



**Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Materiales Poliméricos**

**BIOCOMPATIBILIDAD DE POLIURETANO-UREAS
ELASTOMÉRICOS SEGMENTADOS**

Tesis que presenta

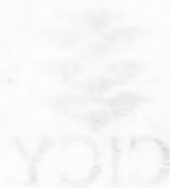
Alvar Augusto Paredes Puerto

En opción al título de

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN MATERIALES POLIMERICOS**

Mérida, Yucatán a julio de 2012





Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Programa en Materiales Poliméricos

BIOCOMPATIBILIDAD DE POLIURETANO-UREAS
ELASTOMÉRICOS SEGMENTADOS

Tesis que presenta

Aivar Augusto Paredes Puerto

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS
EN MATERIALES POLIMÉRICOS

Mérida, Yucatán a julio de 2012



Mérida, Yucatán, México; a 6 de Julio de 2012

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Alvar Augusto Paredes Puerto





RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado

BIOCOMPATIBILIDAD DE POLIURETANO-UREAS ELASTOMÉRICOS SEGMENTADOS

perteneciente al Programa de Doctorado en Ciencias (Materiales Poliméricos) del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Materiales bajo la dirección del Dr. Fernando Hernández Sánchez y la Dra. Eugenia Guzmán Marín.

Atentamente

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

Contribuciones a la literatura

- Los resultados de los cultivos en muestras por moldeo por centrifugado fueron publicados en:
 - Paredes-Puerto, A., Dashti, D., Yeghiazarians, Y., Guzmán-Marín, E., Healy K.E., Hernández-Sánchez, F., “Biocompatibility of Segmented Poly(urethane-urea) Elastomers Based on Polycaprolactone,” *Trans. Soc. For Biomaterials*, 32, 298 (2011)
- Los resultados de las muestras de evaporación por disolvente se reportaron en:
 - Paredes-Puerto, A., Dashti, D., Yeghiazarians, Y., Guzmán-Marín, E., Healy K.E., Hernández-Sánchez, F. Biocompatibility and scaffold fabrication from polycaprolactone based polyurethane ureas, in *Biomaterials for Medical Applications*, edited by Sandra Elizabeth Rodil, Argelia Almaguer-Flores, Karine Anselme (Mater. Res. Soc. Symp. Proc. Volume 1376, Warrendale, PA, 2012).

DEDICATORIA

A mi hijo, mi esposa, mis papas, mis hermanos y hermanas. Para la ciencia la prueba de la existencia de Dios es el diseño del universo, **para mi la prueba de la existencia de Dios es que ustedes sean parte de mi vida.**

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca 211763 otorgada para la realización de mis estudios de doctorado. También al laboratorio “Biomimetic Materials & Tissue Engineering Lab” en UC Berkeley por recibirme, permitirme utilizar sus instalaciones y financiar la investigación en UC Berkeley. Al Dr. Jianqin Ye por obtener los CPC en UC San Francisco y permitir su uso en este trabajo.

A Fernando Hernández, por ser mi asesor.

A Kevin Healy for supporting the research, even if when he was not the official advisor, and for making me a part of his wonderful group.

A Eugenia Guzmán, por estar siempre dispuesta a revisar mis trabajos, aun cuando fueran realmente malos, y enseñarme a escribir de manera adecuada.

A Hugo Carrillo, por todas las veces que me sacaste de algún problema en el laboratorio.

A Jeremy Barton, for teaching what real lab work is and introducing me to the fabulous world of nanoscience.

A Derek Dashti, for teaching me so much about cells and their environments, I will always be in debt with you.

A Lerma Chan, Por siempre estar dispuesta a discutir mis resultados, y enseñarme tanto sobre los poliuretanos y su síntesis.

A Mis Padres Alvar y Neffy por todo su apoyo moral y financiero; y especialmente por su amor hacia mí, mi esposa y mi hijo.

A Mi Hermano y Hermanas, por siempre estar ahí cuando necesité algún apoyo.

A Mi esposa Nara, por creer siempre en mí y siempre ser la mujer tan maravillosa que eres, no sé si ya te lo dije hoy...te amo.

Y Alvar David, por siempre estar en mi corazón y mi mente, te quiero hijo.

Tabla de contenidos

| | | |
|----------|---|----------|
| 1 | Introducción | 4 |
| 1.1 | Problema clínico..... | 4 |
| 2 | Revisión de literatura..... | 8 |
| 2.1 | Introducción | 8 |
| 2.2 | Tejido cardiaco..... | 9 |
| 2.2.1 | Células miocárdicas | 10 |
| 2.2.2 | Ultraestructura del corazón | 11 |
| 2.2.3 | Organización y función de la matriz extracelular | 12 |
| 2.3 | Respuesta regenerativa del corazón al infarto al miocardio..... | 14 |
| 2.4 | Ingeniería de tejidos cardiacos..... | 15 |
| 2.4.1 | Ingeniería de tejidos cardiacos utilizando andamios tridimensionales | 16 |
| 2.4.2 | Biomateriales para ingeniería de tejidos cardiacos | 17 |
| 2.4.3 | Biomateriales naturales..... | 17 |
| 2.4.4 | Biomateriales sintéticos | 18 |
| 2.4.5 | Polímeros tradicionales utilizados en ingeniería de tejidos | 18 |
| 2.4.6 | Biomateriales elastoméricos | 20 |
| 2.4.7 | Células para ingeniería de tejidos cardiacos..... | 22 |
| 2.5 | Células madre | 24 |
| 2.5.1 | Células madre adultas | 25 |
| 2.5.2 | Células madre adultas para regeneración miocárdica | 26 |
| 2.5.2.1 | Progenitores no-cardiacos | 26 |
| 2.5.2.2 | Progenitores de los cardiomiocitos | 27 |
| 2.5.3 | Aplicaciones terapéuticas de células progenitoras cardiacas | 28 |
| 2.5.4 | Dificultades en la utilización de células madre adultas | 29 |
| 2.6 | Inmunocitoquímica | 30 |
| 2.6.1 | Anticuerpos para progenitores cardiacos..... | 31 |
| 2.7 | Poliuretanos segmentados biodegradables para ingeniería de tejidos ... | 32 |
| 2.7.1 | Química y propiedades de poliuretanos degradables | 33 |
| 2.7.2 | Síntesis de poliuretanos segmentados | 34 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.7.2.1 | Cobertura por centrifugación (Spin coating)..... | 37 |
| 2.7.3 | Química de reactivos para poliuretanos biodegradables | 37 |
| 2.8 | Hipótesis | 40 |
| 2.9 | Objetivo general | 41 |
| 2.10 | Objetivos particulares..... | 41 |
| 3 | Síntesis y caracterización de los poliuretano-ureas, elastoméricos y biodegradables, basados en policaprolactona, metileno bis-(4-ciclohexilisocianato) y putrescina | 44 |
| 3.1 | Materiales | 44 |
| 3.2 | Métodos | 44 |
| 3.2.1 | Síntesis | 44 |
| 3.2.2 | Espectroscopia infrarroja (FTIR) | 45 |
| 3.2.3 | Calorimetría diferencial de barrido (DSC) | 45 |
| 3.2.4 | Termogravimetría (TGA)..... | 47 |
| 3.2.5 | Microscopía de fuerza atómica (AFM) | 47 |
| 3.3 | Resultados y discusión | 47 |
| 3.3.1 | Síntesis | 47 |
| 3.3.2 | Espectroscopia de infrarrojo (FTIR) | 48 |
| 3.3.3 | Calorimetría diferencial de barrido (DSC) | 50 |
| 3.3.4 | Termogravimetría (TGA)..... | 53 |
| 3.3.5 | Microscopía de fuerza atómica (AFM) | 58 |
| 3.4 | Conclusiones..... | 60 |
| 4 | Biocompatibilidad de los poliuretano-ureas elastoméricos – estudios <i>in vitro</i> con células progenitoras cardiacas y células madre mesenquimales | 66 |
| 4.1 | Materiales | 66 |
| 4.2 | Métodos | 66 |
| 4.2.1 | Preparación de películas delgadas | 66 |
| 4.2.1.1 | Cobertura por centrifugación (Spin coating)..... | 66 |
| 4.2.1.2 | Evaporación de disolvente | 67 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.2.2 | Elipsometría | 67 |
| 4.2.3 | Cultivo de progenitores cardiacos | 67 |
| 4.2.3.1 | Muestras de cobertura por centrifugación (spin coating) | 67 |
| 4.2.3.2 | Muestras de evaporación de disolvente | 67 |
| 4.2.4 | Cultivo de células madre mesenquimales humanas | 67 |
| 4.2.5 | Evaluación de proliferación de células madre mesenquimales | 68 |
| 4.2.6 | Análisis CyQuant en la proliferación de progenitores cardiacos | 68 |
| 4.2.7 | Microscopía de contraste de fases y análisis de imágenes | 70 |
| 4.2.8 | Inmunocitoquímica | 70 |
| 4.3 | Resultados y Discusión | 71 |
| 4.3.1.1 | Recubrimiento por centrifugación..... | 71 |
| 4.3.1.2 | Evaporación de disolvente | 71 |
| 4.3.1.3 | Elipsometría | 72 |
| 4.3.1.4 | Cultivo de células progenitoras cardiacas | 72 |
| 4.3.1.5 | Cultivo de células madre mesenquimales humanas | 79 |
| 4.3.1.6 | Inmunocitoquímica | 80 |
| 4.4 | Conclusiones..... | 81 |
| 5 | Conclusiones de la tesis | 86 |
| 5.1 | Perspectivas..... | 87 |
| 6 | Bibliografía | 88 |

Lista de cuadros

| | |
|--|----|
| Cuadro 2-1 Resumen de algunos biomateriales utilizados en ingeniería de tejidos cardiacos[71]. | 19 |
| Cuadro 2-2 Tipos de células utilizadas en regeneración cardiaca[71]. | 25 |
| Cuadro 2-3 Diisocianatos utilizados para sintetizar los PUU biodegradables[187]. | 39 |
| Cuadro 2-4 Polioles usados habitualmente para PUU biodegradables[187]. | 40 |
| Cuadro 3-1 Composición de los polímeros sintetizados e identificación de muestras. (Tomado de la referencia [192]) | 48 |
| Cuadro 3-2 Rugosidades (RMS) de los PUU obtenidas por AFM. | 60 |
| Cuadro 4-1 Disolventes utilizados para recubrimiento por centrifugado y sus propiedades relevantes[210] | 71 |
| Cuadro 4-2 Ecuaciones de crecimiento celular y tiempos de duplicación de CPC en PUU. | 75 |
| Cuadro 4-3 Ecuaciones de crecimiento celular y tiempos de duplicación de células madre mesenquimales humanas en los PUU. | 80 |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 2.1 La estructura del miocardio: a) Imagen histológica que muestra las múltiples capas de cardiomiocitos, las flechas señalan los discos de intercalación o intercalares b) Esquema identificando los cardiomiocitos, fibroblastos, vasos sanguíneos, y la matriz extracelular[14]. | 10 |
| Figura 2.2 Matriz extracelular cardiaca: a) componentes, y b) organización del endomisio y perimisio[14]. | 13 |
| Figura 2.3 Ilustración de la segregación de microfases en poliuretanos segmentados[175]. | 35 |
| Figura 2.4 Reacción de síntesis de poliuretanos en dos pasos. Paso 1. Formación del pre-polímero. Paso 2. Extensión de cadena[176]. | 36 |
| Figura 3.1 La imagen muestra la representación esquemática de la síntesis de los Poliuretano-ureas por el método de dos pasos [192]. | 46 |
| Figura 3.2 En la figura se muestran trozos de las películas obtenidas por evaporación de DMF de los 4 PUU. | 49 |
| Figura 3.3 Espectros de FT-IR de los PUU. | 50 |
| Figura 3.4 Primer calentamiento de la PCL diol. | 51 |
| Figura 3.5 Termogramas de DSC del PUU14. La figura superior muestra el primer calentamiento del PUU, la siguiente hacia abajo el primer enfriamiento y la última (hasta abajo) representa el segundo calentamiento..... | 52 |
| Figura 3.6 Termogramas de DSC del PUU23. La figura superior muestra el primer calentamiento del PUU, la siguiente hacia abajo el primer enfriamiento y la última (hasta abajo) representa el segundo calentamiento..... | 53 |
| Figura 3.7 Termogramas de DSC del PUU32. La figura superior muestra el primer calentamiento del PUU, la siguiente hacia abajo el primer enfriamiento y la última (hasta abajo) representa el segundo calentamiento..... | 54 |
| Figura 3.8 Termogramas de DSC del PUU40. La figura superior muestra el primer calentamiento del PUU, la siguiente hacia abajo el primer enfriamiento y la última (hasta abajo) representa el segundo calentamiento..... | 55 |

Figura 3.9 Termogramas de TGA para los PUU. En la gráfica se puede observar que la degradación inicia aproximadamente a los 260°C, lo cual coincide con lo reportado para este tipo de materiales..... 57

Figura 3.10 Mecanismo de degradación térmica del segmento rígido de uretano[207]. 58

Figura 3.11 Imágenes de microscopia de fuerza atómica del PUU14. 1. dimetilacetamida altura, 2. dimetilacetamida fase, 3. dimetilacetamida altura 3D, 4. dimetilformamida altura, 5. dimetilformamida fase, 6. dimetilformamida altura 3D, 7. dimetilsulfoxido altura, 8. dimetilsulfoxido fase, 9. dimetilsulfoxido altura 3D, 10. tetrahidrofurano altura, 11. tetrahidrofurano fase, 12. tetrahidrofurano altura 3D, 13. 2-propanol altura, 14. 2-propanol fase, 15. 2-propanol altura 3D. 61

Figura 3.12 Imágenes de microscopia de fuerza atómica del PUU23. 1. dimetilacetamida altura, 2. dimetilacetamida fase, 3. dimetilacetamida altura 3D 4. dimetilformamida altura, 5. dimetilformamida fase, 6. dimetilformamida altura 3D, 7. dimetilsulfoxido altura, 8. dimetilsulfoxido fase, 9. dimetilsulfoxido altura 3D 10. tetrahidrofurano altura, 11. tetrahidrofurano fase, 12. tetrahidrofurano altura 3D . 62

Figura 3.13 Imágenes de microscopia de fuerza atómica del PUU32. 1. dimetilacetamida altura, 2. dimetilacetamida fase, 3. dimetilacetamida altura 3D 4. dimetilformamida altura, 5. dimetilformamida fase, 6. dimetilformamida altura 3D, 7. dimetilsulfoxido altura, 8. dimetilsulfoxido fase, 9. dimetilsulfoxido altura 3D 10. tetrahidrofurano altura, 11. tetrahidrofurano fase, 12. tetrahidrofurano altura 3D . 63

Figura 3.14 Imágenes de microscopia de fuerza atómica del PUU40. 1. dimetilacetamida altura, 2. dimetilacetamida fase, 3. dimetilacetamida altura 3D 4. dimetilformamida altura, 5. dimetilformamida fase, 6. dimetilformamida altura 3D, 7. dimetilsulfoxido altura, 8. dimetilsulfoxido fase, 9. dimetilsulfoxido altura 3D 10. tetrahidrofurano altura, 11. tetrahidrofurano fase, 12. tetrahidrofurano altura 3D. 64

Figura 4.1 Curva de calibración de CyQuant® para CPC 69

Figura 4.2 Imágenes de microscopía óptica de las muestras de Poliuretano-ureas 73

Figura 4.3 Imágenes de microscopio de fases para el cultivo de CPC en muestras obtenidas por recubrimiento por centrifugación con disoluciones de tetrahidrofurano. La primera fila muestra el control de poliestireno para cultivo de tejidos y los PUU14, PUU23 y PUU32 después de 24 horas de haber sembrado las células. La segunda fila muestra los mismos materiales para 168 horas después del sembrado. 76

Figura 4.4 Las imágenes muestran la proliferación de las CPC en poliestireno para cultivo de tejidos y los cuatro PUU. En la primera fila se observa las células 24 horas después de la siembra. En la última fila se muestra la imagen 96 horas después de la siembra de las CPC. 77

Figura 4.5 En la gráfica se observan los resultados de CyQuant® para los estudios de proliferación de las CPC en los cuatro PUU y el poliestireno para cultivo de tejidos. Estos resultados muestran la gran diferencia en la cantidad de células en los PUU y el TCPS después de 24 horas. Asimismo en el lado derecho de la gráfica se observa de manera clara que al final del experimento (96 horas) la cantidad de células era similar en todos los materiales. 78

Figura 4.6 Las imágenes muestran la proliferación de las hMSC en poliestireno para cultivo de tejidos y los cuatro PUU. En la primera fila se observa las células 24 horas después de la siembra. En la última fila se muestra la imagen 96 horas después de la siembra de las CPC. 82

Figura 4.7 En la gráfica se observan los resultados de CyQuant® para los estudios de proliferación de las CPC en los cuatro PUU y el poliestireno para cultivo de tejidos. Estos resultados muestran la gran diferencia en la cantidad de células en los PUU y el TCPS después de 24 horas. Asimismo, en el lado derecho de la gráfica se observa de manera clara que al final del experimento (96 horas) la cantidad de células era similar en todos los materiales, exceptuando el PUU23 que tenía una mayor cantidad de células. 83

Figura 4.8 En las imágenes se observa las imágenes del estudio de inmunocitoquímica de los CPC cultivados en los PUU. En la primeras dos columnas se encuentran las imágenes de las células marcadas con CD31 y DAPI

después de 24 horas de cultivo. En la tercera columna se encuentran las imágenes de los mismos marcadores y materiales pero para 48 horas (sobrepuestos). Y finalmente en la tercera y cuarta columnas se encuentran los resultados para 72 horas de cultivo. Estos resultados se encuentran analizados en el texto..... 84

Resumen

En este trabajo se sintetizó poliuretano-ureas con 14, 23, 32 y 40 por ciento en peso de segmentos rígidos a partir de policaprolactona diol, metileno bis-(4-ciclohexilisocianato) y butanodiamina. La síntesis y el incremento de segmentos rígidos se corroboraron por espectroscopia de infrarrojo. Los estudios de calorimetría de barrido demostraron que PUU14 y PUU23 son materiales semicristalinos (T_m $\sim 50^\circ\text{C}$ y $\sim 30^\circ\text{C}$ respectivamente), y que el PUU32 y PUU40 son materiales amorfos. Las temperaturas de transición vítrea, de estos PUU, son cercanas a la de policaprolactona ($\sim 60^\circ\text{C}$), sin embargo, debido a la influencia de los segmentos rígidos sus temperaturas de transición vítrea se encontraron aproximadamente entre 55 y 57 grados centígrados. Asimismo, Los estudios de microscopía de barrido electrónico mostraron que estos PUU formaban películas rugosas con morfologías variadas que podían influir en la adhesión y proliferación celular. En los estudios celulares se demostró que estos PUU pueden soportar una alta densidad de progenitores cardiacos viables sin afectar su potencialidad. Asimismo se demostró que las células madre mesenquimales humanas pueden proliferar en estos materiales sin diferenciarse de manera espontanea y generar una capa con alta densidad de células viables. En conclusión, los PUU sintetizados fueron biocompatibles con dos tipos de células que prometen ser fuentes de cardiomiocitos para ingeniería de tejidos.

Abstract

In this work, we synthesized polyurethane-ureas with 14, 23, 32 and 40 per cent hard segment content by weight from polycaprolactone diol, methylene bis-(4-cyclohexylisocyanate) and butanediamine. FTIR studies corroborated the hard segment increment and successful synthesis. Differential scanning calorimetric studies showed that PUU14 and PUU23 were semi-crystalline (T_m $\sim 50^\circ\text{C}$ and $\sim 30^\circ\text{C}$ respectively), in contrast PUU32 and PUU40 were completely amorphous materials. The glass transition temperatures, for these PUUs, were close to the PCL T_g ($\sim 60^\circ\text{C}$) but found at higher temperatures ($\sim 55^\circ\text{C}$ and $\sim 57^\circ\text{C}$) due to hard segment influence. The atomic force microscopy studies showed that the PUUs formed rough films with varied morphologies that could influence in cell adhesion and proliferation. Cell culture studies with cardiac progenitors proved that these materials could support a high cell density of viable cells. Human mesenchymal stem cells proliferated in these materials without spontaneous differentiation and could generate a high-density layer of viable cells. In conclusion, the synthesized PUUs were biocompatible with two types of cells that promise to be a source of cardiomyocytes for cardiac tissue engineering.

Capitulo 1

Introducción

1 Introducción

1.1 Problema clínico

Las enfermedades cardíacas son la causa principal de muerte y discapacidad en las naciones industrializadas, en México el INEGI la reportó como la causa número uno de muertes en hombres y la número dos en mujeres en 2002[1, 2], y en la actualización del año 2008 esta fue la número dos en ambos géneros[2]. De manera similar en los Estados Unidos de América la prevalencia de enfermedades cardiovasculares en el 2006 fue de 81.1 millones de pacientes, aproximadamente el 37% de la población. Esto le cuesta al sistema de salud de los EUA \$503.2 miles de millones de dólares y terminó con la muerte de 831,272 de los pacientes (36.3% del total)[3, 4]. De hecho, 8.1 millones de individuos en ese país sufren los efectos incapacitantes de un infarto al miocardio, y hay más de 920,000 casos nuevos cada año que terminan en 156,800 muertes (2004). Esto conlleva una mayor carga en la economía ya que los tratamientos disponibles actualmente aumentan la supervivencia del paciente, pero lo mantienen incapacitado para trabajar.

Cuando el corazón recibe un daño, p.ej. infarto al miocardio (IM), los cardiomiocitos muertos son remplazados con tejido cicatrizado que tiene propiedades mecánicas muy diferentes a las del miocardio sano, esta cicatriz ocasiona que el órgano no pueda mantener su régimen de palpitación natural[5], y provoca eventos de remodelado que incluyen: cambios de fenotipo celular, composición y organización de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), cambios en arquitectura y tamaño ventricular, señalización neurohormonal, expresión de proteínas, entre otros. Estos cambios tratan de contravenir el daño en corto plazo, sin embargo en el largo plazo llevan a la falla por insuficiencia cardíaca (IC) y eventualmente a la muerte del paciente[6]. Los tratamientos actuales para el IM y la IC pueden ser farmacológicos, p. ej. agentes trombolíticos, antitrombóticos, nitratos, beta-bloqueadores, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, estatinas, y antagonistas de los adenosina receptores. Todos estos son utilizados para incrementar

el flujo sanguíneo, limitar el remodelado ventricular e incrementar la respuesta cardiaca[7]. Otro tratamiento para el IM es el dispositivo de asistencia ventricular (VAD, por sus siglas en ingles), este funciona bajo la premisa de reducir la carga de trabajo del corazón infartado y revertir el remodelado cardiaco[8]. Sin embargo, este tratamiento ha sido utilizado como un puente hacia el trasplante y no como una terapia permanente; a últimas fechas esto ha cambiado y se ha vuelto popular como una terapia final cuya limitante sigue siendo el bajo número de pacientes que son candidatos a esta cirugía. El tratamiento más indicado, por los beneficios para el paciente, es el trasplante de corazón que se ve limitado por el bajo número de donantes. También existen otros tratamientos que parecen ser promisorios como la terapia celular, terapia génica y farmacológica que buscan promover la regeneración cardiaca. Sin embargo, muchos de estos pacientes podrían beneficiarse de pequeños injertos de músculo o de pequeños tramos de arterias y venas. Dado lo anterior, la ingeniería de tejidos cardiacos promete ser una gran fuente de tratamientos para las enfermedades cardiovasculares; esta técnica combina el uso de biomateriales, células y factores moleculares que permitan reemplazar o reparar el tejido cardiaco dañado para recuperar la funcionalidad.

Capitulo 2

Revisión

de

Literatura

2 Revisión de literatura

2.1 Introducción

El término biomaterial se refiere a un material inerte utilizado en un dispositivo médico diseñado para interactuar con un sistema biológico o vivo[9]. Diferentes materiales son utilizados para este propósito, p. ej. metales (titanio), cerámicos (hidroxiapatita), y polímeros (poliuretanos). Todos estos materiales ocasionan una reacción del cuerpo llamada reacción a cuerpo extraño, por lo que el término biocompatible fue introducido para distinguir los materiales adecuados para este fin. La biocompatibilidad se define como la habilidad de un material para desempeñarse en un ambiente biológico, con una respuesta adecuada del huésped[9], un material puede ser biocompatible en una aplicación pero incompatible en otra dependiendo de la respuesta que produzca. El propósito de los biomateriales es sustituir tejidos dañados, perdidos de manera temporal o de manera permanente. Usos más recientes incluyen liberación controlada de fármacos e ingeniería de tejidos, sin embargo, aun cuando se ha utilizado materiales artificiales para ayudar a nuestro cuerpo quedan muchos temas que necesitamos resolver, como la pérdida de función al sustituir un tejido y la falla del material. Un intento de sobrepasar estos problemas es la ingeniería de tejidos en la cual el objetivo es implantar un biomaterial, cargado con células, que durante un tiempo determinado funcione como un sustituto de la matriz extracelular, posteriormente se espera que el implante vaya desapareciendo de manera gradual mientras el tejido nuevo y sano se forma.

El corazón es un órgano complejo con muchos componentes que son críticos para su función tan específica, y esta misma característica lo hace susceptible a varias enfermedades y lesiones. La ingeniería de tejidos cardiovasculares, como un todo, explora sustitutos para los varios componentes del corazón como son arterias, venas, válvulas, y músculo cardíaco. Se ha logrado muchos avances en las diferentes áreas de este campo, sin embargo, el desarrollo de músculo cardíaco funcional permanece como uno de los retos más desafiantes. Para la ingeniería de tejidos suaves y mecánicamente demandantes como el músculo cardíaco es

necesario utilizar materiales que presenten comportamiento elastomérico y sean capaces de soportar fatiga. Los poliuretanos han sido ampliamente utilizados en la industria biomédica en implantes de seno, catéteres, recubrimientos para quemaduras, y andamios para ingeniería de tejidos[10]. Una de las razones es que ofrecen la oportunidad de controlar las propiedades mecánicas y químicas del material con una simple sustitución de monómeros. Su uso, sin embargo, se debe principalmente a su hemocompatibilidad y biocompatibilidad comprobadas, asimismo, los poliuretanos han demostrado ser útiles para ingeniería de tejidos cardiacos. En estudios previos se han sembrado células primarias (cardiomiocitos) en superficies y andamios[11, 12]. Otra ventaja de estos materiales degradables, mecánicamente ajustables y elastoméricos es que la degradación del andamio durante el crecimiento celular presentaría una oportunidad para la transferencia de esfuerzos mecánicos de la matriz sustituta al tejido en crecimiento.

2.2 Tejido cardiaco

El corazón es una bomba que tiene dos funciones: 1) recolectar sangre del organismo y bombearla hacia los pulmones, y 2) recuperar la sangre de los pulmones para después enviarla hacia todos los órganos y tejidos. Este órgano se encuentra localizado en el tórax y esta compuesto de cuatro cavidades musculares los atrios derechos e izquierdos y los ventrículos correspondientes que bombean sangre a los circuitos pulmonar y sistémico respectivamente. Una de las estructuras críticas para la función de bombeo es la pared del corazón, está compuesta por tres capas distintivas, el endocardio, el miocardio y el epicardio nombrándolas desde el lumen hacia afuera; todo esto se encuentra rodeado por el pericardio[13]. Cada capa que compone el corazón tiene una función crítica en su función, sin embargo, el miocardio es la porción contráctil que genera la fuerza necesaria para bombear la sangre al cuerpo y constituye la mayor parte de la pared cardiaca. El miocardio consiste de múltiples capas de tejido muscular cardiaco que se entrelazan con los vasos sanguíneos y el tejido conectivo (Figura 2.1). Las células de cada capa están organizadas de forma paralela, anisotrópica

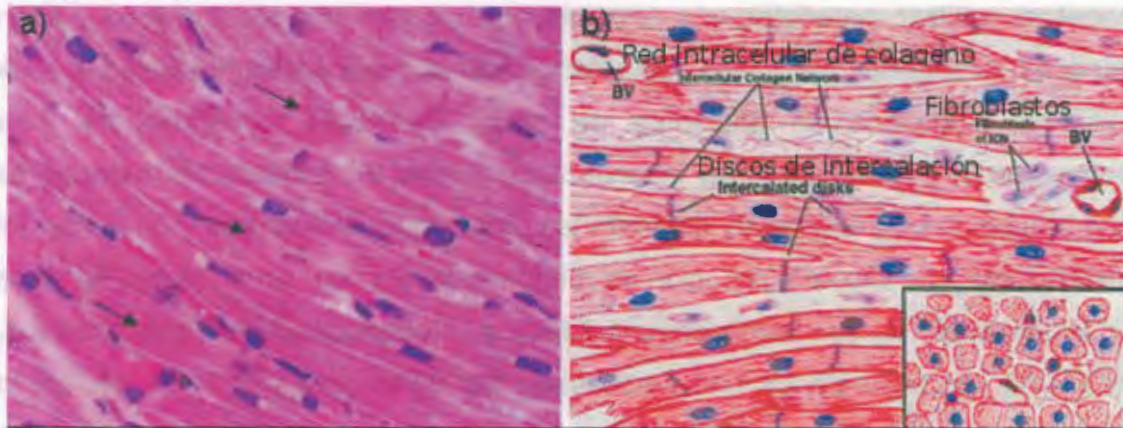


Figura 2.1 La estructura del miocardio: a) Imagen histológica que muestra las múltiples capas de cardiomiocitos, las flechas señalan los discos de intercalación o intercalares b) Esquema identificando los cardiomiocitos, fibroblastos, vasos sanguíneos, y la matriz extracelular[14].

mente, y cada capa esta subsecuentemente orientada a un ángulo diferente dependiendo del tipo de cavidad y localización dentro de esta. Debido a la energía necesaria para la función contráctil el miocardio es una estructura altamente vascularizada y la alta demanda de oxígeno hace que sea una estructura altamente susceptible a la isquemia. La disrupción de la composición y organización naturales de este tejido se presenta en varias enfermedades, y con esto se compromete la función contráctil del corazón. Como resultado, las técnicas de medicina regenerativa se han enfocado en la manera de recuperar la función contráctil del tejido. Por lo tanto, el entender la composición celular y organización tisular del miocardio son un prerrequisito para la ingeniería de estructuras miocárdicas.

2.2.1 Células miocárdicas

El miocardio esta compuesto de células endoteliales vasculares, células de músculo liso vascular, fibroblastos, neuronas, y cardiomiocitos. Los cardiomiocitos son las células contráctiles que ocupan la mayoría del volumen del miocardio, los cardiomiocitos maduros tienen forma de bastón y su diámetro normal es de aproximadamente 10 a 30 μm con una longitud de entre 80 y 150 μm [15], y contienen un alto número de mitocondrias y mioglobina para cumplir con los

requerimientos energéticos de la contracción[16]. Los cardiomiocitos son el principal componente de la estructura del miocardio, en circunstancias naturales suman el 70% del espesor de la pared ventricular. Estos están formados principalmente de haces de miofibrillas y miofibras que consisten de cadenas largas y repetitivas de sarcómeros, los cuales son la unidad básica repetitiva compuesta de actina, miosina, tropomiosina, troponina y otras proteínas[17]. Asimismo, estas estructuras son las que le dan la apariencia estriada característica al músculo cardíaco[18]. En él encontramos dos grupos principales, el primero está compuesto de músculos contráctiles que comprenden los ventriculares y auriculares. El segundo grupo es el sistema excitatorio que está compuesto de fibras conductoras y excitatorias[19]. En un estado de reposo el complejo de troponina y tropomiosina previene la interacción de la miosina con los filamentos de actina. En respuesta a la propagación del potencial de activación los mecanismos de excitación-contracción causan incrementos en la concentración de Ca^{+2} intracelular, la desaparición de la barrera de tropomiosina y permiten el acoplamiento de la miosina y la actina acortando los sarcómeros[20]; todo esto en la presencia de trifosfato de adenosina. Este mecanismo es posible debido a la particular membrana plasmática de las células, el sarcolema, el sistema tubular transversal, el retículo sarcoplásmico, numerosas proteínas, canales iónicos, y proteínas reguladoras; todas estas trabajan en conjunto de manera coordinada a iniciativa del potencial de activación, que se produce de manera independiente del sistema nervioso, que dispara este complejo mecanismo cuyo fin es la contracción de los cardiomiocitos.

