

**Instituto Tecnológico de Costa Rica**  
**Escuela de Ingeniería Electrónica**

**Informe final de proyecto de investigación**

**Desarrollo de matrices extracelulares conductoras (MECC)  
para el crecimiento de células *in vitro***

**Dr. Juan José Montero Rodríguez**  
**Dr. Ricardo Starbird Pérez**  
**MSc. Silvia Castro Piedra**  
**MSc. Andrea Ulloa Fernández**  
**MSc. Karla Ramírez Sánchez**

**Enero 2022**

**(Modificado el 28 de junio de 2023)**

## Tabla de contenido

1	Código y Título del proyecto .....	3
2	Autores y direcciones .....	3
3	Resumen .....	3
4	Palabras clave .....	4
5	Introducción .....	4
6	Objetivos .....	5
6.1	Objetivo general .....	5
6.2	Objetivos específicos.....	5
7	Marco teórico .....	6
8	Metodología .....	7
9	Resultados .....	13
10	Conclusiones .....	19
11	Recomendaciones.....	20
12	Anexos.....	21
13	Referencias .....	22

## 1 Código y Título del proyecto

Código: 5402-1360-4401

**Título:** Desarrollo de matrices extracelulares conductoras (MECC) para el crecimiento de células *in vitro*.

## 2 Autores y direcciones

Dr. Juan José Montero Rodríguez (coordinador), Escuela de Ingeniería Electrónica, TEC

Dr. Ricardo Starbird Pérez, Escuela de Química, TEC

M.Sc. Silvia Castro Piedra, Escuela de Biología, TEC

M.Sc. Andrea Ulloa Fernández, Escuela de Biología, TEC

M.Sc. Karla Ramírez Sánchez, Escuela de Química, TEC

## 3 Resumen

En este proyecto, se estudió el efecto de una matriz porosa producida a partir de polisacáridos, la cual fue recubierta con un polímero conductor de la electricidad para llevar a cabo estudios *in vitro*. Este andamio conductor podría funcionar como una matriz extracelular para el crecimiento de células. Los resultados obtenidos permitirían mejorar las metodologías de crecimiento de tejido biológico, tales como mioblastos de músculo esquelético o células neuronales, lo cual traería beneficios a la salud pública.

La inyección de células suspendidas en un medio apropiado ha constituido por excelencia una de las mejores maneras de realizar terapia celular en las zonas dañadas. El crecimiento celular requiere de matrices extracelulares (MEC) que simulen las condiciones naturales de crecimiento. La matriz extracelular desempeña un papel importante en la morfogénesis de tejidos y órganos, el mantenimiento de la estructura y función de las células y los tejidos, además de afectar la respuesta del huésped ante diversos estímulos.

Existen tejidos que requieren estimulación eléctrica, tales como células nerviosas y músculo esqueléticas. La ingeniería de tejidos busca por medio de andamios recubiertos de células funcionales, mejorar la regeneración muscular. Al proveer un soporte, así como el adecuado estímulo eléctrico, no sólo se genera una ubicación más controlada de las células, sino que también provee el microambiente adecuado para que se dé una acción sinérgica entre señales biofísicas y biomecánicas que mimetizan tanto *in vivo* como *in vitro* el nicho de las células musculares, lo cual permite su expansión y posterior regeneración normal. En este trabajo, se sintetizó una matriz porosa a base de almidón, se recubrió con un polímero conductor electro-estimulable y se estudió su biocompatibilidad para apoyar su uso futuro durante el crecimiento y diferenciación de tejido muscular. Además, se sintetizó un sistema eléctrico para estimulación celular en dos dimensiones y la inducción de diferenciación.

#### **4 Palabras clave**

Células musculares, espectroscopía de impedancia, estimulación eléctrica, matriz electroconductora.

#### **5 Introducción**

La Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos se define como la aplicación de principios y métodos de la ingeniería y las ciencias biológicas para el entendimiento de las relaciones estructura-función en tejidos normales y patológicos, para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren y mejoren una función afectada, dentro de esta disciplina se encuentra la terapia celular [1]. Diversos estudios muestran que una parte de la población de células incrementa la regeneración producto de la secreción de factores de crecimiento y algunas sí participan directamente en la remodelación y restablecimiento de la arquitectura del tejido. Sin embargo, un punto crítico para la utilidad de la terapia es la adecuada distribución de las células inyectadas en el tejido, que a su vez resulta uno de los mayores problemas de la aplicación de la técnica. La dispersión de las células inyectadas en el tejido es sumamente limitada considerando que la mayor parte (más del 90%) no se llega a injertar, sino que mueren por las condiciones de isquemia inducidas; por su parte, las que logran sobrevivir reparan muy puntualmente una sección del tejido dañado [1].

