Esta disciplina desarrolla técnicas que puedan regenerar o restaurar el funcionamiento y la salud de tejidos y órganos humanos. ²

Una de las técnicas más utilizadas en ingeniería de tejidos implica la generación de andamios celulares poliméricos, ya que permiten bio-mimetizar la matriz extracelular, además de proporcionar un microambiente en forma de red tridimensional de poros interconectados, necesaria para permitir el crecimiento de las células implantadas en el andamio, hasta que las células naturales del huésped puedan repoblar y re-sintetizar la matriz natural. Estos andamios celulares se pueden producir a partir de nano-fibras poliméricas generadas mediante la técnica de electrohilado. ^{2,3}

Propiedades del alginato de sodio (SA) y el polivinil alcohol (PVA)

Alginato de sodio

Sólido de color blanco a beige. Posee una viscosidad de entre 5.0 a 40.0 cps. Soluble en agua a 25°C. ⁴

El alginato es un polisacárido lineal biodegradable. Consiste en dos unidades de repetición con diferente orientación estérica, (1-4)- α -L-guluronato (unidad G) y (1-4)- β -D-mannuronato (unidad M), en proporciones variables como se muestra en la **Figura 1**. Las propiedades mecánicas del Alginato dependen principalmente del contenido y longitud de los bloques G. La combinación del Alginato con otros biopolímeros puede modificar sus propiedades, volviéndolo un material versátil. ⁵

El alginato ha sido estudiado extensivamente debido a sus propiedades únicas de compatibilidad con tejido y aplicaciones en ingeniería de tejidos, incluyendo la regeneración de piel, cartílago, huesos, hígado y tejido cardíaco. ³

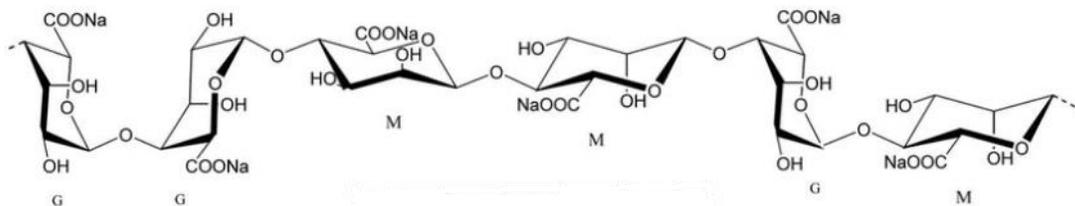


Figura 1. Molécula de Alginato de Sodio

Tabla 1. Artículos relacionados con aplicaciones del SA en ingeniería de tejidos.

Referencia	Resultados
<p>Tingting Liang, Jingwen Wu, <i>Drug-Loading three-dimensional scaffolds based on hydroxyapatite-sodium alginate for bone regeneration</i>, Society for Biomaterials, WILEY, (2020).</p> <p>Línea de investigación: Regeneración de hueso</p>	<p>Se generó un hidrogel de hidroxiapatita (HA) y alginato de sodio (SA) para la formación de un andamio poroso mediante impresión 3D.</p> <p>Se demostró que el andamio fue capaz de soportar y permitir la proliferación de células madre mesenquimales (BMSCs) además de favorecer su diferenciación a osteocitos.</p>
<p>Kun Zhang, Zhenqing Shi, <i>Potential application of an injectable hidrogel scaffold loaded with mesenchymal stem cells for treating traumatic brain injury</i>, Royal Society of Chemistry, (2018).</p> <p>Línea de investigación: Tratamiento de daño cerebral por trauma.</p>	<p>Se desarrolló un hidrogel compuesto de SA y ácido hialurónico (HA) para generar un andamio celular inyectable.</p> <p>Se demostró que el andamio permite la proliferación de células madre mesenquimales, además de facilitar la aplicación de las mismas en el área de la lesión.</p> <p>Luego 28 días de aplicar el hidrogel en ratas, se observó una contribución importante a la recuperación de la lesión en comparación con los experimentos control.</p>
<p>Wei Yang, Hongjie Xu, <i>Preparation and Characterization of a novel silk fibroin /hyaluronic acid/sodium alginate scaffold for skin repair</i>, International Journal of Biological Macromolecules, (2019).</p> <p>Línea de investigación: Regeneración de piel</p>	<p>Se generó un andamio celular de Fibroína de seda/ Ácido hialurónico/ Alginato de sodio con un 92% de porosidad mediante un procesado de congelamiento y secado.</p> <p>Se demostró que el andamio presenta propiedades mecánicas adecuadas y permite la adhesión y proliferación celular.</p> <p>Adicionalmente, el andamio compuesto proporcionó un entorno favorable para la cicatrización de heridas, además de promover una mayor deposición de</p>

colágeno logrando un rendimiento notable en la reconstrucción de piel.

Polivinil alcohol

Sólido incoloro, solubilidad en agua caliente. Químicamente estable. ⁶

Es un polímero con buena estabilidad térmica y química, altamente biocompatible. Puede procesarse fácilmente. Se ha utilizado en aplicaciones médicas, cosméticas y alimenticias. ⁷

Incluso, se ha logrado utilizar en la generación de andamios con aplicación en ingeniería de tejido cardíaco, gracias a sus propiedades flexibles, hidrofílica, biodegradabilidad y biocompatibilidad. ⁸ En la figura 2 se observa la molécula de Poli vinil alcohol.

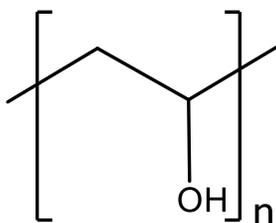


Figura 2. Molécula de Poli (vinil alcohol)

Para el desarrollo del proyecto, se busca utilizar el PVA para mejorar la movilidad de las cadenas del SA durante el proceso de electrohilado.

Las dificultades para trabajar con SA en electrohilado son que la gelación de la solución de alginato empieza a muy bajas concentraciones de polímero (2% de SA en agua desionizada). A tan bajas concentraciones, la solución no posee material suficiente para generar estructuras fibrosas. Si se aumenta la concentración, la disolución se vuelve demasiado viscosa y no es posible inyectarla. Una manera de solucionar este problema, es incorporar una fracción de copolímero, o aplicar surfactantes o codisolventes a la disolución original. ³

Es importante señalar que se ha logrado obtener fibras uniformes de aproximadamente 200 nm de radio, únicamente de alginato de sodio (SA), adicionando glicerol como co-disolvente. ⁹

Tabla 2. Artículos relacionados con aplicaciones del PVA en ingeniería de tejidos

Referencia	Resultados
<p>Issabetta Dattola, Elvira Immacolata, <i>Development of 3D scaffold for cardiac tissue engineering and cell screening applications</i>, Royal Society of Chemistry, (2019).</p> <p>Línea de investigación: Regeneración de tejido cardíaco</p>	<p>Se obtuvo un andamio celular poroso, biocompatible y 3D a base de PVA, mediante procesos de generación de espuma y secado en frío.</p> <p>Se demostró que el andamio fue capaz de soportar y permitir la diferenciación de células pluripotenciales a cardiomiocitos. Además, el andamio presentó propiedades mecánicas similares a la matriz extracelular de los músculos del corazón.</p>
<p>Neda Dadgar, Ali Ghiaseddin, <i>Bioartificial injectable cartilage implants from demineralized bone matrix / PVA and related studies in rabbit animal model</i>, Biomaterials Applications, (2020).</p> <p>Línea de investigación: Regeneración de tejido de cartílago.</p>	<p>Se obtuvo una matriz de hueso desmineralizada (DBM) con Polivinil alcohol (PVA), para generar un andamio homogéneo, biodegradable e inyectable capaz de asistir en la regeneración de cartílago.</p> <p>Se demostró que el andamio fue capaz de soportar y permitir la proliferación de células madre mesenquimales de médula ósea, además de favorecer la Condrogénesis.</p> <p>Adicionalmente, se realizaron estudios <i>in vivo</i> en los cuales se muestra una reparación evidente del cartílago de rodilla en fémur de conejo.</p>
<p>Regina Giovanni, Untung A. Wibowo, <i>Growth of Human Dermal Fibroblasts on PolyvinylAlcohol-Silk Fibroin Nanofiber Scaffold</i>, J. Math. Fund. Sci., Vol. 51, No.3, (2019).</p> <p>Línea de investigación: Regeneración de piel.</p>	<p>Se generó un andamio de Fibroína de seda (SF) y PVA mediante la técnica de electrohilado, capaz de imitar las fibras de colágeno en piel.</p> <p>Se demostró que el andamio SF-PVA permite el crecimiento y proliferación de células fibroblastos dérmicos humanas (HDF).</p>

Andamios

Los andamios son matrices porosas desarrolladas para proveer de un microambiente definido que promueva la reparación y regeneración del tejido. Un andamio debe ser capaz de facilitar el transporte de masa y nutrientes, así como promover la supervivencia, proliferación y diferenciación celular. Debe estimular la adherencia, crecimiento y migración de las células dentro del material y ofrecer una estructura con soporte mecánico resistente a la tensión y, a su vez, poseer elasticidad.

Otras características importantes son que un andamio debe ser capaz de degradarse a un ritmo controlado, no presentar toxicidad ni procesos inflamatorios importantes *in vivo*.¹⁰

Se han logrado desarrollar andamios de diversos materiales tales como metales, cerámicos y polímeros. Estos últimos, juegan un papel importante en la ingeniería de tejidos, ya que permiten la formación de andamios tridimensionales, con tamaños de poro variables e interconectividad entre los mismos, lo cual es una característica clave en la implantación de células, así como su migración, crecimiento y transporte de masa dentro del andamio.

Los polímeros biodegradables son candidatos atractivos para la formación de andamios, ya que estos se degradan conforme el nuevo tejido es formado y, al final desaparecen por completo dejando al cuerpo del huésped libre de material externo a su tejido natural.¹¹

Electrohilado (electrospinning)

La técnica de electrohilado se basa en el estiramiento o elongación de un chorro viscoelástico derivado de una solución de polímero o de un polímero fundido. Permite la obtención de fibras en un rango entre los 40 a 2000 nm, con diámetros uniformes.¹²

Mediante la técnica de electrohilado, una fibra sólida es generada conforme un chorro electrificado es continuamente estirado debido a la repulsión electrostática entre las cargas superficiales del polímero.

El hilador (spinnerete) es conectado a una jeringa, en donde se aloja la solución de polímero. Con el embolo de la jeringa, la solución se hace pasar a través del hilador de manera constante y controlada. Un alto voltaje (entre 1 a 30 kV) es aplicado, lo que provoca que se distribuyan cargas superficiales en el hilo de disolución proveniente de la jeringa. Como resultado, el chorro experimenta una repulsión electrostática entre las cargas superficiales y fuerzas de Coulomb ejercidas por el campo electrostático aplicado.

Bajo la acción de estas interacciones electrostáticas, el chorro será distorsionado a medida que aumenta el voltaje hasta formar lo que se conoce como *Cono de Taylor*. Una vez que la fuerza del campo aplicado ha superado un valor umbral, las fuerzas electrostáticas pueden romper la tensión superficial de la solución de polímero y esto fuerza la eyección del líquido por la boquilla.

Posteriormente, este chorro electrificado pasa por un proceso de estiramiento para la formación de una fibra delgada. Conforme la fibra es estirada y el disolvente se evapora, el diámetro se va reduciendo.

Atraídas por el colector (conectado a tierra), las fibras electrificadas se depositan con una orientación aleatoria.¹³

La orientación de las fibras de electrohilado se pueden controlar modificando el diseño de los electrodos del conector.

La morfología y diámetro de las fibras dependen de los siguientes parámetros:¹³

1. Las propiedades intrínsecas de la solución de polímero (tipo de polímero, conformación de las cadenas, viscosidad, concentración, elasticidad, conductividad eléctrica, polaridad, y tensión superficial del disolvente)
2. Las condiciones de operación (la fuerza del campo aplicado, la distancia entre el hilador y el colector, y la velocidad de alimentación de la solución de polímero)
3. Humedad y temperatura del ambiente

Es importante mantener un flujo constante del chorro, ya que el diámetro de la fibra disminuye conforme la longitud aumenta, de manera que debe mantenerse constante la cantidad de masa por unidad de tiempo.¹²

En la **Figura 3** se muestra un diagrama general de los componentes del equipo descritos anteriormente.

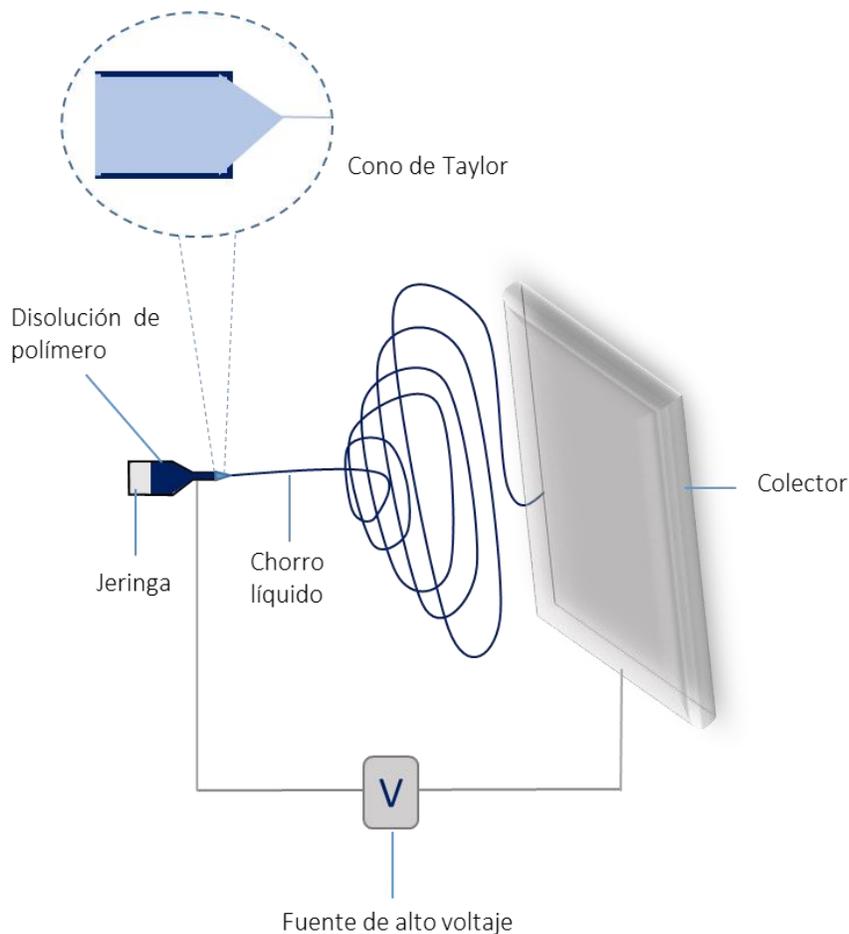


Figura 3. Esquema general de componentes del equipo de Electrohilado.

Microscopía de fuerza atómica (AFM)

El principio de operación del equipo consiste en una punta afilada que interactúa con la superficie de la muestra, esta va detectando las fuerzas locales (en cada punto), entre las moléculas en la superficie y la punta del equipo sin utilizar luz. Como analogía podemos pensar en una persona que lee en braille. De esta manera, se puede obtener la topografía de la muestra con resolución atómica.¹⁴ En la **Figura 4** se aprecian los componentes del equipo.

Los componentes del equipo consisten en:

- Una punta afilada montada en una viga elevada flexible (Cantilever).
- Sistema de monitoreo del movimiento del cantiléver, compuesto por un láser y un fotodetector.

- El escáner piezoeléctrico encargado de mover la muestra. La imagen en 3D se construye al interpretar el movimiento del cantiléver en la dirección Z en función del movimiento de la muestra en X y Y.
- El sistema de conversión de los datos crudos obtenidos por el equipo a una imagen interpretable. ¹⁵

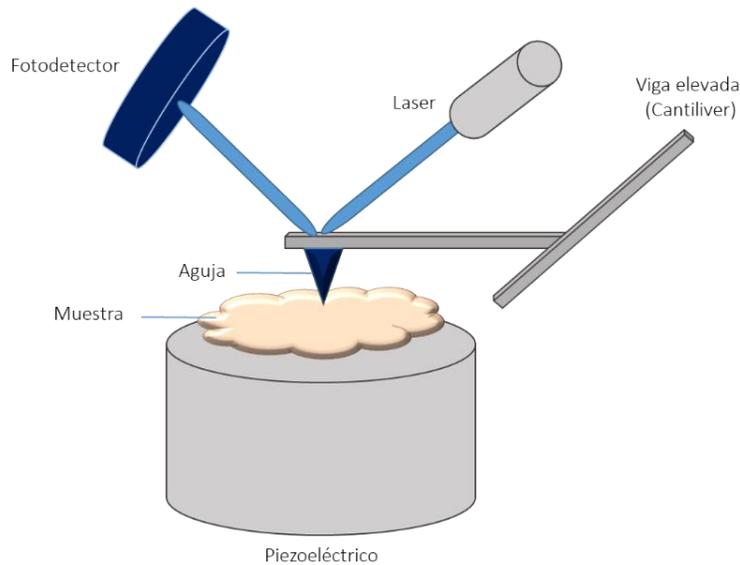


Figura 4. Esquema general de los componentes de un equipo de Microscopía de Fuerza Atómica.

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La microscopia electrónica de barrido es una técnica utilizada para observar la superficie de una muestra analizada. Las imágenes se obtienen a partir de un escaneo de la superficie de la muestra con un haz de electrones, lo cual brinda una mayor resolución (nanómetros) en comparación con un microscopio óptico (micrómetros), debido a que los electrones poseen una menor longitud de onda que la de los fotones (luz), gracias a esto, es posible obtener imágenes mucho más detalladas.

La técnica de SEM es una herramienta ampliamente utilizada en la caracterización de materiales, ya que nos permite obtener información de la estructura superficial, composición y defectos en el material.

Los componentes de un microscopio electrónico de barrido consisten en:

- La columna, en la parte superior de esta se encuentra la fuente generadora del haz de electrones
- Lentes electromagnéticas localizadas en el interior de la columna, se encargan de guiar el haz de electrones hasta una sonda de nanómetros de diámetro.

- Las bobinas de escaneo, las cuales dirigen la sonda haciendo un barrido sobre la superficie de la muestra.
- La cámara de la muestra, localizada al final de la columna.

El equipo se encuentra sellado al vacío para prevenir una desviación anormal del haz de electrones. El haz interactúa con los átomos de la muestra y genera una variedad de señales (electrones refractados, secundarios, RX característicos), las cuales son captadas por el equipo y procesadas hasta formar una imagen. La **Figura 5** muestra los componentes del sistema. La resolución de los equipos más modernos puede llegar a ser de menos de 1 nm.¹⁶

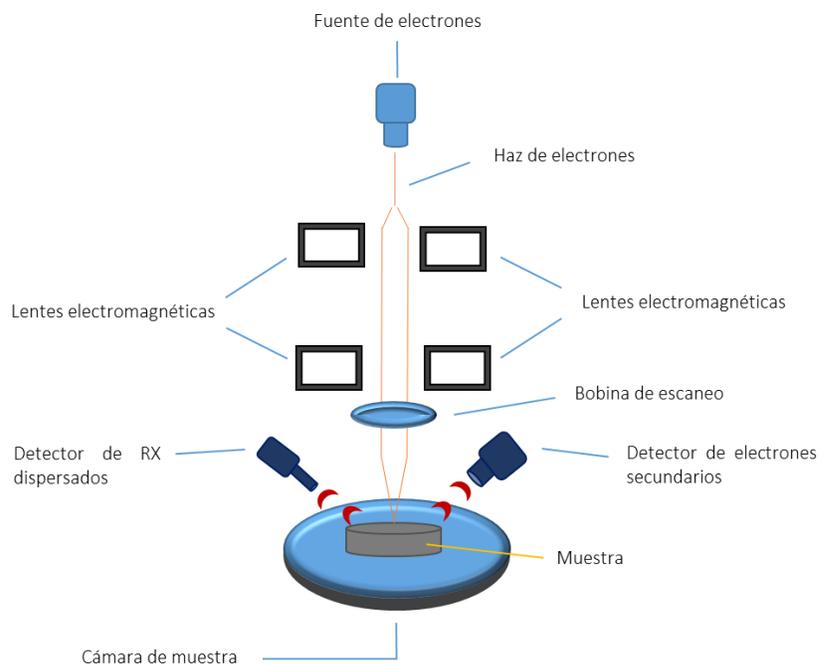


Figura 5. Esquema de los componentes de un microscopio electrónico de barrido

Espectroscopia electroquímica de impedancia (EIS).

La espectroscopia electroquímica de impedancia es un método analítico utilizado para el estudio de sistemas electroquímicos, aplicando un voltaje en función de un rango de frecuencias. La impedancia se define como la medida de la resistencia al flujo de corriente eléctrica de un circuito y se mide en unidades de Ω (ohm). La **Figura 6** muestra un esquema general del sistema.

Se pueden hacer mediciones con gran sensibilidad, obteniendo información de la evolución de un sistema respecto a un tiempo determinado.¹⁷

El uso del EIS en aplicaciones biológicas ha sido reportado sobre todo en estudio de la impedancia de células biológicas y el estudio de la actividad de enzimas combinadas con moléculas objetivo. ¹⁸

En la mayoría de los experimentos de EIS, un voltaje sinusoidal fijo se aplica mediante un potenciostato a través de una celda de tres electrodos, que contiene una solución de electrolito de la molécula que se está investigando. Para moléculas biológicas, suelen utilizarse voltajes menores en comparación que los utilizados en moléculas no biológicas, ya que los compuestos biológicos se desnaturalizan fácilmente. ¹⁸

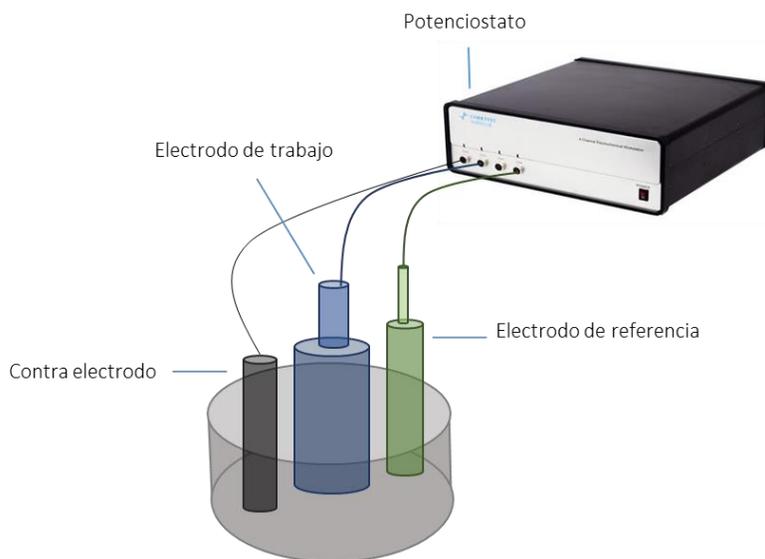


Figura 6. Esquema general del equipo de EIS. Arreglo de tres electrodos.