2.2.2 Ultraestructura del corazón

Un cardiomiocito latiendo por sí solo hace poco para la generación de las fuerzas requeridas para el bombeo de la sangre por el cuerpo, para esto es necesario un esfuerzo coordinado, por lo tanto, los cardiomiocitos están organizados en múltiples capas entrelazadas que están conectadas a las células vecinas por unos discos intercalares, entre los cardiomiocitos, son exclusivos del músculo cardíaco (Figura 2.1 a)[16]. En los discos de intercalación las células están acopladas por

desmosomas, uniones fascia adherens, y uniones comunicantes[21]. Todos estos diferentes tipos de conexiones (físicas, químicas, y mecánicas) permiten el comportamiento de los cardiomiocitos como una estructura sincronizada funcional que se contrae y expande eficientemente con fuerza suficiente para bombear sangre de las cavidades cardiacas. Los fibroblastos cardiacos son el tipo de célula más numeroso en el miocardio, juegan un papel central en la regulación de la organización y función tisular, están organizados de manera adyacente a grupos de miocitos desde donde interactúan con otros fibroblastos, miocitos, y las macromoléculas de la matriz extracelular (Figura 2.1 b)[22]. Estas células utilizan uniones comunicantes para conectarse, y enviar señales, a los cardiomiocitos y otras células adyacentes[22]. Sin embargo, su papel más importante es la regulación de la estructura y función de la matriz extracelular a través de la deposición de macromoléculas y la secreción de enzimas que las degradan. La matriz extracelular actúa como soporte mecánico para los tejidos y transmite la información del ambiente extracelular para regular la función y forma de las células. Los fibroblastos sintetizan y depositan la mayoría de la matriz extracelular incluidos los colágenos fibrilares tipo I y III, elastina, laminina, fibronectina, y glicosaminoglicanos[15, 23, 24]. La remodelación y regeneración de la matriz extracelular se ejecuta por medio de las metaloproteinasas secretadas por los fibroblastos. Varios factores de crecimiento, citoquinas, y otras moléculas bioactivas también son producidas por estas células, lo cual resalta su papel regulatorio[25]. Algunas investigaciones sugieren que estas células jugarán un papel importante en el desarrollo de tejidos cardiacos *in vitro*.

2.2.3 Organización y función de la matriz extracelular

La matriz extracelular del miocardio esta conformada por tres grupos: el endomisio, que rodea cada célula individualmente; el perimisio que envuelve grupos de miocitos, y el epimisio que rodea el músculo entero[26]. La matriz extracelular esta constituida por una red de fibrillas de colágeno, membranas basales, fibras elásticas, proteoglicanos y otras señales moleculares bioactivas (Figura 2.2 a)[27]. Hay una relación directa entre la organización específica de la

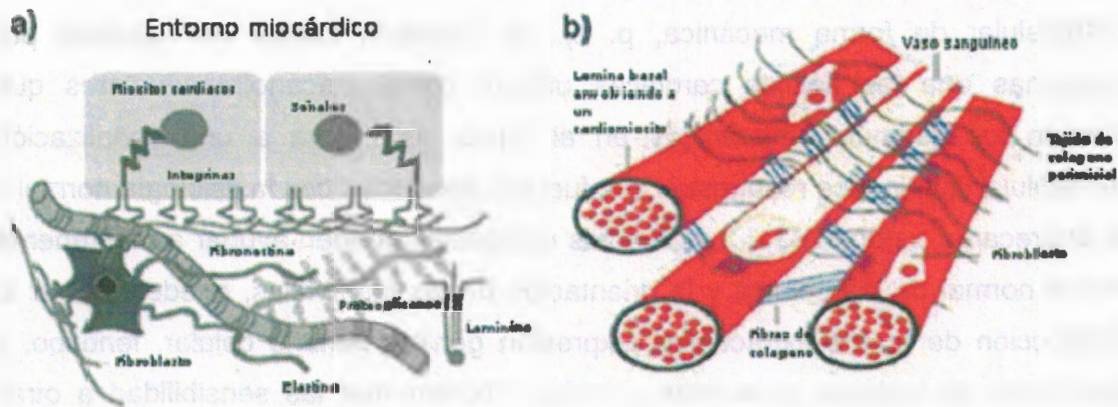


Figura 2.2 Matriz extracelular cardíaca: a) componentes, y b) organización del endomisio y perimisio[14].

matriz extracelular, sus capas, y la función tisular apropiada ya que hay una dependencia entre esta y las señales moleculares adecuadas, tanto en la función normal como la patológica. El endomisio contiene la lámina basal que coordina la acción de los cardiomiocitos y el colágeno fibrilar que forma las conexiones celulares laterales (Figura 2.2 b). La difusión de oxígeno y nutrientes, alineación de miocitos, adhesión celular, y la corta distancia entre vasos sanguíneos se deben al endomisio[28]. La red fibrilar de colágeno que se encarga de unir la lámina basal del endomisio y las fibras grandes de colágeno del epimisio se llama perimisio. Las fibras grandes del epimisio están organizadas de manera paralela a las miofibrillas protegiendo los sarcómeros del sobreestiramiento durante la relajación[26]. Además, esta organización permite que las fuerzas sean transmitidas a través de la capa de tejido durante la contracción y auxilia en la elasticidad del tejido al jalar sobre los cardiomiocitos durante la relajación. La muy particular organización de endomisio, perimisio, y epimisio le proporciona al miocardio la integridad mecánica necesaria para el ciclo dinámico del corazón. La matriz extracelular, aparte de la función estructural y organizacional, provee guías microestructurales para diferenciar cardiomiocitos que regulan el autoensamblaje de los sarcómeros y guían la formación de nuevas miofibrillas[29] y controla la rapidez de maduración de los cardiomiocitos neonatales[30]. Muchas de las señales viajan en la matriz

extracelular de forma mecánica, p. ej., la adhesión celular es regulada por integrinas que las células cardiacas utilizan como mecanotransductores que sienten los estímulos mecánicos en el tejido, esto lleva a una señalización intracelular que induce respuestas a esfuerzos asociadas con la fisiología normal y la sobrecarga patógena[31]. Las fuerzas mecánicas pueden ayudar a mantener la forma normal de las células y la orientación de las miofibrillas, pueden alterar la producción de matriz extracelular, expresión génica, tamaño celular, fenotipo, y expresión de factores paracrinos e incluso incrementar la sensibilidad a otras señales moleculares y aumentar los contactos célula - célula que son importantes para las propiedades eléctricas y mecánicas del tejido[32-36]. De toda esta información podemos concluir que la matriz extracelular es mucho más que un componente pasivo del miocardio mostrándose como una estructura dinámica, funcional y reguladora del tejido.

2.3 Respuesta regenerativa del corazón al infarto al miocardio

La cantidad de oxígeno requerida para la contracción muscular es alta, por lo tanto el tejido cardíaco tiene una alta demanda de este, si esta cantidad es reducida el tejido tiende a la isquemia, para prevenir esto las células cardiacas se encuentran localizadas cerca de vasos sanguíneos derivados de la arteria coronaria. Las enfermedades de la arteria coronaria se refieren a la degeneración de la circulación en este circuito y resultan en una reducción del flujo sanguíneo a los tejidos[37]. En casos severos de oclusión se da la necrosis del miocardio, y después de esto se presentan ciertas fases que caracterizan el sistema regenerativo del corazón: la muerte de los cardiomiocitos, inflamación aguda, y formación de tejido granular, remodelación ventricular, y por último, la formación de tejido cicatrizado (reparación fibrótica)[38]. Los fibroblastos y miofibroblastos, locales y reclutados, sintetizan y depositan colágenos tipo I, III y V que dan como resultado una respuesta adaptativa que mantiene la integridad estructural del ventrículo pero la reemplaza con una cicatriz no contráctil[39]. La fibrosis reactiva, que se presenta cuando no hay pérdida celular alrededor del área dañada, ocurre en paralelo a la fibrosis reparativa y conlleva a un mayor endurecimiento del

miocardio, arritmia y función sistólica reducida[36, 39]. La reacción del corazón al miocardio dañado es una respuesta de reparación caracterizada por una pérdida de función contráctil y fibrosis del miocardio. La herida inicial y los efectos secundarios de la respuesta regenerativa conllevan hacia una pérdida de la función celular y de la matriz extracelular, los cuales eventualmente desembocan en la falla cardíaca.

2.4 Ingeniería de tejidos cardíacos

El infarto al miocardio (IM) es una de las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo industrializado, la gente que sobrevive el IM lo hace con un corazón debilitado por una cicatriz que no se contrae por impedimentos mecánicos. Esta condición se conoce como insuficiencia cardíaca y es una enfermedad progresiva que eventualmente produce la muerte. En los EUA 5.3 millones de personas sufren de esta enfermedad y fue anotada como la causa de muerte de 277,193 personas, y también como una causa asociada en 56,565 muertes en el 2007[4]. Esto ha sido tratado de muchas maneras diferentes: a) con agentes farmacológicos tales como agentes trombolíticos, antitrombóticos, nitratos, betabloqueadores, bloqueadores del canal de Ca^{+2} , estatinas, antagonistas de adenoreceptores que son utilizados para incrementar el flujo de sangre, limitar el remodelado ventricular, e incrementar la función cardíaca[40], b) con dispositivos de asistencia ventricular, en este tratamiento lo que se logra es reducir la carga de trabajo del órgano, lo cual resulta en una reversión del remodelado ventricular[41]; c) terapias celulares, las cuales han tomado diferentes acercamientos a lo largo de los últimos 15 años. La idea básica es inyectar células directamente a la zona del infarto y esperar que estas se integraran en el tejido cicatrizado aumentando la vascularización y la función tisular. Se favoreció el uso de mioblastos esqueléticos, cardiomiocitos neonatales y fetales debido a que se les considero células similares a las que se necesitaba reemplazar o que al menos podrían diferenciarse en estas. Sin embargo, los reportes muestran que la integración celular fue baja y que las células que se integraron no estaban sincronizadas con el resto del tejido[42-54]. Ha habido esfuerzos más recientes

utilizando células madre embrionarias y mesenquimales, las cuales se ha comprobado que pueden diferenciarse en cardiomiocitos[55-62]. Desafortunadamente el éxito en el tratamiento del IM y otras enfermedades cardíacas ha producido un aumento en la prevalencia de la insuficiencia cardíaca crónica, trayendo como consecuencia una urgencia de hallar tratamientos eficaces para esta. Uno de los tratamientos más promisorios es la ingeniería de tejidos cardíacos (ITC), esta consiste en utilizar biomateriales en combinación con células y/o varios agentes moleculares hacia el desarrollo de estructuras de tejido viables que permitan la regeneración del miocardio. El objetivo es implantar un material que, durante un período de tiempo limitado, sirva de sustituto de la matriz extracelular perdida mientras la estructura se regenera en tejido sano nuevo[63-67]. Para lograr esto el material necesita ser capaz de trabajar como un refuerzo mecánico, al inicio, y degradarse sin causar una respuesta inflamatoria aguda[68-70]. En el caso de la ingeniería de tejidos mecánicamente demandantes, como el miocardio, se requiere de materiales que soporten la fatiga, sean degradables, con propiedades mecánicas ajustables y un comportamiento elastomérico; para que conforme el material se degrade el nuevo tejido pueda infiltrarse y repoblar la zona herida.

2.4.1 Ingeniería de tejidos cardíacos utilizando andamios tridimensionales

Los biomateriales han sido utilizados, de manera tradicional, como un sustituto de la matriz extracelular la cual provee un ambiente favorable para la recuperación del tejido. Estos andamios deben tener las propiedades mecánicas, químicas y físicas adecuadas para fomentar la adhesión celular, proliferación, diferenciación, organización y vascularización *in vivo*, integración con tejido hospedero, y el remplazo gradual del andamio por matriz extracelular nueva mientras este se degrada. Los biomateriales utilizados para fabricar andamios deben presentar baja toxicidad y respuesta inmunológica, y productos de degradación que cumplan con esto. Uno de los enfoques que se persigue en ingeniería de tejidos cardíacos es crear un parche *in vitro* que pueda ser implantado posteriormente funcionando como un refuerzo mecánico y un vehículo celular. Hay cuatro componentes que

son clave para el éxito: 1) el biomaterial elegido, 2) la técnica de fabricación del andamio, 3) el tipo de células, y 4) los métodos de sembrado y cultivo. La idea es que al combinar los avances en estas cuatro áreas podamos establecer un andamio y método de formación tisular que lleven a una regeneración exitosa del miocardio. En una sección posterior se encuentra una revisión de las dos áreas más importantes para esta tesis, los biomateriales y células utilizados previamente en ingeniería de tejidos cardiacos.

2.4.2 *Biomateriales para ingeniería de tejidos cardiacos*

La selección del material es un componente crítico del éxito de la ingeniería de tejidos cardiacos. El primer requisito que debemos buscar es que las propiedades fisicoquímicas promuevan la adhesión, proliferación, y de ser deseable la diferenciación celular. Para buscar estos materiales, tradicionalmente, se ha mirado a los biomateriales derivados de la naturaleza como colágeno, gelatina, fibrina, ácido hialurónico, alginato, y matriz extracelular desnaturalizada. Los otros materiales que se han utilizado son polímeros sintéticos como los poliésteres, polilactonas, poliuretanos, y/o mezclas de estos[71]. El Cuadro 2-1 remarca algunos biomateriales y la forma en que han sido utilizados en ingeniería de tejidos cardiacos. El biomaterial ideal para este fin aún no ha sido identificado, sin embargo ya se han establecido algunas pautas para la selección de materiales.

2.4.3 *Biomateriales naturales*

La ventaja de estos materiales es que son componentes naturales de la matriz extracelular e idealmente deben contener de manera inherente señales moleculares que promuevan la adhesión, proliferación, y diferenciación celular. El alginato y el colágeno han sido utilizados por varios grupos de investigación para demostrar que se puede cultivar un gran número de células cardiacas con un espaciamiento uniforme, que estas empiezan a latir de manera espontanea, y además generan fuerzas al latir en preformas de estos materiales[72-75]. Otros estudios *in vivo* han demostrado la factibilidad de trasplantar estas estructuras a un miocardio infartado manteniendo la viabilidad celular y neovascularización. En un estudio Li *et al* (1999) sembraron cardiomiocitos fetales de rata en mallas de

gelatina biodegradable para formar estructuras que latían y fueron implantadas en corazones crio-dañados. Estas estructuras mantuvieron células viables durante al menos 5 semanas y se observó el crecimiento de vasos capilares y se pudo apreciar una integración con las células hospederas[76]. Leor *et al*(2000) obtuvieron estructuras de células fetales y andamios de alginato que mostraban neovascularización al trasplantarlas al corazón de una rata infartada[77]; este estudio también halló indicios de que el parche atenuaba la remodelación ventricular e insuficiencia cardiaca. Aun cuando estos estudios iniciales dejaron claro el potencial de los materiales naturales queda claro que su uso está limitado por el bajo control de las propiedades mecánicas, tiempos de degradación, variación lote a lote y baja escalabilidad[78].

2.4.4 Biomateriales sintéticos

Los biomateriales sintéticos ofrecen un mejor control sobre sus propiedades físicas, químicas, mecánicas y de degradación. Lo que es aun más importante, estos materiales pueden ser combinados con proteínas de la matriz extracelular o incorporar desde su obtención secuencias de péptidos específicas que les confieran funcionalidades biológicas únicas. Esto nos permite concluir que todos aquellos beneficios que alguna vez estuvieron disponibles únicamente a través de los materiales naturales serán pronto alcanzados con polímeros biomiméticos que cumplirán con varios de los requerimientos para ser utilizados como materiales de ingeniería de tejidos cardiacos. Los rápidos avances en este campo harán esto una realidad en poco tiempo permitiendo así alcanzar este objetivo.

2.4.5 Polímeros tradicionales utilizados en ingeniería de tejidos

Algunos de los polímeros utilizados de manera rutinaria en ingeniería de tejidos incluyen los poliésteres como el poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), y su copolímero el poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA). Estos polímeros han sido aplicados en ingeniería de tejidos cardiacos y se ha tenido algún éxito en generar estructuras tisulares *in vitro* con ellos. Bursac *et al*[79] sembraron células primarias de ventrículo de rata neonatal en andamios porosos de PGA y cultivaron estas estructuras en bioreactores por 1 semana. Las muestras formaron una

Cuadro 2-1 Resumen de algunos biomateriales utilizados en ingeniería de tejidos cardiacos[71].

| Biomaterial | Estado Físico | Enfoque de Ingeniería de Tejidos |
|---|------------------------|--|
| <i>Naturales</i> | | |
| Colágeno | Gel o malla porosa 3-D | Parche cardiaco epicardial y tejido cultivado 3D |
| Fibrina | Gel inyectable | Parche cardiaco endoventricular |
| Nanofibra de péptidos | Gel inyectable | Parche cardiaco endoventricular |
| Colágeno – glicosaminoglicanos | Malla porosa 3-D | Tejido 3-D cultivado |
| Malla de gelatina | Malla porosa 3-D | Tejido 3-D cultivado |
| Malla de alginato | Malla porosa 3-D | Tejido 3-D cultivado |
| <i>Sintéticos biodegradables</i> | | |
| Poli(ácido láctico) | Malla porosa 3-D | Tejido 3-D cultivado |
| Poli(ácido glicólico) y sus copolímeros con poli(ácido láctico) | Malla porosa 3-D | Tejido 3-D cultivado |
| Policaprolactona y su copolímero con poli(ácido láctico) | Malla porosa 3-D | Tejido 3-D cultivado |
| Poli(glicerol sebacato) | Malla porosa 3-D | Parche cardiaco epicardial y tejido cultivado 3D |
| Poliuretanos segmentados | Malla porosa 3-D | Parche cardiaco epicardial y tejido cultivado 3D |
| <i>Sintéticos no-biodegradables</i> | | |
| Poli(etileno tereftalato) | Malla tejida | Restricción al ventrículo izquierdo & Trasplante de tejido |
| Polipropileno | Película solida | Restricción al ventrículo izquierdo |
| Poli(tetrafluoretileno) con o sin poli(ácido láctico) y/o poli(ácido glicólico) | Película solida | Tratamiento de defecto congénito & Trasplante de tejido |
| Poli(N-isopropilo acrilamida) | Película solida | Ingeniería de películas celulares libres de andamios. |

región periférica de 50 a 70 μm de ancho que asemejaba una morfología tisular y contenía cardiomiocitos organizados en múltiples capas en configuración tridimensional. Asimismo el tejido obtenido tenía propiedades eléctricas homogéneas y propagaba impulsos de manera continua por lo que se le consideró un buen modelo para estudios electrofisiológicos. En un estudio de seguimiento se encontró que al recubrir el PGA con laminina se mejoraba las propiedades moleculares, estructurales, y electrofisiológicas del tejido logrando acercarse a las del tejido ventricular nativo[80]. Sin embargo, se ha comprobado que el uso de estos polímeros *in vivo* tiene productos de degradación ácidos que pueden afectar la viabilidad celular y producir respuesta inflamatoria aguda después del

implante[81]. Una vez iniciada la degradación la integridad mecánica de estos poliésteres se pierde rápidamente y no brinda el tiempo suficiente para que el tejido reconstruya la estructura necesaria por si mismo[78]. Sumado a esto se encuentra el hecho de que estos polímeros son rígidos y no poseen propiedades mecánicas adecuadas para la ingeniería de tejidos cardiacos. Como resultado de la problemática asociada al PGA, PLA y PLGA se ha desarrollado otros polímeros sintéticos que prometen ser una mejor opción.

2.4.6 Biomateriales elastoméricos

La naturaleza dinámica del ambiente cardiaco requiere el uso de biomateriales que sean suaves, flexibles, y que pueden soportar las fuerzas repetitivas asociadas con el ciclo cardiaco sin perder su integridad mecánica. Aun más, las señales mecánicas juegan un papel clave en el desarrollo del tejido cardiaco normal y necesitan de polímeros que tengan las propiedades mecánicas adecuadas para promover la mecanotransducción entre las células y el ambiente cardiaco o cardio-simulado[31]. Un estudio hecho por Engler *et al* sugiere que la elasticidad de la superficie utilizada para cultivar los cardiomiocitos juega un papel determinante en la organización del citoesqueleto y en la permanencia del fenotipo contráctil[82]. En este estudio, el cual utilizó geles de acrilamida entrecruzados, Engler demostró que las matrices en las cuales se mimetizaba el modulo elástico del microambiente miocárdico ($E \sim 10-15$ kPa) producían mejores resultados en la transmisión de fuerzas, formación de miofibrillas y en mantener las contracciones. En el caso de cardiomiocitos cultivados en matrices rígidas que mimetizaban el tejido cicatrizado post-infarto ($E \sim 35-70$ kPa) se observó que se sobrecargaban, carecían de apariencia estriada y dejaban de palpitar después de unos días en cultivo. Estas mismas células en matrices suaves ($E \sim 1$ kPa) son capaces de mantener la palpitación pero no producen las fuerza necesarias para su funcionamiento adecuado. Engler demostró, en este trabajo, que hay una relación entre el modulo elástico de los materiales, la estructura y la función de los cardiomiocitos. Asimismo, sugirió que entender las propiedades mecánicas del miocardio nativo puede ayudar a establecer los parámetros adecuados para el

desarrollo de biomateriales de ingeniería de tejidos cardiacos. Con este fin se ha medido el esfuerzo último tensil (σ), bajo cargas estáticas, de músculo cardiaco humano de la capa media del miocardio ventricular. Los valores obtenidos fueron de 115 mN/mm² (115kPa) con un 66% de elongación máxima en la dirección paralela a la contracción y aproximadamente 38 kPa y 86% de elongación en la dirección transversal[83]. El modulo de Young estuvo entre 20 y 500 kPa[83, 84]. Adicionalmente, un corazón normal en descanso palpita unas 75 veces por minuto con un esfuerzo de ~60 kPa durante ~0.3 segundos por latido[5, 85]. Tomando todo lo anterior, las propiedades mecánicas de los biomateriales deben tratar de mimetizar las del miocardio. La importancia de materiales suaves, flexibles y elásticos sugiere que los biomateriales elastoméricos pueden ser apropiados para su utilización en el corazón. Varios materiales han sido desarrollados con propiedades mecánicas elastoméricas que parecen ser útiles en ingeniería de tejidos cardiacos como los poliésteres biodegradables, poliuretanos segmentados, polihidroxialcanoatos, y algunos materiales compuestos[84, 86-94]. Chen et al[84] sintetizaron poli(glicerol sebacato) (PGS) a diferentes temperaturas obteniendo materiales elastoméricos biocompatibles y degradables que mimetizan las propiedades mecánicas del miocardio con módulos elásticos desde 0.056 a 1.2 MPa. De manera similar Borenstein et al[95] utilizaron PGS para crear andamios con forma de panal de abeja que mimetizaban de manera cercana las propiedades mecánicas del ventriculo derecho de ratas adultas y cultivaron células cardiacas en ellos. Park et al[96] desarrollaron materiales compuestos elastoméricos hechos de PLGA/colágeno tipo I y posteriormente los sembraron con células cardiacas neonatales. Aun cuando las propiedades mecánicas del andamio no fueron estudiadas hubo un marcado aumento de la expresión de marcadores cardiacos y de la función contráctil al compararlos con controles de colágeno I y PLGA solos. Los autores atribuyeron esta mejora de la función contráctil a las propiedades mecánicas elásticas del material compuesto, las cuales mejoraron la mecanotransducción y formación de acoplamientos electromecánicos[96]. La rigidez del PLGA impidió la palpitación de la estructura a pesar de la adhesión

celular y expresión de marcadores cardiacos. Esta afirmación fue posible ya que las propiedades mecánicas de los materiales eran conocidas y la estructura de los andamios era similar. McDevitt *et al*[11, 12] utilizaron películas de poliuretanos segmentados (PU) compuestos de policaprolactona, un diisocianato basado en lisina y un extensor de cadena basado en fenilalanina para cultivar cardiomiocitos de rata neonatal y demostraron que las células mantienen su fenotipo y función contráctil. Este polímero tiene un módulo mucho más alto que el miocardio (~50 MPa a temperatura ambiente), sin embargo, se sugirió que la elasticidad puede haber contribuido a mantener la fisiología y función celular normales. Más recientemente, este mismo poliuretano fue utilizado en forma de películas y andamios para cultivar células cardiacas primarias y cardiomiocitos derivados de células embrionarias con resultados positivos[20, 97, 98]. El grupo de Wagner (2005) ha desarrollado series de poliuretanos elastoméricos segmentados utilizando segmentos suaves de policaprolactona-polióxido de etileno-policaprolactona, 1, 4-butanodiisocianato, y putrescina o péptidos como extensores de cadena[86, 90, 99-103]. Este grupo demostró que los poliuretanos tienen las propiedades mecánicas y la biocompatibilidad adecuadas para su uso en el corazón; incluso se demostró que al implantarlos mejoraron la función cardiaca de ratas infartadas[65, 104]. Una de las ventajas de utilizar poliuretanos segmentados es la flexibilidad en la química utilizada para sintetizar estos polímeros la cual permite ajustar las propiedades mecánicas y rapidez de degradación e incorporar fracciones que permitan transformarlos en materiales biomiméticos. Estos materiales promueven la mecanotransducción en tejidos construidos, ayudan a prevenir el desprendimiento celular, pueden contribuir en la transmisión de fuerzas durante la contracción y contribuir en la recuperación posterior. Como resultado, los biomateriales elastoméricos van a jugar un papel muy importante en ingeniería de tejidos cardiacos.

2.4.7 Células para ingeniería de tejidos cardiacos

La incertidumbre de una fuente confiable de nuevos cardiomiocitos es una de las limitaciones de la ingeniería de tejidos cardiacos. Los diversos tipos de células

utilizados en cardiomioplastía, que han demostrado potencial en regeneración cardiaca, tal vez presenten el mismo o mayor potencial al ser combinados con los biomateriales que aumentarán su supervivencia, el área disponible para adhesión y otros beneficios asociados con los biomateriales directamente. Aun así, la mayoría de los estudios en el área de ingeniería de tejidos cardiacos han sido llevados a cabo con células cardiacas primarias con el fin de demostrar el potencial de las diferentes técnicas y parámetros necesarios para desarrollar tejido de miocardio *in vitro* (Cuadro 2-2). En la terapia celular cardiaca, que ha tomado diferentes enfoques a lo largo de los últimos 15 años, la idea original fue inyectar células directo en la zona del infarto y permitir su integración al tejido ayudando a la regeneración. El uso de mioblastos esqueléticos, cardiomiocitos neonatales y fetales fue preferido porque estas células ya estaban comprometidas con el fenotipo adecuado o podían diferenciarse en él. Sin embargo, los reportes muestran que la integración celular fue baja y que las células, que se integraron, no estaban sincronizadas con el resto del tejido[42-54]. Ha habido esfuerzos más recientes utilizando células madre embrionarias y mesenquimales, las cuales se ha comprobado que pueden diferenciarse en cardiomiocitos[55-62]. En un estudio más reciente Chi *et al* utilizaron parches constituidos de células madre derivadas de medula ósea (BMSC), seda (S) y ácido hialurónico (H). Después de obtener los parches *in vitro* se les implantó en 45 ratas en cuatro grupos: control, infarto por daño criogénico, SH y BMSC/SH. Después de ocho semanas los parches de SH y BMSC/SH se encontraban intactos, bien adheridos a las zonas del infarto y con nula o baja respuesta inmune respectivamente. El grupo de parche de SH demostró ser eficaz en la regeneración de zonas infartadas, y el grupo de BMSC/SH mejoró significativamente la pared del ventrículo izquierdo, aumentó la supervivencia de las células madre mesenquimales, redujo su apoptosis, promovió la neo-vascularización y estimuló la secreción de factores paracrinos, p. ej. factor de crecimiento vascular y endotelial (VEGF por sus siglas en ingles)[105]. Recientemente un nuevo tipo de célula ha sido aislado y parece representar una fuente confiable de células para ingeniería de tejidos cardiacos[106]. Estas células

son progenitores cardiacos aislados de cardioesferas obtenidas de corazones de ratones infartados. Estas células, al ser cultivadas, pueden representar una fuente de células cardiacas para ser utilizadas en parches cardiacos. Son especialmente importantes ya que representan una buena opción en relación a las células madre embrionarias, las células madre inducidas, y las células madre mesenquimales. En el caso de las primeras dos aun hay algunos problemas éticos y de seguridad que pueden mantener a estas células fuera de la terapia clínica por años (excepto en el estado de California en los USA)[107, 108]. Por otro lado, las células madre mesenquimales han sido utilizadas en el pasado para terapia celular cardiaca y se encontró efectos positivos. La hipótesis actual es que estas células solamente presentaron efectos paracrinos, p. ej. segregación de factores angiogénicos, y realmente no se integraron o diferenciaron en el tejido a sanar[109-112]. En contraste, los progenitores cardiacos han sido identificados como las células responsables de la homeostasis normal del corazón y también se ha demostrado su capacidad de diferenciarse en cardiomiocitos tanto *in vivo* como *in vitro* utilizando diferentes protocolos[110, 113-121]. Asimismo ha habido estudios que demuestran su habilidad para transformarse en células endoteliales cardiacas[122-124].

2.5 Células madre

Las células de los tejidos adultos se encuentran diferenciadas, permanecen de esa manera y eventualmente pierden su capacidad de proliferación[125, 126]. En contraste, las células madre son capaces de dividirse de manera repetitiva y producir células idénticas a ellas (autorenovación) o diferenciarse hacia un tipo celular especializado (diferenciación)[127]. Existen diferentes tipos de células madre y se les clasifica según su potencialidad: totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales. Las células totipotenciales son aquellas capaces de diferenciarse en cualquier tipo de célula del embrión o tejidos extra-embrionarios. Las pluripotenciales son aquellas que pueden dar lugar a todos los tipos de células en el embrión (sin incluir tejidos extra-embrionarios). Tanto las células madre embrionarias, como las epiteliales amnióticas son pluripotenciales.

Cuadro 2-2 Tipos de células utilizadas en regeneración cardíaca[71].

| Fuente de Células | Autó logo | Fácil de obtener | Altamente expandibles | Miogénesis cardíaca | Eval. clínica | Problemas de Seguridad |
|---|-----------|------------------|-----------------------|---------------------|---------------|---|
| Células Primarias | | | | | | |
| Cardiomiocitos fetales | No | No | No | Si | No | No |
| Mioblastos esqueléticos | Si | Si | Depende de la edad | No | Si | Si, se observó arritmias |
| Células de músculo liso | Si | Si | Si | No | No | No |
| Fibroblastos | Si | Si | Si | No | No | No |
| Células Troncales y Progenitoras | | | | | | |
| Células madre mesenquimales | Si | No | Depende de la edad | Debatido | No | Si, fibrosis y calcificación después de la implantación |
| Células progenitoras endoteliales | Si | Si | Depende de la edad | Debatido | No | Si, calcificación después de la implantación |
| Células de medula ósea | Si | Si | Depende de la edad | Debatido | Si | Si, calcificación después de la implantación |
| Células del cordón umbilical | No | Si | Si | Debatido | No | No |
| Células madre hematopoyéticas | Si | Si | Si | Debatido | No | Si |
| Células madre embrionarias | No | No | Si | Si | No | Si, teratomas generados por las células |

Las células multipotenciales ya no poseen la capacidad de diferenciarse en cada tipo de célula pero mantienen la habilidad de diferenciarse en varios tipos de células. Las células fetales, del cordón umbilical y las células madre específicas a un tejido, como las mesenquimales y hematopoyéticas, son de esta categoría. En el caso de las células unipotenciales estas solamente pueden diferenciarse en un tipo de célula específico, p. ej. las células que dan lugar a los espermatozoides[127, 128].

