Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería

Desarrollo de una plataforma organ-on-a-chip para evaluar la interacción celular de miocardio con nanosistemas poliméricos biofuncionales

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Doctor en Ingeniería

Presenta:

Tonantzi Pérez Moreno

Dirigido por:

Dra. Janet Ledesma García

Co-dirigido por:

Dr. J. Gabriel Luna Bárcenas

Dra. Janet Ledesma García
Presidente
Dr. J. Gabriel Luna Bárcenas
Secretario
Dra. Minerva Guerra Balcázar
Vocal
Dr. Omar Lozano García
Suplente
Dr. Ricardo Antonio Escalona
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Septiembre 2026
México

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

La presente obra está bajo la licencia:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es

CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

SinDerivadas — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad, o derechos morales pueden limitar la forma en que utilice el material.

A "Houston", Dr. Lalo Elizalde:

Por enseñarme a mirar más alto y sostener el rumbo cuando las fuerzas fallaban. Su fe incondicional, su amparo y su mentoría quedarán grabados para siempre en el origen de este y de mis futuros logros.



Agradecimientos

A mi familia, por ser el pilar fundamental en todo este proceso. A mis padres, por su apoyo incondicional en cada etapa, y a mis hermanos, por recordarme siempre la importancia de disfrutar la vida. Gracias, Dr. Richi, mi bebé Lolito y el latoso de mi pariente Miguel.

A mis amigos, por escuchar pacientemente cada una de mis quejas y nunca dejar de echarme porras. Gracias infinitas a Rosendito, Jared, Pantoja, Azuri, Lupita, futura Dra. Victoria, Dra. Judith, Monse y Dr. Roberto.

A mi asesora, la Dra. Janet, por adoptarme, confiar en mí y brindarme la libertad para crecer. Gracias por generar proyectos, por visualizar nuevas perspectivas para mi futuro y por jamás dejarme sola; la admiro profundamente como una gran mujer científica.

Al Dr. Luna, por darme la oportunidad de mostrar mi forma de trabajo como alumna del Dr. Elizalde, quien dejó una vara muy alta que espero alcanzar. Es un verdadero honor trabajar con el mentor de mi mentor.

Al Dr. Omar, por recibirme en su grupo de investigación y en su familia, así como por brindarme valiosas oportunidades de aprendizaje todos los días.

A mis minions, porque sin ustedes no habría podido terminar ni lograr nada de esto. Todo mi reconocimiento y gratitud para Humberto, Nadia y Mariana, no solo por el apoyo profesional, sino también por brindarme su amistad.



PRODUCTOS OBTENIDOS

Requisito	Producto	Cantidad
Alumnos titulados	Directora de Tesis	3
	Parte del sínodo	3
	Protocolos enviados a comité	2
Clases	Actas de calificaciones	6
Artículos publicados	JCR primer autor	4
	JCR otros autores	1
	otros	1
	Artículos en revisión	1
Divulgación	Congresos	4
	otros	7

ARTÍCULOS PUBLICADOS JCR PRIMER AUTOR


membranes

MDPI

Article

Nanofibrous Membranes Based on Collagen and Conductive Polymers with Perspective for Biological Applications

Tonantzi Pérez-Moreno [1], Claudia D'Urso [2], Gabriel Trejo [3], Maria V. Contreras-Martínez [3], Omar Lozano [4], Gerardo J. García-Rivas [4], Luis G. Arriaga [5,*], Gabriel Luna-Barcenas [5] and Janet Ledesma-García [1,*]

https://doi.org/10.3390/membranes15060177

membranes

MDPI

Article

Enhanced Properties of Collagen Nanofiber Scaffolds via Chitosan/Polypyrrole/Glutaraldehyde Double-Crosslinking

Tonantzi Pérez-Moreno [1], Jesús Humberto Chávez-Meza [1], Jesús-Salvador Jaime-Ferrer [2], Gabriel Luna-Bárcenas [3], Luis G. Arriaga [3,†] and Janet Ledesma-García [1,*,†]

https://doi.org/10.3390/membranes16040129

Biotecnia

Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx

Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Original Article

A novel bath coagulation/electrospinning method to obtain crosslinked nanofibers based on calcium alginate and polyvinyl alcohol and *In Vitro* cytotoxicity evaluation

Innovador método de electrohilado/ baño de coagulación para obtener nanofibras entrecruzadas basadas en alginato de calcio y alcohol polivinilo y su evaluación citotóxica *in vitro*

Tonantzi Pérez-Moreno[1], M.J. Rivas-Arreola[2], I. Santos-Sauceda[3], R. Ramirez-Bon[4], E.A. Elizalde-Peña[1]

[1] Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, Carr. A Chichimequillas S/N, Ejido Bolaños, 76140 Santiago de Querétaro, Qro., México.
[2] Departamento de Ciencias e Ingenierías, Universidad Iberoamericana Puebla, Blvd. Del Niño Poblano 2901, Reserva Territorial Atlixcáyotl, Centro Comercial Puebla, 72810 San Andrés Cholula, Pue., México.
[3] Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas J, Calle Av. Rosales &, Centro, 83000 Hermosillo, Son., México.
[4] Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Querétaro, Apdo, Postal 1-798, Querétaro, Qro., México.

https://doi.org/10.18633/biotecnia.v27.2641

Nanofiber Membranes of Chitosan and Alcohol Polyvinyl for Neomycin Delivery Comparing Simple and Coaxial Electrospinning

Conference paper | First Online: 16 May 2025
pp 65–75 | Cite this conference paper



X Latin American Congress on Biomedical Engineering
(CLAIB 2024)

Save conference paper

Tonatzi Pérez-Moreno, Luisa F. Luna-Solache, Isodoro Olvera-Rodríguez & Beatriz L. España-Sánchez

Access this chapter



ARTÍCULOS PUBLICADOS JCR OTROS AUTORES

RSC Advances

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

PAPER

Published on 10 March 2025
Licensed under CC-BY-NC 4.0

Check for updates

Cite this: *RSC Adv.*, 2025, **15**, 7693

Immunocytochemistry response of a hybrid (chitosan-*g*-glycidyl methacrylate)-xanthan scaffold for cell proliferation

Argelia Rosillo-de la Torre,[a] Tonantzi Pérez-Moreno,[b] Iraís A. Quintero-Ortega,[a] Padmavati Sahare,[c] Diego A. Bravo-Alfaro,[c] Héctor E. Martínez-Flores,[d] Friné López-Medina,[e] Ramón Román-Doval,[f] Alejandro Gómez-Sánchez,[f] Sandra Herrera-Perez,[g] Julie E. Gough,[h] Zaira Yunuen García Carvajal,*[i] Cristina Velasquillo*[j] and Gabriel Luna-Barcenas*[c]

https://doi.org/10.1039/d4ra06549b

DIRECTORA DE TESIS


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
ACTA DE TITULACIÓN


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
ACTA DE TITULACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Ingeniería

"DESARROLLO DE UN APÓSITO A BASE DE MUCÍLAGO DE NOPAL PARA LA RECUPERACIÓN DE TEJIDO EPITELIAL DAÑADO POR QUEMADURAS."

TESIS INDIVIDUAL

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
INGENIERO BIOMÉDICO

PRESENTA:
RAMÍREZ ÁLVAREZ CARLO IVÁN

DIRIGIDO POR:
M. en C. TONANTZI PÉREZ MORENO

SINODALES:
- M. en C. TONANTZI PÉREZ MORENO
  Directora
- Dra. ALEJANDRA ÁLVAREZ LÓPEZ
  Secretaria
- Dra. SANDRA VIRGINIA RIVAS GÁNDARA
  Vocal
- Dra. Vanessa Vallejo Becerra
  Suplente

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. JUNIO DE 2025

Evento	Año	Lugar	
XIII Congreso Anual sobre Ciencia y Tecnología de Membranas	2024	Chetumal	
XIV Congreso Anual sobre Ciencia y Tecnología de Membranas	2025	UNAM, Ciudad de México	Tercer lugar en presentación oral
Científicas FI-CA	2024	UAQ-CA	Prácticas en laboratorio
Científicas FI-CA	2025	UAQ-CA y Tequisquiapan	Prácticas de laboratorio y plática
Tesis en 3 min	2025	Qro. estatal	Tercer lugar
Ciencia y café	2025	UAQ	Entrevista
Difusión UAQ	2025	UAQ	Entrevista
Seminario SAFI-CA	2025	UAQ-CA	Ponencia, entrevista y taller
Congreso Internacional de investigación sobre obesidad	2026	Tec de Monterrey, Mty.	Poster



International Congress of Obesity	2026	CDMX	Poster
Revista Conversus	2026	IPN	Artículo de divulgación

PREMIOS OBTENIDOS

Tercer lugar concurso “Tesis en 3 minutos”





Tercer lugar en Presentación Oral en el XIV Congreso Anual sobre Ciencia y Tecnología de Membranas



Índice

Capítulo 1. Generalidades 21

1.1 Antecedentes 21

1.2 Justificación 24

1.3 Descripción del problema 25

1.4 Fundamentación teórica 26

1.4.1 Fisiología y microambiente de las células cardíacas. 26
1.4.2 Ingeniería de tejidos y Biomateriales 30
1.4.2.1 Polímeros naturales 30
1.4.2.2 Polímeros conductores 31
1.4.2.3 Síntesis de nanoestructuras 32
1.4.3 Propiedades fisicoquímicas y eléctricas de nanofibras biocompatibles 34
1.4.3.1 Conducción en los polímeros conductores 34
1.4.3.2 Medición de impedancia 35
1.4.4 Evaluación de la interacción célula-material 35
1.4.4.1 Modelos de cultivo celular in vitro 35
1.4.4.2 Cinética de viabilidad y citotoxicidad 36
1.4.4.3 Marcadores proteicos y técnicas de inmunocitoquímica 36
1.4.5 Sistemas Organ-on-a-chip 36
1.4.5.1 Microfabricación y plataformas de microfluídica 37
1.4.5.2 Integración de sensores para análisis en tiempo real 37
1.4.5.3 Electroestimulación en dispositivos Organ on a chip 38

1.5 Hipótesis 39

1.6 Objetivos 39

1.6.1 Objetivo general: 39
1.6.2 Objetivos particulares 39

Capítulo 2. Sistemas nanoestructurados 40

2.1 Metodología 40

2.1.1 Nanosistema polimérico biofuncional 40
2.1.1.1 Síntesis de nanosistema nanoestructurado polimérico biofuncional 40
2.1.1.1.1 Soluciones de polímeros naturales 40
2.1.1.1.2 Soluciones de polímeros conductores 40
2.1.1.1.2.1 Síntesis de Ppy 40
2.1.1.1.2.2 Síntesis de Pani 41
2.1.1.1.3 Electrohilado 41
2.1.1.2 Síntesis de nanosistema nanoestructurado polimérico biofuncional entrecruzado 41
2.1.1.2.1 Entrecruzamiento por base de Schiff con glutaraldehído 41
2.1.1.2.2 Electrohilado 42
2.1.2 Caracterización fisicoquímica 42
2.1.2.1 Microscopía electrónica de barrido 42
2.1.2.1.1 Medición del diámetro de las fibras 43



2.1.2.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier 43
2.1.2.3 Porosidad 43
2.1.3 Caracterización mecánica 43
2.1.3.1 Tensión 43
2.1.4 Evaluación de conducción 43
2.1.4.1 Conducción eléctrica en seco 43
2.1.4.1.1 Determinación de conducción eléctrica 44
2.1.4.2 Resistencia eléctrica 44
2.1.4.2.1 Determinación de conducción eléctrica 44
2.1.4.3 Capacidad de intercambio iónico 44

2.2 Resultados 45
2.2.1 Síntesis de sistemas nanoestructurados por electrohilado 45
2.2.1.1 Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier 45
2.2.1.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM) 46
2.2.1.3 Porosidad 48
2.2.1.4 Mecánicas 49
2.2.1.5 Conductividad 50
2.2.2 Síntesis de sistemas nanoestructurados por electrohilado entrecruzados con GTA 51
2.2.2.1 Espectroscopia FTIR 51
2.2.2.2 Microscopia SEM 53
2.2.2.3 Degradación e hinchamiento 55
2.2.2.4 Conductividad Iónica 57
2.2.2.5 Propiedades mecánicas 59
2.2.2.5.1 Permeabilidad iónica 59

2.3 Discusión de resultados 61

2.4 Conclusiones 63

Capítulo 3. Evaluación de sistema nanoestructurado en pruebas in vitro 64

3.1 Metodología 64
3.1.1 Cultivo celular de fibroblastos y cardiomiocitos 64
3.1.2 Esterilización de las membranas 64
3.1.3 Viabilidad celular 65
3.1.3.1.1 Azul alamar 65
3.1.4 Inmunocitoquímica 65
3.1.5 Degradación in vitro de membrana 66
3.1.6 Viabilidad celular de membranas entrecruzadas con GTA 66
3.1.6.1 Neutralización de membranas 66
3.1.6.2 Pruebas de fluorescencia 66
3.1.6.2.1 Vida y muerte 66
3.1.6.2.2 Morfología 67

3.2 Resultados 67
3.2.1 Membranas de Colágeno-Quitosano y polímeros conductores 67
3.2.1.1 Proceso de esterilización 67
3.2.1.2 Viabilidad celular 68
3.2.1.3 Degradación de la membrana 70
3.2.1.4 Inmunocitoquímica 71



3.2.2 Viabilidad celular de membranas entrecruzadas con GTA 71
3.2.2.1 Previo a neutralización de membranas 71
3.2.2.2 Después de neutralización de membranas 75
3.2.2.3 Pruebas de fluorescencia 78
3.2.2.3.1 Vida y muerte 78
3.2.2.3.2 Inmucitoquímica 80

3.3 Discusión de resultados 81
3.3.1 Dinámica del proceso de esterilización en matrices electroactivas 81
3.3.2 Biocompatibilidad metabólica inicial 82
3.3.3 Termodinámica de la degradación 83
3.3.3.1 Mecanobiología del anclaje celular temprano y respuestas adaptativas al sustrato conductor83
3.3.4 Análisis de sistemas estabilizados mediante entrecruzamiento molecular 84
3.3.4.1 Optimización de la ventana de siembra preliminar 84
3.3.4.2 Mecanismo químico de neutralización con glicina 85
3.3.4.3 Efectos homeostáticos dependientes de la densidad de siembra celular 85
3.3.4.4 Influencia del diámetro de fibra y porosidad 86
3.3.5 Termodinámica de la autofluorescencia y deconstrucción del ruido espectral en compósitos 87
3.3.5.1 Evaluación crítica de sondas fluorogénicas 87
3.3.5.2 Validación espectroscópica del protocolo optimizado 88
3.3.5.3 Caracterización citoesquelética final 88

3.4 Conclusiones 89

Capítulo 4. Desarrollo de plataforma organ-on-a-chip 91

4.1 Metodología 91
4.1.1 Diseño del dispositivo en 3D 91
4.1.2 Impresión en resina LDL 92
4.1.3 Molde de PDMS 92
4.1.4 Sellado del dispositivo 93
4.1.5 Flujo de medios acuosos 94

4.2 Resultados 94
4.2.1 Dispositivos PDMS:PDMS 94
4.2.2 Dispositivos PDMS:vidrio 95

4.3 Análisis de resultados 98
4.3.1 Fallas en el sellado mecánico 98
4.3.2 Éxito del sellado por plasma de oxígeno 98
4.3.3 Dinámica de burbujas y el efecto de las válvulas de tres vías 98

4.4 Conclusiones 99

Capítulo 5. Evaluación de membrana en organ-on-a-chip 100

5.1 Metodología 100
5.1.1 Pruebas de esterilidad 100
5.1.2 Monitoreo de viabilidad celular 100
5.1.2.1 Vitalidad celular 100



5.1.2.2 Vida/muerte 101
5.1.3 Inmunocitoquímica 101
5.1.3.1 Procesamiento de imágenes 102
5.2 Resultados 105
5.2.1 Viabilidad metabólica 105
5.2.2 Monitoreo continuo de vida/muerte 107
5.2.3 Construcción de esquemas 3D 112
5.3 Viabilidad celular en dispositivo sin flujo 115
5.4 Análisis de resultados 119
5.5 Conclusiones 121
Capítulo 6. Perspectivas 123
Capítulo 7. Productos 4
Capítulo 8. Anexos 124
8.1 Anexo 1: Deconvoluciones de entrecruzamiento 124
8.2 Anexo 2: Reconstrucciones tridimensionales y ortogonales usando 30k células 126
8.3 Anexo 3: Reconstrucciones tridimensionales y ortogonales usando dispositivos OoC 127
8.4 Anexo 3: Reconstrucciones tridimensionales y ortogonales usando dispositivos estáticos 128
Capítulo 9. Referencias bibliográficas 130



Índice de Figuras

Figura 1.1. Glicoproteínas presentes en el complejo de unión entre los cardiomiocitos (modificado de (Vermij et al., 2017)) 26

Figura 1.2. Matriz de actina y miosina..... 27

Figura 1.3. Estructura de hélices oligomerizadas de las conexiones (modificada de (Vermij et al., 2017)) 28

Figura 1.4. Conjunto de células presentes en el miocardio (extraído de (Vermij et al., 2017))..... 29

Figura 1.5. Señales de potenciales de acción en células cardíacas. 29

Figura 1.6. Estructura de colágeno (modificado de (Gelse et al., 2003))..... 30

Figura 1.7. Estructura molecular de polipirrol y polianilina (modificado de (Zare et al., 2021) 32

Figura 1.8. Esquema del funcionamiento del electrohilado (modificado de long et al., 2018)..... 33

Figura 2.1. Análisis de grupos funcionales por FTIR de: (a) los materiales precursores individuales y de los complejos poliméricos modificados con (b) Ppy y (c) Pani. 46

Figura 2.2. Micrografías de SEM de las membranas en estado seco: (a) Coll-Ch, (c) Coll-Ch/Pani y (e) Coll-Ch/Ppy; y de las membranas tras el proceso de hidratación/estado húmedo: (b) Coll-Ch, (d) Coll-Ch/Pani y (f) Coll-Ch/Ppy. 48

Figura 2.3. Curvas de esfuerzo-deformación de las diferentes membranas poliméricas evaluadas mediante ensayos de tracción uniaxial. 50

Figura 2.4. Espectros de FTIR de los controles individuales de Ch y Ppy, de la mezcla física Ch-Ppy y de la muestra de la matriz reticulada Ch-Ppy-GTA..... 52

Figura 2.5. Espectros de FTIR de la mezcla de colágeno y quitosano, de la matriz de Coll-Ch reticulada con glutaraldehído a 10 µM (Coll-Ch-GTA 100 µM) y de la membrana electroactiva compuesta, funcionalizada con polipirrol (Coll-Ch/Ppy-GTA 100 µM). 53

Figura 2.6. Micrografías de SEM de las membranas electroactivas de Coll-Ch/Ppy reticuladas con GTA a concentraciones, (b) 50 µM y (c) 100 µM. Los paneles (d), (e) y (f) corresponden a las membranas tratadas adicionalmente con vapor de GTA (0.8 µL/mL) durante 24 h, a las concentraciones de 25 µM, 50 µM y 100 µM, respectivamente..... 54

Figura 2.7. Micrografías de SEM que muestran la morfología superficial de las membranas modificadas (a) 50 µM, (b) 50 µM y (c) 100 µM tras 10 días de incubación en solución de PBS a 37 °C. 55

Figura 2.8. Evaluación de la estabilidad hidrolítica de las membranas reticuladas: (a) pérdida de masa; (b) modelo cinético de pérdida de masa a los 5, 10, 20 y 30 días de incubación; y (c) grado de hinchamiento (swelling ratio) a las 1, 2, 3, 4 y 24 h en PBS a 37 °C. 56

Figura 2.9. Diagramas de Nyquist y gráficos del ángulo de fase de Bode para las membranas de colágeno-quitosano (Coll-Ch) modificadas a concentraciones de: (a) $25\ \mu$M, (b) $50\ \mu$M y (c) $100\ \mu$M. Las mediciones de espectroscopía de impedancia se realizaron a las 0 h y 144 h de exposición a iones $Na+$ (procedentes de NaCl) y $Ca2+$ (procedentes de CaCl2). En (e) se presenta el circuito eléctrico equivalente utilizado para ajustar los datos experimentales del sistema. 57

Figura 2.10. Cinética electroquímica a lo largo de 6 días para las matrices de Coll-Ch ($25\ \mu$M, $50\ \mu$M y $100\ \mu$M): Pseudocapacitancia en medio iónico de (a) $Na+$ y (c) $Ca2+$; y resistencia del volumen (RB) en medio iónico de (b) $Na+$ y (d) $Ca2+$ 58

Figura 2.11. Evaluación temporal de la conductividad (0 a 6 días) en membranas de Coll-Ch-GTA expuestas a diferentes concentraciones ($25\ \mu$M, $50\ \mu$M, $100\ \mu$M y $200\ \mu$M) como control de Coll-Ch, bajo la influencia de (a) cationes $Na+$ y (b) cationes $Ca2+$..... 59

Figura 2.12. Permeación iónica de la membrana en celda tipo H de los iones de Na^+ y Cl^-. 60

Figura 3.1. Seguimiento de la esterilización de las membranas durante 7 días. 68

Figura 3.2. Placa de 96 pozos con las membranas evaluadas en el experimento 1 (N=3). 69

Figura 3.3. Viabilidad celular por conteo con azul de tripano de las células tripsinizadas de las membranas. 69

Figura 3.4. Degradación de la membrana por pérdida de peso durante 9 días..... 70

Figura 3.5. Imágenes ortogonales de las micrografías por confocal de las membranas en cultivo de 24 h: a) control de células cultivadas en cubreobjetos, b) membrana con Ppy, y c) membrana con Pani. 71

Figura 3.6. Perfil cuantitativo de viabilidad celular en membranas funcionalizadas con: (a) Ppy y (b) Pani, evaluado durante un periodo continuo de 120 horas..... 72

Figura 3.7. Cinética de viabilidad celular en membranas de Ppy, analizando el efecto del tiempo de anclaje temprano durante las primeras 4 horas y su evolución hasta las 120 horas (N = 3). 73

Figura 3.8. Cinética de viabilidad celular en membranas de Pani, analizando el efecto del tiempo de anclaje temprano durante las primeras 4 horas y su evolución hasta las 120 horas (N = 3), donde: a) Ctrl con 100 µM, b) 50 µM y c) 100 µM..... 74

Figura 3.9. Micrografía óptica de los cardiomioblastos H9c2 distribuidos sobre la superficie de la membrana tras 2 h de cultivo estático y posterior restitución del volumen de medio (objetivo 10X): a) Ppy y b)Pani. 75

Figura 3.10. Perfil cuantitativo de viabilidad celular con azul alamar en membranas de Ppy tratadas con Gly y EtOH al 70%, evaluadas durante 120 horas, empleando dos densidades de siembra: (a) 3 000 células/pozo y (b) 10 000 células/pozo (N = 3). 76

Figura 3.11. Caracterización morfológica por microscopía óptica de los cardiomioblastos H9c2 a las 72 h de cultivo sobre la superficie de la membrana modificada con Ppy, neutralizada con Gly y esterilizada con EtOH (objetivo 10X)..... 77

Figura 3.12. Perfil cuantitativo de viabilidad celular en membranas de Pani tratadas con Gly y EtOH al 70%, evaluadas durante 120 horas, empleando dos densidades de siembra: (a) 3 000 células/pozo y (b) 10 000 células/pozo (N = 3).... 78

Figura 3.13. Caracterización de la respuesta autofluorescente intrínseca en membranas de control de Coll-Ch bajo líneas de excitación de 488 y 514 nm empleando un láser de argón.... 79

Figura 3.14. Ensayos preliminares de optimización mediante microscopía de fluorescencia, evaluando: (a) yoduro de propidio, (b) CellTrace Violet y (c) Fluo-4..... 79

Figura 3.15. Micrografías de microscopía confocal de barrido láser aplicando el protocolo optimizado con calceína AM roja y Sytox Green: (a) membrana Coll-Ch, y (b) Coll-Ch/Ppy.... 80

Figura 3.16. Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de membranas de Ppy al día 5 de cultivo: (a) marcaje del citoesqueleto con faloidina y (b) contratinción dual de faloidina con Sytox Green. 81

Figura 4.1. Proceso de diseño y fabricación del dispositivo.... 92

Figura 4.2. Procedimiento para la obtención de un dispositivo microfluídico de PDMS.... 93

Figura 4.3. Dispositivos microfluídicos con interfaz PDMS:PDMS ensamblados mediante fijación mecánica sobre bases de soporte de resina polimérica. 95

Figura 4.4. Dispositivos con interfaz PDMS-vidrio acoplada mediante compresión mecánica sobre bases de resina. 96

Figura 4.5. Chip microfluídico funcionalizado y sellado de forma irreversible mediante activación superficial con plasma de oxígeno.... 96

Figura 4.6. Variantes de diseño arquitectónico para el almacenamiento y bombeo de fluidos: (a) reservorios pasivos por gravedad en tubos de microcentrífuga, (b) sistema híbrido con tubos y jeringas, (c) configuración de reservorios con figuras para la inducción de presión negativa, y (d) reservorios equipados con acoplamientos valvulares para la conexión de regímenes de presión positiva.... 97

Figura 4.7. Configuración final del dispositivo microfluídico optimizado mediante la integración de válvulas direccionales de tres vías para el control de la presión positiva y la supresión de la nucleación de burbujas en los canales..... 97

Figura 5.1. Perfil cinético de la viabilidad metabólica celular (azul alamar) de los cardiomioblastos H9c2 cultivados en el dispositivo microfluídico con membrana Coll-Ch/Ppy durante 10 días bajo condiciones de perfusión semicontinua. 105

Figura 5.2. Perfil cinético de la viabilidad metabólica celular (azul alamar) de los cardiomioblastos H9c2 cultivados en el dispositivo microfluídico con membrana Coll-Ch/Pani durante 10 días bajo condiciones de perfusión semicontinua. 106



Figura 5.3. Seguimiento del efecto en la viabilidad celular del cultivo que fue sembrado en 10 ul. 107

Figura 5.5. Micrografías de microscopía confocal representativas de los cardiomioblastos H9c2 perfundidos en el chip en el día 1 de cultivo: (a) Blanco en placa, (b) Control del dispositivo sin membrana, (c) Andamio de control de Coll-Ch y (d) Andamio electroactivo de Coll-Ch/Ppy. 108

Figura 5.6. Micrografías representativas de microscopía confocal de barrido láser que ilustran la morfología y distribución espacial de los cardiomioblastos H9c2 perfundidos en el dispositivo microfluídico en los días 1, 5 y 10 de cultivo. Comparativa entre el Ctrl (a,b y c) del dispositivo sin membrana y la plataforma OoC integrada con la matriz electroactiva de Coll-Ch/Pani (d, e y f). 109

Figura 5.7. Análisis cuantitativo de las densidades de poblaciones celulares vivas (a) y muertas (b), indexadas por unidad de área, en los andamios microfluídicos con membranas de Coll-Ch/Ppy durante 10 días. 110

Figura 5.8. Curvas porcentuales de viabilidad celular derivadas del procesamiento digital de imágenes confocales de fluorescencia en el dispositivo OoC (N = 3). 111

Figura 5.9. Reconstrucciones ortogonales obtenidas a partir del Z-stack por microscopía confocal de barrido láser al día 10 de cultivo dinámico. Se ilustra la colonización e infiltración tridimensional de las células H9c2 a través del espesor de los andamios electroactivos en la plataforma OoC: (a) matriz de Coll-Ch/PPy, (b) matriz de Coll-Ch/Pani y (c) dispositivo Ctrl sin membrana. 112

Figura 5.10. Reconstrucción tridimensional e histología virtual (z-stack) que ilustran la distribución e infiltración de los cardiomioblastos H9c2 en el plano axial de la membrana electrohilada Coll-Ch/Ppy a las 24 horas de cultivo (a y b), así como al día 5 (c y d). 113

Figura 5.11. Reconstrucción tridimensional e histología virtual (z-stack) que ilustran la distribución e infiltración de los cardiomioblastos H9c2 en el plano axial de la membrana electrohilada Coll-Ch/Pani a las 24 horas de cultivo (a), así como al día 5 (b) 114

Figura 5.12. Micrografías de microscopía confocal que ilustran la viabilidad celular tras 24 h de cultivo estático en el chip: (a) blanco de referencia en placa, (b) control del dispositivo sin membrana, (c) andamio de Coll-Ch, y (d) andamio electroactivo de Coll-Ch/Ppy. 115

Figura 5.13. Micrografías confocales de barrido láser correspondientes al día 5 de cultivo bajo régimen estático dentro del dispositivo microfluídico: (a) control del dispositivo sin membrana, (b) andamio de Coll-Ch, y (c) andamio electroactivo de Coll-Ch/Ppy. 116

Figura 5.14. Proyecciones ortogonales de Z-stacks confocales para el análisis de viabilidad celular en función del tiempo: matrices electroactivas de Coll-Ch/Pani en el día 1 (a) y día 5 (b); y matrices de Coll-Ch/PPy en el día 1 (c) y día 5 (d). 117

Figura 5.15. Reconstrucción tridimensional de la distribución e infiltración espacial de los cardiomioblastos H9c2 embebidos en la matriz electroactiva de colágeno-quitosano/polianilina (Coll-Ch/PANI) en el día 1 (a) y día 5 (b) de cultivo. 118

Figura 5.16. Proyecciones ortogonales de Z-stacks confocales para el análisis de α-actina y núcleos en función del tiempo: matrices electroactivas de Coll-Ch/Pani en el día 1 (a) y día 5 (b); y matrices de Coll-Ch/PPy en el día 1 (c) y día 5 (d). 119

Figura 8.1. Semientrecruzamiento de Ch-Pani con GTA, previo al electrohilado..... 124

Figura 8.2. Semientrecruzamiento de Ch-Ppy con GTA, previo al electrohilado. 125

Figura 8.3. Reconstrucciones 3D y ortogonales a las 2 h con membranas de Coll-Ch/Pani (a y b), y Coll-Ch/Ppy (c y d). 126

Figura 8.4. Reconstrucciones 3D y ortogonales al día 1 con membranas de Coll-Ch/Pani (a y b), y Coll-Ch/Ppy (c y d). 126

Figura 8.5. Reconstrucciones 3D y ortogonales al día 1 con membranas de Coll-Ch/Pani (a y b), y Coll-Ch/Ppy (c y d), en dispositivos con flujo. 127

Figura 8.6. Reconstrucciones 3D y ortogonales al día 5 con membranas de Coll-Ch/Pani (a y b), y Coll-Ch/Ppy (c y d), en dispositivos con flujo. 127

Figura 8.7. Reconstrucciones 3D y ortogonales al día 1 de ensayos de vida/muerte con membranas de Coll-Ch/Pani (a y b), y Coll-Ch/Ppy (c y d), en dispositivos con flujo..... 128

Figura 8.8. Reconstrucciones 3D y ortogonales al día 5 de ensayos de vida/muerte con membranas de Coll-Ch/Pani (a y b), y Coll-Ch/Ppy (c y d), en dispositivos con flujo..... 128

Figura 8.9. Reconstrucciones 3D y ortogonales al día 1 de ensayos de tinción de actina con membranas de Coll-Ch/Pani (a y b), y Coll-Ch/Ppy (c y d), en dispositivos con flujo. 129

Figura 8.10. Reconstrucciones 3D y ortogonales al día 5 de ensayos de tinción de actina con membranas de Coll-Ch/Pani (a y b), y Coll-Ch/Ppy (c y d), en dispositivos con flujo. 129



Índice de Tablas

Tabla 1. Concentraciones de GTA para el entrecruzamiento de Ch y de polímeros conductores. 42

Tabla 2. Concentraciones de las soluciones de Ch y Coll entrecruzadas con GTA. 42

Tabla 3. Análisis morfométrico del diámetro de las fibras y de las impurezas (beads) en las distintas membranas electrohiladas. 47

Tabla 4. Módulo de Young de las diferentes membranas poliméricas, evaluado mediante ensayos mecánicos a 37 °C. 49

Tabla 5. Caracterización de la conductividad eléctrica en matrices de Coll-Ch modificadas con los polímeros conductores Pani y Ppy. 51

Tabla 6. Nomenclatura de diseños de dispositivos microfluídicos. 91



Resumen

Las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de morbimortalidad a nivel mundial, siendo el infarto agudo de miocardio una condición crítica caracterizada por la pérdida masiva de cardiomiocitos y la formación de una cicatriz fibrosa no contráctil. Dada la limitada capacidad regenerativa del tejido cardíaco nativo y la interrupción de la conducción de los impulsos eléctricos, la ingeniería de tejidos surge como una alternativa terapéutica prometedora mediante el desarrollo de matrices tridimensionales que mimetizan la matriz extracelular (MEC) miocárdica. En este trabajo de investigación se diseñó, sintetizó y validó una plataforma biomimética integrada Organ-on-a-chip, compuesta por andamios nanofibrosos electroactivos integrados en un dispositivo microfluídico optimizado para el cultivo dinámico de cardiomioblastos H9c2.

En la primera etapa, se fabricaron matrices nanoestructuradas de colágeno-quitosano (Coll-Ch) funcionalizadas con polímeros conductores (polipirrol, PPy, y polianilina, Pani) mediante la técnica de electrohilado. Para asegurar la integridad estructural sin inducir citotoxicidad, se estableció un protocolo de entrecruzamiento avanzado con glutaraldehído (100 μM) acoplado a una reacción de condensación nucleofílica con glicina, la cual neutralizó los grupos aldehído libres y elevó la viabilidad celular por encima del 75%.

En la etapa de desarrollo microfluídico, se evaluó el comportamiento hidrodinámico en chips de polidimetilsiloxano y de vidrio. Se demostró que el sellado por compresión mecánica es inviable, mientras que la activación superficial con plasma de oxígeno garantizó la hermeticidad del fluido durante 15 días consecutivos de perfusión. Asimismo, la integración de válvulas direccionales de tres vías eliminó los fenómenos de reflujo y redujo la nucleación de microburbujas en las cámaras de cultivo.

Finalmente, la validación biológica bajo flujo continuo e incubación estática reveló que la presencia del polipirrol confiere estabilidad hidrolítica a las nanofibras, lo que previene la degradación prematura y el desprendimiento celular observados en las matrices proteicas puras. Mediante análisis de microscopía confocal y algoritmos de procesamiento digital, se constató que la matriz de Coll-Ch/PPy induce una fase de adaptación inicial, seguida de una proliferación celular exponencial tardía (con un incremento del 300% al décimo día), lo que guía axialmente a los cardiomioblastos a través de las nanofibras en una distribución tridimensional.

Esta plataforma integrada de andamios electroactivos y microfluídica se consolida como un sistema robusto, hemodinámicamente estable y biomimético de alta fidelidad, con gran potencial para la medicina regenerativa cardiovascular, el modelado de patologías y el escrutinio automatizado de fármacos.



Abstract

Cardiovascular diseases represent the leading cause of morbidity and mortality worldwide, with acute myocardial infarction being a critical condition characterised by the massive loss of cardiomyocytes and the formation of a non-contractile fibrous scar. Given the limited regenerative capacity of native cardiac tissue and the disruption of electrical impulse conduction, tissue engineering emerges as a promising therapeutic alternative through the development of three-dimensional matrices that mimic the myocardial extracellular matrix. In this research work, an integrated biomimetic Organ-on-a-chip platform was designed, synthesised, and validated, consisting of electroactive nanofibrous scaffolds integrated into a microfluidic device optimised for the dynamic culture of H9c2 myoblasts.

In the first stage, collagen-chitosan (Coll-Ch) nanostructured matrices functionalized with conductive polymers (polypyrrole, PPy, and polyaniline, Pani) were fabricated via electrospinning. To ensure structural integrity without inducing cytotoxicity, an advanced crosslinking protocol using glutaraldehyde ($100\ \mu M$) was established, coupled with a nucleophilic condensation reaction with glycine, which neutralised free aldehyde groups and raised cell viability above 75%.

In the microfluidic development stage, the hydrodynamic behaviour in polydimethylsiloxane and glass chips was evaluated. It was demonstrated that mechanical compression sealing is unfeasible, whereas surface activation by oxygen plasma guaranteed fluid leak-tightness during 15 continuous days of perfusion. Likewise, the integration of three-way directional valves eliminated backflow phenomena and decreased microbubble nucleation within the culture chambers.

Finally, biological validation under continuous flow and static incubation revealed that the presence of polypyrrole confers hydrolytic stability to the nanofibers, preventing premature degradation and cell detachment observed in pure protein matrices. Through confocal microscopy analysis and digital processing algorithms, it was confirmed that the Coll-Ch/PPy matrix induces an initial adaptation phase followed by late exponential cell proliferation (reaching a 300% increase by the tenth day), axially guiding myoblasts across the nanofibers in a three-dimensional distribution.

This integrated platform of electroactive scaffolds and microfluidics establishes itself as a robust, hemodynamically stable, and high-fidelity biomimetic system with great potential for cardiovascular regenerative medicine, disease modelling, and automated drug screening.



Capítulo 1. GENERALIDADES

1.1 ANTECEDENTES

El corazón es el órgano más importante porque está encargado de bombear la sangre rica en oxígeno al resto del cuerpo a través de los vasos sanguíneos. Este órgano está estructurado en 3 capas: el pericardio, el miocardio y el endocardio. El pericardio es la capa externa que cubre al miocardio, el músculo que conforma la segunda capa del tejido y el endocardio es la capa más interna del tejido cardíaco; mientras que la cavidad del corazón está dividida en aorta y ventrículos tanto derecha e izquierda [1], [2]

Debido a la importancia que tiene el corazón, cuando este sufre un daño, es vital realizar un tratamiento o intervención. Estos daños pueden causar un mal flujo sanguíneo, contracción o conducción cardíaca. Estas afecciones se deben a cardiopatías, que son enfermedades del corazón y de los vasos sanguíneos. Dentro de estas cardiopatías se encuentra los ataques cardíacos que implican muerte celular en zonas donde no se recibe oxigenación [3], arritmias que se producen por ritmo irregulares, arteriosclerosis el cual involucra un crecimiento irregular de las arterias, y los trastornos de conducción eléctrica [4].

El ataque cardíaco también se conoce como infarto del miocardio y, si no se restaura el flujo sanguíneo, el músculo cardíaco comienza a morir hasta llegar a un paro cardíaco súbito. Por ello, según la gravedad, el tratamiento de emergencia incluye el uso de medicamentos para prevenir o aliviar el dolor. Después del ataque cardíaco, la primera recomendación es mejorar el estilo de vida del paciente, continuar con el consumo de medicamentos que ayudan a controlar los síntomas, sin embargo, en algún punto el daño al corazón puede volver a suceder. Dentro de los medicamentos tenemos a: metformina, nitratos, estatinas, bloqueantes de canales de Ca^{2+} y betabloqueadores [5].

Como se mencionó, dependiendo de la gravedad de la cardiopatía, pueden realizarse procedimientos no quirúrgicos, como la intervención coronaria percutánea (ICP), que consiste en colocar un stent tubular para dilatar las arterias obstruidas. Por otro lado, existen procedimientos quirúrgicos que tienen como fin mejorar el flujo de sangre colocando dispositivos médicos, y se conocen como revascularización miocárdica (CRM), que utiliza dispositivos como bypass [6].

Algunos tratamientos utilizan la oxigenación por membrana extracorpórea, que ayuda a suministrar oxígeno y a mejorar la circulación de la sangre, y la bomba de balón intraaórtica, que mejora la circulación al dilatar las arterias obstruidas. En casos de alta gravedad, se deja a los pacientes en espera de trasplante, conectados a máquinas que actúan como asistentes percutáneos (PCADS).

De no ser tratados, los pacientes después de un ataque cardíaco pueden agudizarse los síntomas o afecciones, como shock cardíaco, insuficiencia cardíaca, inflamación, arritmias o incluso un paro cardíaco.

Cuando el daño al tejido no puede ser tratado con estos tratamientos mencionados, se busca que el paciente reciba un primero un dispositivo médico de asistencia ventricular o trasplante de órgano. Los primeros se ven limitados por el tamaño y la dificultad de movilidad que provocan en los pacientes, así como por su durabilidad, fiabilidad e integración con el tejido circundante. Mientras que los implantes de corazón se ven limitados por la escasez de



donantes tanto por la disponibilidad como por los compatibles, lo que resulta en listas de espera; y aún después de obtener un trasplante y recibir supresores de inmunológicos se puede desarrollar rechazo del órgano, también es importante considerar las complicaciones postoperatorias como las infecciones, enfermedades renales y problemas cardiovasculares adicionales [2], [7].

Debido a los efectos secundarios de los tratamientos actuales, se busca restaurar la función de los cardiomiocitos, las células musculares del corazón, que pierden su capacidad de conducción, de duplicación y, por ende, de contracción, así como su capacidad de regenerar el tejido dañado. Además, estos tratamientos se realizan mediante cirugías de alto riesgo y costosas; por ello se estudian tratamientos basados en bioingeniería.

La bioingeniería se puede aplicar utilizando ingeniería de tejidos donde se busca recuperar la estructura fisiológica del corazón, aplicando tratamientos que involucran el uso de trasplantes celulares o el uso de andamios como soporte de celular. El uso de células se conoce como cardiomioplastia celular donde se aplican células madre auto o heterogéneas que provocan su diferenciación a cardiomiocitos utilizando factores de crecimiento; estos han demostrado que pueden disminuir los síntomas, pero no la mortalidad debido a su baja retención y escasa viabilidad, como el uso de células pluripotentes que después de un tiempo presentan fallos cardíacos [8].

Por otro lado, existen estudios que utilizan biomateriales como andamios, vehículos extracelulares e hidrogeles que pueden biomimetizar el microambiente (bioquímico y biomecánico) y la arquitectura de la matriz extracelular [9]; estos materiales pueden tener diferentes estructuras como son las esponjas, películas, partículas [10] o fibras, todo estos con alta porosidad [11].

Dependiendo de la estructura estos andamios pueden mejorar la adherencia y proliferación celular, estas matrices pueden desarrollarse con escalas nanométricas debido a la mimética que se generan con la matriz extracelular que contiene fibras proteicas de escala nanométricas, esto lleva a crear materiales nanométricos que permitan controlar la densidad y distribución celular, además permiten el flujo de desechos y nutrientes celulares

Existen diferentes técnicas para desarrollar las membranas de nanofibras como la extrusión mecánica, extrusión en caliente, y electrohilado [12]. Esta última permite obtener fibras a escala micro y nanométrica y utilizar diferentes polímeros y solventes, que, junto con los componentes del equipo, determinarán la homogeneidad, el diámetro y las impurezas de las nanofibras. Además, el proceso de electrohilado permite obtener fibras a escala industrial.

Como se mencionó, se pueden utilizar diferentes polímeros en el electrohilado, incluidos los polímeros naturales; uno de los más utilizados es el colágeno, una proteína abundante en el cuerpo humano, ya que en él se encuentran 29 tipos de colágeno. En específico, en el corazón se encuentran los colágenos tipo I, III y V, que actúan como matriz extracelular entre los cardiomiocitos y los fibroblastos. Esto les confiere la característica de ser bioactivos, debido a la adhesión que puede generarse entre los fibroblastos y las moléculas conocidas como integrinas, que se activan en presencia del colágeno, lo que promueve la remodelación tisular; por otro lado, el colágeno también participa en el proceso de cicatrización.

Es por lo que algunos de estos biomateriales utilizados involucran el uso de colágeno para crear microambiente, retención celular y permitir aumentar el grosor de la cicatriz con tejido viable, sin embargo, a los 12 meses los pacientes pueden recaer después de este tratamiento [13].



Otros de los materiales estudiados involucran el uso de otros polímeros naturales (PNs) como el quitosano, gelatina, fibroina, alginato y ácido hialurónico, los cuales son biocompatibles y biodegradables; así como polímeros sintéticos por ejemplo el polietilenglicol, ácido polilactico, PLGA, PCL y PGS [14], [15], [16], [17], [18].

Estas bases poliméricas también se utilizan como matrices de factores de crecimiento tal es el caso del FSTl1 que permite la reconstrucción del miocardio aplicando el material en modo de parche que estimula la división de cardiomiocitos existentes [19], [20]

Por otro lado, la nueva generación de andamios inteligentes busca ser medio o matriz extracelular y tener control de actividades celulares, ser soporte en procesos de proliferación celular y promover especialización de tejidos [21]. Estos materiales se utilizan para crear andamios orgánico-inorgánicos conformados por refuerzos conductores y matrices poliméricas.

Estas matrices pueden ser de polímeros naturales o sintéticos como los que ya se mencionaron, mientras que los materiales conductores que se utilizan se basan en materiales de carbón (nanotubos de carbono y grafeno) [22] polímeros conductores (CPs), partículas metálicas y magnéticas.

Los CPs han demostrado ser biocompatibles [23], dentro de los más estudiados tenemos a la polianilina (Pani), polipirrol (Ppy [24], [25]), politiofeno (PTh) los cuales son utilizados debido a su estabilidad mecánica, tienen gran conductividad eléctrica y propiedades de oxido reducción. Sin embargo, pueden presentar toxicidad y no son biodegradables [26]. Los CPs son fáciles de procesar, y sus propiedades como la rugosidad, rigidez y superficie química se pueden controlar durante la síntesis

Con el fin de mejorar el efecto de adherencia celular se pueden funcionalizar estos CPs con proteínas naturales [11], o produciendo compósitos en conjunto con polímeros naturales que promuevan adhesión celular para poder ser utilizados en aplicaciones biomédicas [14], [18], [27], [28].

Los CPs han demostrado poder formar nanofibras utilizando electrohilado, dentro de los cuales se encuentra el Ppy, el cual es fácil de sintetizar, económico y biocompatible en bajas concentraciones [29], además permite la adherencia celular y diversos estudios han demostrado no generar reacciones de inflamación en tiempos prolongados, sin embargo, para mejorar sus propiedades mecánicas se utiliza juntos con otros polímeros como PEO [30], PLA y gelatina [31] o en algunos casos fibras coaxiales utilizando Ppy y poliacrilonitrilo (PAN) en el interior y glucosa como exterior [32].

Para el caso de Pani es un polímero fácil de sintetizar, económico y se ha demostrado ser estable y biocompatible pero citotóxica a altas concentraciones [33]. Sin embargo, presentar limitación en adherencia celular y se pierde conductividad en cultivo celular prolongado, además este CPs es biodegradable no presenta flexibilidad [34]. Es por eso que se busca utilizarlo en composito con polímeros naturales como por ejemplo gelatina, PLA, PLGA, y PCL, entre otros.

Los andamios sintetizados como nanofibras de Pani emplean electrohilado con agujas simples, como en los trabajos de Borriello et al. Quienes crearon un andamio conductor que promueve la diferenciación de células madre a cardiomiocitos [35]; así como el uso de agujas con estructura coaxial donde Pani puede estar en la coraza demostrando un aumento de la biocompatibilidad [36].



Sin embargo, se sigue estudiando el desarrollo de un biomaterial de alta biocompatibilidad, no inmunogénico con ninguna de las células involucradas (cardiomiocitos y fibroblastos), que refleje la morfología y funcionalidad de la matriz extracelular, sea mecánicamente estable, delgado y flexible, que tenga una cinética de degradación igual a la de formación del tejido que le permita el flujo de deshechos y nutrientes celulares con porosidades de 50 a 90%, además de ser conductores que puedan despolarizarse y repolarizarse al igual que las células marcapasos y cardiomiocitos [18].

La evaluación convencional de estos biomateriales abarca desde ensayos *in vitro* bidimensionales tradicionales hasta modelos *in vivo* de mayor complejidad. No obstante, para recrear con mayor fidelidad el microambiente nativo, ha surgido el uso de plataformas microfluídicas avanzadas denominadas Organ-on-a-Chip (OoC). En particular, los dispositivos Heart-on-a-Chip permiten monitorear *in situ* respuestas fisiológicas clave de los cardiomioblastos o cardiomiocitos [37], tales como la dinámica de contracción, la propagación de señales electrofisiológicas de conducción y el potencial de proliferación celular sobre la matriz [38], [39].

Aunque la integración de andamios poliméricos en estos microsistemas varía según el parámetro de interés, históricamente se ha priorizado el uso de hidrogeles debido a las dificultades técnicas inherentes al ensamblaje de membranas sólidas o nanofibrosas [40], [41]. Por ende, la optimización e incorporación directa de estas membranas dentro de dispositivos microfluídicos representa una frontera de desarrollo crucial para simular con mayor fidelidad el entorno biomecánico del tejido cardíaco.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Las muertes por cardiopatías son una de las principales causas de muerte a nivel mundial, se estima que 17.9 millones de vidas se pierden cada año; mientras que en México se reportan cerca de 220 mil de enfermedades al miocardio según el último reporte publicado en 2022 de la Secretaría de Salud México, de los cuales el 76.4% corresponden a 153 242 muertes por infarto al miocardio [42], [43], [44] . Estos datos pueden compararse con las muertes por otras enfermedades, como la diabetes (115 681 personas), por accidentes (37 438 personas) o por agresiones (32 223 personas).

Al ocurrir un ataque cardíaco se evalúa la gravedad para que posteriormente el paciente pueda ser tratado con medicamentos, o en caso de ser emergencia se interviene con cirugías como la ICP, CRM, implantes (desfibrilador o marcapasos) u oxigenoterapia [45]. Cada uno de estos tratamientos tiene costos de entre $100 a 160 mil MXN en el caso del stent, y de $50 a 150 mil MXN si se requiere realizar proceso de cateterismo o colocar un marcapasos [46], estos se llevan a cabo en su mayoría en el sector privado, sin embargo, el 60% de los pacientes no tiene los recursos suficientes para atenderse oportunamente [45].

A esto podemos agregar que en México alrededor del 80% de la población es de clase baja y media-baja (25 mil personas), donde su sueldo es de uno a tres salarios mínimos anuales [47], el cual no les permite pagar un tratamiento de los ya mencionados.

Por otro lado, se debe considerar la duración y efectividad de estos, porque alrededor del 50% de los pacientes muere en los primeros 5 años y solo el 37% sobrevive a los 10 años después de ser diagnosticados como recaídas con fallas cardíacas a pesar de utilizar algunos de estos tratamientos, ya que el corazón en la edad adulta se regenera muy lento y con limitaciones fisiológicas [48], [49], [50].



Por lo tanto, es necesario seguir desarrollando tratamientos personalizados que incrementen las oportunidades de supervivencia de los pacientes con recursos limitados. Por medio de dispositivos que evalúen todo el funcionamiento fisiológico del tejido cardíaco del paciente y constaten que el tratamiento será efectivo para él.

1.3 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Los tratamientos que actualmente se utilizan involucran mecanismos biofísicos para retomar el funcionamiento del corazón, sin embargo, la muerte por apoptosis o autofagia de los cardiomiocitos continúa después de la isquemia; esto lleva a recaídas de los pacientes en rangos de 3 a 36 meses después de una intervención invasiva [51], [52], y muertes del 45 a 50% de los pacientes entre 5 años después de la intervención [53].

Además, se considera que en un infarto se puede perder hasta el 25% del ventrículo derecho de 2-4 billones de cardiomiocitos [54], lo que representa de 1000 a 250 millones de cardiomiocitos muertos [55], lo que implica que la regeneración de cardiomiocitos del humano adulto no es eficiente ya que solo del 0.5 al 2 % de las células realizan duplicación celular en la zona afectada por un ataque cardíaco [56], y aun cuando algunos se logran duplicar pierden la capacidad de contracción y conducción del miocardio [55], [56].

De modo similar, ocurre que los nuevos tratamientos en estudio involucran el uso de células madre, cardiomiocitos y modificación genética tienen resultados de aceptación e integración del 10 al 15%, de los cuales solo el 1% logra eficiencias de 1 mes [57], [58]; mientras que, el implementar el uso de biomateriales se ha demostrado retenciones y eficiencias del 80% [57] pero aún con recaídas alrededor de a los 12 meses [13] de ser implementados en los pacientes y/o animales utilizados en los protocolos y estudios clínicos [59], [60], [61], pero estos implican el uso de biomateriales y células, lo que incrementa el costo. Estos resultados se deben a que a pesar del uso de biomateriales y células madre aún existen cardiomiocitos con alteraciones genéticas y en cantidad insuficiente para acondicionar el área afectada debido a las alteraciones en los canales iónicos, lo que hace que disminuya la función de estos y promueve la formación de tejido fibroso aislante [57] , lo que provoca que se pierda velocidad y orientación en las placas de las uniones gap (GJS) las cuales son las encargadas de comunicación eléctrica e intercambio intercelular de iones, y a su vez se relaciona con la rápida degradación y conducción deficiente del andamio que soporta a las células [34] lo que provoca que no se completen aproximadamente un billón de cardiomiocitos en buenas condiciones para regenerar la zona afectada [54].