El crecimiento celular requiere de matrices extracelulares (MEC) que simulen las condiciones naturales de crecimiento. La matriz extracelular desempeña un papel importante en la morfogénesis de tejidos y órganos, el mantenimiento de la estructura y función de las células y los tejidos, además de afectar la respuesta del huésped ante diversos estímulos. Existen tejidos que requieren estimulación eléctrica, tales como células nerviosas y músculo esqueléticas. El músculo esquelético posee una remarcable capacidad regenerativa en respuesta a heridas menores como laceraciones, contusiones o algunos ejercicios. A pesar de ello, cuando, producto de un accidente automovilístico, un tumor o denervación, hay pérdida de alrededor de un 20% de la masa muscular, resulta difícil reponer todo ese tejido de manera óptima. Esto genera la aparición de una mala cicatrización, fibrosis y pérdida de funcionalidad [2].

En el año 2014 en un trabajo conjunto [2], se preparó un material conductor con poros interconectados, que podría tener potencial aplicación como matriz extracelular conductor (MECC). Para realizar dicho trabajo, se han realizado algunas experiencias, mejorando las características físicas del material. Sin embargo, es necesario estudiar la respuesta del tejido biológico, dadas las características del material, mediante estudios *in vitro*. La biocompatibilidad del sistema ya ha sido estudiada con osteoblastos [3].

## **6 Objetivos**

### **6.1 Objetivo general**

- Estudiar el efecto *in vitro* de materiales conductores porosos en el crecimiento celular al estimular eléctricamente la matriz.

### **6.2 Objetivos específicos**

1. Fabricar un sistema de estimulación eléctrica para aplicaciones *in vitro*.
2. Sintetizar materiales porosos conductores para el estudio de crecimiento celular de células C2C12.
3. Evaluar el crecimiento de las células C2C12 inoculadas en las matrices conductoras porosas bajo estimulación eléctrica.

## 7 Marco teórico

Para estudiar el potencial conductor del material in vitro se estudiará el uso de tejido que requiera estimulación eléctrica. La línea celular C2C12, es una línea de mioblastos de músculo esquelético que ha sido ampliamente utilizada para estudiar la diferenciación celular a miofibras. Sin embargo, si se busca mimetizar la constitución del músculo esquelético, así como su funcionalidad, resulta necesario inocular las células sobre una matriz tridimensional y conductora e inducirle un estímulo eléctrico, esto permitiría obtener un equivalente tisular, en este caso similar al músculo esquelético, donde una de las características más importantes de este tipo de tejido es ser un tejido contráctil y dicha contracción viene dada por el estímulo eléctrico de los nervios presentes en el tejido y que en este caso se le estaría brindando exógenamente.

Existe documentación [5], [6] sobre la respuesta a la estimulación eléctrica de las células C2C12, dicha estimulación coincide en utilizar frecuencias de estimulación de 1 Hz y 2 Hz, pero difieren en los potenciales aplicados desde 1 hasta 10 V. La caracterización de la composición, las propiedades estructurales, el comportamiento mecánico y estructura de la MECC generada en cooperación con la Universidad de Santiago de Compostela, permitiría estudiar el efecto sobre la proliferación celular, así como la diferenciación de células inoculadas en una MECC al ser estimulas eléctricamente.

Las propiedades eléctricas de los polímeros conductores han sido ampliamente estudiadas [7]–[10] como interfase en electrodos [4] y como biomaterial para aplicaciones biológicas [11]. Se han reportado aplicaciones como la liberación de factores de crecimiento [12], dado el mecanismo farádico que se involucra en los procesos reductivos-oxidativos asociados a la conductividad del material [13].

La micro estructuración que emplea matrices porosas ha sido utilizada en análisis bioquímicos [14], biológicos [15], [16] y químicos [17]. Sin embargo, la estructuración con propiedades conductoras permite adaptarse a las aplicaciones biológicas específicas. Hasta donde tenemos conocimiento, aún no se han utilizado materiales porosos conductores con poli(3,4-etilenedioxitiofeno) (PEDOT) como matrices extracelulares. El diseño y fabricación de sistemas macro (50–1000 nm) y microporosos (0,2–2 nm) y conductores con tecnologías emergentes representa un aporte tecnológico en beneficio de la salud pública, por una parte, para el estudio de comportamiento bilógico o para el estudio de sistemas de liberación controlada con aplicaciones médicas.