2.5.1 Células madre adultas

En tejidos que se regeneran constantemente, p. ej. células sanguíneas, las células diferenciadas eventualmente se agotan y, dado que las células diferenciadas no pueden dividirse, son reemplazadas con células derivadas de células progenitoras. Estas, las progenitoras, son descendientes de células madre adultas multipotentes

que se autorenewan y continuamente proveen de células nuevas al tejido[125, 126, 129]. La mayoría de las células madres adultas se encuentran en estado durmiente, no se dividen de manera regular, lo cual protege la integridad de su genoma y previene la senescencia por replicación[130]. En cambio otras, como las células madres que producen el epitelio intestinal, se reproducen de manera muy activa[131]. De cualquier forma, estas células madre adultas aseguran un suministro de células diferenciadas para toda la vida[132]. Las células madre adultas se dividen de manera asimétrica, lo cual implica que sus descendientes pueden permanecer como células madre o diferenciarse[132, 133]. Hay dos vías para esta división asimétrica, la primera es la división asimétrica al nivel de una sola célula en la cual factores citosólicos o ambientales determinan el destino de cada célula hija. La otra posibilidad es la división asimétrica al nivel de un grupo de células, en este caso algunas de las células se renuevan y otras se diferencian para obtener el número necesario de células terminales[133]. Se ha identificado y aislado varios tipos de células madre adultas, por ejemplo, las células madre derivadas de médula ósea que pueden dar lugar a hueso, cartílago, y músculo; otro ejemplo son las células madre hematopoyéticas que son capaces de formar todos los tipos de células sanguíneas (linfoides y mieloides)

2.5.2 Células madre adultas para regeneración miocárdica

Para lograr un efecto benéfico a largo plazo, regeneración cardíaca real, parece preciso el sustituir los cardiomiocitos dañados con el fin de recuperar la función contráctil normal y evitar arritmias. Otro requisito para esta regeneración es la integración celular del tejido hospedero de manera eléctrica y mecánica[134]. Las posibilidades de utilizar células madre adultas esta siendo explorada ya que pueden ser utilizadas para obtener cardiomiocitos funcionales que puedan repoblar el miocardio dañado. Tanto los progenitores cardíacos como no cardíacos están siendo investigados actualmente con este fin.

2.5.2.1 Progenitores no-cardíacos

Se ha demostrado que las células madre derivadas de la médula ósea, como las mesenquimales y hematopoyéticas, que son relativamente fáciles de obtener por

métodos no invasivos se pueden diferenciar *in vitro* a cardiomiocitos si se les añade el factor transformador de crecimiento beta (TGF- β , por sus siglas en ingles)[135] o si se les trasplanta al miocardio[60]. Este es un tema debatido ya que otros estudios aseguran que estas células derivadas de la médula ósea no pueden transdiferenciarse[136], sino que en realidad se funden con otras células adoptando las funcionalidades de estas. Algunas pruebas clínicas realizadas en pacientes, que sufrieron infarto al miocardio, mostraron un efecto positivo al trasplantar células madre derivadas de medula ósea, sin embargo, estos resultados no fueron concluyentes[137, 138]. La hipótesis actual sobre el efecto de estas células es la misma que se tiene con respecto a los cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias, en donde el beneficio no proviene de la integración de esta células y su efecto en la contractilidad, sino más bien de un efecto paracrino por el cual estas células secretan factores que estimulan la supervivencia de los cardiomiocitos y la formación de vasos capilares[107, 108, 139]. Como se ha mencionado antes, estos mecanismos necesitan ser mejor explorados para obtener conocimiento sobre los factores que son responsables de la supervivencia de los cardiomiocitos endógenos, ya que estos factores podrían ser aplicados en tratamientos celulares después de un infarto. Este tipo de tratamiento pasaría del uso de células madre, y por lo tanto evitaría el riesgo de formación de tejido no deseado, p. ej. cartílago[129, 134].

2.5.2.2 Progenitores de los cardiomiocitos

Se creía que el corazón adulto no poseía células capaces de dividirse[132], pero varios estudios han identificado células progenitoras cardiacas (CPC) en el corazón adulto[140-142]. En un estudio reciente[143], se identificó y aisló CPC de aurículas de corazones fetales y adultos utilizando marcadores cardiacos como CD31, CD105, c-kit, Sca-1, Isl-1, y los factores de transcripción GATA-4, Nkx2.5, y Mef2C que indican compromiso con la línea cardiaca. Antes de que estos CPC fueran identificados, solamente las células madre embrionarias habían demostrado diferenciarse en cardiomiocitos, pero es probable que estos CPC sean capaces de diferenciarse en una población homogénea de cardiomiocitos

funcionales. Incluso se ha demostrado que son capaces de diferenciarse en células endoteliales también, lo cual enfatizó su potencial de diferenciación[143, 144]. A diferencia de otros CPC identificados previamente estos no necesitaron ser cocultivados con cardiomiocitos neonatales, sino que se les pudo estimular con factores solubles como azacitidina, que desmetila el DNA, ácido ascórbico, y varios factores de crecimiento, siendo el más importante el TGF- β que es un factor de crecimiento involucrado en múltiples procesos, incluida la diferenciación cardíaca. Por lo tanto, este es posiblemente el factor de crecimiento que secretan los cardiomiocitos neonatales e induce la diferenciación al realizar cocultivos con las CPC. Cuando se estimuló a los CPC con TGF- β , las células se diferenciaron de manera espontánea a cardiomiocitos pulsátiles con las características de un cardiomiocito maduro. Esta diferenciación inducida por el TGF- β produjo grandes y homogéneas poblaciones de cardiomiocitos. Por lo tanto, estos CPC pueden ser utilizados como una fuente directa para producir cardiomiocitos funcionales, ya sea para terapias celulares o para ensayos fisiológicos, farmacéuticos y toxicológicos[144].

2.5.3 Aplicaciones terapéuticas de células progenitoras cardíacas

La terapia celular para el miocardio parece depender, en gran medida, de la producción de suficientes cardiomiocitos con las propiedades adecuadas para integrarse al tejido huésped[128, 134, 143]. Para lograr esto se necesita encontrar fuentes adecuadas para la producción de cardiomiocitos funcionales, las CPC descritas arriba son una buena opción aun cuando solo es posible obtenerlas por cirugía invasiva del corazón[143, 144]. Las CPC o su progenie diferenciada podrían ser expandidos *in vitro* antes de ser administrados, ya sea por inyección intravascular, inyección al miocardio o por medio de un catéter al paciente[128, 134]. Algunos experimentos han demostrado que la administración de las células es complicada ya que las células suelen ser expulsadas por la presión que genera el corazón al latir y después mueren rápidamente. Para mejorar esta situación los cardiomiocitos podrían cultivarse *in vitro* para formar pequeñas estructuras que puedan ser unidas al miocardio[144]. Una vez en el miocardio, es importante que

las células se integren mecánica y funcionalmente para poder coadyuvar en la contracción del miocardio dañado, las uniones comunicantes en este sentido ya que permiten el acoplamiento eléctrico de los cardiomiocitos. Se ha sugerido que la expresión de conexina 43, que juega un papel importante en el desarrollo del corazón y en particular de las uniones comunicantes, mejora el acoplamiento eléctrico entre células musculares y podría, por lo dicho, ser utilizado en la obtención de cardiomiocitos funcionales a partir de sus progenitores[145].

Como se mencionó antes, otro de los enfoques para la terapia cardíaca basada en células es crecer tejido miocárdico *in vitro* y trasplantarlo como un “parche cardíaco” al corazón. En roedores ya es posible la ingeniería, trasplante y vascularización de tejido contráctil, sin embargo, en humanos aun es necesaria más investigación[129]. Se ha sugerido que el tejido creado sea enrollado, haciéndolo suficientemente pequeño para inyectar, y desenrollado en el sitio de trasplante a temperatura ambiente[146]. Incluso se podría recubrir estas estructuras con CPC que pudieran ser capaces de diferenciarse de manera guiada al ser trasplantados al miocardio[146]. En paralelo al uso de los CPC para la producción de cardiomiocitos *in vitro* también se podría estimular a esta célula para regenerar el miocardio *in vivo*. En el caso de los progenitores endoteliales ha sido demostrado que la migración y vascularización se presenta al estimular con timosina- β [147, 148]. Estos resultados y la observación del efecto paracrino del trasplante de células madre al miocardio sugieren que la estimulación de los CPC podría darse a través de factores solubles[134].

2.5.4 Dificultades en la utilización de células madre adultas

En general las células madre adultas no han sido totalmente identificadas, y si lo han sido, no siempre es posible obtenerlas del tejido adulto. El uso de las células madre adultas obtenidas parece ser relativamente seguro ya que no presenta los mismos riesgos de formación de teratomas y rechazo inmune de las células madre embrionarias. La probabilidad de respuesta inmune es baja ya que la mayoría de las células trasplantadas vendrán del mismo paciente, y el hecho de que el trasplante sea autólogo también evita los conflictos éticos de otras terapias

celulares. El riesgo de formación de tumores es mínimo ya que las células trasplantadas serán, en su mayoría, células diferenciadas que no presentan un alto potencial proliferativo. Sin embargo, existe el riesgo de cáncer ya que, p. ej. la leucemia tiene su origen en las células madre hematopoyéticas. Los riesgos asociados con el cultivo celular también aplican a estas células y su progenie, ya que la producción de cantidades suficientes de estas requiere su cultivo *in vitro*. Una de las principales ventajas de este tipo de células es su capacidad de producir poblaciones grandes y homogéneas de células diferenciadas. En particular para regeneración cardíaca, los mayores retos del uso clínico de los CPC parecen residir en obtener y producir suficientes de estos, la supervivencia al trasplante, y su integración al miocardio. El aislar las células madre del paciente y la subsecuente producción de cardiomiocitos para el trasplante lleva tiempo, por lo tanto el paciente no puede recibir estas células de manera inmediata después del infarto. Posiblemente, de hecho, sea mejor no realizar este trasplante de manera inmediata ya que la inflamación existente en el área podría eliminar las células[134]. Además, sería importante investigar los efectos de la terapia farmacéutica actual en la supervivencia, diferenciación e integración de las células trasplantadas, ya que la supervivencia de células podría verse incrementada[149].

2.6 Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica es el uso de anticuerpos para identificar proteínas y moléculas en células y tejidos en un microscopio. Esta técnica hace uso de la alta especificidad de los anticuerpos para adherirse a secuencias de aminoácidos en las proteínas. Tal vez la parte mas importante de utilizar anticuerpos sea el hecho de que pueden ser generados en base a las necesidades, proveyendo siempre nuevos reactivos. Nuevos anticuerpos específicos a fragmentos moleculares estan siendo generados de manera constante, lo cual empuja la continua evolución de la inmunocitoquímica. La localización de moléculas en la célula depende en gran parte de la disponibilidad de marcadores, la cual es cada vez más amplia. Con el paso del tiempo la inmunocitoquímica ha evolucionado para responder al desarrollo de nuevos marcadores y métodos de marcado molecular[150].

Los términos inmunocitoquímica e inmunohistoquímica son similares. Hace muchos años la inmunocitoquímica se definió como el uso de los anticuerpos para estudiar células en cultivo o frotados de tejidos animales. La inmunohistoquímica, por otro lado, fue definida como el uso de anticuerpos para estudiar secciones de tejidos humanos incrustadas en parafina. Hoy en día la inmunohistoquímica mantiene su definición, sin embargo la definición de inmunocitoquímica ha cambiado. La inmunocitoquímica se define actualmente como el uso de anticuerpos en la investigación de tejidos y células animales fijados con paraformaldehído[151].

2.6.1 *Anticuerpos para progenitores cardiacos*

En la literatura se clasifica a las células madre en dos categorías principales: Células madre embrionarias y células madre adultas. Estas últimas son descritas como multipotenciales y generalmente solamente son capaces de remplazar un número limitado de tipos celulares en sus tejidos de origen. En los mamíferos se ha aislado y caracterizado células madre adultas del sistema inmune[152], el cerebro[153], del músculo esquelético[154] y del sistema cardiovascular[106].

Marcadores de la pared celular comunes a las células progenitoras de diferentes especies son esenciales para la identificación, aislamiento, cultivo y caracterización de estas células. Existen 3 proteínas superficiales comunes utilizadas de manera habitual para definir una célula como progenitora: c-kit (CD117), antígeno de células troncales o "stem cell antigen" (sca-1, Ly-6A/E) y la proteína resistente a drogas 1 o "multi-drug resistance protein 1 cell factor" (MDR-1)[155]. C-kit es un receptor de tirosina quinasa para el cual el ligando es el factor de célula madre[156]. La Sca-1 es una proteína de fosfatidilinositol anclada a la superficie que no tiene efectos en la adhesión celular para la cual no se ha descrito ninguna vía de comunicación intracelular[157]. La MDR-1 es una proteína de transporte que se une al ATP responsable del eflujo de múltiples sustancias incluyendo tintes y toxinas de la célula[158]. Estos marcadores no son exclusivos a las células madre y pueden ser expresados en tejidos maduros. Por lo dicho, una combinación de la expresión de estos marcadores (c-kit, sca-1 o MDR-1) en

una célula generalmente indica una cualidad progenitora. Por ejemplo, una célula madre hematopoyética se define como c-kit+, Sca-1+ y un marcador de linaje negativo (c-kit+, Sca-1+, lin-)[159]. La proteína CD45 es una tirosina fosfatasa (PTP) localizada en las células hematopoyéticas, exceptuando los eritrocitos y las plaquetas. Esta proteína también es llamada el antígeno de leucocitos, T220 y B220 en ratones. Los receptores de tirosina quinasa constituyen una familia de enzimas inducidas del citoplasma que catalizan la desfosforilación de los residuos de fosfotirosina y son caracterizadas por sus dominios catalíticos homologados[160]. La proteína CD45 tiene varias isoformas y las células hematopoyéticas expresan una o mas formas. Las expresiones específicas de las isoformas de CD45 pueden ser observadas en las varias etapas de diferenciación de las células hematopoyéticas normales[161]. Esta proteína esta distribuida de manera uniforme en la membrana plasmática y presenta zonas enriquecidas en donde hay contacto de células T y B. De hecho, la CD45 constituye el 10% de las moléculas superficiales en las células que la expresan[162].

2.7 Poliuretanos segmentados biodegradables para ingeniería de tejidos

Los poliuretanos segmentados (PU) representan una familia de polímeros sintéticos muy importante para ingeniería de tejidos. Una de las ventajas significativas de los PUU en comparación a otros biomateriales es la flexibilidad química de la síntesis, que permite el desarrollo de polímeros con diversas propiedades físicas, químicas, mecánicas y de degradación. El conocimiento *a priori* de las propiedades necesarias para una aplicación específica permite a los investigadores diseñar los PUU para cumplir con los requerimientos. La habilidad de incorporar secuencias específicas de péptidos a la cadena principal del polímero le confiere a estos polímeros una funcionalidad biológica única. Entonces, la química flexible de los PUU provee la oportunidad de construir polímeros sintéticos que le dan a los investigadores y las células algún control sobre las propiedades de estos materiales. La obtención de polímeros sintéticos biomiméticos cuyas propiedades puedan ser ajustadas conforme se identifican nuevos criterios de diseño puede tener implicaciones importantes en el desarrollo

de biomateriales para ingeniería de tejidos. Es por esto que en los últimos años se ha producido un gran aumento en el número de investigaciones sobre poliuretanos biodegradables para medicina regenerativa, y es sobre éstos que nos centraremos.

2.7.1 Química y propiedades de poliuretanos degradables

Los poliuretanos son una familia heterogénea de polímeros utilizados en una variedad de aplicaciones biomédicas debido a sus diversas propiedades y biocompatibilidad[163]. Los poliuretanos segmentados son copolímeros en bloque termoplásticos del tipo $(AB)_n$ que consisten en secciones alternantes de segmentos rígidos, que están compuestas de un diisocianato y un diol o diamina de bajo peso molecular, y segmentos suaves, generalmente compuestos de poliésteres, poliéteres, policarbonatos, o, polialquilodiolos[163]. Los poliuretanos segmentados se caracterizan por una separación de microfases que resulta de las incompatibilidades termodinámicas de los segmentos rígidos y suaves[164]. El grado de separación de fases está influenciado por la morfología de los segmentos, los cuales pueden presentarse como segmentos rígidos aislados o interconectados en una matriz de segmentos suaves (Figura 2.3)[165].

En realidad, la morfología depende en la cantidad relativa de segmentos rígidos y suaves, y es afectada por varios factores como la regularidad de los segmentos, la rigidez de estos, la interacción entre segmentos y la presencia o ausencia de grupos laterales abultados. Todos estos presentan un gran efecto en la interconexión entre segmentos y la segregación de fases[166]. Esta morfología de segregación depende también de la longitud de los segmentos suaves y rígidos, su polaridad, cristalinidad, composición, e, historias térmica y mecánica[167-169]. En los PUU la segregación de microfases impacta en las propiedades mecánicas y de degradación, lo cual influye el desempeño de los biomateriales. Una alta segregación de fases generalmente resulta en propiedades mecánicas mejoradas, debido a un trabajo de los segmentos rígidos como entrecruzamientos físico, y la flexibilidad impartida por el segmento suave[169]. La naturaleza elastomérica de los PUU es una consecuencia de la incompatibilidad termodinámica que sirve de

motor a la segregación de fases[164]. Cuando estos polímeros se estiran una mezcla de fases energéticamente desfavorable se produce, la cual se recupera una vez que se le retira la fuerza. El diseño de PUU elastoméricos requiere de una química adecuada para favorecer la segregación de fases[170, 171]. Asimismo, la separación de fases puede afectar la rapidez de degradación, p. ej. se ha demostrado que una segregación de fases muy marcada puede proteger grupos del segmento rígido susceptibles de degradación hidrolítica[172, 173]. De manera similar, una alta segregación de fases promueve el empaquetado de cadenas de polímero llevando a una mayor cantidad de dominios semicristalinos con lo cual el agua y otros agentes hidrolíticos son incapaces de alcanzar los grupos lábiles, con lo cual la rapidez de degradación de estos es menor que la de dominios amorfos[174]. Como resultado una alta segregación de fases puede llevar a una estabilidad más alta y una menor rapidez de degradación. Por lo tanto, los PUUU diseñados para ingeniería de tejidos deben promover la segregación de fases para lograr propiedades elastoméricas sin evitar el acceso a los enlaces lábiles y permitir la degradación en los tiempos adecuados. La introducción de segmentos degradables al extensor de cadena es un acercamiento lógico para lograr un balance entre las propiedades elastoméricas y una rapidez de degradación adecuada, sobre todo en un ambiente acuoso en el cual se observa un enriquecimiento de la fase rígida en la superficie del biomaterial. En conclusión, los componentes químicos deben ser escogidos de manera que se obtengan las propiedades adecuadas para el sitio de aplicación.

2.7.2 Síntesis de poliuretanos segmentados

La síntesis de poliuretanos segmentados es una reacción de dos pasos (Figura 2.4). En el primer paso el diisocianato reacciona con el segmento suave (diol) para formar el pre-polímero. En este paso se forman los enlaces uretano a través de la reacción entre los grupos isocianato y los grupos terminales hidroxilo del poliol. En el segundo paso el extensor de cadena es utilizado para enlazar los segmentos de pre-polímero para formar un polímero de alto peso molecular. Los grupos isocianato del pre-polímero reaccionan con grupos amina terminales del extensor

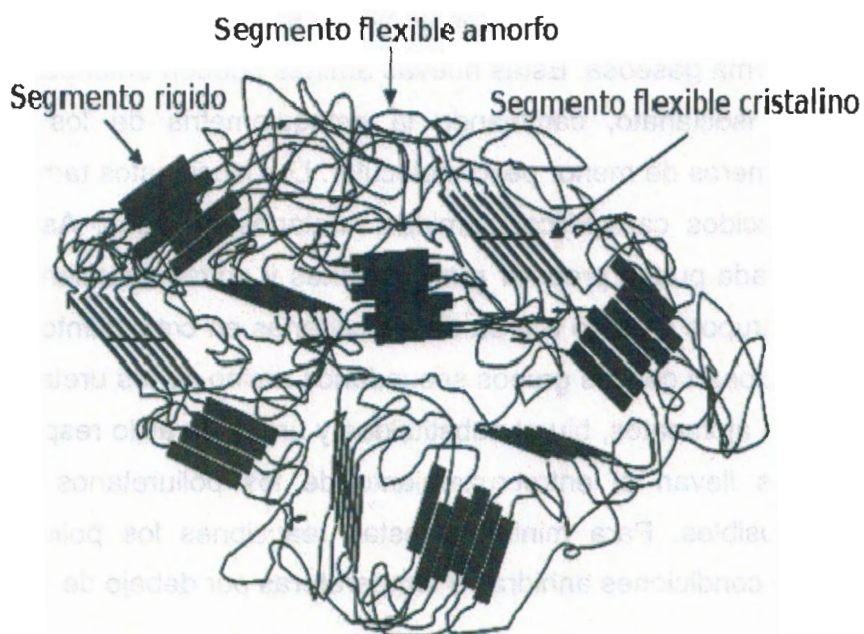


Figura 2.3 Ilustración de la segregación de microfases en poliuretanos segmentados[175]

de cadena para formar grupos urea, produciendo el poliuretano urea. Alternativamente, si se utiliza un diol como extensor, los grupos isocianato reaccionan con los grupos terminales hidroxilo del diol para formar enlaces uretano, produciendo el poliuretano. A lo largo de esta tesis nos referiremos a los poliuretanos ureas como poliuretanos, es importante notar la diferencia en la estructura química ya que son una influencia importante en las propiedades del polímero y el comportamiento de estos. Los grupos urea tienen un grupo N – H adicional que puede actuar como un donante en la formación de puentes de hidrogeno, y se sabe que este tipo de enlace secundario, común en PUU, juega un papel importante en las interacciones inter e intramoleculares, integridad del polímero, y puede ser una de las causas de la segregación de fases[163]. Por lo tanto, los poliuretano-ureas presentan propiedades mecánicas mejoradas al compararlos con su equivalente extendido con un diol[163]. Durante la síntesis de los poliuretanos pueden ocurrir varias reacciones secundarias que produzcan ramificaciones, entrecruzamientos, o, cambios en la estequiometría[163]. La presencia de agua (humedad) produce que los grupos isocianato reaccionen para

formar ácido carbámico, que subsecuentemente se descomponen en aminas y liberan CO_2 en forma gaseosa. Estas nuevas aminas pueden entonces reaccionar con los grupos isocianato, cambiando la estequiometría de los reactivos y produciendo polímeros de menor peso molecular. Los isocianatos también pueden reaccionar con ácidos carboxílicos, amidas, uretanos, y ureas. Asimismo, una temperatura elevada puede producir ramificaciones y entrecruzamientos entre los isocianatos y los grupos uretano o urea de las cadenas en crecimiento. Los grupos isocianatos reaccionan con los grupos secundarios amino de los uretanos, ureas y amidas formando alofanatos, biuret substituidas y ureas de acilo respectivamente. Estas reacciones llevan al entrecruzamiento de los poliuretanos volviéndolos insolubles e infusibles. Para minimizar estas reacciones los poliuretanos son sintetizados bajo condiciones anhidras a temperaturas por debajo de 100°C .

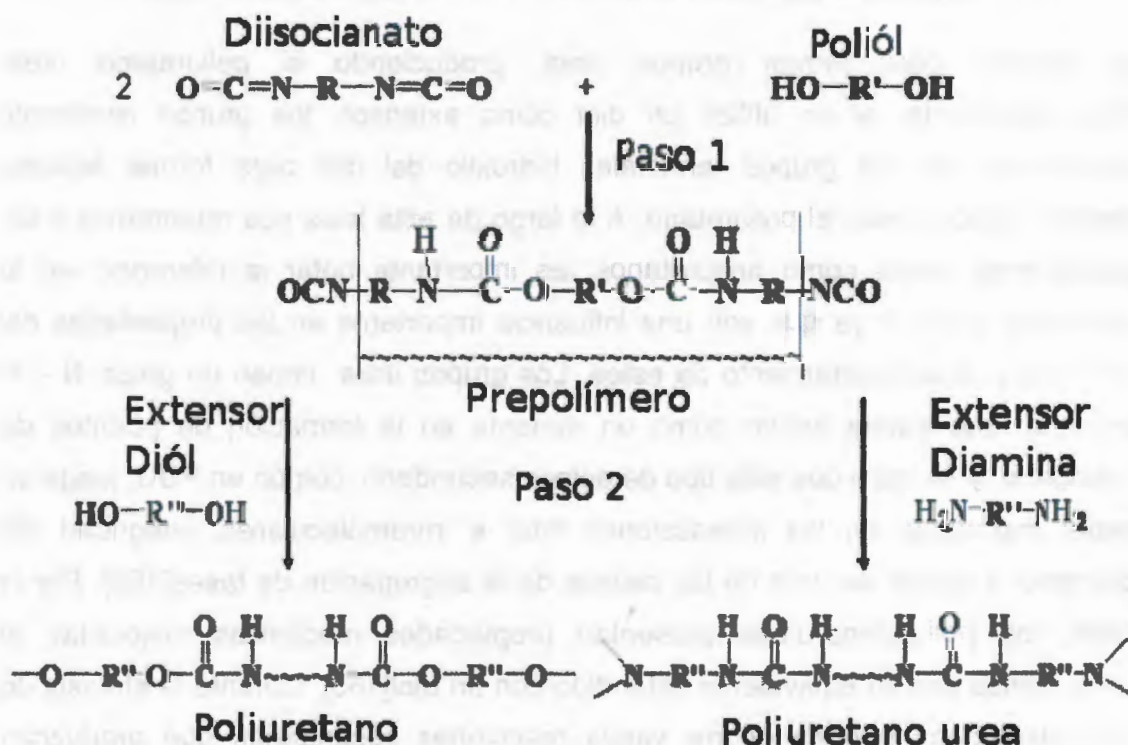


Figura 2.4 Reacción de síntesis de poliuretanos en dos pasos. Paso 1. Formación del prepolímero. Paso 2. Extensión de cadena[176].

2.7.2.1 Cobertura por centrifugación (Spin coating)



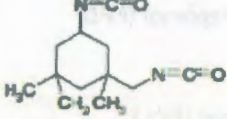

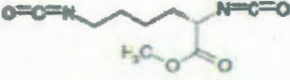
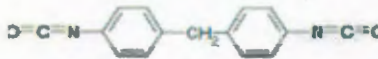
La cobertura por centrifugación ha sido utilizada por décadas para el recubrimiento con películas delgadas. El proceso típico consiste en depositar una pequeña cantidad de material líquido en el centro del sustrato y posteriormente hacer girar este a alta velocidad (normalmente alrededor de 3000 RPM). La aceleración centrípeta causará que la disolución se distribuya en el sustrato hasta eventualmente caer por la orilla. Después de esto lo único que permanece en la superficie del sustrato es una película delgada del polímero. El espesor final de la película y otras propiedades dependerán de la naturaleza del polímero (viscosidad, rapidez de secado, concentración, presión de vapor, etc.) y de los parámetros utilizados para el centrifugado.

2.7.3 Química de reactivos para poliuretanos biodegradables

La flexibilidad química que le da a los PUU su amplia gama de propiedades se debe a la gran cantidad de opciones en diisocianatos, segmentos suaves, y segmentos rígidos disponibles para sintetizarlos. Los diisocianatos y polioles utilizados para sintetizar poliuretanos biodegradables, normalmente, son los disponibles de manera comercial, en el caso de los extensores de cadena se ha utilizado opciones diversas e incluso únicas. La composición estructural de los reactivos, así como la síntesis y el procesamiento dictan la morfología del polímero, segregación de fases, interacción entre cadenas y en general afectan las propiedades del polímero. Los reactivos alifáticos proporcionan la mayor flexibilidad, después los cicloalifáticos, y los aromáticos mayor rigidez. Aunque alguna flexibilidad de la cadena principal es requerida para alcanzar una estructura ordenada y regular, demasiada flexibilidad impide la formación de estructuras cristalinas, interacción entre cadenas y la formación de dominios[177]. Como resultado, los PUU sintetizados con grupos aromáticos en su cadena principal tienen propiedades mecánicas mejoradas debidas a la mayor segregación de fases y la mayor formación de dominios, mientras que los PUU alifáticos generalmente son más suaves y menos resistentes[163, 178, 179]. De manera

similar a la alta flexibilidad molecular, los grupos asimétricos y ramificaciones abultadas pueden evitar la alineación de las cadenas, reducir las interacciones entre cadenas, aumentar la mezcla de fases, y reducir las propiedades mecánicas[179, 180]. Es por esto, que tener conocimientos sobre como la química de los reactivos afecta sus propiedades permite la selección de componentes que se complementen para obtener el PUU con propiedades adecuadas para una aplicación específica. Por ejemplo, si se utiliza un diisocianato alifático que tiene ramificaciones entonces el utilizar una diamina simétrica como extensor de cadena, el cual no es muy flexible, puede permitir obtener un PUU con una segregación de fases moderada, y propiedades flexibles y elastoméricas. El Cuadro 2-3 muestra los diisocianatos disponibles de manera comercial para la síntesis de poliuretanos biodegradables. La mayoría son alifáticos o cicloalifáticos, con excepción del 4, 4 – difenilmetano diisocianato (MDI). Los polioles generalmente utilizados como segmentos suaves para los PUU biodegradables son poliéteres, poliésteres, polialquilos o una combinación de estos. El Cuadro 2-4 muestra la estructura química de algunos segmentos flexibles utilizados comúnmente para los PUU biodegradables. El poliol es el componente responsable de la flexibilidad y límite elástico de un poliuretano ya que compone aproximadamente del 50 al 75% del material. Por lo tanto, la selección del segmento suave dictará las propiedades del polímero final, p. ej., los PUU hechos de poliácido láctico son rígidos, tienen una alta resistencia, y no son muy flexibles; de manera similar a los homopolímeros de poliácido láctico[181, 182]. Para obtener poliuretanos biodegradables que soporten grandes deformaciones, sean suaves, y elastoméricos se ha utilizado policaprolactona (PCL) como segmentos suaves, estos materiales han resultado particularmente atractivos para ingeniería de tejidos suaves[181, 183-186]. Skarja y Woodhouse[93, 183] sintetizaron PUU con segmentos suaves de PCL o PEO con diversos pesos moleculares y encontraron que las propiedades mecánicas y degradativas estaban directamente relacionadas con la composición y peso

Cuadro 2-3 Diisocianatos utilizados para sintetizar los PUU biodegradables[187].

| Nombre Químico | Estructura |
|--|--|
| 1,6-diisocianatohexano (HDI) |  |
| 1,4-diisocianatobutano (BDI) |  |
| Isoforona diisocianato (IPDI) |  |
| Diciclohexil metano-4, 4'-diisocianato |  |
| Lisina - metil - ester - diisocianato |  |
| Difenilmetano diisocianato |  |

molecular del segmento suave. Todos los poliuretanos basados en PCL fueron elastómeros, sin embargo, un incremento en la cristalinidad, hidrofobicidad, módulo elástico, esfuerzo último, deformación máxima, y rapidez de degradación fue observado al ir aumentando el peso molecular de la PCL.

Por el otro lado, los PUU basados en PEO fueron polímeros amorfos, suaves, y hulosos que fueron mucho más hidrofílicos y tenían una mayor rapidez de degradación que los basados en PCL[93, 183]. Para sacar ventaja de las propiedades elastoméricas de las PCL y las degradativas del PEO varios grupos han desarrollado poliuretanos segmentados a base de segmento suave de PCL – PEO – PCL[86, 90, 188, 189]. En estos poliuretanos se observó una gran variación de propiedades mecánicas y degradativas con tendencias similares a las observadas en el trabajo de Skarja y Woodhouse. Por lo tanto, el ajustar la química y el peso molecular del segmento suave permite ajustar las propiedades mecánicas, y degradativas de los poliuretanos sintetizados. Una amplia diversidad de reactivos difuncionales pueden ser utilizados como extensor de cadena para PUU biodegradables, pero la mayoría son dioles y diaminas. Aun cuando los

Cuadro 2-4 Polioles usados habitualmente para PUU biodegradables[187].

| Nombre Químico | Estructura |
|--------------------------------|--|
| Poli(óxido de etileno) (PEO) | $\text{HO} \left[\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} \right]_n \text{H}$ |
| Poli(óxido de propileno) (PPO) | $\text{HO} \left[\text{CH}_2 - \overset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{O} \right]_n \text{H}$ |
| Poli(caprolactona) (PCL) | $\text{HO} \left[\left(\text{CH}_2 \right)_5 \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \right]_n \text{O} \left(\text{CH}_2 \right)_4 \text{O} \left[\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \left(\text{CH}_2 \right)_5 \right]_m \text{OH}$ |
| Poli(D, L-Lactico) | $\text{HO} \left[\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{O} - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \right]_m \text{O} \left(\text{CH}_2 \right)_4 \text{O} \left[\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{O} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} \right]_m \text{OH}$ |
| Poliglicol | $\text{HO} \left[\text{CH}_2 - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{O} - \text{CH}_2 - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \right]_m \text{O} \left(\text{CH}_2 \right)_4 \text{O} \left[\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{CH}_2 - \text{O} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{CH}_2 \right]_m \text{OH}$ |

diisocianatos y polioles disponibles comercialmente son los utilizados de manera común, varios grupos han desarrollado extensores de cadena nuevos como un medio para la introducción de grupos químicos degradables al segmento rígido de estos polímeros[86, 90, 93, 183, 190, 191]. Utilizar este enfoque permite escoger segmentos flexibles para obtener propiedades específicas sin sacrificar las propiedades degradativas del poliuretano. El enriquecimiento de la presencia de segmentos rígidos en la superficie del material, en un medio acuoso, ayuda a promover el acceso de agentes hidrolíticos a los enlaces lábiles promoviendo la degradación. La habilidad de crear poliuretanos biomiméticos con diversas propiedades físicas, químicas, mecánicas, y degradativas posiciona a estos polímeros como materiales muy prometedores para su aplicación en ingeniería de tejidos.