En trabajos anteriores dentro del grupo de investigación, se ha logrado utilizar la técnica de EIS para el monitoreo de la biocompatibilidad del andamio SA/PVA con las células implantadas (fibroblastos gingivales).¹⁹

La impedancia de un sistema Z_w , es una cantidad compleja que se compone de una magnitud y un cambio de fase que depende de la frecuencia de la señal. Por lo tanto, al variar la frecuencia de la señal aplicada, podemos obtener la impedancia de un sistema en función de esta frecuencia. Normalmente, el rango de frecuencias va de 100 kHz hasta 0.1 Hz.²⁰

La impedancia de un sistema a una frecuencia dada esta definida por dos términos que relacionan la corriente resultante al voltaje aplicado, estos son la amplitud de la corriente dividida entre la amplitud del voltaje y el ángulo de fase proporcional al cambio entre el pico de corriente y el pico de voltaje. Las lecturas de estos parámetros a diferentes frecuencias corresponden al espectro de impedancia. Estos parámetros se expresan en términos de la parte real e imaginaria de la impedancia. ²¹

La impedancia de un sistema puede calcularse a partir de la ley de Ohm como muestra la ecuación [1].

$$z_w = \frac{E_w}{i_w} \text{-----}[1]$$

Donde

E_w = Potencial

i_w = Corriente

Al ser una cantidad compleja, podemos representar la impedancia tanto en coordenadas cartesianas como en polares.

Podemos representar la impedancia en coordenadas polares a partir de la ecuación [2].

$$z = |z|e^{j\omega\varphi} \text{-----}[2]$$

Donde

$|z|$ = magnitud de la impedancia

φ = cambio de fase

ω = frecuencia angular = $2\pi f$

Podemos representar la impedancia en coordenadas cartesianas a partir de la siguiente ecuación [3].

$$z = z' - j.z'' \text{-----}[3]$$

Donde

z' = parte real de la impedancia

z'' = parte imaginaria de la impedancia

$$j = \sqrt{-1}$$

$$z' = |z| \cos \varphi$$

$$-z'' = -|z| \sin \varphi$$

Representación de datos

Podemos representar gráficamente a la impedancia de un sistema a partir de una gráfica Nyquist, en la cual se grafica la parte real contra la imaginaria como se representa en la **Figura 7**.

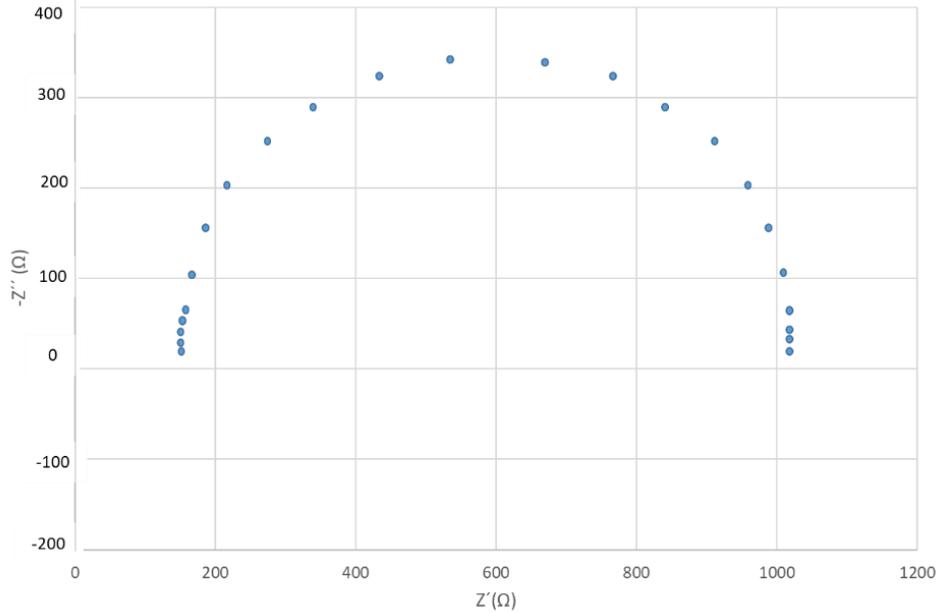


Figura 7. Grafica Nyquist

La forma de la curva es importante al momento de hacer interpretaciones cuantitativas de datos. La desventaja es que la información de la frecuencia no se presenta.

Podemos obtener otro tipo de representación en la que el módulo y el cambio de fase se grafican como función de la frecuencia como se muestra en la **Figura 8.**²⁰

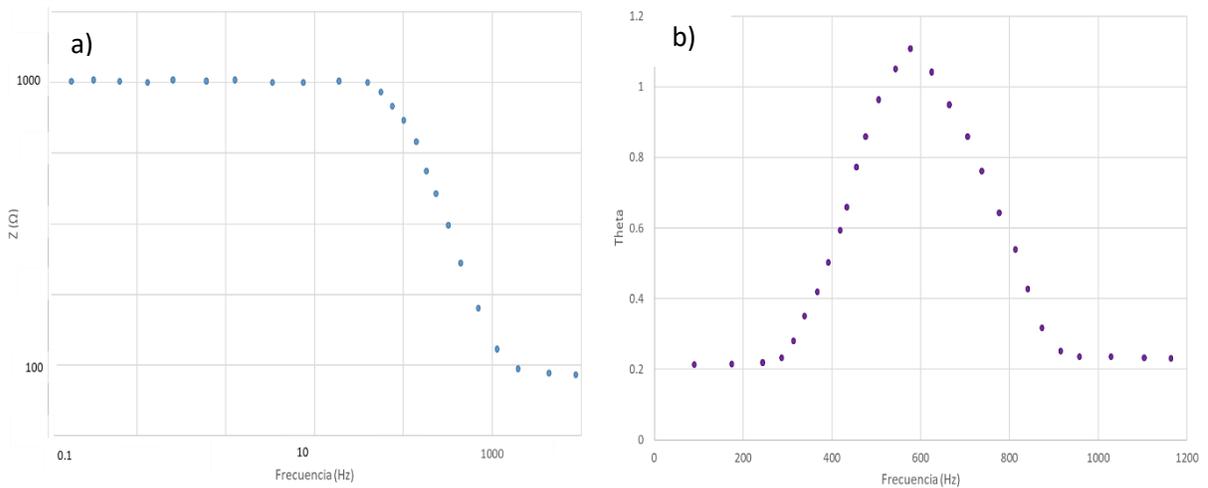


Figura 8. Grafica Bode. a) bode impedancia, b) bode fase

A partir de los resultados de EIS, podemos generar un circuito equivalente que genere la misma respuesta eléctrica que el sistema analizado, un metal en corrosión o un sistema

biológico. De esta manera, podemos identificar y cuantificar los valores de capacitancia y resistencia del sistema.²¹

Sembrado de células en andamios poliméricos

Como se ha mencionado anteriormente, la ingeniería de tejidos busca generar andamios en los que sea posible sembrar células humanas y que a su vez este andamio les permita madurar hasta el punto en el que sean capaces de asistir al huésped en la formación o regeneración de tejido funcional.

Algunos requerimientos generales para el sembrado de células en los andamios son:

- Alto rendimiento, en favor de maximizar la utilización de las células donadas
- Alta cinética, para minimizar el tiempo en la suspensión del cultivo
- Distribución parcialmente uniforme de las células adheridas, para que, a su vez la regeneración del tejido sea uniforme
- Y alta impregnación celular inicial, para mejorar la tasa de desarrollo del tejido

Las células utilizadas son extraídas, cultivadas y proliferadas *in vitro* hasta obtener suficiente masa celular para ser sembradas en el andamio. Además, estas células deben tener la capacidad de diferenciarse en el tejido que se busca obtener.

Antes de sembrar las células, el andamio debe ser esterilizado y humedecido en medio de cultivo hasta desplazar todo el aire, posteriormente, el andamio debe permanecer en el medio de cultivo de entre 2 a 24 horas antes del sembrado celular.

En general, el sembrado celular en andamios poliméricos se realiza en una incubadora humificada a 37 °C, bajo una atmósfera que contiene entre 5-10 % de CO₂ y el resto de aire. La duración del sembrado puede tardar de 1 h a 3 días, dependiendo del tipo de células y del andamio mismo, así como el recipiente en el que se realiza el sembrado y el método de siembra a utilizar.²² La **Figura 9** muestra el proceso general del sembrado celular en los andamios poliméricos.

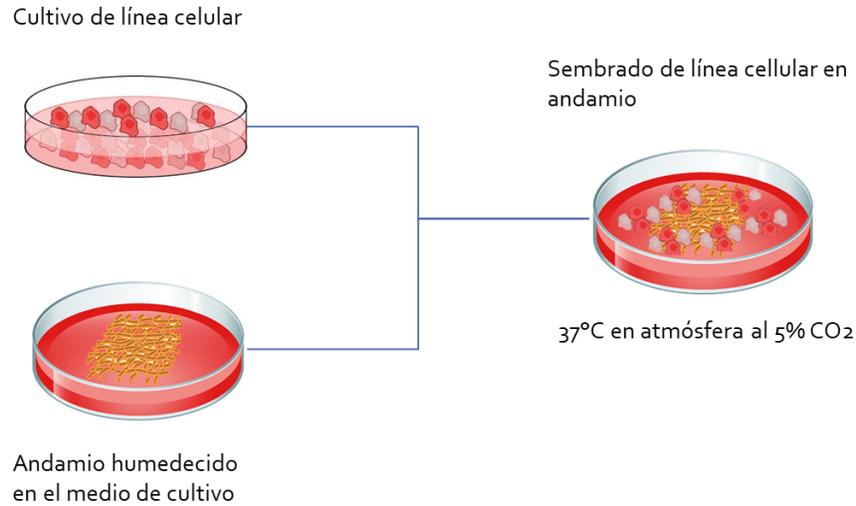


Figura 9. Esquema general del sembrado de la línea celular en los andamios.

Línea celular utilizada

Cardiomiocitos de Ratón

Los cardiomiocitos son las células del tejido cardíaco responsables de las contracciones del corazón. La mayoría de estos cardiomiocitos existen como células estables por años y cumplen su función, es decir, se contraen aproximadamente 60 veces por minuto en humanos, y de 400 a 600 veces en roedores.²³

Las enfermedades cardíacas son responsables de una mortalidad importante a nivel mundial y la cantidad de donantes no es suficiente para cubrir la demanda de pacientes. Además, los tratamientos tradicionales previenen los daños a futuro, pero no son capaces de revertir el daño que ya se ha sufrido. Por otro lado, el corazón posee una limitada capacidad de regenerarse.²⁴

Los andamios celulares representan nuevas oportunidades para el desarrollo de terapias modernas que faciliten el tratamiento de tejidos con dificultad de sanar por sí mismos, específicamente hablando del corazón.

La **Figura 10** muestra las diferentes morfologías que pueden presentar estas células en cultivo.

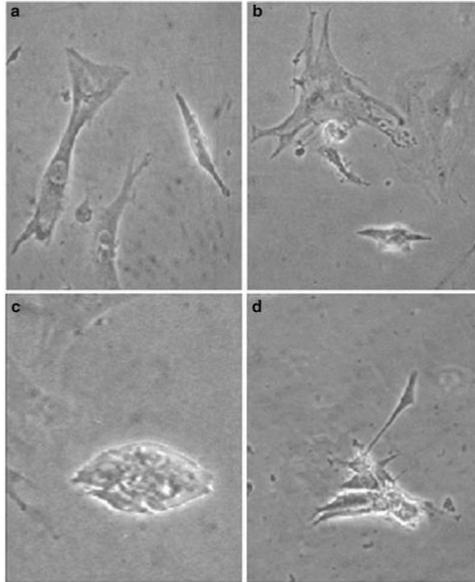


Fig. 1 Phase contrast photomicrograph of cultures showing different morphologies of beating cardiomyocytes in culture (a-d; magnification: $\times 400$)

Figura 10. Micrografía de Cardiomiocitos de ratón en cultivo. Imagen extraída de Gary R. Skuse, Maureen C. Ferran, *Cardio-myocytes Methods and Protocols*, Springer Protocols, Humana Press, 2015, Pag. 22.

Microscopía de Fluorescencia

La microscopia de fluorescencia se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de andamios celulares, ya que permite observar la distribución y proliferación de las células dentro del andamio.²⁵

La fluorescencia es el fenómeno de emisión espontánea de luz (fotones) de un átomo o molécula. En un primer paso, el material absorbe radiación de una fuente específica y posteriormente emite luz de menor longitud de onda que la de la radiación absorbida.²⁵

La diferencia entre fluorescencia y fosforescencia es que en el primer caso la energía absorbida es emitida inmediatamente, mientras que en la fosforescencia la energía se almacena y se libera en una emisión retardada durante minutos o incluso horas después de dejar de estar en contacto con la fuente de radiación.²⁵

Un fluorocromo es una molécula capaz de absorber fotones y emitirlos. Un fluoróforo es la parte del fluorocromo responsable de esta emisión. Los fluoróforos pueden ser moléculas orgánicas que pueden ser utilizados como marcadores de biomoléculas.²⁵

Podemos tener fenómenos de fluorescencia primaria, en el cual los fluoróforos son intrínsecos del material, es decir, el material fluoresce naturalmente.²⁵

También podemos tener fluorescencia secundaria, en el cual los fluoróforos son extrínsecos, es decir, se deben introducir en la estructura del material para que este fluoresca.²⁵

Este último procedimiento es el más utilizado en aplicaciones biológicas, debido a que se añaden fluoróforos a los componentes biológicos (células en este caso) mediante un proceso de tinción, y de esta manera podemos observarlos en el microscopio.

Ensayos de Citotoxicidad y Adherencia celular

Ensayo de Resazurina (citotoxicidad)

Los efectos sobre la proliferación en células cardíacas de ratón se determinaron mediante el ensayo de Resazurina, también conocido como Almar Blue Test. Las células no sembradas en los andamios se consideraron como el control.

La Resazurina es un indicador celular permeable para reacciones de óxido- reducción (REDOX), que se utiliza para monitorizar el número de células viables en cultivo. La Resazurina se disuelve en soluciones tamponadas fisiológicas, resultando en una solución de color azul profundo, y al añadirse directamente a las células de manera homogénea, se oxida en una solución de color rosa brillante.

Las células metabólicamente activas pueden reducir la Resazurina (Azul) en un producto de Resofurina (rosa) el cual es fluorescente, tal como muestra la **Figura 11**. Este cambio de color emite fluorescencia, y puede ser leído con un espectrofotómetro.²⁶

La cantidad de Resofurina producida es proporcional al número de células viables, misma que se puede cuantificar usando un espectrofotómetro.

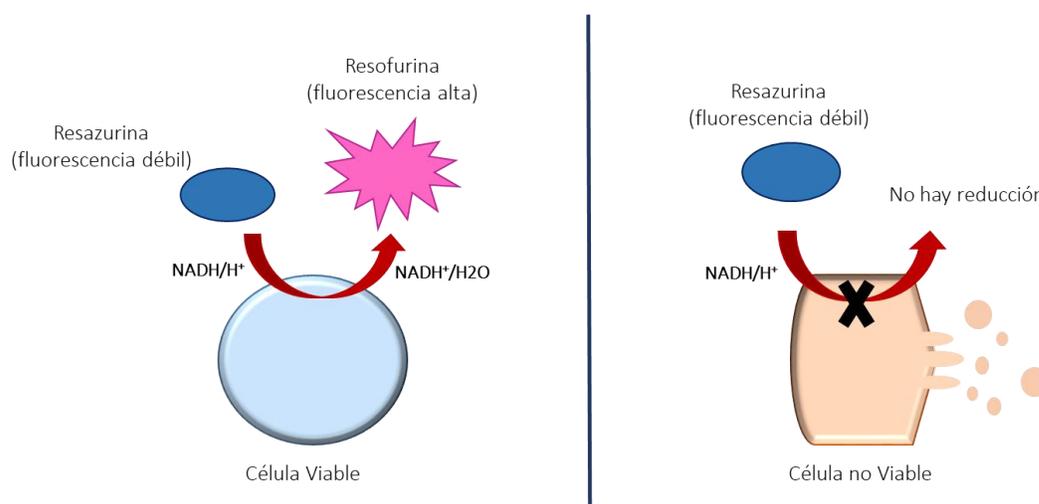


Figura 11. Esquema general de la comparación entre la interacción de la Resazurina con una célula viable y una no viable.

Tinción con Calceína (adherencia)

La Calceína AM es un compuesto no incoloro y fluorescente, al ser absorbido por las células vivas su actividad enzimática transforma a la Calceína AM no fluorescente en Calceína hidrolizada fluorescente, cuyo color verde intenso característico permite ver la cantidad de células vivas en la muestra, tal como muestra la **Figura 12**, de esta manera podemos determinar la adherencia y distribución de las células en los andamios, así como su proliferación en los mismos.

La calceína permea en la membrana celular, por lo que podemos observar la fluorescencia de las células viables en su membrana, no en el núcleo.²⁷

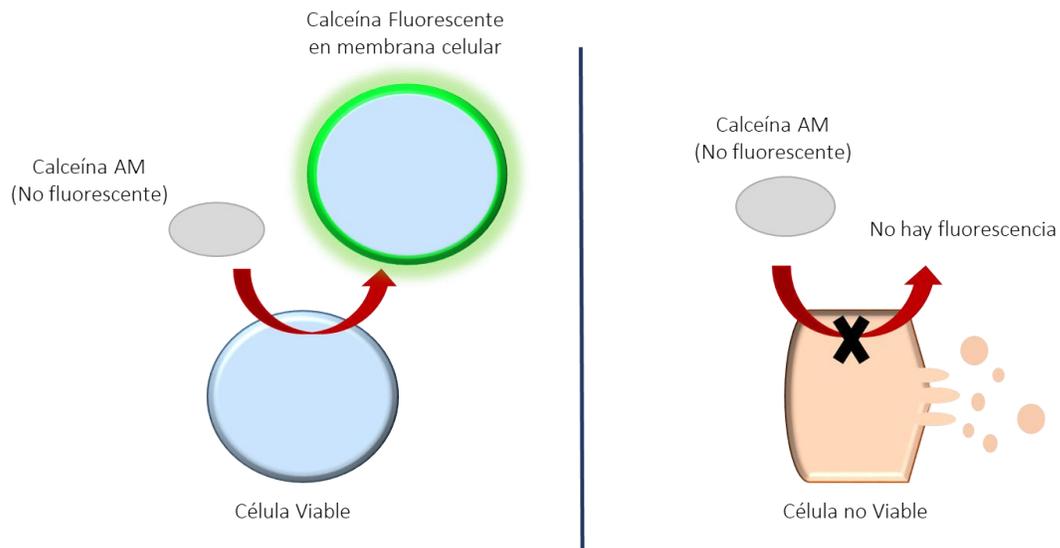


Figura 12. Esquema general de la comparación entre la interacción de la Calceína AM con una célula viable y una no viable.

Capítulo 2.

Sección Experimental

Preparación de disolución de PVA

Se prepararon 50mL de una disolución de PVA al 10%, pesando 5g de PVA reactivo de Aldrich chemistry, 99%+ hidrolizado, CAS 9002-89-5 y disolviéndolo en 50mL de agua destilada. La mezcla se mantuvo a reflujo de entre 70 a 80 °C y en agitación durante 4 horas. Posteriormente se dejó enfriar y reposar durante 24 horas más.

Preparación de disoluciones de SA

Se prepararon disoluciones de SA de Sigma-Aldrich, CAS 9005-38-3, a diferentes concentraciones 3.5 %, 4.0 % y 5.0 %, para lo cual se pesaron 0.7g, 0.8g y 1.0g, respectivamente y se disolvieron en 20 mL de agua destilada. Las mezclas se mantuvieron en agitación durante 24 horas y se dejaron reposar durante 24 horas más.

Preparación de mezclas PVA-SA

De las disoluciones preparadas anteriormente, se obtuvieron mezclas de PVA con SA en proporción 1:1 con las diferentes concentraciones. Se tomaron 5mL de la disolución de PVA 10% y se mezclaron con 5 mL de las disoluciones de Alginato de Sodio de 3.5 %, 4.0% y 5.0%, respectivamente. Las mezclas se dejaron en agitación durante 4 horas y se permanecieron en reposo por 24 horas más.

Formación de los andamios mediante Electrohilado

La preparación de los andamios se llevó a cabo mediante la técnica de electrohilado a partir de cada una de las mezclas obtenidas. Cabe señalar que la concentración para cada proceso se refiere a la concentración de SA en la mezcla, ya que el PVA utilizado siempre es al 10%. El depósito de las fibras que forman los andamios se llevó a cabo en tres diferentes colectores; portaobjetos con recubrimiento conductor de Santa Cruz Biotechnology, de 75 mm X 25 mm, para las pruebas de adherencia (tinción con calceína); en aluminio para las pruebas de citotoxicidad (ensayo de Rezarsurina) y en chips los cuales se utilizaron como electrodos de trabajo en las pruebas de impedancia.

En la **Figura 13** se presenta el montado del equipo de electrohilado para los diferentes colectores utilizados.