Considerando estas últimas condiciones, se podría, mediante el uso de biomateriales en la zona isquémica, promover el reacondicionamiento de los cardiomiocitos mediante materiales que permitan el acceso a las condiciones necesarias para la estabilidad de los canales iónicos y, a su vez, la degradación lenta del biomaterial, hasta estabilizar las células y sus funciones de los canales iónicos y restablecer la comunicación eléctrica intercelular. Estos biomateriales pueden ser poliméricos naturales, sintéticos y/o conductores los cuales se utilizan como inyecciones de hidrogeles o parches [62], [63]; los nanobiomateriales prometen ser una alternativa que permitiría producir ese biocompósito con las propiedades necesarias para ser bioactivo y biofuncional, y de esta manera reacondicionar el miocardio afectado por isquemia [61], [64].

Para poder evaluar ese funcionamiento del biomaterial, es necesario obtener un sistema más complejo que las pruebas *in vitro* bidimensionales tradicionales, debido a la complejidad fisiológica del tejido cardíaco. Para ello, se desarrollan dispositivos Heart-on-a-chip que permiten realizar pruebas de la bioactividad y biofuncionalidad reconstruidas por estos biomateriales.



1.4 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.4.1 Fisiología y microambiente de las células cardíacas.

La sangre es bombeada por la contracción y relajación de las células del músculo cardíaco, llamadas cardiomiocitos. Su estructura interna los hace componentes electrofisiológicamente funcionales de los sistemas cardiovasculares, ya que el miocardio está constituido por alrededor del 30% de cardiomiocitos [65].

Estas células, a su vez, utilizan sus membranas y sus componentes para el traspaso de iones y la generación de potenciales de acción, que pueden actuar como una interfase dieléctrica y considerarse las dos placas de un condensador.

Las proteínas que componen la membrana y el conjunto de unión se dividen en dos, como se muestra en la Figura 1.1: proteínas de adhesión, como las cadherinas y los desmosomas (consideradas cadherinas desmosomales); y proteínas de conexión eléctrica, que incluyen las conexiones y las bombas de sodio-potasio (Na^+-K^+).

Las cadherinas y los desmosomas se encargan de la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular. Para mantener de esta manera la unidad de los cardiomiocitos.

Las uniones de conducción son llevadas a cabo por conexinas en la unión gap (GJS). Estas conexiones se conocen como proteínas Cx43, que se encuentran en mayor proporción en el miocardio, pero también se encuentran Cx30, Cx37, Cx40 y Cx45. A su vez, las conexiones se componen de moléculas de actina, una proteína con orientación alfa, que forman una cadena de triple hélice de actina, y de troponina, que se unen mediante tropomiosina; esta cadena se encuentra en la membrana de cada cardiomiocito, como se muestra en la Figura 1.2. Las actininas se unen a través de la miosina, una matriz semicristalina que forma decenas de miles de canales para el intercambio iónico y molecular.

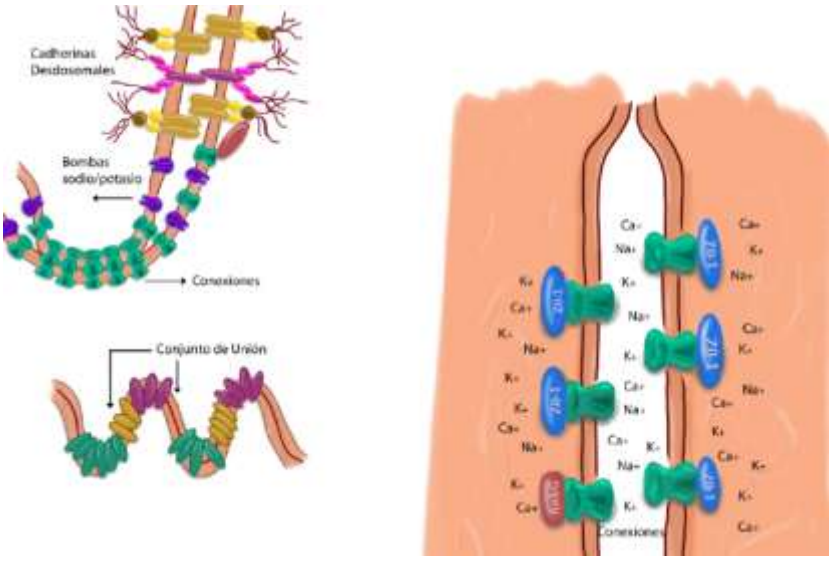


Figura 1.1. Glicoproteínas presentes en el complejo de unión entre los cardiomiocitos (modificado de (Vermij et al., 2017))



La miosina está conformada por 4 hélices de fibras oligomerizadas en canales hexaméricos. Estas cadenas se componen en sus extremos de grupos amino (-NH_2) y carboxilo (-COOH). Estos grupos permiten el paso de iones de Ca^{2+}, Na^{+}, péptidos, ARN mensajero, si-ARN y metabolitos [66], como se muestra en la Figura 1.3.

Estas matrices de miosina tienen un grosor de 2 a 3 nm, y considerando las actinas, el grosor es de aproximadamente 25 nm (Figura 1.2).

Una vez definidas estas glicoproteínas, el fenómeno de relajación dieléctrica en los tejidos se debe a la polarización de las membranas de los cardiomiocitos, en la que los dipolos y el movimiento de cargas generan la conducción. La membrana celular de los cardiomiocitos es la encargada de despolarizar los canales para regular la entrada y la salida de portadores de carga. La fuente de estos son los iones de sodio y de calcio presentes en el tejido cardíaco, e iones de potasio que se encuentran dentro de las células, mientras que los dipolos son moléculas polares del agua en los tejidos [67], [68].

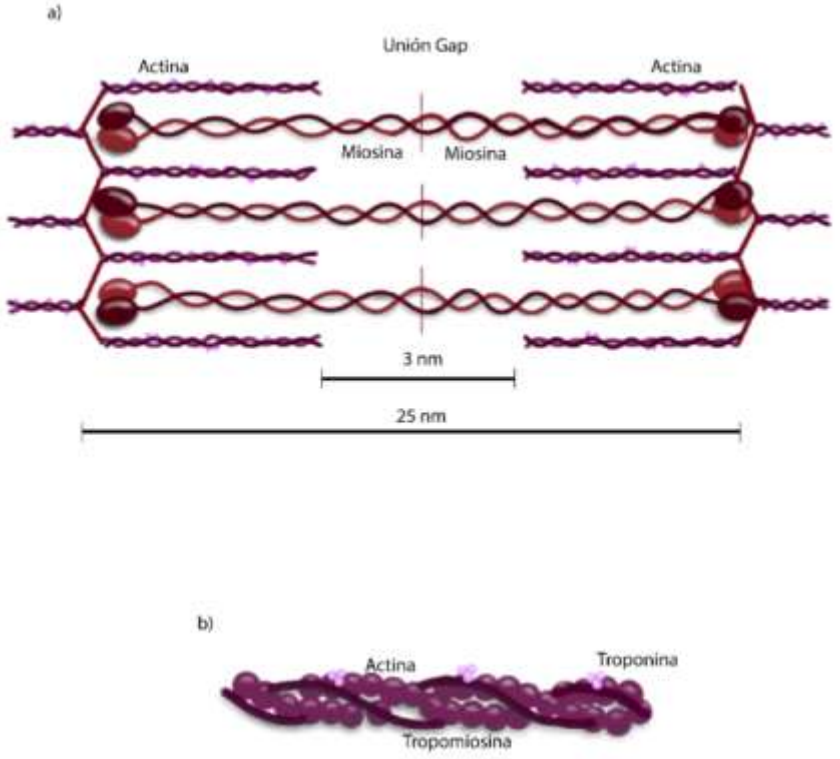


Figura 1.2. Matriz de actina y miosina.

El proceso de conducción y contracción comienza en las células marcapasos, encargadas de generar potenciales de acción y, posteriormente, de enviar la señal a los cardiomiocitos, como se muestra en la Figura 1.4. Los cardiomiocitos transfieren posteriormente la corriente a los fibroblastos para provocar la contracción y la relajación del tejido.

El proceso de conducción de los marcapasos se divide en 4 fases, como se muestra en la Figura 1.5 (línea roja). En este proceso ocurre una despolarización al salir los iones de Na^{+}, lo que provoca que los canales de $Ca2^{+}$ se



abran lentamente hasta alcanzar el punto de equilibrio (0 mV). Posteriormente, las células se repolarizan, lo que provoca el cierre de los canales de Ca^{2+} y de K^{+}, hasta alcanzar el umbral de -60 mV y reiniciar el proceso.

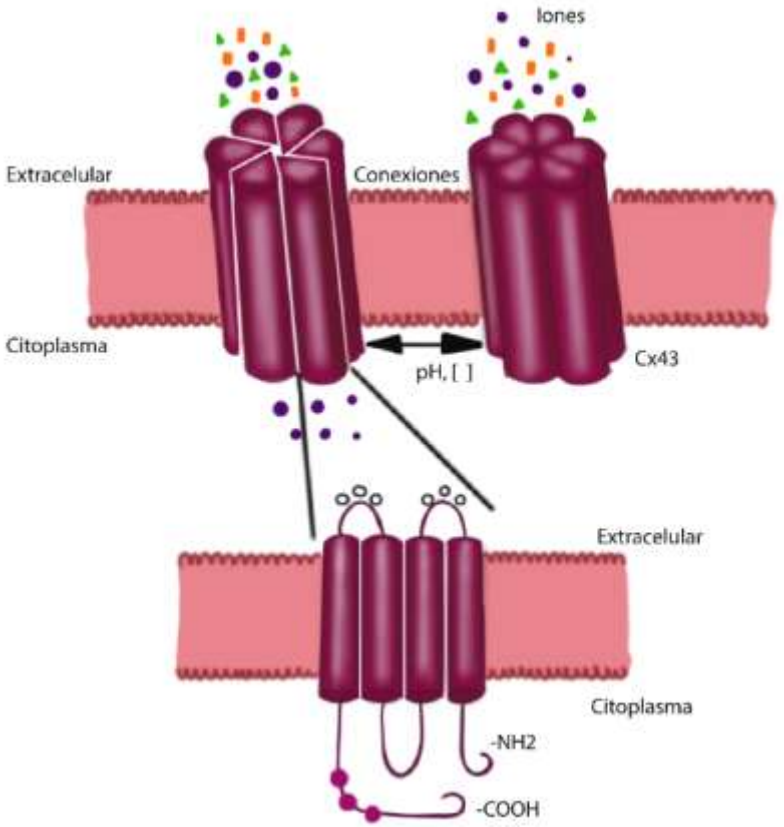


Figura 1.3. Estructura de hélices oligomerizadas de las conexiones (modificada de (Vermij et al., 2017))

Esta corriente es transmitida a los cardiomiocitos, en los cuales el potencial de acción se lleva a cabo en 5 fases como se muestra en la Figura 1.5 línea azul: comienzan con la despolarización de manera rápida para le entrada de Na^{+} a la célula y se liberan Ca^{2+} lo cual se mantiene como un periodo efectivo refractario, en este punto ocurre la contracción, posteriormente se balancea el flujo de k^{+} para repolarizarse y salgan de la célula [68].

Para determinar la conducción de los cardiomiocitos existen diferentes métodos, uno de ellos involucra el uso de la Ecuación (1) para explicar el potencial transmembrana (V_m) relacionado con la corriente total (I_{ion}); donde *Cm* es la capacitancia de la membrana (1 µf/cm^2) por la separación de las capas lipídicas.

$$\frac{dV_m}{dt} = -\frac{1}{C_m} * I_{ion}$$ *Ecuación 1. Potencial transmembrana.*

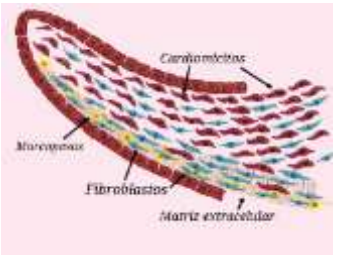


Figura 1.4. Conjunto de células presentes en el miocardio (extraído de (Vermij et al., 2017)).

Esta ecuación permite observar los cambios en el desplazamiento de cargas en la capacitancia de la membrana celular debido al movimiento de iones a través de ella. I_{ion} representa la suma total de los movimientos del conjunto de canales iónicos y bombas.

Una corriente I_{ion} negativa implica un flujo positivo al interior de la célula, el cual produce un diferencial de voltaje positivo que eleva el potencial de la membrana, es decir, la despolariza. Mientras que una corriente positiva indica un flujo positivo hacia fuera de la célula y reduce el potencial al generar un diferencial de voltaje negativo, es decir, se repolariza.

Una vez que se mueve hacia el interior la corriente de sodio I_{Na} que despolariza la membrana muy rápido ($\frac{dV_m}{dt} = 393\ V/s$) y genera una capacitancia de -391 $\mu A/\mu F$ en 1 ms, para inactivarse el flujo de Na^+. Cuando el V_m llega a -25 mV la corriente de calcio (I_{Ca}) se activa la despolarización que soporta el potencial de acción para posteriormente repolarizar y se mueva al interior la corriente de potasio I_K, tanto de manera lenta como rápida [69].

El intercambio de sodio/calcio es un proceso electrogénico con una relación estequiométrica de 3 Na:1 Ca. Estos iones se encuentran presentes en la matriz extracelular, en los espacios intercelulares. Esta matriz genera el ambiente necesario para promover la estabilidad del tejido. En el miocardio, las células están sostenidas por una matriz extracelular, que promueve la adhesión y migración celulares, así como la proliferación y el intercambio de iones. Esta estructura está conformada por proteínas fibrosas como el colágeno y la elastina, cuyos tamaños van de algunos nanómetros a micrómetros. La matriz extracelular contribuye a la deformación durante el ciclo cardíaco, así como en mantener la forma, grosor y rigidez del miocardio [70].

Esta matriz extracelular está constituida por colágeno, en específico, los tipos I, III y V de los 29 tipos existentes en el cuerpo humano, constituida por alrededor del 75 al 80% de fibras de tipo I, y el resto de colágeno tipo V (15%) y tipo III (5%), el último como unión de I-V.

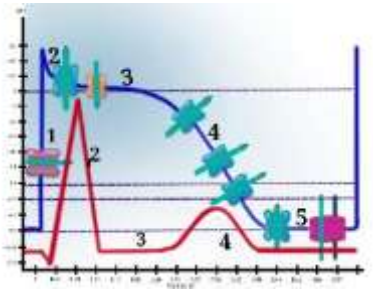


Figura 1.5. Señales de potenciales de acción en células cardíacas.



1.4.2 Ingeniería de tejidos y Biomateriales

La ingeniería de tejidos busca desarrollar sustitutos biológicos que restauren la función del miocardio dañado. El diseño de estos sustitutos depende de la selección de un andamio (scaffold) que imite la matriz extracelular (MEC) nativa.

1.4.2.1 Polímeros naturales

El miocardio está compuesto de colágeno, y como ya se mencionó el colágeno tipo I se encuentra presente, entre un 75-85% en forma fibrilar y no fibrilar, la primera como soporte y la segunda como unión a la membrana celular [71]. El colágeno es el polímero más abundante del cuerpo humano porque componen diversas estructuras de los organismos como los tendones, huesos, piel, ligamentos, cartílago y compone la matriz extracelular [72].

El colágeno tipo I consta de una triple hélice formada por 2 cadenas poliméricas tipo α y 1 β, mientras que el tipo III consta de 3 cadenas α y el tipo V de 3 cadenas β (Figura 1.6). El monómero de colágeno consta de tres aminoácidos; el principal es la glicina (Gly-X-Y), donde X puede ser prolina y Y corresponde al hidróxido de X, que sería hidroxiprolina. X y Y varían entre tipos de colágeno [73].

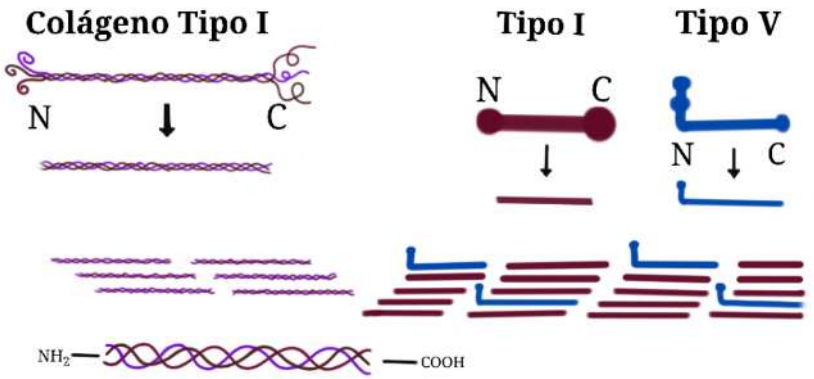


Figura 1.6. Estructura de colágeno (modificado de (Gelse et al., 2003))

Estos aminoácidos le permiten unirse a la matriz extracelular y a otras células. El dominio de la triple hélice de colágeno (tipo I, II y III) tiene una longitud de 300 nm a la cual corresponden alrededor de 1000 aminoácidos [74], [75].

El colágeno tiene propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad, bioactividad y biofuncionalidad que le confieren adhesión y viabilidad celular, lo que lo convierte en un biomaterial investigado en la ingeniería de tejidos y en el ámbito médico.

Por otro lado, el colágeno puede obtenerse de fuentes naturales, como tendones, patas de pollo o colas de rata, pero también puede producirse sintéticamente. Existen diferentes procesos de extracción del colágeno, como el



método de hidrólisis alcalina (Mamani Huamán, 2018) y el método enzimático, que utiliza pepsina; en conjunto, se lleva a cabo la purificación con sales, la cual depende del tipo de colágeno a precipitar [76].

Por ello, se recomienda y se estudia el uso del colágeno como andamio en la ingeniería de tejidos para soportar a las células y permitir que estas se adhieran y, posteriormente, degradarlo para construir su propia matriz extracelular. Sin embargo, para mejorar sus propiedades como andamio se utiliza el colágeno como compósito con otros polímeros como pueden ser el PVA, PLA, AH, y quitosano. Este último permite mejorar su capacidad de adhesión celular, añade propiedades antibacterianas al compósito y mejora la aceptación por el sistema inmune, además de aumentar su viscosidad para poder ser electrohilado.

Aplicar andamios de colágeno para ingeniería de tejidos involucra el uso de solventes como 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP), 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), tetrafluoroacético (TFA); sin embargo, pueden tener resultados citotóxicos, por eso se ha estudiado el uso de ácido acético, etanol o solución buffer de fosfato para disminuir la citotoxicidad de los solventes y permitir su procesamiento en diferentes morfologías.

1.4.2.2 Polímeros conductores

Dado que el corazón es un órgano electroactivo, los andamios aislantes convencionales pueden impedir la propagación del impulso eléctrico. Los polímeros sintéticos pueden utilizarse por sus propiedades, como la conductividad y la biocompatibilidad; algunos ejemplos son el polipirrol y la polianilina. Estos polímeros tienen electrones conjugados que permiten sus propiedades eléctricas por lo que son utilizados en estudios de tejido cardíaco o neuronal [34].

El polipirrol es antimicrobiano y posee propiedades antioxidantes debido a su estructura, compuesta por monómeros heterocíclicos unidos en las posiciones 2 y 5, como se muestra en la Figura 1.7. Esta estructura presenta enlaces simples y triples entre átomos de carbono hibridados sp2, lo que le confiere una banda prohibida de 4 eV. Sin embargo, se dopa para disminuir la banda a valores menores de 2.5 eV y así convertirlo en semiconductor [77].

Se considera que la transferencia de carga en polipirrol dopado como, debido a la carga móvil que genera polarones y bipolarones en estados no degenerados como en la Figura 1.7 línea guinda [78].

El polipirrol puede obtenerse en diferentes estructuras como nanofibras, nanoesferas, nanoajugas, entre otras, dependiendo de la aplicación, y se logran modificando los aditivos, el pH, medio, relación y temperatura [79].

Mientras que la polianilina tiene propiedades térmicas, ópticas, antibacterianas, biocompatibilidad, es fácil de sintetizar y económica, además, permite el intercambio iónico por medio de sus grupos nitrógenos en los anillos fenilenos; sin embargo, aún hay discusiones respecto a su biodegradabilidad. Este polímero puede tener tres estructuras electrónicas qué le otorgan propiedades diferentes de conductividad, la más utilizada es la emeraldina qué se observa en la Figura 1.7 molécula verde, tienen una protonación en el grupo amina para generar bipolarones, qué son parcialmente oxidados y reducida, en una relación 1:1, esta sal es conductora a diferencia de las otras estructuras que involucran a la leucoemeraldina completamente reducida y la pernigranilina qué es completamente oxidada, las cuales no son conductoras [77].



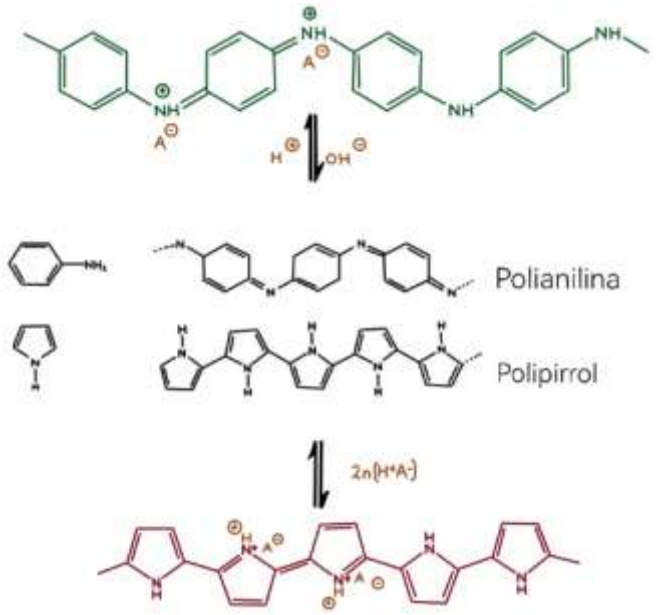


Figura 1.7. Estructura molecular de polipirrol y polianilina (modificado de (Zare et al., 2021)

Estos polímeros suelen mezclarse junto con otros polímeros como la gelatina, ácido poliláctico, policaprolactona, ácido hialurónico [80], [81].

1.4.2.3 Síntesis de nanoestructuras

Los biomateriales utilizados como andamios requieren características como alta porosidad, que les permita soportar a las células y la difusión de nutrientes y desechos, pero no tan alta como para no perder propiedades mecánicas. El tamaño de los poros debe estar relacionado con el tipo de células que se requieren, ya sea células madre o especializadas. Por otro lado, el andamio debe tener el grosor necesario para soportar el tejido dañado sin afectar sus propiedades mecánicas; esto, a su vez, se relaciona con un alto área superficial que permita la adhesión de las células.

Los materiales que pueden tener estas propiedades son materiales nanométricos y, entre ellos, tenemos las nanofibras, debido a su alta relación superficie-volumen, que favorece el ambiente para el crecimiento y desarrollo de células en la regeneración de tejidos.

Estas morfologías pueden generarse durante el proceso de polimerización de los componentes; esto puede realizarse mediante técnicas electroquímicas que no requieren agentes oxidantes y pueden utilizar 2 o 3 electrodos. En el caso del Ppy se basa en la oxidación anódica de un monómero en medio acuoso o no acuoso; esto permite la formación de películas en la superficie del electrodo utilizando voltamperometría cíclica, potenciostato o galvanostato. Estas técnicas permiten controlar el grosor, el radio, la morfología y las propiedades del polipirrol. Sin embargo, existen dificultades como el escalamiento y el uso de ciertos solventes como el cloroformo y diclorometano, los cuales tienen efectos citotóxicos [77].



La Pani puede sintetizarse utilizando dimetilformamida (DMF) con un electrodo de trabajo de grafeno y un electrodo de referencia de cobre, se puede realizar por voltamperometría cíclica con un potencial de 20 a 50 mV/s con un rango de – 0.2 a +1.0 V. Mientras que, en síntesis, con potenciostato el potencial se mantiene estable. La oxidación puede llevarse a cabo durante la polimerización; los aniones ácidos participan en la formación de los cationes de anilina [82].

Por otro lado, se pueden generar las fibras una vez polimerizado los monómeros, con técnicas como pueden ser la extrusión mecánica, extrusión en caliente, y electrohilado [12], [83]. Esta última consiste en aplicar un alto voltaje a una solución polimérica, esto produce un campo eléctrico que permite orientación de las cadenas poliméricas y esto a su vez la repulsión de cargas de la molécula hasta formar al conocido cono de Taylor, en el cual se logra romper la tensión superficial de la solución y se generan las fibras con diámetros del orden de micro y nanómetros [84].

La técnica de electrohilado permite la variación de cada uno de sus componentes del equipo que consisten en la intensidad del voltaje, la velocidad de flujo, la distancia entre la aguja y el recolector, el tipo de recolector, como se observan en la Figura 1.8 y la forma de la aguja; así como condiciones de la solución que implica el tipo de polímero, concentración, viscosidad, conductividad y tensión superficial; existen parámetros difíciles de controlar como es la temperatura y humedad que pueden limitar la formación y morfología de las mismas [12], [84]. Todos estos parámetros y condiciones afectan el diámetro y homogeneidad de las fibras.

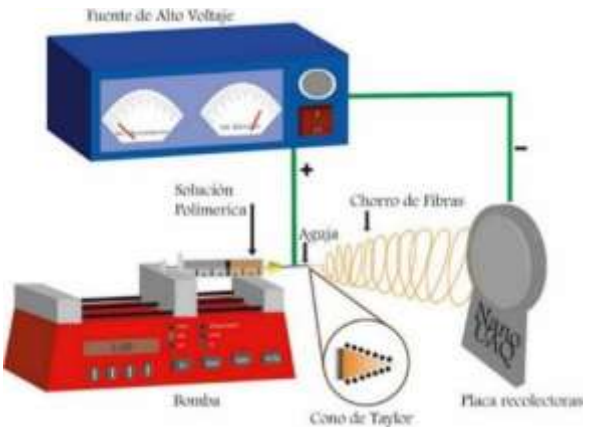


Figura 1.8. Esquema del funcionamiento del electrohilado (modificado de Long et al., 2018).

Modificar la jeringa a un sistema coaxial permite crear fibras de estructura core-shell para mejorar el electrohilado de algún polímero o generar fibras huecas al eliminar uno de los componentes. La aguja coaxial consiste en dos cilindros de diferentes diámetros, uno alrededor del otro, esto permite que ambas soluciones poliméricas se electrohilén al mismo tiempo produciendo una fibra delgada y otra más gruesa alrededor [85]. Por ejemplo, en los diseños se puede colocar CPs de manera interna y de recubierto a PNs, o de manera contraria [23].



1.4.3 Propiedades fisicoquímicas y eléctricas de nanofibras biocompatibles

Estas nanofibras de PNs y CPs deben tener la capacidad de conducir electricidad, es decir, la propiedad física que describe hasta qué punto una sustancia conduce la corriente eléctrica. Esto se debe al desplazamiento de los electrones externos del material (portadores de carga); la conductividad se mide a través de la resistencia de un material a una corriente eléctrica.

La conductividad se mide en siemens por metro (S/m) y se aplica la Ecuación 2. Estos materiales conductores deben dar valores de conducción de $1x10^{-3}$ S/cm para poder actuar en el miocardio.

$$\sigma = \frac{Gl}{A} = \frac{(Conductancia)(Distancia)}{Área}$$

Ecuación 2. Conductividad eléctrica.

La conducción de los materiales promueve cambios en el potencial de acción en las membranas celulares a lo largo de su superficie. Estos desplazamientos relativos de cargas se deben al ingreso de iones de Na^+ y Ca^{2+} que provocan un voltaje positivo o negativo para regular los canales de las bombas sodio-potasio.

Esta diferencia de potencial eléctrico se genera entre electrodos, considerando un electrodo dentro de la célula y otro en el exterior, lo que genera un gradiente electropotencial que permite el flujo y la distribución de iones.

Estos potenciales de acción pueden generar señales bioeléctricas como resultado de la actividad eléctrica de las células del sistema de conducción cardíaca. En condiciones normales, el corazón sigue un patrón de actividad eléctrica específico que se repite con cada latido; este patrón puede observarse en un electrocardiograma, que se representa mediante diferentes ondas y segmentos. La forma de la onda está compuesta por tres secciones: la primera es la onda P, que representa la despolarización de las aurículas; el complejo QRS se compone de tres ondas; la forma y duración proporcionan información sobre la conducción eléctrica del tejido; y la onda T implica la repolarización de los ventrículos, y la transición de la onda S a la T puede presentar cambios, lo que indica daños en el tejido cardíaco.

1.4.3.1 Conducción en los polímeros conductores

Los sistemas utilizados como andamios con propiedades de conducción se consideran pseudocapacitores, dispositivos de almacenamiento de energía que emplean un material electroactivo como electrodo, lo que les permite almacenar energía adicional mediante un proceso electroquímico.

Estos materiales electroactivos pueden almacenar y liberar energía eléctrica cuando sea necesario, esto se puede llevar a cabo a través de reacciones de óxido-reducción en la superficie del electrodo. Estos electrodos pueden ser de estado sólido debido a que estos materiales conducen iones en estado sólido; no hay necesidad de un líquido o gel para transportarlos. Estos ocurren por la absorción en la superficie de los electrodos debido a la interacción entre los iones y las moléculas presentes en el ambiente circundante [86].

Los materiales conductores empleados en estos electrodos suelen presentar una superficie porosa o rugosa, lo que aumenta su área superficial y proporciona más sitios de adsorción. Durante la absorción, los iones pueden unirse a los sitios activos mediante procesos como la adsorción química o la difusión superficial. En la adsorción química,



los iones se unen a la superficie del electrodo mediante enlaces químicos fuertes, lo que genera una fuerte interacción entre el electrodo y los iones. En la difusión superficial, los iones se mueven a través de la superficie del electrodo y pueden quedar temporalmente retenidos en defectos o vacantes superficiales antes de ser liberados nuevamente al electrolito. En este proceso los iones o átomos se adhieren a la superficie y ocupan sitios específicos en la estructura cristalina o en los defectos superficiales del electrodo. Para liberarse, los iones pueden hacerlo por el aumento de su concentración en el electrolito o por un cambio en el potencial eléctrico del electrodo [87].

1.4.3.2 Medición de impedancia

Existen diversos métodos para la medición de la impedancia eléctrica de los tejidos donde se utilizan: dos electrodos (bipolar), cuatro electrodos (tetrapolar), y una variable de tres electrodos. Dependiendo del tejido que se desea medir será el método utilizado, en el caso del tejido cardíaco se utiliza el arreglo de cuatro electrodos [88].

El método de cuatro electrodos (4EM) consiste en aplicar una corriente (l_0) a través de dos electrodos y detectar la tensión en los otros dos electrodos distintos. Esto consigue eliminar la impedancia de los electrodos, pero se requiere que los electrodos tengan una impedancia pequeña en comparación con la impedancia de entrada del circuito utilizado para detectar la tensión V_0 y no provoquen una saturación de los circuitos que inyectan la corriente (l_0).

1.4.4 Evaluación de la interacción célula-material

Es importante evaluar la respuesta biológica de un material en pruebas *in vitro* y estas involucran diferentes procedimientos que incluyen la extracción de un cultivo primario o el descongelamiento de células en criogenia.

1.4.4.1 Modelos de cultivo celular in vitro

Se extraen los tubos criogénicos del ultracongelador, se atempera el vial de criogénico, la alícuota se centrifuga para remover el sobrenadante. Mientras que el pellet es resuspendido en medio DMEM suplementado y transferido a un frasco T para mantenerlo incubado a 37°C en oscuridad.

Cuando se observa una confluencia de alrededor del 80%, se retira el medio de cultivo mediante precipitación o extracción y, posteriormente, se realizan lavados con PBS. Después de retirar el medio de cultivo del segundo lavado, se agrega tripsina y se deja incubar por 5 min. Pasado el tiempo, se agrega medio suplementado para inactivar la enzima (se resuspendió la solución para asegurar la inactivación), enseguida se centrifuga a 1500 rpm por 5 minutos.

El pellet es resuspendido en 1 ml de medio para el conteo de células en el hemocitómetro. El resto de las células se disuelven dependiendo de la densidad celular necesaria para cada experimento. Del mismo modo, se toma una alícuota para volver a sembrar células en frasco T y continuar la línea celular.



1.4.4.2 Cinética de viabilidad y citotoxicidad

Para poder considerar que un biomaterial es biocompatible, se debe evaluar su interacción directa con células, para ello se pueden realizar experimentos de viabilidad celular o citotoxicidad. La viabilidad celular consiste en identificar la cantidad de células vivas después de la interacción con un principio activo o biomaterial, conociendo la cantidad de células totales que deberían estar vivas de un control donde las células se mantienen bajo las condiciones estándar de cultivo. Entre los ensayos más utilizados se encuentran el MTT, el azul alamar y el cristal violeta.

1.4.4.3 Marcadores proteicos y técnicas de inmunocitoquímica

Dentro de técnicas de evaluación inmunológica para la producción de proteínas especificas existen: inmunohistoquímica (IHC) e inmunocitoquíca (ICC), en las cuales existen diferencias respecto a la preparación de las muestras, la primera involucra procesar histológicamente la muestra en secciones muy delgadas y se exponen a enzimas que tiñen el producto de la catalización para identificar los sitios con antígenos en la muestra; mientras que en ICC la muestra se realiza sobre monocapas de células o una suspensión celular y en cultivo celular se realiza la deposición de las enzimas. La técnica de inmunocitoquímica permite visualizar la expresión de marcadores particulares en un cultivo celular bajo condiciones específicas [88].

1.4.5 Sistemas Organ-on-a-chip

Un sistema "*organ-on-a-chip*" (órgano en un chip) es una tecnología de microfluídica que se utiliza para replicar y estudiar las funciones de órganos humanos o de tejidos específicos en un entorno *in vitro* a escala microscópica. Estos dispositivos microfluídicos imitan las funciones y estructuras de los órganos humanos, lo que permite la investigación y el desarrollo de fármacos de una manera más precisa y eficiente que los métodos tradicionales [89], [90].

Un sistema *organ-on-a-chip* (OoC) se asemeja a un pequeño chip o dispositivo, generalmente del tamaño de una tarjeta. Cada dispositivo está diseñado para replicar la estructura y función de un órgano o tejido específico, como un hígado, riñón, corazón, pulmón o incluso barreras hematotisulares como el intestino o la barrera hematoencefálica.

Estos dispositivos incluyen células humanas o animales vivas, que se cultivan en un entorno tridimensional que imita el tejido del órgano en cuestión. Esto permite estudiar cómo las células interactúan y funcionan en condiciones similares a las del cuerpo humano.

Los sistemas OoC emplean microcanales y microbombas para controlar el flujo de líquidos y nutrientes a través de las células, lo que simula la circulación sanguínea y otros procesos biológicos clave. Las ventajas que ofrece



este tipo de sistemas: los sensores incorporados en estos chips pueden medir una variedad de parámetros, como la función celular, la liberación de biomarcadores, la toxicidad de los fármacos y otros indicadores relevantes. Esto permite el monitoreo en tiempo real de la respuesta del órgano o tejido al tratamiento o las condiciones experimentales [91].

1.4.5.1 Microfabricación y plataformas de microfluídica

La microfabricación de sistemas *OoC* se deriva de las técnicas empleadas en la industria de los semiconductores, adaptadas a materiales biocompatibles. La técnica predominante es la litografía blanda (soft lithography), que utiliza elastómeros como el polidimetilsiloxano (PDMS) debido a su alta permeabilidad al oxígeno, su transparencia óptica para la microscopía y su facilidad de moldeo a microescala.

El proceso general implica [89]:

1. Diseño de fotomáscaras: Creación de patrones geométricos con software CAD.
2. Fotolitografía: Exposición de una resina fotosensible (como tipo ABS) a la luz UV a través de una máscara para crear un "negativo" o molde con relieve.
3. Vaciado de PDMS: El elastómero se vierte sobre el molde, se cura térmicamente y se sella mediante activación por plasma de oxígeno sobre un sustrato de vidrio o sobre el propio polímero, formando canales cerrados.

Estas plataformas permiten el control de flujos laminares (número de Reynolds bajo, $Re < 2300$), lo que facilita la entrega precisa de nutrientes, fármacos o señales químicas, emulando la perfusión capilar del miocardio.

1.4.5.2 Integración de sensores para análisis en tiempo real

Para que un dispositivo OoC funcione como una herramienta de diagnóstico robusta, debe integrar sensores que permitan un monitoreo no invasivo y continuo. En el caso del tejido cardíaco, la integración se enfoca en dos parámetros críticos [92]:

- Sensores electroquímicos: Se integran microelectrodos de oro, platino o de materiales conductores (como los mencionados Ppy/Pani) en el fondo de los microcanales.
- Espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS): es posible medir la resistencia de la monocapa celular. Un aumento de la resistencia indica la formación de un tejido denso y funcional (confluencia), mientras que una disminución puede indicar citotoxicidad o desprendimiento celular.
- Sensores de tensión mecánica: Utilizan la deformación de membranas flexibles o el desplazamiento de micropilares para calcular, en tiempo real, la fuerza de contracción de los cardiomiocitos, traduciendo la energía mecánica en señales eléctricas o cambios ópticos medibles.



Esta capacidad de monitoreo *in situ* elimina la necesidad de detener el experimento para realizar tinciones terminales, lo que permite llevar a cabo estudios de toxicidad crónica a largo plazo.

1.4.5.3 Electroestimulación en dispositivos Organ on a chip

El miocardio es un tejido cuya maduración funcional depende críticamente de estímulos externos. Los cardiomiocitos cultivados en condiciones estáticas suelen presentar una morfología inmadura (redondeada) y una expresión limitada de proteínas contráctiles. La electroestimulación dentro del chip actúa como un "marcapasos artificial" que induce los siguientes efectos:

1. Alineación celular: Los pulsos eléctricos orientan las miofibrillas de actina y miosina en la dirección del campo eléctrico, lo que aumenta la anisotropía del tejido.
2. Maduración del acoplamiento excitación-contracción: Se observa un incremento en la expresión de la conexina Cx43 y una mejora en la regulación del calcio intracelular (cinética de los transitorios de Ca^{2+}).
3. Sincronización: Permite que todas las células del andamio se contraigan de forma rítmica y uniforme, imitando la sístole y la diástole fisiológicas.

Los parámetros típicos de estimulación en estos dispositivos consisten en pulsos bipolares o rectangulares con frecuencias de 1 a 2 Hz y campos eléctricos de 1 a 5 V/cm, transmitidos a través de los polímeros conductores o de los electrodos integrados en la arquitectura del chip [93], [94], [95].



1.5 HIPÓTESIS

El cultivo de células cardíacas puede lograrse en un sistema organ-on-a-chip mediante la interacción con nanosistemas poliméricos biofuncionales que posean propiedades conductoras, biodegradabilidad y potencial bioactivo, para promover la formación de una cantidad adecuada de cardiomiocitos, lo que permitirá restablecer el intercambio iónico entre estas células y favorecer un funcionamiento cardíaco normal.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo general:

Demostrar que el cultivo sobre el nanosistema polimérico biofuncional permite obtener cardiomiocitos suficientes que realicen intercambio iónico para el funcionamiento adecuado del tejido en un Organ-on-a-Chip.

1.6.2 Objetivos particulares

1. Obtener los sistemas nanoestructurados por la técnica de electrohilado y electroquímica utilizando colágeno/quitosano y polipirrol, y caracterizar de manera fisicoquímica, mecánica y su conducción eléctrica e iónica tanto en seco como en fluido simulado.
2. Reacondicionar la zona afectada mediante la integración del nanosistema polimérico biofuncional en pruebas *in vitro* con una línea celular de cardiomiocitos.
3. Desarrollar una plataforma organ-on-a-chip para manipular tejido cardíaco.
4. Comparar el funcionamiento del dispositivo con el de sistemas de cultivo convencionales 2D y con el del nanosistema de polímero biofuncional.



Capítulo 2. SISTEMAS NANOESTRUCTURADOS

En este capítulo se habla de la síntesis del nanosistema polimérico biofuncional, produciendo una membrana mediante la técnica de electrohilado. El cual consiste en usar la mezcla de polímeros conductores y naturales para hilarla con una aguja simple, así como emplear una aguja coaxial para obtener fibras core-shell.

2.1 METODOLOGÍA

2.1.1 Nanosistema polimérico biofuncional

2.1.1.1 Síntesis de nanosistema nanoestructurado polimérico biofuncional

2.1.1.1.1 Soluciones de polímeros naturales

En un matraz volumétrico se añadió una solución buffer de fosfato (PBS) y etanol (EtOH) en relación 3:1 para disolver colágeno (Coll) con agitación mecánica por 24 h, mientras que el quitosano (Ch) se disolverá por separado en ácido acético con agitación magnética a temperatura ambiente por 24 h, para posteriormente mezclarse ambas soluciones mencionadas en una relación 4:1 (Coll-Ch) con agitación mecánica por 1 h [96].

2.1.1.1.2 Soluciones de polímeros conductores

Por otro lado, las soluciones de polímeros conductores (Ppy y Pani) se disolvieron en concentraciones de 0.5 % p/v utilizando como disolvente a N,N-dimetilformamida (DMF) [97], [98]. Previamente, se sintetizaron de la siguiente manera.

2.1.1.1.2.1 Síntesis de Ppy

La polimerización del PPy se llevó a cabo mediante la preparación de una solución homogénea compuesta por el monómero de pirrol, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y dodecilsulfato de sodio (SDS), y se utilizó ultrasonación para asegurar su dispersión completa. Posteriormente, se adicionó, gota a gota, una solución de cloruro férrico ($FeCl_3$) como agente oxidante para iniciar la reacción. La mezcla reactiva se mantuvo bajo agitación magnética constante durante 24 h. Concluido este periodo, el polímero sintetizado se purificó mediante lavados exhaustivos con agua desionizada y etanol, con el fin de eliminar residuos del monómero no reaccionado, oligómeros y trazas de tensioactivos [99].



2.1.1.1.2.2 Síntesis de Pani

La síntesis de polianilina (Pani) se realizó mediante polimerización oxidativa en medio ácido, empleando una solución acuosa que contenía $FeCl_3$ 0.055 M y ácido clorhídrico 0.5 M. Se adicionó el monómero de anilina en presencia de los agentes tensioactivos CTAB y SDS, y se sometió la suspensión a agitación constante hasta lograr su homogeneización completa. A continuación, se añadió gota a gota una solución de persulfato de amonio (APS) para catalizar la polimerización. La reacción se mantuvo en agitación magnética continua durante 24 h; posteriormente, el precipitado obtenido se lavó minuciosamente con agua desionizada y etanol para eliminar impurezas y residuos de surfactante [99].

2.1.1.1.3 Electrohilado

El proceso de electrohilado consiste en emplear dos configuraciones para obtener el biocompósito: la primera, la mezcla de polímeros; y la segunda, la estructura de agujas en core-shell.

Para la configuración simple, una vez obtenidas las soluciones por separado, se mezclaron en proporción 1:1 y se colocaron en una jeringa con una aguja simple de 22 G, procurando que cada una de las capas de nanofibras fuera de las mezclas mencionadas.

Mientras que, el sistema coaxial implica una aguja compuesta de dos agujas, la aguja interna de 28 a 26 g y la externa de 22 a 18 g, donde de manera interna se encontrará el CP y en la capa externa la mezcla de C-Ch [100]

Una vez obtenidas las soluciones, se colocarán en el equipo de electrohilado, modificando la aguja entre simple y coaxial, y las condiciones serán: un campo eléctrico de 15 a 22 kV, flujos de 0.1 – 1.0 ml/h y distancias de 8 a 15 cm.

Finalmente se procede a secar la membrana a 50 °C por una noche, para remover restos de agua y ácido acético del proceso de electrohilado [101].

2.1.1.2 Síntesis de nanosistema nanoestructurado polimérico biofuncional entrecruzado

2.1.1.2.1 Entrecruzamiento por base de Schiff con glutaraldehído

Se disolvió Ch de peso molecular medio a 0.4 % en ácido acético 0.4 M y se añadió el polímero conductor en relación molar:

Ppy: 0.1206 g, por una relación molar de 1:1 (Ch:Ppy)

Pani: 1.3248 g, por una relación molar de 2:3 (Ch:Pani)



Cada solución se dejó en agitación magnética por 1 h, a 50 °C. Posteriormente se agregó glutaraldehído (GTA) considerando las concentraciones de:

Tabla 1. Concentraciones de GTA para el entrecruzamiento de Ch y de polímeros conductores.

Solución	GTA (µL/ml)	GTA (µM)	GTA (%)
Ch-Ppy 0.8	0.8	25	0.008
Ch-Ppy 1.7	1.7	50	0.017
Ch-Ppy 3.4	3.4	100	0.034
Ch-Pani 2.5	2.5	100	0.025
Ch-Pani 3.4	3.4	200	0.034
Ch-Pani 5.2	5.2	300	0.052

A partir de las concentraciones de polímeros conductores, se prepararon mezclas de Ch-Coll en las relaciones molares 1:4 y 1:3 de Ch a 0.4 % y Coll a 480 mg/ml.

Tabla 2. Concentraciones de las soluciones de Ch y Coll entrecruzadas con GTA.

Solución	GTA (µL/ml)	GTA (µM)	GTA (%)
Ch-Coll 0.8	0.8	90	0.008
Ch-Coll 1.7	1.7	180	0.017
Ch-Coll 2.5	2.5	180	0.025
Ch-Coll 2.8	2.8	200	0.028
Ch-Coll 3.4	3.4	245	0.034
Ch-Coll 5.2	5.2	375	0.052

2.1.1.2.2 Electrohilado

Una vez obtenidas las soluciones entrecruzadas, se mezclaron con DMF en proporción 1:1. Estas soluciones se colocaron en una jeringa con aguja de 21 G.

Las condiciones del equipo se fijaron a 12 cm entre la aguja y el recolector; el flujo se varió entre 0.1 y 0.3 ml/h, con voltajes de 18 a 24 kV.

2.1.2 Caracterización fisicoquímica

2.1.2.1 Microscopía electrónica de barrido



El análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) permite obtener imágenes de la morfología y del diámetro de las fibras, así como de posibles impurezas y de su uniformidad. Para el análisis se utiliza el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) marca JEOL JSM-7610F, con voltajes de 1,0 y 5,0 kV y aumentos de 5 000, 10 000, 20 000 y 25 000×. La muestra será montada sobre una tira de carbono para después ser recubierta con una capa de oro [102].

2.1.2.1.1 Medición del diámetro de las fibras

Una vez obtenidas las micrografías se utilizará el software ImageJ para obtener el diámetro promedio por muestra, para ello se requiere considerar como referencia la escala y píxeles de la micrografía, para posteriormente medir 100 fibras y obtener las medidas de tendencia central y de dispersión del diámetro de las fibras [102].

2.1.2.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

El análisis de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier, FTIR por sus siglas en inglés, se utilizará para la determinación de los modos vibracionales e identificación de grupos funcionales a partir de los datos anteriores y comparación bibliográfica. El análisis será hecho por un espectrómetro Perkin Elmer GX (modelo Spectrum One), en el rango de 4000 a 450 cm^{-1}, con la técnica de reflectancia totalmente atenuada (ATR) con punta de diamante, 24 barridos, 4 cm^{-1} de resolución [102].

2.1.2.3 Porosidad

El método de caracterización de BET (Brunauer, Emmett y Teller) se utiliza para determinar el área superficial de las nanofibras o los cambios en la porosidad del material al ser sometido a la adsorción de gas nitrógeno [103]. Las membranas se cortan en trozos pequeños de 0.5 x 0.5 cm. Utilizando la ecuación de isotermas de BET se obtienen la porosidad y área superficial de la muestra.

2.1.3 Caracterización mecánica

2.1.3.1 Tensión

La resistencia del compósito se evaluó utilizando el equipo DMA Star System Mettler Toledo, el cual permite un control de aumento de Newtons constante. Las condiciones del equipo quedaron a una velocidad de 0.1 N/s, un límite de fuerza de 2 N, todo esto a una temperatura de 37 °C.

A cada probeta de la membrana se le tomó sus medidas dimensionales: largo, ancho y espesor [104].

2.1.4 Evaluación de conducción

2.1.4.1 Conducción eléctrica en seco



Las mediciones de conductividad superficial de los andamios se realizaron con un medidor de alta resistencia a temperatura ambiente. Los andamios se limpiarán con etanol y se secarán a 55 °C antes de la medición [105]. La conductividad se medirá utilizando el teorema de conducción del four-point (Ecuación 2), en el cual un par de cables se usa para inyectar la corriente, mientras el otro par se encuentra en paralelo para medir el potencial a través del dispositivo;

Determinación de conducción eléctrica

Los cálculos para obtener el valor de la conductividad de la muestra se llevarán a cabo utilizando la ecuación [106]:

$$\sigma = \frac{1}{2\pi V}\left(\frac{1}{l_1} + \frac{1}{l_3} + \frac{1}{l_1+l_2} + \frac{1}{l_2+l_3}\right)$$ Ecuación 3. Teorema del fourt-point.

Donde σ es la conductividad (S/m), v es el voltaje, l_1 es la distancia entre el cable 2 y 3, l_2 es la distancia entre el cable 1 y 2, y $l_3$es entre el cable 3 y 4 (nm).

2.1.4.2 Resistencia eléctrica

La estabilidad eléctrica se define como el porcentaje restante de conductividad eléctrica (γ) de los andamios conductores, a medida que avanza la prueba de estabilidad eléctrica. Los andamios compuestos se cortarán en muestras rectangulares de 2,0 × 2,0 cm y se incubarán en 5 ml de PBS a pH 7,4 a 37 °C durante 5 días. La membrana se coloca en una celda tipo H con una solución de NaCl 0.5 M. Se aplicará un potencial eléctrico constante (u) de 100 mV/cm en los lados opuestos de las muestras durante 2 horas, todos los días, utilizando una estación de trabajo electroquímica. La corriente eléctrica (i) que pasa a través de las membranas se registrará todos los días desde el inicio de la aplicación del potencial eléctrico [107].

2.1.4.2.1 Determinación de conducción eléctrica

La conductividad de las muestras se calculará mediante la ecuación 4:

$$\textit{Conducción restante (\%)} = 1 - \frac{\Delta\gamma}{\gamma} = 1 - \frac{\Delta I}{I}$$ Ecuación 4. Conducción remanente.

Donde γ es la conductividad de los andamios, Δγ y Δi son los cambios de γ e i.

2.1.4.3 Capacidad de intercambio iónico

La eficacia del transporte iónico puede medirse mediante la capacidad de intercambio iónico (IEC), definida como el número de cargas fijas por unidad de peso de polímero seco. Para medirlo se utilizará el método de Fisher y Kunin [108]. Las membranas se secarán durante 24 h a 35 °C, luego se colocarán durante la noche en un desecador. Las muestras se pesaron en una balanza analítica y se cortaron en trozos lo más pequeños posible. Posteriormente,



se sumergieron en soluciones de HCl 1 M y NaOH 1 M, respectivamente, y se dejaron en reposo durante la noche para alcanzar el equilibrio. Las membranas se enjuagarán para eliminar el exceso de solución y, finalmente, se titularán con una solución volumétrica de HCl 0,01 m o de NaOH 0,01 m, utilizando un electrodo de pH.