2.8 Hipótesis

Los poliuretano-ureas basados en policaprolactona diol, metileno bis-(4-ciclohexilisocianato) y butanodiamina pueden mantener la proliferación de células progenitoras cardiacas (CPC, por sus siglas en ingles) y de células madre

mesenquimales humanas (hMSC, por sus siglas en ingles) sin afectar su potencialidad.

2.9 Objetivo general

Sintetizar cuatro poliuretano-ureas con diferentes contenidos de segmentos rígidos (12%, 23% ,32% y 40%), caracterizarlos y comprobar su compatibilidad con células progenitoras cardiacas de ratón y células madre mesenquimales humanas por medio de cultivos. Así como determinar el efecto de estos materiales sobre la potencialidad de las células progenitoras.

2.10 Objetivos particulares

- A. Sintetizar y caracterizar una familia de poliuretanos ureas segmentados utilizando policaprolactona diol, Metileno bis-(4-ciclohexilisocianato), y butanodiamina siguiendo el protocolo de May *et al*[192]. Obteniendo diferentes porcentajes de segmentos rígidos (12%, 23%, 32% y 40%).
- B. Obtener películas delgadas de estos materiales y caracterizar las superficies de estas observando los cambios de rugosidad, de separación de fases y su espesor.
- C. Evaluar la citocompatibilidad de los materiales con células progenitoras cardiacas en cultivo.
- D. Evaluar la citocompatibilidad de los materiales con células madre mesenquimales humanas cultivadas en ellos.
- E. Evaluar el efecto de los materiales sobre la potencialidad de las células progenitoras cardiacas por medio de inmunocitoquímica.

Capítulo 3

Síntesis

y

Caracterización

3 Síntesis y caracterización de los poliuretano-ureas, elastoméricos y biodegradables, basados en policaprolactona, metileno bis-(4-ciclohexilisocianato) y putrescina

3.1 Materiales

Se obtuvo de Sigma-Aldrich el bis(4,4'-ciclohexilisocianato)metano (HMDI), octoato de estaño (SO), dimetilformamida anhidra (DMF), dimetilsulfoxido (DMSO), y tetrahidrofurano (THF), así como la policaprolactona diol (PCL, Mw=2000), la PCL fue secada bajo vacío a 70°C durante 24 horas antes de su uso; el 1, 4-diaminobutano y el alcohol isopropílico se obtuvieron de Fluka.

3.2 Métodos

3.2.1 Síntesis

La síntesis estuvo basada en el trabajo de Luis May-Hernández[192]. Se sintetizaron poliuretano-ureas por medio de una reacción de dos pasos, en el primero se formó un pre-polímero al reaccionar la PCL con el HMDI. Posteriormente se agregó a dicho pre-polímero la putrescina (butanodiamina) como extensor de cadena, todo esto se hizo manteniendo la relación NCO:OH a NH al 1:1. Con el fin de retirar cualquier residuo de humedad de la PCL y fundirla, se colocaron 5 g en un horno a 70°C por 24 horas previas a la síntesis. Se armó un reactor de 3 bocas de 250 mL con flujo continuo de nitrógeno agitado magnéticamente y cuya temperatura fue controlada por medio de un baño de aceite recirculado, la temperatura era medida con un multímetro Fluke con termopar. Se mezcló una solución al 10% p/v de PCL en DMF se mezcló con 0.01% en peso, con respecto a la masa total de reactivos, de octoato de estaño a 60°C y con agitación magnética durante 30 minutos. En el primer paso, de formación del pre-polímero, se añadió un exceso de diisocianato con proporciones de NCO:OH de 1.2, 2, 3 y 4. Una vez agregado el diisocianato se le permitió reaccionar a 75°C durante 3 horas. Para el segundo paso, la extensión de cadena, la solución fue enfriada a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) y se agregó cantidades estequiométricas de putrescina para posteriormente incrementar la

temperatura a 75°C por 3 horas. Un paso crucial fue retirar los restos de monómero y disolvente del polímero por lo cual los poliuretano-ureas fueron precipitados en agua desionizada a 4°C y lavado durante 3 días, el agua se cambiaba cada 24 horas. Después de esto los poliuretano-ureas fueron secados al vacío por 24 horas a temperatura ambiente y se les mantuvo bajo una atmosfera de nitrógeno hasta el momento de preparar las muestras. El esquema de la reacción se presenta en la Figura 3.1.

3.2.2 Espectroscopia infrarroja (FTIR)

El análisis de FT-IR se llevó a cabo en un equipo Thermo-Nicolet, las muestras fueron preparadas vertiendo 90 µL de una solución de los Poliuretano-ureas al 5% p/v en una mezcla de dimetilformamida (DMF por sus siglas en ingles) y tetrahidrofurano (THF por sus siglas en ingles) (50% v/v) en las pastillas de KBr. El disolvente fue evaporado a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente a 120°C durante 60 minutos, estas muestras se mantuvieron en un desecador hasta su análisis. Los espectros fueron generados a partir de 256 lecturas desde 400 hasta 4000 cm^{-1} con una resolución de 8 cm^{-1} .

3.2.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El comportamiento térmico de los Poliuretano-ureas se analizó por medio de calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en ingles) y análisis termogravimétrico (TGA por sus siglas en ingles). Los estudios de DSC se llevaron a cabo en un equipo Perkin – Elmer modelo DSC – 8500, la rampa de calentamiento utilizada fue de 10°C/min bajo un flujo de nitrógeno de 20 mL/min. El tamaño de las muestras estuvo en el intervalo de 10 a 20 miligramos y la temperatura fue desde -100°C hasta 150°C. Todas las muestras compartían la misma historia térmica ya que fueron obtenidas bajo las mismas condiciones, brevemente, se mezcló DMF/THF al 50% v/v y se disolvió lo poliuretano-ureas al 5% p/p en este disolvente, estas fueron calentadas a 60°C por 1 hora. Posteriormente se vertieron estas disoluciones en moldes de teflón en las cuales se permitió la evaporación del disolvente a 60°C.

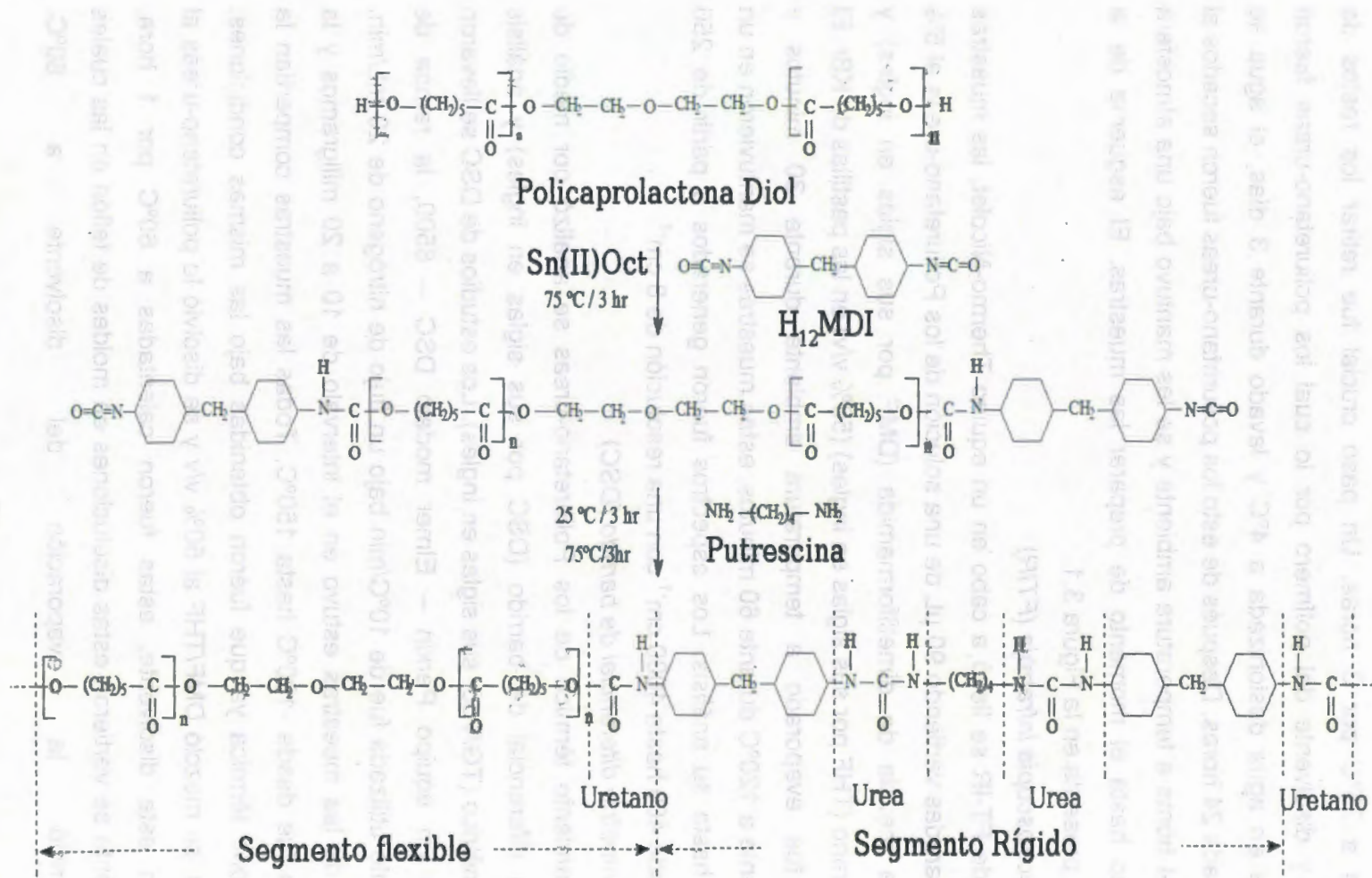


Figura 3.1 La imagen muestra la representación esquemática de la síntesis de los Poliuretano-ureas por el método de dos pasos [192].

Pequeñas piezas de estas películas fueron utilizadas como muestras para los estudios térmicos, se utilizó las graficas del primer calentamiento, primer enfriamiento y segundo calentamiento. El segundo barrido fue realizado con el fin de observar el efecto sobre la Tg de los PUU.

3.2.4 *Termogravimetría (TGA)*

Los estudios de TGA se ejecutaron en un equipo TGA Q50 desde 30°C hasta 500°C bajo atmosfera de nitrógeno con una rapidez de calentamiento de 10°C/min, con un tamaño de muestra en el intervalo desde 10 a 20 mg. Todas las muestras provenían de las obtenidas previamente.

3.2.5 *Microscopía de fuerza atómica (AFM)*

Los estudios de AFM se llevaron a cabo con un equipo de Digital Instruments modelo Nanoscope III conectado a un lector Bioscope. La cabeza del lector tiene un campo máximo de 500 nm x 500 nm, y una altura Z máxima de 300 nm. Todas las imágenes presentadas fueron adquiridas utilizando el modo intermitente con una punta de silicón en cantiléver (TESPA) con una longitud nominal de 125 micrómetros y una frecuencia de resonancia de 320 kHz. Ambas imágenes, altura y fase, fueron adquiridas y procesadas con el software Nanoscope. La cabeza de lectura Bioscope estaba montada encima de un microscopio invertido Zeiss. Las muestras fueron preparadas en cubreobjetos de vidrio (18 mm) por evaporación de disolvente a partir de una solución al 1% de los poliuretano-ureas en diversos disolventes.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 *Síntesis*

Los poliuretano-ureas obtenidos tuvieron diferentes porcentajes de segmentos rígidos (14, 23, 32, 40) en peso[192]. Los PUU fueron solubles en dimetilformamida, dimetilsulfoxido, dimetilacetamida, tetrahidrofurano (solo PUU14 y PUU23) y 2-propanol; estas últimas fueron al uno y dos por ciento en peso. Esto permite que los materiales sean procesados de manera sencilla lo cual es importante en ingeniería de tejidos. Esta solubilidad demostró que se evitaron las

Cuadro 3-1 Composición de los polímeros sintetizados e identificación de muestras. (Tomado de la referencia [192])

| Muestra | Composición molar HMDI/PCL/BDA | Porcentaje de segmento rígido | Características |
|---------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| PUU14 | 1.2/1/0.2 | 14% | Frágil, opaco |
| PUU23 | 2/1/1 | 23% | Flexible, translucido |
| PUU32 | 3/2/1 | 32% | Elástico, transparente |
| PUU40 | 4.5/1/3.5 | 40% | Elástico, opaco |

reacciones secundarias por medio del uso de reactivos anhídros, ambientes no reactivos (nitrógeno), y el uso de temperaturas por debajo de los 80°C. El PUU14 es el que tiene menor porcentaje de segmentos rígidos, su apariencia y propiedades mecánicas son similares a las de la PCL y se le puede describir como frágil y opaco. En el caso del PUU23 se pudo observar la misma tendencia que para el PUU14, el polímero también es opaco pero presenta una consistencia menos frágil y más elastomérica. El PUU32 puede ser descrito como un material completamente elastomérico y transparente. En el caso del PUU40, que tiene el mayor porcentaje de segmentos rígidos, las películas fueron opacas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por May *et al*, lo cual indica que obtuvimos los mismos porcentajes de segmentos rígidos, en ese trabajo May comprobó estos resultados por medio de estudios mecánicos dinámicos y estáticos. El Cuadro 3-1 resume las relaciones molares utilizadas y los resultados; las muestras se pueden observar en la Figura 3.2, la apariencia opaca de las películas indica la presencia de cristales en el material, en el caso de los PUU14 y PUU23 estas se deben claramente al segmento flexible (PCL) y en el caso de PUU40 podría deberse a cristales de segmento rígido (butanodiamina). Estos resultados se confirman más adelante en la sección de calorimetría diferencial de barrido.

3.3.2 Espectroscopia de infrarrojo (FTIR)

Los espectros de los PUUs se observan en la Figura 3.3, se puede observar similitudes entre los picos e intensidades asociadas con el segmento rígido,



Figura 3.2 En la figura se muestran trozos de las películas obtenidas por evaporación de DMF de los 4 PUU.

principalmente entre los grupos amino (NH) (3335 y 1552 cm^{-1}) y los carbonilo de urea (amida I) (1632 cm^{-1}). No se observó ningún pico en 2230 cm^{-1} lo cual sugiere que todos los grupos NCO (isocianato residual) reaccionaron o se eliminaron por lavado; esto es importante ya que estos materiales fueron diseñados con fines biomédicos y la presencia de este grupo significaría una posible toxicidad. El amplio pico de absorción entre 3200 y 3400 cm^{-1} se asignó a los grupos NH de urea y uretanos enlazados por puentes de hidrogeno. Se observó un aumento en la intensidad de este pico con el incremento de segmentos rígidos y se apreció un desplazamiento hacia números de onda más bajos debido al mismo fenómeno[193]. En 1060 y 1160 cm^{-1} encontramos los picos de la extensión de los carbonilos de los grupos éster. El pico en 1558 cm^{-1} es característico de la flexión N-H; en estos picos también se observó un incremento relacionado directamente al porcentaje de segmentos rígidos. Un pico característico de los grupos carbonilo libres, en los enlaces éster y uretano puede ser observado en 1735 cm^{-1} cuya intensidad aumentó de manera proporcional al porcentaje de segmentos rígidos. Los estiramientos asimétrico y simétrico de los grupos CH_2 se encontraron a 2860 cm^{-1} y 2930 cm^{-1} respectivamente. Los picos en 1454 , 1420 , 1394 , y 1365 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de los grupos CH_2 [194]. Asimismo se pudo

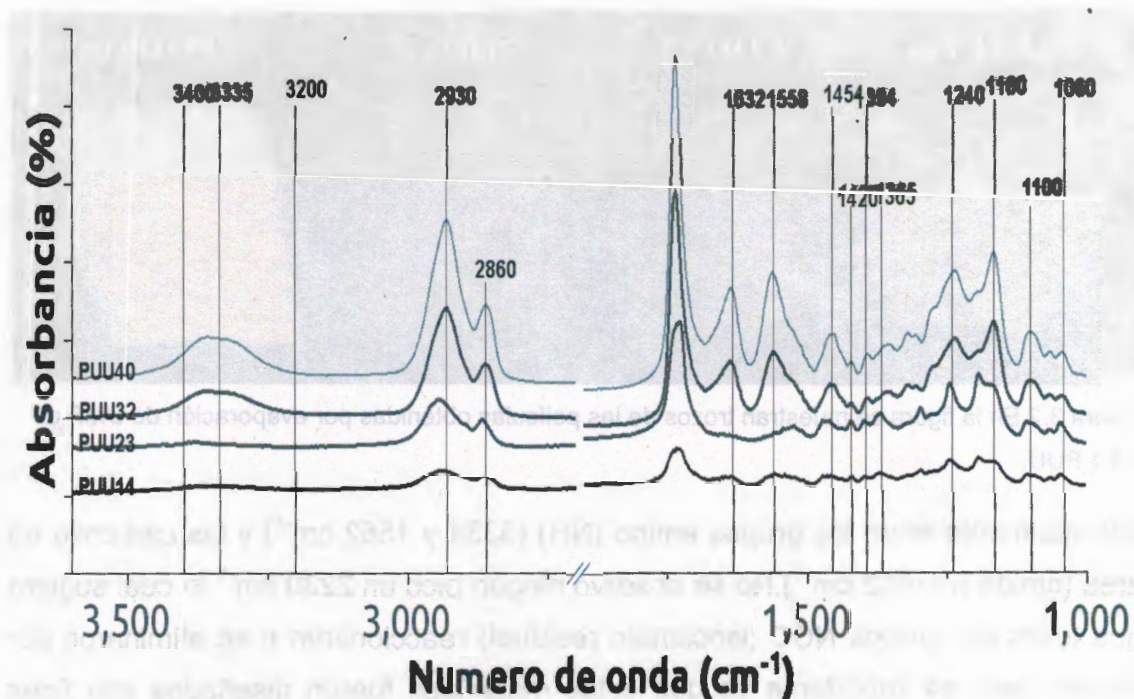


Figura 3.3 Espectros de FT-IR de los PUU.

confirmar la presencia del segmento suave por medio del pico encontrado a 1100 cm^{-1} que esta relacionado al estiramiento C-O-C del poliéter (PCL)[192].

3.3.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La PCL tiene una temperatura de transición vítrea (T_g) reportada de -64°C y una temperatura de fusión (T_m) de 60°C , asimismo presenta una cristalinidad de aproximadamente el 60%[195]. Como se puede observar en la Figura 3.4 el diol que utilizamos tiene dos picos de fusión, el primero (44°C) puede ser atribuido al polietilenglicol en la cadena principal y el segundo (51°C) al segmento de caprolactona[90] y su temperatura de transición vítrea (T_g) se observó aproximadamente a -60°C . La Figura 3.5 muestra los resultados de los tres barridos para el PUU14, en este primer polímeros esperábamos encontrar características térmicas similares a las de la PCL diol. En el apartado anterior mencionamos que al inspeccionar las muestras de manera visual las características del PUU14 y PCL diol eran bastante similares. Esto se debe a que

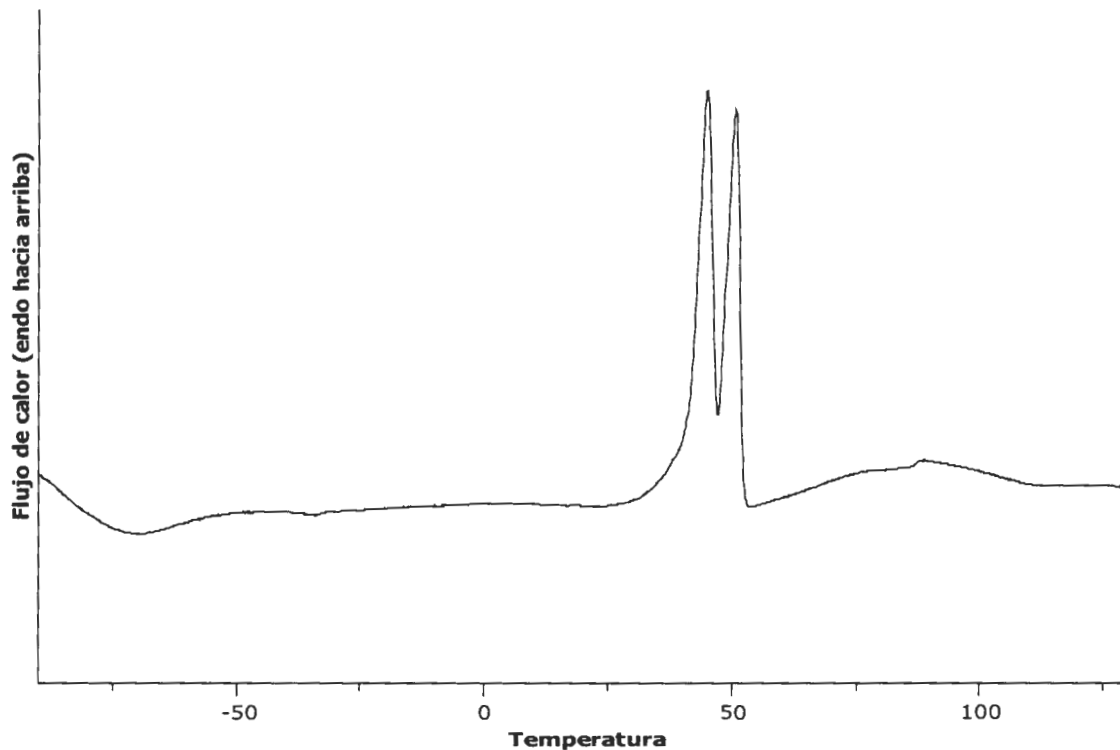


Figura 3.4 Primer calentamiento de la PCL diol.

en composición química este es el PUU que contiene mayor cantidad de segmento suave. Entonces era lógico esperar que conforme aumentara el porcentaje de segmentos rígidos los PUU fueran menos similares a la PCL diol. En las gráficas del PUU14 y PUU23 se observaron picos de fusión a 50°C que se atribuyó a los cristales del segmento suave. Esta menor cristalización, comparada con la PCL diol, esta relacionada con el incremento de segmentos rígidos y una mayor cantidad de puentes de hidrogeno lo cual limita la movilidad de las cadenas[165, 196-198]. En los casos de PUU32 y PUU40 no se encontró evidencia de ningún tipo de cristalización. Entonces, conforme aumenta el contenido de segmentos rígidos la interferencia de los segmentos rígidos aumenta. Después de permitir que los materiales enfriaran de manera lenta (10°C/min) se observó que en los casos de PUU14 y PUU23 el pico de fusión

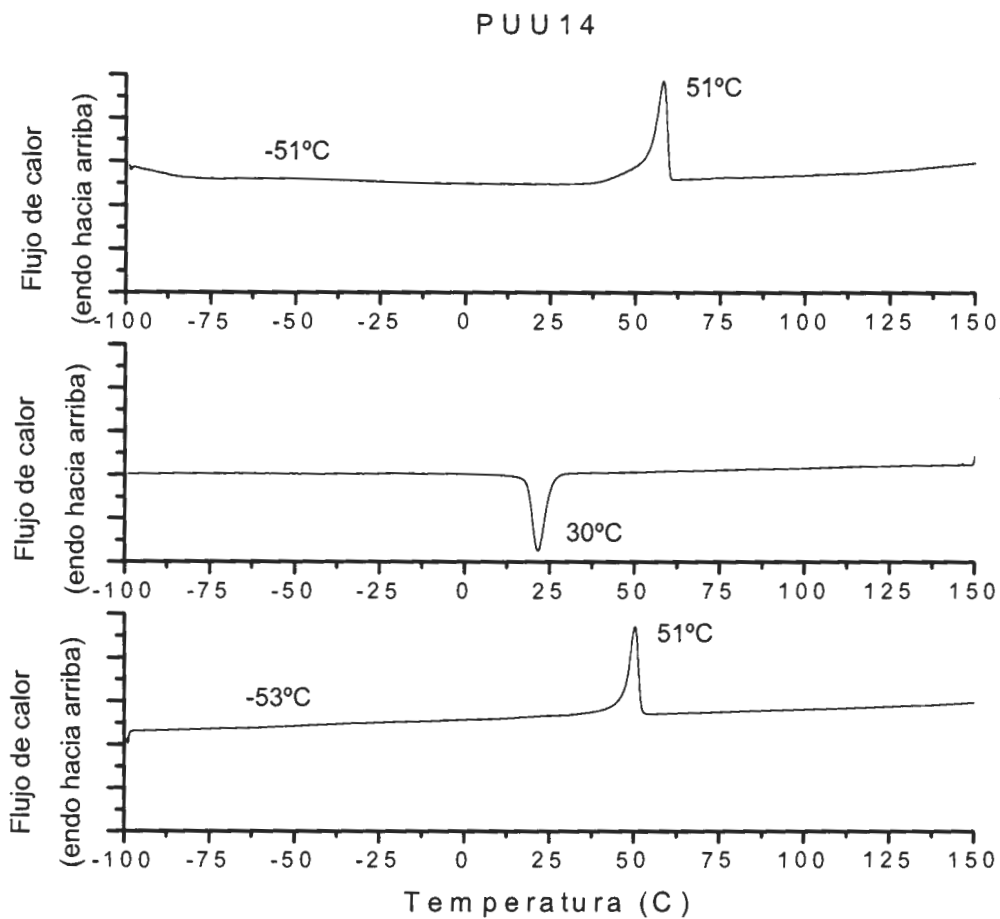


Figura 3.5 Termogramas de DSC del PUU14. La figura superior muestra el primer calentamiento del PUU, la siguiente hacia abajo el primer enfriamiento y la última (hasta abajo) representa el segundo calentamiento.

de los cristales no había cambiado, aunque en el caso del PUU23 se observó una inflexión a -10°C que se atribuyó a una recristalización en frío del segmento suave. En los PUU32 y PUU40 no se observó ningún rastro de fusión de cristales, por lo

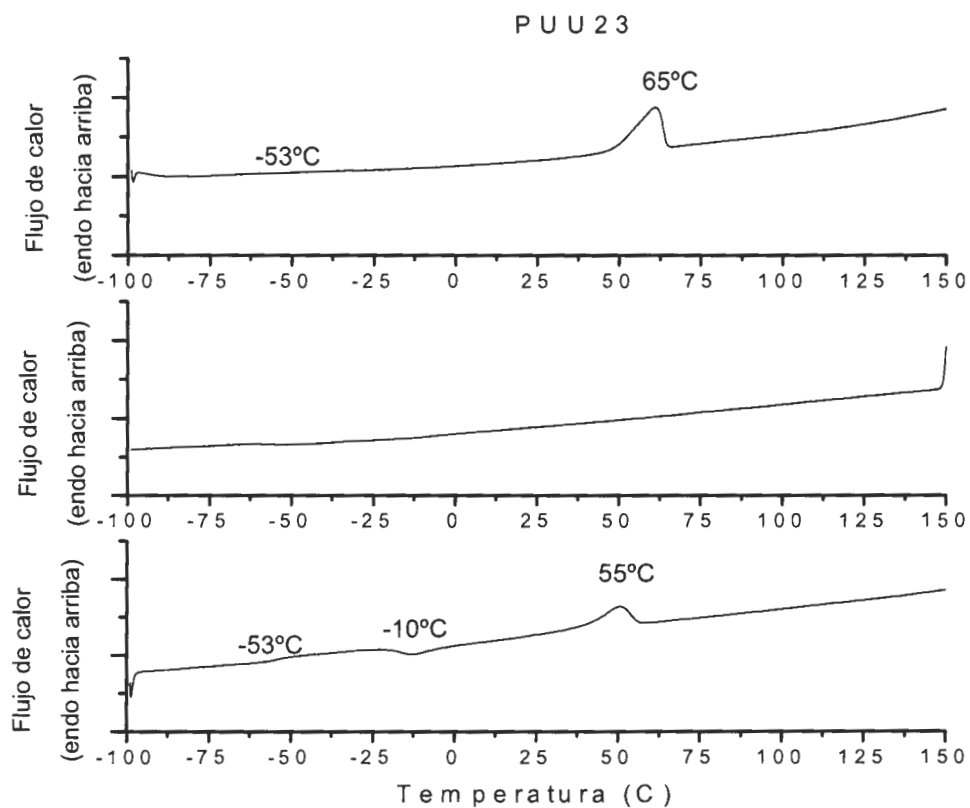


Figura 3.6 Termogramas de DSC del PUU23. La figura superior muestra el primer calentamiento del PUU, la siguiente hacia abajo el primer enfriamiento y la última (hasta abajo) representa el segundo calentamiento.

cual se puede suponer que la cristalización es impedida por el incremento de los segmentos rígidos.