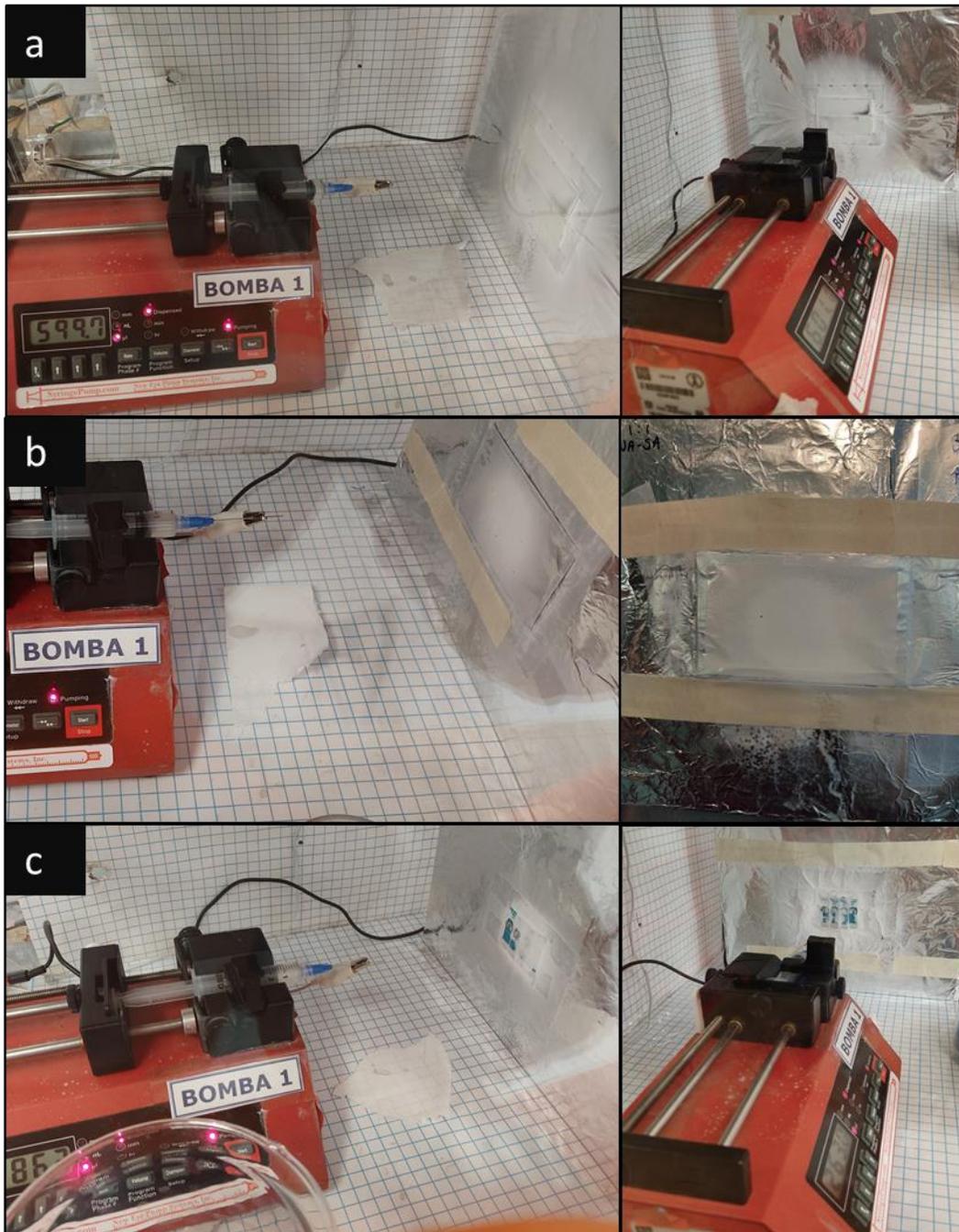


Figura 13. Equipo de electrohilado. a) colectado de fibras en portaobjetos, utilizados en los ensayos de adherencia b) colectado de fibras en aluminio, utilizadas para ensayos de citotoxicidad y micrografías SEM y AFM, c) colectado de fibras en chip, utilizados como electrodos de referencia en pruebas de EIS.

Parámetros utilizados

Los parámetros utilizados en el equipo de electrohilado para cada muestra, fueron determinados en trabajos previos del grupo.

Para la obtención de los andamios de PVA-SA al 3.5% se utilizaron los siguientes parámetros experimentales.

Distancia de la jeringa a la placa metálica = 10 cm

Flujo de mezcla = 11 $\mu\text{L}/\text{min}$

Voltaje = 17 KV

Corriente = 40 μA

Tiempo total de electrohilado = 6 horas

Para la obtención de los andamios de PVA-SA al 4.0% se utilizaron los siguientes parámetros experimentales.

Distancia de la jeringa a la placa metálica = 10 cm

Flujo de mezcla = 11 $\mu\text{L}/\text{min}$

Voltaje = 17 KV

Corriente = 40 μA

Tiempo total de electrohilado = 6 horas

Para la obtención de los andamios de PVA-SA al 5.0% se utilizaron los siguientes parámetros experimentales.

Distancia de la jeringa a la placa metálica = 10 cm

Flujo de mezcla = 14 $\mu\text{L}/\text{min}$

Voltaje = 19 KV

Corriente = 70 μA

Tiempo total de electrohilado = 5 horas

Proceso de entrecruzamiento de fibras en andamios

Los andamios obtenidos fueron sometidos a un proceso de entrecruzamiento de las fibras poliméricas con CaCl_2 al 2% en $\text{EtOH-H}_2\text{O}$ como agente entrecruzante, con el fin de mejorar las propiedades del material formando una película plástica e insoluble en agua. Esto es necesario debido a que las células implantadas se encuentran en medio acuoso.

El entrecruzamiento se lleva a cabo entre los iones Ca^{2+} liberados en la disolución de CaCl_2 en $\text{EtOH-H}_2\text{O}$ y los iones negativos tanto de SA en disolución tal como se propone en la **Figura 14**.²⁸

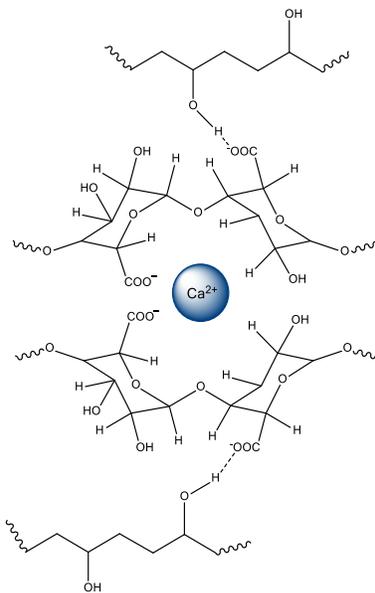


Figura 14. Propuesta del posible arreglo resultante del entrecruzamiento de las cadenas del polímero formado por la mezcla del PVA-SA con CaCl_2 en EtOH como agente entrecruzante.

Preparación de disolución de CaCl_2 al 2%.

Se prepararon 300 mL de una disolución de CaCl_2 al 2% en una mezcla disolventes $\text{EtOH-H}_2\text{O}$ en relación 1:1, es decir, se colocaron 150 ml de EtOH y 150 mL de H_2O , y se mezclaron con 6.004g de CaCl_2 anhidro al 96%, Reaquimez, CAS: 10043-52-4. La mezcla se dejó en agitación por 4 horas y se almaceno en un frasco de vidrio ámbar.

Entrecruzado de fibras

Los andamios fueron sumergidos en la disolución CaCl_2 al 2% durante dos horas, posteriormente, la disolución de cloruro de calcio fue retirada y los andamios fueron lavados tres veces con agua destilada. Los andamios se sumergieron en agua destilada durante dos horas más. Finalmente, el agua fue retirada dejando secar los andamios por 24 horas.

En la **Figura 15 y 16**, se observa la comparación entre las muestras de los andamios antes de ser entrecruzadas y después del proceso de entrecruzamiento de las fibras. A simple vista

podemos observar que existe un cambio de color característico; mientras que los andamios sin entrecruzar se muestran como una película blanca sobre el colector, los andamios que han pasado por el proceso de entrecruzado se observan como una película transparente.

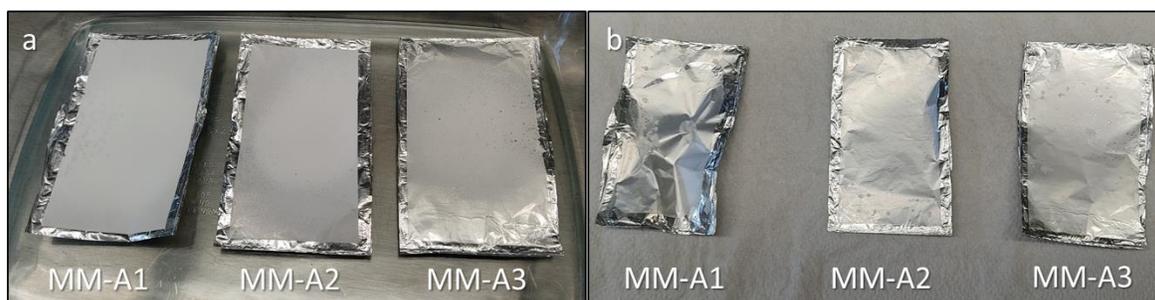


Figura 15. a) Andamios de PVA montados en aluminio sin entrecruzar, b) andamios de PVA montados en aluminio después de entrecruzar.

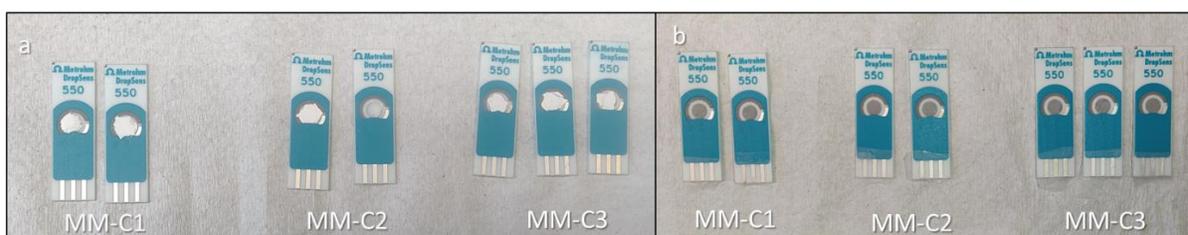


Figura 16. a) Andamios de PVA montados en chips sin entrecruzar, b) andamios de PVA montados en chips después de entrecruzar.

Estudios por SEM y AFM

La preparación de muestras para los estudios por microscopía electrónica de barrido y microscopía de fuerza atómica, consistió en tomar una sección de 1x1 cm del andamio obtenido por electrohilado antes y después de ser sometidos al proceso de entrecruzado de sus fibras con CaCl_2 2%. Las muestras fueron enviadas al Instituto de Investigación en Materiales para su análisis. También se enviaron muestras de los andamios obtenidos en aluminio con las líneas celulares sembradas.

Ensayos de citotoxicidad y adherencia celular

Los estudios de citotoxicidad y adherencia se realizaron en conjunto con la unidad de Posgrado de Odontología, laboratorio de Bioingeniería y Tejidos por la Dra. Patricia Gonzales Alba.

Cultivo celular

La línea celular de cardiomiocitos de ratón fue cultivadas en Dulbecco's modified Eagle's medium (Caisson, DFL14, Smithfield, USA) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (FBS, Biowest, BIO-S1480, Francia), 1 % de Pen/Strep/Fungizone (Biowest, MS005Q1021, USA), y se incubaron a 37° C con 5% de CO₂ (incubadora New Brunswick, Galaxy 14S, Eppendorf, USA). Para los experimentos, las células a un 80% de confluencia, y después del tercero o cuarto pase, fueron recolectadas con solución de 0.25% Trypsin/0.02% EDTA (Cat. 59428C, Sigma-Aldrich Saint Louis, MO, USA) y re suspendidas en medio de cultivo DMEM con 10% de FBS.

Ensayo de citotoxicidad

Preparación de Resazurina

Se disolvió Resazurina de alta pureza en DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) a pH 7.4, en concentración de 0.15 mg/mL (solución stock). La solución se filtró a través de una membrana de 0.2 µm en un recipiente para protegerlo de la luz.

Se prepararon las células en un plato de 96 pozos con un volumen final de 100 µL/pozo, sobre las membranas de PVA/SA o sobre el plato de cultivo. Como control se utilizó medio sin células para sustraer la señal del fondo.

Se añadieron 20 µL de la solución stock de Resazurina a cada pozo y se incubó durante 3 horas a 37°C.

Para la evaluación del ensayo, se midió la respuesta de fluorescencia mediante un espectrofotómetro para placas ELISA (CHROMATE, Awareness Technology Inc.), y utilizando los filtros de emisión a 590 nm y de excitación a 600 nm.

Ensayo en andamios

Las membranas de 3.5%, 4.0%, y 5.0% de PVA-SA se cortaron en círculos de 5 mm de diámetro, y se esterilizaron bajo luz ultravioleta durante 30 minutos. A continuación, las membranas se colocaron en placas de cultivo de 96 pozos (Corning®, Cat. 3585, USA), donde los cardiomiocitos de ratón se sembraron a una densidad de 50 X 10⁴ células/mL, y se incubaron a 37° C, 5% de CO₂, durante 1, 3, 5 y 7 días, con DMEM/F12/10%FBS, el medio se cambió cada 48 horas.

La citotoxicidad de las membranas se analizó mediante el ensayo de la sal de sodio de rezarsurina a 0.15 mg/mL, pH 7.4 (Sigma-Aldrich Cat. # R7017, Saint Louis, MO, USA), conforme a las instrucciones del fabricante. En cada tiempo establecido se añadieron 20 µL de la solución de rezarsurina por cada 100 µL de medio de cultivo.

Adicionalmente, los pozos con únicamente el medio de cultivo, se prepararon con la solución de rezarsurina para sustraer el background, y ganar ajuste del experimento. Posteriormente, las muestras se incubaron durante 3 horas a 37 °C, pasado el tiempo de incubación, 100 µL

de medio se pasaron a una placa de ELISA, para proceder a la lectura de absorbancia en un lector de placas, con un filtro de excitación de 545 nm/ emisión 600 nm. Los resultados de la citotoxicidad se expresan en valores de Absorbancia. Adicionalmente, la proliferación se calculó con la ecuación 4.

$$\% = (\text{OD experimental}/\text{OD plato control}) \times 100 \text{ -----}[4]$$

Donde

OD = Densidad Óptica.

Ensayo de adherencia celular

Para determinar los efectos sobre la adherencia de los cardiomiocitos a los andamios SA/PVA, estos se sometieron a la tinción de Calceína-AM. Brevemente, los patrones de unión y distribución de las células se visualizaron con tinción vital con diacetato de fluoresceína (Calcein-AM, CMFDA, Sigma, EE. UU., Cat. C7025) y se visualizaron con una longitud de onda de excitación de filtro de 485 nm con un microscopio fluorescente AmScope.

Preparación de andamios

El ensayo de adherencia se realizó en los andamios colectados en portaobjetos, para lo cual se llevó a cabo la preparación de los mismos y el sembrado de la línea celular de acuerdo al procedimiento descrito en la *página 17* de la sección de antecedentes.

Tinción de calceína AM

Las células se sembraron en andamios de PVA/SA al 3,5 %, 4 % y 5 % con una densidad de 5×10^4 células/mL, los resultados se compararon con los de las placas de cultivo celular de plástico. El medio se cambió cada 48 horas. Se permitió que los cardiomiocitos se adhirieran a las condiciones de cultivo estándar durante 7 días. La tinción con CMFDA (calceína AM) se realizó intercambiando el medio con 10 mL de medio libre de rojo fenol y 5 μ L de solución stock de CMFDA (5 mg/mL en DMSO), seguido de una incubación durante 1 h a 37° C, 5 % de CO₂. A continuación, el medio de tinción se enjuagó con PBS tres veces y la distribución y el crecimiento celular sobre los andamios, se determinaron mediante microscopio óptico. El objetivo de este análisis cualitativo fue describir el patrón de distribución de las células, su cobertura de adhesión y su morfología.

Pruebas de impedancia

Los estudios de impedancia se realizaron en conjunto con la unidad de Posgrado de Odontología, laboratorio de Bioingeniería y Tejidos en colaboración con la Dra. Patricia Gonzales Alba.

Para poder sembrar las líneas celulares en los chips utilizados en las pruebas de impedancia, estos chips se montaron en pequeñas cajas Petri como se muestra en el panel *a* de la

Figura 17, posteriormente, se llevó a cabo el sembrado celular como se muestra en el panel b. Una vez concluido el proceso de sembrado, el sistema fue conectado al electrodo de trabajo del equipo de EIS. Para conservar la salud de las células en el sistema, fue necesario que este permaneciera dentro de una incubadora, como se muestra en el panel c, durante toda la prueba.

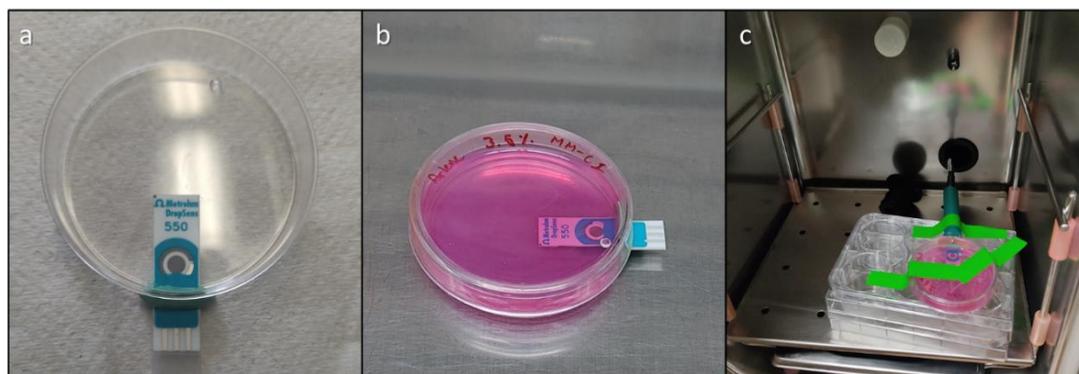


Figura 17. a) sistema de chip montado en caja Petri, b) sistema de chip montado en caja Petri con células y medio de cultivo, c) sistema de chip en caja Petri conectado al electrodo de trabajo dentro de incubadora.

Las pruebas de impedancia para todas las muestras analizadas se llevaron a cabo utilizando el programa Nova 2.1 por 71 horas consecutivas. En la siguiente imagen se muestra el armado general del sistema utilizado.



Figura 18. Sistema utilizado en las pruebas de impedancia de los andamios.

Capítulo 3.

Resultados

En el siguiente apartado se describen y discuten los resultados obtenidos para todos los experimentos realizados a lo largo del proyecto.

Estudios por SEM para andamios sin línea celular

A continuación, se presentan los resultados obtenidos por SEM para los diferentes andamios, haciendo una comparación entre la morfología del andamio antes y después del proceso de entrecruzado de las fibras.

Es importante mencionar que todas las micrografías se evaluaron en las muestras colectadas en aluminio.

Muestra correspondiente a 3.5% de concentración

Para el andamio PVA-SA al 3.5%, los primeros dos paneles (a.1 y a.2) de la **Figura 19**, muestran la morfología del andamio antes de someterse al proceso de entrecruzado, en estos se aprecian claramente las nanofibras a las diferentes magnificaciones de 15.00 KX y 1.00 KX respectivamente. Sin embargo, también se observa la presencia de ciertos grumos indicadores de un posible mal manejo de los parámetros de electrohilado, o un tiempo de mezclado insuficiente.

Por otro lado, los segundos paneles (b.1 y b.2) de la **Figura 19**, con aumentos de 10.00 KX y 250 X respectivamente, muestran el andamio después del entrecruzado, en el cual aparentemente las fibras se han ensanchado, dando paso a un material poroso.

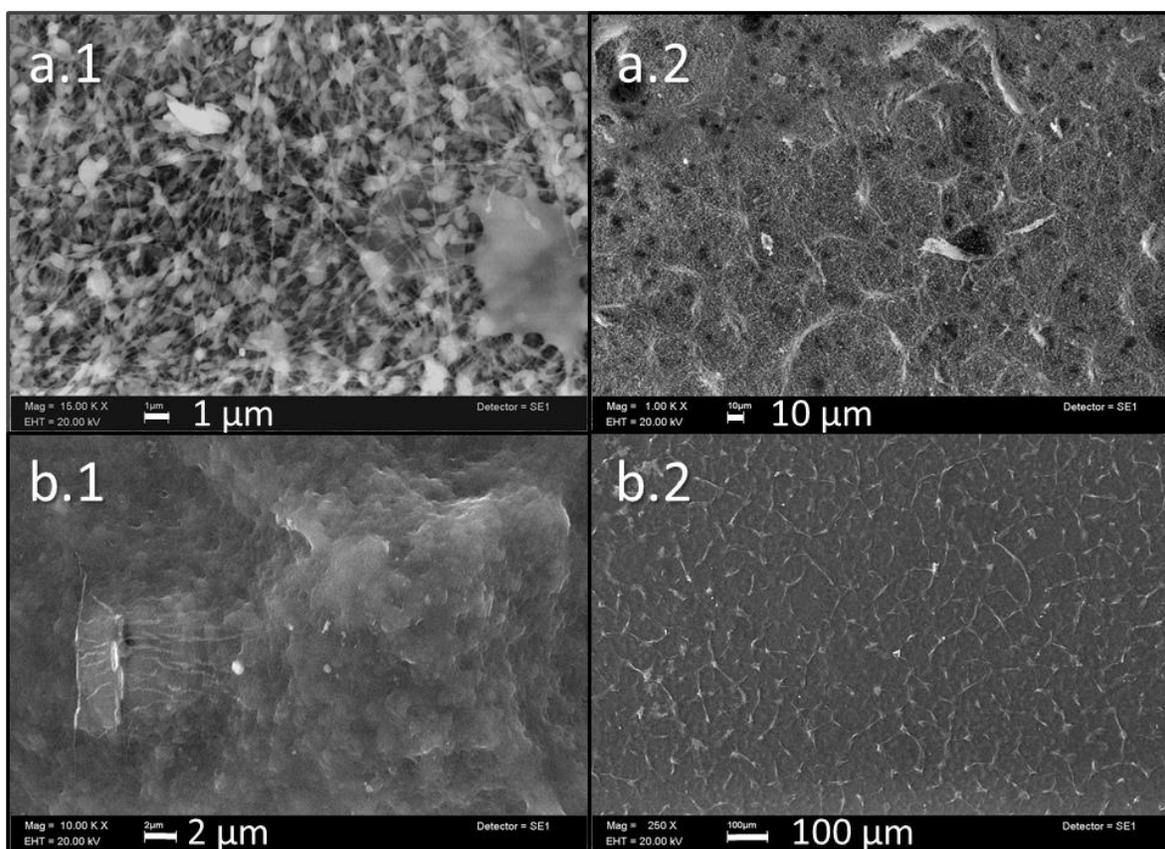


Figura 19. Micrografías SEM para andamio PVA-SA 3.5%. a.1 y a.2) morfología de andamio sin someterse al proceso de entrecruzado de fibras a 15.00 KX y 1.00 KX aumentos respectivamente. b.1 y b.2) morfología del andamio después del proceso de entrecruzado a 10.00 KX y 250 X aumentos respectivamente.

Muestra correspondiente a 4.0% de concentración

Para el andamio PVA-SA al 4.0%, los primeros dos paneles (a.1 y a.2) de la **Figura 20**, muestran la morfología del andamio antes de someterse al proceso de entrecruzado, en estos se observa un comportamiento similar al andamio de 3.5%, en el cual se aprecian claramente las nanofibras a las diferentes magnificaciones de 15.00 KX y 1.00 KX respectivamente. Sin embargo, la presencia de los grumos es aún más evidente, indicando nuevamente una posible deficiencia en la preparación de la muestra o del proceso de electrohilado.

De igual manera, los siguientes paneles (b.1 y b.2) de la **Figura 20**, a 10.00 KX y 1.00 KX aumentos respectivamente, muestran la morfología del andamio después del proceso de entrecruzado. En este caso las fibras aparentemente dejan de observarse, aunque el material resultante sigue siendo poroso.