2.2 RESULTADOS

2.2.1 Síntesis de sistemas nanoestructurados por electrohilado

2.2.1.1 Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier

Las muestras fueron analizadas mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), y los espectros obtenidos se presentan en la Figura 2.1. Los grupos funcionales característicos del colágeno tipo I se muestran en la Figura 2.1(a), con señales prominentes correspondientes a la amida I (1631 cm^{-1}), la amida II (1530 cm^{-1}) y la amida III (1239 cm^{-1}). Estas señales son indicativas de la estructura terciaria de la proteína, como ha sido reportado previamente [73], [75]

La adición de quitosano provocó desplazamientos en las bandas de absorción a 3279, 1530 y 1239 cm^{-1}, atribuidos a los grupos OH y NH_2, que pueden interactuar debido a sus cargas opuestas. Adicionalmente, un desplazamiento en 1031 cm^{-1} corresponde a la presencia de quitosano, que podría interactuar con la estructura de triple hélice del colágeno, induciendo tensión en el grupo glucosídico [109], [110].

Los espectros de los componentes individuales y del compuesto resultante con polipirrol (Ppy) se muestran en la Figura 2.1(b). Las señales características del Ppy incluyen bandas de absorción en 1689 cm^{-1} (CH_2) y en 1559 cm^{-1} y 1480 cm^{-1}, asociadas a los modos de estiramiento del anillo de pirrol (C=C y C–N, respectivamente). Señales adicionales en 1304 cm^{-1} y 1046 cm^{-1} corresponden a deformaciones =C–H, mientras que 1188 cm^{-1} se relaciona con la reducción de C–H en el polímero. También se observa una vibración característica C=C en 920 cm^{-1} [111], [112].

Al mezclarlo con colágeno, las señales características de este se conservan, lo que indica que su estructura terciaria permanece intacta (Figura 2.1(c)). Sin embargo, se observa un aumento de intensidad y un desplazamiento en 923 cm^{-1}, atribuido a la incorporación de Ppy. Asimismo, un desplazamiento hacia la izquierda en 1634 cm^{-1} puede relacionarse con tensión en el grupo amida primaria debido a la interacción con el grupo N–H protonado del anillo de pirrol [98].



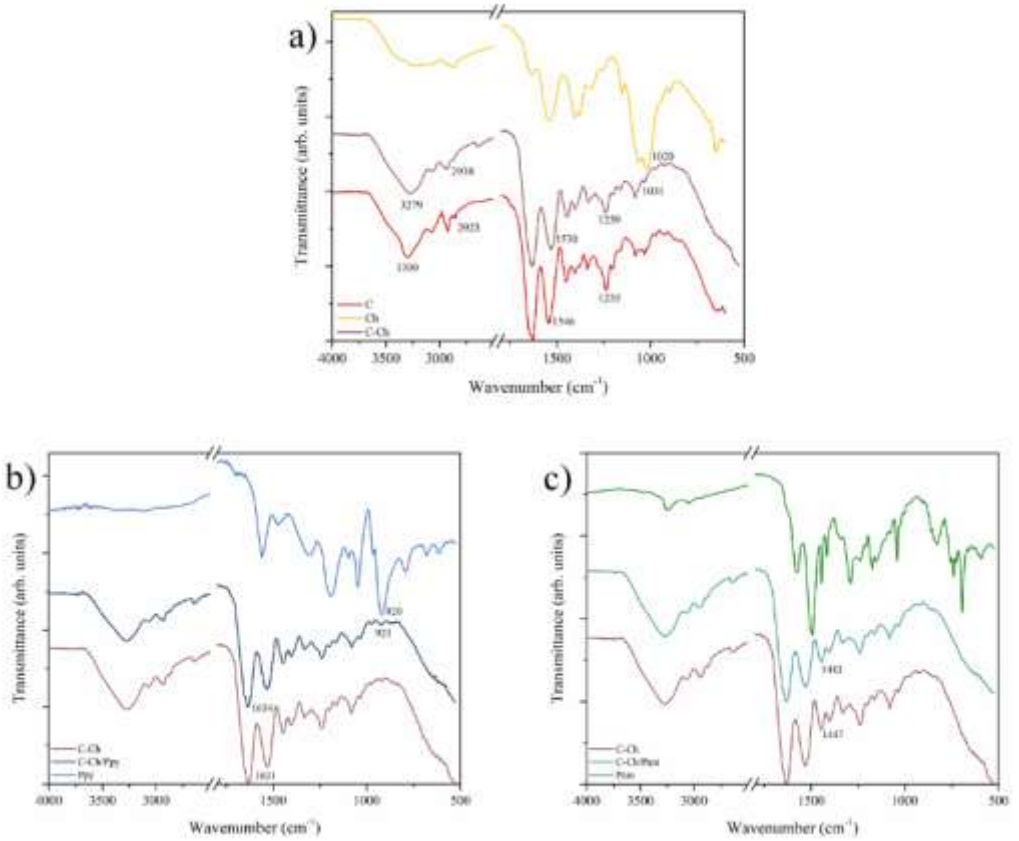


Figura 2.1. Análisis de grupos funcionales por FTIR de: (a) los materiales precursores individuales y de los complejos poliméricos modificados con (b) Ppy y (c) Pani.

En el caso de la polianilina (Pani), como se muestra en la Figura 2.1(c), una señal a 1579 cm^{-1} se atribuye al estiramiento C=C del anillo quinoide, mientras que la señal a 1492 cm^{-1} se asocia al estiramiento C=C del anillo bencenoide [113]. La presencia de ambas confirma la formación de la sal de esmeraldina de la Pani. Señales adicionales en 1287 cm^{-1} corresponden al estiramiento C–N, junto con bandas en 1172 cm^{-1} y 826 cm^{-1} relacionadas con resonancia π-polaron. Además, se observan señales C–H en 1445, 1415 y 739 cm^{-1} [35], [114]. Moreover, C–H signals are observed at 1445 cm^{-1}, 1415 cm^{-1}, and 739 cm^{-1} [115].

Al mezclar Pani con colágeno, la estructura de triple hélice se mantiene. No obstante, se observa un desplazamiento hacia la derecha a 1443 cm^{-1} y cambios en la intensidad relativa a 1400 cm^{-1}, correspondientes a estiramientos C–H. Estos cambios sugieren una interacción débil entre Pani y el colágeno.

2.2.1.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)



Las membranas obtenidas mediante electrohilado se muestran en la Figura 2.2. El diámetro de las fibras se analizó en ImageJ, con 100 mediciones por muestra.

La membrana C-Ch presenta fibras de 105 ± 34 nm con beads. Estas impurezas (148 ± 16 nm) podrían explicar la pérdida de la morfología observada tras la hidratación. Con la adición de Pani, el diámetro disminuye a 71 ± 24 nm, lo que aumenta la presencia de beads (298 ± 144 nm) y la deformación tras la hidratación. Por otro lado, el Ppy incrementa el diámetro a 394 ± 365 nm, con beads mayores de 3.3 µm y pérdida total de la morfología tras la hidratación.

Las condiciones de electrohilado fueron: 19 kV, 0.1 mL/h y 12 cm de distancia entre la aguja y el colector.

Tabla 3. Análisis morfométrico del diámetro de las fibras y de las impurezas (beads) en las distintas membranas electrohiladas.

Membrana	Diámetros de fibras	Impurezas
C-Ch	105 ± 34 nm	148 ± 16 nm
C-Ch/Pani	71 ± 24 nm	298 ± 144 nm
C-Ch/Ppy	394 ± 365 nm	3.3 µm

La pérdida de la morfología fibrilar nativa observada en las muestras tras su exposición al medio acuoso se atribuye principalmente al fenómeno de hinchamiento. Este proceso induce la coalescencia de las nanofibras y la subsecuente formación de aglomerados irregulares o estructuras nodulares, tal como se ilustra en las Figuras 2.2(b) y 2.2(f). Para las membranas con Pani, este comportamiento se asocia con interacciones intermoleculares débiles, mientras que en el sistema con Ppy el fenómeno está regido por fuerzas electrostáticas más intensas.

De acuerdo con las evidencias espectroscópicas de la Figura 2.1(b), esta transición morfológica es dirigida por la interacción de los grupos funcionales de los constituyentes, sugiriendo la formación de puentes de hidrógeno y otras fuerzas intermoleculares que comprometen la integridad estructural de las redes de nanofibras [116].

En el caso específico de la Figura 2.2(d), correspondiente a la muestra compuesta por Pani, las alteraciones estructurales observadas se deben a la débil afinidad interfacial entre la polianilina y la matriz polimérica de colágeno-quitosano (C-Ch). La ausencia de un enlace intercadena robusto propicia un hinchamiento localizado o un colapso segmentario de la red fibrilar, lo que favorece la fusión de las fibras individuales y la nucleación de gotas residuales.

Esta modificación en la microarquitectura pone de manifiesto la alta sensibilidad de la estructura del compósito frente a las variaciones del entorno hidrodinámico y a las interacciones poliméricas. Asimismo, estos hallazgos acentúan la necesidad crítica de optimizar el equilibrio sinérgico entre la resistencia al hinchamiento y la estabilidad mecánica de las membranas en función de los requerimientos de su aplicación biomédica específica.



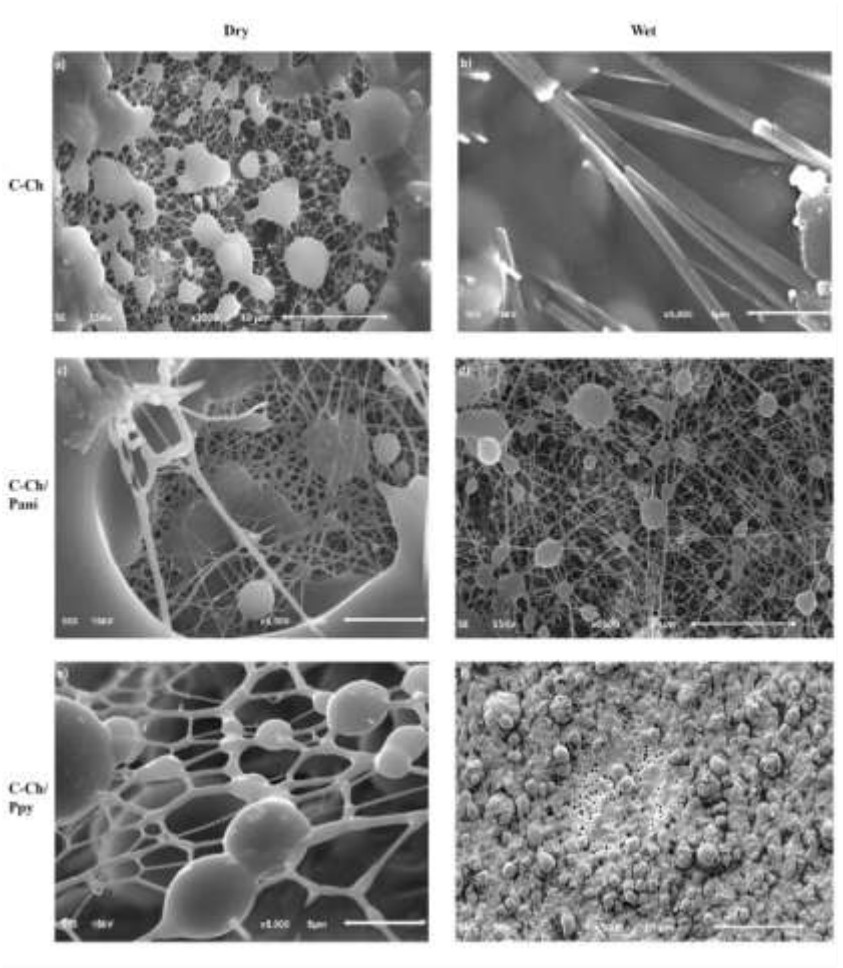


Figura 2.2. Micrografías de SEM de las membranas en estado seco: (a) Coll-Ch, (c) Coll-Ch/Pani y (e) Coll-Ch/Ppy; y de las membranas tras el proceso de hidratación/estado húmedo: (b) Coll-Ch, (d) Coll-Ch/Pani y (f) Coll-Ch/Ppy.

2.2.1.3 Porosidad

La microarquitectura interna de las membranas electrohiladas se caracterizó mediante ensayos de fisisorción con adsorción de nitrógeno. Los andamios compuestos por colágeno y quitosano (Coll-Ch), empleados como control de referencia en comparación con trabajos previos, exhibieron un tamaño promedio de poro de 32.40 nm y un área superficial específica de 4.49 m^2/g [117]. Estos parámetros estructurales son fundamentales para garantizar la difusión eficiente de nutrientes, el intercambio de gases y la viabilidad celular a largo plazo dentro de la matriz polimérica.



2.2.1.4 Mecánicas

Las propiedades mecánicas axiales de las membranas se evaluaron bajo condiciones fisiológicas simuladas a una temperatura de 37 °C, empleando probetas con un espesor nominal aproximado de 50 µm [118]. Los valores obtenidos para el módulo de Young de las matrices compuestas se aproximan significativamente al rango viscoelástico reportado para el tejido miocárdico nativo, el cual oscila entre 0.2 y 0.5 MPa (Lozano et al., 2018).

El perfil esfuerzo-deformación evidenció que la incorporación de Pani incrementó la capacidad de deformación de la membrana en aproximadamente un 50% respecto al control. Este comportamiento puede atribuirse a la presencia y dispersión homogénea de estructuras nodulares a lo largo de la red fibrilar, lo que favorece una distribución más eficiente de los esfuerzos mecánicos y relaja localmente las concentraciones de estrés.

Por el contrario, la adición de Ppy modificó drásticamente el desempeño mecánico, lo que provocó una disminución del módulo de Young del compósito. Este detrimento estructural se asocia a la formación continua y a la aglomeración densa de nódulos macromoleculares sobre los filamentos, los cuales actúan como defectos puntuales o concentradores de esfuerzos que restringen la elasticidad cooperativa de las fibras poliméricas y favorecen una falla prematura bajo tensión molecular.

Tabla 4. Módulo de Young de las diferentes membranas poliméricas, evaluado mediante ensayos mecánicos a 37 °C.

Membrana	Grosor de la membrana	Young's Module (ε)
C-Ch	47 µm	0.882 MPa
C-Ch/Pani	82 µm	1.18 MPa
C-Ch/Ppy	51 µm	0.025 MPa

El comportamiento en la región elástica de Coll-Ch y de Coll-Ch/Pani es similar, como se muestra en la Figura 2.3; sin embargo, la adición de Pani disminuye la resistencia a la tracción. Esto puede atribuirse a una interacción débil entre los polímeros, que impide que la red de colágeno resista el esfuerzo mecánico de la misma manera, aunque su elasticidad mejora a bajas magnitudes de esfuerzo. Estas interacciones débiles pueden alterar la organización intrínseca de las fibras de colágeno, reduciendo su capacidad para distribuir uniformemente las tensiones [120], [121].

A pesar de esta disminución de la resistencia a la tracción, el material compuesto mostró una mayor elasticidad en regímenes de bajo esfuerzo, lo que sugiere que la Pani introduce flexibilidad en el sistema al interferir parcialmente con la rigidez estructural del Coll.

Por otro lado, la incorporación de Ppy modifica significativamente el comportamiento mecánico, como se observa en la Figura 3, donde el material presenta un comportamiento más cercano al de un elastómero. Este cambio puede atribuirse a las interacciones electrostáticas entre los polímeros, en particular las que involucran los grupos N–H, las cuales permiten una distribución más eficiente de los esfuerzos dentro de la red [116], [122].



Estas interacciones favorecen una redistribución más eficiente de las tensiones a lo largo de la matriz, lo que mejora la capacidad del material para soportar deformaciones sin comprometer su integridad estructural. El desplazamiento observado en los espectros FTIR (Figura 2.2(b), a 923 cm^{-1} y 1634 cm^{-1}) confirma la presencia de fuerzas intermoleculares entre las cadenas de Ppy y de colágeno. Este comportamiento elastomérico permitiría al material adaptarse a los ciclos continuos de contracción y relajación del tejido cardíaco sin sufrir una falla mecánica.

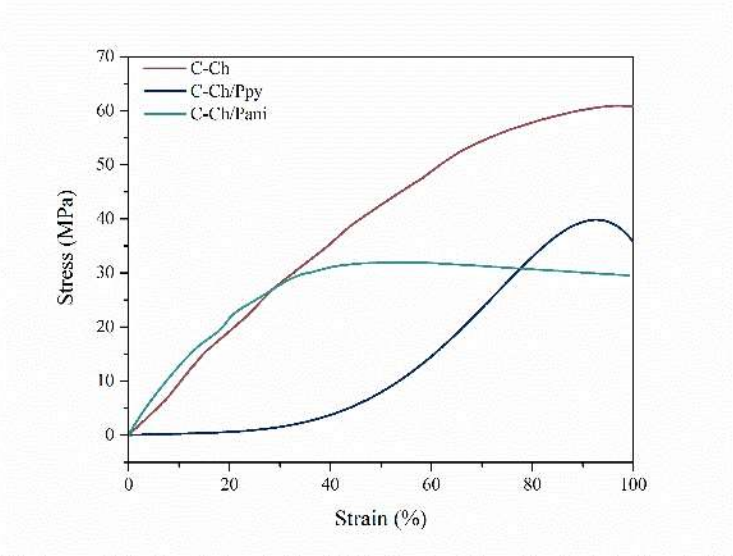


Figura 2.3. Curvas de esfuerzo-deformación de las diferentes membranas poliméricas evaluadas mediante ensayos de tracción uniaxial.

2.2.1.5 Conductividad

Los valores de conductividad eléctrica se presentan en la Tabla 5, donde se observa que la incorporación de Pani se asocia con un incremento significativo de la conductividad. Este comportamiento puede atribuirse a que el colágeno no interfiere con las vías conductoras de la Pani, lo que permite que la Pani funcione sin actuar como un aislante eléctrico. Las señales observadas en la Figura 2.2(c) sugieren que la estructura conductora de la Pani, en su forma de sal de esmeraldina, se mantiene en presencia de colágeno, lo que favorece un transporte de carga eficiente.

En contraste, el compuesto C-Ch/Ppy muestra una notable disminución de la conductividad eléctrica. Esta reducción puede atribuirse a las interacciones entre el Ppy y el colágeno, que potencialmente interfieren con los mecanismos de transporte electrónico del Ppy. En particular, los grupos NH del Ppy, que desempeñan un papel crítico en la deslocalización y el transporte electrónico, pueden verse parcialmente bloqueados por la formación de enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas con la matriz de colágeno.

La modificación estructural de la matriz de Ppy, probablemente inducida por su incorporación en la red de colágeno, contribuye adicionalmente a la disminución de sus propiedades conductoras [81], [123].



En comparación con otras membranas reportadas en la literatura, los valores de conductividad obtenidos en este estudio son superiores a los reportados por Bertuoli et al. (2019b) [36], [124].

Tabla 5. Caracterización de la conductividad eléctrica en matrices de Coll-Ch modificadas con los polímeros conductores Pani y Ppy.

	Conductividad Eléctrica (S/cm)	Conductividad Iónica (Na^+)	Conductividad Iónica (Ca^{2+})
C-Ch	2.69E-04	1.68×10^{-10}	6.64×10^{-9}
C-Ch/Pani	5.18E-04	5.47×10^{-9}	4.2×10^{-9}
C-Ch/Ppy	1.79E-04	6.23×10^{-9}	6.56×10^{-9}

2.2.2 Síntesis de sistemas nanoestructurados por electrohilado entrecruzados con GTA

2.2.2.1 Espectroscopia FTIR

Los espectros de los componentes se muestran en la Figura 2.4. Las señales del espectro de Ppy presentan picos característicos en 1569 y 1478 cm^{-1}, asociados al estiramiento y a la deformación del anillo pirrólico, así como una banda en 1310 cm^{-1} atribuida a los estiramientos C–N y C=C. Las señales en 1186 y 1044 cm^{-1} corresponden a deformaciones de los enlaces C–H en el plano y fuera del plano, respectivamente. La señal en 920 cm^{-1} se atribuye a estructuras de tipo bipolarón, lo que indica un estado parcialmente oxidado del Ppy [112], [125].

En el caso del Ch, se observan bandas de estiramiento O–H y N–H a 3359 y 3291 cm^{-1}, respectivamente, así como una banda de estiramiento C–H a 2869 cm^{-1}. La banda en 1374 cm^{-1} corresponde a los grupos –CH–OH, mientras que la señal en 1026 cm^{-1} se asocia al enlace C–O–C [126]. Además, se identifican señales características en 1650, 1558 y 1418 cm^{-1}, asociadas a los grupos –C=O, NH_2 y CH_2, respectivamente [109].

Adicionalmente, el espectro del sistema Ch-Ppy muestra las señales características de ambos componentes (Ch y Ppy), aunque con desplazamientos respecto de sus posiciones. En particular, se observa un desplazamiento hacia la izquierda en 1557 cm^{-1}, indicativo de tensión en el estiramiento de la amina II, así como un desplazamiento hacia la derecha en 3263 cm^{-1}, correspondiente al estiramiento del grupo N–H. Estos desplazamientos sugieren la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos NH_2 y OH del quitosano y el nitrógeno del Ppy.



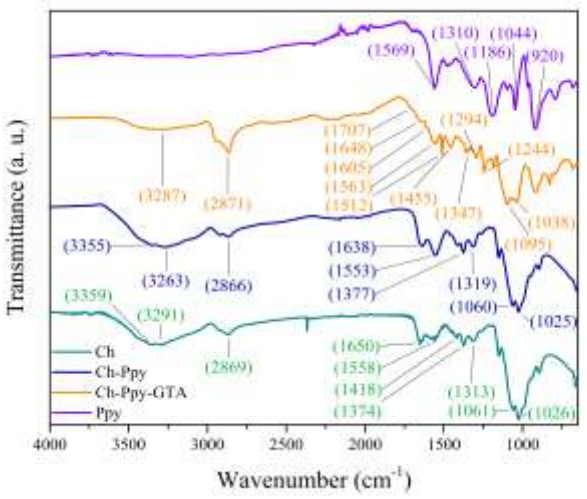


Figura 2.4. Espectros de FTIR de los controles individuales de Ch y Ppy, de la mezcla física Ch-Ppy y de la muestra de la matriz reticulada Ch-Ppy-GTA.

En el sistema Ch-Ppy entrecruzado con GTA, la señal a 3287 cm^{-1} indica la presencia de grupos OH y NH desplazados. La nueva banda en 1713 cm^{-1} se asocia a grupos C=O residuales, mientras que la señal en 1562 cm^{-1} corresponde a la amida II, que no se consumió por completo durante el proceso de reacción. Por otro lado, las señales en 1653, 1609 y 1294 cm^{-1} se atribuyen a la formación de grupos imina, característicos de la base de Schiff [127].

Las señales en 1510 y 980 cm^{-1} se relacionan con el anillo pirrólico, mientras que las bandas en 1347, 1244, 1095 y 1038 cm^{-1} se atribuyen al quitosano. La señal en 1463 cm^{-1} está asociada a una reorganización conformacional del esqueleto orgánico.

Para la cuantificación y confirmación del entrecruzamiento, el espectro de diferencia muestra señales en 1707, 1607, 1575, 1510 y 1469 cm^{-1}, correspondientes a grupos C=O residuales, grupos imina, residuos de aminas, la presencia de Ppy y deformaciones de $–CH_2$, respectivamente, lo que sugiere un entrecruzamiento parcial del sistema.

Las deconvoluciones para la identificación de señales se encuentran en el Anexo 1.

Tras la incorporación de Coll, los espectros del compuesto resultante, como se muestra en la Figura 2.5, presentan señales predominantes características del colágeno, destacando los principales grupos amida: Amida I en 1636 cm^{-1}, Amida II en 1530 cm^{-1} y Amida III en 1448 cm^{-1} [128]. Una señal doble bien definida entre 1537 y 1510 cm^{-1} indica la presencia simultánea de grupos NH_2 residuales y de contribuciones del componente Ppy.



La banda en 1246 cm^{-1} es consistente con la presencia del grupo imina formado durante el proceso de entrecruzamiento, mientras que la señal en 1105 cm^{-1} corresponde a las vibraciones características de estiramiento C–O–C de la cadena principal del quitosano.

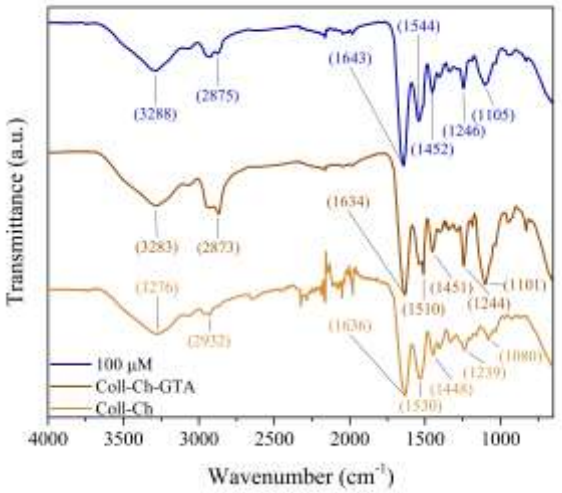


Figura 2.5. Espectros de FTIR de la mezcla de colágeno y quitosano, de la matriz de Coll-Ch reticulada con glutaraldehído a 10 µM (Coll-Ch-GTA 100 µM) y de la membrana electroactiva compuesta, funcionalizada con polipirrol (Coll-Ch/Ppy-GTA 100 µM).

2.2.2.2 Microscopia SEM

El análisis del diámetro de las fibras se realizó a partir de micrografías SEM, midiendo 200 nanofibras por muestra con el software ImageJ. Como se muestra en la Figura 2.6, los diámetros promedio de las fibras variaron en función de la concentración de GTA: 101 ± 9 nm a 25 µM, 125 ± 15 nm a 50 µM y 113 ± 15 nm a 100 µM. Las Figuras 2.6a y 2.6b presentan morfologías representativas de las fibras; sin embargo, en el caso de 50 µM se observan "beads" distribuidos a lo largo de toda la membrana.

Posterior al proceso de electrohilado, las membranas fueron sometidas a una etapa adicional de entrecruzamiento mediante exposición a vapores de GTA. Este tratamiento permitió preservar la morfología nanofibrilar, promoviendo la unión o fusión interfibrilar en los puntos de intersección de las nanofibras [129], como se observa en las micrografías de las Figuras 2.6d–f, donde la preservación estructural aumenta con la concentración de GTA.

Este postratamiento, junto con la formación de haces de fibras entrelazadas durante el proceso, se tradujo en una mejora significativa de la resistencia mecánica de las membranas fibrosas finales. No obstante, un entrecruzamiento parcial deja cadenas libres de Coll y Ch susceptibles a la hidratación. La absorción de agua puede inducir hinchamiento y la posterior fusión de estas cadenas no entrecruzadas, lo que contribuye al colapso o



alisamiento de la estructura tras el secado, particularmente en muestras con concentraciones más bajas de GTA [127], [130].

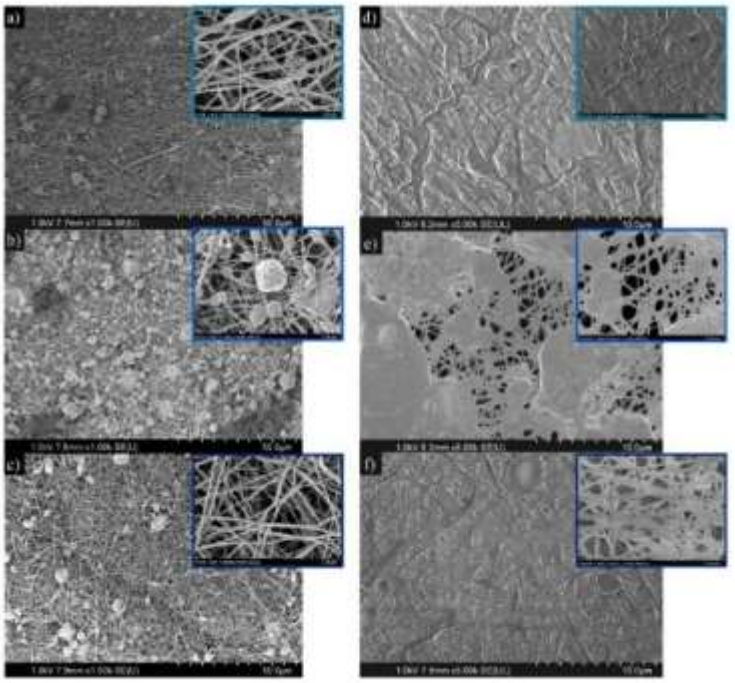


Figura 2.6. Micrografías de SEM de las membranas electroactivas de Coll-Ch/Ppy reticuladas con GTA a concentraciones, (b) 50 µM y (c) 100 µM. Los paneles (d), (e) y (f) corresponden a las membranas tratadas adicionalmente con vapor de GTA (0.8 µL/mL) durante 24 h, a las concentraciones de 25 µM, 50 µM y 100 µM, respectivamente.

Se observó una fuerte correlación entre la estabilidad morfológica y la concentración inicial de GTA. La estructura entrecruzada con 25 µM de GTA (Figura 2.7a) mostró una pérdida evidente de la morfología fibrosa. La muestra de 50 µM (Figura 2.7b) presentó una estabilidad intermedia, perdiendo la mayoría de las características individuales de las fibras, aunque conservando algunos conglomerados fibrosos. En contraste, las membranas tratadas con 100 µM de GTA (Figura 2.7c) preservaron en gran medida la estructura fibrosa y la porosidad, confirmando la superior integridad estructural a largo plazo proporcionada por la mayor densidad de entrecruzamiento [131].



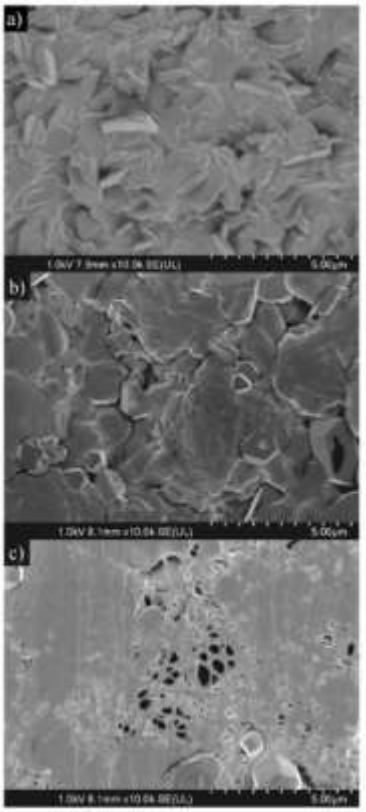


Figura 2.7. Micrografías de SEM que muestran la morfología superficial de las membranas modificadas (a) 50 µM, (b) 50 µM y (c) 100 µM tras 10 días de incubación en solución de PBS a 37 °C.

2.2.2.3 Degradación e hinchamiento

Para evaluar la estabilidad hidrolítica de los andamios, las membranas se sometieron a un ensayo de pérdida de masa en PBS a 37 °C (Figura 2.8). La Figura 2.8a muestra una dependencia directa de la concentración del agente entrecruzante: al día 1, las membranas con 100 µM retuvieron el 90% de su masa inicial, frente al 65% en las muestras con 25 µM. Esta diferencia se acentuó hacia el día 10, con retenciones de masa del 70% y del 30%, respectivamente. Para el día 30, ambos grupos convergieron, manteniendo menos del 5% de su masa inicial.

La cinética de pérdida de masa se analizó ajustando los datos a un modelo cinético de primer orden (Figura 2.8c), lo que permitió identificar las fases de degradación dominantes, influidas por la concentración de GTA. En las muestras de 50 µM, la pérdida de masa inicial observada durante los primeros 10 días es característica de un proceso de erosión superficial, atribuible principalmente a la lixiviación y la hidrólisis de componentes no entrecruzados [132]. En contraste, las muestras de 25 µM mostraron una disminución rápida y sostenida de la masa desde etapas tempranas, lo que sugiere que la baja densidad de entrecruzamiento favorece la hidrólisis



temprana de los pocos enlaces imina presentes, lo que provoca un colapso estructural acelerado y la liberación de fragmentos [133].

Por otro lado, en las muestras de 100 µM se maximiza la estabilidad: aunque los componentes no entrecruzados se eliminan rápidamente en etapas iniciales, la elevada densidad de entrecruzamiento permite que el núcleo polimérico resista la hidrólisis en volumen durante un periodo significativamente más prolongado, lo que valida el efecto estabilizante superior asociado a altas concentraciones de GTA [134].

El comportamiento de hinchamiento de las membranas se evaluó mediante la cuantificación de la absorción de agua en función del peso seco. Durante la primera hora, las membranas mostraron una elevada capacidad de absorción, alcanzando valores de 700, 1190 y 250 veces su peso inicial en agua para concentraciones de GTA de 25, 50 y 100 µM, respectivamente.

La muestra de 25 µM presentó una menor absorción de agua, lo cual puede atribuirse a la pérdida de masa asociada a una baja densidad de entrecruzamiento [135], [136]. En contraste, la muestra de 100 µM mostró un incremento de la absorción durante las primeras 4 h; sin embargo, esta se mantuvo por debajo del 400% debido a la alta densidad de entrecruzamiento [137].

Para la muestra de 50 µM, la absorción de agua se mantuvo alrededor de 1200 veces el peso inicial durante las primeras 24 h, lo que evidencia un comportamiento altamente hidrofílico y una mayor capacidad de retención de agua en comparación con las demás condiciones.

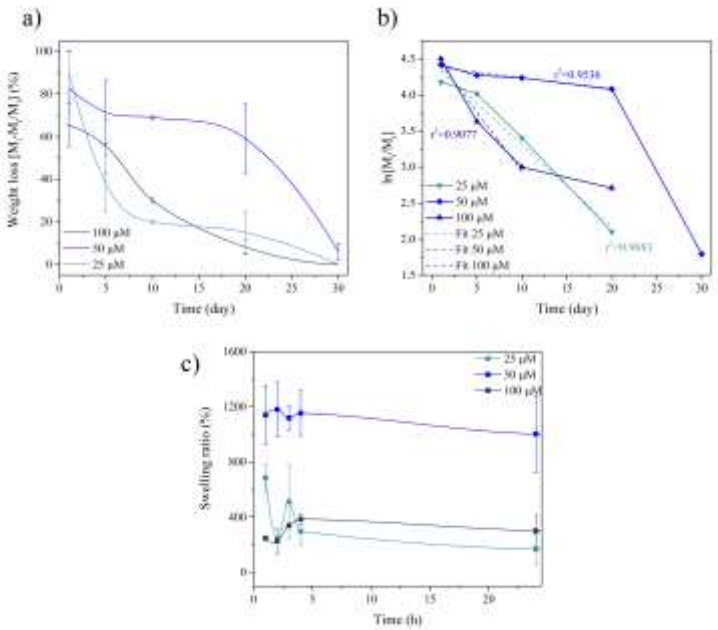


Figura 2.8. Evaluación de la estabilidad hidrolítica de las membranas reticuladas: (a) pérdida de masa; (b) modelo cinético de pérdida de masa a los 5, 10, 20 y 30 días de incubación; y (c) grado de hinchamiento (swelling ratio) a las 1, 2, 3, 4 y 24 h en PBS a 37 °C.



2.2.2.4 Conductividad Iónica

La conductividad iónica fue evaluada mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), y los datos obtenidos se presentan como diagramas de Nyquist en la Figura 2.9. Tanto para la membrana de control como para las membranas entrecruzadas con Ppy, la intersección inicial del semicírculo de alta frecuencia con el eje real (Z') corresponde a la resistencia óhmica (RA), atribuible principalmente a la resistencia del electrolito [138]

Al comparar los valores de resistencia entre el día 1 y el día 6, se observó un incremento significativo. En el primer día, la resistencia se encontraba entre 3.0×10^5 Ω y 4.0×10^5 Ω. Para el día 6, la resistencia de las membranas aumentó a valores entre 8.0×10^5 Ω y 1.0×10^6 Ω tanto para iones Na^+ como para Ca^{2+}, como se muestra en las Figuras 2.9b–c.

Una diferencia significativa en la resistencia entre ambos iones se observó únicamente en la membrana control y en la membrana con 100 µM de GTA (Figuras 2.9a y 2.9d) al evaluar con Ca^{2+} en comparación con Na^+. Este comportamiento diferencial sugiere la presencia de interacciones iónicas selectivas o de mecanismos de inhibición del transporte dentro de la estructura de la membrana [139], posiblemente debido a la mayor densidad de carga o al carácter divalente del ión Ca^{2+}, que interactúa preferencialmente con la red polimérica entrecruzada [140].

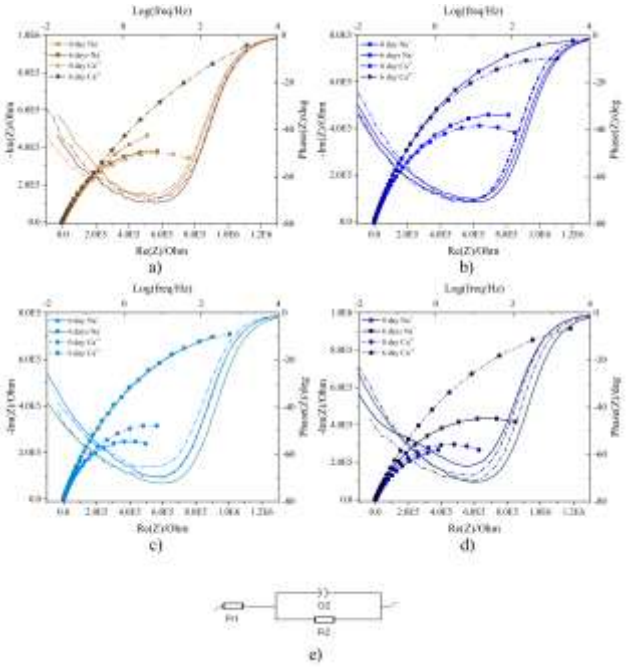


Figura 2.9. Diagramas de Nyquist y gráficos del ángulo de fase de Bode para las membranas de colágeno-quitosano (Coll-Ch) modificadas a concentraciones de: (a) 25 µM, (b) 50 µM y (c) 100 µM. Las mediciones de espectroscopía de impedancia se realizaron a las 0 h y 144 h de exposición a iones Na^+ (procedentes de NaCl) y Ca^{2+} (procedentes de $CaCl_2$). En (e) se presenta el circuito eléctrico equivalente utilizado para ajustar los datos experimentales del sistema.

Por otro lado, el análisis del diagrama de Bode (ángulo de fase) sugiere un comportamiento pseudocapacitivo del sistema (Figura 2.9e). En particular, la resistencia inicial del circuito equivalente (RA) se manifiesta en la región de altas frecuencias, donde el ángulo de fase es cercano a 0°. A medida que la frecuencia disminuye, la pendiente de la curva de fase cambia, lo que indica una transición de un régimen dominado por el comportamiento resistivo a uno de carácter capacitivo o pseudocapacitivo [141].

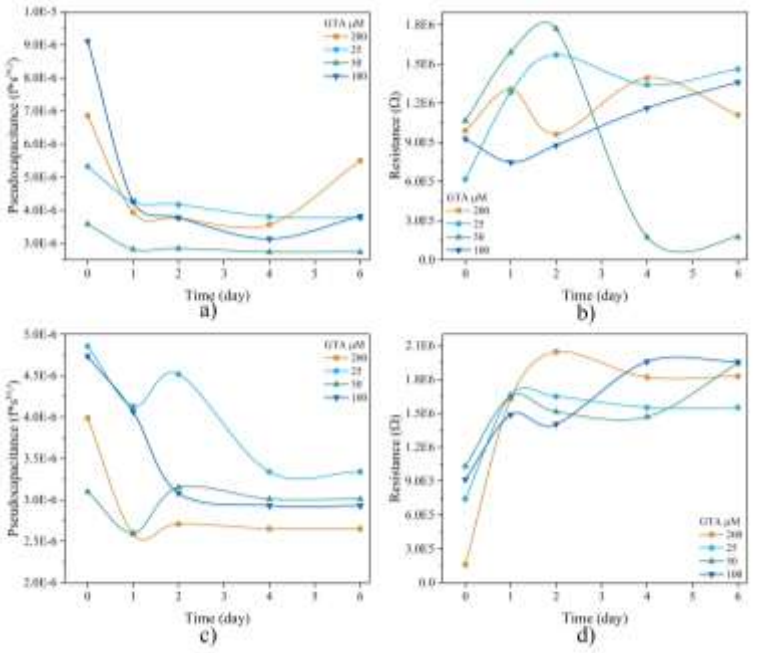


Figura 2.10. Cinética electroquímica a lo largo de 6 días para las matrices de Coll-Ch (25 μM, 50 μM y 100 μM): Pseudocapacitancia en medio iónico de (a) Na^+ y (c) Ca^{2+}; y resistencia del volumen (R_B) en medio iónico de (b) Na^+ y (d) Ca^{2+}

El análisis de la resistencia de las membranas a lo largo de varios días (Figura 2.10) confirmó un comportamiento pseudocapacitivo distintivo. Para los iones Na^+ (Figura 2.10a), las membranas con menor concentración de GTA mantuvieron una capacidad de almacenamiento de carga relativamente constante durante 6 días. En contraste, al exponerse a iones Ca^{2+} (Figura 2.10c), la capacidad varió significativamente con el tiempo, observándose una tendencia de las membranas a liberar iones durante este intervalo, lo que sugiere diferencias en la estabilidad o reversibilidad de las interacciones con cationes divalentes [142].

A pesar de estas diferencias iónicas, se identificó una tendencia consistente en todas las muestras: el incremento de la concentración de GTA condujo a una disminución de la pseudocapacitancia entre el día 1 y el día 6, tanto para Na^+ como para Ca^{2+}, probablemente debido a la restricción de la movilidad iónica asociada a una mayor densidad de entrecruzamiento [143], [144].

El análisis de la resistencia final del circuito (Figuras 2.10b y d) reveló comportamientos dependientes del tiempo, diferenciados entre ambas especies iónicas. En el caso de los iones Na^+ (Figura 2.10b), la resistencia RB mostró



un incremento general durante los seis días, pasando de un valor inicial de 6.0×10^5 Ω a 1.8×10^6 Ω, con excepción de la membrana con 50 µM de GTA, que presentó una disminución significativa hasta 2.0×10^5 Ω. Para los iones Ca^{2+} (Figura 2.10d), la resistencia fue relativamente baja al día 0, aumentó bruscamente al día 1 y posteriormente se estabilizó entre 1.5×10^6 Ω y 2.1×10^6 Ω.

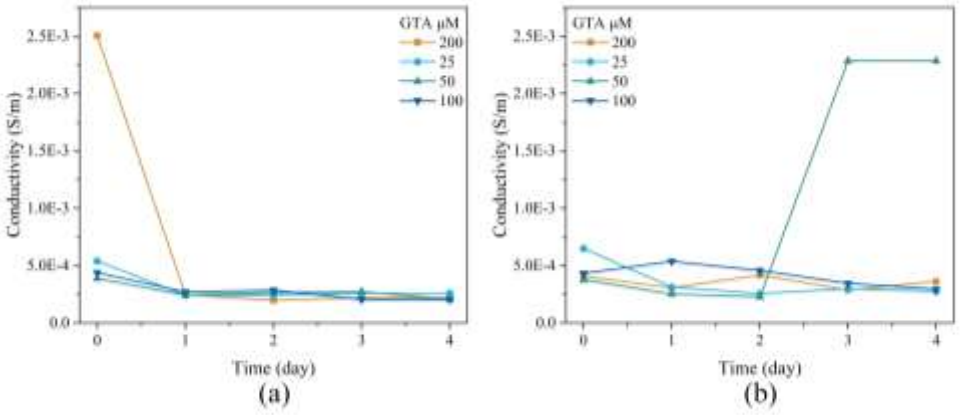


Figura 2.11. Evaluación temporal de la conductividad (0 a 6 días) en membranas de Coll-Ch-GTA expuestas a diferentes concentraciones (25 µM, 50 µM, 100 µM y 200 µM) como control de Coll-Ch, bajo la influencia de (a) cationes Na^+ y (b) cationes Ca^{2+}.

2.2.2.5 Propiedades mecánicas

La evaluación mecánica consistió en el análisis del módulo de Young de la membrana con 50 µM de GTA y de la membrana control Coll-Ch-GTA. Los resultados muestran que la incorporación y el entrecruzamiento del sistema Ch-Ppy con GTA dieron lugar a un incremento de un orden de magnitud en la rigidez en comparación con el control Coll/Ch-GTA, lo que confirma una mejora significativa de la integridad mecánica de las membranas.

En este caso, el módulo de Young de ambas membranas supera los valores requeridos para el tejido miocárdico, que se encuentran en el rango de 0.2 a 0.5 MPa [119].

2.2.2.5.1 Permeabilidad iónica

La capacidad de transporte selectivo y la permeabilidad iónica a través de las membranas poliméricas se evaluaron mediante una celda de difusión de tipo H. El monitoreo cinético se llevó a cabo mediante la recolección de alícuotas seriadas cada 30 min durante las primeras 4 h del ensayo, seguido de un muestreo diario durante un periodo continuo de 8 días. Las cuantificaciones de flujo y de liberación de los iones cloruro (Cl-) y sodio (Na^+) acumulados



en el compartimento receptor se realizaron mediante espectroscopía de fluorescencia (XRF), obteniéndose los perfiles volumétricos presentados en la Figura 20.

Para las condiciones experimentales de la prueba, se empleó una solución de trabajo de Tris enriquecida con 15 mM de NaCl en el compartimento emisor, mientras que la matriz de la membrana se acondicionó previamente a concentraciones saturadas de 36.940 g/L para el catión Na^+ y de 48.556 g/L para el anión Cl^-.

Como se aprecia en la curva de difusión de la Figura 2.12, el gradiente químico inicial indujo una transferencia de masa marcadamente lenta durante las primeras 4 h de evaluación, alcanzando valores de permeación acumulada de apenas el 3.60% para el Na^+ y el 19% para el Cl^-, con respecto a la concentración teórica total. Esta resistencia inicial al flujo es característica de un proceso de difusión restringido por la tortuosidad y la densidad de carga de la red polimérica.

Por el contrario, al cumplir las 24 h de incubación, se registró la máxima tasa de transferencia cinético-difusiva, de 25 % alcanzando el pico de liberación para ambas especies iónicas. Posteriormente, en el intervalo comprendido entre las 24 h y el octavo día de monitoreo, el sistema experimentó fluctuaciones transitorias en la concentración que sugieren el establecimiento de un equilibrio dinámico interfacial. Estas variaciones cíclicas de aumento y disminución de los niveles iónicos detectados son indicativas de procesos simultáneos de adsorción-desorción en los sitios activos de la membrana conductora, que busca estabilizar su potencial electroquímico con el medio circundante.

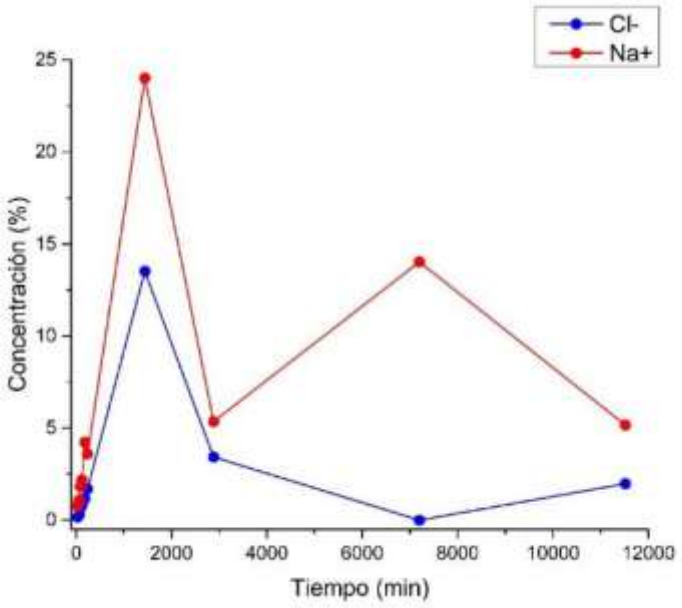


Figura 2.12. Permeación iónica de la membrana en celda tipo H de los iones de Na^+ y Cl^-.

2.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las membranas obtenidas por electrohilado mediante el sistema de mezclas demostraron que la integración de polímeros conductores, como Pani y Ppy, con matrices de C-Ch genera efectos diferenciados en las propiedades estructurales, mecánicas y eléctricas de los compuestos resultantes. Las muestras con Pani mostraron un incremento de la conductividad eléctrica, atribuible a la interacción mínima entre Pani y la red C-Ch, lo que permitió preservar las rutas conductoras del polímero. Sin embargo, esta interacción débil también se tradujo en una disminución de la resistencia a la tracción, ya que el polímero interfiere con la resistencia estructural intrínseca de la red de colágeno. A pesar de ello, el material compuesto mostró una mejora en la elasticidad a bajos niveles de esfuerzo, lo que lo hace adecuado para aplicaciones en las que la flexibilidad es prioritaria frente a la resistencia mecánica.

En contraste, la incorporación de Ppy generó interacciones electrostáticas más fuertes con la matriz de colágeno, lo que favoreció una mejor distribución de esfuerzos y confirió al material un comportamiento elastomérico. No obstante, esto ocurrió a expensas de una disminución de la conductividad, debido a la obstrucción parcial de los mecanismos de transporte electrónico del Ppy. Desde el punto de vista morfológico, los efectos de hinchamiento promovieron la unión de fibras y la formación de "beads" en ambos sistemas, siendo más pronunciados en las muestras con Ppy debido a las interacciones más intensas dentro de la red polimérica.

Estos resultados destacan el potencial de los sistemas C-Ch/Pani para aplicaciones en andamios electroactivos, y de los sistemas C-Ch/Ppy para aplicaciones donde se requieren propiedades mecánicas dinámicas. Asimismo, subrayan la necesidad de optimizar estos sistemas para lograr un equilibrio adecuado entre la conductividad, la integridad mecánica y la estabilidad morfológica en aplicaciones biomédicas específicas.

La estrategia de doble entrecruzamiento implementada en este estudio fue diseñada específicamente para maximizar la integración de la fase electroactiva Ch-Ppy con el componente estructural de colágeno (Coll), requisito crítico para el desarrollo de andamios avanzados en ingeniería de tejidos. El análisis FTIR confirmó la formación exitosa del sistema Ch-Ppy preentrecruzado mediante enlaces de tipo imina, empleando concentraciones de GTA dentro de rangos no citotóxicos (100 µM). La posterior incorporación de colágeno permitió el electrohilado exitoso de los andamios, obteniéndose diámetros de nanofibras consistentes en el rango de 101 a 125 nm, que mimetizan eficazmente la matriz extracelular nativa (ECM).

La estabilidad posfabricación mejoró significativamente mediante la metodología de entrecruzamiento. Las micrografías SEM mostraron que las membranas tratadas con vapores de GTA y aquellas preparadas con 100 µM de GTA mantuvieron en gran medida su morfología y porosidad originales tras 10 días de inmersión en PBS, mientras que las muestras con bajo grado de entrecruzamiento se degradaron rápidamente. Esta correlación directa entre la densidad de entrecruzamiento y la estabilidad morfológica también se observó en los resultados de pérdida de masa. Las membranas con alta concentración de GTA retuvieron hasta el 70% de su masa inicial al día 10, lo que extendió la vida útil de los andamios hasta aproximadamente 30 días.

La pérdida de integridad morfológica y la subsecuente pérdida de masa observadas en las membranas con baja concentración de GTA se atribuyen principalmente a la hidrólisis de las cadenas de colágeno y, en menor medida,



de los componentes Ch-Ppy, que permanecen disponibles para su degradación debido a un entrecruzamiento incompleto [145], [146]. Este hallazgo aborda una limitación importante de los andamios basados en polímeros naturales y resulta clave para garantizar su viabilidad en aplicaciones biomédicas a largo plazo.

El comportamiento de hinchamiento inicial fue notable, con absorciones de hasta 1200 veces su peso seco, lo cual es fundamental para facilitar el transporte de nutrientes y la adhesión celular. La disminución o estabilización del hinchamiento durante las primeras 24 horas coincidió con la pérdida progresiva de masa, lo que indica que la degradación estructural se convierte en el principal factor limitante de la retención de agua a largo plazo. A bajas concentraciones de GTA, las membranas presentan un comportamiento tipo hidrogel [147]; sin embargo, el mayor número de grupos funcionales libres se traduce en una menor resistencia y una mayor pseudocapacitancia. En contraste, a concentraciones más altas de GTA, estos sitios se consumen durante el entrecruzamiento, lo que afecta directamente la difusión iónica.