3.3.4 Termogravimetría (TGA)

La degradación de polímeros ha sido ampliamente estudiada, se ha dedicado especial atención a entender la relación entre la estructura y las propiedades de los poliuretanos. Los poliuretanos termoplásticos son copolímeros segmentados y lineales formados por segmentos rígidos y segmentos suaves que se alternan. Es

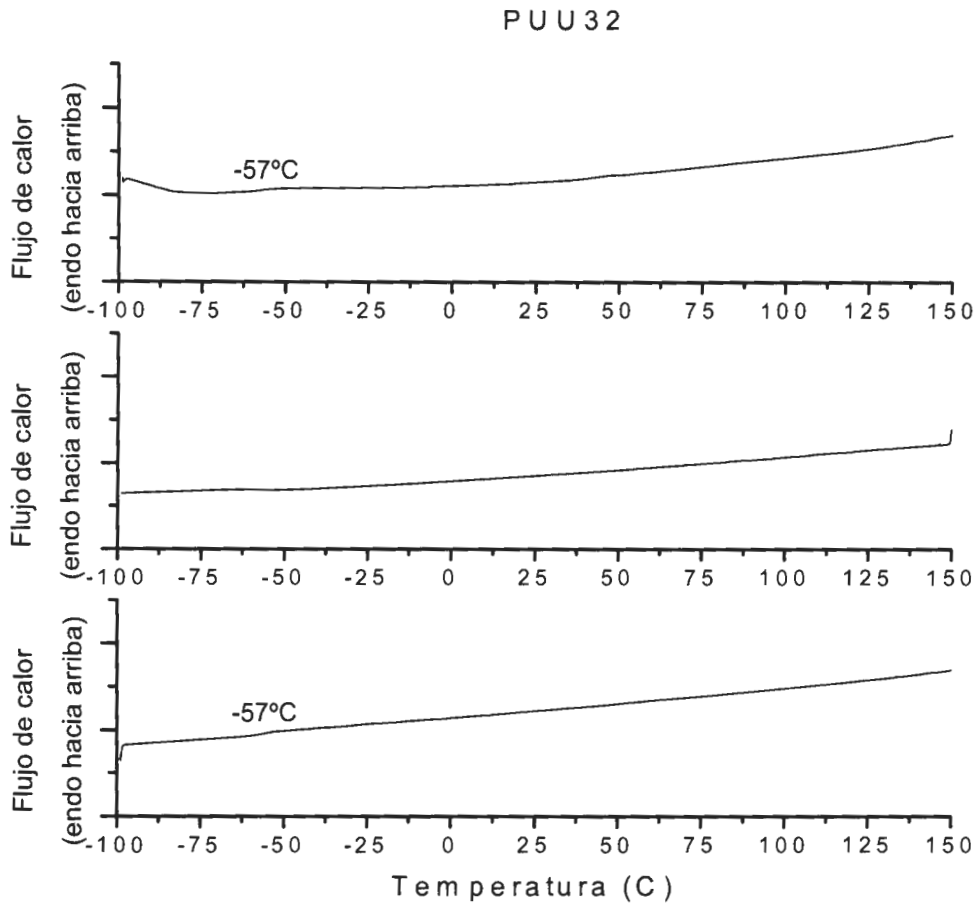


Figura 3.7 Termogramas de DSC del PUU32. La figura superior muestra el primer calentamiento del PUU, la siguiente hacia abajo el primer enfriamiento y la última (hasta abajo) representa el segundo calentamiento.

esta composición la que favorece una segregación de fases por incompatibilidad termodinámica y permite que al variar la cantidad de segmentos rígidos se modifique las propiedades de estos materiales. Algunos trabajos han demostrado que la descomposición térmica de los PUU es un proceso heterogéneo y complejo que consiste de varias reacciones de descomposición parciales[199-204]. Durante la excitación térmica los enlaces covalentes de las cadenas de PUU sufren

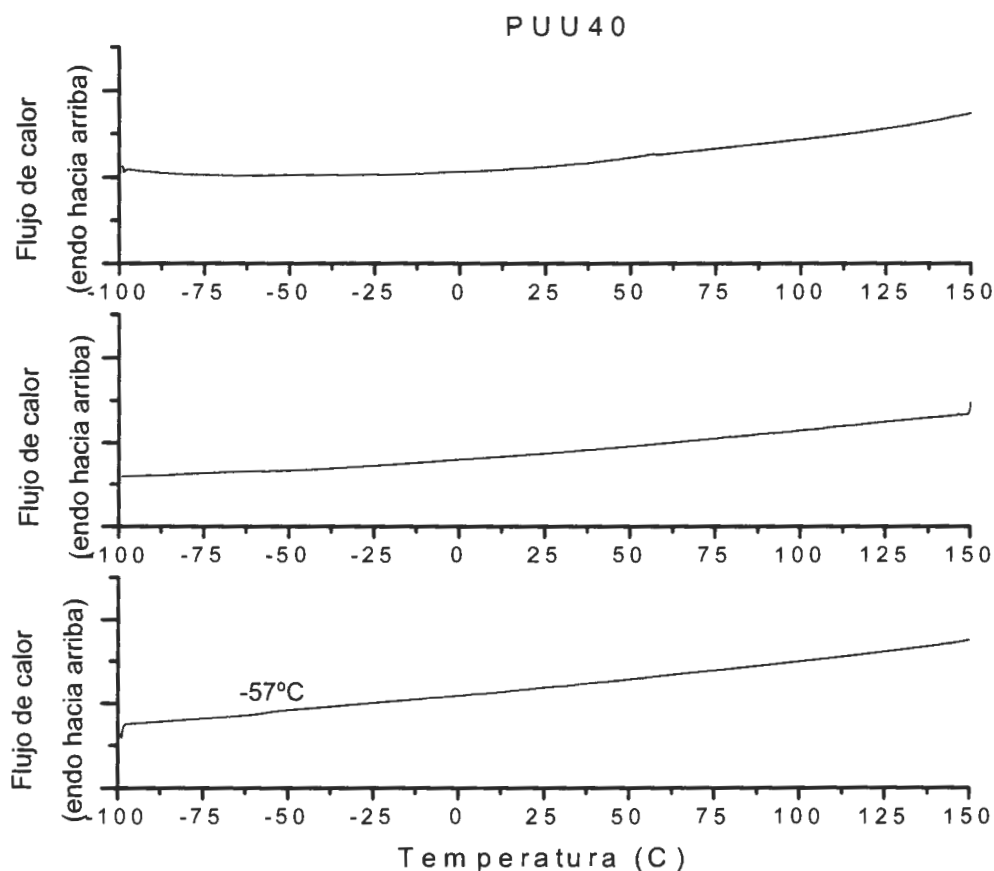


Figura 3.8 Termogramas de DSC del PUU40. La figura superior muestra el primer calentamiento del PUU, la siguiente hacia abajo el primer enfriamiento y la última (hasta abajo) representa el segundo calentamiento.

complejos movimientos de vibración y rotación de manera local. Si dicha excitación continua estos enlaces se pueden romper para formar una variedad de radicales libres y moléculas pequeñas que pueden combinarse entre si o continuar fragmentándose. Finalmente estos fragmentos pueden ser vaporizados, difundidos al exterior o carbonizados. El proceso de descomposición termina con la pérdida

de todos los materiales volátiles y la formación de un material complejo e infusible. Por lo tanto, la estabilidad térmica es una medida directa de la rigidez molecular ya que la reactividad química y degradación dependen de la excitación de las cadenas macromoleculares y el movimiento adquirido por la exposición a las altas temperaturas. Al hacer una revisión bibliográfica es obvio el hecho de que la degradación de los PUU ocurre en dos o tres etapas. En la Figura 3.9 se puede observar que a aproximadamente 250°C se presenta una desestabilización que se refleja en una rápida pérdida de masa. Este primer paso es debido a la degradación de segmentos rígidos de enlaces uretano, lo cual resulta en la formación de isocianatos y alcohol, aminas primarias o secundarias y olefinas. La rapidez de degradación de esta primera etapa disminuye cuando se utiliza mayores porcentajes de segmento suave. A través del uso simultáneo de estudios de IR se ha determinado que la desintegración del enlace C-NH, con una energía de disociación de 98 kJ/mol, es el primer paso en la degradación. La temperatura de descomposición inicial del enlace uretano depende de las estructuras del isocianato y alcohol utilizados. Algunos investigadores han reportado que los poliuretanos formados más fácilmente son los menos estables, y que los obtenidos de alquilo-isocianatos y alquilo-alcoholes son los más estables[200, 205, 206]. Asimismo, la cinética de descomposición térmica depende del carácter aceptor (aromático) o donador (alifático) del isocianato. En el caso de los primeros la reacción prosigue según la ecuación 2 de la figura 3.9 y la ecuación 1 en el caso de los segundos. Esto corresponde con lo hallado en nuestro estudio ya que la temperatura a la cual observamos una primera etapa es de aproximadamente 260°C, la cual es la reportada por estos autores.

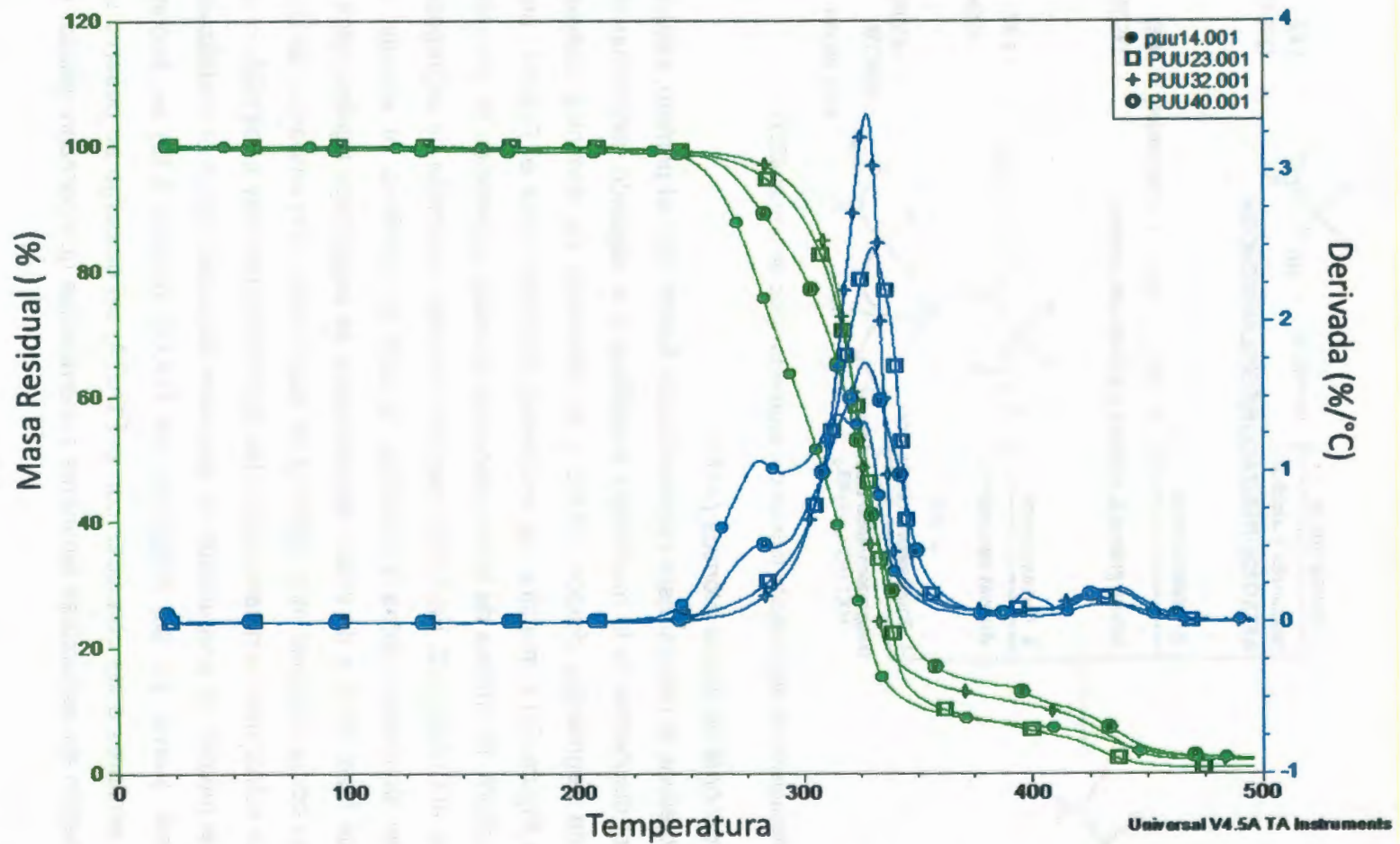


Figura 3.9 Termogramas de TGA para los PUU. En la gráfica se puede observar que la degradación inicia aproximadamente a los 260°C, lo cual coincide con lo reportado para este tipo de materiales.

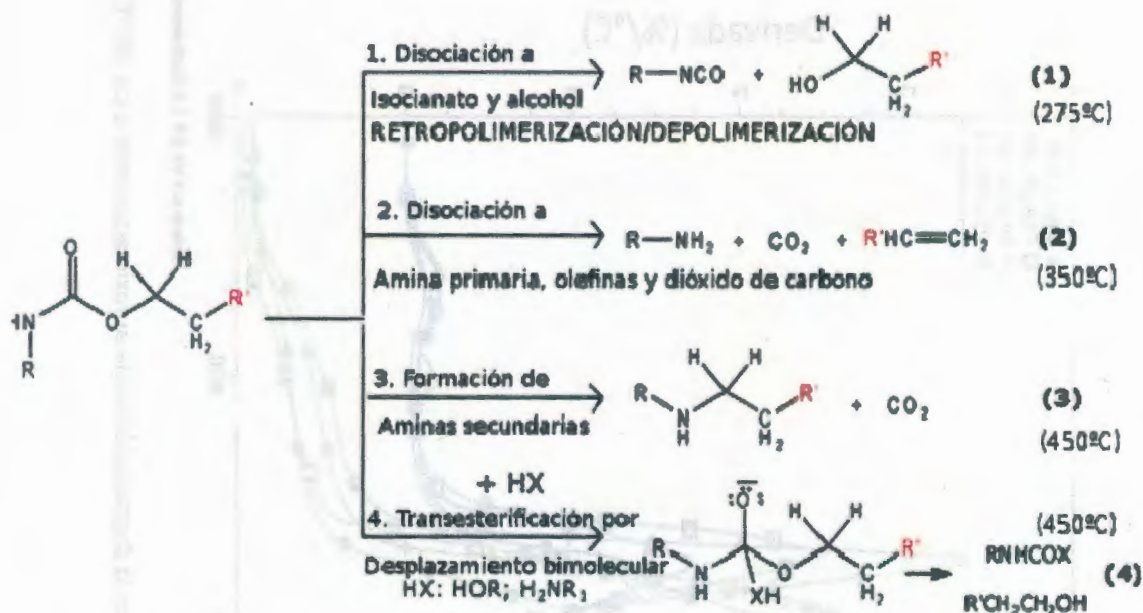


Figura 3.10 Mecanismo de degradación térmica del segmento rígido de uretano[207].

3.3.5 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Nuestros objetivos al realizar esta caracterización fueron dos: el primero, observar el efecto del disolvente en la morfología superficial y el segundo determinar si el contenido de segmentos rígidos induce a la formación de dominios suaves y rígidos. La Figura 3.11 muestra las imágenes obtenidas para el PUU14, en la imagen de altura. El análisis de las rugosidades de estas superficies se encuentra resumido en el Cuadro 3-2. En ningún caso se encontró evidencia de segregación de fases en dominios rígidos y flexibles, lo cual se confirmó al estudiar las imágenes de fase, ya que de existir agrupaciones de segmentos rígidos estos se presentarían como regiones más claras o de mayor brillo. Sin embargo, tampoco se observan estructuras lamelares como las reportadas por May *et al* [192], lo cual indica que el método de preparación de películas delgadas inhibió la cristalización del segmento suave. En las imágenes del PUU23 (Figura 3.12) se encontró superficies similares a las obtenidas con el PUU14, sin embargo se observó una mayor formación de estructuras laminares superpuestas que parecen resultar del

incremento en segmentos rígidos. La separación de fases en las imágenes de fases no se observó de manera clara, sin embargo en el caso de las películas formadas con THF se observa regiones más brillantes que parecen indicar zonas de mayor módulo elástico. Estas zonas pueden atribuirse al incremento en segmentos rígidos y su agrupación en zonas específicas. Las rugosidades obtenidas se encuentran en el Cuadro 3-2. En el caso del PUU32 (Figura 3.13) en las imágenes de DMSO y THF se puede encontrar una mayor cantidad de puntos brillantes y con un mayor tamaño que en los otros dos materiales, estas (señaladas en las imágenes) representan dominios de segmentos rígidos. Las imágenes presentadas para el PUU40 (Figura 3.14) permiten observar que en el caso de las superficies formadas a partir de disoluciones de DMAc el material se ordena en la forma de placas superpuestas. En las otras superficies se observó estructuras más uniformes y lisas, sin embargo, al comparar las imágenes de altura y de fase se descubre que los dominios de segmentos rígidos son mucho más abundantes y grandes que en los otros PUUs. En conclusión, se demostró que el disolvente utilizado durante la preparación de películas delgadas de estos PUUs tiene gran influencia sobre las morfologías obtenidas. Los resultados demuestran que la utilización de disolventes con baja presión de vapor permite obtener películas con una baja rugosidad, en un intervalo de presiones de vapor intermedio se obtiene superficies con una alta rugosidad y películas poco homogéneas (RMS=5.78 nm), y que en el caso de películas preparadas de disolventes muy volátiles, como el THF, estas no son tan lisas como las preparadas con disolventes poco volátiles[208]. Por lo tanto, el disolvente tiene una mayor influencia en la morfología superficial que el contenido de segmentos rígidos. Sin embargo, el análisis del cuadro 3-2 permitió observar una influencia del contenido de segmentos rígidos en la rugosidad ya que al aumentar este contenido la rugosidad disminuye. Esto concuerda con resultados publicados previamente por Mishra *et al*[209].

Cuadro 3-2 Rugosidades (RMS) de los PUU obtenidas por AFM.

| Disolvente | RMS | | | | Presión de vapor (KPa@20°C) |
|------------|----------|----------|---------|---------|--------------------------------|
| | PUU14 | PUU23 | PUU32 | PUU40 | |
| DMAC | 4,83 nm | 15,06 nm | 3,38 nm | 5,80 nm | 0.200 |
| DMF | 13,37 nm | 21,4 nm | 1.25 nm | 3,66 nm | 0.380 |
| DMSO | 3,66 nm | 2,43 nm | 6,80 nm | 2,62 nm | 0.061 |
| THF | 9,76 nm | 2,44 nm | 5,09 nm | 5,49 nm | 19.30 |
| 2-Propanol | 5,78 nm | - | - | - | 4.240 |

3.4 Conclusiones

En este capítulo se demostró que es posible sintetizar los poliuretano ureas que son termoplásticos, biodegradables por diseño y tienen propiedades que pueden ser ajustadas al aumentar o disminuir el porcentaje de segmentos rígidos. Este incremento de segmentos rígidos fue comprobado por medio de FTIR y estos resultados permitieron comprobar que el incremento de segmentos rígidos se dio en forma de enlaces urea mientras los enlaces uretano se mantenían constantes. Asimismo se encontró una influencia de la cantidad de segmentos rígidos en esta temperatura de transición vítrea desplazándola hacia temperaturas más altas que la de la PCL diol. Esta se debió a una reducción de la movilidad de las cadenas por la formación de puentes de hidrogeno. Este mismo efecto se observó sobre la cristalinidad de los materiales la cual también disminuyó al aumentar la cantidad de segmentos rígidos. Esto permitió caracterizar las superficies formadas por los materiales para posteriormente tratar de determinar el efecto de esta morfología en las células progenitoras cardiacas de ratón y mesenquimales humanas.

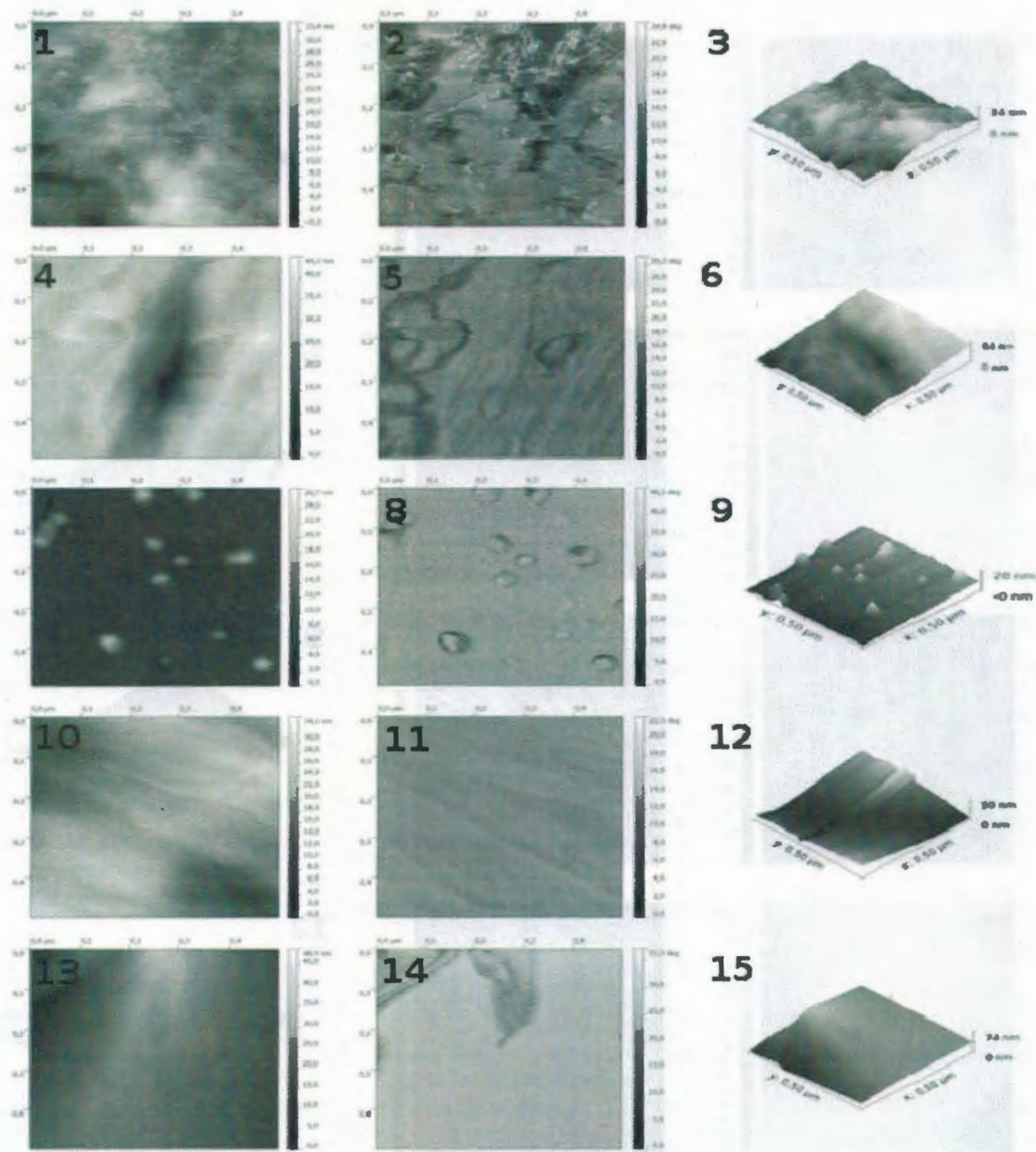


Figura 3.11 Imágenes de microscopia de fuerza atómica del PUU14. 1. dimetilacetamida altura, 2. dimetilacetamida fase, 3. dimetilacetamida altura 3D, 4. dimetilformamida altura, 5. dimetilformamida fase, 6. dimetilformamida altura 3D, 7. dimetilsulfoxido altura, 8. dimetilsulfoxido fase, 9. dimetilsulfoxido altura 3D, 10. tetrahidrofurano altura, 11. tetrahidrofurano fase, 12. tetrahidrofurano altura 3D, 13. 2-propanol altura, 14. 2-propanol fase, 15. 2-propanol altura 3D.

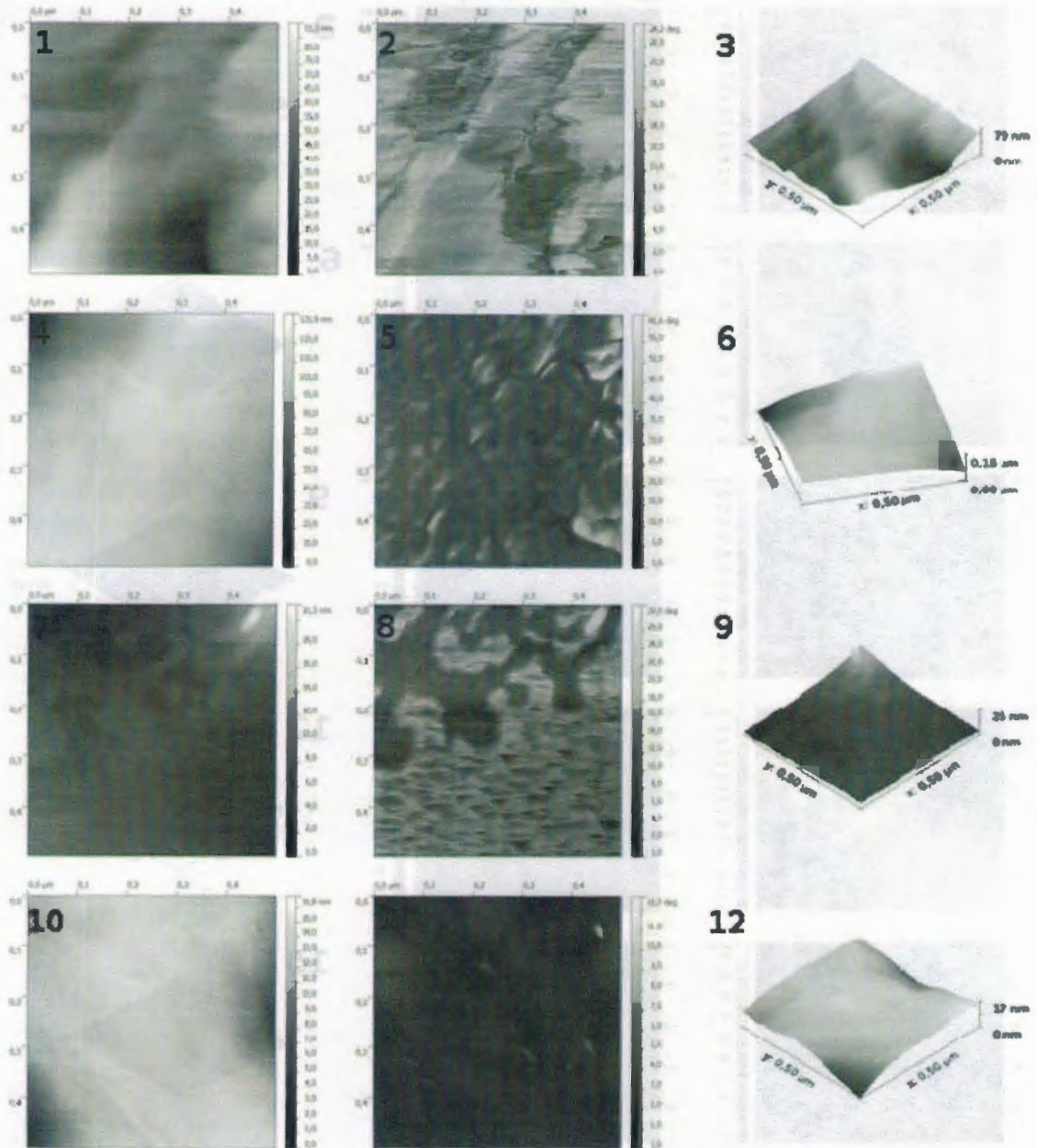


Figura 3.12 Imágenes de microscopia de fuerza atómica del PUU23. 1. dimetilacetamida altura, 2. dimetilacetamida fase, 3. dimetilacetamida altura 3D 4. dimetilformamida altura, 5. dimetilformamida fase, 6. dimetilformamida altura 3D, 7. dimetilsulfoxido altura, 8. dimetilsulfoxido fase, 9. dimetilsulfoxido altura 3D 10. tetrahidrofurano altura, 11. tetrahidrofurano fase, 12. tetrahidrofurano altura 3D

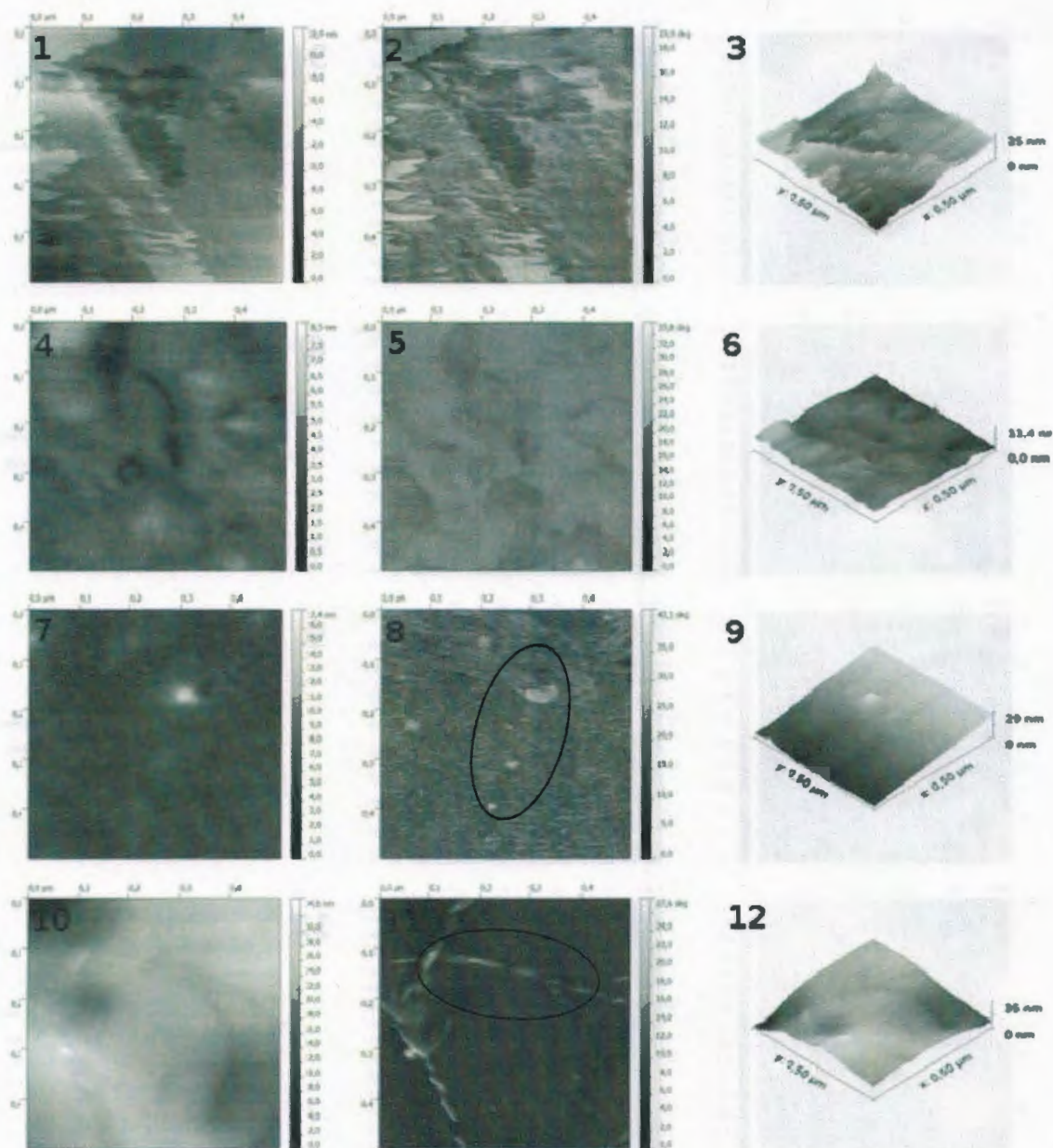


Figura 3.13 Imágenes de microscopía de fuerza atómica del PUU32. 1. dimetilacetamida altura, 2. dimetilacetamida fase, 3. dimetilacetamida altura 3D 4. dimetilformamida altura, 5. dimetilformamida fase, 6. dimetilformamida altura 3D, 7. dimetilsulfoxido altura, 8. dimetilsulfoxido fase, 9. dimetilsulfoxido altura 3D 10. tetrahydrofurano altura, 11. tetrahydrofurano fase, 12. tetrahydrofurano altura 3D

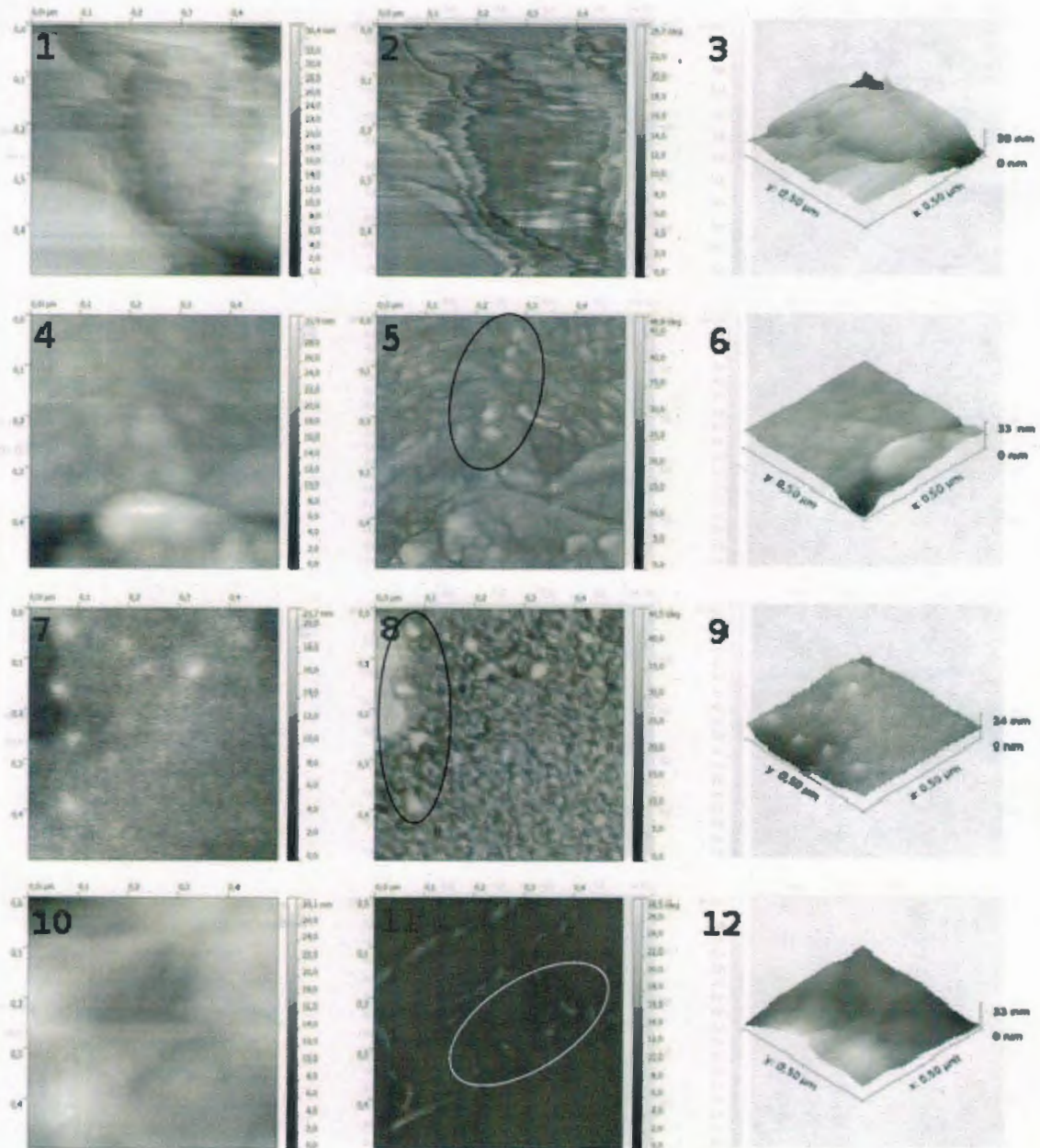


Figura 3.14 Imágenes de microscopia de fuerza atómica del PUU40. 1. dimetilacetamida altura, 2. dimetilacetamida fase, 3. dimetilacetamida altura 3D 4. dimetilformamida altura, 5. dimetilformamida fase, 6. dimetilformamida altura 3D, 7. dimetilsulfoxido altura, 8. dimetilsulfoxido fase, 9. dimetilsulfoxido altura 3D 10. tetrahydrofurano altura, 11. tetrahydrofurano fase, 12. tetrahydrofurano altura 3D.