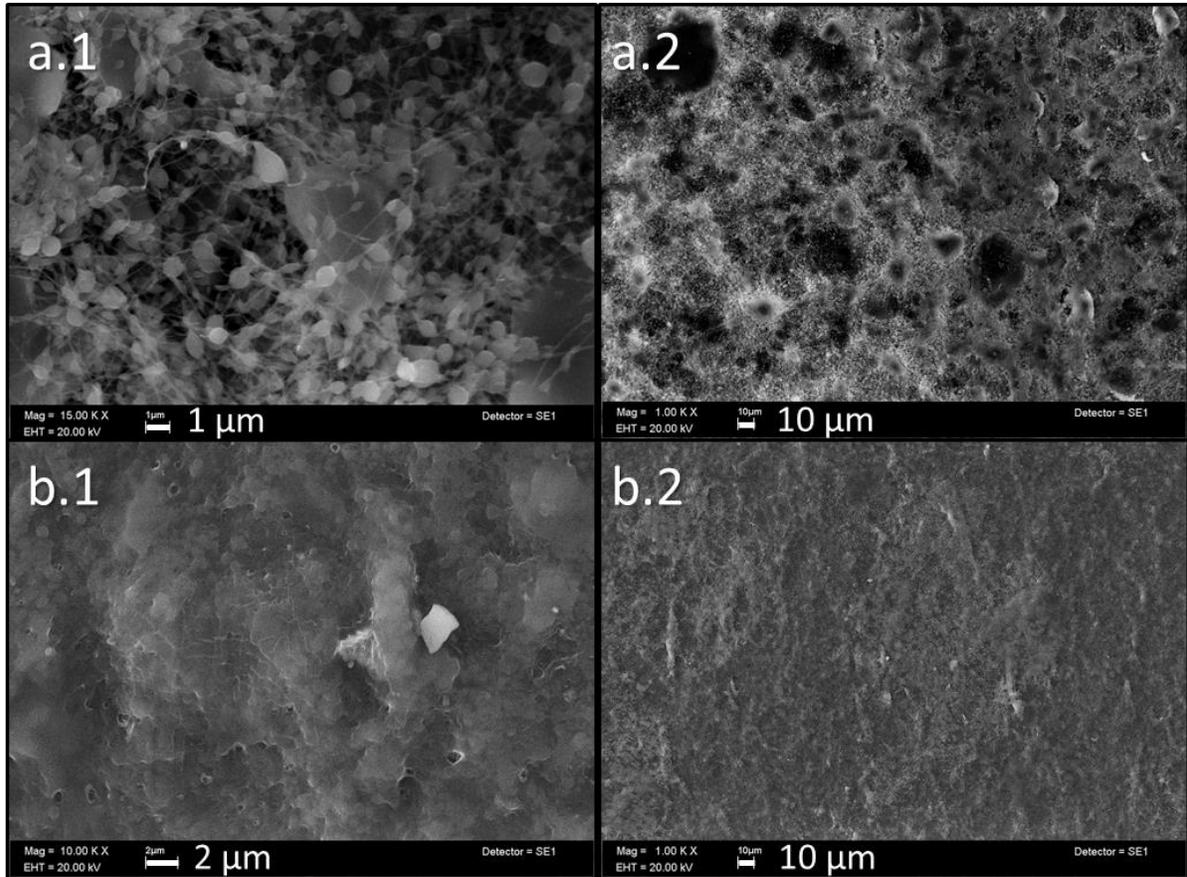


Figura 20. Micrografías SEM para andamio PVA-SA 4.0%. a.1 y a.2) morfología de andamio sin someterse al proceso de entrecruzado de fibras a 15.00 KX y 1.00 KX aumentos respectivamente. b.1 y b.2) morfología del andamio después del proceso de entrecruzado a 10.00 KX y 1.00 KX aumentos respectivamente.

Muestra correspondiente a 5.0% de concentración

Para el andamio PVA-SA al 5.0%, de igual manera los primeros paneles (a.1 y a.2) de la **Figura 21**, muestran la morfología del andamio antes de entrecruzado a 15.00 KX y 1.00 KX respectivamente. En este caso nuevamente se observan las nanofibras poliméricas con claridad, así como la presencia de grumos.

Los siguientes paneles (b.1 y b.2) de la **Figura 21**, a 500 X y 5.00 KX aumentos respectivamente, muestran la morfología del andamio después del proceso de entrecruzado. En este caso las fibras aparentemente dejan de observarse, dando paso a un material poroso.

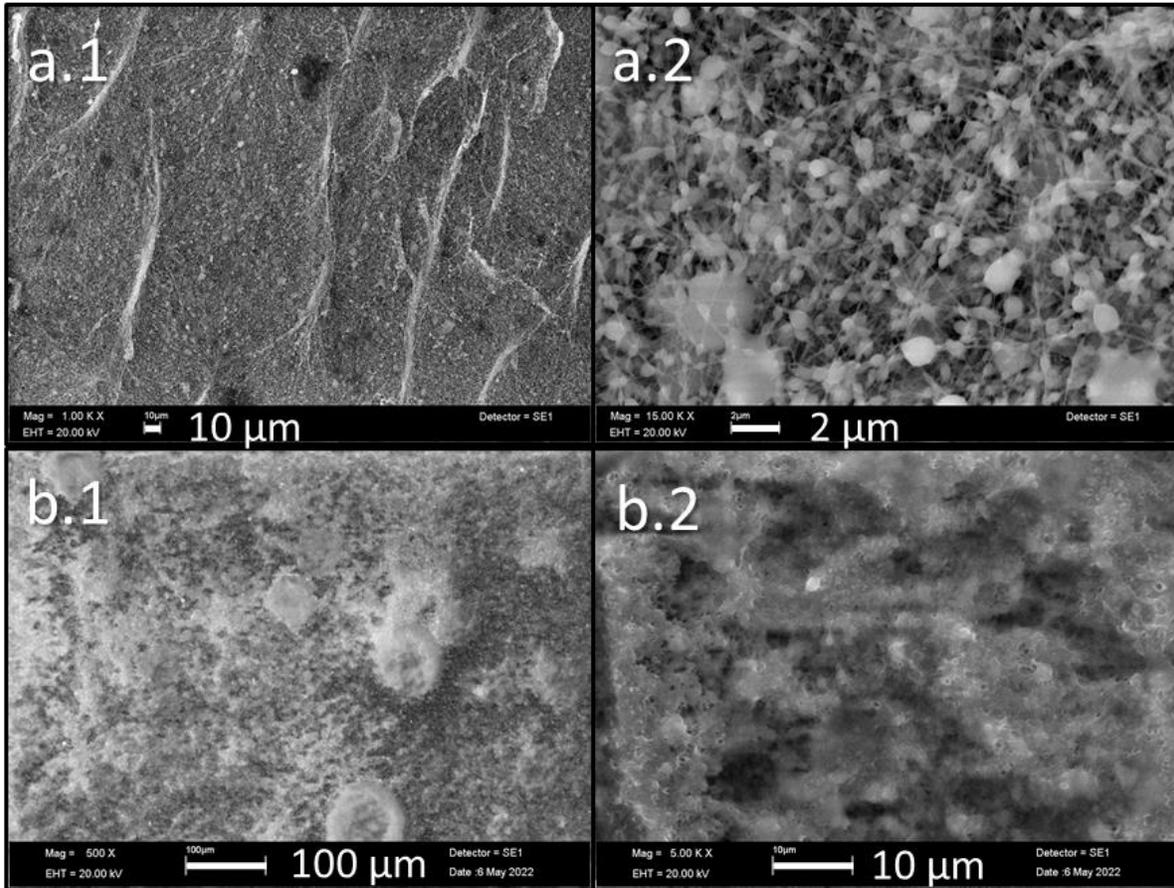


Figura 21. Micrografías SEM para andamio PVA-SA 5.0%. a.1 y a.2) morfología de andamio sin someterse al proceso de entrecruzado de fibras a 1.00 KX y 15.00 KX aumentos respectivamente. b.1 y b.2) morfología del andamio después del proceso de entrecruzado a 500 KX y 5.00 KX aumentos respectivamente.

Es claro que las muestras analizadas para cada concentración (3.5, 4.0 y 5.0%) presentan la misma tendencia, siendo en un principio un material con fibras definidas y posteriormente dando paso a un material poroso, una vez sometidas al tratamiento con CaCl_2 2% en EtOH- H_2O .

De acuerdo a lo encontrado en la literatura, la porosidad del material es necesaria para asegurar un ambiente tridimensional que permita el anclaje de las células de corazón al ser sembradas, así como su proliferación, ya que un ambiente poroso permite el transporte de oxígeno y nutrientes para las células a lo largo del andamio tridimensional,²⁹ por lo que los resultados obtenidos parecen ser favorables. Más adelante se corrobora este punto con los ensayos celulares.

Estudios por SEM para andamios con línea celular

A continuación, se presentan los resultados obtenidos por SEM para los diferentes andamios una vez que los cardiomiocitos de ratón fueron sembrados. Es importante mencionar que todos los estudios con células se llevaron a cabo en las membranas formadas por los andamios en aluminio después del proceso de entrecruzado de las fibras.

Muestra correspondiente al 3.5% de concentración con línea celular

La **Figura 22** muestra al andamio montado en aluminio a 2.50 KX, mientras que la **Figura 23** corresponde a la micrografía del andamio montado en el chip utilizado en las pruebas de impedancia a 2.50 KX.

En ambos paneles se aprecian una serie de esferas adheridas a la superficie del material, las cuales no se observaron en los estudios previos al sembrado de cardiomiocitos de ratón en los andamios presentados en la **Figura 19**, por lo tanto, basándonos en lo reportado en la literatura ^{30,31,32} donde se ha descrito la morfología y distribución de las células de tejido cardíaco estudiada por SEM, de un modo muy similar a los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos asumir que estas esferas corresponden a las células sembradas sobre el material y que además presentan una distribución uniforme a lo largo del mismo.

Cabe señalar que las micrografías con línea celular para todos los sistemas estudiados fueron obtenidas después de los ensayos realizados.

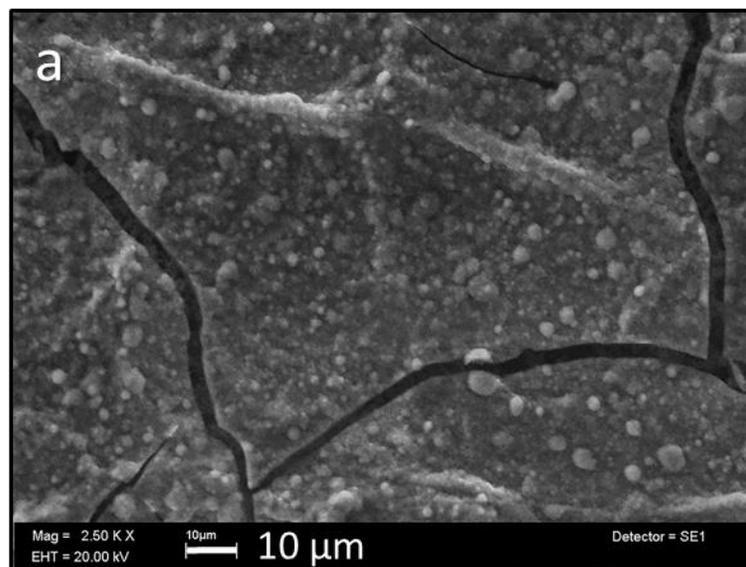


Figura 22. Micrografía SEM para andamio de PVA-SA 3.5% con cardiomiocitos de ratón, correspondientes al andamio montado en aluminio.

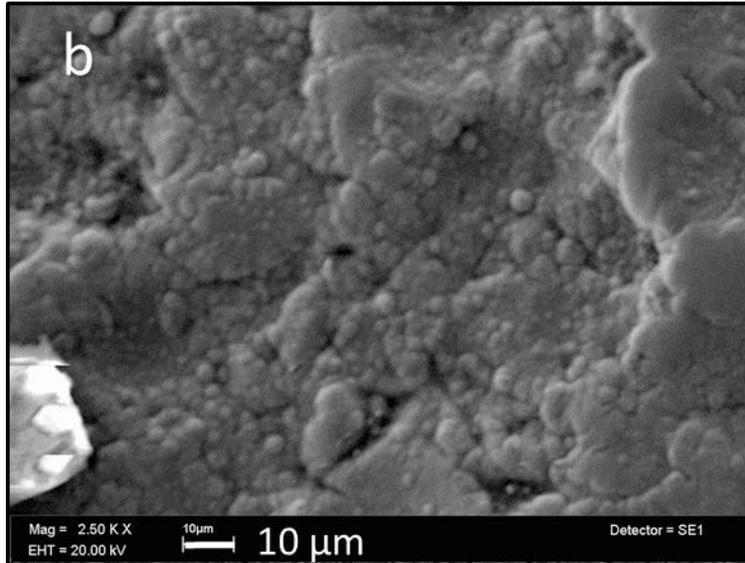


Figura 23. Micrografías por SEM para andamios de PVA-SA 3.5% con cardiomiocitos de ratón b.1) Micrografías correspondientes al andamio montado en chip.

Muestra correspondiente al 4.0% de concentración con línea celular

En la **Figura 24** se presentan las micrografías correspondientes al andamio montado en aluminio de PVA/SA 4.0%. Se observa una clara diferencia en la morfología del andamio si lo comparamos con la **Figura 20**, la cual presenta la muestra sin línea celular. El material conserva su porosidad, adicionalmente se aprecian una especie de grumos adheridos a la superficie del mismo, presumiblemente estos grumos corresponden a los cardiomiocitos implantados, de acuerdo a lo discutido en el caso de 3.5%.

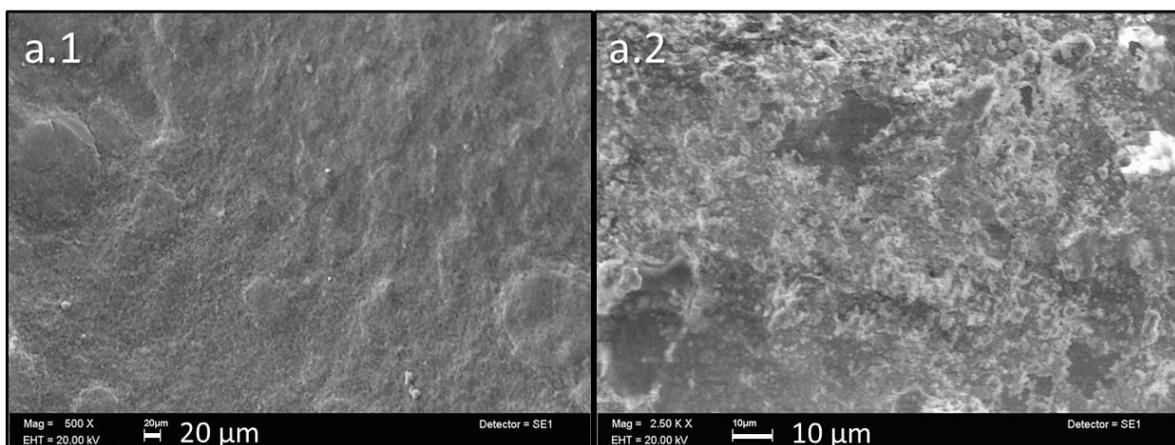


Figura 24. Micrografías SEM para andamio PVA-SA 4.0%. a.1 – a.2) morfología de andamio montado en aluminio con cardiomiocitos de ratón a 500 X y 2.50 KX respectivamente.

En la **Figura 25** se observan las micrografías (b.1 y b.2) para el andamio montado en chip con cardiomiocitos de ratón a 5.00 KX y 250 X respectivamente. La diferencia en la morfología respecto a la **Figura 23** para el chip de 3.5%, se debe a la diferencia de resolución de la imagen. Se observa un material altamente poroso, aunque las células no son tan evidentes como en la muestra de 3.5%, se sugieren ciertos aglomerados semiesféricos distribuidos a lo largo de todo el andamio que presumiblemente podrían considerarse como correspondientes a los cardiomiocitos implantados.

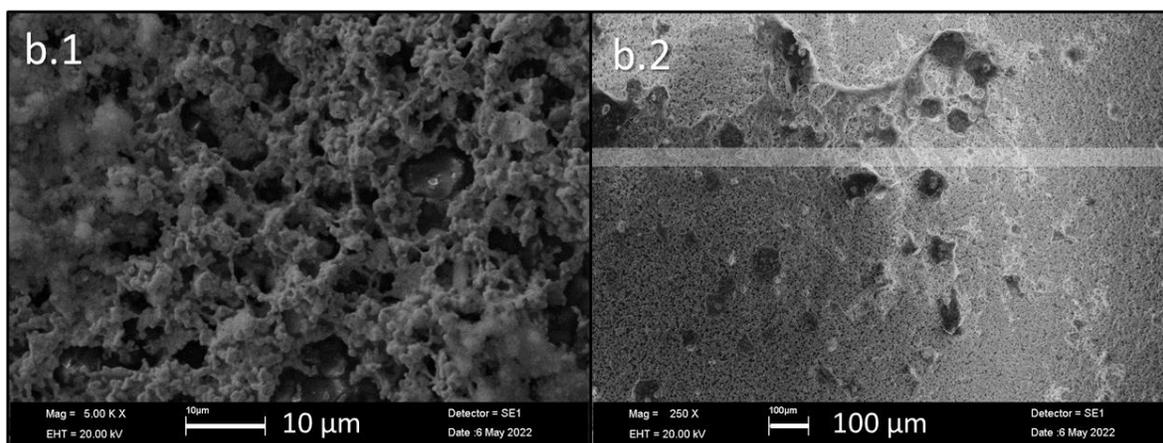


Figura 25. Micrografías SEM para andamio PVA-SA 4.0%. b.1 – b.2) morfología de andamio montado en chip con cardiomiocitos de ratón a 5.00 KX y 250 X respectivamente.

Muestra correspondiente al 5.0% de concentración con línea celular

Las siguientes micrografías (a.1 y a.2) de la **Figura 26** se presenta al andamio montado en aluminio a 1.00 KX y 1.50 KX respectivamente. La superficie del material presenta un comportamiento muy similar al observado en la **Figura 24** para el caso de 4.0%, en el cual el material conserva su porosidad, adicionalmente, se observan una especie de aglomerados distribuidos en la superficie del mismo; posiblemente estos cúmulos corresponden a los cardiomiocitos implantados, aunque nuevamente, no son tan evidentes como para el caso de 3.5%.

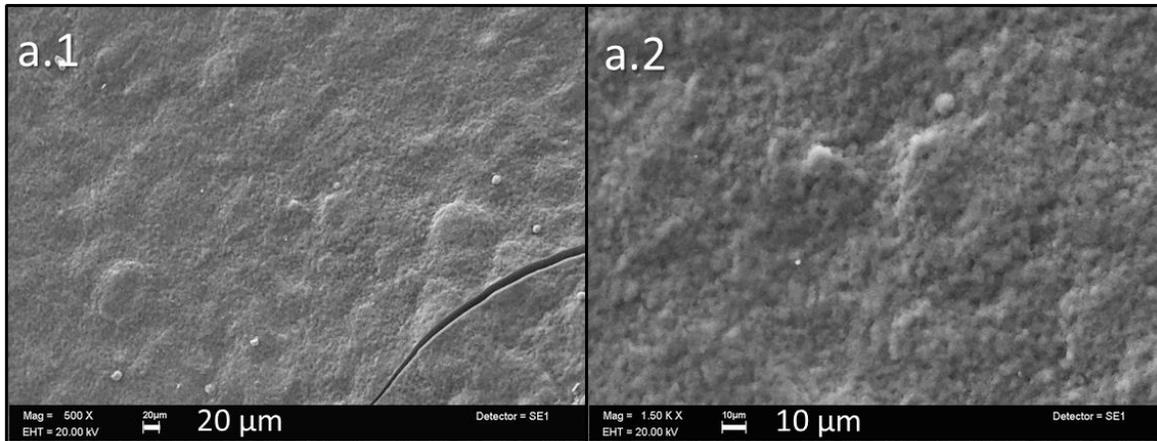


Figura 26. Micrografías SEM para andamio PVA-SA 5.0%. a.1 – a.2 morfología de andamio montado en aluminio con cardiomiocitos de ratón a 1.00 KX y 1.50 KX respectivamente.

Los paneles b.1 y b.2 de la **Figura 27**, corresponden a las micrografías del andamio de 5.0% montado en el chip utilizado en las pruebas de impedancia. En el panel b.1 se observa lo que parece ser el borde del material aparentemente liso que da paso a un material mucho más poroso, mientras que el panel b.2 se aprecia una superficie irregular texturizada, donde se observan ciertos agregados semiesféricos que podrían corresponder a cúmulos de cardiomiocitos.

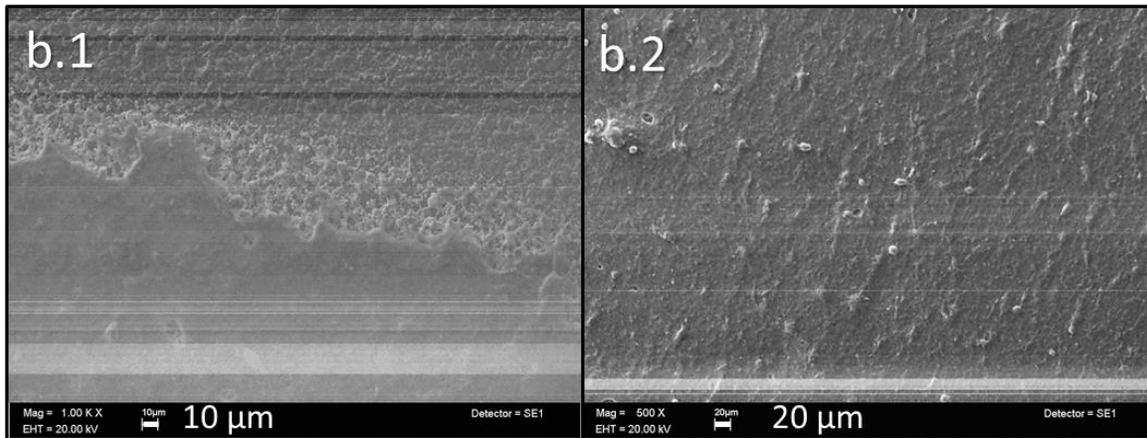


Figura 27. Micrografías por SEM para andamio PVA-SA 5.0% b.1 y b.2) morfología de andamio montado en chip con cardiomiocitos de ratón a 1.00 KX, 500 X respectivamente.

Estudios por AFM

A continuación, se presentan y discuten los resultados obtenidos por microscopía de fuerza atómica para todas las muestras estudiadas.

Muestras correspondientes al 3.5% de concentración

En la **Figura 28** se comparan los resultados obtenidos para el andamio de PVA-SA al 3.5% antes y después del proceso de entrecruzamiento de las fibras, así como una vez sembrada la línea células en el mismo.