Los resultados de pseudocapacitancia mostraron un almacenamiento de carga más estable para el ión monovalente Na^+, particularmente en sistemas con baja concentración de GTA, lo que sugiere una difusión iónica facilitada a través de los canales generados por el hinchamiento. En contraste, el ión Ca^{2+} presentó un comportamiento más dinámico y menos estable, probablemente debido a interacciones electrostáticas preferenciales con los grupos funcionales de la red Ch-Ppy/Coll, lo que puede restringir su movilidad [148].

Es importante destacar que, aunque una mayor densidad de entrecruzamiento mejora la estabilidad estructural, también reduce la pseudocapacitancia y aumenta la resistencia final respecto al día 0. Este compromiso estructura-función indica que una alta densidad de entrecruzamiento limita la movilidad de las cadenas poliméricas y la accesibilidad iónica, lo que reduce la conductividad iónica y la capacidad de almacenamiento de carga [149].

Además, el incremento de la resistencia observado al día 6 en ambos iones sugiere que la degradación progresiva y el colapso estructural de las cadenas no entrecruzadas restringen gradualmente las vías de transporte iónico [150].

En particular, la capacidad del ión Ca^{2+} para formar enlaces de coordinación con grupos funcionales, como las aminas del quitosano o del colágeno, contribuye a la inhibición del transporte iónico, lo que se traduce en una liberación más lenta y en cambios más pronunciados en la resistencia en comparación con el ión Na^+.

Al absorber agua, la distancia intercadena de los polímeros aumenta, lo que abre canales hidrofílicos microscópicos de baja tortuosidad. Esto reduce significativamente la barrera estérica de la membrana, permitiendo que tanto el sodio como el cloro retenido difundan masivamente a favor de su gradiente de concentración. Dado que los polímeros conductores poseen propiedades pseudocapacitivas, las cadenas macromoleculares experimentan transiciones conformacionales constantes a medida que se degradan o se reordenan debido al flujo de corriente iónica pasiva. Esto provoca que la membrana actúe como una esponja molecular reversible, reabsorbiendo temporalmente iones del medio cuando la densidad de carga local cambia, para luego liberarlos de nuevo, buscando termodinámicamente la neutralidad electroquímica con el medio Tris circundante.

Finalmente, la capacidad de almacenamiento temporal de Ca^{2+} sugiere que estas membranas pueden influir significativamente en la interfaz célula-andamio, modulando potencialmente rutas de señalización relevantes en células como miocitos u osteoblastos, involucradas en procesos de migración, supervivencia y diferenciación.



2.4 CONCLUSIONES

Este estudio empleó con éxito una estrategia de preentrecruzamiento entre Ch y Ppy a bajas concentraciones de GTA, previa a la fabricación de las membranas, mediante una metodología de doble entrecruzamiento específicamente dirigida al sistema compuesto Coll/Ch-Ppy. Este paso crítico permitió el electrohilado eficaz del material en presencia de Coll. La concentración de GTA se identificó como el factor clave para modular las propiedades finales de las membranas.

Este método de preentrecruzamiento permitió obtener membranas fibrosas robustas con perfiles de degradación significativamente prolongados, manteniendo su morfología estructural durante periodos de 20–30 días, lo que representa un avance relevante para aplicaciones clínicas a largo plazo.

Los resultados mostraron que el incremento de la estabilidad estructural, asociado a una mayor densidad de entrecruzamiento, se correlaciona inversamente con el desempeño electroactivo, lo que se manifiesta en una disminución de la pseudocapacitancia y un incremento de la resistencia iónica. Este hallazgo evidencia que las altas densidades de entrecruzamiento restringen la movilidad de las cadenas poliméricas y limitan la accesibilidad iónica.

De manera importante, una proporción optimizada de baja concentración de GTA proporcionó el mejor equilibrio, permitiendo la conservación de grupos funcionales libres esenciales para maximizar el desempeño electroquímico, aun cuando concentraciones más altas de GTA comprometieron la homogeneidad de las fibras.

En conjunto, esta metodología constituye una plataforma adaptable para el desarrollo de biomateriales funcionales, lo que permite equilibrar la durabilidad estructural a largo plazo con un desempeño electroquímico óptimo en andamios destinados a aplicaciones avanzadas de ingeniería de tejidos.



Capítulo 3. EVALUACIÓN DE SISTEMA NANOESTRUCTURADO EN PRUEBAS IN VITRO

En este capítulo se aborda la evaluación biológica *in vitro* de las membranas obtenidas para determinar su biocompatibilidad mediante técnicas de viabilidad celular e inmunocitoquímica. Estas pruebas permitirán evaluar su capacidad para promover la adhesión y la proliferación de cardiomiocitos de ratón de la línea celular definida H9C2.

3.1 METODOLOGÍA

Como protocolo general de cultivo celular, se siguieron los establecidos para la línea celular H9C2.

3.1.1 Cultivo celular de cardiomioblastos

Se extraen los tubos criogénicos del ultracongelador, se atempera el vial criogénico, y la alícuota se centrifuga para remover el sobrenadante. Mientras que el pellet es resuspendido en medio DMEM suplementado y transferido a un frasco T para mantenerlo incubado a 37°C en oscuridad.

Cuando se observa una confluencia de alrededor del 80%, se retira el medio de cultivo mediante precipitación o extracción y, posteriormente, se realizan dos lavados con PBS. Después de retirar el medio de cultivo del segundo lavado, se agrega tripsina al 0.5% y se deja incubar a 37 °C en oscuridad por 5 min. Pasado el tiempo, se agrega medio suplementado para inactivar la enzima (se resuspendió la solución para asegurar la inactivación), enseguida se centrifuga a 1500 rpm por 5 minutos.

Se remueve el sobrenadante y el pellet es resuspendido en 1 ml de medio suplementado para realizar el conteo de células en el hemocitómetro (se utilizan 10 µl). El resto de las células se disuelven dependiendo de la densidad celular necesaria para cada experimento (entre 3 000 o 10 000 células/pozo). Del mismo modo, se toma una alícuota para a sembrar células en frasco T y continuar la línea celular [151].

3.1.2 Esterilización de las membranas

Una vez lavadas o neutralizadas, las membranas se esterilizaron mediante dos métodos. El primero consiste en esterilización con plasma de peróxido de hidrógeno, mientras que el segundo consiste en un lavado con etanol al 70% durante 20 min, seguido de dos lavados con PBS 1X durante 20 min cada uno, todo ello en campana.

Posteriormente, las membranas se colocaron en placas de cultivo de 96 o 24 pozos, según los tiempos de cultivo de hasta 5 o 15 días respectivamente, procurando cubrir toda la superficie del pozo o dejar membrana extra en los extremos del mismo, y se siguió con 5 min de luz UV por cada lado.



3.1.3 Viabilidad celular

Los cardiomioblastos H9c2 se sembraron a una densidad superficial de 3000 células/mm² sobre las membranas poliméricas, utilizando medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% v/v. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de incubación estándar a 37 °C y 5% de CO_2 durante periodos de 1, 3 o 5 días, en función de la cinética específica de la matriz a evaluar. De manera complementaria, para el ensayo de siembra microvolumétrica, se inocularon 10 000 células/pozo, suspendidas en una alícuota concentrada de 10 µL, en la sección central de cada pozo. Los dispositivos se sometieron a una preincubación estática de 2 h para favorecer la adhesión focal y el anclaje inicial celular; transcurrido este tiempo, se adicionó el volumen complementario de medio de cultivo de 90 µL hasta alcanzar un volumen final de 100 µL por cavidad, y se prosiguió con la incubación continua durante un periodo de 5 días.

3.1.3.1.1 Azul alamar

A los intervalos de tiempo designados, se añadió el reactivo Alamar Blue a una concentración final del 10% v/v, seguido de un periodo de incubación de 2 h. Posteriormente, el medio de cultivo de cada muestra fue recolectado y centrifugado; el sobrenadante resultante se transfirió a placas de microanálisis para cuantificar la señal de fluorescencia a longitudes de onda de excitación/emisión de 530/590 nm empleando un lector de microplacas BioTek Synergy HT (Bio-Tek, Winooski, VT, EE. UU.). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado independiente (N=3). Para el análisis estadístico de los datos, se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA bidireccional), estableciendo el umbral de significancia estadística en $\rho \leq 0.05$.

Una vez obtenida la absorbancia de cada muestra, se realizará un análisis con la $viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{celulas\ vivas}{celulas\ totales} * 100\%$ Ecuación 5.

$$viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{celulas\ vivas}{celulas\ totales} * 100\%$$ *Ecuación 5: Cálculo de viabilidad celular.*

3.1.4 Inmunocitoquímica

Para la evaluación preliminar de la adhesión celular, los cardiomioblastos cultivados sobre las membranas se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% p/v en PBS y se tiñeron con faloidina conjugada con Alexa Fluor 546 para visualizar el citoesqueleto de actina en la superficie del andamio. El análisis óptico se llevó a cabo utilizando un microscopio confocal de barrido láser Leica TCS SP5 equipado con un objetivo de inmersión en aceite D-Apochromatic de 40× (apertura numérica, AN = 1.2; Leica Microsystems, Ciudad de México, México), manteniendo una temperatura regulada de 25 °C durante la adquisición de las imágenes.



3.1.5 Degradación in vitro de membrana

El perfil de degradación hidrolítica se determinó mediante placas de cultivo de 96 pozos, en las que los fragmentos de membrana se colocaron para cubrir la superficie basal disponible máxima. Tras su esterilización previa, las muestras se sumergieron y se cultivaron en tres condiciones experimentales independientes: PBS 1X, medio DMEM base y medio DMEM suplementado con SFB al 10% v/v. El ensayo se extendió durante un periodo continuo de 8 días, con muestreos por triplicado cada 24 h. En cada punto de tiempo, se recolectó el sobrenadante de los pozos correspondientes y se centrifugó a 5 000 rpm durante 5 min para sedimentar los fragmentos poliméricos desprendidos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado residual se sometió a secado por evaporación hasta alcanzar el peso constante. La masa seca obtenida se cuantificó y se registró como el porcentaje de pérdida de masa respecto de la matriz original debido a procesos de degradación.

3.1.6 Viabilidad celular de membranas entrecruzadas con GTA

Con la finalidad de optimizar la biocompatibilidad celular de las membranas modificadas con GTA, los andamios electrohilados se sometieron a dos protocolos independientes de acondicionamiento y lavado posfabricación: el primer tratamiento consistió en lavados seriados con agua destilada y PBS 1X, mientras que el segundo consistió en la neutralización química de los residuos libres de GTA mediante glicina como agente bloqueante.

3.1.6.1 Neutralización de membranas

Se preparó una solución de trabajo de glicina de grado biológico (ChemCruz) a una concentración de 2 mM disuelta en agua destilada. Esta solución se adicionó a los pozos que contenían las membranas, asegurando la cobertura volumétrica total del material electrohilado. Los dispositivos se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h para propiciar la reacción de bloqueo de los aldehídos libres. Transcurrido este lapso, la solución se retiró y las membranas se sometieron a tres lavados consecutivos con agua destilada, de 20 min cada uno, bajo agitación suave.

3.1.6.2 Pruebas de fluorescencia

3.1.6.2.1 Vida y muerte

En los primeros y últimos días de incubación pos-siembra, las células cultivadas sobre las membranas tratadas se sometieron a un ensayo de viabilidad diferencial empleando calceína AM roja-naranja como indicador de vitalidad



citoplasmática y Sytox Green como indicador de compromiso de la membrana celular (muerte). La solución de trabajo se preparó disolviendo calceína AM a 5 µM y Sytox Green a 1 µM en medio DMEM libre de rojo de fenol. Las matrices se incubaron con este volumen de marcaje durante 20 a 30 min en oscuridad a 37 °C, previo a su análisis óptico.

3.1.6.2.2 Morfología

La organización de la arquitectura celular y la densidad poblacional se caracterizaron mediante la tinción combinada de los filamentos de actina y de los ácidos nucleicos. Para ello, se preparó una solución de tinción en PBS 1X que contenía faloidina conjugada con fluoróforo rojo a 2 µM y Sytox Green a 1 µM como contratinción nuclear específica para la cuantificación automatizada de células. Las muestras se incubaron con la solución de trabajo a temperatura ambiente durante 20 min. Finalmente, el exceso de colorante no unido se eliminó mediante tres lavados consecutivos con PBS 1X previos a la visualización microscópica.

3.2 RESULTADOS

3.2.1 Membranas de Colágeno-Quitosano y polímeros conductores

3.2.1.1 Proceso de esterilización

El proceso de optimización para el cultivo celular requirió evaluar, de manera preliminar, diferentes metodologías de esterilización aplicadas a las membranas electrohiladas. El monitoreo cualitativo del sistema durante un periodo de 7 días, detallado en la Figura 3.1, demostró que el tratamiento basado en lavados sucesivos con PBS 1X, combinado con la irradiación con luz ultravioleta (UV), previno eficazmente la proliferación de microorganismos bacterianos y fúngicos. Asimismo, la estabilidad del indicador de pH en el medio de cultivo, evidenciada por la ausencia de cambios en su coloración, confirmó que este protocolo no induce la lixiviación de subproductos ácidos o básicos de la matriz.

En el caso específico de las membranas modificadas mediante entrecruzamiento con GTA, la esterilización por plasma de peróxido de hidrógeno fue descartada debido a un cambio cromático macroscópico inmediato en los andamios; esta alteración óptica es indicativa de un proceso de degradación polimérica acelerado por la oxidación química de las cadenas conductoras de Pani o Ppy.

Por otro lado, debido a resultados citotóxicos de las membranas con GTA, se estableció un protocolo alternativo que consistió en un lavado inicial con glicina (Gly) para el bloqueo de residuos libres, seguido de una desinfección con etanol (EtOH) al 70% v/v e irradiación UV, estrategia que garantizó la esterilidad total y la viabilidad de los ensayos biológicos a largo plazo durante 15 días continuos de cultivo, sin incidencias de contaminación.





Figura 3.1. Seguimiento de la esterilización de las membranas durante 7 días.

3.2.1.2 Viabilidad celular

Una vez consolidada la esterilización de las matrices, los fragmentos se dispusieron en placas de cultivo de 96 pozos, asegurando la máxima cobertura de la superficie basal. La siembra biológica se realizó utilizando la línea celular H9c2 a una densidad nominal de 3000 células/cm², calculada en función de la geometría real del andamio y del pozo mediante un análisis de umbralización digitalizado con el software ImageJ (Figura 3.2). La respuesta de viabilidad celular frente a las diferentes membranas se muestra en la Figura 3.2a. Al tercer día de cultivo, la curva metabólica (Figura 3.2b) reveló diferencias significativas a favor de la matriz control de C-Ch; por el contrario, los sistemas modificados con polímeros conductores (C-Ch/Pani y C-Ch/Ppy) exhibieron perfiles de viabilidad que no difirieron estadísticamente respecto al grupo control de referencia en placa. Estos hallazgos moleculares demuestran que la incorporación de las fases electroactivas en la red polimérica no induce efectos citotóxicos intrínsecos en el linaje celular [152].

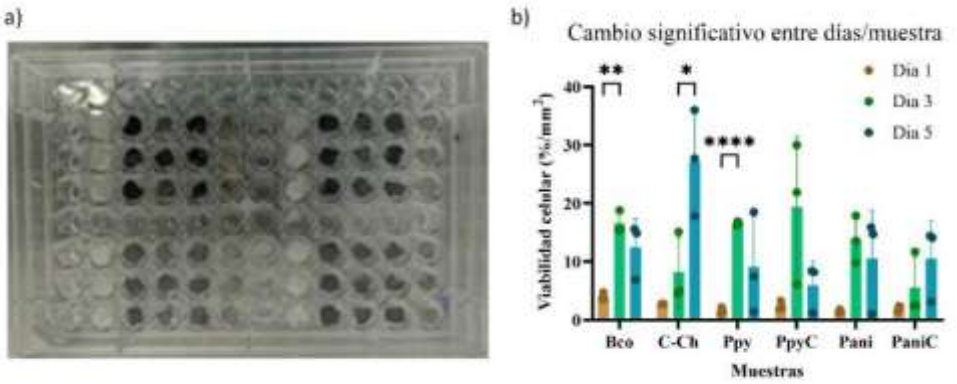


Figura 3.2. Placa de 96 pozos con las membranas evaluadas en el experimento 1 (N=3).

Esta tendencia de crecimiento celular se corroboró mediante la cuantificación directa de los cardiomioblastos adheridos tras un proceso de tripsinización y el conteo por exclusión con azul de tripano (Figura 3.3). Los resultados cinéticos revelaron un incremento exponencial de la densidad celular hacia el día 3, duplicando aproximadamente la población registrada en el día 1, lo que evidencia una correlación directa con los perfiles de actividad metabólica. No obstante, hacia el quinto día de incubación, tanto las membranas compuestas como las muestras en blanco (Bco) presentaron una disminución del número de células viables por pozo, lo que se tradujo en un descenso de la viabilidad global del sistema.

Este comportamiento contractivo no se observó en los controles puros de Coll y Ch, que mantuvieron un incremento estadísticamente significativo en la población de células vivas. Este fenómeno de declive celular tardío en los compósitos electroactivos se atribuye directamente a las transiciones cinéticas de degradación hidrolítica y disolución parcial que experimenta la matriz estructural de la membrana bajo condiciones de incubación prolongada, como se cuantifica mediante el ensayo de pérdida de peso seco presentado en la Figura 3.4 durante un periodo de 9 días.

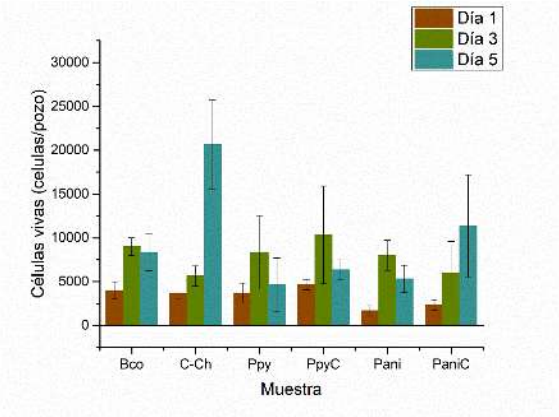


Figura 3.3. Viabilidad celular por conteo con azul de tripano de las células tripsinizadas de las membranas.



3.2.1.3 Degradación de la membrana

A pesar de los perfiles favorables de viabilidad y proliferación celular previamente descritos, las membranas nanoestructuradas evidenciaron procesos concomitantes de degradación hidrolítica en condiciones cinéticas de incubación, manifestados macroscópicamente mediante la disolución progresiva de la matriz polimérica. Como se cuantifica en las curvas de pérdida de peso seco de la Figura 3.4, el grado de degradación dependió críticamente de la naturaleza química del medio de inmersión; se determinó de manera consistente que todas las variantes de andamios presentaron una mayor resistencia estructural al ser suspendidas en PBS 1X en comparación con los ensayos realizados en medio DMEM base y en DMEM suplementado [153].

Esta aceleración en la tasa de degradación dentro del medio de cultivo está íntimamente relacionada con la complejidad bioquímica del DMEM, cuyos componentes solubles (aminoácidos, vitaminas, sales y proteínas plasmáticas derivadas del suero) ejercen un efecto de solvatación competitivo e interactúan activamente con los sitios hidrofílicos expuestos de las cadenas de colágeno y quitosano, debilitando los enlaces intermoleculares secundarios y acelerando la escisión hidrolítica de la red [154].

Estos hallazgos ponen de manifiesto la necesidad imperativa de optimizar la resistencia química intrínseca del andamio para prolongar su ventana operativa en entornos biológicos complejos. Dicho fenómeno de inestabilidad estructural fue marcadamente prematuro en las membranas de control de Coll-Ch, que iniciaron una pérdida de masa estadísticamente significativa a partir del tercer día de evaluación. Por el contrario, la incorporación de las fases electroactivas modificó favorablemente el comportamiento cinético; las membranas modificadas con Ppy demostraron una estabilidad hidrolítica sustancialmente mayor en ambos medios, efecto atribuible a las interacciones electrostáticas robustas y al empaquetamiento molecular denso que el Ppy establece con la matriz proteica, lo que restringe de forma efectiva la difusión interna del agua y protege los dominios lábiles del colágeno frente al ataque hidrolítico temprano.

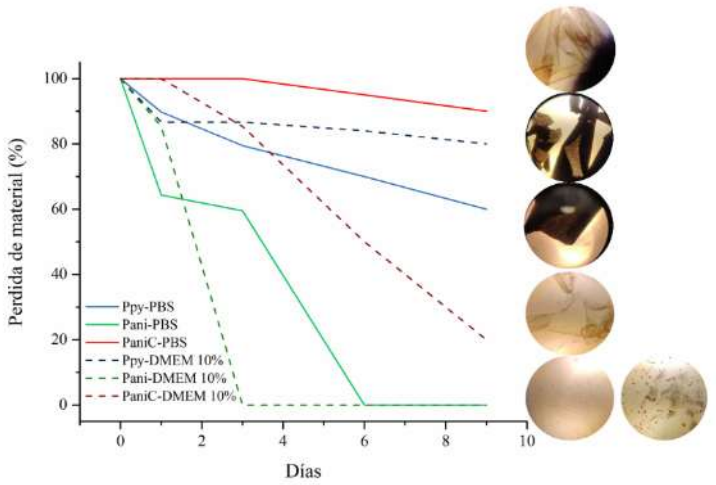


Figura 3.4. Degradación de la membrana por pérdida de peso durante 9 días.



3.2.1.4 Inmunocitoquímica

La evaluación preliminar de la adhesión y la organización arquitectónica de los miocitos tras 24 h de interacción con las superficies de C-Ch/PANI y C-Ch/Ppy se analizó mediante microscopía confocal de barrido láser, cuyos perfiles ortogonales se exponen en la Figura 3.5 y las micrografías de punto en las Figuras 3.5c y 3.5d. Ambas imágenes confirman la afinidad celular y el anclaje físico de los cardiomioblastos sobre la superficie del andamio, y se identifica una emisión de fluorescencia azul de fondo que corresponde a la señal intrínseca (autofluorescencia) del material polimérico. Sin embargo, se observó que las proyecciones del citoesqueleto de actina en las muestras con polímeros conductores presentaron un área citoplasmática menor en comparación con la morfología extendida del grupo control sobre cubreobjetos (Figura 3.5b)[155], [156]. Esta restricción espacial es indicativa de una respuesta inicial de estrés celular, consistente con la fase de adaptación y con el reconocimiento de los receptores de membrana (integrinas) por parte de la topografía y la composición del nuevo biomaterial [157].

Este retraso en la estabilización homeostática celular y en la adaptación volumétrica diferencial se relaciona con la rugosidad nanométrica inherente a los polímeros conductores, que contrasta con la superficie bidimensional homogénea y plana de las placas de cultivo convencionales. Dicho efecto fue marcadamente evidente en los andamios de C-Ch/Ppy, donde la presencia de interacciones electrostáticas localizadas de alta intensidad impuso una barrera energética inicial que restringió la polarización celular y moduló transitoriamente la polimerización y la organización tempranas de los filamentos de actina del citoesqueleto [158].

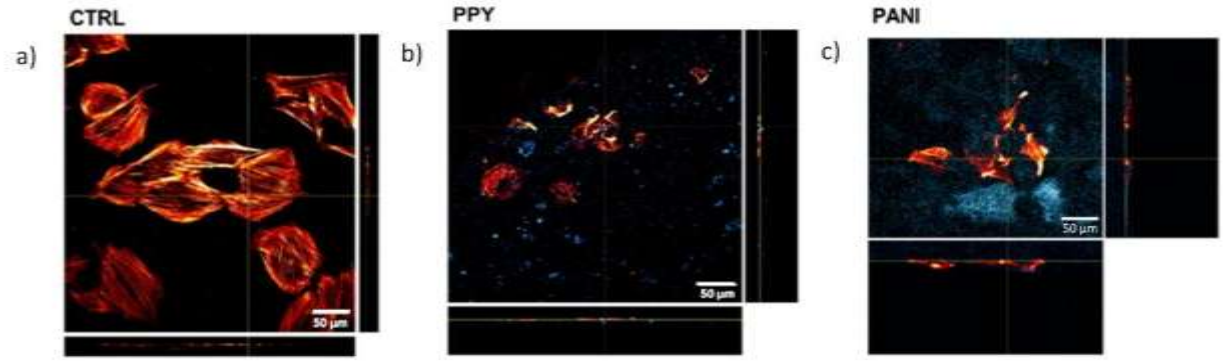


Figura 3.5. Imágenes ortogonales de las micrografías por confocal de las membranas en cultivo de 24 h: a) control de células cultivadas en cubreobjetos, b) membrana con Ppy, y c) membrana con Pani.

3.2.2 Viabilidad celular de membranas entrecruzadas con GTA

3.2.2.1 Previo a neutralización de membranas

Al evaluar las membranas cuya estabilización estructural dependió únicamente de la reacción de entrecruzamiento con GTA seguida de lavados físicos convencionales con PBS 1X, se analizó el perfil de viabilidad metabólica celular mediante el ensayo de Alamar Blue. Los resultados cinéticos derivados de esta primera aproximación se



presentan en la Figura 3.6. Para este diseño experimental, las dimensiones de las membranas se establecieron estratégicamente para cubrir tanto la superficie basal como la porción inferior del cilindro del pozo de cultivo. Como consecuencia de esta configuración geométrica, durante la fase de máximo hinchamiento hidrodinámico, los andamios poliméricos cubrieron por completo el área útil de las placas de 96 pozos.

Esta condición operativa arrojó respuestas biológicas marcadamente diferenciadas. En el caso de las matrices modificadas con Ppy, se registraron viabilidades celulares superiores al 75% durante las primeras 24 h de interacción, comportamiento que se mantuvo estable hasta completar 72 h. Sin embargo, al alcanzar las 120 h de incubación, la actividad metabólica experimentó una contracción severa, disminuyendo a valores inferiores al 50% y evidenciando una clara respuesta citotóxica del sistema. Por su parte, los andamios formulados con Pani exhibieron valores de viabilidad que rondaron el 60% en las primeras 24 h, seguidos de un declive crítico y sostenido en los puntos temporales de 72 y 120 h, lo que evidencia igualmente un perfil de alta citotoxicidad celular.

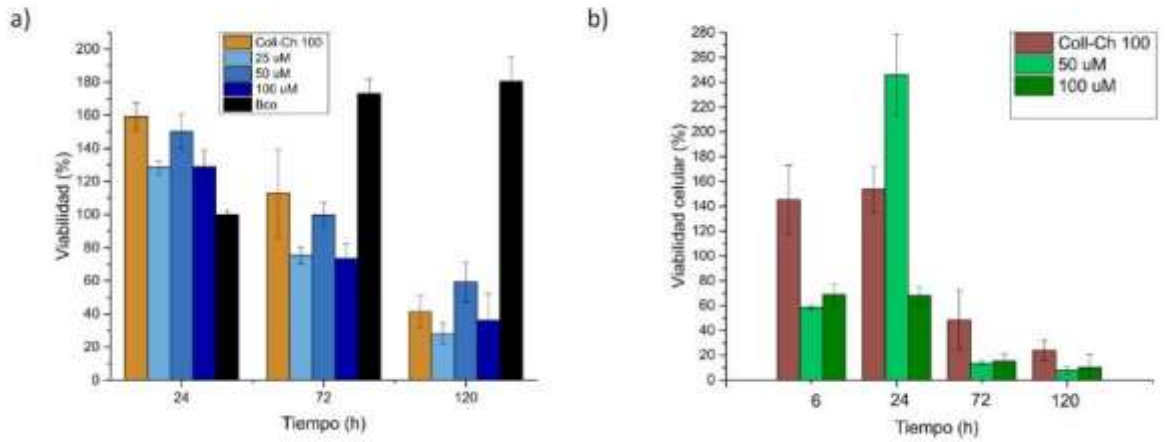


Figura 3.6. Perfil cuantitativo de viabilidad celular en membranas funcionalizadas con: (a) Ppy y (b) Pani, evaluado durante un periodo continuo de 120 horas.

Con el propósito de esclarecer si la viabilidad registrada correspondía exclusivamente al nicho celular colonizado sobre el andamio y determinar si el tiempo asignado para la adhesión inicial de los miocitos regulaba su persistencia tanto en la superficie como en la sección basal del pozo, se desarrolló un estudio cinético complementario empleando membranas de Ppy. Como se detalla en la Figura 3.7, la siembra celular se realizó confinando inicialmente la población en alícuotas concentradas de 10 µL, depositadas directamente sobre el material electrohilado. Posteriormente, la restitución del volumen total (los 90 µL restantes de medio de cultivo completo) se realizó de manera seriada a intervalos de 1, 2, 3 y 4 h pos-siembra, manteniendo los sistemas bajo incubación estándar a 37 °C en oscuridad.



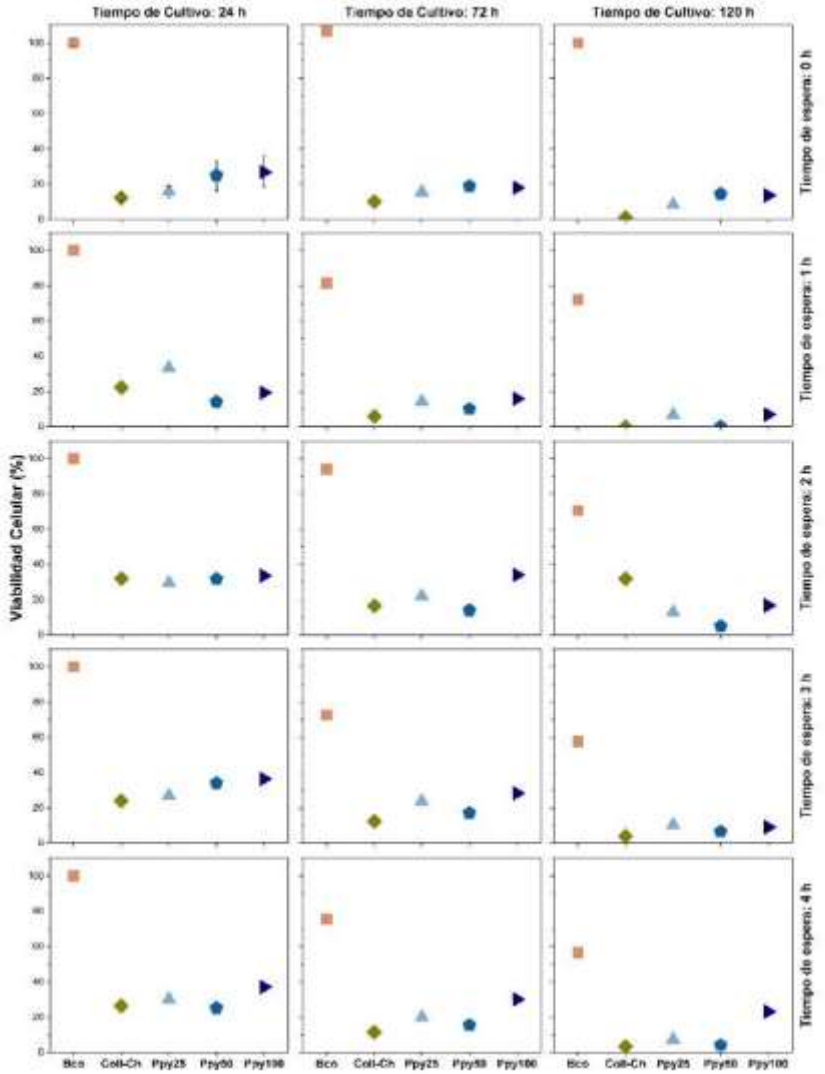


Figura 3.7. Cinética de viabilidad celular en membranas de Ppy, analizando el efecto del tiempo de anclaje temprano durante las primeras 4 horas y su evolución hasta las 120 horas (N = 3).

El monitoreo reveló que interrumpir el periodo de fijación pasiva a primera hora se asociaba con una viabilidad significativamente menor. Este fenómeno se atribuye a que los cardiomioblastos aún no habían consolidado sus complejos de adhesión focal con la microarquitectura fibrilar, lo que propició la pérdida masiva de biomasa debido a fuerzas de cizallamiento e hidrodinámicas durante las maniobras de recambio de medio. En contraste, a partir de las 2 h de incubación estática, la viabilidad celular mostró un incremento sustancial y mantuvo una tendencia al alza durante el seguimiento temporal. Comportamientos cinéticos análogos se documentaron para los intervalos de 3 y 4 h, sin evidenciar variaciones estadísticamente significativas con respecto al umbral crítico alcanzado a las



2 h, lo que demostró que un periodo de 120 minutos es el tiempo nominal idóneo para la estabilización del contacto celular inicial.

El efecto de la funcionalización con Pani sobre la respuesta biológica se ilustra en la Figura 3.8. Se determinó que, de manera análoga a las membranas de Ppy, a partir de las 2 h de incubación no se observan variaciones estadísticamente significativas en la viabilidad celular en comparación con los puntos temporales de 3 y 4 h. Sin embargo, se identificó un efecto dosis-dependiente negativo sobre la supervivencia celular, caracterizado por una reducción progresiva de la viabilidad con el incremento de la concentración del agente entrecruzante GTA hasta 100 µM.

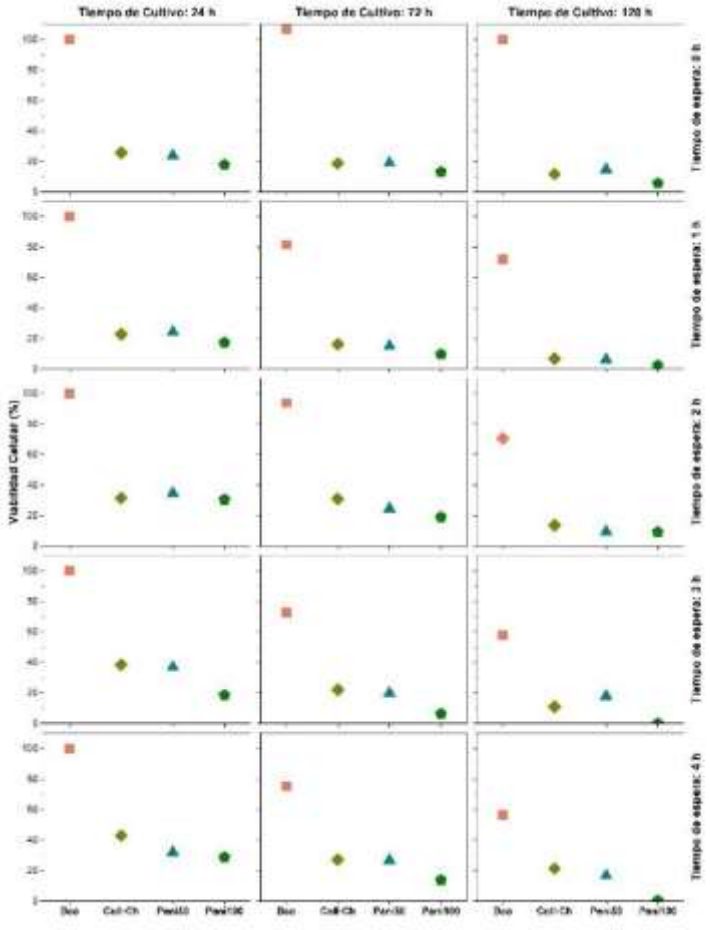


Figura 3.8. Cinética de viabilidad celular en membranas de Pani, analizando el efecto del tiempo de anclaje temprano durante las primeras 4 horas y su evolución hasta las 120 horas (N = 3), donde: a) Ctrl con 100 µM, b) 50 µM y c) 100 µM.

Esta dinámica de colonización superficial temprana se corroboró cualitativamente mediante microscopía óptica convencional a las 2 h de cultivo (Figura 3.9), identificándose la formación de cúmulos y agregados celulares altamente refringentes y brillantes distribuidos sobre la topografía porosa. No obstante, el seguimiento



microscópico *in vivo* a largo plazo evidenció limitaciones técnicas severas debido a la alta transparencia intrínseca tanto de los cardiomioblastos H9c2 como de las nanofibras del andamio, sumadas a la presencia de artefactos ópticos e impurezas moleculares remanentes en el material electrohilado que interferían con la refracción de la luz y dificultaban la discriminación inequívoca de las células individuales.

A pesar del éxito alcanzado al mapear y optimizar la ventana cronológica de anclaje celular, el sistema continuó mostrando un efecto citotóxico generalizado a partir de las 120 h en todas las variantes evaluadas. Esta persistencia del declive metabólico tardío permitió concluir que el proceso de lavado físico con PBS resulta insuficiente para eliminar las trazas de GTA atrapadas en la densa red de nanofibras. Los residuos del agente químico actúan como un reservorio de aldehídos libres que lixivian gradualmente hacia el microentorno e inducen la apoptosis celular, lo que justifica la necesidad imperativa de implementar una estrategia de neutralización química complementaria.

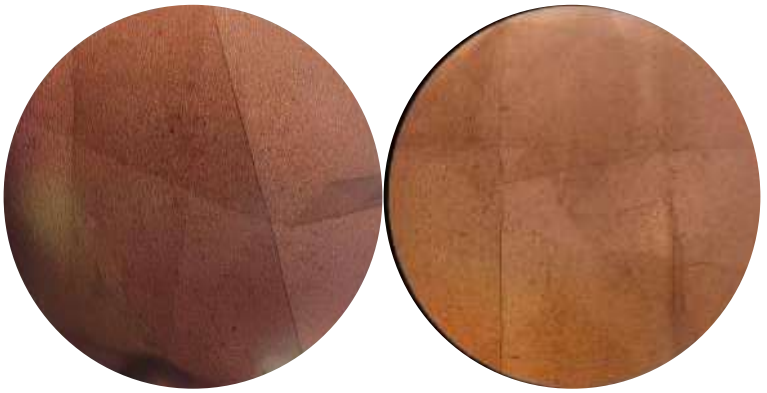


Figura 3.9. Micrografía óptica de los cardiomioblastos H9c2 distribuidos sobre la superficie de la membrana tras 2 h de cultivo estático y posterior restitución del volumen de medio (objetivo 10X): a) Ppy y b)Pani.

3.2.2.2 Después de neutralización de membranas

Con base en la citotoxicidad tardía identificada en ensayos previos, se implementó un protocolo de desactivación química mediante lavados con Gly para neutralizar de forma eficiente los residuos reactivos de GTA atrapados en la matriz [159]. Como se expone en la Figura 3.10, esta estrategia modificó drásticamente el comportamiento biológico del sistema, lo que se tradujo en viabilidades metabólicas consistentemente superiores al 75%.

El incremento sustancial en la viabilidad celular tras este tratamiento se debe a la reactividad de los grupos amino de la glicina (H_2N-CH_2-COOH). El glutaraldehído es un agente biofuncional que se enlaza a las proteínas mediante la formación de bases de Schiff [160]; sin embargo, las moléculas que quedan parcialmente fijadas dejan un grupo aldehído (-CHO) libre y altamente reactivo expuesto hacia el exterior. Estos aldehídos libres son responsables de la citotoxicidad, ya que reaccionan de forma inespecífica con las proteínas y las membranas de las células sembradas, lo que induce estrés oxidativo y apoptosis celular. Al introducir la Gly, sus grupos amino primarios reaccionan preferentemente con estos aldehídos residuales mediante una reacción de condensación, bloqueándolos químicamente (saturación de sitios activos) y transformándolos en compuestos estables y biológicamente inertes.



Complementariamente, el lavado posterior con EtOH al 70% v/v, realizado antes de finalizar el proceso de esterilización, aportó un beneficio dual crítico para el éxito del cultivo. Además de actuar como un agente antimicrobiano de amplio espectro que desnaturaliza proteínas plasmáticas de patógenos potenciales, el etanol al 70% funciona como un solvente orgánico altamente eficiente para solubilizar y lixiviar cualquier traza residual de GTA libre o de complejos solubles de GTA-glicina que no lograron fijarse a la matriz polimérica y que permanecían atrapados por capilaridad en la densa red de nanofibras[161]. Asimismo, la rápida evaporación del alcohol facilita la deshidratación controlada y la posterior estabilización estéril del andamio antes de la adición del medio de cultivo definitivo.

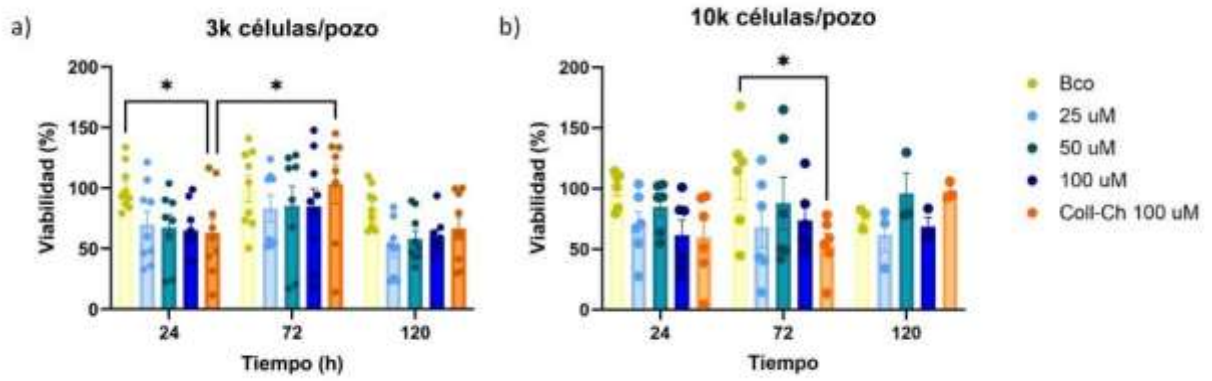


Figura 3.10. Perfil cuantitativo de viabilidad celular con azul alamar en membranas de Ppy tratadas con Gly y EtOH al 70%, evaluadas durante 120 horas, empleando dos densidades de siembra: (a) 3 000 células/pozo y (b) 10 000 células/pozo (N = 3).

Como parte del protocolo de validación a largo plazo, se comenzó a evaluar 3 000 células por pozo en placas de 96 pozos (Figura 3.11a). Bajo esta condición, se registró una viabilidad superior al 70% desde las primeras 24 h, la cual se mantuvo estable en los intervalos subsecuentes; si bien se detectó un descenso marginal de la actividad metabólica a las 120 h, este descenso no presentó un cambio estadísticamente significativo, lo que convalidó la biocompatibilidad molecular lograda en las membranas de Ppy (N = 3).

Ante la hipótesis de que una baja densidad celular pudiera inducir un aislamiento estocástico de los cardiomioblastos, limitando la señalización paracrina y retrasando la formación de colonias confluentes, se replicó el diseño experimental (N = 3) incrementando la densidad a 10 000 células por pozo (10k/pozo). Como se ilustra en la Figura 3.10b, esta modificación elevó la viabilidad por encima del 80% a las 24 h y la mantuvo en un rango cercano al 100% hasta las 120 h de cultivo. A pesar de este incremento en el rendimiento metabólico, la densidad de 10k/pozo introdujo una mayor dispersión de los datos entre réplicas independientes, lo que se tradujo en desviaciones estándar significativamente mayores.

En general, este conjunto de resultados convalida la biocompatibilidad de las matrices nanoestructuradas tras el proceso de optimización química y demuestra que no existe una variación estadísticamente significativa en la respuesta celular respecto a la concentración de GTA empleada durante la etapa de entrecruzamiento [162]. La única excepción cuantitativa correspondió a un incremento, aunque no significativo, en la viabilidad de los



andamios más porosos, manufacturados con 100 µM de GTA y caracterizados por presentar diámetros de nanofibras de 120 nm, lo que sugiere que esta microarquitectura específica ofrece una mayor área superficial efectiva y canales de interconexión más propicios para el nicho celular.

Finalmente, la interacción física se caracterizó mediante microscopía óptica convencional a las 72 h de cultivo (Figura 3.11). Las micrografías revelaron la presencia de cardiomioblastos H9c2 extendidos y morfológicamente adheridos en la periferia del pozo de cultivo y en la interfaz con el biomaterial. Sin embargo, es necesario precisar que la visualización directa de las células sobre el cuerpo principal del andamio continuó restringida debido a la coincidencia de los índices de refracción y a la transparencia mutua entre el tejido en crecimiento y las nanofibras de la membrana, tal como se describió en la fase experimental previa.



Figura 3.11. Caracterización morfológica por microscopía óptica de los cardiomioblastos H9c2 a las 72 h de cultivo sobre la superficie de la membrana modificada con Ppy, neutralizada con Gly y esterilizada con EtOH (objetivo 10X).

En el caso de las matrices funcionalizadas con Pani (Figura 3.12), se registraron valores superiores de viabilidad celular al emplear una densidad inicial de siembra de 3000 células/pozo. Bajo esta condición, el perfil cinético mostró un incremento significativo de la actividad celular a las 72 h de incubación, seguido de un declive progresivo hasta las 120 h. En contraposición, al utilizar una densidad mayor (10 000 células/pozo), la viabilidad se mantuvo en un régimen estacionario, sin variaciones significativas desde las 24 h hasta el final del periodo de evaluación a las 120 h.

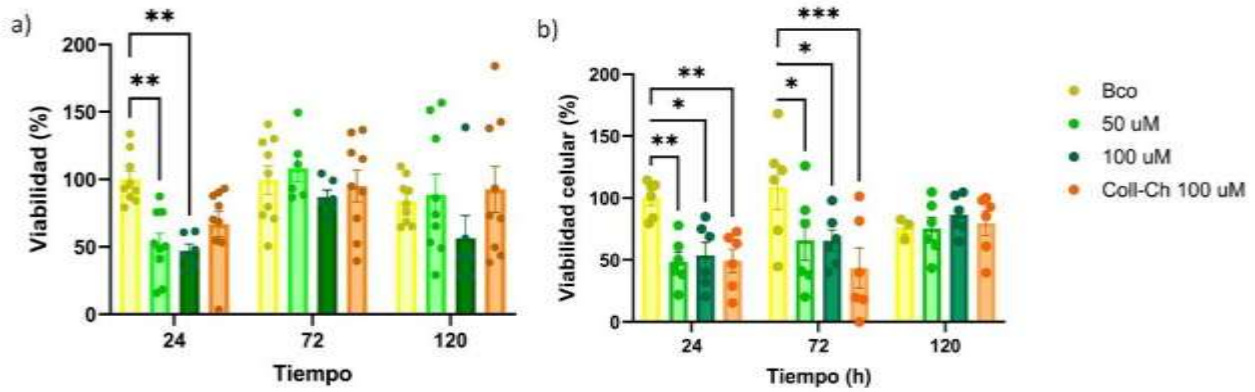


Figura 3.12. Perfil cuantitativo de viabilidad celular en membranas de Pani tratadas con Gly y EtOH al 70%, evaluadas durante 120 horas, empleando dos densidades de siembra: (a) 3 000 células/pozo y (b) 10 000 células/pozo (N = 3).

3.2.2.3 Pruebas de fluorescencia

3.2.2.3.1 Vida y muerte

Con el propósito de establecer un método de monitoreo continuo para evaluar el comportamiento de los cardiomioblastos sobre las membranas, se investigó el uso de tinciones diferenciales de viabilidad (*live/dead*). Tradicionalmente, los protocolos más empleados recurren a la combinación de calceína AM como indicador de vitalidad y yoduro de propidio (PI) como marcador de muerte celular por apoptosis; ambas sondas emiten señales detectables principalmente en las regiones verde y roja del espectro. No obstante, al caracterizar las matrices compuestas C-Ch/Ppy y C-Ch/Pani, se identificó una intensa señal de autofluorescencia intrínseca proveniente de los polímeros constituyentes. Como se documenta en la Figura 3.13, al excitar la membrana sin teñir con un láser de argón a 488 nm, se generó una alta emisión de ruido óptico en el canal verde, lo que imposibilita y descarta el uso de la calceína AM convencional. En contraste, al desplazar la línea de excitación a 514 nm y evaluar las regiones espectrales correspondientes a tonos rojos y naranjas, dicho fenómeno de interferencia disminuyó significativamente, lo que justificó la búsqueda de fluoróforos alternativos con perfiles de emisión desplazados hacia longitudes de onda más largas.



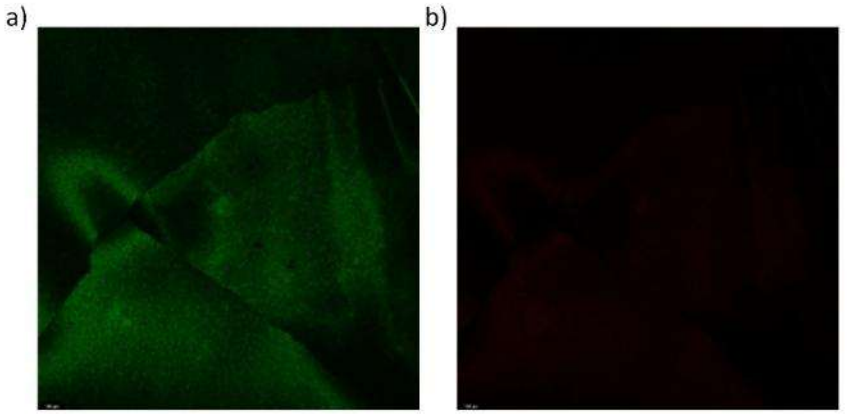


Figura 3.13. Caracterización de la respuesta autofluorescente intrínseca en membranas de control de Coll-Ch bajo líneas de excitación de 488 y 514 nm empleando un láser de argón.

Como parte de este proceso de optimización, se evaluaron otras combinaciones fluorogénicas cuyos resultados se presentan en la Figura 3.14. Los ensayos con CellTrace Violet examinados mediante microscopía de epifluorescencia revelaron un ruido óptico severo debido a la autofluorescencia de la matriz bajo excitación con luz UV [163]. Por su parte, la tinción intracelular de calcio mediante Fluo-4 (Figura 3.14c) también presentó un solapamiento espectral con el andamio polimérico, lo que limitó su idoneidad para el monitoreo continuo de la viabilidad; no obstante, se determinó que esta sonda tiene el potencial de cuantificar flujos iónicos dinámicos en etapas posteriores del proyecto, cuando la membrana sea sometida a regímenes de electroestimulación. En ambos casos experimentales se utilizó yoduro de propidio como control de muerte celular, induciendo la lisis por choque térmico para obtener señales positivas cuantificables; sin embargo, el ruido de fondo obligó a descartar estos sistemas de tinción.

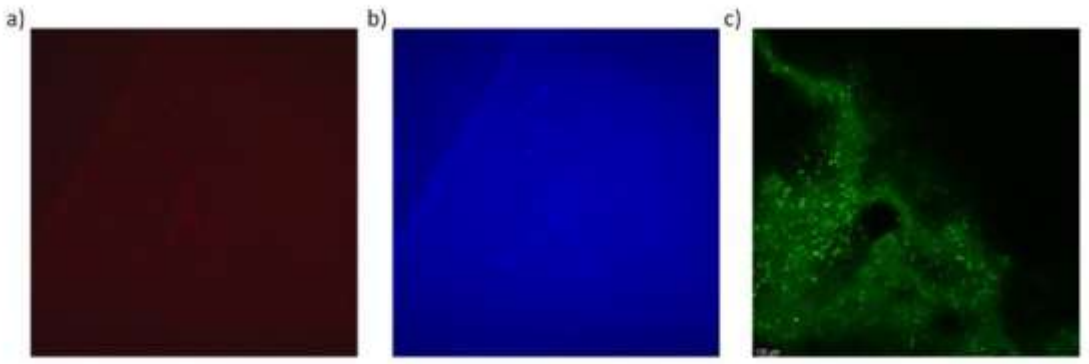


Figura 3.14. Ensayos preliminares de optimización mediante microscopía de fluorescencia, evaluando: (a) yoduro de propidio, (b) CellTrace Violet y (c) Fluo-4.



A partir de estas restricciones ópticas, se estandarizó con éxito un protocolo robusto basado en el uso combinado de la calceína AM roja (indicador de vida) y de Sytox Green (indicador de muerte). Los monitoreos sistemáticos se efectuaron a las 24, 72, 120, 168 y 240 h de cultivo. En la Figura 3.15 se presentan micrografías representativas obtenidas a las 24 h pos-siembra, en las que se evidencia visualmente la atenuación de la interferencia de la membrana y se valida la optimización metodológica del ensayo.