Capitulo 4

Estudios

de

Biocompatibilidad

4 Biocompatibilidad de los poliuretano-ureas elastoméricos – estudios *in vitro* con células progenitoras cardíacas y células madre mesenquimales

4.1 Materiales

Los Medios de Iscove Modificado por Dulbecco (IMDM), y MesenPRO RS™, así como la penicilina – estreptomicina se obtuvieron de Invitrogen y fueron utilizados como se les recibió. El ensayo de proliferación celular se realizó con el estuche comercial CyQuant® Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes®) y se utilizó de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante. El suero bovino fetal (FBS), la tripsina, y la solución salina tamponada de fosfatos (PBS por sus siglas en ingles) fueron compradas de la casa comercial Gibco. Los platos de cultivo utilizados fueron de 12 pozos de Corning Costar®. Los anticuerpos para los estudios de inmunocitoquímica se obtuvieron de Abcam® y se utilizaron de acuerdo a los protocolos establecidos por el fabricante.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparación de películas delgadas

4.2.1.1 Cobertura por centrifugación (Spin coating)

La cobertura por centrifugación ha sido utilizada por décadas para el recubrimiento con películas delgadas. El proceso típico consiste en depositar una pequeña cantidad de material líquido en el centro del sustrato y posteriormente hacer girar este a alta velocidad (normalmente alrededor de 3000 RPM). La aceleración centrípeta causará que la disolución se distribuya en el sustrato hasta eventualmente caer por la orilla. Después de esto lo único que permanece en la superficie del sustrato es una película delgada del polímero. El espesor final de la película y otras propiedades dependerán de la naturaleza del polímero (viscosidad, rapidez de secado, concentración, presión de vapor, etc.) y de los parámetros utilizados para el centrifugado.

Con el fin de obtener películas delgadas de los Poliuretano-ureas se aplicó 50 µL de una solución de PUU al 10% v/v en THF en el centro de un cubreobjetos de

vidrio de 18 mm y se les hizo girar por 30 segundos a 3000 RPM en un equipo para cobertura por centrifugado de Headway research.

4.2.1.2 Evaporación de disolvente

Se obtuvieron películas de poliuretano-ureas en platos de cultivo celular de 12 pozos. Se vertió 90 μ L, en cada pozo, de una solución de PUU al 1% p/p en 2-propanol a 75°C. Se utilizó este disolvente ya que permitía formar películas de manera directa en los pozos.

4.2.2 Elipsometría

Se prepararon muestras de los poliuretano-ureas en obleas de SiO₂ al verter 90 μ L de una solución al 1% p/p en 2-propanol y dejar evaporar el disolvente. La superficie disponible por muestra fue de 3.8 cm² ya que esta es el área de un pozo de un plato de 12 de estos. Se utilizó un equipo Lentech SE400 para medir el espesor de las películas, este experimento fue repetido 3 veces en 3 diferentes muestras por cada PUU (N=3, n=3).

4.2.3 Cultivo de progenitores cardiacos

4.2.3.1 Muestras de cobertura por centrifugación (spin coating)

Se sembraron células Sca-1⁺/CD45⁻ a una densidad de 3000 células/cm² en los cubreobjetos con poliuretano-ureas, previamente esterilizados, y se les colocó en platos de 12 pozos con 3 mL de medio de cultivo consistente de IMDM suplementado con 10% de FBS, 1% de penicilina – estreptomicina. El medio de cultivo se cambio cada 48 horas y los pozos fueron lavados con PBS antes de agregar el nuevo medio.

4.2.3.2 Muestras de evaporación de disolvente

Se utilizó la misma metodología que con las muestras de cobertura por centrifugación.

4.2.4 Cultivo de células madre mesenquimales humanas

Se sembraron hMSCs a una densidad de 3000 células/cm² en muestras preparadas directamente en un plato de 12 pozos. Cada pozo fue llenado con 3 mL de medio de cultivo que consistía de MesenPRO RS™, este fue preparado de

medio basal Mesen PRO™ y el suplemento de crecimiento MesenPRO™. El medio de cultivo fue cambiado cada 24 horas y los pozos lavados con PBS antes de agregar el nuevo medio de cultivo.

4.2.5 Evaluación de proliferación de células madre mesenquimales

Los ensayos de proliferación se llevaron a cabo en un equipo Nucleo Counter NC-100 (Sartorius) de acuerdo a los protocolos del fabricante. El protocolo básico consiste en cultivar las células durante un tiempo previamente establecido, posteriormente se aspiró el medio de cultivo y se despegaron las células con una solución de tripsina/EDTA al 0.05%, para después resuspenderlas en 5 mL de medio MesenPRO, y después se mezclaron 200 µL de esta suspensión con un volumen igual del reactivo A100 (amortiguador de lisis/disgregación) y el reactivo B (amortiguador estabilizante). Finalmente estas suspensiones fueron medidas en el NC-100.

4.2.6 Análisis CyQuant en la proliferación de progenitores cardiacos

El estuche de proliferación CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit (C7026) provee un procedimiento para medir la densidad de las células en cultivo de forma rápida, cómoda y con una alta sensibilidad. El kit tiene un rango de detección lineal que va desde 50 (o menos) hasta 50,000 células en volúmenes de 200 µL con una sola concentración de colorante. Esta técnica es ideal para estudios de proliferación celular y conteo rutinario de células, asimismo puede ser utilizado para monitorear la adherencia celular a superficies. La base de este kit es el uso de un colorante fluorescente verde (patentado) CyQUANT® GR, el cual exhibe una fuerte fluorescencia al unirse al ácido nucleico celular. El protocolo básico consistió en cultivar las células durante el tiempo establecido, después se aspiró el medio de cultivo y posteriormente se almacenaron las muestras a -70°C hasta el momento de realizar el conteo. Al momento de llevar a cabo el conteo se descongeló el plato, se lisaron las células con un amortiguador que contiene el colorante fluorescente CyQUANT® GR y posteriormente se midió la fluorescencia a 520 nm (excitación 480 nm, emisión 520 nm). La fluorescencia es proporcional al número

de células (contenido de ADN). Para nuestro experimento se tomaron tres muestras de cada material por día y se utilizó el protocolo descrito. Con el fin de poder convertir las unidades relativas de fluorescencia al número de células se construyó una curva estándar de calibración. Para obtener esta curva estándar se preparó una solución concentrada de células (10^6 células/ml) y se colocaron cantidades conocidas de células desde 0 a 150,000 a diferentes pozos de cultivo, estas concentraciones conocidas de células fueron teñidas con CyQUANT para luego ser medidas en el fluorómetro, los resultados se muestran en la Figura 4.1.

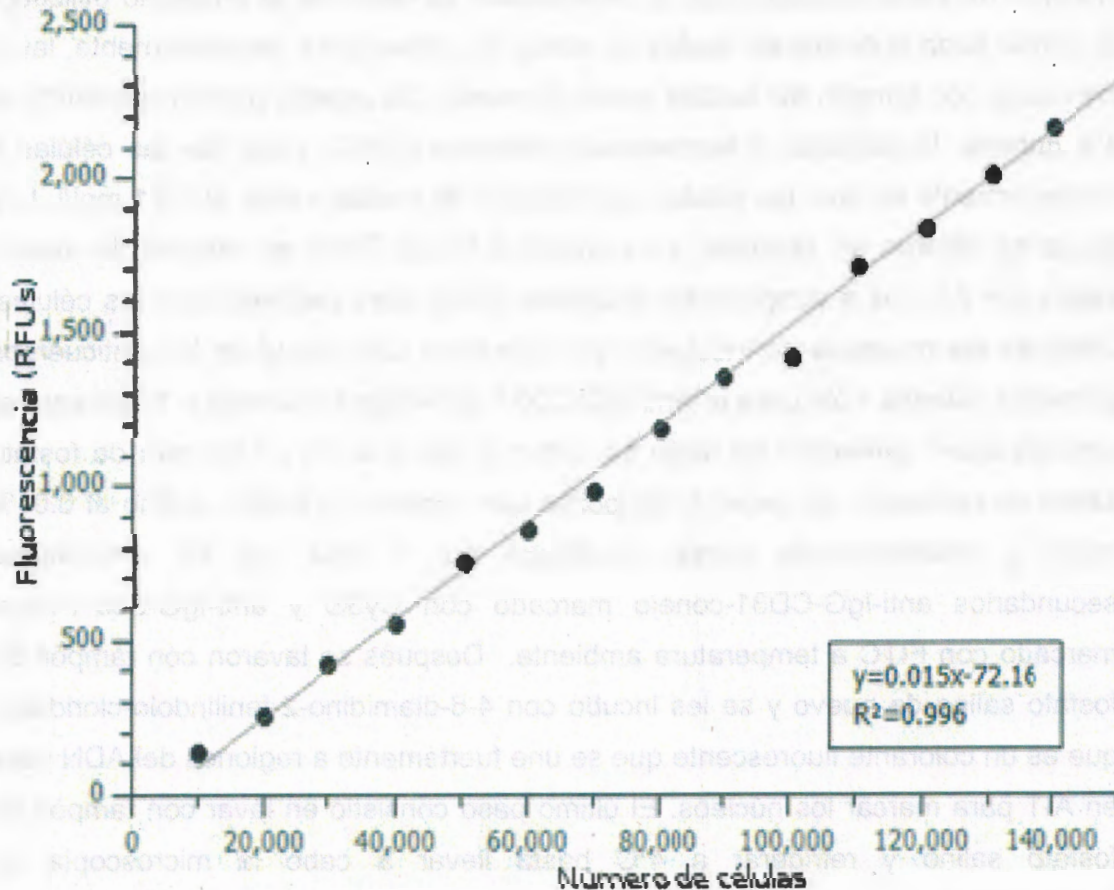


Figura 4.1 Curva de calibración de CyQuant® para CPC

4.2.7 Microscopía de contraste de fases y análisis de imágenes

Las imágenes de contraste de fases fueron tomadas en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE300 equipado con una cámara de video Qimaging QICAM Fast 1394 CCD (Surrey BC, Canadá) y el software de adquisición IPLabs (Scanalytics, Fairfax, VA). Se centró la cámara en los pozos y se tomaron cuatro imágenes al azar con objetivos de 4x y 10x en cada muestra.

4.2.8 Inmunocitoquímica

Con el fin de estudiar la expresión de los marcadores Sca-1 y CD31 se realizaron ensayos de inmunocitoquímica. A continuación se describe el protocolo utilizado. El primer paso consistió en aspirar el medio de cultivo para, posteriormente, lavar los pozos con tampón de fosfato salino (3 veces). Se agregó paraformaldehído al 4% durante 10 minutos, a temperatura ambiente (25°C), para fijar las células y posteriormente se lavó las células con tampón de fosfato salino al 0.01 mol/l. Los pozos se dejaron sin bloquear y se añadió 0.1% de Triton en tampón de fosfato salino por 2 horas a temperatura ambiente (25°C) para permeabilizar las células. Después las muestras se incubaron por una hora con 500 µl de los anticuerpos primarios diluidos 1:20 para el anti-IgG-CD31 generado en conejo y 1:200 para el anti-IgG-Sca-1 generado en ratón en Triton X-100 al 0.1% en tampón de fosfato salino de Dulbecco. Se lavaron los pozos con tampón de fosfato salino al 0.01% mol/L y posteriormente fueron incubados por 1 hora con los anticuerpos secundarios anti-IgG-CD31-conejo marcado con Cy3® y anti-IgG-Sca-1-ratón marcado con FITC a temperatura ambiente. Después se lavaron con tampón de fosfato salino de nuevo y se les incubó con 4-6-diamidino-2-fenilindolo-cloridrato, que es un colorante fluorescente que se une fuertemente a regiones del ADN ricas en A-T para marcar los núcleos. El último paso consistió en lavar con tampón de fosfato salino y refrigerar a 4°C hasta llevar a cabo la microscopía de fluorescencia.

Cuadro 4-1 Disolventes utilizados para recubrimiento por centrifugado y sus propiedades relevantes[210]

| Disolvente | Viscosidad (C _p @25°C) | Presión de vapor (KPa@20°C) |
|------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| Dimetilacetamida | 1.956 | 0.20 |
| Dimetilformamida | 0.802 | 0.38 |
| Dimetilsulfoxido | 2.0 | 0.061 |
| Tetrahidrofurano | 0.48 | 19.30 |

4.3 Resultados y Discusión

4.3.1.1 Recubrimiento por centrifugación

Se utilizaron varios disolventes para probar la eficacia de este método de fabricación de películas delgadas, los cuales se señalan en el cuadro 4-1. En el caso de las disoluciones de THF solamente se pudo obtener muestras con películas uniformes de PUU14, PUU23 y PUU32 ya que el PUU40 no se disolvió.

En los casos de la dimetilacetamida, dimetilsulfoxido y la dimetilformamida las películas presentaban áreas sin mojar y poca uniformidad, por lo cual no se les considero adecuadas para los estudios celulares. Esto se atribuyó a las propiedades de las disoluciones ya que las de alta viscosidad no formaban películas sino gotas que salían despedidas debido al efecto centrífugo. Esto se comprobó al disminuir la velocidad de rotación a 100 RPM, lo cual permitió la formación de películas más uniformes y gruesas, pero aumentaba el tiempo de evaporación de disolvente aproximadamente a 5 minutos por muestra. Otra de las propiedades del disolvente que ejerce una influencia en la morfología es la presión de vapor, mientras más alto el valor de esta, las películas fueron más uniformes y el polímero se distribuyo mejor[211]. El efecto de la presión de vapor es fácil de entender en términos del tiempo de evaporación y la formación de la película[212].

4.3.1.2 Evaporación de disolvente

La forma tradicional de obtener películas de polímero utilizadas para experimentos de cultivo celular involucra el uso de disolventes orgánicos como el THF, DMSO o DMF para obtener disoluciones y después obtener las muestras por evaporación de disolvente o cobertura por centrifugado[12, 86, 213, 214]. Una gran desventaja

de este método es el uso de disolventes que podrían generar toxicidad de no ser retirados completamente o filtrarse de los materiales[215, 216], otra desventaja es que la preparación de muestras requiere de la manipulación directa, lo que puede llevar a contaminación bacteriana.. En este estudio utilizamos 2-propanol como disolvente con el fin de evitar el uso de disolventes tóxicos, esto permitió la preparación de muestras por el vertido directo de la solución en el pozo, asimismo el disolvente se evaporó de manera rápida dejando pocos residuos.

4.3.1.3 Elipsometría

Se examinó las muestras con un microscopio óptico para determinar que las películas de polímero estuvieran presentes y se encontró que las muestras presentaban una morfología rugosa que se presenta en la Figura 4.2. En el caso del PUU14 se encontró una morfología similar a la observada en la PCL diol y en los casos de PUU23 y PUU32 se observó una morfología con poros y nervios. Todas las películas tuvieron espesores entre 60 y 80 nanómetros, este se consideró adecuado ya que una revisión de literatura arrojó que no se conoce el espesor mínimo para el cual una célula reconoce el material subyacente[217-221].

4.3.1.4 Cultivo de células progenitoras cardíacas

4.3.1.4.1 CPC en muestras de recubrimiento por centrifugación

Las CPC fueron cultivadas en estas superficies durante 7 días con el fin de comprobar su citocompatibilidad y medir la proliferación en estos poliuretanos elastoméricos biodegradables. La Figura 4.3 presenta las micrografías correspondientes al primer y último día de los cultivos. La cantidad de células, observadas, en los poliuretano-ureas y el poliestireno para cultivo de tejidos después de 24 h fue bastante similar. Esto se mantuvo hasta el final del experimento, lo cual indica que no hubo un efecto citotóxico de los PUU. Las células presentaron tamaños similares y morfología fibroblástica en todas las imágenes lo cual indica que no hubo diferenciación. Los resultados del capítulo

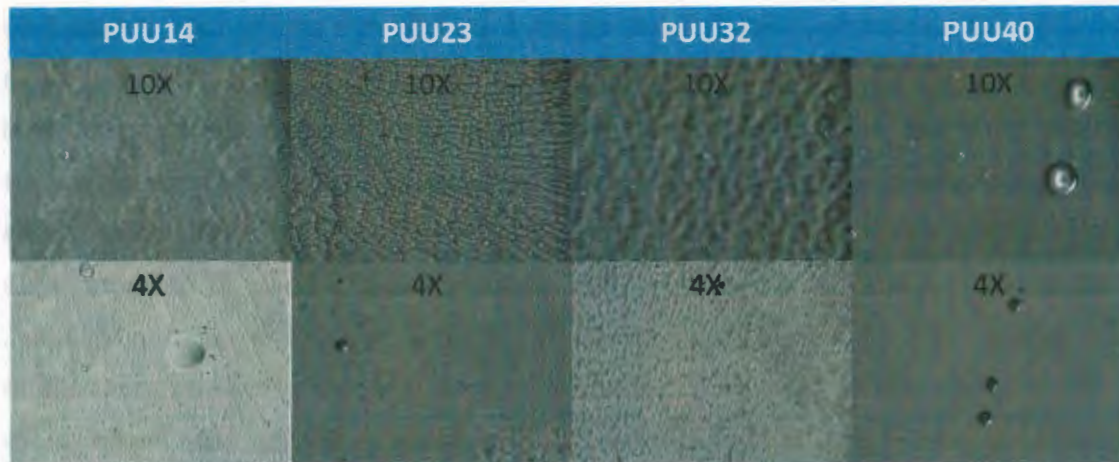


Figura 4.2 Imágenes de microscopía óptica de las muestras de Poliuretano-ureas

anterior mostraron que las superficies formadas por el THF presentaron rugosidades entre 3 y 10 nm aproximadamente, pero con una morfología homogénea. Esto puede explicar el hecho de que las CPC hayan crecido de manera similar al control de poliestireno para cultivo de tejidos (TCPS) ya que no hubo prácticamente ningún efecto de la rugosidad. Por otro lado, el efecto de la química superficial no parece haber ejercido ningún efecto en la proliferación.

4.3.1.4.2 CPC en muestras por evaporación de 2-propanol

Se cultivaron CPC en estas muestras de PUU14, PUU23, PUU32 y PUU40 por 96 horas para observar el efecto en la morfología (que normalmente es fibroblástica) y en la proliferación celular. Las imágenes muestran la evolución celular día a día para cada uno de los materiales y el control (Figura 4.4). Después de 24 horas de haber sembrado las CPC se observó una mayor cantidad de células adheridas en los poliuretano-ureas al compararlos con el TCPS, lo cual se atribuyó a la mayor rugosidad que otorgó una mayor cantidad de sitios de anclaje[222, 223]. Según resultados reportados las superficies de TCPS obtenidas de Corning tienen una rugosidad RMS de aproximadamente 8 nm[224] con una amplia homogeneidad superficial y según nuestros resultados los PUU tenían rugosidades entre 3 nm y 10 nm aproximadamente. No se midió la adhesión celular de manera inmediata

después del sembrado pero después de 24 h se observó una menor cantidad de células en el PUU14 y el TCPS al compararlos con los otros PUU. Al observar los resultados a las 48 h y 72 h los PUU tenían aproximadamente dos veces el número de células que el TCPS. Sin embargo a las 96 h se observó que el PUU14 y el TCPS tuvieron una mayor proliferación celular que los demás poliuretanos (Figura 4.4). Esto se atribuyó a dos fenómenos[225-227], el primero esta relacionado con la confluencia celular y el área disponible para migración. Consideramos que en los tres PUU, en los que se observó una disminución de la rapidez de proliferación, la superficie para migración celular fue menor y los contactos intercelulares inhibieron la rapidez de proliferación[225]. El segundo efecto al cual se atribuyó estos resultados fue la liberación de poliaminas, en particular algún análogo de putrescina, las cuales al liberarse disminuyeron la rapidez de proliferación e influyeron en el tiempo de duplicación celular[226-228]. Este efecto aumentó conforme se incrementó el contenido de segmentos rígidos. En el cuadro 4-2 se presenta las ecuaciones de regresión exponencial y los tiempos de duplicación para las células en cada material. Es importante mencionar que aun cuando la degradación liberó estos productos, los poliuretanos pueden haberse degradado a diferentes tiempos, lo cual habría influido en la concentración de análogos de putrescina. Otro de los factores que influye sobre el comportamiento celular es la nanotopografía: puede inducir la diferenciación[229, 230], mimetizar la matriz extracelular[231], modificar la adhesión celular[232], la organización del citoesqueleto e incluso influir en la proliferación celular[233]. En este trabajo caracterizamos las superficies formadas por los PUU y estas tuvieron rugosidades en el intervalo de 3 nm a 22 nm para 4 disolventes (Cuadro 3-2). Tomando como ejemplo el caso de las películas de THF, las rugosidades decrecen en el orden siguiente

PUU14 > TCPS > PUU40 > PUU32 > PUU23

Y los tiempos de duplicación decrecen en el siguiente orden (cuadro 4-2)

PUU23 > PUU40 > PUU32 > PUU14 > TCPS

Cuadro 4-2 Ecuaciones de crecimiento celular y tiempos de duplicación de CPC en PUU.

| Material | Ecuación de regresión exponencial (Crecimiento celular) | Tiempo de duplicación (horas) | RMS (THF) (nm) |
|----------|--|----------------------------------|----------------------|
| TCPS | $2109.5288 * e^{0.0455 * \text{time}}$ | 15.22 | 8 |
| PUU14 | $6746.2397 * e^{0.0346 * \text{time}}$ | 20.05 | 9.76 |
| PUU23 | $13118.7702 * e^{0.0254 * \text{time}}$ | 27.34 | 2.44 |
| PUU32 | $9872.0709 * e^{0.0306 * \text{time}}$ | 22.67 | 5.09 |
| PUU40 | $11676.7063 * e^{0.0273 * \text{time}}$ | 25.39 | 5.49 |

Esto deja claramente establecida una relación entre la rugosidad y la proliferación ya que el PUU23, que presentó la menor rugosidad de los cuatro PUU fue también el que presentó el mayor tiempo de duplicación. En contraste el PUU14 que presento la mayor rugosidad fue el que tuvo el menor tiempo de duplicación celular de los PUU. Sin embargo, en el caso del TCPS se observó el efecto contrario, aun cuando era el de menor rugosidad presentó el menor tiempo de duplicación. Esto se explicó de manera clara en los párrafos anteriores ya que el TCPS no presentó restricciones a la expansión celular ni liberó análogos de putrescina. Los casos de PUU32 y PUU40 nos llevaron a concluir que aun cuando hay una relación entre la rugosidad y la proliferación al tener rugosidades muy semejantes este efecto no fue tan claro ya que se esperaba una mayor proliferación de PUU32 al ser el menos rugoso.

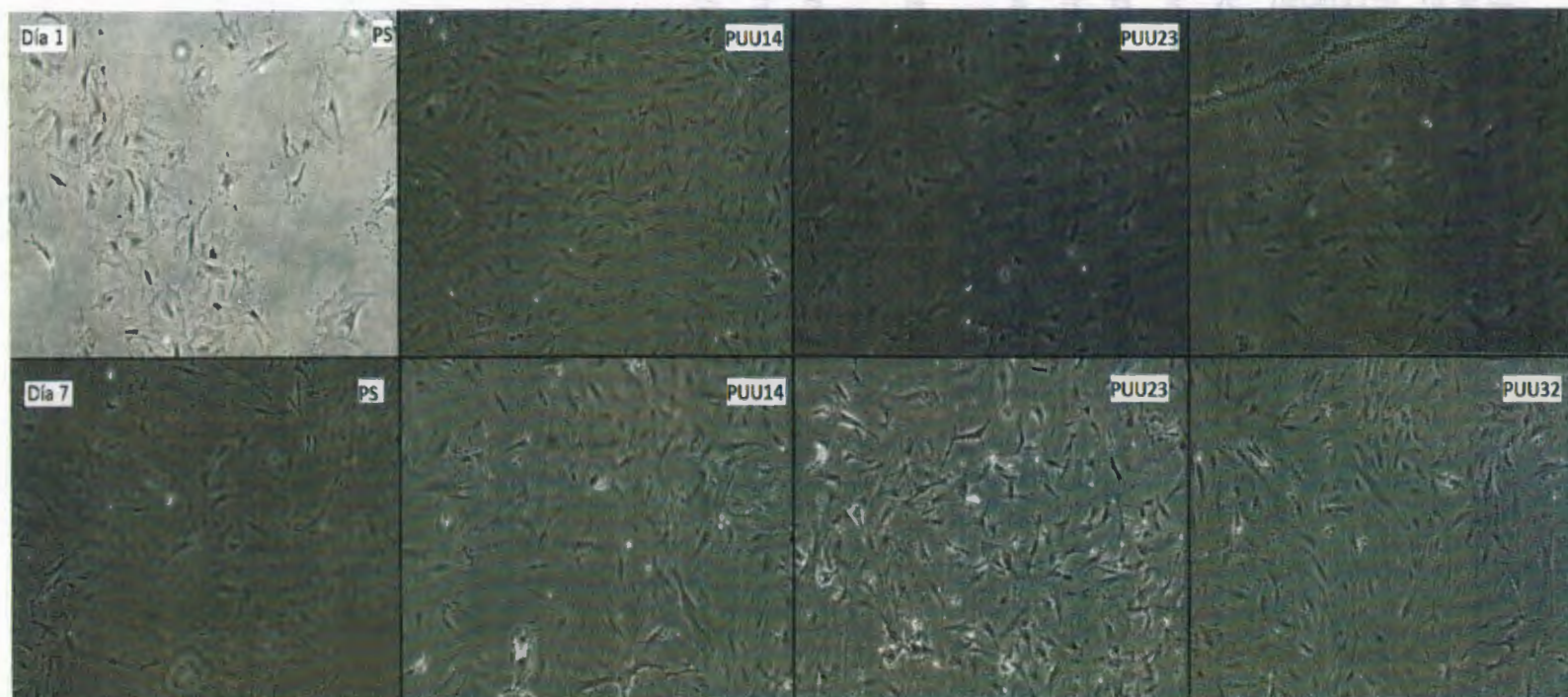


Figura 4.3 Imágenes de microscopio de fases para el cultivo de CPC en muestras obtenidas por recubrimiento por centrifugación con disoluciones de tetrahidrofurano. La primera fila muestra el control de poliestireno para cultivo de tejidos y los PUU14, PUU23 y PUU32 después de 24 horas de haber sembrado las células. La segunda fila muestra los mismos materiales para 168 horas después del sembrado.

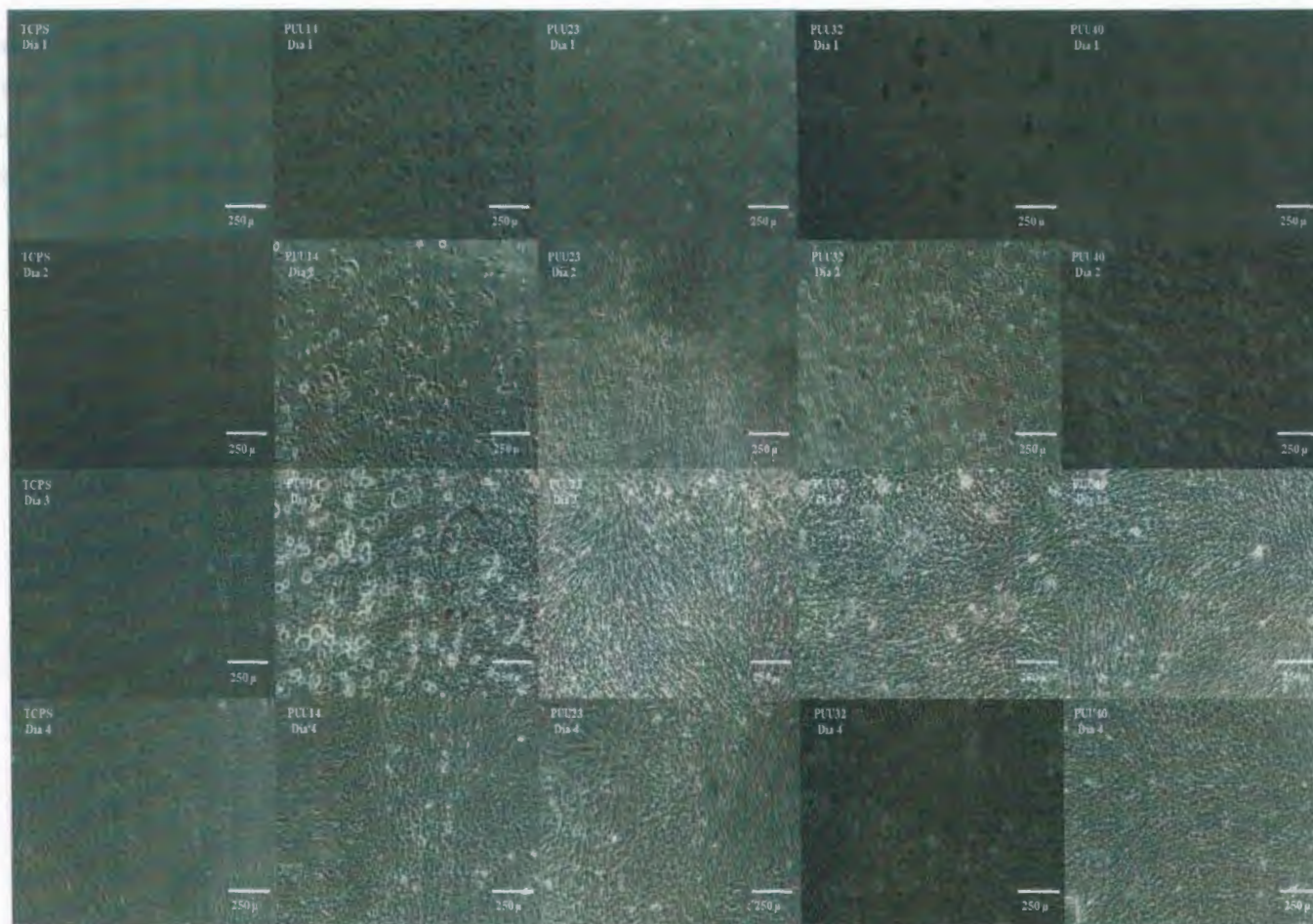


Figura 4.4 Las imágenes muestran la proliferación de las CPC en poliestireno para cultivo de tejidos y los cuatro PUU. En la primera fila se observa las células 24 horas después de la siembra. En la última fila se muestra la imagen 96 horas después de la siembra de las CPC.