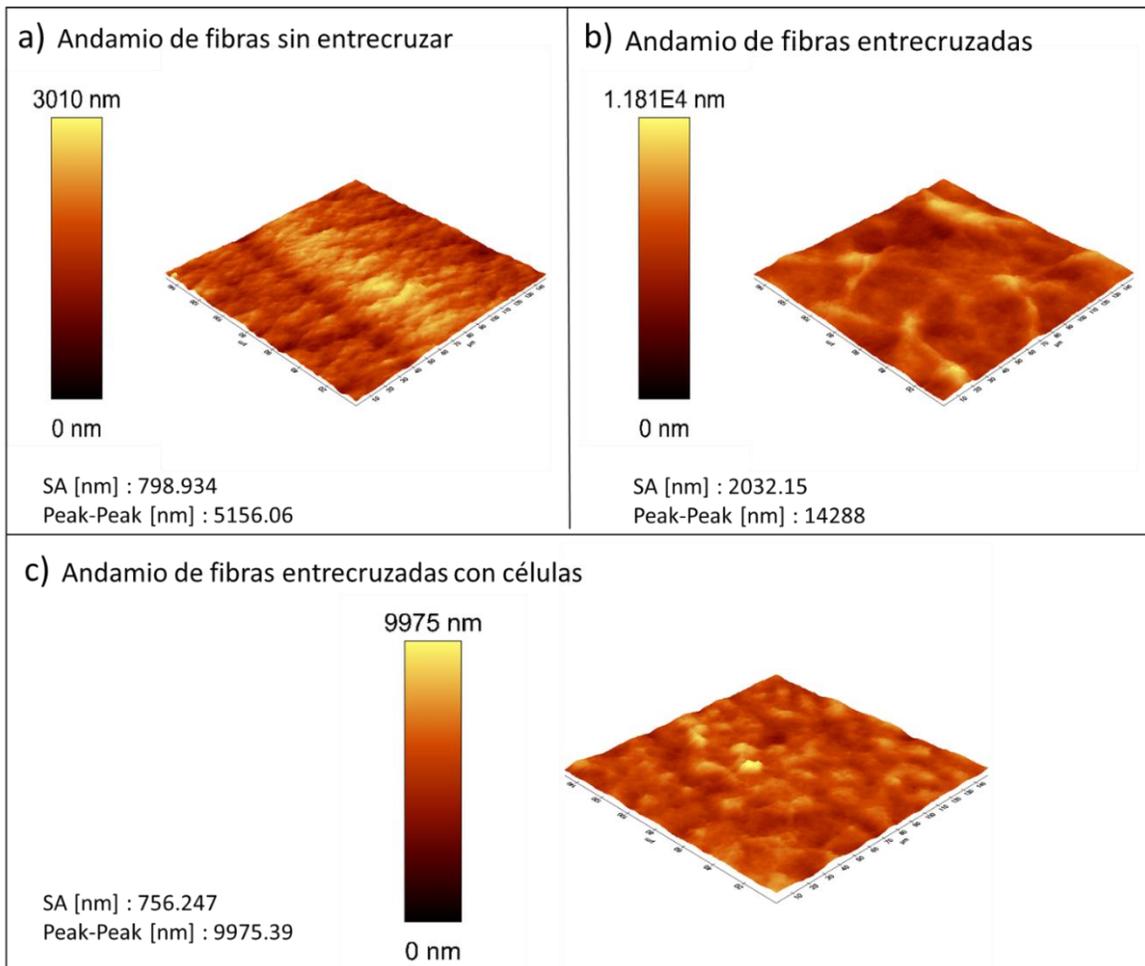


Figura 28. Resultados de AFM para andamios de PVA-SA de 3.5%. a) Andamio sin entrecruzamiento, b) andamio después de entrecruzamiento, c) andamio con línea celular.

Se observa que, tanto los valores de rugosidad del sistema (S_a) como la distancia entre el pico más bajo y el más alto, aumentan considerablemente después del proceso de entrecruzamiento de las fibras, con una diferencia de 1233.216 nm y 9131.94 nm, respectivamente. Por lo que se puede considerar que, para este sistema, la morfología se vuelve más irregular, más rugosa y con poros más profundos luego del tratamiento con CaCl_2 .

2%. Por otro lado, en el panel (c) se observa que la muestra vuelve a sufrir un cambio en su morfología disminuyendo los valores de rugosidad, así como la distancia pico a pico debido a la presencia de los cardiomiocitos sobre el andamio. Estos resultados corresponden con los obtenidos en trabajos anteriores en el grupo de investigación.³⁵

Muestras correspondientes al 4.0% de concentración

En la **Figura 29** se comparan los resultados obtenidos para el andamio de PVA/SA al 4.0%.

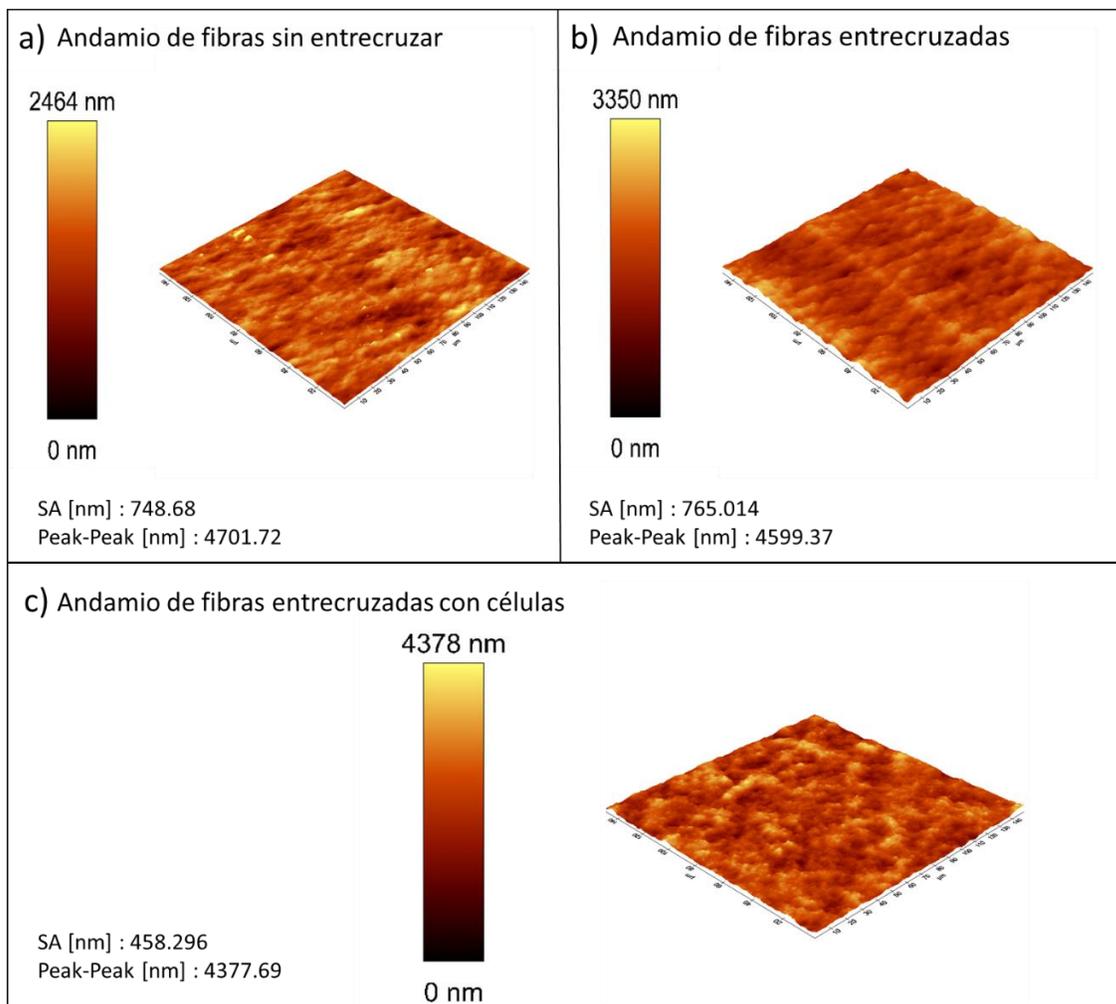


Figura 29. Resultados de AFM para andamios de PVA-SA de 4.0%. a) Andamio sin entrecruzamiento, b) andamio después de entrecruzamiento. c) andamio con línea celular.

En este caso se observa un comportamiento diferente al observado para el caso de 3.5%, ya que los valores de rugosidad (Sa) y la distancia pico a pico permanecen prácticamente sin cambios. La rugosidad presenta una diferencia de 16.334 nm y la distancia pico a pico disminuye en lugar de aumentar con una diferencia de 102.35 nm. Por lo que se puede

considerar que, para este caso, el proceso de entrecruzamiento no altera de manera significativa la morfología del andamio. Por otro lado, en el panel (c) se observa que la muestra sufre un cambio en su morfología debido a la presencia de las células implantadas, presentando una disminución en su rugosidad, así como una ligera disminución en la distancia pico a pico. Este último resultado es congruente con lo observado para la muestra de 3.5%.

El cambio poco significativo en la rugosidad podría ser un indicio de que el andamio formado por la muestra de 4.0% es más homogéneo, esta propuesta parece corroborarse con las micrografías SEM (**Figuras 20 y 24**) descritas anteriormente para esta muestra.

Muestras correspondientes al 5.0% de concentración

En la **Figura 30** se comparan los resultados obtenidos para el andamio de PVA-SA al 5.0%.

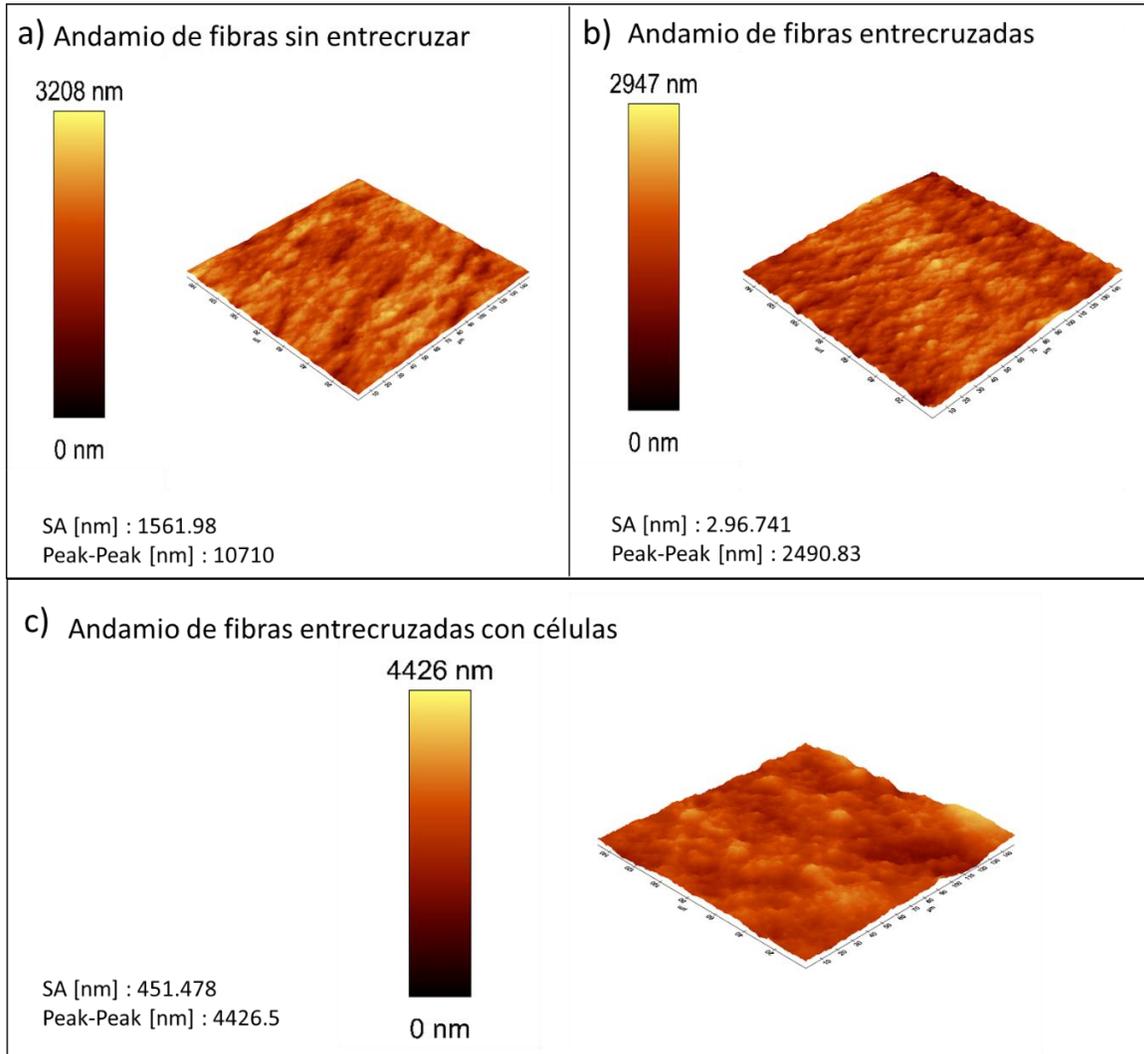


Figura 30. Resultados de AFM para andamios de PVA-SA de 5.0%. a) Andamio sin entrecruzamiento, b) andamio después de entrecruzamiento, c) andamio con línea celular.

En este caso, se observa que los valores de rugosidad (Sa) y la distancia pico a pico disminuyen considerablemente, con una diferencia de 1265.239 y 8219.17 nm, respectivamente. Por lo que se puede considerar que, para este sistema, la morfología se vuelve menos irregular y menos rugosa luego del tratamiento con CaCl_2 2%. Por otro lado, en el panel (c) se observa que la muestra vuelve a sufrir un cambio en su morfología disminuyendo nuevamente los valores de rugosidad y la distancia pico a pico debido a la presencia de los cardiomiocitos sobre el andamio. Esto último concuerda con los resultados obtenidos para el caso del 4.0%.

Estos resultados muestran que la adherencia de los cardiomiocitos sobre el material disminuye y homogeneiza la rugosidad, pero a su vez generar espacios con mayor profundidad.

Ensayo de Adherencia Celular

A continuación, se presentan y discuten los resultados obtenidos por la tinción con calceína AM para todas las muestras estudiadas. Estos estudios se llevaron a cabo en conjunto con la unidad de Posgrado de Odontología, laboratorio de Bioingeniería y Tejidos por la Dra. Patricia Gonzales Alba.

Micrografías obtenidas para la muestra de 3.5%

En las micrografías de fluorescencia de la **Figura 31** se puede observar que existe un crecimiento celular siguiendo la morfología fibrosa del material, a mayores aumentos en el panel b) además del crecimiento a lo largo de las fibras, se observa también agrupamientos de mayor tamaño.

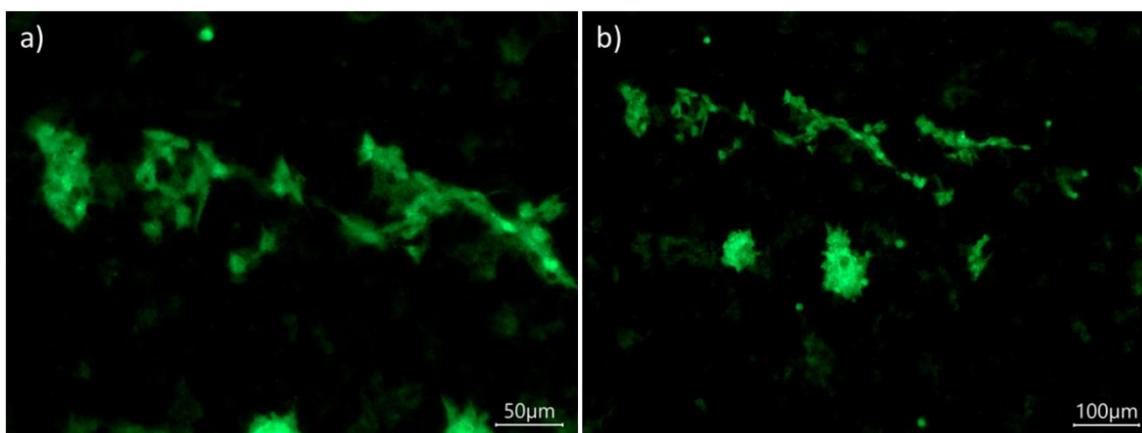


Figura 31. Micrografías para muestra de 3.5% en portaobjetos

Micrografías obtenidas para la muestra de 4.0%

En la **Figura 32** se observa con mayor claridad el crecimiento celular siguiendo la morfología fibrosa del material, además, aparentemente el crecimiento es mayor en esta muestra en comparación con la muestra de 3.5%, y parecen distribuirse uniformemente por el material, por lo que se observa que el andamio de 4.0% es un medio más favorable para la proliferación de los cardiomiocitos.

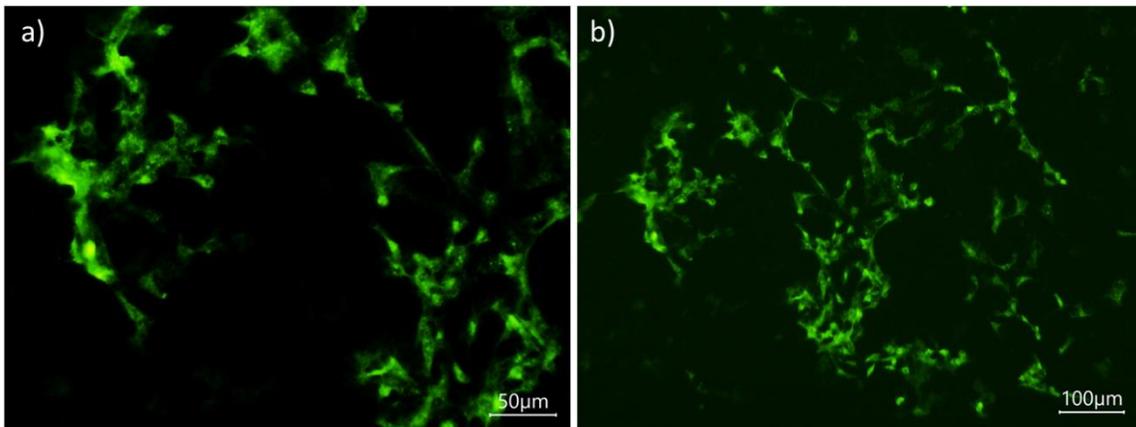


Figura 32. Micrografías para muestra de 4.0% en portaobjetos

Micrografías obtenidas para la muestra de 5.0%

En la **Figura 33** también se observa con mayor claridad las células, las cuales no solo crecen a lo largo de las fibras, sino que forman cúmulos que crecen alrededor de éstas, por lo que este sistema también es favorable para el crecimiento de la línea celular en comparación con el andamio 3.5%, pero no es concluyente en comparación con la del 4.0%

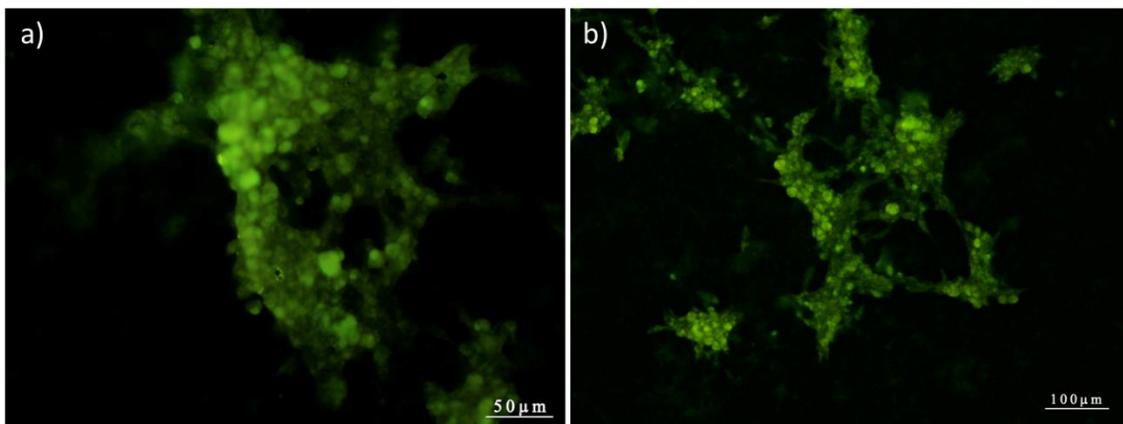


Figura 33. Micrografías para muestra de 5.0% en portaobjetos

Adicionalmente, en la literatura se reporta la morfología de los cardiomiocitos analizados por ensayo de calceina AM ^{32, 33,34} dónde los cardiomiocitos presentan un citoesqueleto de actina α , la cual es exclusiva de fibras musculares, alargado y que parece interconectarse entre sí, lo cual corresponde con los resultados obtenidos en el presente estudio. Además de que nuevamente la distribución a lo largo del material corresponde con lo reportado en la literatura ³⁰ y los estudios por SEM previamente discutidos.

Ensayo de citotoxicidad

Es importante mencionar que todos los estudios con células se llevaron a cabo en conjunto con la unidad de Posgrado de Odontología, laboratorio de Bioingeniería y Tejidos por la Dra.

Patricia Gonzales Alba, sobre las membranas formadas por los andamios con fibras entrecruzadas. Todos los ensayos se hicieron por triplicado y se presentan los valores promedio.

A continuación, se presentan los valores promedio de fluorescencia obtenidos para todas las muestras estudiadas en un periodo de siete días, en el cual la muestra control se montó sobre el pocito sin andamio.

Tabla 3. Valores de Fluorescencia obtenidos para cada muestra estudiada

Unidades relativas de fluorescencia	1 día 24 horas	2 días 48 horas	3 días 72 horas	4 días 96 horas	5 días 120 horas	6 días 144 horas	7 días 168 horas
Control	0.0062 ± 0.0017	0.0205 ± 0.0069	0.0883 ± 0.0041	0.1563 ± 0.0010	0.2322 ± 0.0090	0.3172 ± 0.0049	0.4025 ± 0.0008
0.035	0.0077 ± 0.0015	0.0128 ± 0.0008	0.0425 ± 0.0014	0.1000 ± 0.0019	0.1578 ± 0.0029	0.2752 ± 0.0067	0.3913 ± 0.0077
0.04	0.0218 ± 0.0008	0.0268 ± 0.0016	0.0525 ± 0.0043	0.1110 ± 0.0020	0.1703 ± 0.0020	0.2858 ± 0.0012	0.4018 ± 0.0010
0.05	0.0175 ± 0.0015	0.0237 ± 0.0016	0.0452 ± 0.0034	0.1048 ± 0.0019	0.1652 ± 0.0019	0.2815 ± 0.0084	0.3922 ± 0.0057

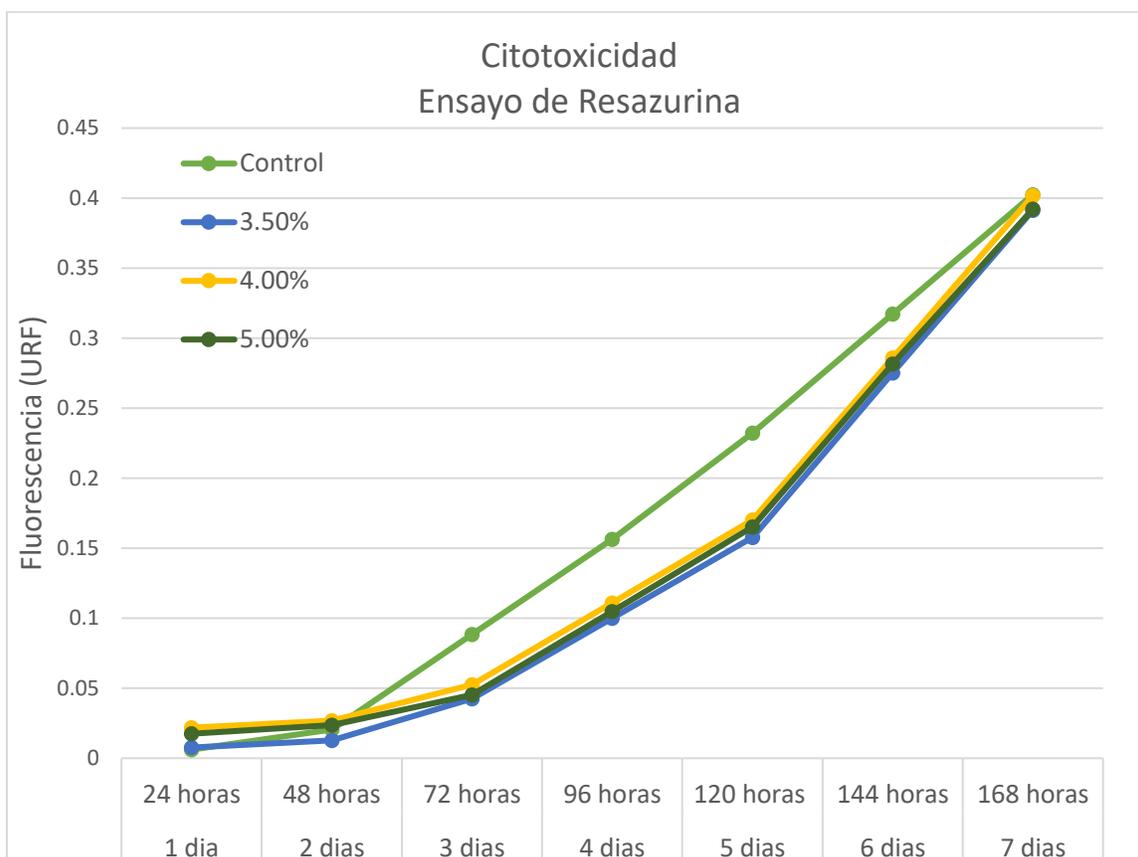


Figura 34. Ensayo de Resazurina, donde URF se refiere a las Unidades Relativas de Fluorescencia.