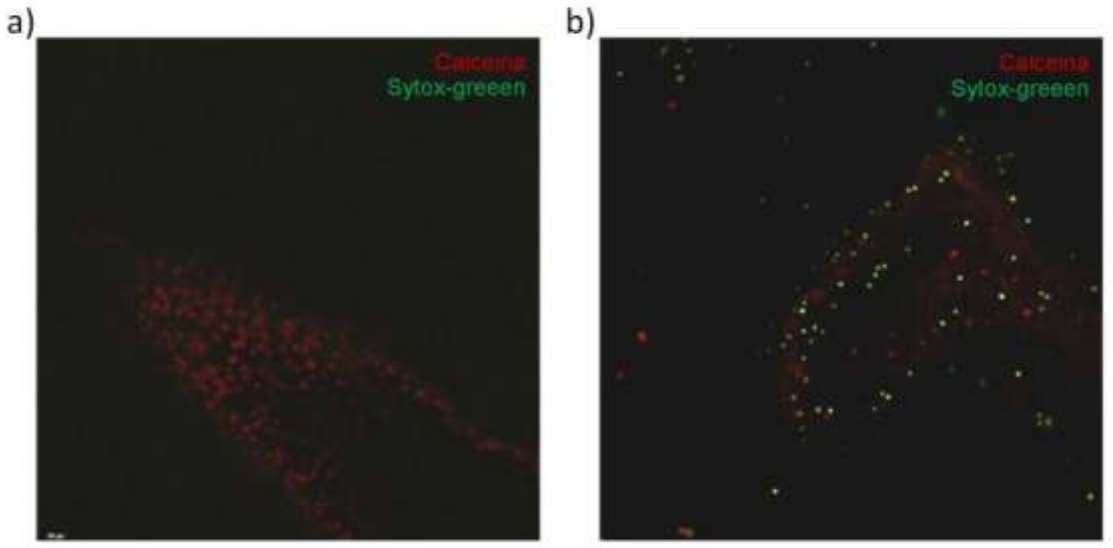


Figura 3.15. Micrografías de microscopía confocal de barrido láser aplicando el protocolo optimizado con calceína AM roja y Sytox Green: (a) membrana Coll-Ch, y (b) Coll-Ch/Ppy.

En la Figura 3.15a es posible discernir con claridad la señal citoplasmática de las células viables distribuidas sobre la membrana de Coll-Ch, la cual preserva su topografía porosa y ondulada característica. Asimismo, en la Figura 3.15b se aprecia una señal mixta que evidencia la coexistencia de cardiomioblastos metabólicamente activos con núcleos de células muertas teñidos de verde brillante por la intercalación de Sytox Green en el ADN permeabilizado de células sobre la membrana Coll-Ch/Ppy.

3.2.2.3.2 Inmucitoquímica

Como análisis de punto final para evaluar cualitativamente la influencia de la microarquitectura sobre la morfología celular, las membranas se sometieron a un protocolo de tinción de afinidad con faloidina conjugada para el marcaje de los filamentos de actina del citoesqueleto. En la Figura 3.16a se ilustra la morfología predominantemente alargada y fusiforme de los cardiomioblastos cultivados sobre las membranas de Ppy al quinto día de incubación, a pesar de la persistencia de cierta fluorescencia de fondo del material. Un hallazgo relevante



en la historia de la colonización del andamio fue la observación de células que exhibían curvaturas o adaptaciones tridimensionales en su estructura; este fenotipo sugiere un acoplamiento físico y un guiado morfológico de las células a lo largo de los poros interconectados y del relieve de las nanofibras electrohiladas.

Por otra parte, la incorporación de Sytox Green como contratinción nuclear robusta facilitó la localización espacial y la cuantificación analítica posterior de la población celular. Como se observa en la Figura 3.16b, la transición en la representación visual y el contraste óptico se atribuyen al solapamiento controlado de las señales de emisión de ambos canales cromáticos. No obstante, esta aproximación dual permitió confirmar de manera inequívoca tanto el mantenimiento del fenotipo alargado de los cardiomioblastos como el marcaje nítido de los ácidos nucleicos en las células permeabilizadas, lo que validó la idoneidad de la matriz como soporte estructural electroactivo.

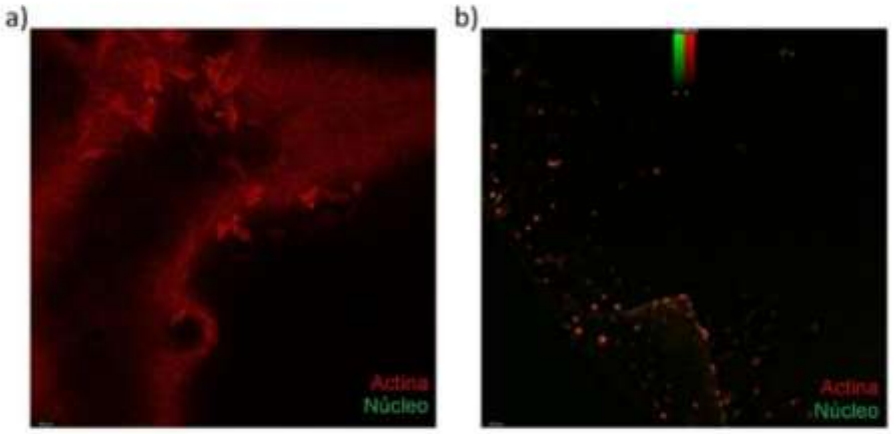


Figura 3.16. Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de membranas de Ppy al día 5 de cultivo: (a) marcaje del citoesqueleto con faloidina y (b) contratinción dual de faloidina con Sytox Green.

3.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.3.1 Dinámica del proceso de esterilización en matrices electroactivas

El desarrollo de un protocolo de esterilización óptimo para andamios nanoestructurados basados en colágeno-quitosano, combinados con Pani o Ppy, constituye un desafío crítico en la ingeniería de tejidos. El monitoreo cualitativo durante 7 días demostró que la combinación de lavados físicos con PBS 1X e irradiación UV proporciona una descontaminación efectiva sin inducir alteraciones macroscópicas en las membranas. La estabilidad del pH del medio de cultivo corrobora la ausencia de subproductos de degradación, ya sean ácidos o básicos, en forma libre, lo que valida la inocuidad inicial del método.



Sin embargo, el comportamiento asimétrico observado al someter las membranas entrecruzadas con GTA al plasma de peróxido de hidrógeno evidencia la susceptibilidad fisicoquímica de estos sistemas. El plasma de H_2O_2 genera especies reactivas de oxígeno de alto poder oxidante que atacan preferencialmente los dobles enlaces conjugados de la Pani y del Ppy. Esta sobreoxidación podría estar rompiendo la deslocalización electrónica de la cadena principal de los polímeros conductores, induciendo una degradación estructural irreversible que anula sus propiedades de transporte de carga antes de la interacción con las células.

Para resolver esta limitación, el diseño de una ruta alternativa que involucra el bloqueo químico latente con Gly, seguido de la desinfección con etanol al 70% v/v y la irradiación UV, demostró ser termodinámicamente compatible con los compósitos. El etanol al 70% actúa mediante la desnaturalización de las proteínas de la membrana celular de patógenos potenciales, y su tensión superficial favorece la penetración capilar en la densa red de nanofibras, facilitando el arrastre de impurezas sin perturbar la estabilidad de las fases conductoras dopadas, lo que garantiza una ventana de esterilidad de hasta 15 días.

3.3.2 Biocompatibilidad metabólica inicial

Los ensayos de viabilidad metabólica a las 72 h demostraron que, si bien la matriz control de C-Ch exhibe una ventaja proliferativa inicial debido a la máxima exposición de los motivos de adhesión celular nativos del colágeno, los compósitos funcionalizados con Pani y Ppy no muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al control cuantitativo de la placa. La integración de polímeros conductores sintéticos dispersos en la matriz proteica no induce citotoxicidad intrínseca aguda [164], lo cual constituye un criterio esencial para andamios electroactivos destinados a tejidos excitables.

La cuantificación por exclusión con azul de tripano corroboró un incremento exponencial de la población celular al tercer día, duplicando los valores del día 1 y validando la fase logarítmica de crecimiento sobre los andamios electrohilados.

Este declive del quinto día se debe a la cinética de degradación hidrolítica acelerada, como se muestra en la Figura 3.4. En sistemas de mezclas físicas sin entrecruzar o con bajo acoplamiento, el agua y las macromoléculas del medio DMEM disuelven de manera asimétrica los componentes hidrofílicos del andamio. Al desestructurarse mecánicamente la nanofibra mediante hidrólisis, las células pierden los puntos de anclaje físicos necesarios para activar las vías de señalización intracelular de supervivencia dependientes de las integrinas. Este fenómeno, conocido como anoikis (apoptosis inducida por pérdida de adhesión sustrato-dependiente) [165], sumado a la posible lixiviación de oligómeros insolubles de Pani o Ppy libres que saturan el microentorno celular [166], explica la reducción poblacional observada hacia el quinto día, lo que establece la necesidad de incorporar estrategias de entrecruzamiento molecular denso.



3.3.3 Degradación de la membrana

La cinética de pérdida de peso seco demostró que la degradación de las membranas nanoestructuradas se acelera drásticamente en presencia de medio DMEM (base y suplementado con SFB) en comparación con el amortiguador PBS 1X. Desde una perspectiva fisicoquímica, esta divergencia responde a los fenómenos de solvatación competitiva e interacción electrostática que ejercen los componentes del medio complejo sobre la superficie de las nanofibras.

El PBS 1X es una solución salina isotónica simple que induce un hinchamiento por presión osmótica, pero mantiene un equilibrio iónico relativo que preserva parcialmente las interacciones electrostáticas secundarias (puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals) entre las cadenas de colágeno y de quitosano. En contraste, el medio DMEM es una matriz bioquímica densa que contiene aminoácidos polares, vitaminas, nucleósidos y una elevada concentración de iones divalentes. Estos solutos actúan como agentes que compiten directamente por los sitios de unión hídrica del colágeno y del quitosano [167]. Las proteínas globulares del suero fetal bovino, como la albúmina, poseen una alta afinidad por las cadenas hidrofílicas del quitosano, lo que ejerce un efecto de intercambio de surfactante o de microsolvatación que debilita el empaquetamiento intermolecular de la nanofibra [168]. Esto facilita la penetración de moléculas de agua en los dominios amorfos de la red proteica, acelerando la escisión hidrolítica de las uniones lábiles y promoviendo la disolución prematura observada desde el día 3 en el control Coll-Ch.

La estabilidad significativamente mayor observada en las membranas modificadas con Ppy bajo las mismas condiciones agresivas confirma que la fase electroactiva actúa como un escudo microestructural protector. Debido a que el Ppy establece interacciones electrostáticas π-π y puentes de hidrógeno densos con los residuos de aminoácidos del colágeno, se forma un entramado molecular altamente compacto y de baja tortuosidad. Este empaquetamiento restringe espacialmente la difusión interna de las macromoléculas del DMEM y del agua hacia el núcleo de la fibra, retrasando la desconsolidación física del andamio y prolongando su integridad morfológica e idoneidad biológica.

3.3.3.1 Anclaje celular temprano y respuestas adaptativas al sustrato conductor

Las micrografías de microscopía confocal de barrido láser y las proyecciones de puntos confirman que, a las 24 h de cultivo, existe una afinidad biointerfacial efectiva que permite el anclaje físico de los cardiomioblastos a los andamios C-Ch/Pani y C-Ch/Ppy. La presencia de autofluorescencia azul intrínseca en la matriz es una propiedad óptica típica de las estructuras helicoidales del colágeno y de los anillos conjugados de los polímeros conductores, la cual, aunque útil para mapear la topografía del soporte, impone desafíos en la resolución de imagen.

El hallazgo de que el área citoplasmática y la extensión del citoesqueleto de actina en las membranas electroactivas son menores que en el control plano de vidrio representa una respuesta mecanobiológica clásica de adaptación al sustrato biomimético [169]. Las placas de cultivo convencionales y los cubreobjetos proporcionan una superficie hidrofílica bidimensional, rígida e infinitamente plana, en la que las células pueden polimerizar filamentos de actina de manera isotrópica y rápida. En contraste, los andamios electrohilados presentan una topografía



tridimensional porosa caracterizada por una rugosidad nanométrica inherente aportada por los agregados de Pani o Ppy.

En los andamios de C-Ch/Ppy, donde las intensas interacciones electrostáticas locales modifican la distribución de carga superficial, se impone una barrera energética inicial que restringe temporalmente la dinámica de polimerización de la actina G hacia la actina F [170], [171]. Este retraso cinético en el plano bidimensional se traduce en una morfología inicialmente más compacta y en un estado transitorio de estrés adaptativo. No obstante, este confinamiento geométrico inicial es indispensable para inducir posteriormente un guiado morfológico tridimensional auténtico, que mimetiza con precisión el microentorno de la matriz extracelular (ECM) nativa del miocardio.

3.3.4 Análisis de sistemas estabilizados mediante entrecruzamiento molecular

3.3.4.1 Optimización de la ventana de siembra preliminar

Los perfiles de viabilidad celular evaluados antes de la neutralización con Gly revelaron una limitación crítica: un comportamiento citotóxico severo a partir de las 72 h en sistemas estabilizados únicamente mediante lavados con PBS. Este comportamiento obligó a deconstruir la cinética temprana de la interacción celular para aislar las variables metodológicas de las variables químicas.

El estudio cinético del tiempo de anclaje demostró de forma contundente que la eficiencia del andamio depende de la consolidación de los complejos de adhesión focal en las primeras dos horas pos-siembra. Al inocular las células en microvolúmenes concentrados (10 µL), se favorece el contacto inmediato entre los receptores celulares y la superficie del biomaterial. Si este estado de reposo estático se interrumpe a la primera hora mediante la adición masiva de medio de cultivo (90 µL), las fuerzas hidrodinámicas y el estrés de cizallamiento desprenden mecánicamente a las células que se encuentran en una fase débil de adsorción física reversible (enlaces electrostáticos débiles).

A partir de las 2 h de incubación estática a 37 °C, la viabilidad celular aumenta de manera estadísticamente significativa y se estabiliza. Cronológicamente, este lapso coincide con los procesos biológicos de secreción de proteínas de adhesión endógenas y con la transición hacia una adhesión química irreversible mediada por integrinas, lo que permite que la población celular resista los flujos difusivos posteriores. La aparición de cúmulos celulares refringentes a las 2 h confirma visualmente el anclaje exitoso. Sin embargo, el hecho de que el sistema colapse irremediablemente hacia las 120 h en todas las variantes físicas demuestra que la optimización de la siembra celular no puede contrarrestar el fenómeno químico de la citotoxicidad por lixiviación de aldehídos, lo que confirma que el glutaraldehído atrapado en la matriz opera como un veneno metabólico de liberación controlada si no se interviene químicamente.



3.3.4.2 Mecanismo químico de neutralización con glicina

La implementación del protocolo de neutralización con glicina representó el punto de inflexión químico que transformó un andamio citotóxico en una plataforma altamente biocompatible, elevando la viabilidad por encima del 75%. El éxito de esta estrategia radica en la termodinámica de las reacciones de condensación nucleofílica de los grupos funcionales expuestos.

El GTA es un dialdehído lineal altamente reactivo. Durante el entrecruzamiento de matrices proteicas, un extremo del residuo funcional reacciona con los grupos amino primarios (NH_2) de la lisina en el colágeno o del quitosano para formar enlaces estables de tipo imina (bases de Schiff). Sin embargo, debido al impedimento estérico y a las restricciones conformacionales de la red electrohilada, un porcentaje significativo de moléculas de GTA experimenta una fijación monovalente, dejando libre el segundo grupo aldehído (-CHO) y orientándolo hacia los poros del andamio [172]. Al entrar en contacto con las células sembradas, estos aldehídos libres reaccionan de manera inespecífica con las aminas de las proteínas de la membrana citoplasmática, desnaturalizándolas y desencadenando, a las 120 h, cascadas de señalización apoptótica y necrosis celular masiva.

Al introducir Gly, un aminoácido de cadena corta y alta movilidad difusiva, sus grupos amino primarios atacan nucleófilamente a los aldehídos residuales libres del GTA fijado. Esta reacción de condensación satura por completo los sitios activos del agente químico, transformando los extremos tóxicos expuestos en conjugados estables e inocuos que presentan una terminación carboxílica (-COOH) altamente hidrofílica y compatible con el entorno biológico [173].

Complementariamente, el beneficio dual del lavado posterior con EtOH al 70% v/v consolida este estado de biocompatibilidad. El agua presente en la mezcla azeotrópica del etanol al 70% induce un hinchamiento controlado de la red, que expande los canales porosos, mientras que la fracción alcohólica actúa como un solvente orgánico ideal de polaridad intermedia. Esta combinación posee la capacidad termodinámica para disolver, lixiviar y remover por capilaridad las moléculas de GTA libre que estaban adsorbidas físicamente en las regiones hidrofóbicas de los polímeros conductores, así como los complejos solubles de GTA-Gly que no se fijaron covalentemente a la red. La alta tasa de evaporación del etanol remanente previene la retención de solventes y estabiliza la microarquitectura estéril, preparando el andamio para recibir el medio de cultivo definitivo sin riesgo de lixiviación tóxica latente.

3.3.4.3 Efectos homeostáticos dependientes de la densidad de siembra celular

Los perfiles comparativos de viabilidad entre densidades de siembra de 3k/pozo y 10k/pozo revelan un comportamiento biológico regido por la homeostasia celular y la retroalimentación paracrina en entornos tridimensionales. A bajas densidades (3k/pozo), el andamio demuestra una biocompatibilidad aceptable (viabilidad >70), pero la curva metabólica se mantiene en una meseta horizontal con un ligero declive a las 120 h. Este comportamiento responde al fenómeno de aislamiento estocástico celular: al encontrarse las células físicamente distantes unas de otras a lo largo de la superficie texturizada de la membrana, la concentración local de factores de crecimiento autocrinos y paracrinos secretados al medio se diluye por debajo del umbral crítico necesario para



activar de forma robusta los receptores de membrana y desencadenar la mitosis. Las células sobreviven gracias a la biocompatibilidad del soporte, pero entran en un estado metabólico basal estacionario de senescencia latente.

Por el contrario, al incrementar la densidad de siembra a 10k/pozo, la viabilidad experimenta un salto cuántico hacia valores cercanos al 100% a las 120 h. Esta respuesta exponencial es una consecuencia directa del establecimiento de una masa crítica celular que satura rápidamente el microentorno poroso con señales moleculares de supervivencia. La corta distancia intercelular facilita el acoplamiento mecánico temprano y la formación de uniones de tipo conexina, indispensables para la sincronización metabólica de los cardiomioblastos H9c2.

Sin embargo, la aparición de desviaciones estándar significativamente mayores en la condición de 10k/pozo refleja la sensibilidad termodinámica del sistema frente a densidades poblacionales elevadas. Al coexistir una elevada cantidad de células metabólicamente hiperactivas sobre una matriz porosa que experimenta degradación hidrolítica concomitante, se generan gradientes microscópicos locales de consumo de oxígeno y nutrientes [174]. Estas microvariaciones ambientales contribuyen a la introducción de heterogeneidad en la tasa respiratoria celular entre diferentes pozos, lo que se manifiesta experimentalmente como una mayor dispersión en los datos de absorbancia del azul alamar, lo que sugiere que la densidad de 10k/pozo, aunque óptima para inducir confluencia, demanda un control estricto de las tasas de difusión y de recambio del medio de cultivo.

3.3.4.4 Influencia del diámetro de fibra y porosidad

La observación experimental de una mayor viabilidad en las membranas electrohiladas con 100 µM de GTA, caracterizadas por diámetros de nanofibras consistentes en 113 ± 15 nm, pone de manifiesto la relevancia de la escala nanométrica en el diseño de nichos biomiméticos. Las dimensiones estructurales de un andamio regulan directamente la energía libre de la superficie y la disponibilidad espacial para la colonización celular.

Una fibra con un diámetro controlado de 113 ± 15 nm se sitúa en el rango dimensional óptimo para los filamentos de colágeno nativos de la matriz extracelular cardíaca. Desde el punto de vista físico, un diámetro submicrónico incrementa exponencialmente la relación superficie-volumen del andamio. Esto significa que, para un mismo volumen geométrico de pozo, la membrana de 113 ± 15 nm ofrece una densidad de sitios activos hidrofílicos y de motivos de adhesión celular sustancialmente mayor que la de andamios con fibras colapsadas o de mayor grosor.

Asimismo, la arquitectura generada por nanofibras de 113 ± 15 nm, a una concentración de 100 µM de GTA, evita la fusión prematura de los filamentos durante el hilado y preserva una alta porosidad interconectada. Esta porosidad abierta reduce la tortuosidad de los canales microscópicos, lo que optimiza la conductividad hidráulica de la membrana. Como consecuencia, se facilita la difusión pasiva de oxígeno y el transporte de nutrientes esenciales hacia las capas internas del andamio, al tiempo que se agiliza la eliminación de los desechos metabólicos celulares [175]. Esta ventaja en los fenómenos de transporte de masa se traduce en un microentorno celular energéticamente más favorable, lo que explica el incremento adaptativo de la actividad metabólica documentado hacia las 120 h de cultivo.



3.3.5 Autofluorescencia y deconstrucción del ruido espectral en compósitos

El desarrollo de las pruebas de fluorescencia molecular evidenció limitaciones ópticas severas que retrasaron el establecimiento de protocolos estándar de viabilidad y aportaron un valioso entendimiento de las propiedades fotofísicas de los compósitos electroactivos. La intensa respuesta autofluorescente detectada al excitar las membranas control, sin teñir, con una línea de láser de argón y el filtro a 488 nm se explica por la estructura electrónica de las macromoléculas constituyentes.

El colágeno es rico en aminoácidos aromáticos (como la tirosina y el triptófano) y posee enlaces cruzados naturales basados en anillos de piridinolina, que actúan como cromóforos intrínsecos con perfiles de absorción y emisión en el espectro ultravioleta y en el azul-verde [176]. Por su parte, el quitosano semidesacetilado presenta grupos carbonilo y residuos de quitina remanentes que contribuyen a la dispersión y a la emisión de luz en longitudes de onda cortas. Sin embargo, el factor que exacerba críticamente la autofluorescencia verde en estas membranas es el estado de dopaje del polipirrol y de la polianilina. Estos polímeros conductores poseen un sistema extendido de electrones π deslocalizados a lo largo de sus cadenas carbonadas conjugadas. Al encontrarse dopados en formas conductoras (estructuras tipo polaron y bipolarón), sus transiciones energéticas interbanda (2.5 eV - 3.2 eV) absorben fuertemente la radiación electromagnética de alta energía [177], disipando parte de esa energía mediante fenómenos de emisión fluorescente inespecífica que saturan el canal verde.

El desplazamiento de la línea de excitación hacia 514 nm y el análisis en la región de 530/590 nm demostraron ser la solución termodinámica al problema. Al disminuir la energía del fotón incidente, se evita la activación de las transiciones electrónicas de alta energía de los cromóforos del colágeno y de las bandas de polarones del Ppy. La matriz deja de absorber eficientemente la luz de excitación, lo que elimina el fenómeno de emisión de fluorescencia de fondo del soporte. Esta deconstrucción del ruido óptico justificó el abandono definitivo de la calceína AM convencional y la selección de sondas con corrimientos de Stokes desplazados hacia el espectro rojo-anaranjado.

3.3.5.1 Evaluación crítica de sondas fluorogénicas

El análisis comparativo de las sondas alternativas presentadas en la Figura 3.12 manifiestó el solapamiento espectral y la inestabilidad fotofísica de varios marcadores comerciales frente a la matriz electroactiva. El uso de CellTrace Violet bajo excitación UV activó de forma masiva los centros emisores del colágeno, transformando el ruido óptico de fondo en un factor incontrolable que enmascaró por completo la fluorescencia celular.

Un caso de alto interés es el uso de Fluo-4. Este fluoróforo incrementa exponencialmente su emisión verde únicamente al unirse a iones de calcio libres (Ca^{+2}) intracitoplasmáticos. Los ensayos demostraron una interferencia en condiciones basales, ya que la señal de emisión coincidió con la banda residual de autofluorescencia de la membrana excitada a 488 nm, lo que obligó a descartarla como indicador de viabilidad en la práctica rutinaria. No obstante, la dinámica fisicoquímica de esta sonda abre una ventana metodológica de gran valor para las fases futuras de la investigación. Debido a que los polímeros conductores, como el Ppy y la Pani, poseen la capacidad de alterar de forma reversible su densidad de carga [178] y su permeabilidad iónica ante estímulos eléctricos externos [179], la membrana funcionará como una plataforma de electroestimulación activa. Cuando los cardiomioblastos H9c2, que poseen canales de calcio dependientes de voltaje, sean estimulados



eléctricamente sobre el andamio conductor, se inducirá un flujo masivo de Ca^{+2} transmembranal hacia el citoplasma. Este incremento en la concentración del ión superará por varios órdenes de magnitud el ruido de fondo del polímero, lo que permitirá utilizar la sonda Fluo-4 no como marcador morfológico, sino como un biosensor cinético en tiempo real para cuantificar el acoplamiento electromecánico y la funcionalidad de los canales iónicos del tejido cardíaco en desarrollo.

3.3.5.2 Validación espectroscópica del protocolo optimizado

La resolución exitosa del conflicto óptico se consolidó mediante la estandarización del par fluorogénico calceína AM roja y Sytox Green, cuyas micrografías confocales se muestran en la Figura 3.13. Este protocolo optimizado aprovecha magistralmente las ventanas de transmitancia óptica de la matriz polimérica.

La calceína AM roja es una molécula apolar y neutra que difunde libremente a través de la membrana plasmática de las células vivas. Una vez en el citoplasma, las esterasas intracelulares activas hidrolizan los grupos éster de la sonda, transformándola en una molécula hidrofílica con una intensa fluorescencia roja [180], cuya excitación y emisión se sitúan fuera de las bandas de absorción parasitaria de la red C-Ch/Ppy. Como se evidencia en la Figura 3.13a, este desplazamiento espectral permitió aislar con alta resolución la señal citoplasmática de los cardiomioblastos viables, revelando con nitidez cómo las células se distribuyen y colonizan la topografía tridimensional ondulada propia de la membrana electrohilada, sin interferencia del soporte.

Por otra parte, el Sytox Green actúa como un contramarcador ideal de muerte celular de alta afinidad. Esta sonda es incapaz de atravesar la membrana plasmática intacta de las células vivas; sin embargo, cuando una célula experimenta un compromiso de la membrana o apoptosis tardía, el colorante penetra en el citoplasma e intercala de forma específica en los surcos del ADN nuclear [181]. Al unirse a los ácidos nucleicos, el Sytox Green experimenta un incremento de más de 500 veces en su rendimiento cuántico de fluorescencia verde. Este aumento en la intensidad de la señal nuclear supera la autofluorescencia basal de la nanofibra, lo que permite la discriminación inequívoca de los núcleos de células muertas teñidos de verde brillante en coexistencia con los cardiomioblastos vivos, validando la idoneidad analítica del método confocal.

3.3.5.3 Caracterización citoesquelética final

Las imágenes de inmunocitoquímica de punto final al quinto día de cultivo proporcionan evidencia de la morfología alargada, fusiforme y polarizada de los cardiomioblastos en contacto con las membranas de Ppy. Esta alineación axial representa un indicador fenotípico de maduración celular, crucial en la ingeniería de tejido cardíaco.

La observación de cardiomioblastos que exhiben curvaturas pronunciadas, torsiones axiales [182], [183] y adaptaciones tridimensionales complejas en su estructura es una manifestación directa de la guía de contacto y el confinamiento geométrico [184] impuesto por la microarquitectura del andamio. En una placa de cultivo plana, las fuerzas de tensión citoesquelética se distribuyen isotrópicamente radialmente. En contraste, al colonizar la red



de nanofibras de Ppy entrecruzadas con GTA, los filamentos de actina del citoesqueleto se ven obligados a polimerizarse a lo largo del eje longitudinal de las fibras individuales o de los puentes interconectados [185], [186]. La célula responde adaptando volumétricamente su citoplasma a la porosidad de la membrana, doblándose y entrelazándose entre las capas de nanofibras, lo que demuestra que el andamio no opera como un simple soporte estático bidimensional, sino como una verdadera matriz biomimética activa que dirige el ordenamiento tridimensional del tejido [187].

La incorporación de Sytox Green como contrastante nuclear, acoplada al marcaje de actina con faloidina, consolidó una herramienta analítica robusta para la caracterización volumétrica del sistema. La transición observada en la representación cromática y el contraste de la imagen responde a un fenómeno de solapamiento de señales ópticas que, lejos de ser un artefacto defectuoso, opera de forma sinérgica controlada.

Al excitar simultáneamente ambos canales, las señales rojas de la faloidina (actina) y las verdes del Sytox Green (núcleos permeabilizados) se superponen en las regiones celulares vecinas. Debido a que el Sytox Green posee una extraordinaria intensidad de emisión al unirse al ADN, su señal delimita con precisión nanométrica la posición espacial y la orientación de los núcleos celulares en el espacio tridimensional del andamio. Esta contratinción nuclear aporta el marco de referencia geométrico necesario para realizar conteos celulares automatizados y evaluar la densidad poblacional por unidad de área mediante algoritmos de segmentación digital en Matlab, contrarrestando la pérdida de contraste inducida por la fluorescencia residual de la membrana de Ppy o Pani.

Al mismo tiempo, la persistencia de la señal de faloidina en los márgenes periféricos confirma que el tratamiento de entrecruzamiento optimizado con 100 µM de GTA y la posterior neutralización con glicina preservan la integridad estructural del citoesqueleto a largo plazo (día 5). Las células mantienen su estructura alargada característica y sus capacidades de extensión citoplasmática, lo que valida de forma definitiva la viabilidad y el alto potencial de aplicación de estas membranas nanoestructuradas como andamios electroactivos avanzados para la regeneración y el modelado funcional de tejido cardiovascular.

3.4 CONCLUSIONES

El conjunto de evaluaciones biológicas e inmunocitoquímicas desarrollado en esta investigación permite concluir, en primera instancia, que la viabilidad estructural y la inocuidad microbiana de las membranas electroactivas dependen críticamente de la selección de las rutas de desinfección. Mientras que los métodos basados en plasma de peróxido de hidrógeno inducen una degradación oxidativa irreversible de las cadenas conjugadas de polianilina y polipirrol, la combinación secuencial de bloqueo químico con glicina, desinfección con etanol al 70% v/v e irradiación ultravioleta consolida una estrategia termodinámicamente compatible que garantiza la esterilidad biológica durante quince días consecutivos sin perturbar el dopaje de las fases conductoras.

Asimismo, el análisis cinético de las matrices nativas evidenció la alta susceptibilidad hidrolítica de las mezclas de colágeno y quitosano sin entrecruzar al ser expuestas al medio DMEM, en el que los aminoácidos y las proteínas plasmáticas aceleran la disolución estructural y provocan un declive celular tardío hacia el quinto día. Esta inestabilidad estructural prematura se resolvió mediante el entrecruzamiento molecular avanzado con GTA a una concentración de 100 µM; sin embargo, este agente introdujo una citotoxicidad latente debido a la presencia de grupos aldehídicos libres de fijación monovalente. La implementación de la Gly funcionó como el núcleo de la



optimización química al saturar dichos sitios activos mediante reacciones de condensación nucleofílica, transformando los extremos reactivos en conjugados estables y biológicamente inertes que elevaron de forma consistente la viabilidad celular por encima del setenta y cinco por ciento, un beneficio potenciado por el lavado posterior con etanol que lixivió eficientemente las trazas del agente químico atrapadas por capilaridad en la red.

Por otra parte, los estudios cinéticos de colonización celular demostraron que la ventana cronológica óptima para que los cardiomioblastos H9c2 consoliden sus complejos de adhesión focal y resistan las fuerzas de cizallamiento hidrodinámico es de 2 h bajo un régimen de siembra estática en microvolúmenes. A partir de este umbral, el incremento de la densidad de siembra a 10k células/pozo maximizó la actividad metabólica celular hasta las ciento veinte horas, gracias al establecimiento de una masa crítica que promueve la retroalimentación paracrina y el acoplamiento mecánico temprano mediante uniones tipo gap. Desde la perspectiva de la relación estructura-función, las membranas con diámetros de nanofibras de 120 nm ofrecieron una microarquitectura biomimética óptima que incrementó la relación superficie-volumen y redujo la tortuosidad de los microcanales, optimizando los procesos de transporte de masa y la difusión pasiva de nutrientes esenciales hacia las capas internas del andamio.

Finalmente, la caracterización fotofísica de los compósitos reveló que la deslocalización electrónica de las fases electroactivas y de las estructuras helicoidales del colágeno genera una intensa autofluorescencia intrínseca en el canal verde al ser excitadas a 488 nm, lo que obligó a descartar las tinciones tradicionales, como la calceína AM convencional. El diseño de un protocolo de fluorescencia molecular optimizado, basado en el par calceína AM roja y Sytox Green, logró evadir con éxito estas ventanas de absorción parasitaria, permitiendo el mapeo tridimensional nítido de los cardiomioblastos viables y abriendo la pauta metodológica para el uso de biosensores iónicos, como el Fluo-4, en futuras fases de electroestimulación activa. Esta resolución óptica facilitó los análisis inmunocitoquímicos de punto final, que confirmaron que la topografía nanoestructurada de las membranas de polipirrol actúa como inductor de la mecanotransducción axial y como guía de contacto para las células. Al quinto día de incubación, los miocitos mantuvieron un fenotipo alargado y fusiforme, adaptando y curvando su citoesqueleto de actina a lo largo del relieve de las fibras poliméricas, hallazgo que convalida la excelente biocompatibilidad molecular y el alto potencial de aplicación de estos andamios electroactivos avanzados para la ingeniería y el modelado funcional de tejido cardiovascular.



Capítulo 4. DESARROLLO DE PLATAFORMA ORGAN-ON-A-CHIP

En este capítulo se construyó una plataforma de un solo sistema OoC como referencia para un sistema microfisiológico. Los materiales por elegir dependen de un depende de la finalidad del dispositivo, los más utilizados son de polidimetilsilicona (PDMS), vidrio, polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), sin embargo, no hay un material perfecto. Estos dispositivos pueden contener estructuras nanométricas, tanto en componentes necesarios para crear el ambiente como en sensores en el sistema, además se pueden construir estructuras con dimensiones en el orden de 10 a 30 µm con desviaciones de 0.3 µm [188].

El diseño depende del sistema a evaluar, para el corazón, los diseños más utilizados involucran el uso de microfluídica para crear sistemas vasculares. Estos diseños permiten realizar el cambio del medio de cultivo cada 7 días; a su vez, permiten utilizar alrededor de 100 µl de medio por día. En algunos casos, es preferible un cambio constante de medio, en el que se utilizan de 25 a 50 µl por día para simular los fluidos biológicos en su composición y en su velocidad. La fabricación de la plataforma puede ser realizada por litografía, por láser, modelado por inyección, impresión 3D o bioimpresión 3D [189].

Una vez diseñado, el dispositivo debe esterilizarse para prevenir la contaminación por microorganismos y residuos de fabricación. Dependerá del material si puede ser con autoclave (los PDMS tienen bajo punto de fusión y baja resistencia térmica); es común el uso de radiación UV y de tratamiento con etanol. Una vez obtenido la plataforma se pueden incorporar microtejidos ya sea en 2D y 3D, para esto es necesario utilizar un componente natural que funcione como soporte de las células permitir adherencia y crecimiento del tejido [190].

4.1 METODOLOGÍA

4.1.1 Diseño del dispositivo en 3D

Para el diseño de los canales y cavidades de cultivo, se utilizaron los softwares: Fusion 360 y SolidWorks.

Considerando el diseño del boceto inicial, posteriormente se realizará la extracción para la construcción digital 3D en positivo, como se muestra en la Figura 4.1. Del mismo modo, se construyó la versión digital negativa del dispositivo.

Tabla 6. Nomenclatura de diseños de dispositivos microfluídicos.

Nomenclatura	Parte inferior	Parte superior	Oxigeno	Sistema de sellado
D1	PDMS	PDMS	Si	Soporte
D2	PDMS	PDMS	No	Soporte
D3	Vidrio	PDMS	Si	Soporte
D4	Vidrio	PDMS	No	Soporte
D5	Vidrio	PDMS	Si	Plasma
D6	Vidrio	PDMS	Si	Plasma



Se realizaron 5 diseños de dispositivos que se enlistan en la Tabla 66, los cuales se diferencian en la presencia de canales de bloqueo de oxígeno, la unión entre PDMS y PDMS o PDMS y vidrio, así como la incorporación de canales de distribución en la cavidad.

4.1.2 Impresión en resina LDL

Los diseños geométricos previamente optimizados se fabricaron mediante impresión tridimensional con una impresora de tecnología LCD (Liquid Crystal DisPLAy) y una resina fotosensible comercial con propiedades mecánicas similares a las del acrilonitrilo-butadieno-estireno (tipo ABS), tal como se ilustra en la Figura 4.1. Los archivos digitales con los parámetros de diseño se transfirieron al equipo de impresión, configurando los tiempos de exposición lumínica y las alturas de capa específicas recomendadas para las propiedades ópticas y de curado de la resina seleccionada.

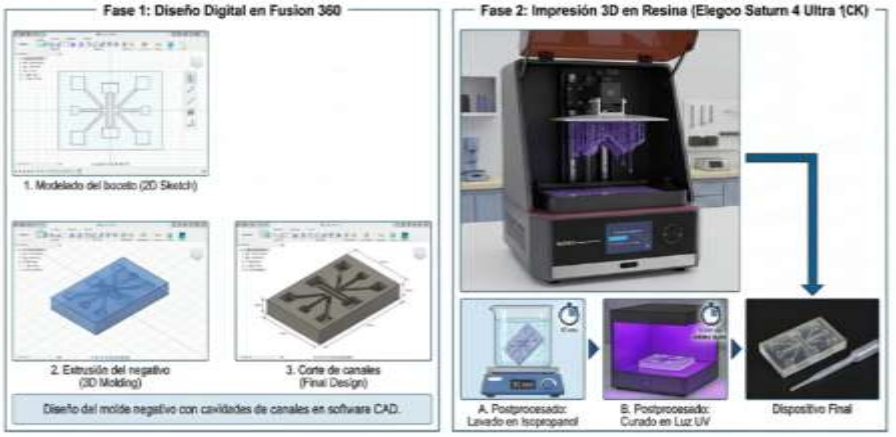


Figura 4.1. Proceso de diseño y fabricación del dispositivo.

4.1.3 Molde de PDMS

Para obtener las réplicas microfluídicas, se preparó una mezcla de PDMS y su respectivo agente de curado utilizando el kit comercial Sylgard 184 Silicone Elastomer en una relación estequiométrica de 10:1 en peso. Como se describe en la Figura 4.2, una vez alcanzada la homogeneización completa de la mezcla, esta se vertió cuidadosamente sobre el molde polimérico previamente lavado y acondicionado. Con el propósito de eliminar el aire ocluido y prevenir la formación de defectos estructurales en los microcanales, el conjunto se introdujo en una cámara de vacío acoplada a un extractor de aire hasta lograr la desgasificación total del polímero.

Posteriormente, el proceso de entrecruzamiento térmico se llevó a cabo en un horno de convección a una temperatura controlada de 80 °C durante 24 h. Una vez finalizado el curado, el elastómero se desmoldó



mecánicamente y se sometió a una etapa complementaria de esterilización y estabilización mediante irradiación con luz UV-B durante 5 min por cada superficie expuesta.

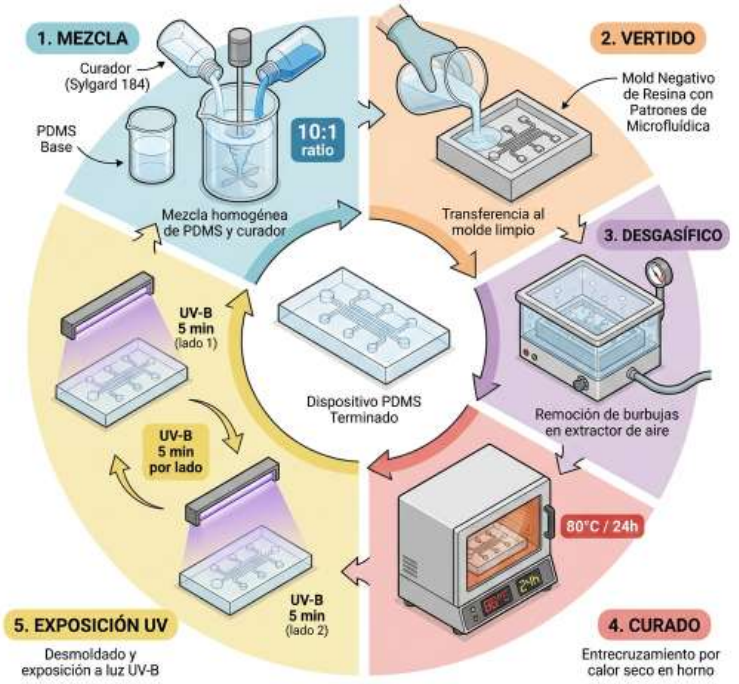


Figura 4.2. Procedimiento para obtener de un dispositivo microfluídico de PDMS.

4.1.4 Sellado del dispositivo

Con el fin de garantizar el confinamiento de los fluidos, se evaluaron dos estrategias independientes de sellado:

- Ensamble mediante fijación mecánica (configuración tipo sándwich): Se diseñó un sistema de placas de resina rígida para ejercer una presión uniforme sobre las caras externas del dispositivo. A partir de esta aproximación, se desarrollaron cuatro variantes estructurales en función de la interfaz y la distribución del esfuerzo mecánico:
    - a) Interfaz PDMS-Vidrio: Incorporación de un elemento sujetador adaptado a portaobjetos convencionales.
    - b) Interfaz PDMS-PDMS: Estructuras laterales diseñadas para proporcionar soporte estructural a la sección basal de PDMS.
    - c) Diseño con ranura central: Configuración geométrica que concentra la fuerza de compresión en la zona central del canal.



- d) Diseño sin ranura central: Configuración con superficie continua para una distribución homogénea de la fuerza de apriete.

- Sellado irreversible mediante plasma de oxígeno: De forma complementaria, se implementó el método de activación superficial mediante plasma gaseoso con un equipo Plasma Cleaner (Harrick Plasma). Previo a la activación, los bloques de PDMS se limpiaron exhaustivamente y se perforaron en los horificios de entrada y salida con un punzón de biopsia (biopsy punch). El protocolo de unión consistió en una etapa inicial de vacío de 3 min, seguida de la generación de plasma de oxígeno a potencia optimizada durante 2 min. Finalmente, las superficies activadas (PDMS-Vidrio o PDMS-PDMS) se pusieron en contacto inmediato para propiciar la formación de enlaces covalentes siloxánicos (Si-O-Si) [191].

4.1.5 Flujo de medios acuosos

Posteriormente al sellado del sistema microfluídico, los accesos se conectaron a distintos mecanismos de alimentación hidrodinámica para perfundir el medio de cultivo. Las interfaces evaluadas comprendieron: el acoplamiento directo de puntas de micropipeta a los puertos de entrada, la interconexión mediante tuberías poliméricas (tubing) flexibles conectadas a depósitos de almacenamiento (tubos Eppendorf y jeringas), y la integración de válvulas reguladoras microfluídicas acopladas a bombas de jeringa. Se determinó experimentalmente que el volumen de llenado nominal para la saturación total de cada microcavidad es de 700 µL.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Dispositivos PDMS:PDMS

La evaluación de los dispositivos microfluídicos sellados mediante ensambles mecánicos de compresión tipo sándwich (interfaz homopolimérica PDMS:PDMS) evidenció deficiencias críticas en la contención hidrodinámica del flujo. El monitoreo operativo reveló la aparición de fugas localizadas y de filtraciones de medio de cultivo antes de transcurridas las primeras 24 h de perfusión continua. Asimismo, mediante análisis de esfuerzos se determinó que cualquier asimetría a microescala o desnivel transitorio en el torque aplicado a los tornillos de fijación inducía una distribución heterogénea de la presión de contacto. Esta descompensación provocaba la deformación elástica del elastómero y una pérdida inmediata de hermeticidad en los extremos periféricos del chip, lo que derivaba en una lixiviación gradual del fluido. Debido a esta marcada inestabilidad hidrodinámica, al riesgo



de contaminación y a la falta de reproducibilidad del acoplamiento físico, esta configuración estructural fue descartada para los ensayos biológicos posteriores (Figura 4.3).

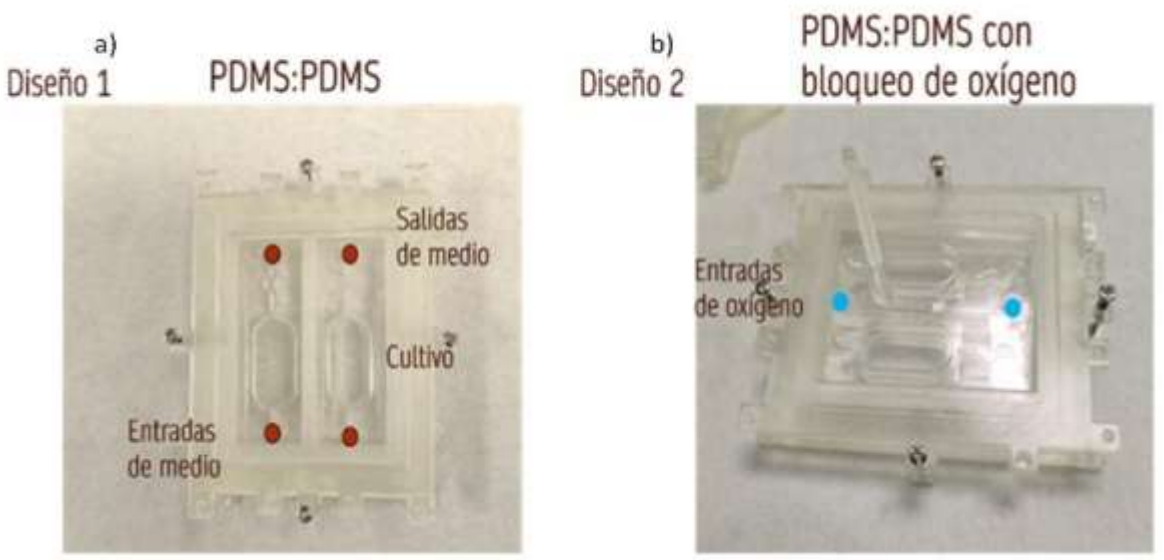


Figura 4.3. Dispositivos microfluídicos con interfaz PDMS:PDMS ensamblados mediante fijación mecánica sobre bases de soporte de resina polimérica.

4.2.2 Dispositivos PDMS:vidrio

El sellado puramente mecánico aplicado a la interfaz heterogénea PDMS:vidrio exhibió limitaciones operativas análogas a las del sistema homopolimérico, con pérdidas de fluido hacia el exterior, gobernadas por fenómenos de capilaridad en la zona de contacto interfacial (Figura 4.4). Por el contrario, la optimización del protocolo mediante la activación superficial con plasma de oxígeno resolvió de manera definitiva esta problemática de confinamiento. La exposición al plasma indujo la ruptura de los enlaces siloxano Si-O-Si y la formación masiva de grupos silanol (Si-OH) hidrofílicos en la superficie del PDMS, lo que permitió una condensación covalente irreversible con los silanoles del vidrio [191].

Esta unión química permanente garantizó el confinamiento absoluto del medio de cultivo y soportó un régimen de flujo continuo a través de los canales durante un periodo de hasta 15 días, sin manifestar delaminación interfacial, degradación del polímero ni filtraciones periféricas (Figura 4.5). La robustez y la estabilidad de este sellado



covalente facilitaron la ejecución de ciclos periódicos de recambio de medio de cultivo, así como de los regímenes de lavado y acondicionamiento requeridos por el protocolo experimental.

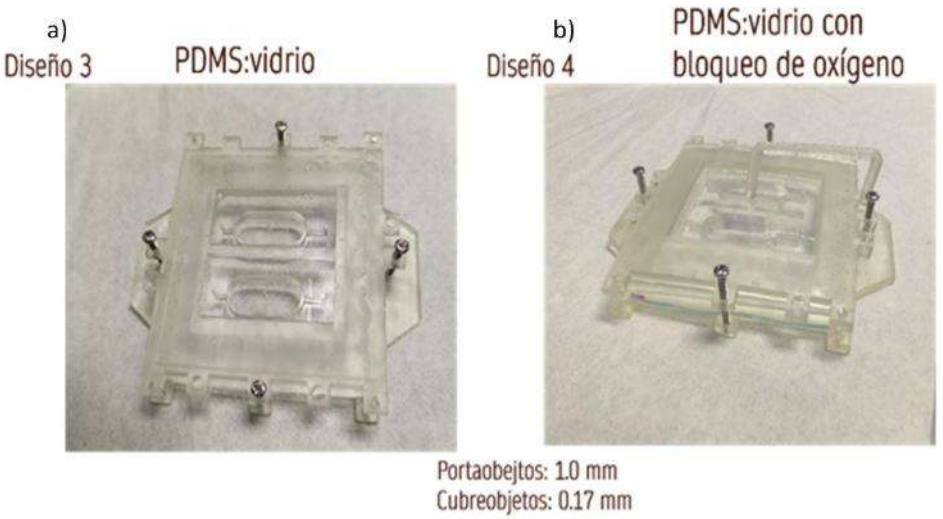


Figura 4.4. Dispositivos con interfaz PDMS-vidrio acoplada mediante compresión mecánica sobre bases de resina.

Respecto a la dinámica de alimentación del sistema, los reservorios pasivos basados en tubos de microcentrífuga modificados, que operaban por gravedad mediante diferencias de carga hidrostática [192] , mantuvieron de manera efectiva la tasa de perfusión durante las primeras 24 h de incubación. No obstante, durante las maniobras manuales de recambio del medio de cultivo, la interrupción del gradiente provocó un reflujo en los puertos de salida. Este gradiente de presión adverso indujo la introducción involuntaria de microburbujas de aire en el interior de las cámaras de cultivo, comprometiendo la viabilidad del microentorno celular (Figura 4.6a).



Figura 4.5. Chip microfluídico funcionalizado y sellado de forma irreversible mediante activación superficial con plasma de oxígeno.



Un comportamiento análogo se observó al cambiar a configuraciones que empleaban agujas y jeringas como reservorios pasivos (Figuras 4.6b y 4.6c); la pérdida paulatina de presión hidrostática en la sección de salida alteró severamente el gradiente de presiones transcapilares, lo que incrementó la caída de presión interna y favoreció el atrapamiento de burbujas en las microcavidades del dispositivo [193], [194], [195].

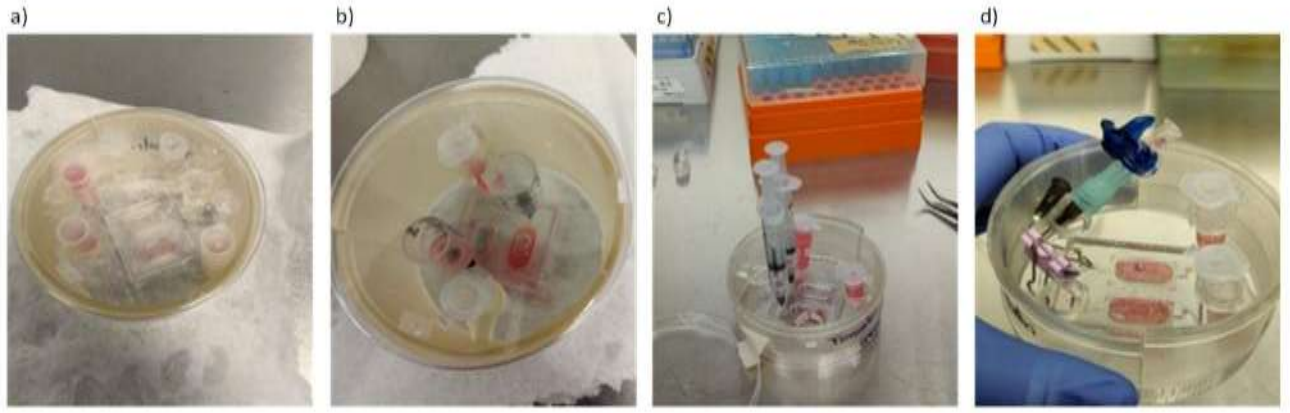


Figura 4.6. Variantes de diseño arquitectónico para el almacenamiento y bombeo de fluidos: (a) reservorios pasivos por gravedad en tubos de microcentrífuga, (b) sistema híbrido con tubos y jeringas, (c) configuración de reservorios con figuras para la inducción de presión negativa, y (d) reservorios equipados con acoplamientos valvulares para la conexión de regímenes de presión positiva.