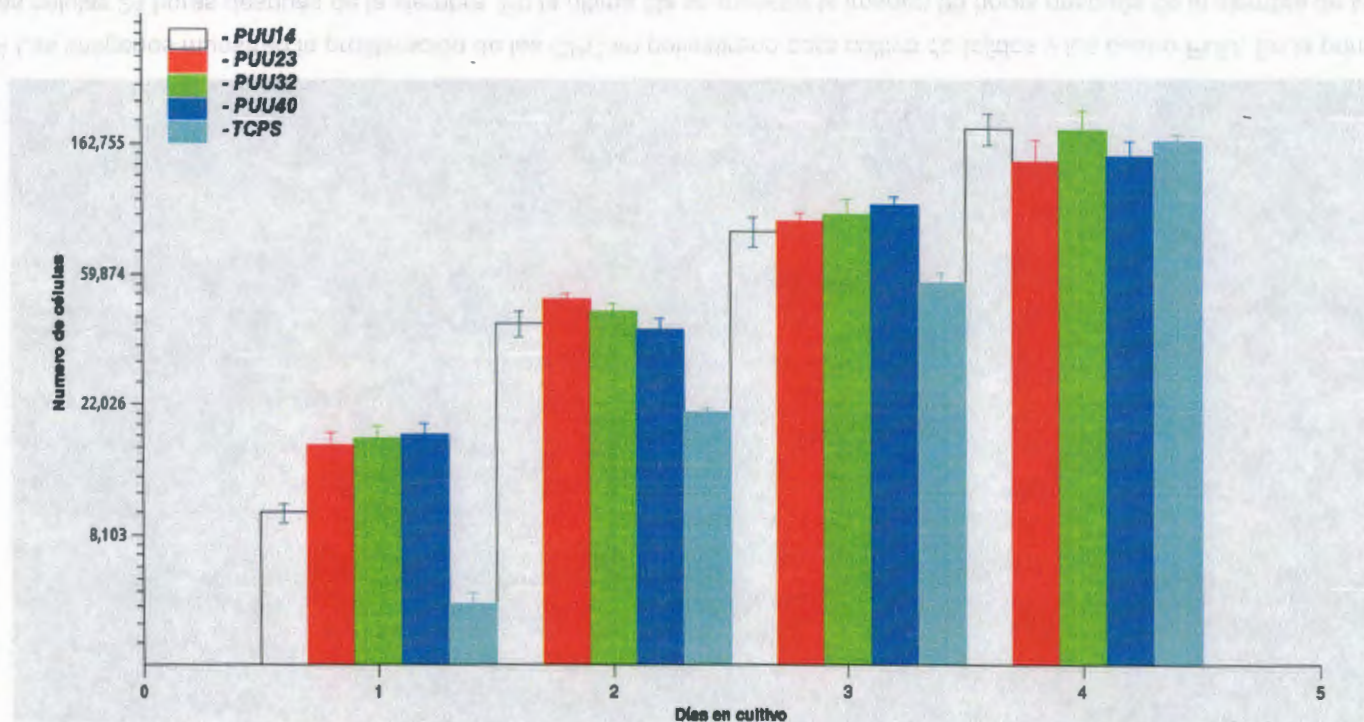


Figura 4.5 En la gráfica se observan los resultados de CyQuant® para los estudios de proliferación de las CPC en los cuatro PUU y el poliestireno para cultivo de tejidos. Estos resultados muestran la gran diferencia en la cantidad de células en los PUU y el TCPS después de 24 horas. Asimismo en el lado derecho de la gráfica se observa de manera clara que al final del experimento (96 horas) la cantidad de células era similar en todos los materiales.

4.3.1.5 Cultivo de células madre mesenquimales humanas

Toma *et al*, entre otros, han diferenciado las células madre mesenquimales humanas en cardiomiocitos[234] y eso las convierte en células importantes para la ingeniería de tejidos del corazón. Por lo tanto, la supervivencia de estas células es una condición importante para el trabajo a largo plazo con este tipo de materiales (poliuretano-ureas). La Figura 4.6 muestra las imágenes del cultivo, durante cinco días, de las células madre mesenquimales humanas en los PUU. Inicialmente se observa una mayor adhesión en los poliuretano-ureas que en el TCPS, esto fue atribuido a la rugosidad de los materiales que puede haber favorecido la formación de adhesiones focales celulares[235]. En los cinco días de cultivo no se observó ningún cambio morfológico en las células, esto significa que las células se están renovando en la superficie y podrían ser inducidas a diferenciarse por métodos de factores solubles o estímulos mecánicos posteriormente. La proliferación celular fue similar en los PUU y el TCPS (Figura 4.7). Buscando analizar el efecto de la rugosidad de los PUU se repitió el mismo análisis que para el cultivo de los CPC. Tomando como ejemplo el caso de las películas de THF, las rugosidades decrecen en el orden siguiente:

PUU14 > TCPS > PUU40 > PUU32 > PUU23

Y los tiempos de duplicación decrecen en el siguiente orden

PUU32 > PUU40 > PUU14 > TCPS > PUU23

Por lo tanto, concluimos que en este caso la menor rugosidad del PUU23 permitió una mayor rapidez de proliferación que los otros materiales con una mayor rugosidad RMS.

Cuadro 4-3 Ecuaciones de crecimiento celular y tiempos de duplicación de células madre mesenquimales humanas en los PUU.

| Material | Ecuación de regresión exponencial (Crecimiento celular) | Tiempo de duplicación (horas) | RMS (THF) (nm) |
|----------|---|-------------------------------|----------------|
| TCPS | $256154.0075 * e^{0.0127 * \text{time}}$ | 54.4 | 8 |
| PUU14 | $372703.0541 * e^{0.0124 * \text{time}}$ | 56 | 9.76 |
| PUU23 | $276633.8795 * e^{0.0183 * \text{time}}$ | 37.8 | 2.44 |
| PUU32 | $399691.3898 * e^{0.0097 * \text{time}}$ | 71.1 | 5.09 |
| PUU40 | $319098.8738 * e^{0.0117 * \text{time}}$ | 59.2 | 5.49 |

4.3.1.6 Inmunocitoquímica

Este experimento fue diseñado para determinar si los poliuretanos ejercen alguna influencia sobre la diferenciación de las CPC. Estas células son positivas para el marcador Sca-1 lo cual indica que son potencialmente diferenciables en otros tipos de células. Asimismo, estas células son negativas para los marcadores CD45 (muscular) y CD31 (endotelial). Por lo tanto, estas células son progenitores cardiovasculares y pueden diferenciarse en cardiomiocitos o células endoteliales cardiovasculares. *Ye et al* las han diferenciado en células endoteliales al cultivarlas en gelatina o agregarles el factor de crecimiento endotelial vascular en un tiempo de 3 días y en cardiomiocitos por medio del factor 5-Azacidina[106]. En nuestro caso el cultivo de los CPC en los poliuretanos durante 3 días no evidenció ninguna diferencia en la morfología de las CPC, seguían teniendo una apariencia fibroblástica (endotelial), por lo cual se utilizaron anticuerpos para marcar esta potencialidad de convertirse en células endoteliales. Los resultados de los controles de PS fueron muy claros y se pudo observar desde el primer día una respuesta positiva al marcador Sca-1 y una negativa al CD31, con lo cual se comprueba que no hay una influencia del TCPS en la potencialidad de estas células. En el caso de los poliuretano-ureas se demostró que son suficientemente rígidos para no comprometer a las células hacia la línea endotelial. Se observó una disminución del marcador Sca-1 al final del experimento, lo cual indica una disminución en la potencialidad (Figura 4.8). Estos resultados indican que el cultivo de CPC en los poliuretano-ureas permitiría tener la cantidad adecuada de células

antes de ser trasplantadas al miocardio y diferenciarlas *in vitro* según las necesidades. Esto es importante ya que la única vía para hacer llegar células al corazón, que se integren y sobrevivan es la ingeniería de tejidos. En estudios llevados a cabo en modelos animales pequeños, como estudios preclínicos, se ha obtenido éxitos esperanzadores con una gran variedad de células. Desafortunadamente, al trasladar estos experimentos a humanos los resultados han sido decepcionantes. Probablemente varios factores sean importantes al explicar este fenómeno, sin embargo el tamaño es tal vez el más importante. El corazón humano adulto pesa aproximadamente entre 300 y 350 g, en comparación, el corazón de un ratón pesa entre 0.5 y 1 g[236, 237]. Proporcionalmente se necesitaría una dosis 300 veces mayor de células para que esta fuera equivalente en humanos y ratones. Adicionalmente, la pared ventricular izquierda del ratón tiene un espesor de aproximadamente 1 mm, en comparación el corazón humano tiene una pared del ventrículo izquierdo de entre 7 y 11 mm de espesor. Por lo tanto, las capas de células trasplantadas tienen que ser al menos diez veces más gruesas en humanos que en ratones[238]. Dado que estos PUU han demostrado ser capaces de soportar altas densidades celulares *in vitro* es lógico esperar que los andamios obtenidos de ellos soporten la invasión celular hasta obtener números adecuados para el tratamiento.

4.4 Conclusiones

Se comprobó por medio de la siembra de dos líneas celulares diferentes que estos materiales son citocompatibles con ellas. Asimismo se realizaron estudios de inmunocitoquímica y se comprobó que estos materiales no producen una diferenciación espontánea de los CPC hacia la línea endotelial. Con este resultado se puede concluir que hay una alta probabilidad de hacer “parches cardiacos” que puedan llevar células progenitoras no diferenciadas en gran número hasta el lugar del infarto y posteriormente permitir una diferenciación *in situ* al implantarlo.

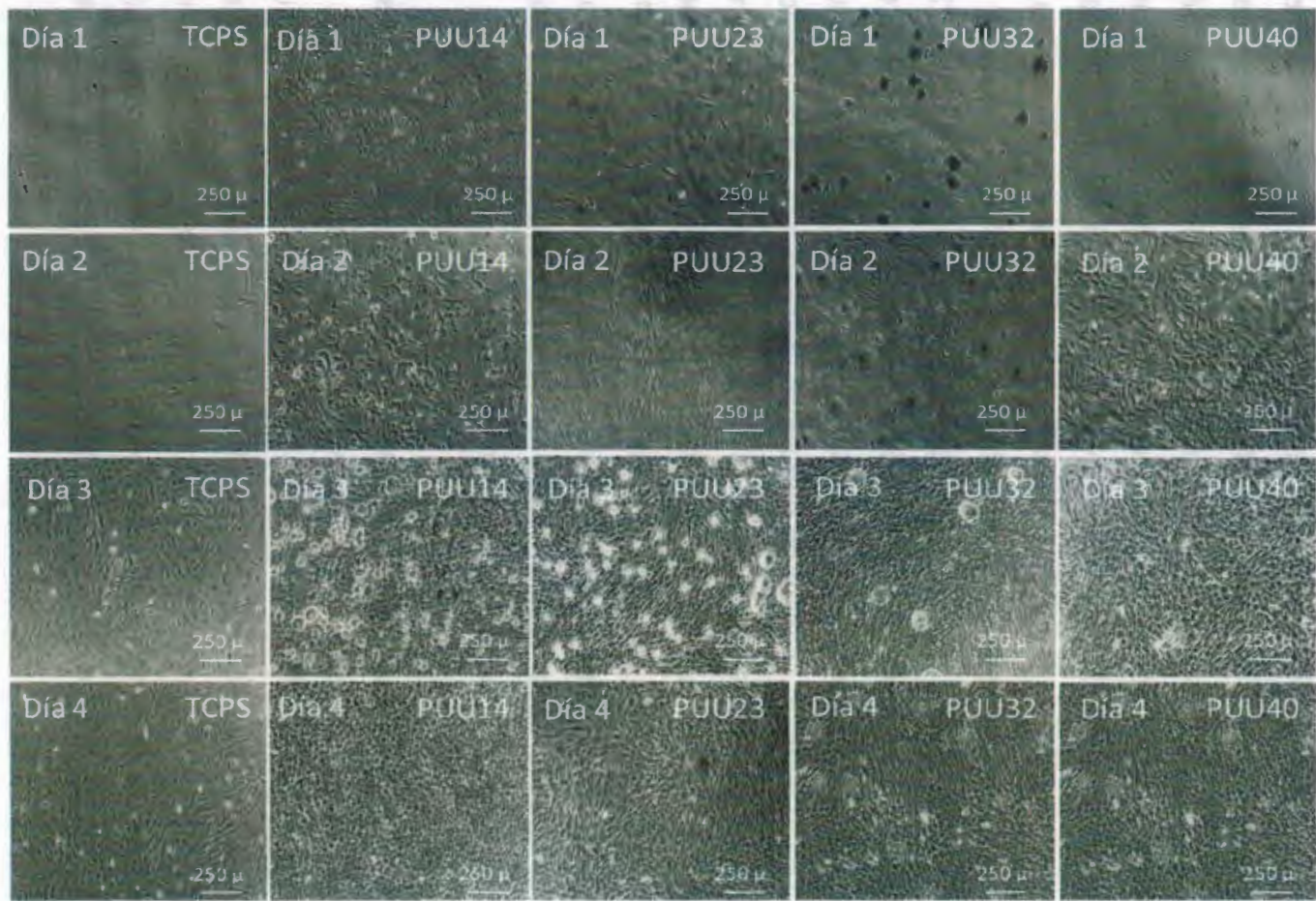


Figura 4.6 Las imágenes muestran la proliferación de las hMSC en poliestireno para cultivo de tejidos y los cuatro PUU. En la primera fila se observa las células 24 horas después de la siembra. En la última fila se muestra la imagen 96 horas después de la siembra de las CPC.

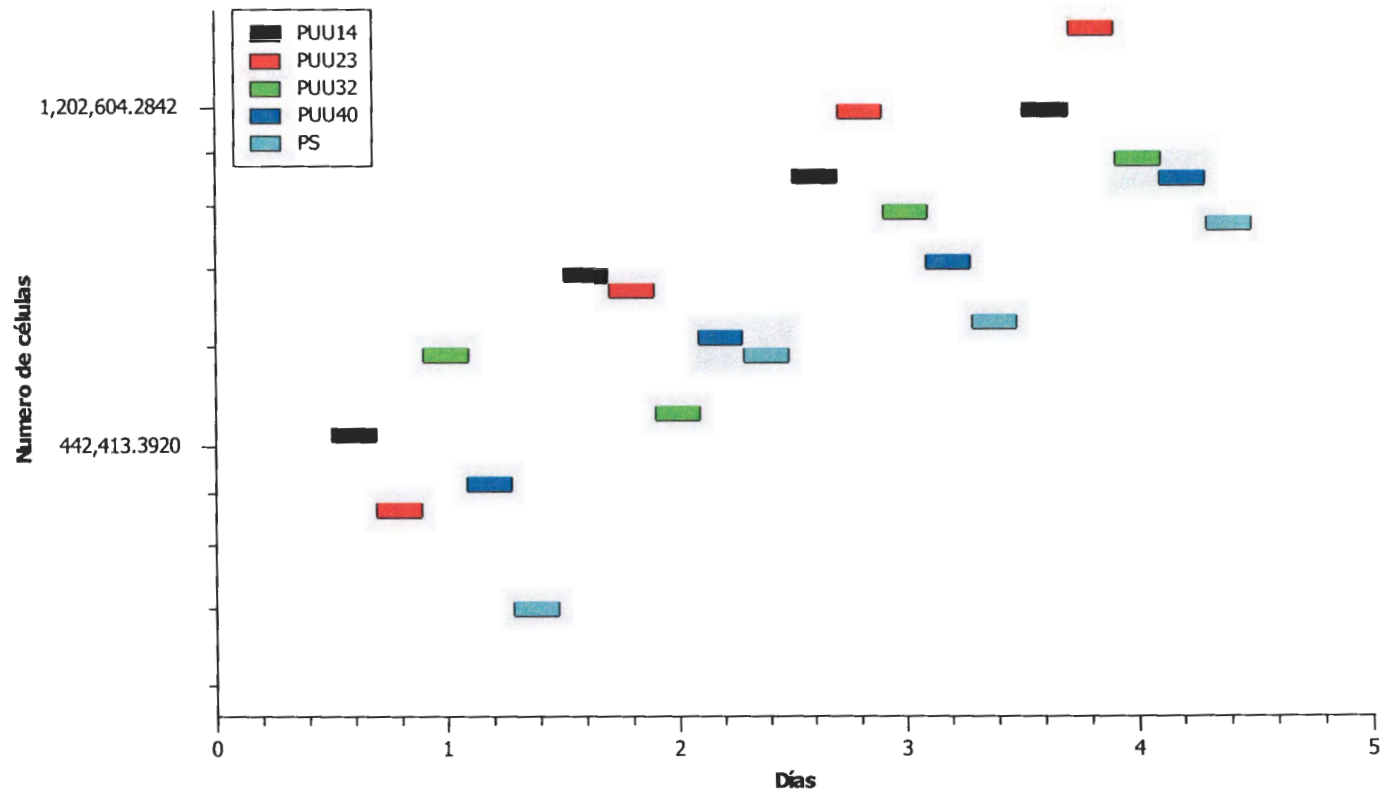


Figura 4.7 En la gráfica se observan los resultados de CyQuant® para los estudios de proliferación de las CPC en los cuatro PUU y el poliestireno para cultivo de tejidos. Estos resultados muestran la gran diferencia en la cantidad de células en los PUU y el TCPS después de 24 horas. Asimismo, en el lado derecho de la gráfica se observa de manera clara que al final del experimento (96 horas) la cantidad de células era similar en todos los materiales, exceptuando el PUU23 que tenía una mayor cantidad de células.

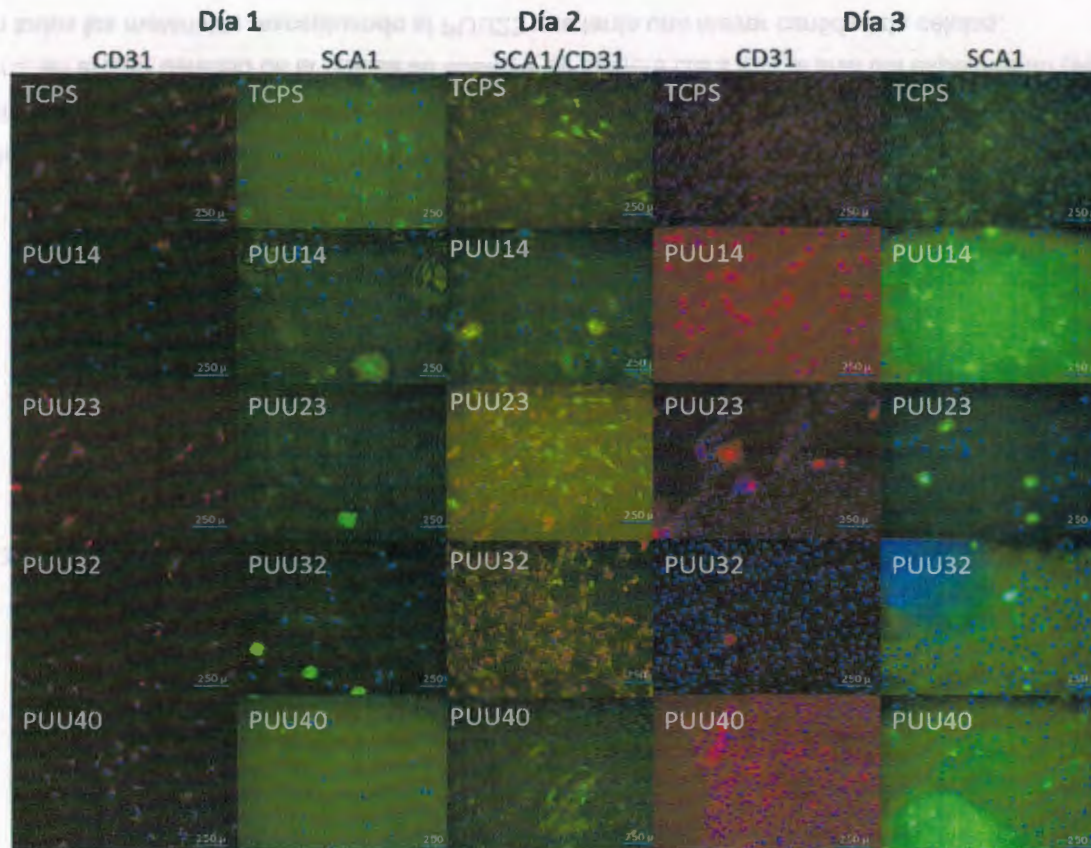


Figura 4.8 En las imágenes se observa las imágenes del estudio de inmunocitoquímica de los CPC cultivados en los PUU. En la primeras dos columnas se encuentran las imágenes de las células marcadas con CD31 y DAPI después de 24 horas de cultivo. En la tercera columna se encuentran las imágenes de los mismos marcadores y materiales pero para 48 horas (sobrepuestos). Y finalmente en la tercera y cuarta columnas se encuentran los resultados para 72 horas de cultivo. Estos resultados se encuentran analizados en el texto.

Capitulo 5

Conclusiones

y

Perspectivas

5 Conclusiones de la tesis

Se sintetizaron poliuretanos ureas biodegradables basados en policaprolactona, HMDI (diisocianato alifático), y 1, 4-butanodiamina (putrescina) siguiendo el método de May-Hernández *et al*[192]. La cristalinidad de estos poliuretano-ureas se vio afectada por el incremento en los segmentos rígidos ya que la movilidad de las cadenas fue limitada por los enlaces por puentes de hidrogeno, y en consecuencia, la capacidad de cristalizar del segmento suave también disminuyó. En este trabajo solamente fue posible encontrar segregación de fases en PUU40 en el nivel nanométrico (~300 nm). Se comprobó la biocompatibilidad por medio de los cultivos de dos tipos de células que prometen ser fuentes de cardiomiocitos funcionales: los progenitores cardiacos y las células madre mesenquimales humanas. Se obtuvieron resultados alentadores en el cultivo de ambas líneas celulares en muestras por moldeo por centrifugado (THF) y muestras por evaporación de 2-propanol. Se concluyó que estas células son capaces de multiplicarse y sobrevivir sobre las superficies de PUU. Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica y se halló que los PUU no comprometían a los CPC hacia ningún fenotipo sino que mantenían su potencialidad. Esto demuestra que los materiales podrían soportar el cultivo de CPC o hMSC *in vitro* para posteriormente ser implantados y permitir la diferenciación *in vivo*. Los progenitores cardiacos utilizados en este trabajo fueron aislados por ye *et al* en 2011, y por lo tanto en este momento no han sido probados en muchos biomateriales. La publicación sobre su obtención y uso potencial en regeneración cardiaca acaba de ser publicada[106]. Por lo tanto, el cultivo de estas CPC en estos PUU es un trabajo novedoso que no se había realizado previamente. Finalmente, el demostrar que las hMSCs pueden proliferar y mantener su fenotipo en estos materiales es también trabajo novedoso ya que esto nunca se había comprobado.

5.1 Perspectivas

- Diseñar extensores de cadena basados en péptidos con secuencias variadas con el fin de obtener un arreglo de elastómeros sintéticos sensibles a las enzimas y con diferentes perfiles degradativos.
- Probar parámetros de electrospinning de manera sistemática para obtener nanofibras con el fin de estudiar el efecto del tamaño de estas en las propiedades del andamio y su desempeño. Con el fin de observar fibras que mimeticen la matriz extracelular de fibras de colágeno.
- Comprobar las propiedades mecánicas de nanofibras individuales de estos materiales con el fin de entender lo que experimentan las células cardíacas. Exponer células cardíacas a fibras de diferentes diámetros para observar su comportamiento.
- Determinar las propiedades mecánicas de los Poliuretano-ureas en estado hidratado.
- Cultivar CPC en los Poliuretano-ureas y guiar su diferenciación para obtener un constructo que pueda ser implantado.

6 Bibliografía

1. Instituto Nacional de Salud, P., *Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2000*. Salud Pública de México, 2002. **44**(3): p. 226-282.
2. Salud, S.N.d.I.e. *Mortalidad*. [Web] 2011 [cited 2011 09/01/11]; Mortalidad - Información Tabular]. Available from: <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>.
3. Lloyd-Jones, D., et al., *Heart disease and stroke statistics--2010 update. A report from the American Heart Association*. Circulation, 2010. **7**(121): p. e46-e215.
4. Roger, V.L., et al., *Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2011. **123**(4): p. e18-e209.
5. Uusimaa, P., et al., *Collagen scar formation after acute myocardial infarction: relationships to infarct size, left ventricular function, and coronary artery patency*. Circulation, 1997. **96**(8): p. 2565-72.
6. Colucci, W.S., *Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling*, in *Molecular Cardiology in Clinical Practice*, M. Sanders and J.B. Kostis, Editors. 1999, Springer US. p. 29-42.
7. Gelfand, E. and C. Cannon, *Myocardial infarction: contemporary management strategies*. Journal of internal medicine, 2007. **262**(1): p. 59-77.
8. Saito, S., et al., *Cardiac fibrosis and cellular hypertrophy decrease the degree of reverse remodeling and improvement in cardiac function during left ventricular assist*. J Heart Lung Transplant, 2010. **29**(6): p. 672-9.
9. Williams, D.F., *Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986*. Vol. 4. 1987: Elsevier Science Ltd.

10. Zdrahala, R.J. and I.J. Zdrahala, *Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future*. Journal of Biomaterials Applications, 1999. **14**(1): p. 67-90.
11. McDevitt, T., et al., *In vitro generation of differentiated cardiac myofibers on micropatterned laminin surfaces*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2002. **60**(3): p. 472-479.
12. McDevitt, T.C., et al., *Spatially organized layers of cardiomyocytes on biodegradable polyurethane films for myocardial repair*. Journal of Biomedical Materials Research, 2003. **66**(3): p. 586-595.
13. Weinhaus, A.J. and K.P. Roberts, *Anatomy of the Human Heart*, in *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices*, P.A. Iaizzo, Editor 2005, Humana Press. p. 51-79.
14. Caceci, T. *Cardiovascular System: Myocardium and Heart*. Available from: <http://www.vetmed.vt.edu/education/curriculum/VM8054/Labs/Lab12a/Lab12a.htm>.
15. Severs, N., *Constituent cells of the heart and isolated cell models in cardiovascular research*, in *Isolated adult cardiomyocytes*, H. Piper and G. Isenberg, Editors. 1989, CRC Press: Boca raton. p. 3-41.
16. Weinhaus, A.J. and K.P. Roberts, *Anatomy of the Human Heart*, in *Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices*, P.A. Iaizzo, Editor 2009, Humana Press. p. 59-85.
17. Sperelakis, N., *Heart physiology and pathophysiology* 2001, San Diego California: Academic Press. 1261.
18. Walker, C.A. and F.G. Spinale, *The structure and function of the cardiac myocyte: a review of fundamental concepts*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 1999. **118**(2): p. 375.

19. LeGrice, I., A. Pope, and B. Smaill, *The Architecture of the Heart: Myocyte Organization and the Cardiac Extracellular Matrix*, 2005.
20. Rockwood, D., et al., *Culture on electrospun polyurethane scaffolds decreases atrial natriuretic peptide expression by cardiomyocytes in vitro*. *Biomaterials*, 2008. **29**(36): p. 4783-4791.
21. Cormack, D.H., *Essential histology*2001: Lippincott Williams & Wilkins.
22. Goldsmith, E.C., et al., *Organization of fibroblasts in the heart*. *Developmental dynamics*, 2004. **230**(4): p. 787-794.
23. Eghbali, M., et al., *Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats**. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 1988. **20**(3): p. 267-276.
24. Kanekar, S., et al., *Cardiac Fibroblasts:: Form and Function*. *Cardiovascular Pathology*, 1998. **7**(3): p. 127-133.
25. Manabe, I., T. Shindo, and R. Nagai, *Gene expression in fibroblasts and fibrosis*. *Circulation Research*, 2002. **91**(12): p. 1103-1113.
26. Robinson, T., L. Cohen-Gould, and S. Factor, *Skeletal framework of mammalian heart muscle. Arrangement of inter-and pericellular connective tissue structures*. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 1983. **49**(4): p. 482.
27. De Souza, R., *Aging of myocardial collagen*. *Biogerontology*, 2002. **3**(6): p. 325-335.
28. Janicki, J.S. and G.L. Brower, *The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function*. *Journal of cardiac failure*, 2002. **8**(6): p. S319-S325.

29. McElhinny, A., S. Labeit, and C. Gregorio, *Probing the functional roles of titin ligands in cardiac myofibril assembly and maintenance*. *Advances in experimental medicine and biology*, 2000. **481**: p. 67-88.
30. Miskon, A., et al., *Beating behavior of primary neonatal cardiomyocytes and cardiac-differentiated P19. CL6 cells on different extracellular matrix components*. *Journal of Artificial Organs*, 2009. **12**(2): p. 111-117.
31. Parker, K.K. and D.E. Ingber, *Extracellular matrix, mechanotransduction and structural hierarchies in heart tissue engineering*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2007. **362**(1484): p. 1267-1279.
32. MacKenna, D., S. Summerour, and F. Villarreal, *Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis*. *Cardiovascular research*, 2000. **46**(2): p. 257.
33. Kögler, H., et al., *Mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat*. *Circulation Research*, 2003. **93**(3): p. 230-237.
34. Ross, R.S., *Molecular and mechanical synergy: cross-talk between integrins and growth factor receptors*. *Cardiovascular research*, 2004. **63**(3): p. 381.
35. Sadoshima, J., et al., *Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy*. *Journal of Biological Chemistry*, 1992. **267**(15): p. 10551.
36. Swynghedauw, B., *Molecular mechanisms of myocardial remodeling*. *Physiological reviews*, 1999. **79**(1): p. 215-262.
37. Kumar, V., et al., *Basic pathology*1992: Saunders Philadelphia.
38. Blankesteyn, W., et al., *Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice*. *Acta physiologica scandinavica*, 2001. **173**(1): p. 75-82.

39. Sun, Y. and K.T. Weber, *Infarct scar: a dynamic tissue*. Cardiovascular research, 2000. **46**(2): p. 250.
40. Jessup, M., et al., *2009 Focused Update: ACCF/AHA Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults*. Circulation, 2009. **119**(14): p. 1977-2016.
41. Ambardekar, A.V. and P.M. Buttrick, *Reverse remodeling with left ventricular assist devices: a review of clinical, cellular, and molecular effects*. Circ Heart Fail, 2011. **4**(2): p. 224-33.
42. Dorfman, J., et al., *Myocardial tissue engineering with autologous myoblast implantation*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 1998. **116**(5): p. 744-751.
43. Chiu, R., *Cardiac cell transplantation: the autologous skeletal myoblast implantation for myocardial regeneration*. Advances in cardiac surgery, 1999. **11**: p. 69.
44. Koh, G., et al., *Long-term survival of AT-1 cardiomyocyte grafts in syngeneic myocardium*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 1993. **264**(5): p. H1727.
45. Soonpaa, M.H., et al., *Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium*. Science, 1994. **264**(5155): p. 98.
46. Reinecke, H., et al., *Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts*. Circulation, 1999. **100**(2): p. 193-202.
47. Scorsin, M., et al., *Can grafted cardiomyocytes colonize peri-infarct myocardial areas?* Circulation, 1996. **94**(9): p. 337-340.
48. Scorsin, M., et al., *Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium?* Circulation, 1997. **96**(9): p. II-188.