En la **Figura 34** se aprecia que existe un incremento en los valores de fluorescencia a lo largo del experimento, esto está asociado a un incremento en la cantidad de células en cada

muestra. Se observa que en las primeras 48 horas, el incremento en la cantidad de células tanto para las muestras del andamio de 4.0% como para el de 5.0% es ligeramente mayor que el crecimiento en la muestra control.

A las 72 horas se observa que el crecimiento celular en la muestra control supera considerablemente el crecimiento en los andamios y este comportamiento se mantiene hasta casi los 7 días. Sin embargo, el crecimiento sigue en aumento constante en todas las muestras analizadas, lo cual demuestra que el material no es citotóxico para los cardiomiocitos de ratón y que además permite la proliferación de los mismos. Estos resultados son propios del presente trabajo de investigación ya que no se ha trabajado con esta línea celular anteriormente en el grupo de investigación.

Adicionalmente, se observa que la muestra de 4.0% eventualmente iguala los valores de crecimiento de la muestra control a los 7 días.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la cantidad de células para cada sistema estudiado en comparación con la muestra control.

La **Tabla 4** presenta los valores numéricos del crecimiento celular para cada andamio estudiado durante siete días, así como de la muestra control. Posteriormente, estos datos se presentan gráficamente de manera comparativa.

Tabla 4. Crecimiento celular. Numero promedio de células por día para cada muestra estudiada.

Celulas promedio	1 día 24 horas	2 días 48 horas	3 días 72 horas	4 días 96 horas	5 días 120 horas	6 días 144 horas	7 días 168 horas
Control	51389 ± 14353	170833 ± 57434	734999 ± 38369	1302777 ± 8607	1934722 ± 75169	2643055 ± 40625	3354166 ± 6972
0.035	61111 ± 11386	106944 ± 6273	354166 ± 11486	833333 ± 15811	1315277 ± 24390	2293055 ± 55632	3118055 ± 413837
0.04	181944 ± 6273	223499 ± 13422	437499 ± 35649	924999 ± 16667	1419444 ± 16387	2381944 ± 9742	3348610 ± 8193
0.05	145933 ± 12758	197111 ± 13419	376388 ± 28096	873611 ± 16173	1376389 ± 16173	2345833 ± 70069	3101388 ± 415712

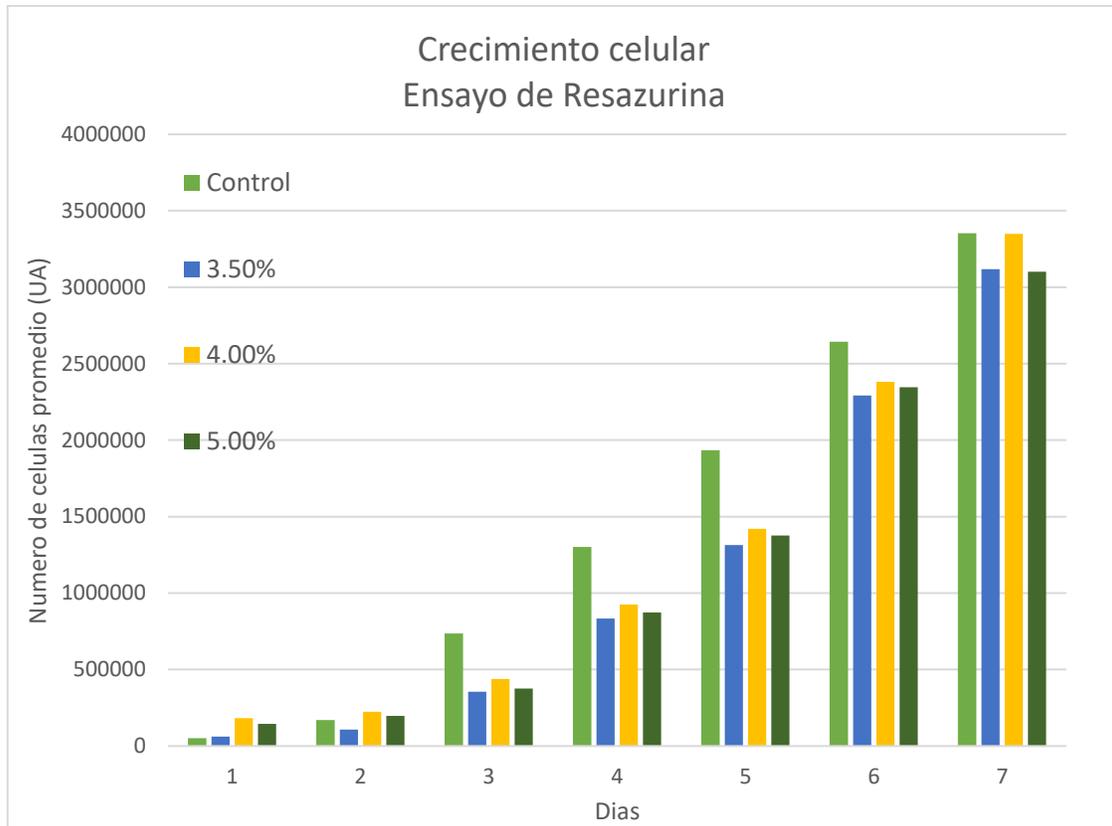


Figura 35. Ensayo de Resazurina, donde UA se refiere a las Unidades Arbitrarias de células.

Los resultados presentados en la **Figura 35** son una comparación cuantitativa del comportamiento presentado en la **Figura 34**. De igual manera, como ya se discutió, se observa que el crecimiento celular en la muestra control es mayor que en cualquiera de los sistemas de andamio PVA/SA, sin embargo, al día 7 la muestra de 4.0% presenta un crecimiento que, si bien es menor que el de la muestra control, la diferencia es de únicamente 5556 unidades, lo cual en términos de crecimiento celular es una diferencia mínima.

Pruebas de Impedancia

Las pruebas de impedancia se llevaron a cabo durante 71 horas consecutivas, obteniendo una medición cada hora, utilizando como electrodos de trabajo los andamios montados en los chips con los cardiomiocitos de ratón para cada una de las concentraciones estudiadas.

Gráficos obtenidos para la muestra correspondiente a 3.5% montada en chip

En la **Figura 36** se observa que el sistema PVA/SA 3.5% se mantiene estable, es decir, sin cambios significativos de comportamiento en todas las mediciones, durante los 3 días de experimentación.

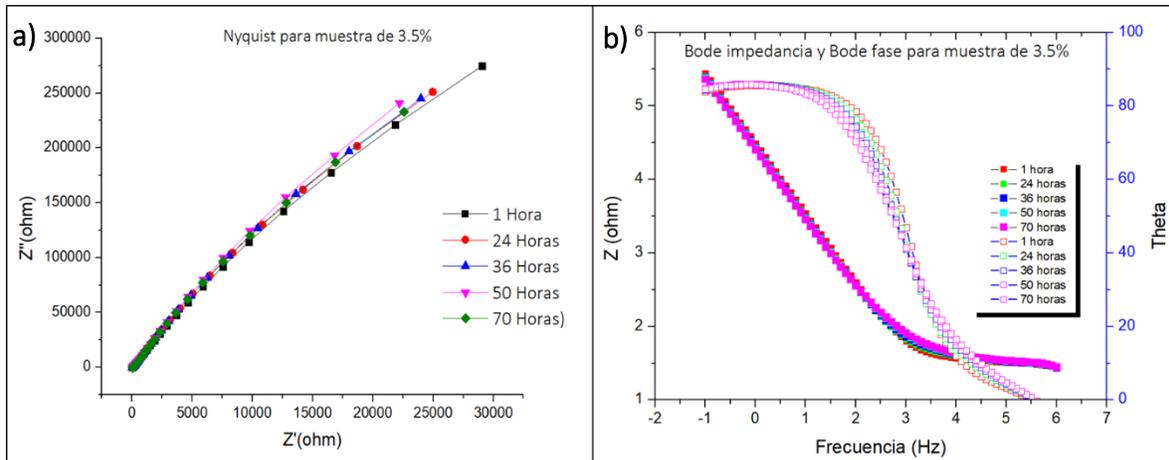


Figura 36. Gráficos obtenidos por EIS para el sistema PVA/SA 3.5%. a) Gráfica Nyquist, b) Grafica Bode Impedancia y grafica Bode fase.

Para el sistema 3.5%, el módulo de impedancia a 0.1 Hz es en torno a 10^5 ohm-cm². Los resultados de Bode-fase muestran una constante de tiempo a altas frecuencias ($\approx 10^5$ Hz) y otra en el resto de intervalo de frecuencias hasta 0.1 Hz. El diagrama de Nyquist muestra un comportamiento capacitivo-resistivo que no varió durante toda la medición.

Gráficos obtenidos para la muestra correspondiente a 4.0% montada en chip

En la **Figura 37** se observa que el sistema PVA/SA 4.0%, tiene una menor estabilidad que el sistema 3.5%, ya que existen ligeras variaciones en la medición a bajas frecuencias sobre todo a las 36 horas, así como a las 50 horas de experimentación.

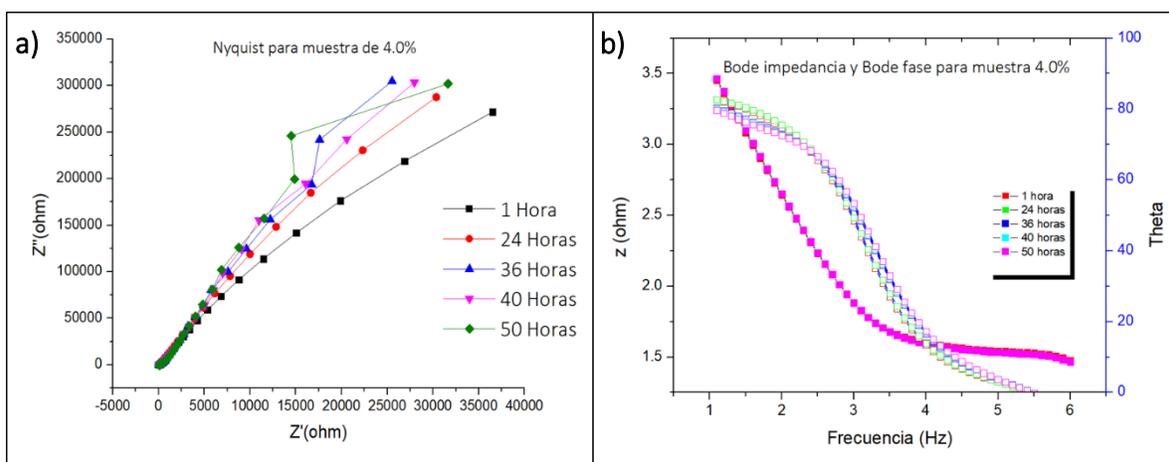


Figura 37. Gráficos obtenidos por EIS para el sistema PVA/SA 4.0%. a) Gráfica Nyquist, b) Grafica Bode Impedancia y grafica Bode fase.

La concentración del 4.0% sigue presentando el mismo comportamiento capacitivo-resistivo, pero con menores módulos de impedancia a 0.1 Hz ($\approx 10^3$ ohm-cm²). A baja frecuencia hubo más variación en el semi-arco del diagrama de Nyquist.

Gráficos obtenidos para la muestra correspondiente a 5.0% montada en chip

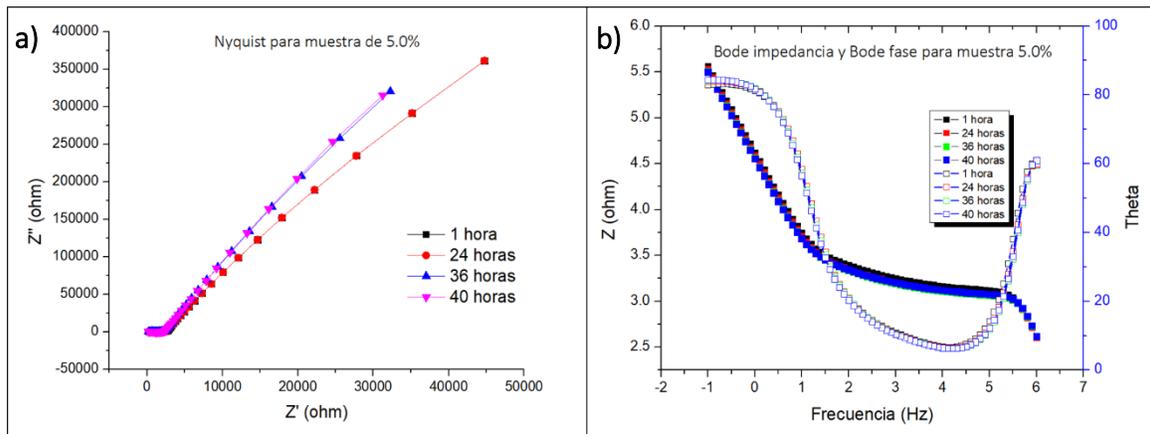


Figura 38. Gráficos obtenidos por EIS para el sistema PVA/SA 5.0%. a) Gráfica Nyquist, b) grafica Bode Impedancia y grafica Bode fase.

En la **Figura 38**, se observa que para el caso del sistema a 5.0% la respuesta electroquímica cambió respecto a las dos anteriores. A alta frecuencia se aprecia la formación más a detalle de la primera constante de tiempo en el intervalo de frecuencias entre 10^6 a 10^4 Hz, mientras que, a baja frecuencia, se formó una respuesta lineal que revela un comportamiento más capacitivo. La respuesta es parecida durante las 70 horas de ensayo con módulo de impedancia finales de 10^5 ohm-cm² a 0.1 Hz.

De acuerdo con trabajos previos en el grupo de investigación³⁵, se ha encontrado que a mayores concentraciones de SA en los andamios, se correlaciona con un comportamiento más capacitivo, lo cual corresponde con los resultados obtenidos, ya que la muestra de PVA/SA 5.0% es justamente la que presenta este tipo de comportamiento (mayor pendiente en el diagrama de Nyquist). Por otro lado, también ha sido reportado en la literatura^{19, 36} que los andamios con mayores resistencias y menores capacitancias son los que presentan mayor biocompatibilidad. De acuerdo con los estudios por rezasurina discutidos anteriormente, es la muestra de 4.0% la que se acerca más a los valores de número de células de la muestra control de las tres condiciones estudiadas. Por lo tanto, la muestra del 5% presentó los resultados de impedancia con mayores propiedades capacitivas, ya que se logra identificar claramente una primera constante de tiempo, lo indica que el crecimiento celular está bien diferenciado del resto del andamio a bajas frecuencias, es decir, la resistencia del cultivo celular medido entre 10^6 Hz y 10^4 Hz es baja en comparación con los otros dos sistemas, por lo que se esperaría que en esta muestra el crecimiento celular fuera menor.

Los resultados de EIS muestran las diferencias electroquímicas obtenidas en las tres muestras, que de acuerdo con los estudios por rezasurina, el crecimiento celular en la muestra de 3.5% y 5.0% es muy similar mientras que el de la muestra del 4.0% es el más cercano a los valores de la muestra control. Estos resultados indican que el estudio con impedancia electroquímica no es concluyente para determinar con exactitud cuál sistema es el más apto para la proliferación celular, por ello es necesario el apoyo de los estudios celulares.

Impedancia Total del sistema

La **Figura 39** presenta la impedancia total a 0.1 Hz para todos los andamios celulares estudiados.

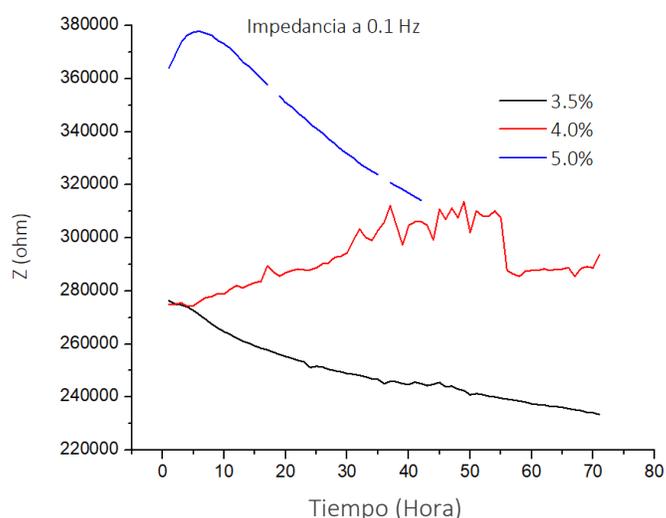


Figura 39. Impedancia total a 0.1 Hz para los andamios celulares estudiados.

Se observa que los valores de impedancia a 0.1Hz disminuyen a mayores tiempos de experimentación para la muestra del 3.5%. Para el caso de la muestra del 4.0%, estos valores van en aumento, por lo que es interesante observar que la impedancia para ambos sistemas presenta lecturas casi del mismo orden de magnitud después de 40 horas de experimentación. Por otro lado, el comportamiento para la muestra de 5.0% en un inicio presenta un aumento pronunciado para, posteriormente, ir disminuyendo progresivamente al aumentar el ensayo celular.

Circuito equivalente

La **Figura 40** es un circuito eléctrico que representa de manera esquemática el sistema analizado (andamio celular de PVA/SA con cardiomiocitos) con las mediciones de impedancia electroquímica. Este tipo de circuito es empleado para modelar y obtener los parámetros dieléctricos ²¹ de este tipo de andamio celular. En el circuito, R_s corresponde a la resistencia del medio de cultivo (disolución), $C_{células}$ y $R_{células}$ se refiere a la capacitancia y la resistencia mostrada por las células implantadas, de igual forma $C_{andamio}$ y $R_{andamio}$ representan la

capacitancia y resistencia mostrada por el andamio. Los valores de $C_{células}$ y $R_{células}$ corresponden a las lecturas a altas frecuencias, mientras que $C_{andamio}$ y $R_{andamio}$ corresponden a las lecturas a menores frecuencias.

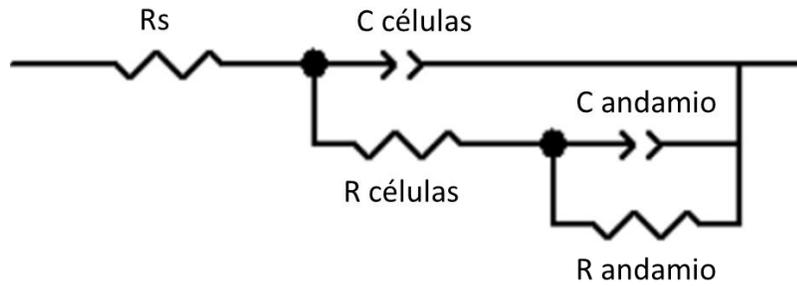


Figura 40. Representación esquemática del sistema analizado (andamio celular de PVA/SA con cardiomiocitos) a modo de circuito equivalente.

Capacitancias obtenidas debido a las células ($C_{células}$) para los sistemas estudiados
 La **Figura 41** muestra los valores de capacitancia de las células ($C_{células}$), a lo largo del experimento de los tres sistemas.

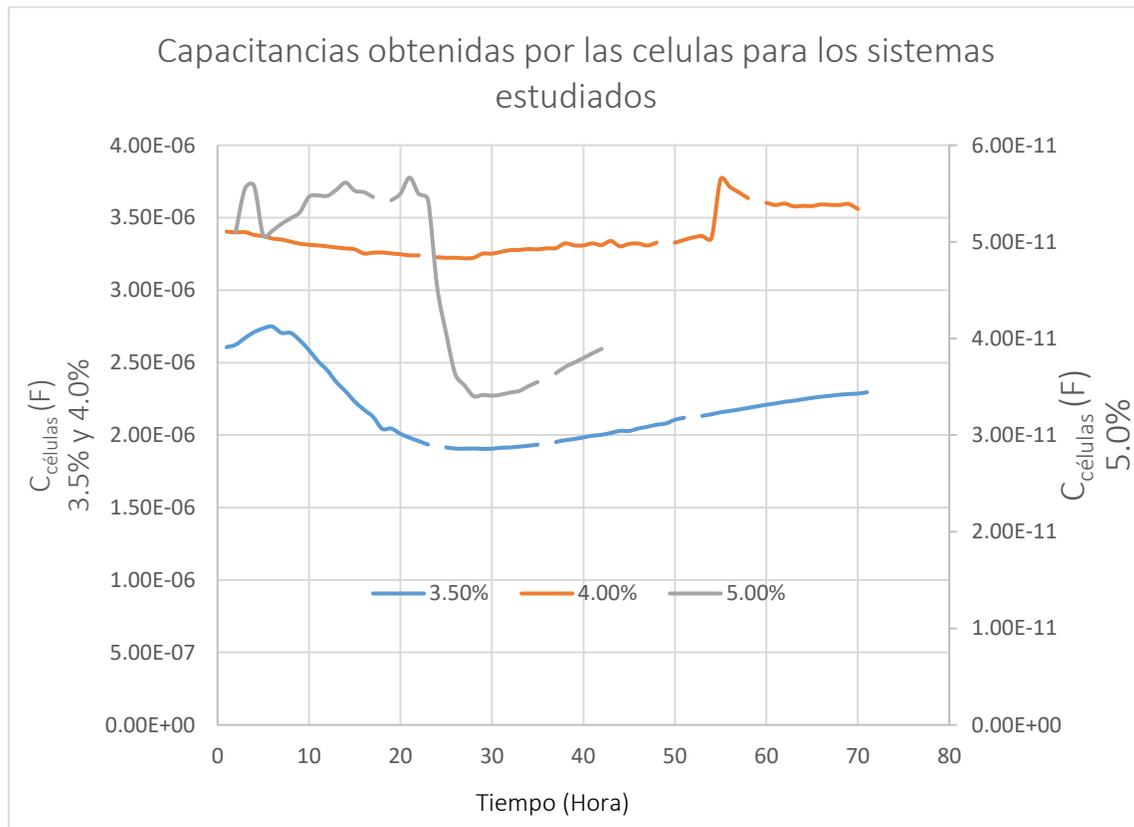


Figura 41. Valores de capacitancia obtenidos por los cardiomiocitos ($C_{células}$).