Para mitigar este artefacto técnico e impedir la desgasificación del medio, se integraron válvulas microfluídicas direccionales de tres vías en los nodos críticos del circuito físico (Figuras 4.6d y 4.7). Esta modificación arquitectónica permitió interrumpir de forma controlada el flujo inverso durante las desconexiones y estabilizar las presiones transitorias del sistema. La implementación de las válvulas logró disminuir significativamente la nucleación de burbujas de aire y anular el desprendimiento celular debido a las fluctuaciones mecánicas durante los procesos de lavado, purga y renovación del medio de cultivo.



Figura 4.7. Configuración final del dispositivo microfluídico optimizado mediante la integración de válvulas direccionales de tres vías para el control de la presión positiva y la supresión de la nucleación de burbujas en los canales.



Para mitigar este artefacto técnico, se integraron válvulas microfluídicas de tres vías en el circuito físico. Esta modificación interrumpió de forma controlada el flujo inverso y estabilizó las presiones transitorias, lo que redujo significativamente la formación de burbujas durante los procesos de lavado y renovación del medio de cultivo.

4.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.3.1 Fallas en el sellado mecánico

El PDMS es un elastómero de baja rigidez estructural. Al aplicar una fuerza puntual mediante tornillos en un sistema tipo sándwich, el estrés mecánico no se distribuye uniformemente, lo que provoca microdeformaciones en el cuerpo del chip. Estas deformaciones abren canales interfaciales microscópicos (capilaridad) por los que el fluido escapa. La falta de paralelismo microscópico entre las dos capas de PDMS o entre el PDMS y el vidrio impide que el sellado mecánico sea hermético a escala microfluídica bajo presión constante.

4.3.2 Éxito del sellado por plasma de oxígeno

La exposición al plasma de oxígeno modifica químicamente la superficie hidrofóbica del PDMS. El plasma rompe los enlaces metilo ($-CH_3$) expuestos y los sustituye por grupos silanol (-SOH), lo que vuelve la superficie altamente hidrofílica. Al poner esta capa en contacto con el vidrio (que naturalmente posee grupos silanol) o con otra capa de PDMS activada, se produce una reacción de condensación que origina enlaces covalentes siloxanos (Si-O-Si) irreversibles. Este enlace químico es lo suficientemente fuerte como para soportar las presiones hidrodinámicas del medio de cultivo sin ceder por fatiga molecular durante dos semanas.

4.3.3 Dinámica de burbujas y el efecto de las válvulas de tres vías

La transición hacia un sellado irreversible resolvió el confinamiento del fluido, pero reveló un artefacto técnico crítico asociado a la desgasificación y a la estabilidad de las presiones transitorias en los microcanales. El comportamiento observado corresponde a una inestabilidad transitoria del gradiente de presión. Durante las fases estables, la diferencia de carga hidrostática entre los reservorios genera el flujo gravitacional a través de los microcanales. No obstante, al realizar el recambio del medio se modifican los niveles líquidos y la distribución de presión del sistema, provocando una caída de presión manométrica interna. Cuando la presión en los puertos de salida supera la presión del reservorio o de la cámara de entrada, el gradiente hidráulico se invierte y se produce reflujo (backflow) . En consecuencia, el recambio puede ocasionar contaminación cruzada, entrada de burbujas y alteraciones temporales del caudal y del esfuerzo cortante, por lo que resulta necesario incorporar estrategias de aislamiento, amortiguador o rectificación del flujo [196].

El reflujo altera la hidrodinámica del sistema e induce la intrusión de aire atmosférico. Al ingresar a la red microfluídica, el aire experimenta un fenómeno de atrapamiento debido a la alta tensión superficial e



hidrofobicidad residual de las paredes internas del PDMS que no están en contacto directo con el flujo. La formación de microburbujas actúa como un aislante mecánico que bloquea el transporte de masa de nutrientes, altera localmente los perfiles de velocidad del fluido y somete a las células sembradas a esfuerzos de cizallamiento durante el desplazamiento de la burbuja [197] . Un comportamiento similar se observó al usar jeringas pasivas, en las que la pérdida progresiva del volumen de fluido reduce la presión hidrostática basal y favorece la desgasificación espontánea del DMEM debido al gradiente de presión negativa generado en la sección de salida.

La integración de válvulas microfluídicas direccionales de tres vías representó la solución biomecánica a esta inestabilidad hidrodinámica. Desde la perspectiva de la dinámica de fluidos, las válvulas operan como barreras cinéticas de aislamiento selectivo [198]. Al realizar los recambios de medio o los lavados del circuito, el accionamiento de la válvula interrumpe instantáneamente el flujo inverso, aislando mecánicamente las cámaras de cultivo de las fluctuaciones de la presión atmosférica exterior. Esto estabiliza las presiones transitorias y previene el desequilibrio hidrostático que provoca el reflujo. Al mantener una presión positiva constante y controlada en el núcleo del dispositivo, se incrementa la solubilidad de los gases disueltos en el DMEM, lo que inhibe la formación de microburbujas y asegura un entorno de cizallamiento laminar homogéneo y predecible [199], indispensable para el éxito de cultivos biológicos de larga duración o de plataformas OoC.

4.4 CONCLUSIONES

A partir de los análisis reológicos y cinéticos desarrollados en esta sección, se demostró que el sellado reversible por compresión mecánica en configuraciones tipo sándwich es completamente inviable para aplicaciones microfluídicas de mediana y larga duración. Este colapso prematuro responde a los fenómenos de relajación de esfuerzos y de fluencia lenta, intrínsecos de PDMS, que disipan la energía de compresión inicial y deforman elásticamente los microcanales a las 24 h de operación continua, activando vías de escape de fluido gobernadas por la capilaridad. Por el contrario, la activación superficial mediante plasma de oxígeno se consolidó como el método óptimo de acoplamiento interfacial; la generación controlada de grupos silanol permitió estructurar uniones covalentes permanentes e irreversibles con el siloxano. Esta cohesión química garantizó el confinamiento hermético del fluido y soportó los gradientes de presión manométrica interna durante un periodo operativo continuo de hasta 15 días, previniendo la delaminación periférica del chip durante la manipulación prolongada.

De manera complementaria, la caracterización de la dinámica de fluidos evidenció que los reservorios pasivos por gravedad e inducción de presión negativa generan desequilibrios hidrostáticos y fenómenos de reflujo durante las maniobras de recambio de medio, lo que favorece el atrapamiento de microburbujas de aire debido a la hidrofobicidad residual del elastómero. Este artefacto técnico fue mitigado mediante la integración de válvulas microfluídicas direccionales de tres vías, que actuaron como barreras de aislamiento, estabilizaron las presiones transitorias y mantuvieron un cizallamiento laminar homogéneo. En consecuencia, se validó exitosamente un protocolo integral de manufactura y operación para un dispositivo microfluídico biocompatible basado en la interfaz heterogénea PDMS:vidrio; la sinergia entre el sellado covalente por plasma y el control micromecánico del flujo mediante válvulas proporciona una plataforma robusta, hermética y libre de burbujas, que reúne las condiciones hidrodinámicas estables y reproducibles necesarias para su posterior explotación en ensayos de cultivo celular prolongado o en sistemas avanzados de OoC.



Capítulo 5. EVALUACIÓN DE MEMBRANA EN ORGAN-ON-A-CHIP

En este capítulo se presentan y se discuten los resultados de la evaluación biológica de la membrana nanoestructurada integrada en el dispositivo microfluídico. Se determinó la viabilidad celular a lo largo de un periodo de cultivo de 15 días mediante monitoreo continuo y análisis de punto final. Para ello, se emplearon ensayos metabólicos basados en Alamar Blue, tinciones de viabilidad diferencial de tipo vivo/muerto (live/dead), así como la caracterización de la morfología celular mediante la tinción de los filamentos de actina.

5.1 METODOLOGÍA

5.1.1 Pruebas de esterilidad

El proceso de esterilización de las plataformas microfluídicas se llevó a cabo mediante la inmersión completa de los dispositivos en una solución de etanol (EtOH) al 70% v/v durante 5 min, seguida de una exposición a la radiación UV durante 15 min. Concluidos ambos procedimientos, el sistema se mantuvo en incubación bajo condiciones fisiológicas (37 °C y 5% de CO_2) durante toda la noche (overnight) previa a la siembra celular, con el fin de asegurar la evaporación total de trazas de alcohol y la estabilización térmica del andamio.

5.1.2 Monitoreo de viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad se ejecutaron en paralelo en las microcavidades de una misma plataforma. Para optimizar el análisis, una de las cavidades se destinó exclusivamente al monitoreo metabólico continuo con Alamar Blue, mientras que la cavidad adyacente se reservó para la evaluación semicuantitativa mediante tinciones de fluorescencia de punto final (vivo/muerto).

5.1.2.1 Vitalidad celular

La viabilidad celular cuantitativa se determinó mediante el perfil metabólico con el reactivo comercial Alamar Blue. El procedimiento consistió en la adición de una solución de Alamar Blue diluida al 10% v/v en el medio de cultivo completo. Se dosificó un volumen de 700 µL por cavidad para garantizar la cobertura total de la superficie del andamio y, posteriormente, se incubó el dispositivo en condiciones estándar para permitir la reducción enzimática de la resazurina a resorufina por las células viables.



5.1.2.2 Vida/muerte

La integridad de la membrana celular y la supervivencia bacteriana/celular se evaluaron mediante el uso combinado de dos indicadores fluorogénicos específicos:

- Indicador de viabilidad (Calceína AM Roja): Una molécula no fluorescente y permeable que, al difundirse pasivamente al interior de las células vivas, es hidrolizada por las esterasas citoplasmáticas activas, liberando un fluoróforo atrapado en el citoplasma que emite fluorescencia roja [180].
- Indicador de citotoxicidad (Sytox Green): Un colorante impermeable a membranas intactas que penetra exclusivamente en células con compromiso estructural (muertas), interactúa por intercalación con los ácidos nucleicos y emite una señal fluorescente verde brillante [181].

Para la ejecución técnica en el chip, se realizaron dos lavados consecutivos de la cavidad con amortiguador de fosfatos (PBS) para eliminar los residuos del medio de cultivo. La solución de trabajo se preparó disolviendo calceína AM Roja a 5 µM y Sytox Green a 1 µM en medio DMEM suplementado libre de rojo de fenol, evitando así la autofluorescencia o interferencia óptica durante la adquisición de imágenes microscópicas.

5.1.3 Inmunocitoquímica

La organización del citoesqueleto y la morfología de los cardiomioblastos cultivados sobre membranas se evaluaron mediante técnicas de inmunocitoquímica y de tinción de afinidad. Para la visualización de los microfilamentos de actina, se utilizó faloidina conjugada con el fluoróforo Alexa Fluor 546, empleando simultáneamente Sytox Green como contratinción específica para la localización de los núcleos celulares.

El protocolo experimental dentro del dispositivo microfluídico se llevó a cabo en los siguientes pasos consecutivos:

1. Fijación celular: Las muestras se fijaron *in situ* mediante la adición de una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% p/v en amortiguador de fosfatos, y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min para preservar las estructuras celulares.
2. Permeabilización: Con la finalidad de permitir el acceso de los fluoróforos al espacio intracelular, las membranas citoplasmáticas se permeabilizaron mediante la incubación con Triton X-100 al 0.1% v/v diluido en PBS durante 10 min.
3. Marcaje fluorogénico: Posteriormente, se retiró la solución de permeabilización y se aplicó una solución de trabajo en PBS que contenía faloidina a 2 µM y Sytox Green a 1 µM. El dispositivo se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 min.
4. Lavado y conservación: Finalmente, se realizaron dos lavados consecutivos con PBS estéril para eliminar el exceso de colorantes libres. Los dispositivos se mantuvieron sumergidos en PBS a 4 °C para garantizar la hidratación y la estabilidad de la fluorescencia, previa a su análisis tridimensional mediante microscopía confocal de barrido láser.



5.1.3.1 Procesamiento de imágenes

Las imágenes tridimensionales de alta resolución obtenidas mediante microscopía confocal de barrido láser se procesaron en el entorno informático de MATLAB (MathWorks, EE. UU.) con el propósito de cuantificar de forma automatizada las señales correspondientes a las poblaciones de células vivas y muertas, así como de reconstruir su distribución espacial a lo largo del eje axial (z). El algoritmo de procesamiento digital de imágenes desarrollado se estructuró de manera sistemática en las siguientes fases metodológicas:

- Consolidación de Imágenes (Stack Fusion): El script lee secuencialmente las imágenes de directorios independientes. Tras convertirlas a escala de grises y binarizarlas mediante umbralización, realiza una operación lógica de unión (OR) para fusionar las tramas individuales en una sola máscara compuesta por carpeta.

```
% Conversión y binarización por frame
imgray = rgb2gray(I);
imbw = imbinarize(imgray, 0.05);
% Fusión acumulativa del stack mediante operador lógico OR
fusedbw = fusedbw | imbw;
```

- Acondicionamiento y Corrección de Fondo (Rolling Background): Con el fin de mitigar gradientes de iluminación artificiales o ruido de fondo, se aplica una apertura morfológica con un elemento estructurante de disco. La sustracción de este fondo optimiza el contraste de las estructuras biológicas de interés.

```
se1 = strel('disk', 2);
background1 = imopen(fusedbw, se1); % Apertura morfológica
I_corr = fusedbw - background1; % Sustracción del fondo
I_corr = mat2gray(I_corr); % Normalización de la imagen
```

- Segmentación Avanzada mediante Watershed: Para resolver el problema de células adyacentes o agrupadas, el script calcula la transformada de distancia inversa a partir de la máscara limpia. Tras aplicar un filtro gaussiano y modificar los mínimos extendidos para evitar la sobresegmentación, se ejecuta el algoritmo de Watershed, lo que permite individualizar y delimitar con precisión los contornos celulares.

```
Ho_filt = bwareaopen(imfill(I_corr, 'holes'), 30);
Ho_dist = -bwdist(~Ho_filt); % Transformada de distancia invertida
Ho_dist = imgaussfilt(Ho_dist, 1); % Filtro Gaussiano de suavizado
Ho_D_modificada = imextendedmin(Ho_dist, 0.4); % Modificación de mínimos
Ho_Dfinal = imimposemin(Ho_dist, Ho_D_modificada); L = watershed(Ho_Dfinal); % Algoritmo Watershed
Ho_filt(L == 0) = 0; % Separación de objetos en la máscara
```

- Extracción de Métricas y Cuantificación: Se extraen las propiedades morfológicas de cada objeto segmentado (centroide, área y diámetro equivalente). El script calcula automáticamente el conteo total de



células y el área promedio por condición, diferenciando visualmente los resultados mediante códigos de color (rojo y verde).

```
stats = regionprops(Ho_filt, 'Centroid', 'EquivDiameter', 'Area');
conteo = length(stats);
area_promedio = mean([stats.Area]);
```

- Análisis Comparativo y Solapamiento (Overlay): En la fase final, el programa genera una gráfica estadística de barras que evalúa la proporción poblacional entre las condiciones viables y no viables. Asimismo, mapea la coexistencia espacial de los marcadores mediante un compuesto RGB y cuantifica la presencia exclusiva de señales no solapadas.

```
% Crear imagen compuesta RGB (Canal 1: Rojo / Canal 2: Verde)
overlay = zeros(size(mask_red, 1), size(mask_red, 2), 3);
overlay(:, :, 1) = mask_red; overlay(:, :, 2) = mask_green;
% Identificación de regiones exclusivas (verdes no solapadas)
green_only = mask_green - ~mask_red;
CC_green = bwconncomp(green_only);
num_green_only = CC_green.NumObjects;
```

Del mismo modo, se utilice un cogido para la construcción 3D, el algoritmo se divide en las siguientes etapas metodológicas:

1. Desempaquetado del Hyperstack y Gestión de Memoria

El script interactúa con el usuario para seleccionar el archivo .tif, analiza sus metadatos estructurales (imfinfo) y preasigna bloques de memoria según la profundidad de bits nativa (uint8 o uint16). Posteriormente, utiliza la clase de bajo nivel Tiff para separar los canales entrelazados por planos Z de forma eficiente:

```
% Preasignación dinámica según la profundidad de bits nativa
if info(1).BitDepth > 8
   channel(1).stack = zeros(H,W,nZ,'uint16'); % Canal Verde
   channel(2).stack = zeros(H,W,nZ,'uint16'); % Canal Rojo
end

% Separación (demultiplexación) de canales intercalados en Z
t = Tiff(fname,'r');
for z = 1:nZ
   t.setDirectory(2*z - 1); channel(1).stack(:,:,z) = t.read(); % Impar: Verde
   t.setDirectory(2*z);     channel(2).stack(:,:,z) = t.read(); % Par: Rojo
end
t.close();
```

2. Recorte de Regiones de Interés (ROI) y Ajuste Estadístico de Contraste



Para optimizar el procesamiento, se delimita una región espacial específica mediante coordenadas de recorte (X, Y). En cada rebanada del volumen, el algoritmo ajusta de forma no lineal los límites de intensidad óptica y realiza una operación de sustracción cruzada para eliminar el solapamiento de espectros de emisión (*crossover* o *bleed-through*):

```
% Recorte volumétrico y normalización de contraste por slice
gCrop = green(y1:y2, x1:x2, z);
rCrop = red(y1:y2, x1:x2, z);
gAdj = imadjust(gCrop, [500 2000]/65535);
rAdj = imadjust(rCrop, [200 2000]/65535);
rAdj = rAdj - gAdj; % Sustracción de fondo/bleed-through
```

3. Acondicionamiento Volumétrico y Corrección de Anisotropía

Los datos procesados se convierten al tipo de dato single y se normalizan de forma robusta en el intervalo cerrado [0, 1]. Para suavizar las transiciones espaciales se aplica un filtrado Gaussiano tridimensional (imgaussfilt3). Dado que la resolución en el eje Z suele ser menor que en el plano XY (anisotropía), el script modela la escala real del voxel definiendo un espaciado físico (ej. Z = 5 µm):

```
% Suavizado tridimensional del volumen para reducir ruido de reconstrucción
gVolS = imgaussfilt3(gVol, 0.5);
rVolS = imgaussfilt3(rVol, 0.5);

% Generación de la malla tridimensional anisotrópica (Z = 5 um, XY = 1 px)
zStep = 5; xStep = 1; yStep = 1;
[X,Y,Z] = meshgrid((0:wC-1)*xStep, (0:hC-1)*yStep, (0:nZ-1)*zStep);
```

4. Generación y Renderizado de Isosuperficies 3D

Utilizando los percentiles más altos de la intensidad volumétrica como umbrales críticos de segmentación espacial (prctile), el script calcula y modela las geometrías de superficie mediante la técnica de Isosuperficies. Cada canal es representado como un objeto matemático independiente con propiedades ópticas personalizadas (transparencia y color) y un sistema de iluminación avanzado para resaltar la topografía:

```
% Cálculo de umbrales umbralizadores basados en percentiles estadísticos
isoG = prctile(gVolS(:), 99.5);
isoR = prctile(rVolS(:), 99.5);

% Construcción y mapeo del objeto gráfico 3D (Isosuperficie)
pG = patch(isosurface(X,Y,Z, gVolS, isoG));
isonormals(X,Y,Z, gVolS, pG); % Computar vectores normales
set(pG, 'FaceColor',[0 1 0], 'EdgeColor','none', 'FaceAlpha',0.35);

% ConFiguración del motor de renderizado y proyección de luces
```



```
view(ax,3); daspect(ax,[1 1 1]);
camlight(ax,'headlight'); lighting(ax,'gouraud');
```

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Viabilidad metabólica

Con base en los ensayos previos de biocompatibilidad y estabilización química, se seleccionaron, para su integración y validación dinámica en el dispositivo microfluídico, las matrices funcionalizadas con una concentración nominal de 100 µM de GTA, empleando como variantes experimentales el control proteico de colágeno-quitosano (Coll-Ch), el compósito electroactivo de colágeno-quitosano/polipirrol (Coll-Ch/Ppy) y el compósito de colágeno-quitosano/polianilina (Coll-Ch/Pani). El sistema integrado fue esterilizado mediante perfusión controlada con etanol al 70% v/v, seguida de irradiación con luz UV. Las evaluaciones cinéticas de la actividad metabólica mediante el ensayo de Alamar Blue se realizaron en paralelo y en condiciones ciegas respecto al monitoreo microscópico de la viabilidad, utilizando cámaras microfluídicas independientes para evitar el solapamiento de las señales ópticas.

Los perfiles metabólicos de las matrices miniaturizadas a lo largo de 10 días se presentan en la Figura 5.1. En este diseño, el grupo Blanco (Bco) correspondió al cultivo bidimensional estándar en placas de 24 pozos bajo condiciones estáticas de referencia; el Control (Ctrl) representó el dispositivo microfluídico operado sin andamio polimérico (confinamiento en vidrio/PDMS), mientras que las cámaras restantes albergaron las membranas electrohiladas de Coll-Ch y Coll-Ch/Ppy (N = 3), manteniendo un régimen de perfusión y recambio de medio mediante jeringas optimizadas con válvulas direccionales.

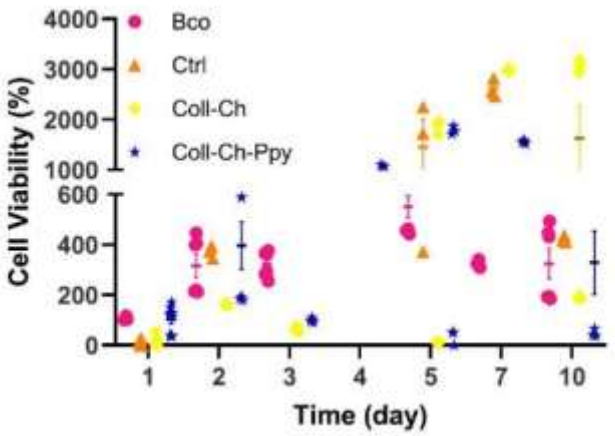


Figura 5.1. Perfil cinético de la viabilidad metabólica celular (azul alamar) de los cardiomioblastos H9c2 cultivados en el dispositivo microfluídico con membrana Coll-Ch/Ppy durante 10 días bajo condiciones de perfusión semicontinua.



El grupo Bco exhibió una fase logarítmica de crecimiento metabólico durante los primeros 5 días, seguida de un declive pronunciado en los puntos temporales posteriores. Este comportamiento contractivo se atribuye a la inhibición por contacto derivada de la confluencia celular en superficies bidimensionales, fenómeno que restringe la tasa de duplicación celular por saturación del área útil disponible, como se corrobora en la Figura 5.2. Por su parte, el grupo Ctrl mostró una cinética análoga al Bco durante las primeras 72 h; no obstante, manifestó un incremento metabólico estadísticamente significativo en los días 5 y 7. Esta divergencia en la distribución y la proliferación poblacional sugiere que las fuerzas de cizallamiento e hidrodinámica laminar generadas por la perfusión en los microcanales optimizan el transporte de masa, renovando la capa límite difusiva y estimulando la actividad metabólica en comparación con el régimen estático del blanco.

En el escenario de los andamios poliméricos integrados, se observaron viabilidades metabólicas basales cuantitativamente inferiores a las del grupo Bco durante los primeros 3 días. Esta respuesta corresponde a una adhesión dependiente del tiempo, a la fase de estabilización, reconocimiento y mecanotaxismo usando sensado de moléculas de adhesión focal de los cardiomioblastos al transicionar de un sustrato plano y rígido a una topografía porosa tridimensional . Sin embargo, hacia el día 5, la vitalidad celular experimentó un incremento exponencial significativo. Este fenómeno demuestra el acoplamiento morfológico y la colonización efectiva del espesor del andamio, en el que las células podría estar reanudaron sus funciones dentro de una arquitectura tridimensional que mimetiza la matriz extracelular nativa .

En cuanto a la evaluación cinética de la actividad metabólica mediante azul alamar en el dispositivo microfluídico, el andamio funcionalizado con Pani se monitoreó durante 15 días (Figura 5.2). A partir del día 4 de incubación bajo perfusión, la matriz de Coll-Ch/Pani mostró valores de viabilidad cuantitativamente superiores a los observados en la membrana modificada con PPy. Este perfil metabólico se mantuvo en una fase estacionaria estable hasta el día 7; no obstante, en el punto temporal del día 10 se constató una atenuación transitoria de la actividad metabólica, seguida de una recuperación proliferativa notable hacia el día 15, con un incremento de hasta un orden de magnitud (10 veces superior) en la respuesta metabólica celular.

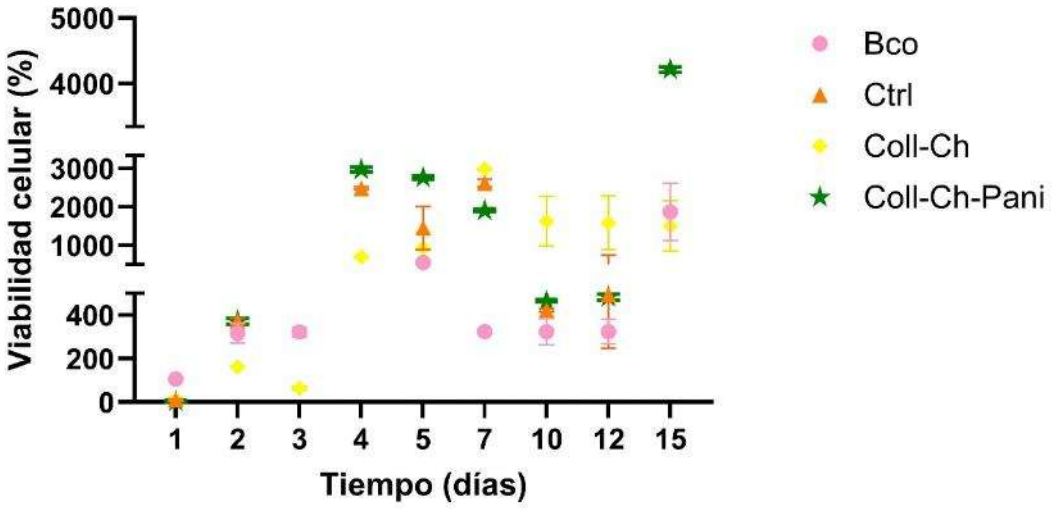


Figura 5.2. Perfil cinético de la viabilidad metabólica celular (azul alamar) de los cardiomioblastos H9c2 cultivados en el dispositivo microfluídico con membrana Coll-Ch/Pani durante 10 días bajo condiciones de perfusión semicontinua.



En la Figura 5.3 se analizó adicionalmente si el protocolo de evaluación continua inducía acumulación residual de la forma reducida del azul alamar (resorufina) en los microcanales del chip, en comparación con las placas tradicionales, y se determinó que no se observaron diferencias significativas entre ambos métodos de cuantificación. No obstante, se detectó un efecto crítico a lo largo de la cinética celular, caracterizado por la ausencia del crecimiento exponencial típicamente esperado en la línea H9c2. Este fenómeno se atribuye al confinamiento celular asociado al método de siembra en microvolúmenes (alícuotas de 10 µL). La elevada densidad celular inicial promueve la formación instantánea de conglomerados masivos de células; esto genera gradientes difusivos internos en los que las células ubicadas en el centro del agregado experimentan restricciones a la difusión de oxígeno y nutrientes, lo que induce un estado latente de estrés por hipoxia y quiescencia metabólica que deprime la tasa global de proliferación.

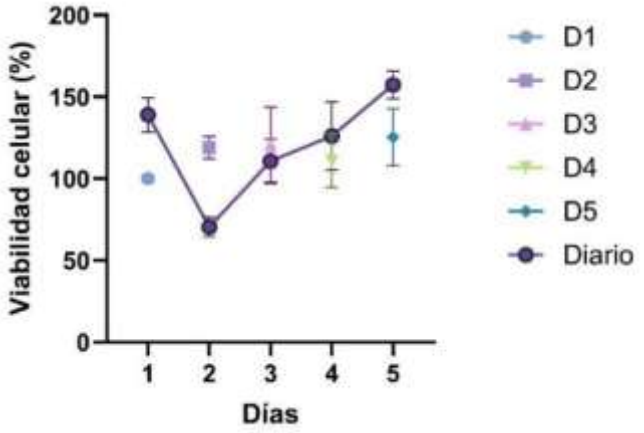


Figura 5.3. Seguimiento del efecto en la viabilidad celular del cultivo que fue sembrado en 10 ul.

De manera complementaria, se evaluó el posible efecto interferente de la matriz polimérica sin células sobre la cinética de reducción química o acumulación del reactivo azul alamar. Los controles acelulares de las membranas no registraron señales de reducción de la resazurina a resorufina a lo largo del ensayo, lo que descarta cualquier actividad autocatalítica o interferencia óptica por parte de las matrices nanofibrosas. Este hallazgo permite atribuir, con rigor analítico, la totalidad de las señales de fluorescencia cuantificadas a la actividad metabólica respiratoria de las células viables adheridas a los andamios.

5.2.2 Monitoreo continuo de vida/muerte

En las cámaras secundarias del dispositivo se realizó, de forma paralela, un análisis histológico virtual continuo durante los 10 días de incubación mediante el par fluorogénico de viabilidad *live/dead*. Las micrografías confocales



correspondientes al Bco, Ctrl (sin membrana), Coll-Ch y Coll-Ch/Ppy permitieron caracterizar la evolución morfológica de la población celular (Figura 5.4). Durante las primeras 24 h, las células de los grupos Bco y Ctrl mantuvieron su fenotipo fusiforme y alargado característico. Es notable la ausencia de fluorescencia verde en el canal de muerte celular en los puntos tempranos; esto se atribuye al efecto de cizallamiento hidrodinámico ejercido durante los lavados previos a la tinción, que desplazan y remueven mecánicamente los detritos y las células muertas que carecen de complejos de adhesión focal estables.

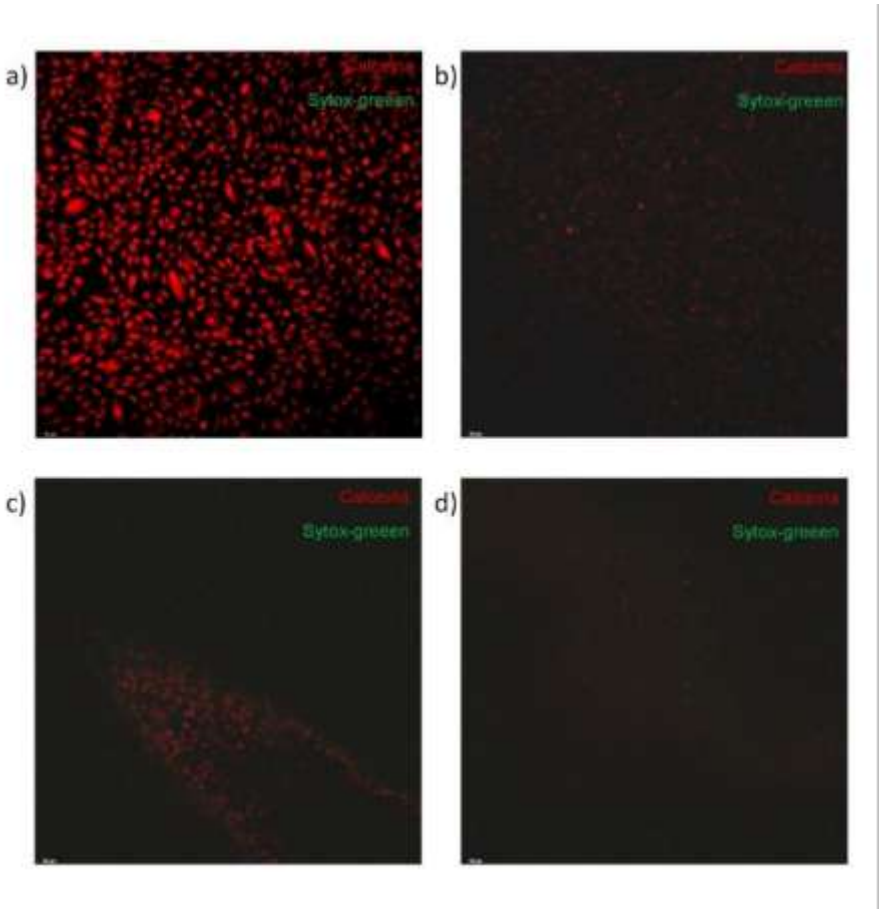


Figura 5.4. Micrografías de microscopía confocal representativas de los cardiomioblastos H9c2 perfundidos en el chip en el día 1 de cultivo: (a) Blanco en placa, (b) Control del dispositivo sin membrana, (c) Andamio de control de Coll-Ch y (d) Andamio electroactivo de Coll-Ch/Ppy.

En el andamio de control de Coll-Ch, los cardiomioblastos exhibieron una morfología inicialmente menos extendida (esferoidal/fusiforme), pero con una alta estabilidad interfacial que les permitió resistir los flujos de lavado, lo cual confirmó su anclaje químico a la matriz proteica. Asimismo, las imágenes confocales revelaron que las células se alinean a lo largo de la topografía ondulada y del patrón de relieve intrínseco de las nanofibras electrohiladas. En contraste, en la matriz electroactiva de Coll-Ch/Ppy, la densidad de señal fluorescente activa fue menor y se distribuyó en cúmulos de menor tamaño molecular. Este comportamiento es consistente con los datos macroscópicos de azul alamar, lo que confirma que la resistencia conductiva y la rugosidad nanométrica del



polipirrol imponen una barrera energética que prolonga el periodo de adaptación celular y restringe la velocidad de colonización inicial.

En el caso de los andamios electroactivos de colágeno-quitosano/polianilina (Coll-Ch/Pani), el análisis confocal representativo de la Figura 5.5 reveló una marcada predominancia de señales asociadas a células viables durante las primeras 24 h post-siembra. Esta prevalencia de señales de viabilidad que se mantuvo constante a lo largo de la cinética de incubación en flujo. La baja densidad de señales fluorescentes en el canal de Sytox green se atribuye a un efecto mecánico de remoción hidrodinámica: aquellas células que no consolidaron complejos de adhesión focal estables o que iniciaron procesos apoptóticos sufrieron desprendimiento y arrastre durante los ciclos de lavado previos al protocolo de tinción.

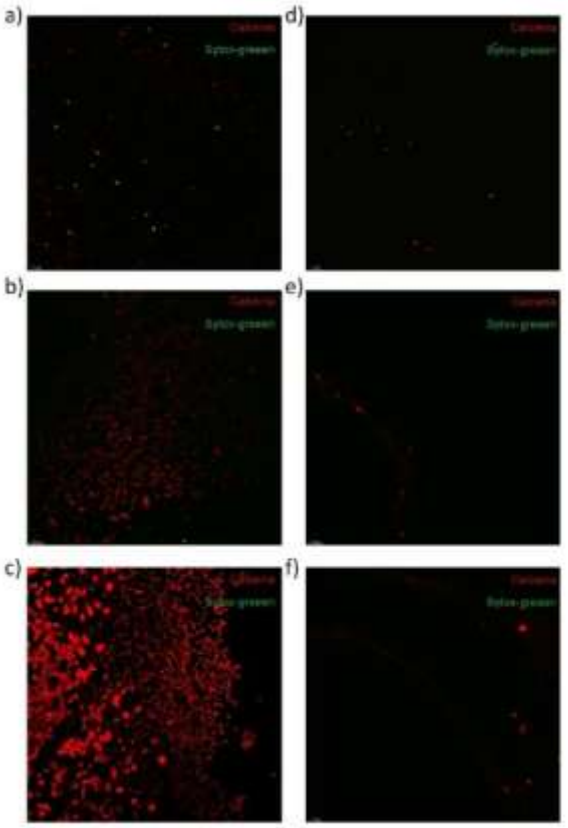


Figura 5.5. Micrografías representativas de microscopía confocal de barrido láser que ilustran la morfología y distribución espacial de los cardiomioblastos H9c2 perfundidos en el dispositivo microfluídico en los días 1, 5 y 10 de cultivo. Comparativa entre el Ctrl (a,b y c) del dispositivo sin membrana y la plataforma OoC integrada con la matriz electroactiva de Coll-Ch/Pani (d, e y f).

En contraste con el Control del dispositivo sin membrana, donde se identificó una tasa considerable de mortalidad celular desde el día 1, con una atenuación progresiva de esta señal hacia el día 5, la matriz de Coll-Ch/Pani preservó la viabilidad poblacional. No obstante, hacia el día 10 de cultivo, si bien persistió la señal de fluorescencia correspondiente a células viables, los cardiomioblastos exhibieron una alteración morfológica sustancial, perdiendo su fenotipo elongado y fusiforme característico para adoptar una estructura atípica modificada, lo que



sugiere una respuesta de remodelación citoesquelética o de adaptación fenotípica tardía frente a las propiedades interfaciales de la polianilina.

La cuantificación digitalizada de la densidad de miocitos vivos y muertos se detalla en la Figura 5.6. En el andamio funcionalizado con Ppy, se observó un comportamiento cinético inversamente proporcional: el incremento progresivo de la biomasa celular viva se correlacionó con una reducción sistemática de la tasa de muerte celular hacia el final del estudio (día 10). Por el contrario, el dispositivo Ctrl mostró una tendencia opuesta, caracterizada por un incremento de la densidad de núcleos muertos teñidos con Sytox Green y el estancamiento de la población viva, un comportamiento asociado a la saturación bidimensional del canal hidrodinámico. En el andamio puro de Coll-Ch, la población de células viables inicial se aproximó a los niveles de referencia del blanco en placa; sin embargo, a medida que avanzaban los días, se documentó un declive progresivo de células viables, con el consecuente incremento de células muertas, fenómeno correlacionado con la degradación hidrolítica del colágeno desprotegido.

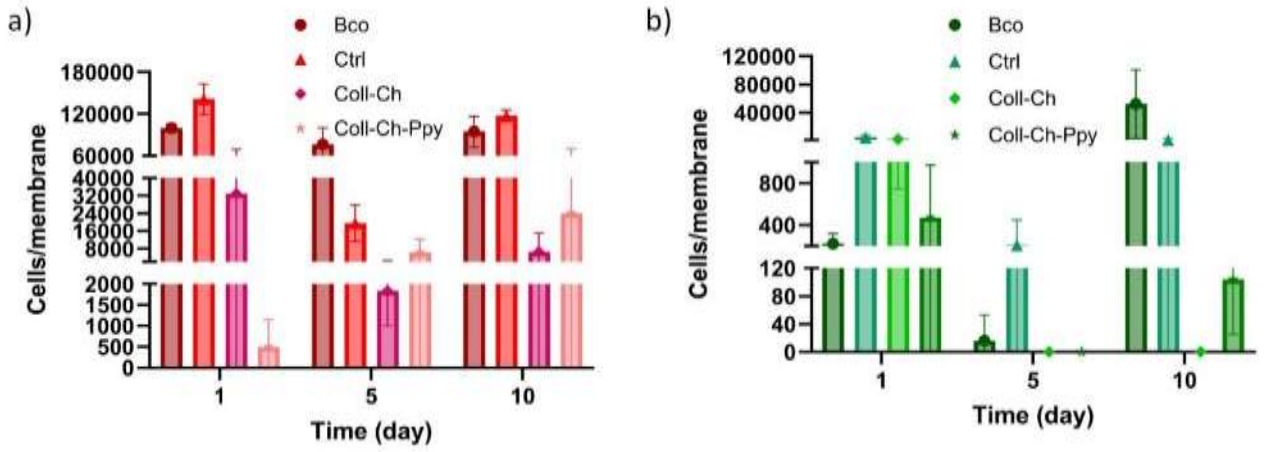


Figura 5.6. Análisis cuantitativo de las densidades de poblaciones celulares vivas (a) y muertas (b), indexadas por unidad de área, en los andamios microfluídicos con membranas de Coll-Ch/Ppy durante 10 días.

A partir de estas métricas de segmentación celular, se construyeron los perfiles de viabilidad porcentual presentados en la Figura 5.7, que validaron matemáticamente los hallazgos metabólicos del ensayo de azul alamar y confirmaron una sólida consistencia metodológica entre ambos enfoques analíticos. Cuantitativamente, se observó que la viabilidad del grupo Bco se mantuvo en niveles óptimos superiores al 90% desde el primer día de evaluación; el Ctrl exhibió un comportamiento cinético análogo, sin diferencias estadísticamente significativas respecto de la referencia estática.

En contraste, los andamios poliméricos integrados en el chip mostraron perfiles dinámicos marcadamente divergentes. La membrana de Coll-Ch mostró un declive crítico de su viabilidad a partir del día 5, contrayéndose drásticamente hasta alcanzar valores cercanos al 15% y manteniéndose en rangos de hipoviabilidad severa hacia el final del ensayo. Por el contrario, la matriz electroactiva funcionalizada con Ppy demostró un comportamiento inverso de adaptación tardía: tras superar la fase de latencia inicial, el sistema experimentó una proliferación exponencial acelerada a partir del día 5, registrando un incremento masivo de la densidad celular de hasta un 300%



hacia el día 10 de cultivo bajo perfusión. Que, a su vez, puede observarse mediante la distribución y la reconstrucción ortogonales del stack de micrografías de la Figura 5.8. Las reconstrucciones ortogonales de los días intermedios se presentan en el Anexo 3.

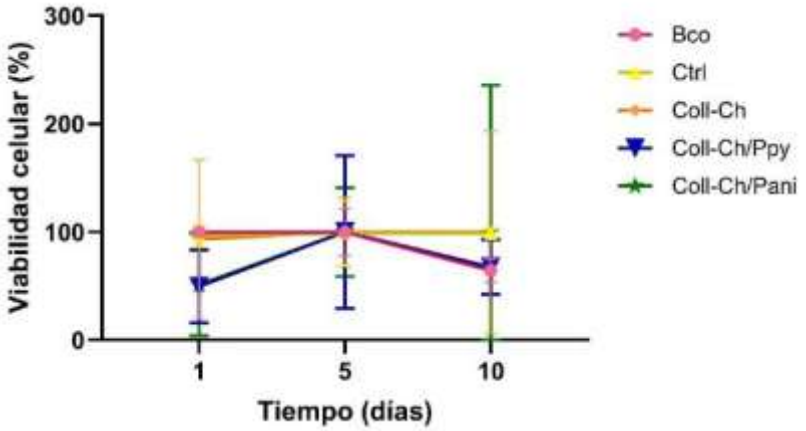


Figura 5.7. Curvas porcentuales de viabilidad celular derivadas del procesamiento digital de imágenes confocales de fluorescencia en el dispositivo OoC (N = 3).

Los perfiles cuantitativos de viabilidad celular obtenidos para las matrices electroactivas de Coll-Ch/Pani mostraron una tendencia cinética similar, caracterizada por un incremento significativo hasta el día 5 de cultivo con perfusión. Esta respuesta biológica alcanzó un nivel de estabilización, manteniendo una viabilidad óptima del 100% hasta el día 10 de la evaluación, un comportamiento que, estadísticamente, se equiparó a los niveles de supervivencia celular observados en el dispositivo de control sin membrana. Además, las reconstrucciones ortogonales evidencian que las células en ambos casos logran atravesar el grosor de la membrana (Figura 5.9). Las reconstrucciones ortogonales de los días iniciales se presentan en los Anexos 2 y 3.



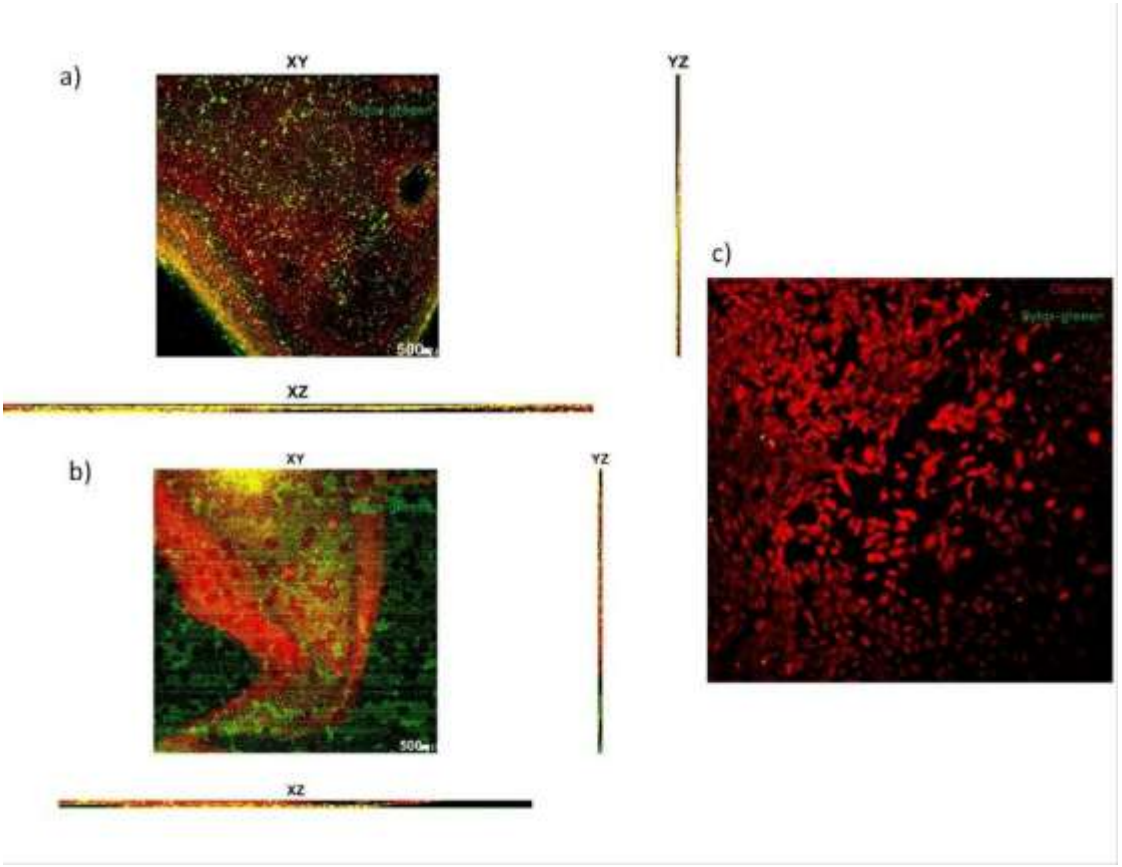


Figura 5.8. Reconstrucciones ortogonales obtenidas a partir del Z-stack por microscopía confocal de barrido láser al día 10 de cultivo dinámico. Se ilustra la colonización e infiltración tridimensional de las células H9c2 a través del espesor de los andamios electroactivos en la plataforma OoC: (a) matriz de Coll-Ch/PPy, (b) matriz de Coll-Ch/Pani y (c) dispositivo Ctrl sin membrana.

5.2.3 Construcción de esquemas 3D

Una vez ejecutados los algoritmos de deconvolución y segmentación de los z-stacks confocales en MATLAB, se generaron los modelos de reconstrucción tridimensionales para mapear la distribución espacial en profundidad de los cardiomioblastos a lo largo del espesor de la membrana electrohilada. Como se ilustra en la Figura 5.9, durante las primeras 24 h pos-siembra, la población celular se distribuyó de manera homogénea configurando una monocapa celular confinada estrictamente a la superficie y a la interfaz porosa más externa del andamio polimérico. Esta distribución espacial temprana corrobora que la invasión celular profunda en matrices electrohiladas densas es un proceso dependiente del tiempo, regulado por la degradación controlada de la matriz bajo el régimen de perfusión transmembranal del dispositivo OoC.

Al analizar minuciosamente el plano axial (z) en el día 1, la membrana de Coll-Ch presentó una densidad de señales de calceína roja (células vivas) superior, que se localizaron a diferentes alturas a lo largo del eje axial de manera sinuosa, lo que demuestra un acoplamiento físico inmediato con la morfología ondulatoria intrínseca del



andamio proteico. Por su parte, el compósito de Coll-Ch/Ppy presentó una menor densidad poblacional inicial en este punto temporal, aunque los miocitos replicaron con precisión el mismo patrón de anclaje tridimensional en distintos planos de la matriz.

Hacia el día 5 de incubación, el panorama histológico virtual cambió drásticamente. En la membrana de Coll-Ch se constató una atenuación severa del contraste fluorescente, registrándose una disminución drástica tanto de las señales de células vivas como de las de células muertas, lo que confirma la desconsolidación física del soporte proteico por hidrólisis y la subsecuente pérdida de biomasa por arrastre hidrodinámico. En contraposición, el andamio electroactivo de Ppy promovió una colonización volumétrica robusta; el sistema no solo facilitó la duplicación celular activa, sino que también guió tridimensionalmente a los cardiomioblastos, induciendo una morfología elongada y orientada verticalmente o inclinada a lo largo del relieve de las nanofibras conductoras. Este fenómeno morfológico se correlaciona directamente con las cinéticas metabólicas previas, lo que demuestra que la presencia del polipirrol impone un periodo tardío de estabilización y equilibrio homeostático; sin embargo, una vez que las células consolidan sus complejos de adhesión focal, el sustrato electroactivo provee un nicho altamente eficiente para los procesos de duplicación, extensión citoplasmática y maduración fenotípica en entornos de flujo continuo [201]. Las reconstrucciones 3D de los días intermediarios se presentan en el Anexo 3.

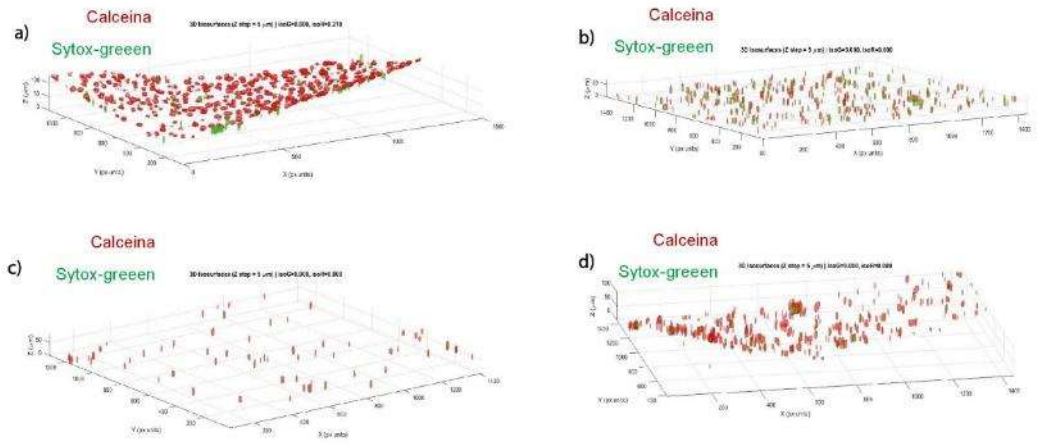


Figura 5.9. Reconstrucción tridimensional e histología virtual (z-stack) que ilustran la distribución e infiltración de los cardiomioblastos H9c2 en el plano axial de la membrana electrohilada Coll-Ch al día 1 y 5 de cultivo (a y c), así como la membrana Coll-Ch al día 1 y 5 de cultivo (b y d).

Como se observa en la Figura 5.11, las membranas funcionalizadas con Pani (Coll-Ch/Pani) exhibieron un aumento constante en la intensidad de fluorescencia vinculada a la viabilidad celular. Este comportamiento biológico fue verificado mediante procesamiento digital y reconstrucción en 3D, en la que las secciones ortogonales confirmaron la penetración y infiltración tridimensional de los cardiomioblastos en la profundidad a lo largo del eje Z del soporte nanoestructurado.