49. Scorsin, M., et al., *Can cellular transplantation improve function in doxorubicin-induced heart failure? Commentary.* *Circulation*, 1998. **98**(19): p. II. 151-II. 156.
50. Li, R.K., et al., *Cardiomyocyte transplantation improves heart function.* *The Annals of Thoracic Surgery*, 1996. **62**(3): p. 654-661.
51. Li, R.K., et al., *In vivo survival and function of transplanted rat cardiomyocytes.* *Circulation Research*, 1996. **78**(2): p. 283-288.
52. Leor, J., et al., *Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium?* *Lead Article*, 1996. **98**: p. 164.
53. Leor, J. and S. Cohen, *Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart.* *ANNALS-NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES*, 2004. **1015**: p. 312-319.
54. Battler, A. and J. Leor, *Stem cell and gene-based therapy : frontiers in regenerative medicine* 2006, London: Springer. xvii, 422 p.
55. Pittenger, M.F. and B.J. Martin, *Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics.* *Circulation Research*, 2004. **95**(1): p. 9.
56. Zisa, D., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a key therapeutic trophic factor in bone marrow mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair.* *Biochemical and biophysical research communications*, 2009. **390**(3): p. 834-838.
57. Jian-an, W., et al., *Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplanted into damaged rabbit heart to improve heart function.* *Journal of Zhejiang University-Science B*, 2005. **6**(4): p. 242-248.
58. Berry, M.F., et al., *Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance.* *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2006. **290**(6): p. H2196-H2203.

59. Imanishi, Y., et al., *Allogenic mesenchymal stem cell transplantation has a therapeutic effect in acute myocardial infarction in rats*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2008. **44**(4): p. 662.
60. Yeghiazarians, Y., et al., *Injection of Bone Marrow Cell Extract Into Infarcted Hearts Results in Functional Improvement Comparable to Intact Cell Therapy*. Mol Ther, 2009. **17**(7): p. 1250-1256.
61. Gaur, M., et al., *Timed inhibition of p38MAPK directs accelerated differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes*. Cytotherapy, 2010. **12**(6): p. 807-817.
62. Angeli, F.S. and Y. Yeghiazarians, *Bone Marrow Cell Therapy for Acute Myocardial Infarction: A Clinical Trial Review*. Stem Cells & Regenerative Medicine, 2011: p. 265-277.
63. Dvir, T., et al., *Prevascularization of cardiac patch on the omentum improves its therapeutic outcome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(35): p. 14990.
64. Suuronen, E.J., D. Kuraitis, and M. Ruel, *Improving Cell Engraftment with Tissue Engineering*. Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2008. **20**(2): p. 110-114.
65. Fujimoto, K.L., et al., *An elastic, biodegradable cardiac patch induces contractile smooth muscle and improves cardiac remodeling and function in subacute myocardial infarction*. Journal of the American College of Cardiology, 2007. **49**(23): p. 2292-2300.
66. Wall, S.T., et al., *Theoretical impact of the injection of material into the myocardium: a finite element model simulation*. Circulation, 2006. **114**(24): p. 2627.
67. Wall, S.T., et al., *Biomimetic matrices for myocardial stabilization and stem cell transplantation*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2009.

68. Kapur, N.K., *A Clinical Commentary on the Articles "Strategies for Tissue Engineering Cardiac Constructs to Affect Functional Repair Following Myocardial Infarction" and "Stem Cell-Based Cardiac Tissue Engineering"*. Journal of Cardiovascular Translational Research, 2011: p. 1-2.
69. Shachar, M., et al., *The effect of immobilized RGD peptide in alginate scaffolds on cardiac tissue engineering*. Acta Biomater, 2011. **7**(1): p. 152-62.
70. Prabhakaran, M.P., et al., *Biomimetic material strategies for cardiac tissue engineering*. Materials Science and Engineering: C, 2011.
71. Chen, Q.Z., et al., *Biomaterials in cardiac tissue engineering: Ten years of research survey*. Materials Science & Engineering R, 2008.
72. Dar, A., et al., *Optimization of cardiac cell seeding and distribution in 3D porous alginate scaffolds*. Biotechnology and bioengineering, 2002. **80**(3): p. 305-312.
73. Kofidis, T., et al., *In vitro engineering of heart muscle: artificial myocardial tissue*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2002. **124**(1): p. 63.
74. Kofidis, T., et al., *Pulsatile perfusion and cardiomyocyte viability in a solid three-dimensional matrix*. Biomaterials, 2003. **24**(27): p. 5009-5014.
75. Radisic, M., et al., *High density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering*. Biotechnology and bioengineering, 2003. **82**(4): p. 403-414.
76. Li, R.K., et al., *Survival and function of bioengineered cardiac grafts*. Circulation, 1999. **100**(suppl 2): p. II-63-II-69.
77. Leor, J., et al., *Bioengineered cardiac grafts: a new approach to repair the infarcted myocardium?* Circulation, 2000. **102**(suppl 3): p. III-56-III-61.

78. Kim, B.S. and D.J. Mooney, *Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering*. Trends in Biotechnology, 1998. **16**(5): p. 224-230.
79. Bursac, N., et al., *Cardiac muscle tissue engineering: toward an in vitro model for electrophysiological studies*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 1999. **277**(2): p. H433.
80. Papadaki, M., et al., *Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(1): p. H168-178-H168-178.
81. Krupnick, A.S., et al., *A novel small animal model of left ventricular tissue engineering*. The Journal of Heart and Lung Transplantation, 2002. **21**(2): p. 233-243.
82. Engler, A.J., et al., *Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 22): p. 3794-802.
83. Yamada, H. and F.G. Evans, *Strength of biological materials*1970: Williams & Wilkins.
84. Chen, Q.-Z., et al., *Characterisation of a soft elastomer poly(glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue*. Biomaterials, 2008. **29**(1): p. 47-57.
85. Janssen, P. and W.C. Hunter, *Force, not sarcomere length, correlates with prolongation of isosarcometric contraction*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 1995. **269**(2): p. H676-H685.
86. Guan, J. and W.R. Wagner, *Synthesis, Characterization and Cytocompatibility of Polyurethaneurea Elastomers with Designed Elastase Sensitivity*. Biomacromolecules, 2005. **6**(5): p. 2833-2842.

87. Amsden, B., *Curable, biodegradable elastomers: emerging biomaterials for drug delivery and tissue engineering*. *Soft Matter*, 2007. **3**(11): p. 1335-1348.
88. Bettinger, C.J., et al., *Amino alcohol-based degradable poly (ester amide) elastomers*. *Biomaterials*, 2008. **29**(15): p. 2315-2325.
89. Freier, T., *Biopolyesters in Tissue Engineering Applications Polymers for Regenerative Medicine*, C. Werner, Editor 2006, Springer Berlin / Heidelberg. p. 1-61.
90. Guan, J., et al., *Biodegradable poly (ether ester urethane) urea elastomers based on poly (ether ester) triblock copolymers and putrescine: synthesis, characterization and cytocompatibility*. *Biomaterials*, 2004. **25**(1): p. 85-96.
91. Lei, L., et al., *Synthesis, characterization and in vitro degradation of a novel degradable poly((1,2-propanediol-sebacate)-citrate) bioelastomer*. *Polymer Degradation and Stability*, 2007. **92**(3): p. 389-396.
92. Nijst, C.L.E., et al., *Synthesis and characterization of photocurable elastomers from poly (glycerol-co-sebacate)*. *Biomacromolecules*, 2007. **8**(10): p. 3067-3073.
93. Skarja, G. and K. Woodhouse, *In vitro degradation and erosion of degradable, segmented polyurethanes containing an amino acid-based chain extender*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2001. **12**(8): p. 851-873.
94. Yang, J., et al., *Synthesis and evaluation of poly (diol citrate) biodegradable elastomers*. *Biomaterials*, 2006. **27**(9): p. 1889-1898.
95. Borenstein, J.T., R. Langer, and L.E. Freed, *Accordion-like honeycombs for tissue engineering of cardiac anisotropy*. *Nature Materials*, 2008.
96. Park, H., et al., *A novel composite scaffold for cardiac tissue engineering*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2005. **41**(7): p. 188-196.

97. Alperin, C., P.W. Zandstra, and K.A. Woodhouse, *Polyurethane films seeded with embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for use in cardiac tissue engineering applications*. *Biomaterials*, 2005. **26**(35): p. 7377-7386.
98. Fromstein, J.D., et al., *Seeding bioreactor-produced embryonic stem cell-derived cardiomyocytes on different porous, degradable, polyurethane scaffolds reveals the effect of scaffold architecture on cell morphology*. *Tissue Engineering Part A*, 2008. **14**(3): p. 369-378.
99. Stankus, J.J., J. Guan, and W.R. Wagner, *Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2004. **70A**(4): p. 603-614.
100. Stankus, J.J., J. Guan, and W.R. Wagner, *Elastomers, Biodegradable*. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, 2004: p. 484 - 494.
101. Guan, J., et al., *Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications*. *Biomaterials*, 2005. **26**(18): p. 3961-3971.
102. Guan, J., K.L. Fujimoto, and W.R. Wagner, *Elastase-sensitive elastomeric scaffolds with variable anisotropy for soft tissue engineering*. *Pharmaceutical Research*, 2008. **25**(10): p. 2400-2412.
103. Guan, J., et al., *The stimulation of the cardiac differentiation of mesenchymal stem cells in tissue constructs that mimic myocardium structure and biomechanics*. *Biomaterials*, 2011.
104. Fujimoto, K.L., et al., *In vivo evaluation of a porous, elastic, biodegradable patch for reconstructive cardiac procedures*. *The Annals of thoracic surgery*, 2007. **83**(2): p. 648-654.

105. Chi, N.H., et al., *Cardiac repair achieved by bone marrow mesenchymal stem cells/silk fibroin/hyaluronic acid patches in a rat of myocardial infarction model*. *Biomaterials*, 2012. **33**(22): p. 5541-51.
106. Ye, J., et al., *Sca-1+ cardiosphere-derived cells are enriched for Isl1-expressing cardiac precursors and improve cardiac function after myocardial injury*. *PLoS ONE*, 2012. **7**(1): p. e30329.
107. Ben-David, U. and N. Benvenisty, *The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells*. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(4): p. 268-77.
108. Trounson, A., et al., *Clinical trials for stem cell therapies*. *BMC Med*, 2011. **9**(1): p. 52.
109. Tolar, J., et al., *Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells*. *Stem cells*, 2010. **28**(8): p. 1446-55.
110. Amabile, G. and A. Meissner, *Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine*. *Trends in molecular medicine*, 2009. **15**(2): p. 59-68.
111. Burdon, T.J., et al., *Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: current perspectives and therapeutic potential*. *Bone Marrow Res*, 2011. **2011**: p. 207326.
112. Angelini, A., et al., *Stem-cell therapy in an experimental model of pulmonary hypertension and right heart failure: role of paracrine and neurohormonal milieu in the remodeling process*. *J Heart Lung Transplant*, 2011. **30**(11): p. 1281-93.
113. Rosenblatt-Velin, N., et al., *FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes*. *Journal of Clinical Investigation*, 2005. **115**(7): p. 1724.

114. Matsuura, K., et al., *Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(12): p. 11384.
115. Van Vliet, P., et al., *Foetal and adult cardiomyocyte progenitor cells have different developmental potential*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2010. **14**(4): p. 861-870.
116. Noort, W.A., et al., *Stem cells from in-or outside of the heart: isolation, characterization, and potential for myocardial tissue regeneration*. Pediatric cardiology, 2009. **30**(5): p. 699-709.
117. Bianco, P., et al., *Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications*. Stem cells, 2001. **19**(3): p. 180-192.
118. Torella, D., et al., *Resident human cardiac stem cells: role in cardiac cellular homeostasis and potential for myocardial regeneration*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2006. **3 Suppl 1**: p. S8-13.
119. Matsuura, K., et al., *Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice*. The Journal of clinical investigation, 2009. **119**(8): p. 2204.
120. Tokunaga, M., et al., *Implantation of cardiac progenitor cells using self-assembling peptide improves cardiac function after myocardial infarction*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2010.
121. Atala, A., *Engineering organs*. Current opinion in biotechnology, 2009. **20**(5): p. 575-592.
122. Hoch, M., et al., *Erythropoietin preserves the endothelial differentiation capacity of cardiac progenitor cells and reduces heart failure during anticancer therapies*. Cell stem cell, 2011. **9**(2): p. 131-43.

123. Schneider, M.D., *EPO and super-EPO: erythropoietins direct neoangiogenesis by cardiac progenitor cells*. *Cell stem cell*, 2011. **9**(2): p. 95-6.
124. Liang, S.X., et al., *In vitro and in vivo proliferation, differentiation and migration of cardiac endothelial progenitor cells (SCA1+/CD31+ side-population cells)*. *J Thromb Haemost*, 2011. **9**(8): p. 1628-37.
125. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*2008, New York: Garland Science.
126. Ovalle, W.K., P.C. Nahirney, and F.H. Netter, *Netter's essential histology*2008, Philadelphia: Saunders/Elsevier.
127. Wolpert, L., *Principles of development*1998, London; New York; Oxford; New York: Current Biology ; Oxford University Press.
128. Mimeault, M., R. Hauke, and S. Batra, *Stem cells: a revolution in therapeutics—recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2007. **82**(3): p. 252-264.
129. Mummery, C.L., *Stem cells : scientific facts and fiction*2011, Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press.
130. Morrison, S.J. and A.C. Spradling, *Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life*. *Cell*, 2008. **132**(4): p. 598-611.
131. Barker, N., et al., *Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5*. *Nature*, 2007. **449**(7165): p. 1003-1007.
132. Körbling, M. and Z. Estrov, *Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept?* *New England Journal of Medicine*, 2003. **349**(6): p. 570-582.

133. Knoblich, J.A., *Mechanisms of asymmetric stem cell division*. Cell, 2008. **132**(4): p. 583-597.
134. Passier, R., L.W. van Laake, and C.L. Mummery, *Stem-cell-based therapy and lessons from the heart*. Nature, 2008. **453**(7193): p. 322-329.
135. Li, T.S., et al., *TGF-[beta] induces the differentiation of bone marrow stem cells into immature cardiomyocytes*. Biochemical and biophysical research communications, 2008. **366**(4): p. 1074-1080.
136. Murry, C.E., et al., *Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts*. Nature, 2004. **428**(6983): p. 664-668.
137. Stamm, C., et al., *Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration*. The Lancet, 2003. **361**(9351): p. 45-46.
138. Orlic, D., et al., *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. Nature, 2001. **410**(6829): p. 701-705.
139. Tang, Y.L., et al., *Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction*. The Annals of Thoracic Surgery, 2005. **80**(1): p. 229-237.
140. Dawn, B. and R. Bolli, *Cardiac progenitor cells*. Circulation Research, 2005. **97**(11): p. 1080-1082.
141. Oh, H., et al., *Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(21): p. 12313.
142. Cai, C.L., et al., *Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart*. Developmental cell, 2003. **5**(6): p. 877-889.

143. Goumans, M.J., et al., *TGF- β 1 induces efficient differentiation of human cardiomyocyte progenitor cells into functional cardiomyocytes in vitro*. Stem cell research, 2008. **1**(2): p. 138-149.
144. MacKenzie, D., *A shot in the heart*. The New Scientist, 2011. **209**(2797): p. 22-23.
145. Roell, W., et al., *Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia*. Nature, 2007. **450**(7171): p. 819-824.
146. McKee, M.G., et al., *Electrospinning of linear and highly branched segmented poly(urethane urea)s*. Polymer, 2005. **46**(7): p. 2011-2015.
147. Hinkel, R., et al., *Thymosin β 4 Is an Essential Paracrine Factor of Embryonic Endothelial Progenitor Cell-Mediated Cardioprotection*. Circulation, 2008. **117**(17): p. 2232.
148. Smart, N., A. Rossdeutsch, and P.R. Riley, *Thymosin β 4 and angiogenesis: modes of action and therapeutic potential*. Angiogenesis, 2007. **10**(4): p. 229-241.
149. McMullen, N.M.M.N.M., B. Kishore, and P.K.B.S. Pasumarthi, *Donor cell transplantation for myocardial disease: does it complement current pharmacological therapies? This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled Young Investigators' Forum*. Canadian journal of physiology and pharmacology, 2007. **85**(1): p. 1-15.
150. Jones, A.M., D.W. Ehrhardt, and W.B. Frommer, *A never ending race for new and improved fluorescent proteins*. BMC biology, 2012. **10**(1): p. 39.
151. Burry, R.W. and SpringerLink, *Immunocytochemistry: a practical guide for biomedical research*2010: Springer.
152. Nagai, Y., et al., *Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment*. Immunity, 2006. **24**(6): p. 801-812.

153. Gage, F.H., et al., *Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(25): p. 11879.
154. Buckingham, M., *Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes*. Comptes rendus biologiques, 2007. **330**(6-7): p. 530-533.
155. Ellison, G., et al., *Cardiac stem and progenitor cell identification: different markers for the same cell?* Frontiers in bioscience (Scholar edition), 2010. **2**: p. 641.
156. Zsebo, K.M., et al., *Stem cell factor is encoded at the *Sl* locus of the mouse and is the ligand for the c-*kit* tyrosine kinase receptor*. Cell, 1990. **63**(1): p. 213-224.
157. Bradfute, S.B., T.A. Graubert, and M.A. Goodell, *Roles of Sca-1 in hematopoietic stem/progenitor cell function*. Experimental hematology, 2005. **33**(7): p. 836-843.
158. Gottesman, M.M. and I. Pastan, *Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter*. Annual review of biochemistry, 1993. **62**(1): p. 385-427.
159. Osawa, M., et al., *Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell*. Science, 1996. **273**(5272): p. 242-245.
160. Barford, D., A.J. Flint, and N.K. Tonks, *Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B*. Science, 1994. **263**(5152): p. 1397-1404.
161. Virts, E., et al., *Murine mast cells and monocytes express distinctive sets of CD45 isoforms*. Molecular immunology, 1997. **34**(16-17): p. 1191-1197.
162. Falahati, R., *Regulation of the CD45 protein tyrosine phosphatase*, 2007, THE GEORGE WASHINGTON UNIVERSITY.

163. Lamba, N.M.K., et al., *Polyurethanes in biomedical applications* 1998: CRC.
164. Cooper, S.L. and A.V. Tobolsky, *Properties of linear elastomeric polyurethanes*. Journal of Applied Polymer Science, 1966. **10**(12): p. 1837-1844.
165. Van Bogart, J., P. Gibson, and S. Cooper, *Structure-property relationships in polycaprolactone-polyurethanes*. Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition, 1983. **21**(1): p. 65-95.
166. Xue-Hai, Y., et al., *Polydimethylsiloxane-polyurethane elastomers: Synthesis and properties of segmented copolymers and related zwitterionomers*. Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition, 1985. **23**(11): p. 2319-2338.
167. Ikeda, Y., et al., *Effect of solvent evaporation rate on microphase-separated structure of segmented poly(urethane-urea) prepared by solution casting*. Macromolecular Chemistry and Physics, 1994. **195**(11): p. 3615-3628.
168. Li, F., et al., *Crystallinity and morphology of segmented polyurethanes with different soft-segment length*. Journal of Applied Polymer Science, 1996. **62**(4): p. 631-638.
169. Nakamae, K., T. Nishino, and S. Asaoka, *Microphase separation and surface properties of segmented polyurethane--Effect of hard segment content*. International journal of adhesion and adhesives, 1996. **16**(4): p. 233-239.
170. Olabisi, O., *Handbook of thermoplastics*. Vol. 41. 1997: CRC.
171. Smith, T.L., *Strength of Elastomers. A Perspective*. Rubber Chemistry and Technology, 1978. **51**: p. 225.
172. Santerre, J.P. and R.S. Labow, *The effect of hard segment size on the hydrolytic stability of polyether-urea-urethanes when exposed to cholesterol esterase*. Journal of biomedical materials research, 1997. **36**(2): p. 223-232.

173. Zhang, Z., et al., *In vitro exposure of a novel polyesterurethane graft to enzymes: A study of the biostability of the Vascugraft® arterial prosthesis*. *Biomaterials*, 1994. **15**(14): p. 1129-1144.
174. Doi, Y., et al., *Structural effects on the biodegradation of microbial and synthetic Poly (hydroxyalkanoates)*. SPECIAL PUBLICATION-ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 1992. **109**: p. 139-139.
175. Parrag, I.C. and K.A. Woodhouse, *Development of Biodegradable Polyurethane Scaffolds Using Amino Acid and Dipeptide-Based Chain Extenders for Soft Tissue Engineering*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2010. **6**(7): p. 843-862.
176. Parrag, I., *The Development of Elastomeric Biodegradable Polyurethane Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering*, in *Chemical Engineering and Applied Chemistry* 2010, University of Toronto: Toronto.
177. Abele, L., *Polyurethane Handbook: chemistry, raw materials, processing, application, properties* 1994: Hanser.
178. Pinchuk, L., *A review of the biostability and carcinogenicity of polyurethanes in medicine and the new generation of 'biostable' polyurethanes*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1995. **6**(3): p. 225-267.
179. Hepburn, C., *Polyurethane elastomers*. C. Hepburn, Applied Science Publishers, Barking (Essex) 1982, 402, 1982.
180. Caracciolo, P., F. Buffa, and G. Abraham, *Effect of the hard segment chemistry and structure on the thermal and mechanical properties of novel biomedical segmented poly (esterurethanes)*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2009. **20**(1): p. 145-155.
181. Kylmä, J. and J.V. Seppälä, *Synthesis and characterization of a biodegradable thermoplastic poly (ester-urethane) elastomer*. *Macromolecules*, 1997. **30**(10): p. 2876-2882.

182. Helminen, A., *Branched and Crosslinked Resorbable Polymers Based on Lactid Acid, Lactide and [epsilon]-caprolactone* 2003: Helsinki University of Technology.
183. Skarja, G. and K. Woodhouse, *Structure-property relationships of degradable polyurethane elastomers containing an amino acid-based chain extender*. Journal of Applied Polymer Science, 2000. **75**(12): p. 1522-1534.
184. Storey, R.F., J.S. Wiggins, and A.D. Puckett, *Hydrolyzable poly(ester-urethane) networks from L-lysine diisocyanate and D,L-lactide/epsilon-caprolactone homo- and copolyester triols*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 1994. **32**(12): p. 2345-2363.
185. Chan-Chan, L.H., et al., *Degradation studies on segmented polyurethanes prepared with HMDI, PCL and different chain extenders*. Acta Biomater, 2010. **6**(6): p. 2035-44.
186. Cervantes-Uc, J.M., et al., *TGA/FTIR studies of segmented aliphatic polyurethanes and their nanocomposites prepared with commercial montmorillonites*. Polymer Degradation and Stability, 2009. **94**(10): p. 1666-1677.
187. Guelcher, S.A., *Biodegradable polyurethanes: synthesis and applications in regenerative medicine*. Tissue Engineering Part B: Reviews, 2008. **14**(1): p. 3-17.
188. Abraham, G.A., A. Marcos-Fernández, and J.S. Román, *Bioresorbable poly(ester-ether urethane)s from L-lysine diisocyanate and triblock copolymers with different hydrophilic character*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006. **76**(4): p. 729-736.
189. Lee, J.W., F. Hua, and D.S. Lee, *Thermoreversible gelation of biodegradable poly([epsilon]-caprolactone) and poly(ethylene glycol)*

- multiblock copolymers in aqueous solutions*. Journal of controlled release, 2001. **73**(2-3): p. 315-327.
190. Guan, J., et al., *Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester-urethane)ureas based on poly(caprolactone) and putrescine*. Journal of Biomedical Materials Research, 2002. **61**(3): p. 493-503.
 191. Jiang, X., et al., *Synthesis and degradation of nontoxic biodegradable waterborne polyurethanes elastomer with poly ([epsilon]-caprolactone) and poly (ethylene glycol) as soft segment*. European Polymer Journal, 2007. **43**(5): p. 1838-1846.
 192. May-Hernández, L., et al., *Segmented poly(urethane-urea) elastomers based on polycaprolactone: Structure and properties*. Journal of Applied Polymer Science, 2011. **119**(4): p. 2093-2104.
 193. Coleman, M., et al., *Hydrogen bonding in polymers. 4. Infrared temperature studies of a simple polyurethane*. Macromolecules, 1986. **19**(8): p. 2149-2157.
 194. Zhang, S., et al., *FTIR spectroscopic characterization of polyurethane-urea model hard segments (PUUMHS) based on three diamine chain extenders*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2007. **66**(1): p. 188-93.
 195. Kweon, H., et al., *A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering*. Biomaterials, 2003. **24**(5): p. 801-808.
 196. Kaushiva, B.D., D.V. Dounis, and G.L. Wilkes, *Influences of copolymer polyol on structural and viscoelastic properties in molded flexible polyurethane foams*. Journal of Applied Polymer Science, 2000. **78**(4): p. 766-786.
 197. Kaushiva, B., et al., *Surfactant level influences on structure and properties of flexible slabstock polyurethane foams*. Polymer, 2000. **41**(1): p. 285-310.

198. Kaushiva, B. and G. Wilkes, *Alteration of polyurea hard domain morphology by diethanol amine (DEOA) in molded flexible polyurethane foams*. *Polymer*, 2000. **41**(18): p. 6981-6986.
199. Scaiano, J.C., *Laser photolysis in polymer chemistry*, in *Degradation and stabilization of polymers*, H.H.G. Jellinek, Editor 1989, Elsevier: Amsterdam. p. 1-43.
200. Petrović, Z.S., et al., *Thermal degradation of segmented polyurethanes*. *Journal of Applied Polymer Science*, 1994. **51**(6): p. 1087-1095.
201. Lage, L.G. and Y. Kawano, *Thermal degradation of biomedical polyurethanes—A kinetic study using high-resolution thermogravimetry*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2001. **79**(5): p. 910-919.
202. Lee, H.K. and S.W. Ko, *Structure and thermal properties of polyether polyurethaneurea elastomers*. *Journal of Applied Polymer Science*, 1993. **50**(7): p. 1269-1280.
203. Grassie, N. and M. Zulfiqar, *Thermal degradation of the polyurethane from 1,4-butanediol and methylene bis(4-phenyl isocyanate)*. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, 1978. **16**(7): p. 1563-1574.
204. Zhang, Y., et al., *Influence of structure of hydroxyl-terminated maleopimaric acid ester on thermal stability of rigid polyurethane foams*. *Journal of Applied Polymer Science*, 1995. **58**(10): p. 1803-1809.
205. Song, Y.M., et al., *Effect of isocyanates on the crystallinity and thermal stability of polyurethanes*. *Journal of Applied Polymer Science*, 1996. **62**(5): p. 827-834.
206. Ferguson, J. and Z. Petrovic, *Thermal stability of segmented polyurethanes*. *European Polymer Journal*, 1976. **12**(3): p. 177-181.
207. Simon, J., et al., *Thermal stability of polyurethanes*. *Chromatographia*, 1988. **25**(2): p. 99-106.

208. Müller-Buschbaum, P., et al., *Solvent-induced surface morphology of thin polymer films*. *Macromolecules*, 2001. **34**(5): p. 1369-1375.
209. Mishra, A. and P. Maiti, *Aromatic polyurethanes: the effect of hard segment and chain structure on their properties*. *Journal of Polymer Engineering*, 2011. **31**(2-3): p. 253-259.
210. Safety Information Resources, I. *SIRI MSDS Index*. 2001 [cited 2011 23-jun-2011]; Available from: <http://hazard.com/msds/>.
211. De Gennes, P.G., *Solvent evaporation of spin cast films: "crust" effects*. *The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics*, 2002. **7**(1): p. 31-34.
212. Richardson, H., et al., *Structural relaxation of spin-cast glassy polymer thin films as a possible factor in dewetting*. *The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics*, 2003. **12**(3): p. 437-441.
213. Zhou, G., C. Ma, and G. Zhang, *Synthesis of polyurethane-g-poly (ethylene glycol) copolymers by macroiniferter and their protein resistance*. *Polymer Chemistry*, 2011. **2**(6): p. 1409-1414.
214. Kuryla, W.C., *Dipolar solvents in polyurethane foams*. *Journal of Applied Polymer Science*, 1965. **9**(3): p. 1019-1040.
215. Mohsen, N., R.G. Craig, and C. Hanks, *Cytotoxicity of urethane dimethacrylate composites before and after aging and leaching*. 1998.
216. Anne Rathbun, M., et al., *Cytotoxicity of a BIS GMA dental composite before and after leaching in organic solvents*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1991. **25**(4): p. 443-457.
217. Griffin, M.A., et al., *Patterning, prestress, and peeling dynamics of myocytes*. *Biophys J*, 2004. **86**(2): p. 1209-22.

218. Discher, D.E., P. Janmey, and Y. Wang, *Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate*. Science, 2005. **310**(5751): p. 1139.
219. Sen, S., A.J. Engler, and D.E. Discher, *Matrix strains induced by cells: computing how far cells can feel*. Cellular and molecular bioengineering, 2009. **2**(1): p. 39-48.
220. Saha, K., et al., *Substrate modulus directs neural stem cell behavior*. Biophys J, 2008. **95**(9): p. 4426-38.
221. Keung, A.J., et al., *Biophysics and dynamics of natural and engineered stem cell microenvironments*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. **2**(1): p. 49-64.
222. Heidari S, A.S., Asefnezhad A, Sadraeian M, Montazeri M, Biazar E, *The relationship between cellular adhesion and surface roughness for polyurethane modified by microwave plasma radiation*. International Journal of Nanomedicine, 2011. **6**(1): p. 641-647.
223. Deligianni, D.D., et al., *Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength*. Biomaterials, 2001. **22**(1): p. 87-96.
224. John, A., et al., *In vitro investigations of bone remodeling on a transparent hydroxyapatite ceramic*. Biomedical Materials, 2009. **4**: p. 015007.
225. Martz, E. and M.S. Steinberg, *The role of cell-cell contact in "contact" inhibition of cell division: A review and new evidence*. Journal of Cellular Physiology, 1972. **79**(2): p. 189-210.
226. Gaugas, J. and D. Dewey, *Evidence for serum binding of oxidized spermine and its potent G1-phase inhibition of cell proliferation*. British journal of cancer, 1979. **39**(5): p. 548.

227. Monti, M.G., et al., *Inhibition of cell growth by accumulated spermine is associated with a transient alteration of cell cycle progression*. Life Sciences, 1996. **58**(23): p. 2065-2072.
228. Szycher, M., *Polyurethane Adhesives*. Szycher's Handbook of Polyurethanes, 2012: p. 393.
229. Yim, E.K.F., S.W. Pang, and K.W. Leong, *Synthetic nanostructures inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into neuronal lineage*. Experimental cell research, 2007. **313**(9): p. 1820-1829.
230. Kunzler, T.P., et al., *Systematic study of osteoblast response to nanotopography by means of nanoparticle-density gradients*. Biomaterials, 2007. **28**(33): p. 5000-5006.
231. Dellatore, S.M., A.S. Garcia, and W.M. Miller, *Mimicking stem cell niches to increase stem cell expansion*. Current opinion in biotechnology, 2008. **19**(5): p. 534-540.
232. Yim, E.K.F., et al., *Nanotopography-induced changes in focal adhesions, cytoskeletal organization, and mechanical properties of human mesenchymal stem cells*. Biomaterials, 2010. **31**(6): p. 1299-1306.
233. Gittens, R.A., et al., *The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation*. Biomaterials, 2011.
234. Toma, C., et al., *Human Mesenchymal Stem Cells Differentiate to a Cardiomyocyte Phenotype in the Adult Murine Heart*. Circulation, 2002. **105**(1): p. 93-98.
235. Dulgar-Tulloch, A., R. Bizios, and R. Siegel, *Human mesenchymal stem cell adhesion and proliferation in response to ceramic chemistry and nanoscale topography*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2009. **90**(2): p. 586-594.

236. de la Grandmaison, G.L., I. Clairand, and M. Durigon, *Organ weight in 684 adult autopsies: new tables for a Caucasoid population*. Forensic science international, 2001. **119**(2): p. 149-154.
237. Sebki, A., et al., *Genetic determination of cardiac mass in normotensive rats: results from an F344xWKY cross*. Hypertension, 1999. **33**(4): p. 949-953.
238. Beitnes, J.O., et al., *Stem cells for cardiac repair in acute myocardial infarction*. Expert Review of Cardiovascular Therapy, 2011. **9**(8): p. 1015-1025.