De manera comparativa se observa que en un inicio los sistemas parecen tener un ligero incremento en los valores de capacitancia, seguido de un decremento en los mismos, para luego estabilizarse e ir aumentando progresivamente a lo largo del tiempo. Sin embargo, aunque la tendencia es similar, los valores son muy diferentes entre sí, el sistema 4.0% es el que presenta los valores de capacitancia mayores, mientras que el sistema 5.0% fue necesario graficarlo en un eje secundario debido a que sus valores de capacitancia son mucho menores en comparación a los otros dos sistemas.

Más adelante se discutirá a detalle de este comportamiento para cada sistema, este apartado busca únicamente señalar las similitudes y diferencias entre las muestras estudiadas.

Resistencias obtenidas debido a las células ($R_{células}$) para los sistemas estudiados

La **Figura 42** muestra los valores de resistencia ($R_{células}$) obtenidas a largo del experimento. Se presentan de manera comparativa todas las concentraciones estudiadas.

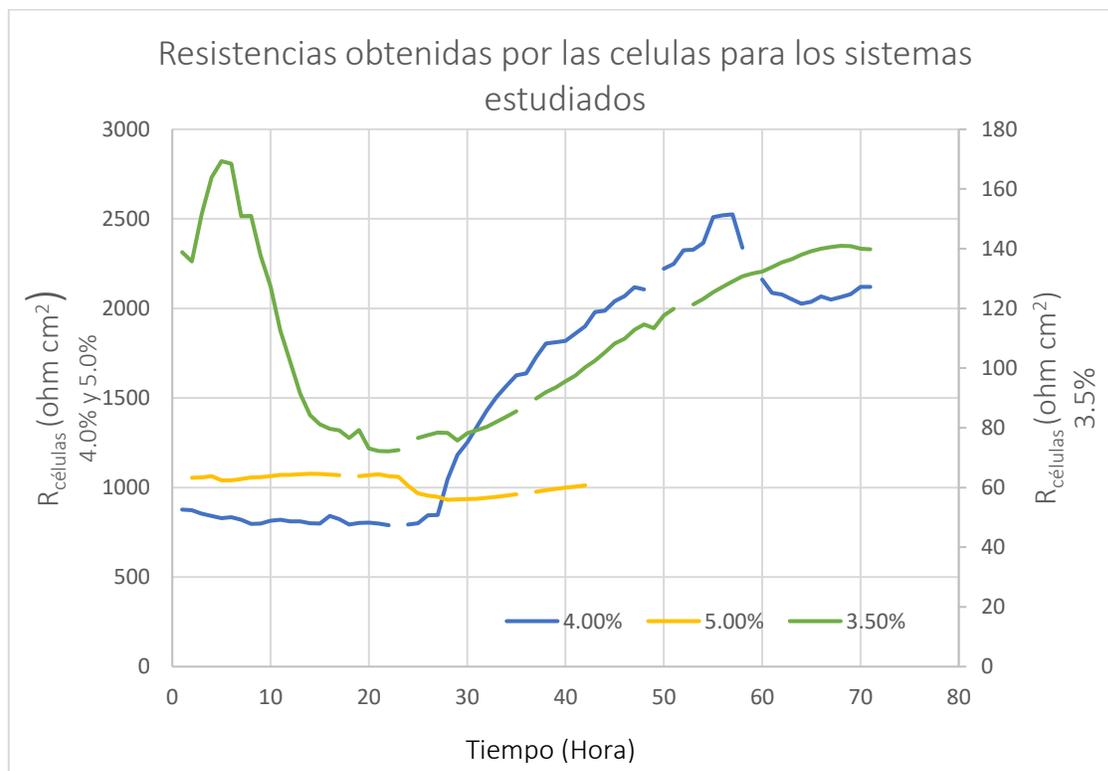


Figura 42. Valores de resistencia obtenidos por los cardiomiocitos ($R_{células}$) para los sistemas PVA/SA 3.5% Y 4.0%.

De igual manera se observa que en un inicio, los sistemas parecen tener un comportamiento inicial de estabilización, seguido de un incremento progresivo en los valores de resistencia. En este caso, el sistema de 4.0% es el que presenta los mayores valores de resistencia,

mientras que el sistema de 3.5% presenta los menores valores de resistencia, siendo incluso necesario graficarlo en un eje secundario.

Capacitancias obtenidas debido al andamio ($C_{andamio}$) para los sistemas estudiados

La **Figura 43** muestra los valores de capacitancia ($C_{andamio}$) de la segunda constante de tiempo a lo largo del experimento.

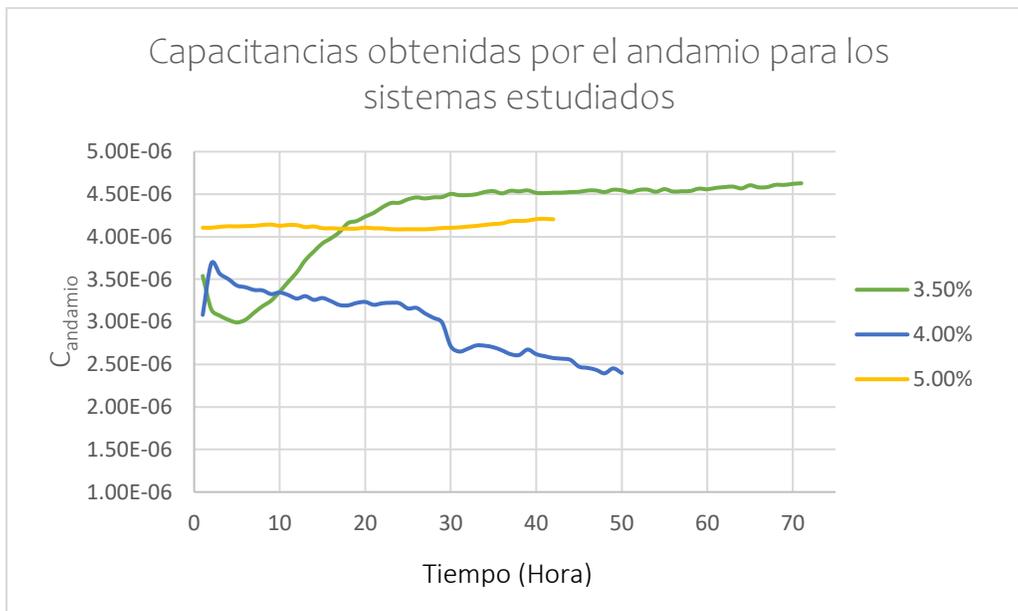


Figura 43. Valores de capacitancia obtenidos por los andamios ($C_{andamio}$) para todos los sistemas PVA/SA estudiados.

Para el sistema 3.5% se observa que los valores de capacitancia del andamio disminuyen en las primeras mediciones para después aumentar y mantenerse aparentemente estable. Para el sistema 4.0%, existe primero un aumento de $C_{andamio}$, para después disminuir a lo largo del experimento. Finalmente, el sistema 5.0% parece ir aumentando sus valores de $C_{andamio}$ ligeramente a lo largo del experimento, pero en general se mantiene aparentemente estable.

Como se discutió en el capítulo anterior, se ha reportado que las muestras con valores de resistencia mayores y menores valores de capacitancia resultan ser las más biocompatibles con las células implantadas, esta grafica muestra que los resultados observados para la muestra del 4.0% son los que mejor siguen dicha tendencia, por lo que el comportamiento que presenta esta muestra parece bastante positivo.

Resistencias obtenidas debido al andamio ($R_{andamio}$) para los sistemas estudiados

La **Figura 44** muestra los valores de Resistencia ($R_{andamio}$) a bajas frecuencias, el cual corresponde a las lecturas generada únicamente por el andamio. Se presenta de manera comparativa para todas las concentraciones estudiadas.

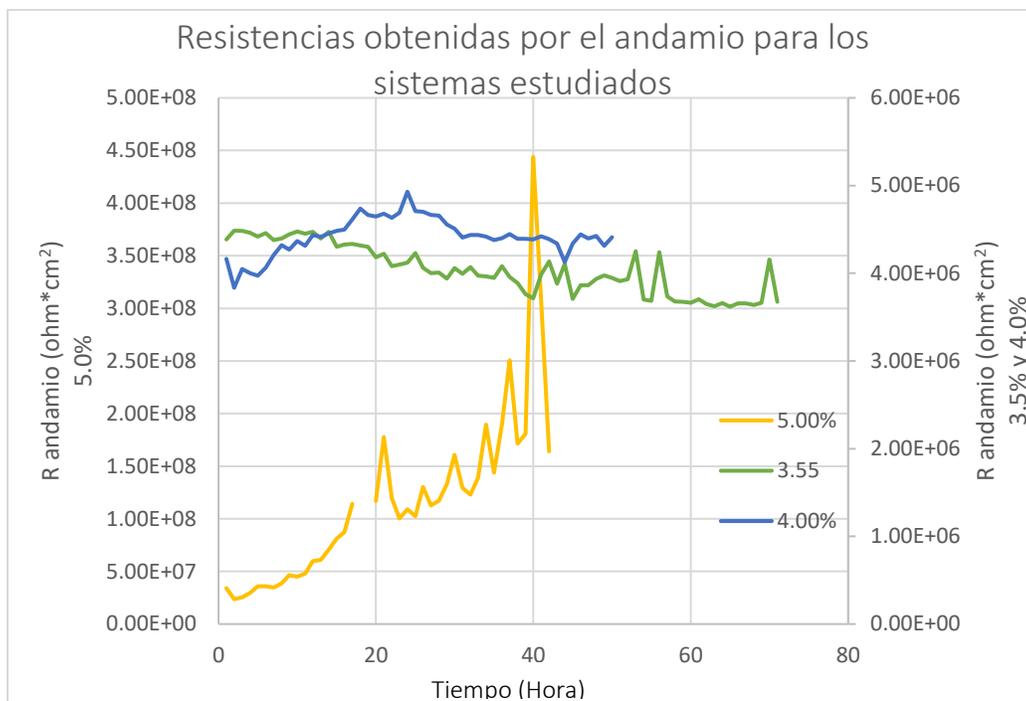


Figura 44. Valores de resistencia obtenidos por los andamios ($R_{andamio}$) para los sistemas PVA/SA 3.5% Y 4.0%.

Para el sistema PVA/SA 3.5% los valores de $R_{andamio}$ disminuyen ligeramente a lo largo del experimento, mientras que los valores del sistema 4.0% en un primer momento presentan una tendencia en aumento, para después disminuir ligeramente y aparentemente estabilizarse. Las lecturas para el sistema PVA/SA 5.0% son considerablemente más inestables, sin embargo, siguen una tendencia de aumento con muchas variaciones.

Como se mencionó anteriormente, de acuerdo a lo reportado en la literatura, los andamios que presentan mayores valores de resistencia y menores de capacitancia resultan ser los más biocompatibles con las células implantadas,^{19, 36} los resultados presentados muestran que el comportamiento de la muestra del 4.0% tanto para la capacitancia como para la resistencia es la que mejor se apega a este principio, por lo que la muestra del 4.0% parece ser el candidato más favorable para los estudios con línea celular.

Determinación de modelos matemáticos de Resistencia y Capacitancia

A continuación, se presentan los modelos matemáticos que mejor simulan el comportamiento de resistencia y capacitancia obtenidos a partir de las pruebas de impedancia para cada una de los sistemas estudiados. A partir de los polinomios obtenidos, se determinaron valores de resistencia más allá del tiempo de experimentación para simular el comportamiento de los sistemas a 4, 5, 6 y 7 días.

Ecuaciones correspondientes al sistema PVA/SA 3.5%

En la **Figura 45** se muestran los valores de capacitancia ($C_{\text{células}}$) y resistencia ($R_{\text{células}}$) obtenidos cada hora para el andamio de 3.5%, así como las líneas de tendencia correspondientes a las ecuaciones polinómicas que mejor asemejan los valores experimentales.

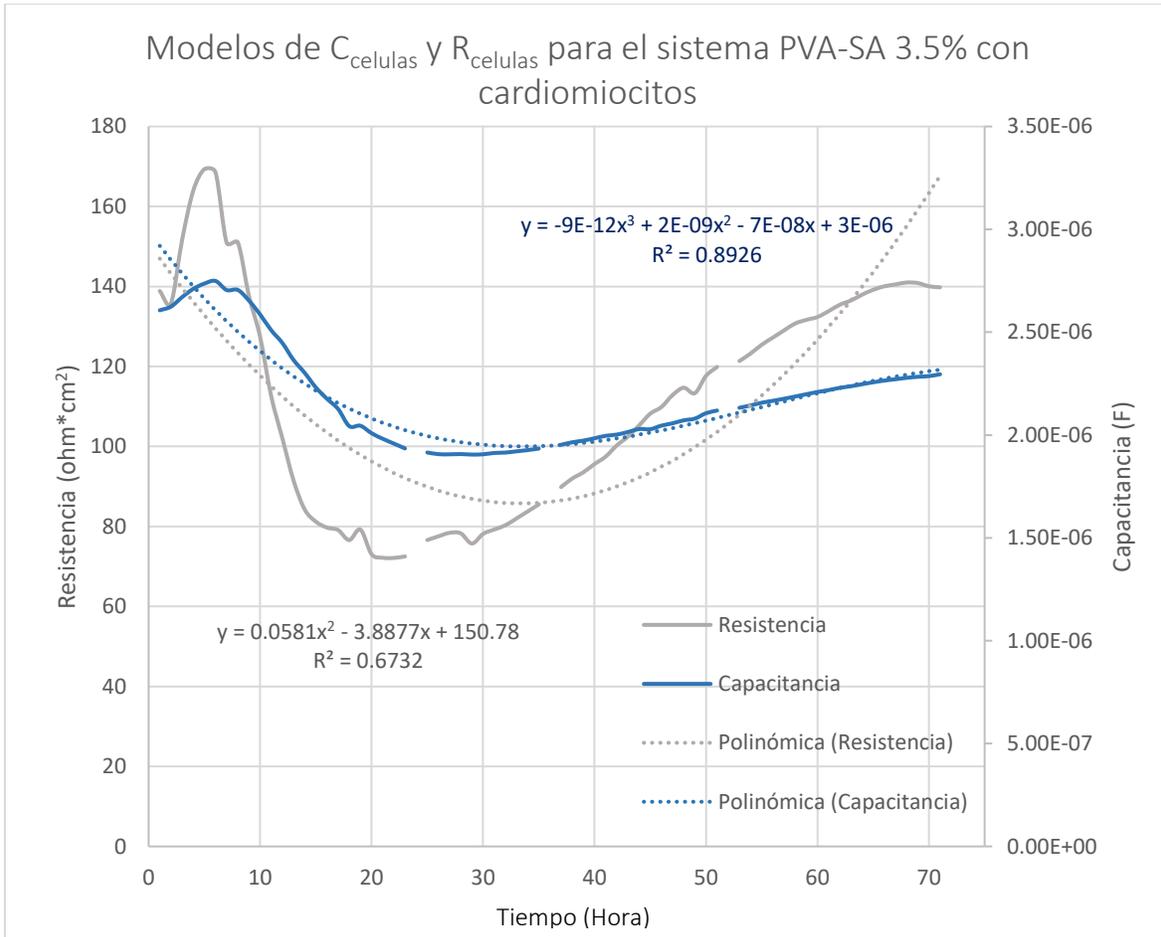


Figura 45. Modelos matemáticos que emulan los valores de impedancia correspondientes al andamio de PVA-SA 3.5% montado en chip con cardiomiocitos de ratón.

Como se mencionó en el apartado anterior (**Figura 41**), para la muestra de 3.5% se observa que en un primer momento presenta un aumento en sus valores de resistencia seguido de una disminución de los mismos, posteriormente, presenta un aumento progresivo a lo largo del tiempo. Esto puede deberse a que dentro de las primeras 10 a 15 horas, el sistema compuesto por el andamio con las células sembradas, entra en un periodo de estabilización y a partir de las 20 horas, el crecimiento celular se da de forma regular. De esta manera, al pasar el tiempo y conforme aumenta la cantidad de células, también aumentan los valores de resistencia y capacitancia del sistema.

Cabe mencionar que, el grado del polinomio utilizado fue seleccionado como uno de segundo grado debido a que, al intentar utilizar polinomios de mayor orden, aunque en un principio aparentaban seguir mejor la tendencia de los datos experimentales, al momento de extrapolar los datos más allá del tiempo de experimentación estos generaban resultados extremadamente fuera de tendencia. Sin embargo, se pretende seguir trabajando en este ajuste en futuros trabajos de investigación.

Ecuaciones correspondientes al sistema PVA/SA 4.0%

En la **Figura 46** se muestran los valores de capacitancia ($C_{\text{células}}$) y resistencia ($R_{\text{células}}$) obtenidos cada hora para el andamio de 4.0%, así como las líneas de tendencia correspondientes a las ecuaciones polinómicas que mejor asemejan los valores experimentales.

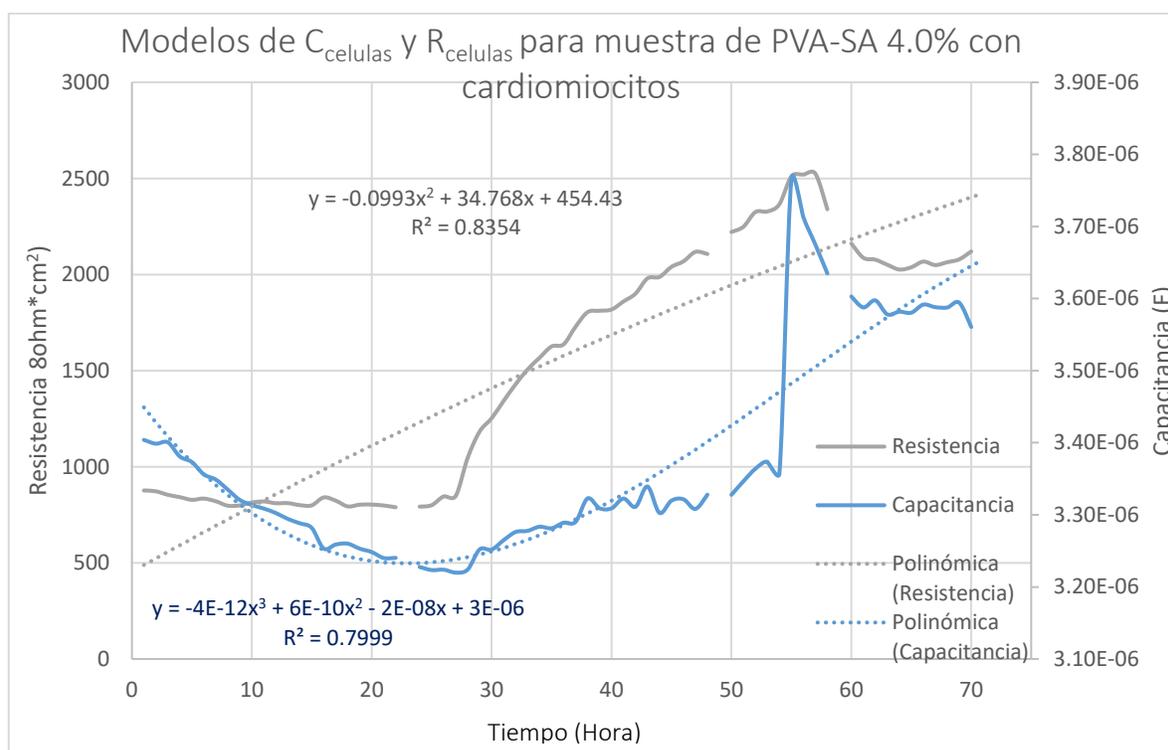


Figura 46. Modelos matemáticos que emulan los valores de impedancia correspondientes al andamio de PVA-SA 4.0% montado en chip con cardiomiocitos de ratón.

Al igual que en el caso anterior, para el sistema 4.0% se observa que dentro de las primeras horas el sistema presenta una disminución en los valores de resistencia y capacitancia debido al periodo de estabilización del mismo, aunque esta disminución no es tan pronunciada como en el caso de la muestra de 3.5%; posteriormente la tendencia cambia, registrándose un aumento en los valores de resistencia y capacitancia conforme avanza al tiempo de medición.

Por lo que, al pasar el tiempo y conforme aumenta la cantidad de células, también aumentan los valores de resistencia y capacitancia del sistema.

De igual manera que para el andamio de 3.5%, el polinomio utilizado es de segundo orden, ya que, al intentar utilizar polinomios de mayor orden, aunque en un principio aparentaban seguir mejor la tendencia de los datos experimentales, al momento de extrapolar los datos más allá del tiempo de experimentación estos generaban resultados extremadamente fuera de tendencia, mientras que el polinomio de segundo grado genera resultados que se corresponden mejor con la tendencia experimental.

Ecuaciones correspondientes al sistema PVA/SA 5.0%

En la **Figura 47** se muestran los valores de capacitancia ($C_{\text{células}}$) y resistencia ($R_{\text{células}}$) obtenidos cada hora para el andamio de 5.0%, así como las líneas de tendencia correspondientes a las ecuaciones polinómicas que mejor asemejan los valores experimentales.