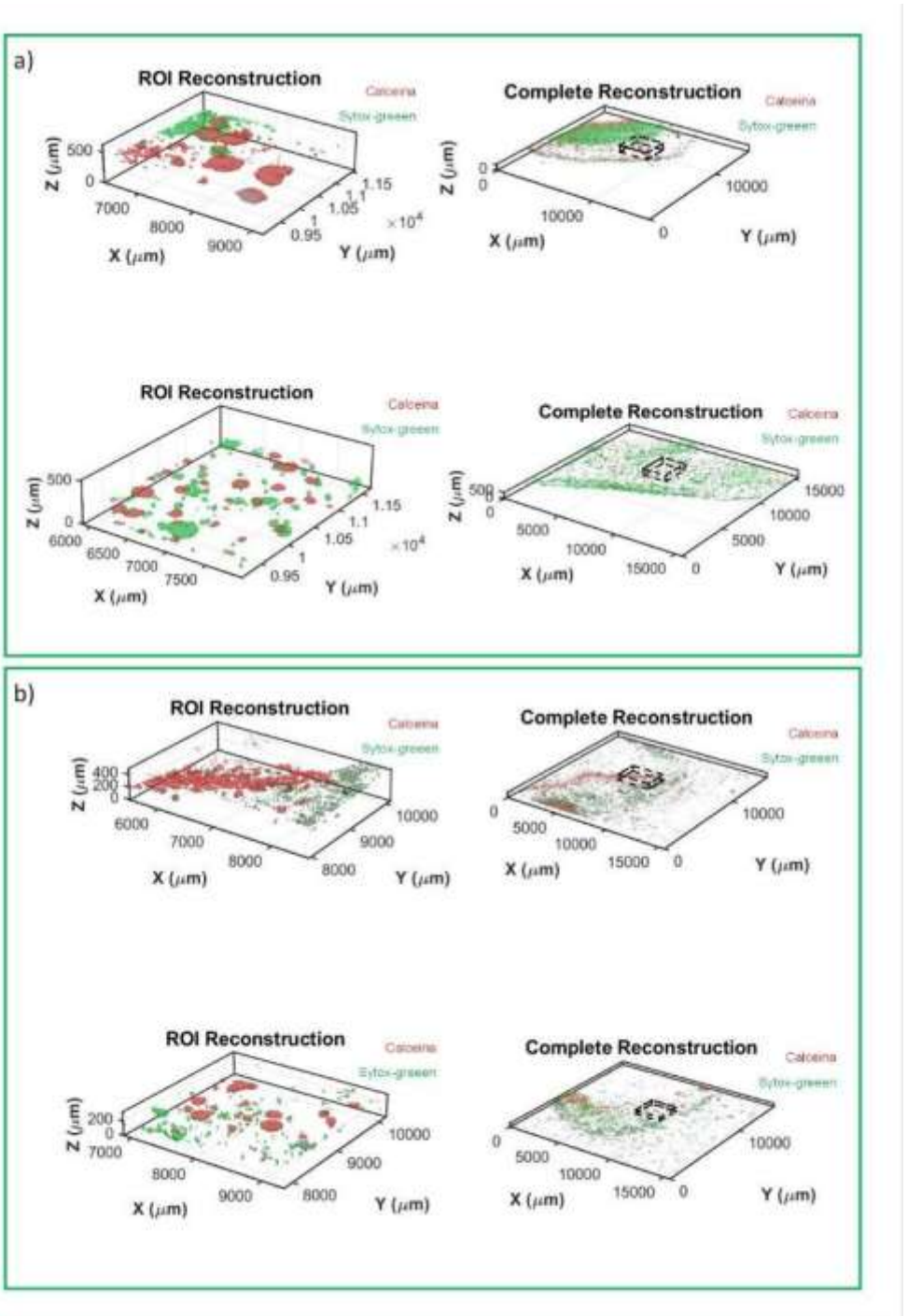


Figura 5.10. Reconstrucción tridimensional e histología virtual (z-stack) que ilustran la distribución e infiltración de los cardiomioblastos H9c2 en el plano axial de la membrana electrohilada Coll-Ch/Pani a las 24 horas de cultivo (a), así como al día 5 (b)



Las reconstrucciones 3D de los días intermediarios se presentan en el Anexo 3.

5.3 VIABILIDAD CELULAR EN DISPOSITIVO SIN FLUJO

Con el propósito de aislar y discriminar los efectos mecánicos e hidrodinámicos derivados de la perfusión continua con jeringas sobre la adherencia y la supervivencia celulares, se llevó a cabo un diseño experimental complementario, manteniendo el medio de cultivo en régimen estático absoluto dentro del dispositivo. En la Figura 5.12 se presentan las micrografías confocales de barrido láser obtenidas a las 24 h post-siembra. En este punto temporal temprano, se constató una elevada densidad de señales de células viables en todos los sistemas. No obstante, la persistencia de núcleos positivos de muerte celular en las matrices poliméricas se mantiene en niveles consistentes con los reportados en los ensayos dinámicos, lo que ratifica que el periodo inicial de 24 h constituye una ventana crítica de adaptación estocástica para las células.

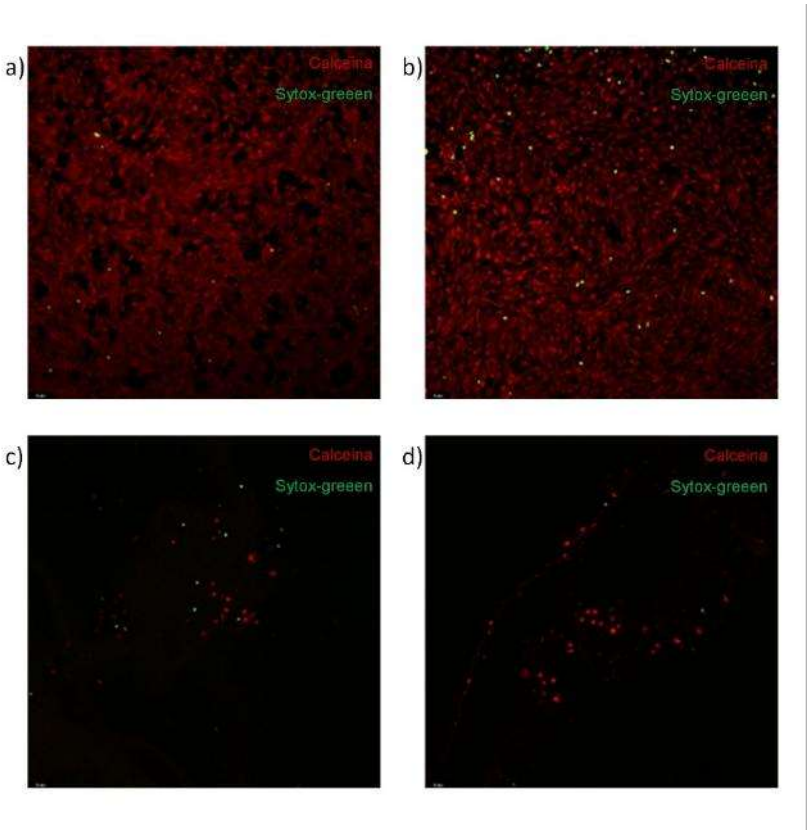


Figura 5.11. Micrografías de microscopía confocal que ilustran la viabilidad celular tras 24 h de cultivo estático en el chip: (a) blanco de referencia en placa, (b) control del dispositivo sin membrana, (c) andamio de Coll-Ch, y (d) andamio electroactivo de Coll-Ch/Ppy.

A nivel morfológico, el grupo Ctrl (Figura 5.12b) propició una distribución espacial homogénea que permitió a los miocitos conservar su fenotipo característico elongado y fusiforme. En contraposición, el grupo Bco (Figura



5.11a) evidenció alteraciones estructurales sutiles y zonas de aglomeración localizada, lo que sugiere un efecto de empaquetamiento celular inducido por las fuerzas capilares del protocolo de siembra en microvolúmenes sobre superficies planas desprovistas de confinamiento microfluídico.

Mientras que en el dispositivo Ctrl (Figura 5.12b) las células preservaron la morfología nativa de la línea H9c2, en el andamio puro de Coll-Ch (Figura 5.12c) se identificó una población celular viable pero caracterizada por un fenotipo transitorio más esferoidal o semicircular. Una respuesta citotópica análoga se observó en la matriz electroactiva de Coll-Ch/Ppy. Aunque la retención de los cardiomioblastos tras los rigurosos ciclos de lavado previos a la tinción convalidó la efectividad de su anclaje físico al sustrato, la ausencia de una extensión citoplasmática completa (alargamiento axial) indica que los miocitos se encuentran inmersos en una fase activa de remodelación citoesquelética. Durante esta etapa, la célula prioriza el ensamblaje de complejos macromoleculares de adhesión focal, gobernados por la reclutación de proteínas estructurales como la vinculina y la talina, antes de proceder a la elongación celular definitiva sobre el relieve de las nanofibras.

Al avanzar el periodo cinético hasta el día 5 de cultivo estático, la dinámica celular experimentó cambios drásticos debido a la falta de renovación del medio. En el dispositivo Ctrl (Figura 5.13a), las células experimentaron una confluencia crítica que derivó en la formación de conglomerados masivos hiperdensos, con cambios morfológicos consistentes con un fenotipo de senescencia celular prematura que sugiere una inducción por el agotamiento local de nutrientes y la acumulación de desechos metabólicos ácidos en el microcanal.

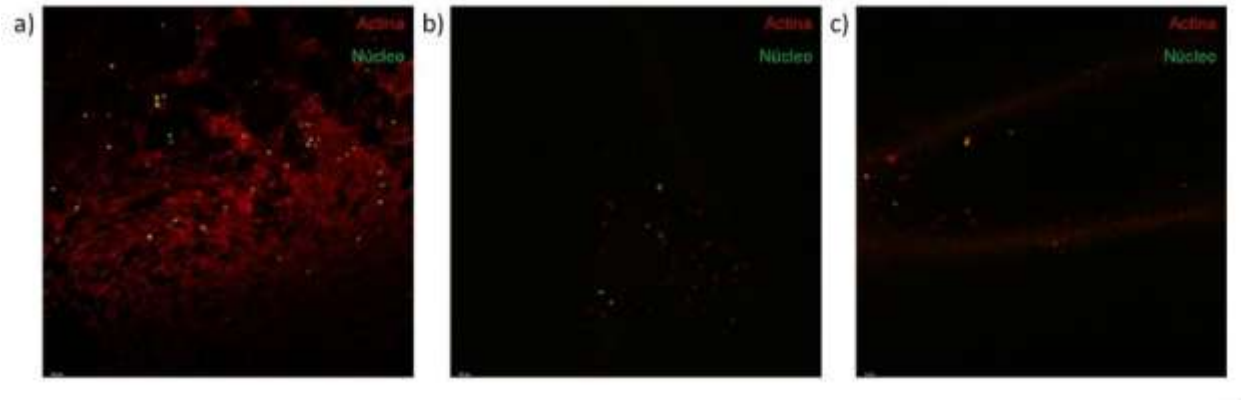


Figura 5.12. Micrografías confocales de barrido láser correspondientes al día 5 de cultivo bajo régimen estático dentro del dispositivo microfluídico: (a) control del dispositivo sin membrana, (b) andamio de Coll-Ch, y (c) andamio electroactivo de Coll-Ch/Ppy.

Por el contrario, los dispositivos que albergaban los andamios porosos (Figuras 5.13b y 5.13c) mitigaron este efecto de saturación bidimensional. Las micrografías confocales ortogonales (Figura 5.14) revelaron que las células no solo recuperaron y consolidaron una morfología marcadamente alargada, sino que también se distribuyeron de manera tridimensional, aprovechando el espesor y el área superficial disponible de las membranas. Este hallazgo demuestra que, incluso bajo condiciones restrictivas de flujo estático, las matrices electrohiladas actúan como amortiguadores de confluencia al expandir el nicho celular en la tercera dimensión y al retrasar los procesos de senescencia por contacto espacial.



La Figura 5.14 ilustra la evolución morfológica y la reorganización espacial de los cardiomioblastos H9c2 durante el periodo de incubación estática intermitente (días 1 a 5) con recambio de medio. Hacia el día 5 de cultivo, la población celular exhibió una marcada elongación citoplasmática y un alineamiento axial característico, superando la etapa inicial de adaptación morfométrica. Asimismo, el análisis espacial confirmó la presencia de células distribuidas homogéneamente a lo largo del grosor de la matriz nanoestructurada, evidenciando una colonización e infiltración transmural efectiva en el eje Z. Al comparar ambas funcionalizaciones electroactivas, los andamios compuestos por colágeno-quitosano y polianilina (Coll-Ch/Pani) mostraron un desempeño biológico superior respecto a los de polipirrol (Coll-Ch/PPy), manifestado en una mayor orientación citoesquelética y mejor penetración tridimensional.

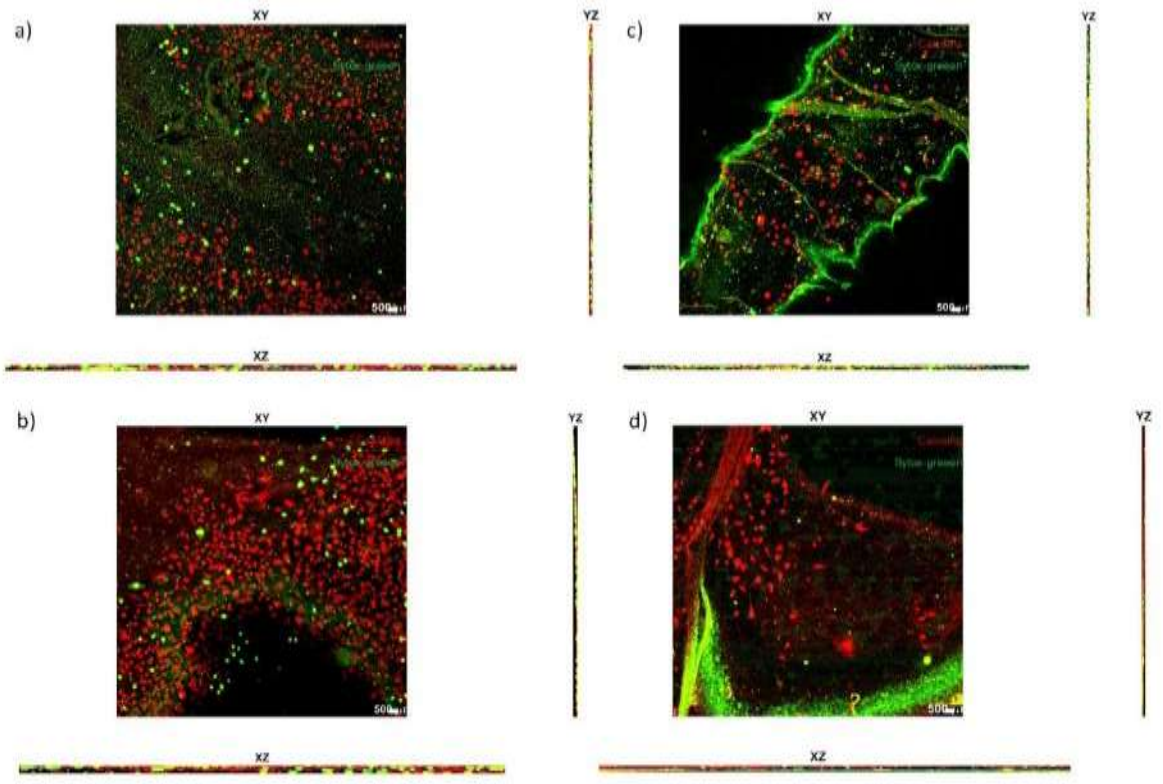


Figura 5.13. Proyecciones ortogonales de Z-stacks confocales para el análisis de viabilidad celular en función del tiempo: matrices electroactivas de Coll-Ch/Pani en el día 1 (a) y día 5 (b); y matrices de Coll-Ch/PPy en el día 1 (c) y día 5 (d).

De manera análoga, las reconstrucciones tridimensionales de las matrices de Coll-Ch/Pani confirmaron la colonización e infiltración transmural efectiva de los cardiomioblastos a través de todo el espesor del andamio, tal como se ilustra en la Figura 5.15.



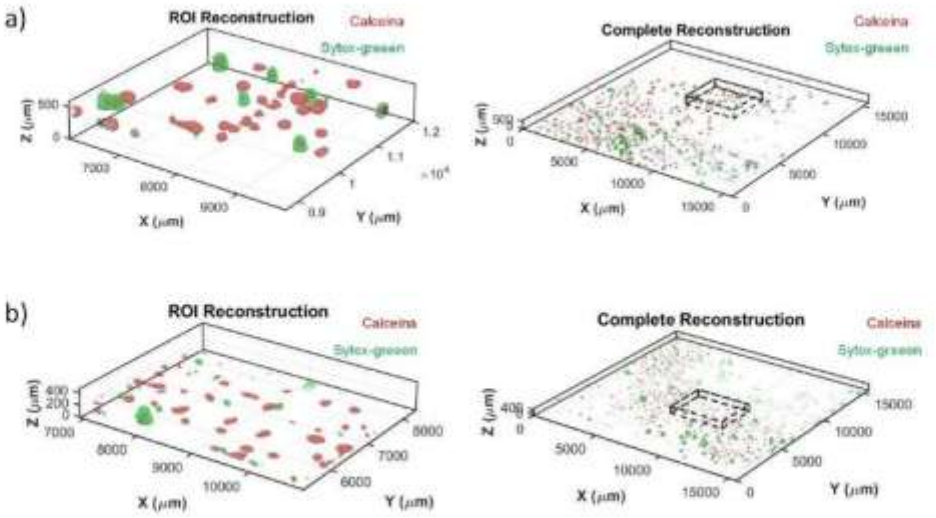


Figura 5.14. Reconstrucción tridimensional de la distribución e infiltración espacial de los cardiomioblastos H9c2 embebidos en la matriz electroactiva de colágeno-quitosano/polianilina (Coll-Ch/PANI) en el día 1 (a) y día 5 (b) de cultivo.

Adicionalmente, en la Figura 5.16, las reconstrucciones ortogonales derivadas de la inmunotinción del citoesqueleto de actina de filamento (F-actina) confirmaron la distribución espacial tridimensional y el marcado alineamiento citoesquelético de los cardiomioblastos sobre las matrices nanofibrosas. La transición morfológica observada entre el día 1 y el día 5 sugiere que las células atraviesan un periodo de adaptación inicial prolongado, lo que requiere un intervalo temporal mayor para consolidar complejos de adhesión focal maduros y reorganizar sus fibras de estrés. Sin embargo, estos hallazgos plantean interrogantes acerca de las interacciones célula-matriz a nivel microambiental local, dado que la fuerza de arrastre generada durante los ciclos de lavado e incubación del protocolo de tinción podría inducir el desprendimiento preferencial de la fracción celular con adhesión débil, sesgando potencialmente la cuantificación poblacional in situ.



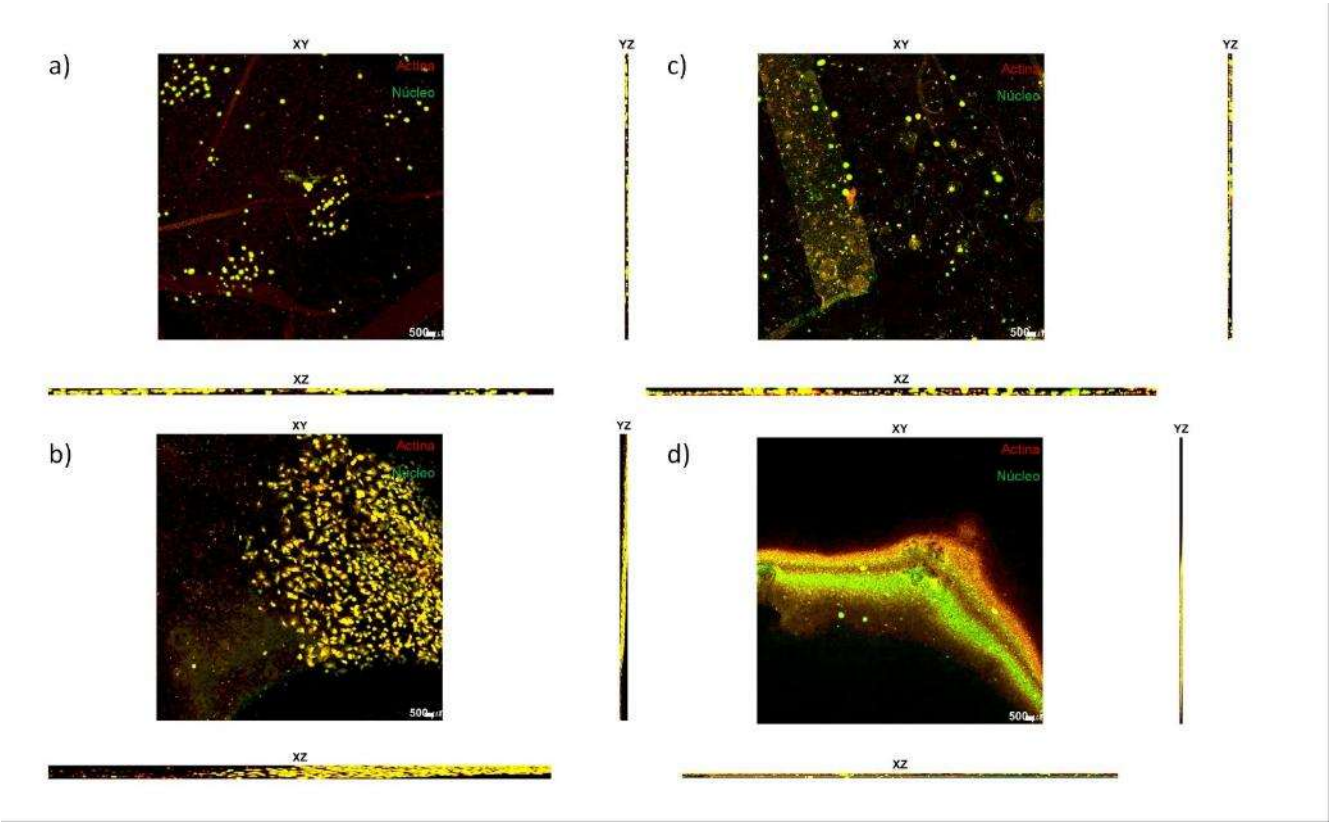


Figura 5.15. Proyecciones ortogonales de Z-stacks confocales para el análisis de α-actina y núcleos en función del tiempo: matrices electroactivas de Coll-Ch/Pani en el día 1 (a) y día 5 (b); y matrices de Coll-Ch/PPy en el día 1 (c) y día 5 (d).

5.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

La transición desde un entorno de cultivo bidimensional estático hacia una arquitectura microfluídica puso de manifiesto el impacto regulatorio de los fenómenos de transporte de masa y de las fuerzas hidrodinámicas en el metabolismo de los cardiomioblastos. El incremento metabólico estadísticamente significativo registrado en el dispositivo de control sin membrana durante los días 5 y 7, en comparación con el grupo Bco, se fundamenta físicamente en la dinámica de la capa difusiva.

En condiciones estáticas tradicionales, el transporte de oxígeno y nutrientes hacia las células está estrictamente limitado por la difusión pasiva molecular, lo que induce la acumulación local de metabolitos ácidos secundarios e inhibición por contacto a medida que el tejido alcanza la confluencia. Por el contrario, la perfusión semicontinua en el microcanal del dispositivo Ctrl introduce una velocidad de flujo laminar que genera un esfuerzo de cizallamiento basal sobre la membrana plasmática celular. Desde una perspectiva mecanobiológica, este estímulo hidrodinámico activa canales iónicos mecanosensibles y receptores acoplados a proteínas G, lo que desencadena cascadas de señalización intracelular que podrían sobreestimular la actividad respiratoria mitocondrial y acelerar la renovación de los sustratos energéticos en la interfaz celular.



Sin embargo, un hallazgo crítico que moduló la cinética proliferativa global en todos los sistemas del chip fue la ausencia del crecimiento exponencial clásico, consecuencia directa del confinamiento inducido por el método de siembra en microvolúmenes. Al confinar nominalmente 3 000 o 10 000 células en un volumen macromolecularmente restringido, las fuerzas cohesivas intercelulares predominan sobre las fuerzas de adhesión al sustrato durante la primera hora. Esto induce la coalescencia estocástica de los cardiomioblastos en densos conglomerados tridimensionales antes de su fijación física.

A nivel molecular, el núcleo de estos agregados experimenta una severa restricción del transporte difusivo de oxígeno y un gradiente negativo en el suministro de glucosa, lo que emula las condiciones isquémicas de los esferoides tumorales o de microtejidos avasculares. Este perfil de hipoxia local transitoria activa la vía del factor inducible por hipoxia, lo que induce un estado de quiescencia metabólica o de arresto del ciclo celular en las capas internas del conglomerado. Esto explica analíticamente por qué las viabilidades iniciales en las membranas resultaron subóptimas respecto al blanco en placa, al operar el microvolumen como un cuello de botella difusivo inicial.

El comportamiento asimétrico observado entre el andamio de control de Coll-Ch y el compósito electroactivo (Coll-Ch/Ppy) a partir del día 5 evidencia que las propiedades fisicoquímicas superficiales del biomaterial regulan el destino biológico del tejido. El colapso drástico de la viabilidad en la matriz de Coll-Ch se correlaciona con la termodinámica de su degradación hidrolítica en flujo. Al no contar con el refuerzo estructural de una fase conductora intercalada, las cadenas lábiles de colágeno podrían sufrir una rápida escisión de sus enlaces peptídicos debido a la acción competitiva de los iones y las proteínas presentes en el medio DMEM durante la perfusión. Esta desestructuración macroscópica de la nanofibra destruye los complejos de adhesión focal previamente consolidados, provocando la pérdida masiva de biomasa celular por arrastre mecánico del flujo laminar y desencadenando una muerte celular generalizada.

Por el contrario, el comportamiento de la matriz modificada con Ppy, que alcanzó un incremento de la densidad celular de hasta el 300% hacia el día 10, podría relacionarse con un mecanismo de estabilización adaptativa tardía de gran relevancia para la ingeniería de tejidos cardíacos. Durante los primeros 3 días, la presencia de los anillos conjugados del Ppy y su rugosidad nanométrica inherente actúan como una barrera energética para las integrinas celulares. Las cargas electrostáticas localizadas del polímero conductor dopado inicialmente restringen la movilidad lateral de los receptores de membrana, lo que prolonga el tiempo necesario para el reconocimiento molecular de los motivos de adhesión del colágeno.

No obstante, una vez superado este periodo de latencia y de aclimatación homeostática, el Ppy confiere al andamio una estabilidad mecánica superior, restringiendo la difusión interna del agua y protegiendo la matriz proteica frente al ataque hidrolítico temprano. Al mantener de forma continua la integridad de las nanofibras, los cardiomioblastos logran colonizar de manera estable el sustrato. El empaquetamiento molecular denso y la conductividad eléctrica basal del compósito actúan entonces como un sustrato biológicamente eficiente, estimulando la duplicación celular a largo plazo al proveer un anclaje mecánico rígido y continuo que resiste el cizallamiento del fluido sin delaminarse.

Las reconstrucciones tridimensionales derivadas del procesamiento digital confirmaron que la invasión celular dentro de las membranas integradas en el chip es un fenómeno dinámico a lo largo del espesor de la matriz (eje z). A las 24 h pos-siembra, la localización restringida de los miocitos en una monocapa superficial sobre ambas membranas (Coll-Ch y Coll-Ch/Ppy) demuestra que la densa red de nanofibras electrohiladas actúa inicialmente



como una barrera física de filtración mecánica, en la que el diámetro de poro interconectado es menor o igual que el diámetro celular en estado esferoidal en suspensión.

La transición estructural documentada hacia el día 5 evidencia la superioridad del sistema electroactivo de Ppy en la dirección axial del andamio. En las muestras de Coll-Ch puras, el adelgazamiento de las señales fluorescentes en diferentes planos de altura corrobora la desconsolidación física del soporte: la hidrólisis destruyó las nanofibras en los planos superiores, lo que provocó el desprendimiento de las células adheridas. En contraste, en la matriz de Coll-Ch/Ppy, la observación de cardiomioblastos distribuidos tridimensionalmente a diferentes alturas del eje z, con un fenotipo elongado y una orientación inclinada o vertical, constituye una prueba de guía de contacto activa.

La estabilidad hidrolítica que el Ppy confiere a la nanofibra permite que los poros interconectados se mantengan estables a lo largo del tiempo, sirviendo como microcanales o autopistas tridimensionales para la migración activa. La perfusión transmembranal del dispositivo OoC genera un gradiente de presión hidrostática y de concentración de oxígeno a lo largo del espesor de la membrana. Los cardiomioblastos responden a este gradiente quimiotáctico elongando sus filamentos de actina e invadiendo los intersticios del andamio, tanto vertical como angularmente. Este ordenamiento celular tridimensional, acoplado al relieve del polímero electroactivo, representa un paso para mimetizar la anisotropía estructural del miocardio nativo en ensayos de maduración de tejido cardiovascular a largo plazo.

5.5 CONCLUSIONES

El conjunto de evaluaciones biológicas, metabólicas e histológicas desarrolladas en este capítulo permite concluir que la integración sinérgica de los andamios nanofibrosos en la plataforma heterogénea de PDMS:vidrio consolida un modelo funcional y reproducible de OoC para el modelado cardiovascular. Los ensayos comparativos bajo regímenes fluidódicos demostraron que, si bien el flujo laminar continuo induce un estímulo de mecanotransducción benéfico, el método de siembra en microvolúmenes opera como un cuello de botella difusivo transitorio al promover la coalescencia estocástica de los cardiomioblastos en conglomerados densos propensos a la hipoxia local y a la quiescencia metabólica temprana.

Esta limitación difusiva y la susceptibilidad del tejido a la confluencia crítica fueron resueltas de manera diferencial por las matrices poliméricas tridimensionales, cuya presencia actúa como un amortiguador de la saturación espacial, expandiendo el nicho celular hacia la tercera dimensión y retrayendo el fenotipo de senescencia celular prematura sugerido en los sistemas estáticos desprovistos de soporte.

No obstante, la viabilidad del tejido a largo plazo demostraron estar gobernados por la termodinámica interfacial y la estabilidad estructural del biomaterial; mientras que el andamio control de colágeno-quitosano experimentó una degradación hidrolítica prematura bajo perfusión que destruyó los complejos de adhesión focal y provocó la pérdida masiva de biomasa, la matriz electroactiva funcionalizada con Ppy impuso una barrera energética inicial que prolongó el periodo de adaptación celular, pero confirió una robustez estructural superior que protegió la red nanofibrilar frente al ataque hidrolítico.



Una vez superada esta fase de latencia, el compósito electroactivo con Ppy demostró ser un sustrato biológicamente óptimo bajo flujo continuo, promoviendo una proliferación celular exponencial tardía de hasta el 300% al décimo día y actuando como inductor de guía de contacto axial. Las reconstrucciones tridimensionales confocales confirmaron que los cardiomioblastos se encuentran elongados e inclinados verticalmente, con sus filamentos de actina a lo largo del relieve polimérico conductor, un ordenamiento anisotrópico que mimetiza la arquitectura nativa del miocardio y ofrece un punto de partida para este tipo de sistema microfluídico como una plataforma biomimética para futuras aplicaciones de electroestimulación activa.



Capítulo 6. PERSPECTIVAS

Los hallazgos de esta investigación demuestran el éxito inicial de una plataforma biomimética integrada, que constituye un sólido punto de partida para la ingeniería de tejido cardiovascular tridimensional. No obstante, la transición hacia un modelo completamente funcional abre nuevas interrogantes científicas a nivel molecular y tecnológico, particularmente en lo que respecta a las cinéticas de adaptación celular tras el umbral crítico de 120 horas de cultivo. A partir de estas consideraciones, se proponen las siguientes líneas de investigación y optimización tecnológica:

- Caracterización mecanobiológica de la adhesión celular temprana: Se requiere analizar, cualitativa y cuantitativamente, la expresión espacial de las proteínas que integran los complejos de adhesión focal (como vinculina, talina y paxilina), con el objetivo de dilucidar los mecanismos termodinámicos y moleculares que inducen el fenotipo transitorio esferoidal antes de la elongación definitiva de la citoesquelética sobre las nanofibras.
- Evaluación del perfil de maduración fenotípica y funcional: Es imperativo evaluar la expresión de marcadores específicos del linaje cardíaco maduro, tales como la troponina T cardíaca y la conexina 43 para el acoplamiento electromecánico, tras periodos prolongados de cultivo en el andamio electroactivo, convalidando la funcionalidad biológica del tejido diferenciado.
- Optimización reológica del circuito microfluídico: Se plantea el rediseño y la simulación por dinámica de fluidos computacional de la arquitectura del chip para optimizar la distribución de los microcanales. Esto permitirá homogeneizar los perfiles de velocidad del fluido, minimizar las caídas de presión que favorecen la desgasificación espontánea y suprimir radicalmente la nucleación de microburbujas que induce el desprendimiento celular por esfuerzos de cizallamiento transitorios.
- Manufactura avanzada e integración *in situ* de la matriz anisotrópica: Se propone acoplar un sistema de recolección orientado para inducir un alineamiento toroidal de las nanofibras que replique la anisotropía estructural del miocardio nativo. Asimismo, se plantea el desarrollo de una estrategia de electrohilado directo sobre sustratos de PDMS o vidrios activados, eliminando las etapas intermedias de manipulación mecánica del andamio y previniendo microfracturas interfaciales durante el ensamble del dispositivo.

Una vez resueltos y estandarizados estos hitos metodológicos clave, la plataforma estará en condiciones operativas óptimas para la integración de regímenes de electroestimulación activa *in chip*. Esto permitirá modular el comportamiento electrofisiológico de los cardiomioblastos y potenciará la explotación de este sistema avanzado en aplicaciones de escrutinio farmacológico de alta precisión o de medicina regenerativa personalizada.



Capítulo 7. ANEXOS

7.1 ANEXO 1: DECONVOLUCIONES DE ENTRECRUZAMIENTO

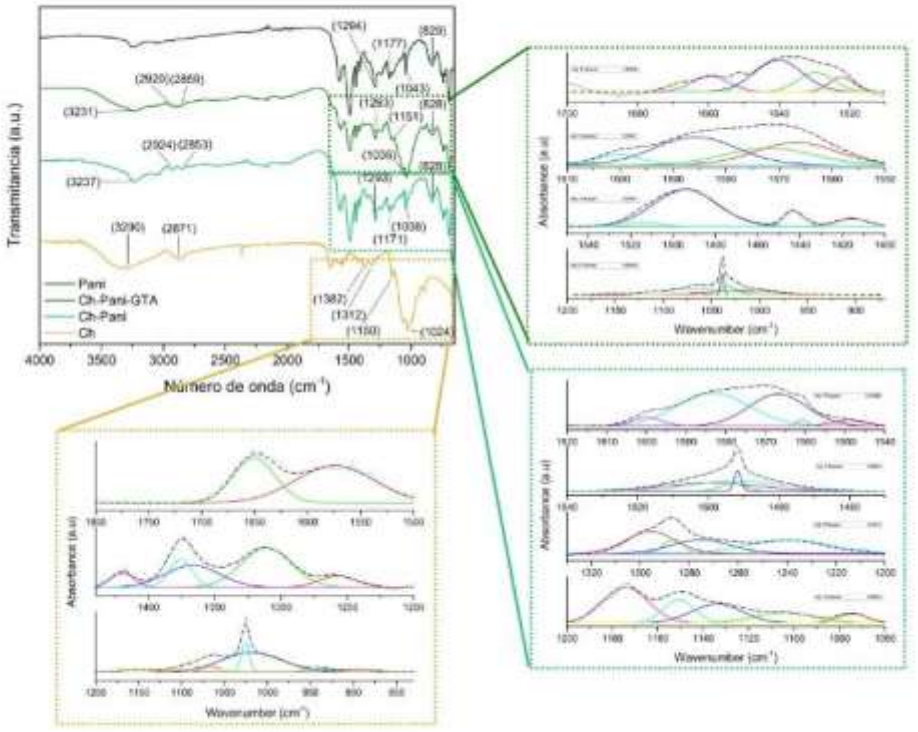


Figura 7.1. Semientrecruzamiento de Ch-Pani con GTA, previo al electrohilado.

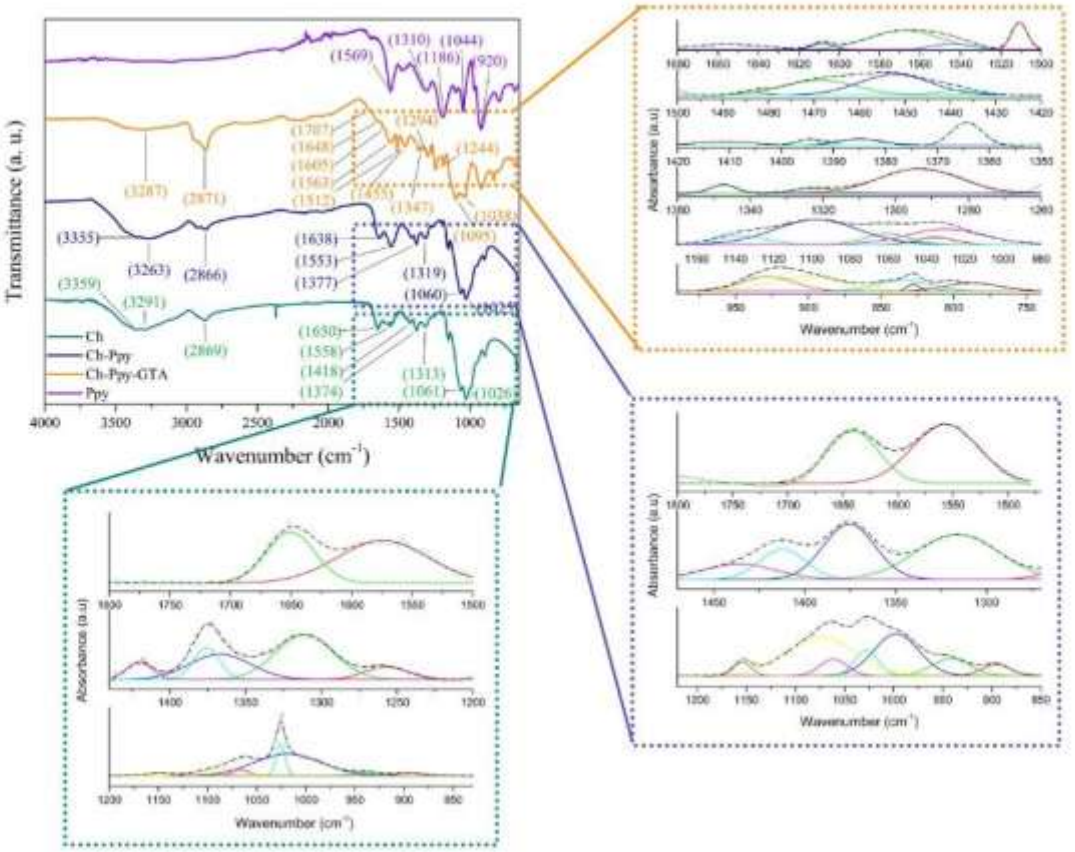


Figura 7.2. Semientrecruzamiento de Ch-Ppy con GTA, previo al electrohilado.



7.2 ANEXO 2: RECONSTRUCCIONES TRIDIMENSIONALES Y ORTOGONALES USANDO 30K CÉLULAS

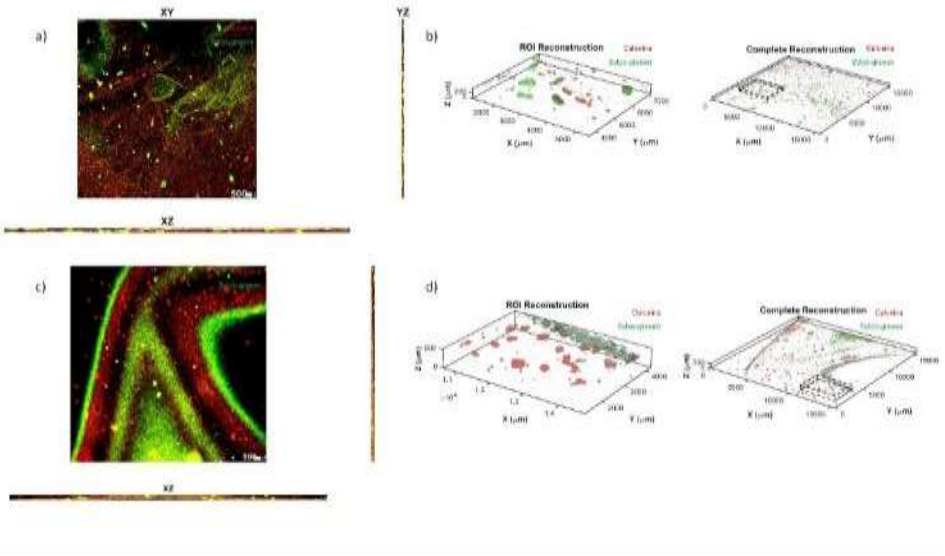


Figura 7.3. Reconstrucciones 3D y ortogonales a las 2 h con membranas de Coll-Ch/Pani (a y b), y Coll-Ch/Ppy (c y d).

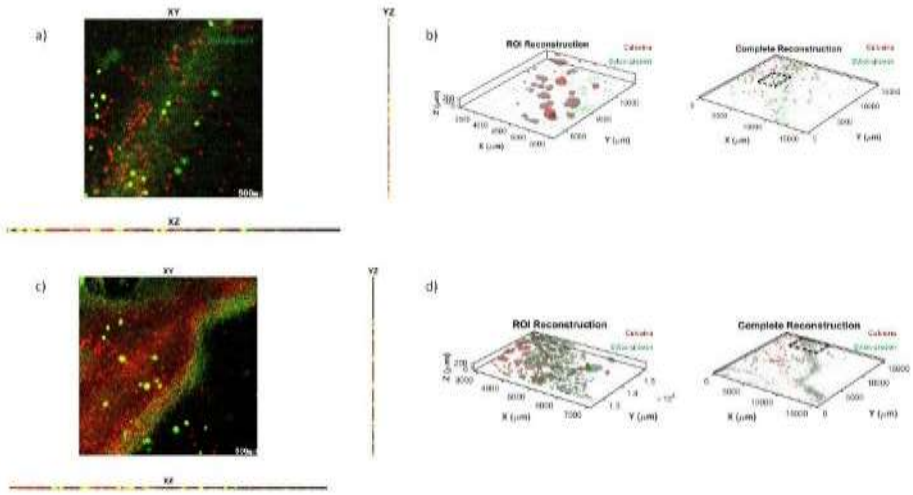


Figura 7.4. Reconstrucciones 3D y ortogonales al día 1 con membranas de Coll-Ch/Pani (a y b), y Coll-Ch/Ppy (c y d).



7.3 ANEXO 3: RECONSTRUCCIONES TRIDIMENSIONALES Y ORTOGONALES USANDO DISPOSITIVOS OoC

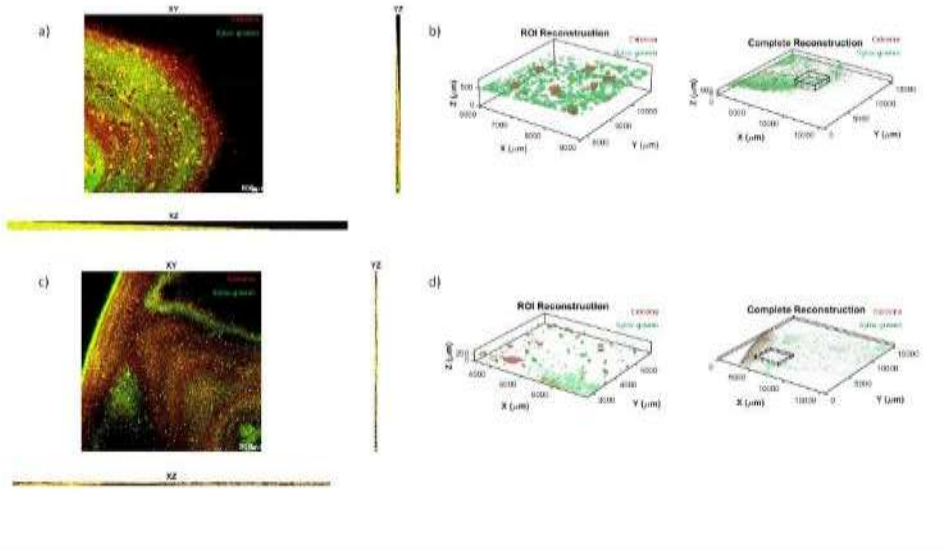


Figura 7.5. Reconstrucciones 3D y ortogonales al día 1 con membranas de Coll-Ch/Pani (a y b), y Coll-Ch/Ppy (c y d), en dispositivos con flujo.

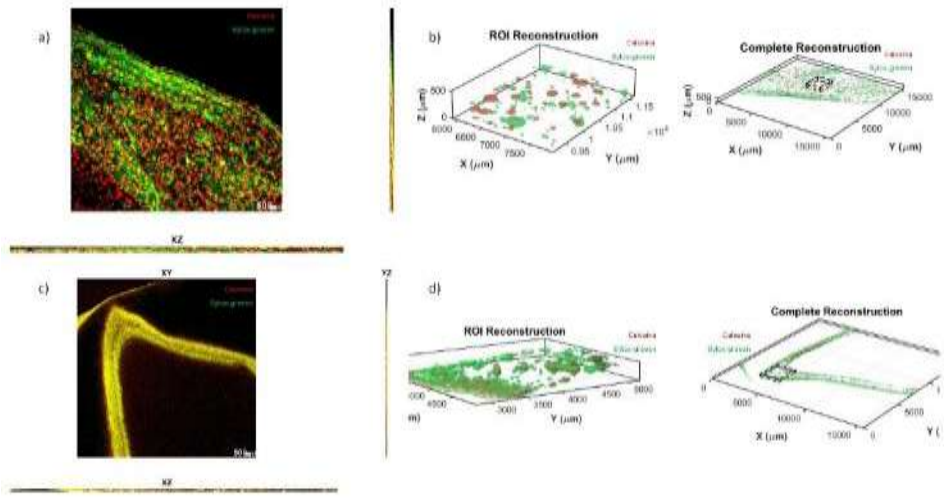


Figura 7.6. Reconstrucciones 3D y ortogonales al día 5 con membranas de Coll-Ch/Pani (a y b), y Coll-Ch/Ppy (c y d), en dispositivos con flujo.



7.4 ANEXO 3: RECONSTRUCCIONES TRIDIMENSIONALES Y ORTOGONALES USANDO DISPOSITIVOS ESTÁTICOS

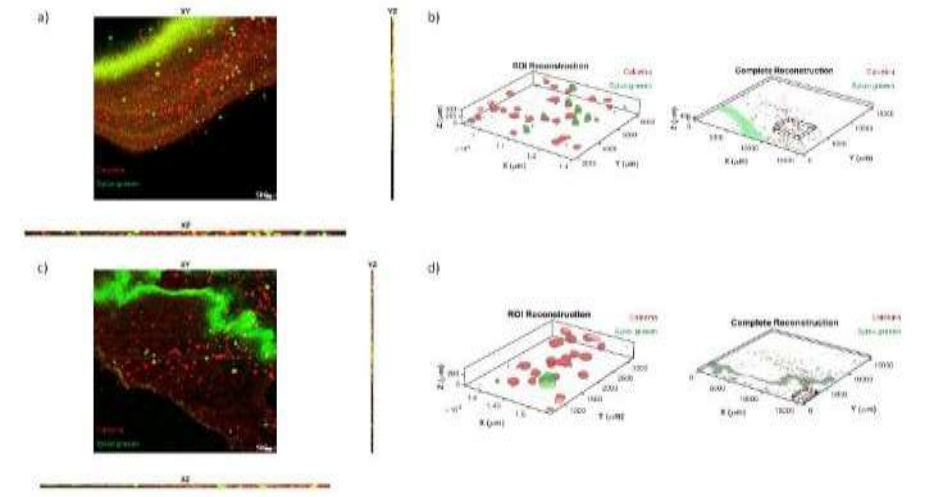


Figura 7.7. Reconstrucciones 3D y ortogonales al día 1 de ensayos de vida/muerte con membranas de Coll-Ch/Pani (a y b), y Coll-Ch/Ppy (c y d), en dispositivos con flujo.

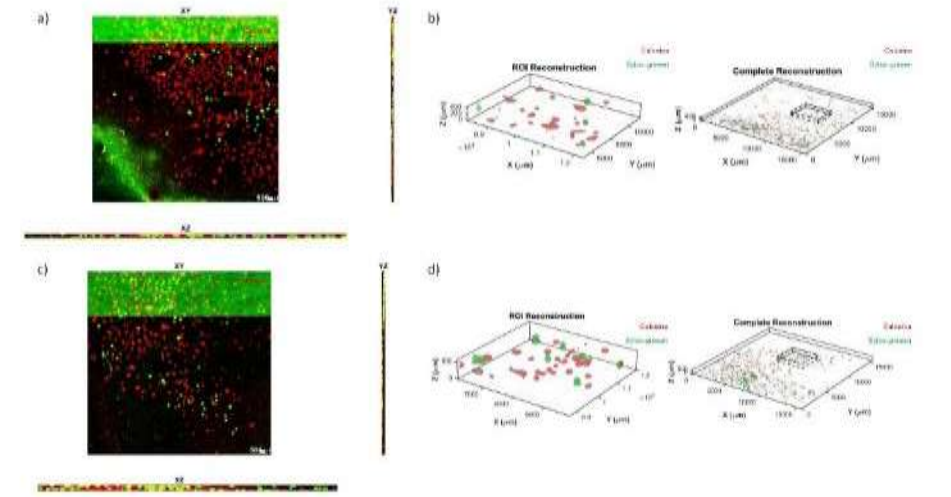


Figura 7.8. Reconstrucciones 3D y ortogonales al día 5 de ensayos de vida/muerte con membranas de Coll-Ch/Pani (a y b), y Coll-Ch/Ppy (c y d), en dispositivos con flujo.



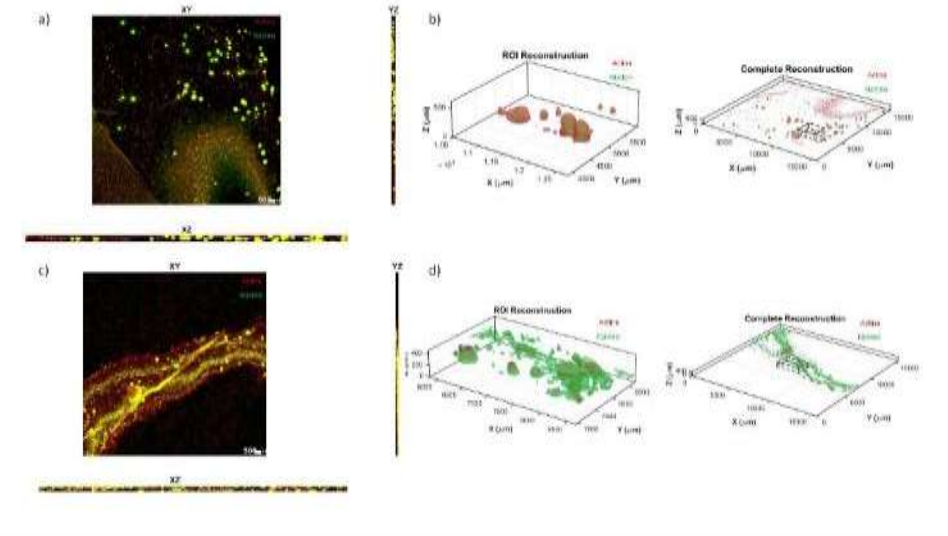


Figura 7.9. Reconstrucciones 3D y ortogonales al día 1 de ensayos de tinción de actina con membranas de Coll-Ch/Pani (a y b), y Coll-Ch/Ppy (c y d), en dispositivos con flujo.