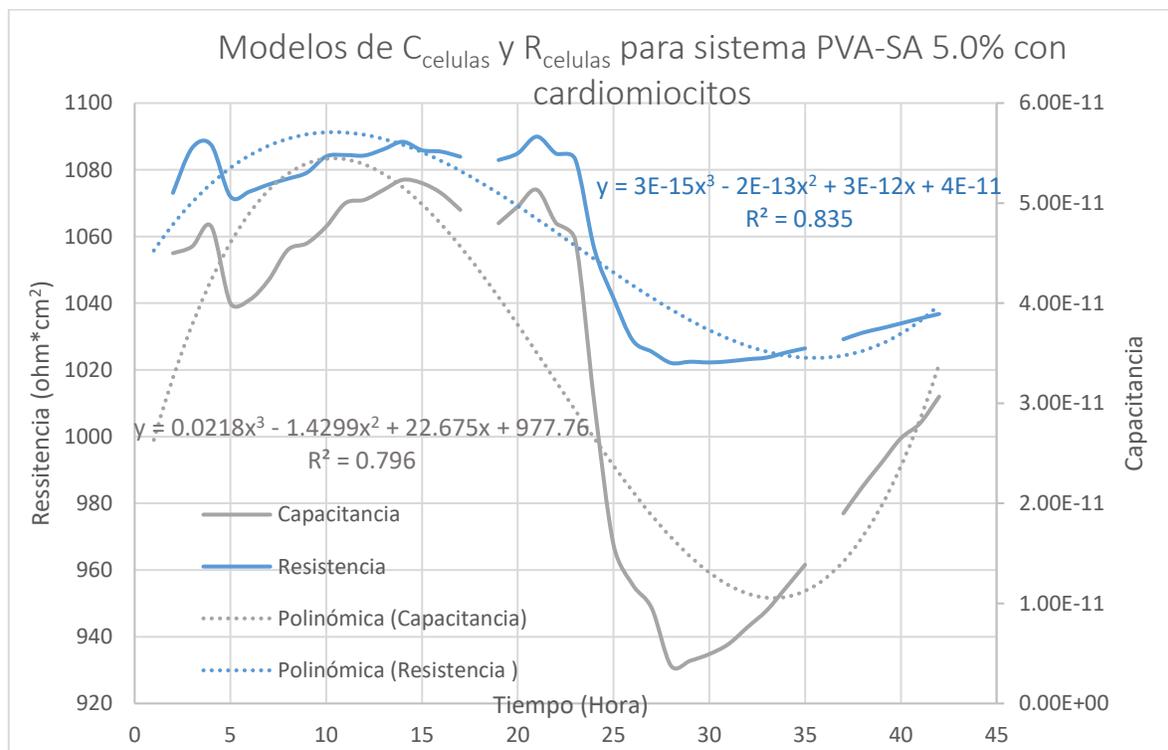


Figura 47. Modelos matemáticos que emulan los valores de impedancia correspondientes al andamio de PVA-SA 5.0% montado en chip con cardiomiocitos de ratón.

En este caso, se observa que la muestra de 5.0% presenta una tendencia distinta a las muestras anteriores, ya que aparentemente el periodo de estabilización del sistema es mucho mayor, teniendo una disminución muy pronunciada en los valores de capacitancia y

resistencia alrededor de las 25 horas, para posteriormente ir aumentando de manera progresiva con el paso del tiempo.

Para la muestra de 5.0%, el polinomio seleccionado resulta ser de tercer grado y no de segundo orden como para la muestra de 3.5% y 4.0%, aunque el grado de complejidad del polinomio aumenta, sigue siendo una ecuación bastante simple, y de igual manera que para los otros dos sistemas estudiados, este polinomio resulta ser el que genera resultados más acordes a la tendencia experimental al momento de extrapolar los datos fuera del tiempo de análisis.

A partir de los modelos para la Resistencia y la Capacitancia, se proyectaron los valores de resistencia para los sistemas estudiados más allá del tiempo de experimentación de 3 días, sustituyendo en sus respectivas ecuaciones los valores de (X) como el tiempo correspondiente a 4, 5, 6 y 7 días, es decir, 96, 120, 144 y 168 horas respectivamente.

Modelos de crecimiento celular respecto a los valores de resistencia

A continuación, se presenta los polinomios obtenidos al graficar los valores de células experimentales contra los valores de resistencia experimentales. Estos modelos matemáticos buscan simular el crecimiento celular en los andamios de acuerdo con los valores de resistencia experimentales obtenidos. A partir de estas ecuaciones se calculó el número de células para 96, 120, 144 y 168 horas sustituyendo el valor de (X) como los valores de resistencia proyectados en el apartado anterior. Finalmente, los valores de número de células generadas a partir del modelo, se compararon con los valores experimentales obtenidos para determinar la precisión del modelo. Los valores numéricos se presentan a modo de tabla para cada modelo.

Modelo de crecimiento celular para muestra de PVA/SA 3.5%

En la **Figura 48** se presenta el modelo matemático asociado al crecimiento celular en el andamio PVA/SA 3.5%, mientras que la **Tabla 5** presenta las células calculadas con el modelo, así como el porcentaje de error respecto a la cantidad de células medidas experimentalmente.

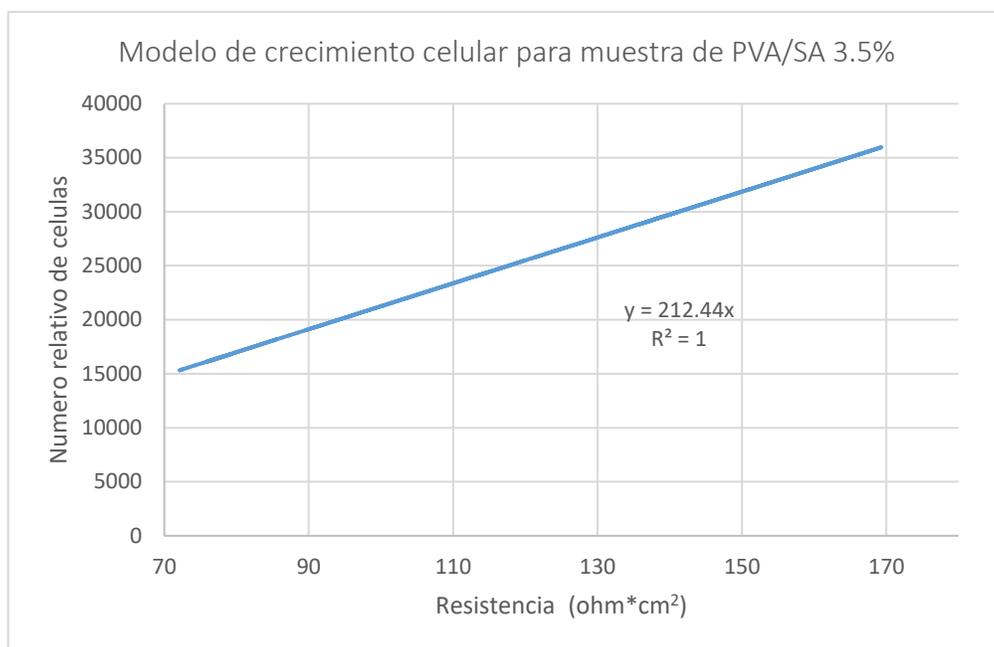


Figura 48. Modelos matemáticos que asocian el crecimiento celular el andamio celular de PVA-SA 3.5% de acuerdo a los valores de resistencia del mismo obtenidos por EIS.

Tabla 5. Valores de resistencia y número de células calculados para el andamio celular PVA-SA 3.5% y el % error respecto a los valores experimentales de número de células.

Hora	Células promedio experimentales	R calculada con ecuación (ohm*cm ²)	Células calculadas con modelo a partir de R calculada	% error
96	833333	313.010	66496	92.02
120	1315277	520.896	110659	91.59
144	2293055	795.713	169041	92.63
168	3118055	1137.460	241642	92.25

Para la muestra de PVA/SA 3.5%, al comparar el número de células calculadas con el modelo contra el número de células experimentales, se obtiene un porcentaje de error elevado de alrededor del 92%; sin embargo, es interesante señalar que este % error se mantiene constante a lo largo de todas las proyecciones, lo cual se verá en los siguientes apartados, no ocurre con las muestras de 4.0% y 5.0%.

Modelo de crecimiento celular para muestra de PVA/SA 4.0%

En la **Figura 49** se presenta el modelo matemático asociado al crecimiento celular en el andamio PVA/SA 4.0%, mientras que la **Tabla 6** presenta las células calculadas con el modelo, así como el porcentaje de error respecto a la cantidad de células medidas experimentalmente.

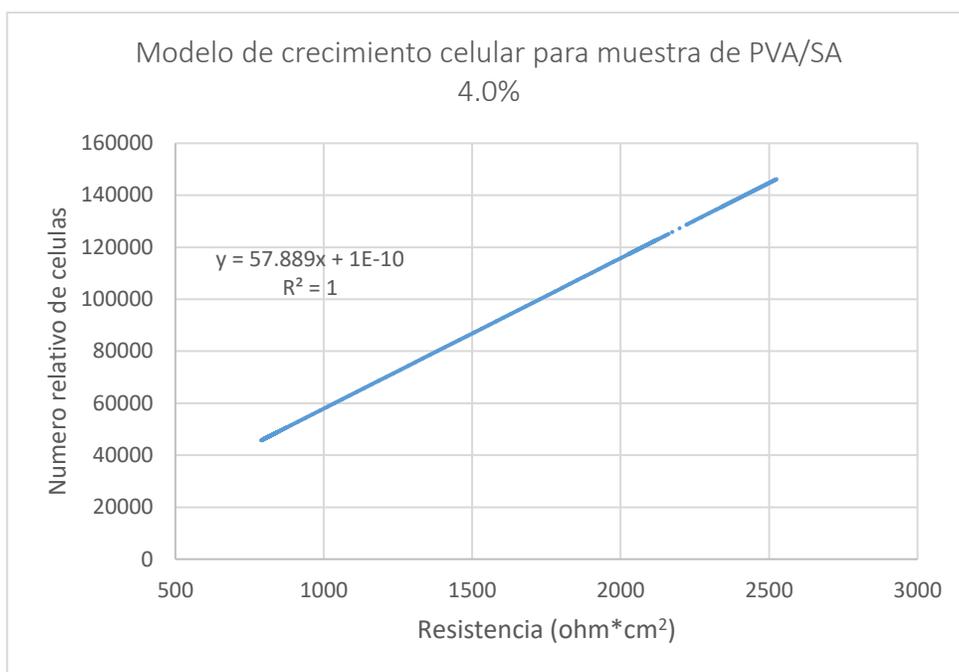


Figura 49. Modelos matemáticos que asocian el crecimiento celular el andamio celular de PVA-SA 4.0%, de acuerdo a los valores de resistencia del mismo obtenidos por EIS.

Tabla 6. Valores de resistencia y número de células calculados para el andamio celular PVA-SA 4.0% y el % error respecto a los valores experimentales de número de células.

Hora	Células promedio experimentales	R calculada con ecuación (ohm*cm ²)	Células calculadas con modelo a partir de R calculada	% error
96	924999	47865.579	2770891	199.56
120	1419444	48185.240	2789395	96.51
144	2381944	48390.507	2801278	17.60
168	3348611	48481.381	2806539	16.19

Para la muestra de PVA/SA 4.0%, al comparar el número de células calculadas con el modelo contra el número de células experimentales, se obtiene en un principio un porcentaje de error elevado, prácticamente del 200%, pero este disminuye considerablemente respecto al tiempo, obteniendo para 144 y 168 horas un error del 17% y 16 % respectivamente, lo cual es un indicio de que la correlación del modelo, si bien no es perfecta, es bastante adecuada para simular valores a tiempos de estudio altos, a partir de los 6 días en adelante.

Modelo de crecimiento celular para muestra de PVA/SA 5.0%

En la **Figura 50** se presenta el modelo matemático asociado al crecimiento celular en el andamio PVA/SA 3.5%, mientras que la **Tabla 7** presenta las células calculadas con el modelo, así como el porcentaje de error respecto a la cantidad de células medidas experimentalmente.

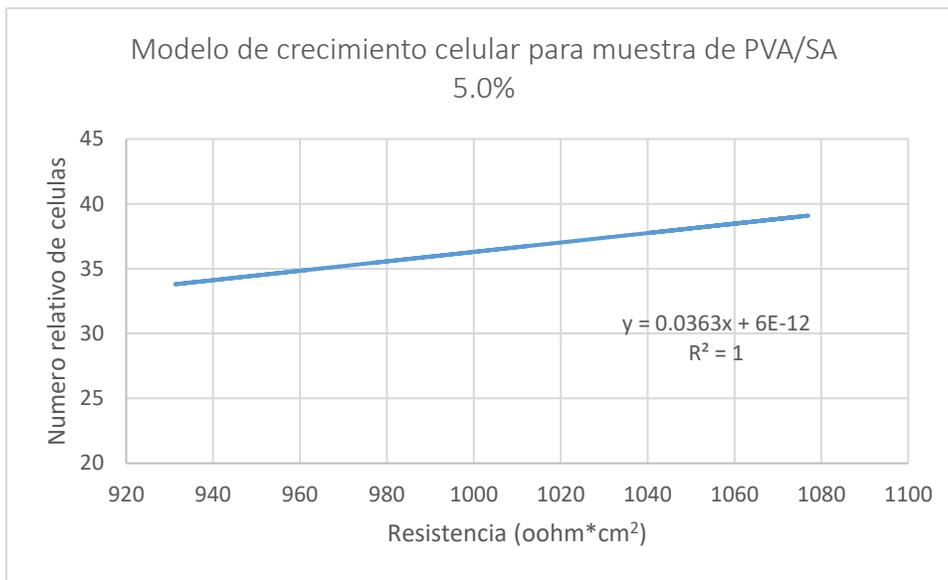


Figura 50. Modelos matemáticos que asocian el crecimiento celular el andamio de PVA-SA 5.0%, de acuerdo a los valores de resistencia del mismo obtenidos por EIS.

Tabla 5. Valores de resistencia y número de células calculados para el andamio celular PVA-SA 5.0% y el % error respecto a los valores experimentales de número de células.

Hora	Células promedio experimentales	R calculada con ecuación (ohm*cm ²)	Células calculadas con modelo a partir de R calculada	% error
72	376	3334.560	121	67.81
96	873	9263.850	336	61.51
120	1376	20778.600	754	45.20
144	2346	39687.010	1440	38.62
168	3101	67797.240	2461	20.64

Para la muestra de PVA/SA 5.0%, al comparar el número de células calculadas con el modelo contra el número de células experimentales, se obtienen los menores porcentajes de error para 72, 96 y 120 horas, siendo de 67%, 61% y 45%, respectivamente, por lo que este sistema

es el que muestra una mejor correlación a tiempos de estudio menores, de 3 a 5 días en comparación con los otros sistemas estudiados. Por otro lado, al igual que para el sistema de 4.0%, conforme va aumentando el tiempo de experimentación el porcentaje de error disminuye, obteniendo un 20 % error para 168 horas, por lo que este modelo es bastante adecuado para simular sistemas a partir de los 7 días y en adelante.

Como se mencionó anteriormente, los modelos predichos en el presente estudio se basan en polinomios de segundo y tercer orden, al ser ecuaciones relativamente simples, podrían no reflejar con suficiente precisión el comportamiento de los sistemas estudiados, por lo que es preciso mejorar el ajuste polinomial en futuros trabajos de investigación, de esta manera se espera reducir los porcentajes de error y acercarnos más a la tendencia experimental, sin embargo, como un primer acercamiento, los resultados representan una tendencia bastante positiva que nos demuestra que es posible predecir el crecimiento celular en este tipo de materiales a largos periodos de tiempo a partir de unos cuantos valores experimentales.

Conclusiones

Los estudios por SEM muestran que existe una adhesión importante de las células al andamio. El crecimiento celular presenta una morfología de estructuras semiesféricas sobre la superficie de los andamios poliméricos. Los cardiomiocitos se ven más claramente en la muestra del PVA/SA al 3.5%; sin embargo, tanto para la muestra de 4.0% como para la de 5.0%, el cambio en la morfología del material antes y después del sembrado celular es evidente.

Por otro lado, los estudios de AFM demostraron que la distribución de las células en el material es más homogénea para la muestra de PVA/SA al 4.0% ya que presentó menor rugosidad, seguida del andamio al 5.0% y del 3.5%.

Los estudios biológicos demostraron que los andamios de PVA/SA para todas las concentraciones permiten el crecimiento y proliferación de los cardiomiocitos, por lo tanto, son un material biocompatible con esta línea celular. El andamio PVA/SA 4.0% resultó ser el más favorable de los tres, ya que fue el que presentó un crecimiento celular más cercano al crecimiento de la muestra control.

Las mediciones con EIS muestran que a mayor concentración de SA en los andamios, el comportamiento se vuelve más capacitivo siendo, por lo tanto, la muestra de 5.0% la que presenta a bajas frecuencias un comportamiento casi lineal, muy capacitivo. Por otro lado, la muestra de 3.5%, presenta un comportamiento capacitivo-resistivo casi invariante. Por otro lado, la muestra de 4.0% también presenta un comportamiento capacitivo-resistivo similar a la muestra de 3.5% aunque con menores módulos de impedancia, por lo que las propiedades dieléctricas del 4% presentan cambios de resistencia eléctrica a bajas frecuencias.

Se demostró que es posible predecir el crecimiento celular en andamios poliméricos de PVA/SA a partir de modelos matemáticos polinomiales utilizando los datos de resistencia y capacitancia de las mediciones de EIS, siendo las muestras de 4.0% y 5.0% las que presentan mayor correlación con los valores experimentales a tiempos de estudio altos, 6 días en adelante para la muestra del 4.0% y 7 días en adelante para la muestra del 5.0%. Sin embargo, los resultados no fueron tan favorables para la muestra del 3.5%. Por otro lado, es necesario mejorar el ajuste polinomial en futuros trabajos de investigación para mejorar la calidad de las predicciones.

Referencias

1. Reyes Blas, Olivias Armendáriz, *Uso de Biomateriales Funcionalizados con Moléculas Bioactivas en la Ingeniería Biomédica*, Revista Mexicana de Ingeniería biomédica, vol. 40, (2019).
2. Xianrui Xie, Yjie Chen, Electrospinning nanofiber scaffolds for soft and hard tissue renegeration, *Journal of Materials Science & Technology*, vol. 59, (2020).
3. Narayan Bhattarrai, Zhensheng Li, *Alginate-based Nanofibrous Scaffold: Structural, Mechanical and biological properties*, Adv. Mater, vol. 18, (2006).
4. Product Specification, *Alginate*, Sigma-Aldrich, USA.
5. Marcy Wong, Alginates in tissue engineering, *Biopolymer Methos in Tissue Engineering*, Methods in Molecular Biology, Vol 238, Humana Press (2004).
6. Ficha de datos de seguridad, *Polivinilalcohol*, Millipore Sigma, (2020).
7. Md. Shahidul Islam, Mohammad Rezeaul Karim, *Fabrication and characterization of poly(vinil alcohol)/alginate blende nanofibers by electrospinning method*, Physicochem. Eng. Aspects 366, (2010).
8. Elisabetta Dattola, Elvira Immacolata P., *Development of 3D PVA scaffols for cardiac tissue engieneering and cell screening applications*, RSC, (2019).
9. Huaron Nie, Aihua He, *Effect of Chain conformation an entanglement on electrospinning of pure alginate*, Biomacromolecules, vol. 9, (2008).
10. Sandra Pina, Viviana P. Ribeiro, *Tissue engineering scaffolds: Future perspectives*, *Handbook of tissue engineering scaffold*, Vol. 1, (2019).

11. James Velema, David Kaplan, Biopolymer-Based Biomaterials as Scaffolds for tissue Engineering, *Biotechnol* Vol. 102 (2006).
12. Darrell H Reneker, Iksoo Chun, *Nanometer diametres fibres of polymer, produce by electrospinning*, *Nanotechnology*, vol.7, (1996).
13. Dan Li, Younan Xia, *Electrospinning of nanofibers Reinventing the Wheel?*, *Adv. Mater*, Vol. 16, (2004).
14. Andreea Trache, Gerald A. Meininger, Atomic Force Microscopy (AFM), *Current Protocols in Microbiology*, Wiley Interscience, (2008).
15. R. N. Jagtap, A. H. Ambre, Overview literature on atomic force microscopy (AFM): Basics and its important applications for polymer characterization, *Indian Journal of Engineering and Material Sciences*, vol. 13, (2006).
16. 16 Anwar Ul-Hamid, *A beginners' Guide to scanning electron Microscopy*, Springer, (2018).
17. Hector Herrera H., Adriana M. Ruiz, *Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): A Review Study of Basic Aspects of the Corrosion Mechanism Applied to Steels*, IntechOpen, (2020).
18. Edward P., Craig E., *Electrochemical Impedance Spectroscopy: An Overview of Bioanalytical Applications*. University of Arizona, (2013).
19. M. Hernández, M.A. Álvarez, *Evaluation of the Biocompatibility of PVA/SA scaffold with a human gingival fibroblast (HGF) by using electrochemical impedance spectroscopy*, *Bioelectrochemistry*, (2019).
20. *Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) Part 1-Basic Principles*, Metrohm Autolab, (2019).
21. Robert Cottis, Stephen Turgoose, *Electrochemical Impedance and Noise*, Houston, Texas, NACE International, (1999).
22. Gordana Vunjak, *Cell Seeding of Polumer Scaffolds, Biopolymer Methods in Tissue Engineering*, Anthony P. Hollander, Humana Press, vol. 238, Pag. 131-142.
23. Klaus-Dieter Schlüter, *Cardiomyocytes-Active Player in Cardiac Disease*, Springer, 2016.
24. Gary R. Skuse, Maureen C. Ferran, *Cardio-myocytes Methods and Protocols*, Springer Protocols, Humana Press, (2015).
25. Ulrich Kubitscheck *Fluorescence Microscopy. From principles to biological applications*, Second Edition, Wiley-VCH, (2017).

26. Alberto Mariscal, Rosa M. Lopez, *Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm*, Microbiol Biotechnol, vol. 82, (2009).
27. Invitrogen, *Calcein AM User Guide*, Catalog Numbers C1430, C3099, and C3100
28. Arias Díaz N. (2017), *Microesferas de biopolímeros mediante microfluidica para aplicación biomédica*, Tesis de licenciatura, [Universidad de Chile Facultad de ciencias Físicas y Matemáticas]. Repositorio Institucional-Universidad de Chile.
29. Ieva B., Daiva B., Edvardas B., *Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes – different cell effects*, Cytotechnology, vol. 68, (2015).
30. Weber M., Fech A., Jäger L., *Hydrojet-based delivery of footprint-free iPSC-derived cardiomyocytes into porcine myocardium*, Scientific Reports, Vol. 10, (2020).
31. Issabetta Dattola, Elvira Immacolata, *Development of 3D scaffold for cardiac tissue engineering and cell screening applications*, Royal Society of Chemistry, (2019).
32. Parchehbaf-Kashani M., Sepantafar M., Talkhabi M., *Design and characterization of an electroconductive scaffold for cardiomyocytes based biomedical assays*, Materials Science & Engineering C, vol. 109 (2020).
33. Juhyun Y., Wan Joo S., Young Moo R., *Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes by direct cell-to-cell contact with neonatal cardiomyocytes but not adult cardiomyocytes*, Ann Hematol, Vol. 84, (2005).
34. Weber M., Fech A., Jäger L., *Hydrojet-based delivery of footprint-free iPSC-derived cardiomyocytes into porcine myocardium*, Scientific Reports, Vol. 10, (2020).
35. Soto Quintero A., Golzalez Alva P., Covelo A., Hernandez M., *Study of the in vitro degradation and characterization of the HaCat Keratinocytes adherence on electrospun scaffolds based polyvinyl alcohol/sodium alginate*, Journal of Applied Polymer Science, vol. 139, (2022).
36. Lui L., Xu Y., Cui F., *Monitoring of bacteria biofilms forming process by in-situ impedimetric biosensor chip*, Biosensors and Bioelectronic, (2018).