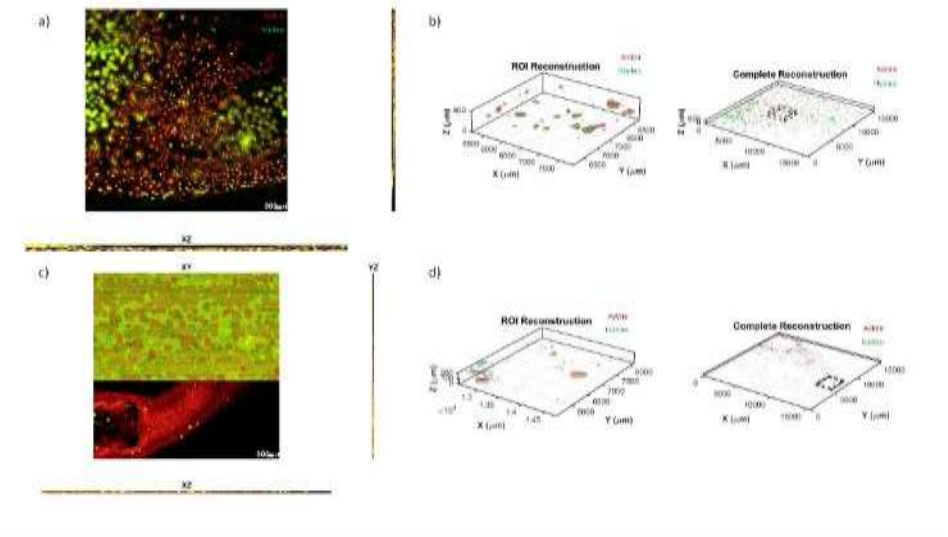


Figura 7.10. Reconstrucciones 3D y ortogonales al día 5 de ensayos de tinción de actina con membranas de Coll-Ch/Pani (a y b), y Coll-Ch/Ppy (c y d), en dispositivos con flujo.



Capítulo 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] "Heart | SEER Training." Accessed: May 23, 2023. [Online]. Available: https://training.seer.cancer.gov/anatomy/cardiovascular/heart/

[2] P. Libby and E. Braunwald, "Braunwald's heart disease a textbook of cardiovascular medicine.".

[3] "Cómo funciona el corazón - Cómo late el corazón | NHLBI, NIH." Accessed: Mar. 10, 2023. [Online]. Available: https://www.nhlbi.nih.gov/es/salud/corazon/latidos-cardiacos

[4] E. J. Benjamin *et al.*, "Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association," *Circulation*, vol. 139, no. 10, pp. e56–e528, Mar. 2019, doi: 10.1161/CIR.0000000000000659.

[5] "Heart Failure - What Is Heart Failure? | NHLBI, NIH." Accessed: Apr. 24, 2023. [Online]. Available: https://www.nhlbi.nih.gov/health/heart-failure

[6] G. D. Flora and M. K. Nayak, "A Brief Review of Cardiovascular Diseases, Associated Risk Factors and Current Treatment Regimes," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 25, no. 38, pp. 4063–4084, Sep. 2019, doi: 10.2174/1381612825666190925163827.

[7] C. W. Tsao *et al.*, "Heart Disease and Stroke Statistics-2023 Update: A Report From the American Heart Association," *Circulation*, vol. 147, no. 8, pp. E93–E621, Feb. 2023, doi: 10.1161/CIR.0000000000001123.

[8] A. H. Nguyen *et al.*, "Cardiac tissue engineering: state-of-the-art methods and outlook," *Journal of Biological Engineering 2019 13:1*, vol. 13, no. 1, pp. 1–21, Jun. 2019, doi: 10.1186/S13036-019-0185-0.

[9] S. Vasu, J. Zhou, J. Chen, P. V. Johnston, and D. H. Kim, "Biomaterials-based Approaches for Cardiac Regeneration," *Korean Circ. J.*, vol. 51, no. 12, p. 943, Sep. 2021, doi: 10.4070/KCJ.2021.0291.

[10] M. Karam, D. Fahs, B. Maatouk, B. Safi, A. A. Jaffa, and R. Mhanna, "Polymeric nanoparticles in the diagnosis and treatment of myocardial infarction: Challenges and future prospects," *Mater. Today Bio*, vol. 14, p. 100249, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.MTBIO.2022.100249.

[11] R. Yu, H. Zhang, and B. Guo, "Conductive Biomaterials as Bioactive Wound Dressing for Wound Healing and Skin Tissue Engineering," *Nano-Micro Letters 2021 14:1*, vol. 14, no. 1, pp. 1–46, Dec. 2021, doi: 10.1007/S40820-021-00751-Y.

[12] M. Rahmati *et al.*, "Electrospinning for tissue engineering applications," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 117, p. 100721, 2021, doi: 10.1016/j.pmatsci.2020.100721.



[13] C. Dong and Y. Lv, "Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives," *Polymers (Basel).*, vol. 8, no. 2, 2016, doi: 10.3390/POLYM8020042.

[14] P. Benzoni *et al.*, "Biomanufacturing of a Chitosan/Collagen Scaffold to Drive Adhesion and Alignment of Human Cardiomyocyte Derived from Stem Cells," *Procedia CIRP*, vol. 49, pp. 113–120, Jan. 2016, doi: 10.1016/J.PROCIR.2015.09.004.

[15] M. Budai-szűcs *et al.*, "Electrospun Scaffolds in Periodontal Wound Healing," *Polymers (Basel).*, vol. 13, no. 2, pp. 1–16, Jan. 2021, doi: 10.3390/POLYM13020307.

[16] V. Di Felice *et al.*, "Silk fibroin scaffolds enhance cell commitment of adult rat cardiac progenitor cells," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 9, no. 11, pp. E51–E64, Nov. 2015, doi: 10.1002/TERM.1739.

[17] D. G. Tamay, T. D. Usal, A. S. Alagoz, D. Yucel, N. Hasirci, and V. Hasirci, "3D and 4D Printing of Polymers for Tissue Engineering Applications," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, no. JUL, 2019, doi: 10.3389/FBIOE.2019.00164.

[18] S. Trombino, F. Curcio, R. Cassano, M. Curcio, G. Cirillo, and F. Iemma, "Polymeric Biomaterials for the Treatment of Cardiac Post-Infarction Injuries," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 7, Jul. 2021, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13071038.

[19] P. F. Hu, C. Y. Ma, F. F. Sun, W. P. Chen, and L. D. Wu, "Follistatin-like protein 1 (FSTL1) promotes chondrocyte expression of matrix metalloproteinase and inflammatory factors via the NF-κB pathway," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 23, no. 3, p. 2230, Mar. 2019, doi: 10.1111/JCMM.14155.

[20] K. Wei *et al.*, "Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart," *Nature 2015 525:7570*, vol. 525, no. 7570, pp. 479–485, Sep. 2015, doi: 10.1038/nature15372.

[21] M. A. Marsudi *et al.*, "Conductive Polymeric-Based Electroactive Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Current Progress and Challenges from Biomaterials and Manufacturing Perspectives," *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 11543*, vol. 22, no. 21, p. 11543, Oct. 2021, doi: 10.3390/IJMS222111543.

[22] M. Lee, M. C. Kim, and J. Y. Lee, "Nanomaterial-Based Electrically Conductive Hydrogels for Cardiac Tissue Repair," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 17, p. 6181, 2022, doi: 10.2147/IJN.S386763.

[23] M. Acosta, M. D. Santiago, and J. A. Irvin, "Electrospun Conducting Polymers: Approaches and Applications," *Materials 2022, Vol. 15, Page 8820*, vol. 15, no. 24, p. 8820, Dec. 2022, doi: 10.3390/MA15248820.

[24] L. P. C. Júnior, D. B. R. dos S. Silva, M. F. de Aguiar, C. P. de Melo, and K. G. B. Alves, "Preparation and characterization of polypyrrole/organophilic montmorillonite nanofibers obtained by electrospinning," *J. Mol. Liq.*, vol. 275, pp. 452–462, Feb. 2019, doi: 10.1016/J.MOLLIQ.2018.11.084.

[25] Y. Cong, S. Liu, and H. Chen, "Fabrication of conductive polypyrrole nanofibers by electrospinning," *J. Nanomater.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/148347.



[26] B. W. Walker, R. Portillo Lara, E. Mogadam, C. Hsiang Yu, W. Kimball, and N. Annabi, "Rational design of microfabricated electroconductive hydrogels for biomedical applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 92, pp. 135–157, May 2019, doi: 10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2019.02.007.

[27] J. A. Roacho-Pérez *et al.*, "Artificial Scaffolds in Cardiac Tissue Engineering," *Life (Basel)*, vol. 12, no. 8, Aug. 2022, doi: 10.3390/LIFE12081117.

[28] M. L. Tomov *et al.*, "Engineering Functional Cardiac Tissues for Regenerative Medicine Applications," *Curr. Cardiol. Rep.*, vol. 21, no. 9, Sep. 2019, doi: 10.1007/S11886-019-1178-9.

[29] Y. Li *et al.*, "Conductive biomaterials for cardiac repair: A review," *Acta Biomater.*, vol. 139, pp. 157–178, Feb. 2022, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2021.04.018.

[30] I. S. Chronakis, S. Grapenson, and A. Jakob, "Conductive polypyrrole nanofibers via electrospinning: Electrical and morphological properties," *Polymer (Guildf).*, vol. 47, no. 5, pp. 1597–1603, Feb. 2006, doi: 10.1016/J.POLYMER.2006.01.032.

[31] F. Imani, R. Karimi-Soflou, I. Shabani, and A. Karkhaneh, "PLA electrospun nanofibers modified with polypyrrole-grafted gelatin as bioactive electroconductive scaffold," *Polymer (Guildf).*, vol. 218, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.polymer.2021.123487.

[32] E. Sapountzi, J. F. Chateaux, and F. Lagarde, "Combining Electrospinning and Vapor-Phase Polymerization for the Production of Polyacrylonitrile/ Polypyrrole Core-Shell Nanofibers and Glucose Biosensor Application," *Front. Chem.*, vol. 8, p. 678, Aug. 2020, doi: 10.3389/FCHEM.2020.00678.

[33] A. Wibowo *et al.*, "3D Printing of Polycaprolactone-Polyaniline Electroactive Scaffolds for Bone Tissue Engineering," *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 3, Feb. 2020, doi: 10.3390/MA13030512.

[34] H. Esmaeili *et al.*, "Electroconductive biomaterials for cardiac tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 139, pp. 118–140, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.actbio.2021.08.031.

[35] A. Borriello, V. Guarino, L. Schiavo, M. A. Alvarez-Perez, and L. Ambrosio, "Optimizing PANi doped electroactive substrates as patches for the regeneration of cardiac muscle," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 22, no. 4, pp. 1053–1062, Apr. 2011, doi: 10.1007/S10856-011-4259-X/FIGURES/7.

[36] P. T. Bertuoli *et al.*, "Electrospun Conducting and Biocompatible Uniaxial and Core-Shell Fibers Having Poly(lactic acid), Poly(ethylene glycol), and Polyaniline for Cardiac Tissue Engineering," *ACS Omega*, vol. 4, no. 2, pp. 3660–3672, Feb. 2019, doi: 10.1021/acsomega.8b03411.

[37] Y. H. Kim, Y. H. Son, Y. Choi, M. S. Kim, S. J. Park, and K. Y. Lee, "Advanced in vitro cardiac models for drug evaluation: integration of organoids, engineered tissues, and microphysiological systems," *Microsystems & Nanoengineering 2026 12:1*, vol. 12, no. 1, pp. 162-, May 2026, doi: 10.1038/s41378-026-01249-6.



[38] J. H. Kim, J. Y. Park, S. Jin, S. Yoon, J. Y. Kwak, and Y. H. Jeong, "A Microfluidic Chip Embracing a Nanofiber Scaffold for 3D Cell Culture and Real-Time Monitoring," *Nanomaterials 2019, Vol. 9, Page 588*, vol. 9, no. 4, p. 588, Apr. 2019, doi: 10.3390/NANO9040588.

[39] W. Wang *et al.*, "Microfluidic platforms for monitoring cardiomyocyte electromechanical activity," *Microsystems & Nanoengineering 2025 11:1*, vol. 11, no. 1, pp. 4-, Jan. 2025, doi: 10.1038/s41378-024-00751-z.

[40] K. Corral-Nájera, G. Chauhan, S. O. Serna-Saldívar, S. O. Martínez-Chapa, and M. M. Aeinehvand, "Polymeric and biological membranes for organ-on-a-chip devices," *Microsystems & Nanoengineering 2023 9:1*, vol. 9, no. 1, pp. 107-, Aug. 2023, doi: 10.1038/s41378-023-00579-z.

[41] J. Lin, L. Cui, X. Shi, and S. Wu, "Emerging Trends in Microfluidic Biomaterials: From Functional Design to Applications," *J. Funct. Biomater.*, vol. 16, no. 5, May 2025, doi: 10.3390/JFB16050166.

[42] "Cardiovascular diseases." Accessed: Feb. 28, 2023. [Online]. Available: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1

[43] "490. Cada año, 220 mil personas fallecen debido a enfermedades del corazón | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx." Accessed: Mar. 01, 2023. [Online]. Available: https://www.gob.mx/salud/prensa/490-cada-ano-220-mil-personas-fallecen-debido-a-enfermedades-del-corazon

[44] M. Vaduganathan, G. A. Mensah, J. V. Turco, V. Fuster, and G. A. Roth, "The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk: A Compass for Future Health," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 80, no. 25, pp. 2361–2371, Dec. 2022, doi: 10.1016/J.JACC.2022.11.005.

[45] *LA ATENCIÓN DEL INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO EN MéXICO*.

[46] "¿Cuánto cuesta la atención de la cardiopatía chagásica crónica?: Costos directos en un hospital de cardiología." Accessed: Sep. 03, 2023. [Online]. Available: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-99402002000200006

[47] "Banco de indicadores." Accessed: Sep. 09, 2023. [Online]. Available: https://www.inegi.org.mx/app/indicadores/?ind=6200032080&tm=7#D6200032080#D6200032080

[48] S. S. Virani *et al.*, "Heart disease and stroke statistics—2020 update a report from the American Heart Association," *Circulation*, vol. 141, no. 9, pp. E139–E596, 2020, doi: 10.1161/CIR.0000000000000757.

[49] B. Bozkurt *et al.*, "2021 ACC/AHA Key Data Elements and Definitions for Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Data Standards (Writing Committee to Develop Clinical Data Standards for Heart Failure)," *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes*, vol. 14, no. 4, p. E000102, Apr. 2021, doi: 10.1161/HCQ.0000000000000102.



[50] "Heart Failure | What We Do | World Heart Federation." Accessed: Sep. 09, 2023. [Online]. Available: https://world-heart-federation.org/what-we-do/heart-failure/

[51] D. D. Nguyen *et al.*, "Health Status and Clinical Outcomes in Older Adults With Chronic Coronary Disease: The ISCHEMIA Trial," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 81, no. 17, pp. 1697–1709, May 2023, doi: 10.1016/J.JACC.2023.02.048.

[52] "Implantable Medical Devices | American Heart Association." Accessed: Sep. 17, 2023. [Online]. Available: https://www.heart.org/en/health-topics/heart-attack/treatment-of-a-heart-attack/implantable-medical-devices

[53] I. Bytyçi and G. Bajraktari, "Mortality in heart failure patients," *Anatol. J. Cardiol.*, vol. 15, no. 1, pp. 63–68, Jan. 2015, doi: 10.5152/AKD.2014.5731.

[54] C. E. Murry, H. Reinecke, and L. M. Pabon, "Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 47, no. 9, pp. 1777–1785, May 2006, doi: 10.1016/J.JACC.2006.02.002.

[55] J. Sörensen, H. J. Harms, J. M. Aalen, T. Baron, O. A. Smiseth, and F. A. Flachskampf, "Myocardial Efficiency: A Fundamental Physiological Concept on the Verge of Clinical Impact," *JACC Cardiovasc. Imaging*, vol. 13, no. 7, pp. 1564–1576, Jul. 2020, doi: 10.1016/J.JCMG.2019.08.030.

[56] T. Eschenhagen *et al.*, "Cardiomyocyte Regeneration: A Consensus Statement," *Circulation*, vol. 136, no. 7, p. 680, Aug. 2017, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029343.

[57] R. Madonna *et al.*, "ESC Working Group on Cellular Biology of the Heart: position paper for Cardiovascular Research: tissue engineering strategies combined with cell therapies for cardiac repair in ischaemic heart disease and heart failure," *Cardiovasc. Res.*, vol. 115, no. 3, pp. 488–500, Mar. 2019, doi: 10.1093/CVR/CVZ010.

[58] P. K. Nguyen, E. Neofytou, J. W. Rhee, and J. C. Wu, "Potential Strategies to Address the Major Clinical Hurdles Facing Stem Cell Regenerative Therapy for Cardiovascular Disease: A Review," *JAMA Cardiol.*, vol. 1, no. 8, p. 953, Nov. 2016, doi: 10.1001/JAMACARDIO.2016.2750.

[59] S. Mani, N. Gurusamy, T. Ulaganathan, A. J. Paluck, S. Ramalingam, and J. Rajasingh, "Therapeutic potentials of stem cell–derived exosomes in cardiovascular diseases," *https://doi.org/10.1177/15353702231151960*, vol. 248, no. 5, pp. 434–444, Feb. 2023, doi: 10.1177/15353702231151960.

[60] A. Gatsiou and K. Stellos, "RNA modifications in cardiovascular health and disease," *Nature Reviews Cardiology 2022 20:5*, vol. 20, no. 5, pp. 325–346, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41569-022-00804-8.

[61] M. Banovic, G. Poglajen, B. Vrtovec, and A. Ristic, "Contemporary Challenges of Regenerative Therapy in Patients with Ischemic and Non-Ischemic Heart Failure," *Journal of Cardiovascular Development and Disease 2022, Vol. 9, Page 429*, vol. 9, no. 12, p. 429, Dec. 2022, doi: 10.3390/JCDD9120429.



[62] A. Akbarzadeh, S. Sobhani, A. Soltani Khaboushan, and A. M. Kajbafzadeh, "Whole-Heart Tissue Engineering and Cardiac Patches: Challenges and Promises," *Bioengineering 2023, Vol. 10, Page 106*, vol. 10, no. 1, p. 106, Jan. 2023, doi: 10.3390/BIOENGINEERING10010106.

[63] L. Stapleton, Y. Zhu, Y. ping J. Woo, and E. Appel, "Engineered biomaterials for heart disease," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 66, pp. 246–254, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.COPBIO.2020.08.008.

[64] D. Sharma, M. Ferguson, T. J. Kamp, and F. Zhao, "Constructing Biomimetic Cardiac Tissues: A Review of Scaffold Materials for Engineering Cardiac Patches," *Emergent Mater.*, vol. 2, no. 2, pp. 181–191, Jun. 2019, doi: 10.1007/S42247-019-00046-4.

[65] M. Correia, F. Santos, R. da Silva Ferreira, R. Ferreira, B. Bernardes de Jesus, and S. Nóbrega-Pereira, "Metabolic Determinants in Cardiomyocyte Function and Heart Regenerative Strategies," *Metabolites*, vol. 12, no. 6, Jun. 2022, doi: 10.3390/METABO12060500.

[66] G. G. Hesketh, J. E. Van Eyk, and G. F. Tomaselli, "Mechanisms of Gap Junction Traffic in Health and Disease," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 54, no. 4, p. 263, Oct. 2009, doi: 10.1097/FJC.0B013E3181BA0811.

[67] S. Burkhard, V. van Eif, L. Garric, V. M. Christoffels, and J. Bakkers, "On the Evolution of the Cardiac Pacemaker," *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, vol. 4, no. 2, Jun. 2017, doi: 10.3390/JCDD4020004.

[68] X. Wei, S. Yohannan, and J. R. Richards, "Physiology, Cardiac Repolarization Dispersion and Reserve," *StatPearls*, Apr. 2022, Accessed: Apr. 15, 2023. [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537194/

[69] A. G. Kléber and Y. Rudy, "Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias," *Physiol. Rev.*, vol. 84, no. 2, pp. 431–488, Apr. 2004, doi: 10.1152/PHYSREV.00025.2003.

[70] Q. A. Majid *et al.*, "Natural Biomaterials for Cardiac Tissue Engineering: A Highly Biocompatible Solution," *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 7, p. 192, Oct. 2020, doi: 10.3389/FCVM.2020.554597/BIBTEX.

[71] R. Aziz, M. Falanga, J. Purenovic, S. Mancini, P. Lamberti, and M. Guida, "A Review on the Applications of Natural Biodegradable Nano Polymers in Cardiac Tissue Engineering," *Nanomaterials 2023, Vol. 13, Page 1374*, vol. 13, no. 8, p. 1374, Apr. 2023, doi: 10.3390/NANO13081374.

[72] S. Ricard-Blum, "The Collagen Family," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–19, Jan. 2011, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A004978.

[73] K. Gelse, E. Pöschl, and T. Aigner, "Collagens—structure, function, and biosynthesis," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, no. 12, pp. 1531–1546, 2003, doi: 10.1016/j.addr.2003.08.002.

[74] S. Radhakrishnan, S. Nagarajan, M. Bechelany, and S. N. Kalkura, "Collagen based biomaterials for tissue engineering applications: A review," *Lecture Notes in Earth System Sciences*, pp. 3–22, 2020, doi: 10.1007/978-3-030-21614-6_1.



[75] E. Rezvani Ghomi, N. Nourbakhsh, M. Akbari Kenari, M. Zare, and S. Ramakrishna, "Collagen-based biomaterials for biomedical applications," *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 109, no. 12, pp. 1986–1999, Dec. 2021, doi: 10.1002/JBM.B.34881.

[76] K. Trescher, N. Scharnagl, K. Kratz, T. Roch, A. Lendlein, and F. Jung, "Adherence and viability of primary human keratinocytes and primary human dermal fibroblasts on acrylonitrile-based copolymers with different concentrations of positively charged functional groups," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 52, no. 2–4, pp. 391–401, 2012, doi: 10.3233/CH-2012-1613.

[77] A. J. Petty, R. L. Keate, B. Jiang, G. A. Ameer, and J. Rivnay, "Conducting Polymers for Tissue Regeneration in Vivo †," *Chemistry of Materials*, vol. 32, no. 10, pp. 4095–4115, May 2020, doi: 10.1021/ACS.CHEMMATER.0C00767/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CM0C00767_0009.GIF.

[78] E. N. Zare *et al.*, "Electroconductive multi-functional polypyrrole composites for biomedical applications," *Appl. Mater. Today*, vol. 24, p. 101117, Sep. 2021, doi: 10.1016/J.APMT.2021.101117.

[79] L. Hao, C. Dong, and D. Yu, "Polypyrrole Derivatives: Preparation, Properties and Application," *Polymers (Basel).*, vol. 16, no. 16, p. 2233, Aug. 2024, doi: 10.3390/POLYM16162233.

[80] A. Mousavi, S. Vahdat, N. Baheiraei, M. Razavi, M. H. Norahan, and H. Baharvand, "Multifunctional Conductive Biomaterials as Promising Platforms for Cardiac Tissue Engineering," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 7, no. 1, pp. 55–82, Jan. 2021, doi: 10.1021/ACSBIOMATERIALS.0C01422.

[81] K. Roshanbinfar, L. Vogt, F. Ruther, J. A. Roether, A. R. Boccaccini, and F. B. Engel, "Nanofibrous Composite with Tailorable Electrical and Mechanical Properties for Cardiac Tissue Engineering," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 30, no. 7, p. 1908612, Feb. 2020, doi: 10.1002/ADFM.201908612.

[82] S. H. Ching, N. Bansal, and B. Bhandari, "Alginate gel particles–A review of production techniques and physical properties," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 57, no. 6, pp. 1133–1152, Apr. 2017, doi: 10.1080/10408398.2014.965773.

[83] N. A. N. Asri, M. M. Mahat, A. Zakaria, M. F. Safian, and U. M. Abd Hamid, "Fabrication Methods of Electroactive Scaffold-Based Conducting Polymers for Tissue Engineering Application: A Review," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 10, Jul. 2022, doi: 10.3389/FBIOE.2022.876696.

[84] I. S. Chronakis, "Nanostructured Conductive Polymers by Electrospinning," *Nanostructured Conductive Polymers*, pp. 161–207, Jul. 2010, doi: 10.1002/9780470661338.CH4.

[85] H. A. Owida *et al.*, "Recent Applications of Electrospun Nanofibrous Scaffold in Tissue Engineering," *Appl. Bionics Biomech.*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/1953861.

[86] M. Sun, Q. Lu, Z. L. Wang, and B. Huang, "Understanding contact electrification at liquid–solid interfaces from surface electronic structure," *Nature Communications 2021 12:1*, vol. 12, no. 1, pp. 1–11, Mar. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-22005-6.



[87] Y. E. Miao and T. Liu, "Electrospun Nanofiber Electrodes: A Promising Platform for Supercapacitor Applications," in *Electrospinning: Nanofabrication and Applications*, William Andrew Publishing, 2019, pp. 641–669. doi: 10.1016/B978-0-323-51270-1.00021-2.

[88] Y. Salazar Muñoz, "Introducción a la medición de impedancia eléctrica de tejidos biológicos," in *Caracterización de tejidos cardíacos mediante métodos mínimamente invasivos...* , Universitat Politècnica de Catalunya, 2004.

[89] S. Deir, Y. Mozhdehbakhsh Mofrad, S. Mashayekhan, A. Shamloo, and A. Mansoori-Kermani, "Step-by-step fabrication of heart-on-chip systems as models for cardiac disease modeling and drug screening," Jan. 01, 2024, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.talanta.2023.124901.

[90] Y. Zhao *et al.*, "Engineering microenvironment for human cardiac tissue assembly in heart-on-a-chip platform," *Matrix Biology*, vol. 85–86, pp. 189–204, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.matbio.2019.04.001.

[91] U. M. N. Cao, Y. Zhang, J. Chen, D. Sayson, S. Pillai, and S. D. Tran, "Microfluidic Organ-on-A-chip: A Guide to Biomaterial Choice and Fabrication," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 4, Feb. 2023, doi: 10.3390/IJMS24043232.

[92] J. Criscione *et al.*, "Heart-on-a-Chip Platforms and Biosensor Integration for Disease Modeling and Phenotypic Drug Screening," 2022.

[93] L. Geng *et al.*, "Rapid Electrical Stimulation Increased Cardiac Apoptosis Through Disturbance of Calcium Homeostasis and Mitochondrial Dysfunction in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 47, no. 3, pp. 1167–1180, Jul. 2018, doi: 10.1159/000490213.

[94] M. R. Love, S. Palee, S. C. Chattipakorn, and N. Chattipakorn, "Effects of electrical stimulation on cell proliferation and apoptosis," *J. Cell. Physiol.*, vol. 233, no. 3, pp. 1860–1876, Mar. 2018, doi: 10.1002/JCP.25975;JOURNAL:JOURNAL:15530809;WGROUP:STRING:PUBLICATION.

[95] Y. C. Chan *et al.*, "Electrical Stimulation Promotes Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Embryonic Stem Cells," *Journal of Cardiovascular Translational Research 2013 6:6*, vol. 6, no. 6, pp. 989–999, Oct. 2013, doi: 10.1007/S12265-013-9510-Z.

[96] M. Erencia, F. Cano, J. A. Tornero, J. Macanás, and F. Carrillo, "Preparation of electrospun nanofibers from solutions of different gelatin types using a benign solvent mixture composed of water/PBS/ethanol," *Polym. Adv. Technol.*, vol. 27, no. 3, pp. 382–392, Mar. 2016, doi: 10.1002/pat.3678.

[97] T. Liu, W. K. Teng, B. P. Chan, and S. Y. Chew, "Photochemical crosslinked electrospun collagen nanofibers: synthesis, characterization and neural stem cell interactions," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 95, no. 1, pp. 276–282, 2010, doi: 10.1002/jbm.a.32831.

[98] M. Zarei, A. Samimi, M. Khorram, M. M. Abdi, and S. I. Golestaneh, "Fabrication and characterization of conductive polypyrrole/chitosan/collagen electrospun nanofiber scaffold for



tissue engineering application," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 168, pp. 175–186, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.031.

[99] T. Samwang, N. M. Watanabe, Y. Okamoto, S. Srinives, and H. Umakoshi, "Study of Chemical Polymerization of Polypyrrole with SDS Soft Template: Physical, Chemical, and Electrical Properties," *ACS Omega*, vol. 8, no. 51, pp. 48946–48957, Dec. 2023, doi: 10.1021/acsomega.3c06511.

[100] M. F. Abdullah, T. Nuge, A. Andriyana, B. C. Ang, and F. Muhamad, "Core–Shell Fibers: Design, Roles, and Controllable Release Strategies in Tissue Engineering and Drug Delivery," *Polymers 2019, Vol. 11, Page 2008*, vol. 11, no. 12, p. 2008, Dec. 2019, doi: 10.3390/POLYM11122008.

[101] H. Wang, M. Li, J. Hu, C. Wang, S. Xu, and C. C. Han, "Multiple targeted drugs carrying biodegradable membrane barrier: anti-adhesion, hemostasis, and anti-infection," *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 4, pp. 954–961, 2013.

[102] M. S. Malik, A. A. Qaiser, and M. A. Arif, "Structural and electrochemical studies of heterogeneous ion exchange membranes based on polyaniline-coated cation exchange resin particles," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 116, pp. 115046–115054, Dec. 2016, doi: 10.1039/C6RA24594C.

[103] J. J. Jakubširc *et al.*, "Morphological Characterization of Nanofibers: Methods and Application in Practice," *J. Nanomater.*, vol. 2012, p. 14, 2012, doi: 10.1155/2012/327369.

[104] "Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting." Accessed: May 24, 2022. [Online]. Available: https://www.astm.org/d0882-12.html

[105] J. F. Zhou, Y. G. Wang, L. Cheng, Z. Wu, X. D. Sun, and J. Peng, "Preparation of polypyrrole-embedded electrospun poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering," *Neural Regen. Res.*, vol. 11, no. 10, pp. 1644–1652, Oct. 2016, doi: 10.4103/1673-5374.193245.

[106] D. A. Stout, J. Yoo, A. N. Santiago-Miranda, and T. J. Webster, "Mechanisms of greater cardiomyocyte functions on conductive nanoengineered composites for cardiovascular applications," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 5653–5669, Nov. 2012, doi: 10.2147/IJN.S34574.

[107] L. Yue *et al.*, "Sulfonated bacterial cellulose/polyaniline composite membrane for use as gel polymer electrolyte," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 145, pp. 122–131, Jun. 2017, doi: 10.1016/J.COMPSCITECH.2017.04.002.

[108] S. Fisher and R. Kunin, "Routine Exchange Capacity Determinations of Ion Exchange Resins," *Anal. Chem.*, vol. 27, no. 7, pp. 1191–1194, 1955, doi: 10.1021/AC60103A052/ASSET/AC60103A052.FP.PNG_V03.

[109] L. Ma, X. Shi, X. Zhang, and L. Li, "Electrospinning of polycaprolacton/chitosan core-shell nanofibers by a stable emulsion system," *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 583, p. 123956, 2019, doi: 10.1016/j.colsurfa.2019.123956.



[110] L. Stryer and L. Stryer, *Biochemistry.* W.H. Freeman and Company, 1995. Accessed: May 01, 2025. [Online]. Available: https://books.google.com/books/about/Biochemistry.html?hl=es&id=d7JpAAAAMAAJ

[111] Y. Fu and A. Manthiram, "Core-shell structured sulfur-polypyrrole composite cathodes for lithium-sulfur batteries," *RSC Adv.*, vol. 2, no. 14, pp. 5927–5929, Jul. 2012, doi: 10.1039/c2ra20393f.

[112] M. E. Nicho and H. Hu, "Fourier transform infrared spectroscopy studies of polypyrrole composite coatings," *Solar Energy Materials and solar cells*, vol. 63, no. 4, 2000, doi: 10.1016/S0927-0248(00)00061-1.

[113] O. Gil-Castell, I. Ontoria-Oviedo, J. D. Badia, E. Amaro-Prellezo, P. Sepúlveda, and A. Ribes-Greus, "Conductive polycaprolactone/gelatin/polyaniline nanofibres as functional scaffolds for cardiac tissue regeneration," *React. Funct. Polym.*, vol. 170, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105064.

[114] S. Arthanari *et al.*, "Preparation and characterization of gatifloxacin-loaded alginate/poly (vinyl alcohol) electrospun nanofibers," *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, vol. 44, no. 3, pp. 847–852, Apr. 2016, doi: 10.3109/21691401.2014.986676.

[115] M. A. Morad, M. S. Abo Ghazala, M. G. El-Shaarawy, M. E. Gouda, and T. Y. Elrasasi, "Preparation and characterization of conjugated PVA/PANi blend films doped with functionalized graphene for thermoelectric applications," *Sci. Rep.*, vol. 14, no. 1, Dec. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-66691-w.

[116] M. Parchehbaf-Kashani *et al.*, "Heart Repair Induced by Cardiac Progenitor Cell Delivery within Polypyrrole-Loaded Cardiogel Post-ischemia," *ACS Appl. Bio Mater.*, vol. 4, no. 6, pp. 4849–4861, Jun. 2021, doi: 10.1021/ACSABM.1C00133.

[117] T. P. Moreno, C. C. CONACyT, and 1002826, "Desarrollo y evaluación de una membrana de nanofibras de colágeno/quitosano para liberación de ácido tranexámico.," 2022. Accessed: Mar. 09, 2025. [Online]. Available: https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/3741

[118] W.-L. Chen and C.-D. Kan, "Using cell-seeded electrospun patch for myocardial injury: in-vitro and in rat model," *2018 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, pp. 5338–5341, 2018, doi: 10.1109/EMBC.2018.8513557.

[119] O. Lozano, A. Torres-Quintanilla, and G. García-Rivas, "Nanomedicine for the cardiac myocyte: Where are we?," *Journal of Controlled Release*, vol. 271, pp. 149–165, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.JCONREL.2017.12.018.

[120] Z. Wu *et al.*, "A novel biomimetic nanofibrous cardiac tissue engineering scaffold with adjustable mechanical and electrical properties based on poly(glycerol sebacate) and polyaniline," *Mater. Today Bio*, vol. 23, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.mtbio.2023.100798.

[121] M. Zamanifard, M. T. Khorasani, and M. Daliri, "Hybrid electrospun polyhydroxybutyrate/gelatin/laminin/polyaniline scaffold for nerve tissue engineering application:



Preparation, characterization, and in vitro assay," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 235, p. 123738, Apr. 2023, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2023.123738.

[122] L. Zhou *et al.*, "Soft Conducting Polymer Hydrogels Cross-Linked and Doped by Tannic Acid for Spinal Cord Injury Repair," *ACS Nano*, vol. 12, no. 11, pp. 10957–10967, Nov. 2018, doi: 10.1021/ACSNANO.8B04609,.

[123] Y. Liang, A. Mitriashkin, T. T. Lim, and J. C. H. Goh, "Conductive polypyrrole-encapsulated silk fibroin fibers for cardiac tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 276, p. 121008, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.121008.

[124] H. Zengin and B. Erkana, "Synthesis and characterization of polyaniline/silicon dioxide composites and preparation of conductive films," *Polym. Adv. Technol.*, vol. 21, no. 3, pp. 216–223, Mar. 2010, doi: 10.1002/PAT.1492.

[125] A. C. Alavarse *et al.*, "Tetracycline hydrochloride-loaded electrospun nanofibers mats based on PVA and chitosan for wound dressing," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 77, pp. 271–281, Aug. 2017, doi: 10.1016/J.MSEC.2017.03.199.

[126] D. J. Indrani, F. Lukitowati, and Y. Yulizar, "Preparation of Chitosan/Collagen Blend Membranes for Wound Dressing: A Study on FTIR Spectroscopy and Mechanical Properties," *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 202, no. 1, 2017, doi: 10.1088/1757-899X/202/1/012020.

[127] B. Zhu, W. Li, N. Chi, R. V. Lewis, J. Osamor, and R. Wang, "Optimization of Glutaraldehyde Vapor Treatment for Electrospun Collagen/Silk Tissue Engineering Scaffolds," *ACS Omega*, vol. 2, no. 6, pp. 2439–2450, Jun. 2017, doi: 10.1021/ACSOMEGA.7B00290.

[128] T. Riaz *et al.*, "FTIR analysis of natural and synthetic collagen," *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 53, no. 9, pp. 703–746, 2018, doi: 10.1080/05704928.2018.1426595.

[129] Y. Z. Zhang, J. Venugopal, Z. M. Huang, C. T. Lim, and S. Ramakrishna, "Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers," *Polymer (Guildf).*, vol. 47, no. 8, pp. 2911–2917, Apr. 2006, doi: 10.1016/J.POLYMER.2006.02.046.

[130] S. Bratskaya *et al.*, "Chitosan Gels and Cryogels Cross-Linked with Diglycidyl Ethers of Ethylene Glycol and Polyethylene Glycol in Acidic Media," *Biomacromolecules*, vol. 20, no. 4, pp. 1635–1643, Apr. 2019, doi: 10.1021/ACS.BIOMAC.8B01817.

[131] S. Wang *et al.*, "Improvement in the Sustained-Release Performance of Electrospun Zein Nanofibers via Crosslinking Using Glutaraldehyde Vapors," *Foods*, vol. 13, no. 10, p. 1583, May 2024, doi: 10.3390/FOODS13101583/S1.

[132] A. Dodero *et al.*, "Effect of Crosslinking Type on the Physical-Chemical Properties and Biocompatibility of Chitosan-Based Electrospun Membranes," 2021, doi: 10.3390/polym13050831.



[133] N. Boehnke, C. Cam, E. Bat, T. Segura, and H. D. Maynard, "Imine Hydrogels with Tunable Degradability for Tissue Engineering," *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 7, pp. 2101–2108, Jul. 2015, doi: 10.1021/ACS.BIOMAC.5B00519.

[134] Z. Tian, W. Liu, and G. Li, "The microstructure and stability of collagen hydrogel cross-linked by glutaraldehyde," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 130, pp. 264–270, Aug. 2016, doi: 10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2016.06.015.

[135] F. Banafati Zadeh and A. Zamanian, "Glutaraldehyde: Introducing Optimum Condition for Cross-linking the Chitosan/Gelatin Scaffolds for Bone Tissue Engineering," *International Journal of Engineering*, vol. 35, no. 10, pp. 1967–1980, Oct. 2022, doi: 10.5829/IJE.2022.35.10A.15.

[136] Y. Liu, Y. Lv, M. An, F. Li, Y. Lu, and J. Song, "Characterization of Chitosan-Gelatin Blend Scaffolds," *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, vol. 58, no. 7, pp. 634–644, Jul. 2019, doi: 10.1080/00222348.2019.1615688;WGROUP:STRING:PUBLICATION.

[137] S. Locarno, P. Arosio, F. Curtoni, M. Piazzoni, E. Pignoli, and S. Gallo, "Microscopic and Macroscopic Characterization of Hydrogels Based on Poly(vinyl-alcohol)–Glutaraldehyde Mixtures for Fricke Gel Dosimetry," *Gels*, vol. 10, no. 3, p. 172, Mar. 2024, doi: 10.3390/GELS10030172/S1.

[138] B. A. Mei, O. Munteshari, J. Lau, B. Dunn, and L. Pilon, "Physical Interpretations of Nyquist Plots for EDLC Electrodes and Devices," *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 122, no. 1, pp. 194–206, Jan. 2017, doi: 10.1021/ACS.JPCC.7B10582.

[139] I. Stenina, D. Golubenko, V. Nikonenko, and A. Yaroslavtsev, "Selectivity of Transport Processes in Ion-Exchange Membranes: Relationship with the Structure and Methods for Its Improvement," *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 5517*, vol. 21, no. 15, p. 5517, Aug. 2020, doi: 10.3390/IJMS21155517.

[140] C. Wu *et al.*, "Electroactive extracellular Matrix/Polypyrrole composite films and their microenvironmental effects on osteogenic differentiation of BMSCs," *Chemical Engineering Journal*, vol. 443, p. 136508, Sep. 2022, doi: 10.1016/J.CEJ.2022.136508.

[141] A. C. Lazanas and M. I. Prodromidis, "Electrochemical Impedance Spectroscopy─A Tutorial," *ACS Measurement Science Au*, vol. 3, no. 3, pp. 162–193, Jun. 2023, doi: 10.1021/ACSMEASURESCIAU.2C00070.

[142] Z. J. Lim, M. Kho, X. Chen, and K. B. Goh, "Selective divalent/monovalent ion partitioning in cation exchange membranes," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 356, p. 129833, Apr. 2025, doi: 10.1016/J.SEPPUR.2024.129833.

[143] A. B. Yaroslavtsev, "Correlation between the properties of hybrid ion-exchange membranes and the nature and dimensions of dopant particles," *Nanotechnol. Russ.*, vol. 7, no. 9–10, pp. 437–451, Sep. 2012, doi: 10.1134/S1995078012050175/METRICS.

[144] J. Horinek, A. Davis, and R. K. Gupta, "Hydrogel and Its Composites for Pseudocapacitors," *Engineering Materials*, vol. Part F1837, pp. 217–235, 2024, doi: 10.1007/978-3-031-45430-1_12.



[145] R. Shah, P. Stodulka, K. Skopalova, and P. Saha, "Dual Crosslinked Collagen/Chitosan Film for Potential Biomedical Applications," *Polymers 2019, Vol. 11, Page 2094*, vol. 11, no. 12, p. 2094, Dec. 2019, doi: 10.3390/POLYM11122094.

[146] L. Salvatore *et al.*, "Exploring the effects of the crosslink density on the physicochemical properties of collagen-based scaffolds," *Polym. Test.*, vol. 93, p. 106966, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.POLYMERTESTING.2020.106966.

[147] J. Padrão, J. P. Silva, L. R. Rodrigues, F. Dourado, S. Lanceros-Méndez, and V. Sencadas, "Modifying fish gelatin electrospun membranes for biomedical applications: Cross-linking and swelling behavior," *Soft Mater.*, vol. 12, no. 3, pp. 247–252, 2014, doi: 10.1080/1539445X.2013.873466;WGROUP:STRING:PUBLICATION.

[148] Z. Xu *et al.*, "One-Step Carbonization Tailored Functional Groups and Micropores toward Fast and Durable Na-Ion Storage in Hard Carbon," *Small*, vol. 21, no. 31, p. 2503945, Aug. 2025, doi: 10.1002/SMLL.202503945;ISSUE:ISSUE:DOI.

[149] T. Samwang, N. M. Watanabe, Y. Okamoto, and H. Umakoshi, "Exploring the Influence of Morphology on Bipolaron–Polaron Ratios and Conductivity in Polypyrrole in the Presence of Surfactants," *Molecules*, vol. 29, no. 6, Mar. 2024, doi: 10.3390/molecules29061197.

[150] V. Uskoković, G. Abuna, J. R. Hampton, and S. Geraldeli, "Tunable Release of Calcium from Chitosan-Coated Bioglass," *Pharmaceutics 2024, Vol. 16, Page 39*, vol. 16, no. 1, p. 39, Dec. 2023, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS16010039.

[151] C. D. Helgason and C. L. Miller, Eds., "Basic Cell Culture Protocols," vol. 946, 2013, doi: 10.1007/978-1-62703-128-8.

[152] N. R. M. Beijer *et al.*, "Dynamic adaptation of mesenchymal stem cell physiology upon exposure to surface micropatterns," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 9099, Dec. 2019, doi: 10.1038/S41598-019-45284-Y.

[153] M. Toledano *et al.*, "Differential Biodegradation Kinetics of Collagen Membranes for Bone Regeneration," *Polymers 2020, Vol. 12, Page 1290*, vol. 12, no. 6, p. 1290, Jun. 2020, doi: 10.3390/POLYM12061290.

[154] M. N. Egorikhina *et al.*, "Aspects of In Vitro Biodegradation of Hybrid Fibrin–Collagen Scaffolds," *Polymers 2021, Vol. 13, Page 3470*, vol. 13, no. 20, p. 3470, Oct. 2021, doi: 10.3390/POLYM13203470.

[155] A. U. Haq *et al.*, "Intrinsically Conductive Polymers for Striated Cardiac Muscle Repair," *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 8550*, vol. 22, no. 16, p. 8550, Aug. 2021, doi: 10.3390/IJMS22168550.

[156] N. Jalilinejad *et al.*, "Electrically conductive carbon-based (bio)-nanomaterials for cardiac tissue engineering," *Bioeng. Transl. Med.*, vol. 8, no. 1, p. e10347, Jan. 2023, doi: 10.1002/BTM2.10347;WEBSITE:WEBSITE:AICHE;JOURNAL:JOURNAL:23806761;ISSUE:ISSUE:DOI.



[157] R. Podgórski, M. Wojasiński, and T. Ciach, "Nanofibrous materials affect the reaction of cytotoxicity assays," *Scientific Reports 2022 12:1*, vol. 12, no. 1, pp. 1–12, May 2022, doi: 10.1038/s41598-022-13002-w.

[158] S. Saghebasl, A. Akbarzadeh, A. M. Gorabi, N. Nikzamir, M. SeyedSadjadi, and E. Mostafavi, "Biodegradable functional macromolecules as promising scaffolds for cardiac tissue engineering," *Polym. Adv. Technol.*, vol. 33, no. 7, pp. 2044–2068, Jul. 2022, doi: 10.1002/pat.5669.

[159] Z. Jiang *et al.*, "Improved Cytocompatibility and Reduced Calcification of Glutaraldehyde-Crosslinked Bovine Pericardium by Modification With Glutathione," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 10, p. 844010, May 2022, doi: 10.3389/FBIOE.2022.844010/TEXT.

[160] I. Sallent, H. Capella-Monsonís, and D. I. Zeugolis, "Production and characterization of chemically cross-linked collagen scaffolds," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1944, pp. 23–38, 2019, doi: 10.1007/978-1-4939-9095-5_3/SAVE-RESEARCH.

[161] X. Xu, G. Van Eygen, Y. Hartanto, B. Van der Bruggen, and P. Luis, "Nanostructural modulation of chitosan matrix for facilitating transport of organic molecules across the membrane by pervaporation," *J. Memb. Sci.*, vol. 706, p. 122953, Jul. 2024, doi: 10.1016/J.MEMSCI.2024.122953.

[162] N. Reddy, R. Reddy, and Q. Jiang, "Crosslinking biopolymers for biomedical applications," *Trends Biotechnol.*, vol. 33, no. 6, pp. 362–369, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.tibtech.2015.03.008.

[163] N. Mighri, J. Mao, F. Mighri, A. Ajji, and M. Rouabhia, "Chitosan-Coated Collagen Membranes Promote Chondrocyte Adhesion, Growth, and Interleukin-6 Secretion," *Materials 2015, Vol. 8, Pages 7673-7689*, vol. 8, no. 11, pp. 7673–7689, Nov. 2015, doi: 10.3390/MA8115413.

[164] R. A. Nasser, S. S. Arya, K. H. Alshehhi, J. C. M. Teo, and C. Pitsalidis, "Conducting polymer scaffolds: a new frontier in bioelectronics and bioengineering," *Trends Biotechnol.*, vol. 42, no. 6, pp. 760–779, Jun. 2024, doi: 10.1016/j.tibtech.2023.11.017.

[165] S. M. Frisch, "Anoikis: How the extracellular matrix regulates life-or-death decisions," *Anoikis: How the Extracellular Matrix Regulates Life-or-Death Decisions*, pp. 1–202, Jul. 2021, doi: 10.1007/978-3-030-73856-3/SAVE-RESEARCH.

[166] M. Morsink, P. Severino, E. Luna-Ceron, M. A. Hussain, N. Sobahi, and S. R. Shin, "Effects of electrically conductive nano-biomaterials on regulating cardiomyocyte behavior for cardiac repair and regeneration," Feb. 01, 2022, *Acta Materialia Inc*. doi: 10.1016/j.actbio.2021.11.022.

[167] Ł. Otulakowski and B. Trzebicka, "Aggregation of Thermoresponsive Polymethacrylates in a Dulbecco's Modified Eagle Medium and Its Salts," *Polymers (Basel).*, vol. 15, no. 17, p. 3587, Sep. 2023, doi: 10.3390/POLYM15173587/S1.

[168] H. Katas, Z. Hussain, and S. A. Awang, "Bovine Serum Albumin-Loaded Chitosan/Dextran Nanoparticles: Preparation and Evaluation of Ex Vivo Colloidal Stability in Serum," *J. Nanomater.*, vol. 2013, no. 1, p. 536291, Jan. 2013, doi: 10.1155/2013/536291.



[169] G. Gonzalez *et al.*, "Conductive electrospun polymer improves stem cell-derived cardiomyocyte function and maturation," *Biomaterials*, vol. 302, p. 122363, Nov. 2023, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2023.122363.

[170] J. Ohnuki, A. Yodogawa, and M. Takano, "Electrostatic balance between global repulsion and local attraction in reentrant polymerization of actin," *Cytoskeleton*, vol. 74, no. 12, pp. 504–511, Dec. 2017, doi: 10.1002/CM.21391;CTYPE:STRING:JOURNAL.

[171] T. Oda, T. Aihara, and K. Wakabayashi, "Early nucleation events in the polymerization of actin, probed by time-resolved small-angle x-ray scattering," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, pp. 34539-, Oct. 2016, doi: 10.1038/SREP34539;TECHMETA.

[172] K. Narayanankutty *et al.*, "Metabolic coordination and phase transitions in spatially distributed multi-cellular systems," *Communications Physics 2025 8:1*, vol. 8, no. 1, pp. 205-, May 2025, doi: 10.1038/s42005-025-02133-x.

[173] C. Pitsalidis *et al.*, "Organic electronic transmembrane device for hosting and monitoring 3D cell cultures," *Sci. Adv.*, vol. 8, no. 37, p. 4761, Sep. 2022, doi: 10.1126/SCIADV.ABO4761;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER.

[174] Ł. Saletnik, W. Szczęsny, J. Szmytkowski, and J. J. Fisz, "On the Nature of Stationary and Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy of Collagen Powder from Bovine Achilles Tendon," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 8, p. 7631, Apr. 2023, doi: 10.3390/IJMS24087631/S1.

[175] T. A. . Skotheim and J. R. . Reynolds, "Conjugated Polymers : theory, synthesis, properties, and characterization," 2007, Accessed: Jul. 30, 2026. [Online]. Available: https://books.google.com/books/about/Conjugated_Polymers.html?hl=es&id=sOj3wdq1sTQC

[176] J. B. Michel, "Anoïkis in the Cardiovascular System: Known and Unknown Extracellular Mediators," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 23, no. 12, pp. 2146–2154, Dec. 2003, doi: 10.1161/01.ATV.0000099882.52647.E4;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER.

[177] P. Gaudriault, D. Fassini, and A. Homs-Corbera, "Heart-on-a-chip," *Organ-on-a-chip: Engineered Microenvironments for Safety and Efficacy Testing*, pp. 255–293, Jan. 2020, doi: 10.1016/B978-0-12-817202-5.00008-5.

[178] C. M. Leung *et al.*, "A guide to the organ-on-a-chip," *Nature Reviews Methods Primers 2022 2:1*, vol. 2, no. 1, pp. 1–29, May 2022, doi: 10.1038/s43586-022-00118-6.

[179] Q. Yang, Z. Xiao, X. Lv, T. Zhang, and H. Liu, "Fabrication and Biomedical Applications of Heart-on-a-chip," *Int. J. Bioprint.*, vol. 7, no. 3, pp. 54–70, 2021, doi: 10.18063/IJB.V7I3.370.

[180] A. Kobuszewska *et al.*, "Heart-on-a-Chip: An Investigation of the Influence of Static and Perfusion Conditions on Cardiac (H9C2) Cell Proliferation, Morphology, and Alignment," *SLAS Technol.*, vol. 22, no. 5, pp. 536–546, Oct. 2017, doi: 10.1177/2472630317705610.



[181] A. J. Rogers, V. G. Fast, and P. Sethu, "Biomimetic Cardiac Tissue Model Enables the Adaption of Human Induced Pluripotent Stem Cell Cardiomyocytes to Physiological Hemodynamic Loads," *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 19, pp. 9862–9868, Oct. 2016, doi: 10.1021/ACS.ANALCHEM.6B03105.

[182] D. Cruz-Moreira *et al.*, "Assessing the influence of perfusion on cardiac microtissue maturation: A heart-on-chip platform embedding peristaltic pump capabilities," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 118, no. 8, pp. 3128–3137, Aug. 2021, doi: 10.1002/BIT.27836.

[183] R. Vaiciuleviciute *et al.*, "Biomimetic electrospun scaffolds for engineered heart tissue: from design parameters to drug testing platforms," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 14, p. 1711698, Feb. 2026, doi: 10.3389/FBIOE.2026.1711698/FULL.