## 8 Metodología

### Objetivo específico 1: Fabricar un sistema de estimulación eléctrica para aplicaciones *in vitro*.

Durante la realización de la presente investigación, ciertos problemas fueron encontrados con respecto a la formulación de la matriz porosa y por consiguiente, su recubrimiento con el polímero conductor. Por esta razón, y con la finalidad de cumplir con los objetivos planteados inicialmente, la metodología fue adaptada a partir de la propuesta original, logrando obtener un sistema de estimulación eléctrica en dos dimensiones que en el futuro pudiera ser adaptado al sistema con las matrices conductoras. Por lo anterior, se trabajó con electrodos de oro y se recubrieron con el polímero conductor PEDOT, según la propuesta inicial:

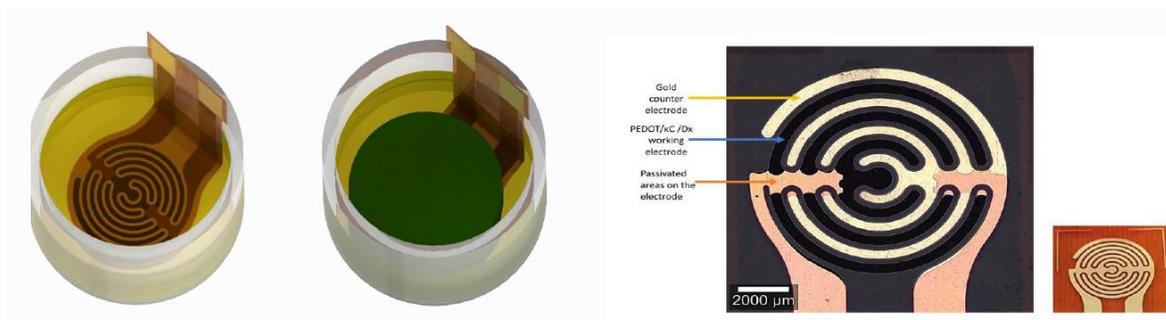


Figura 1. Sistemas de estimulación eléctrica para cultivos celulares diseñados por Jorge Sandoval (izquierda) y Gerardo Valladares (derecha). La matriz extracelular se muestra en verde. [Anexo 2].

### Actividad 1.1: Diseño de sistema eléctrico para cultivo biológico.

Se diseñaron circuitos eléctricos alimentados con baterías de bajo costo para estimulación eléctrica de células musculares, basándose en la línea de trabajos de investigación previos [19]. El estimulador aplica pulsos rectangulares de corta duración (PEF, *pulsed electric field*) con tiempos de estimulación de milisegundos. Uno de los requerimientos para este circuito estimulador es que funcione con baterías, donde la autonomía debe ser de al menos 48 horas, debido a que el estimulador se debe colocar dentro de la incubadora junto con los cultivos celulares, sin posibilidad de conexión a una toma de alimentación externa. Un circuito sencillo, eficiente y económico es el multivibrador astable LM555 que permite generar pulsos con tiempos configurables.

El estimulador se conecta con la placa de cultivo celular por medio de un conector MOLEX y cables flexibles como se muestra en la Figura 2, de manera que todo el circuito, la batería y la placa Eppendorf que contiene las células y electrodos, se incluyen juntos dentro de la incubadora.

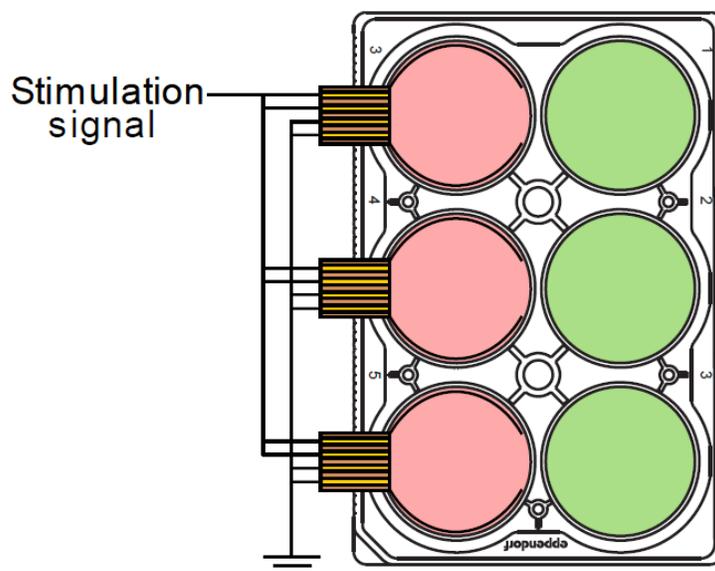


Figura 2. Conexión del circuito estimulador con el cultivo celular [Anexo 6].

### **Actividad 1.2: Fabricación de sistema de cultivo biológico, devastado y deposición de metales.**

Se trabajó con la deposición de electrodos de oro desnudos sobre los moldes diseñados por colaboradores del proyecto y externos, específicamente en la Universidad de Costa Rica.

Una vez obtenidos, inicialmente se realizó una caracterización electroquímica de los electrodos fabricados para estudiar su respuesta en medios controlados (KCl 1.0 M) y con estándares electroquímicos (ferroceno y/o hexacianoferrato). Después, se realizó la polimerización sobre una capa de oro expuesta de cada electrodo, de una solución de sales y polisacáridos conteniendo el monómero EDOT, tal como se especifica en el siguiente párrafo:

Los electrodos de oro se modificaron con el polímero conductor poli 3,4-etilendioxitiofeno (PEDOT), según la literatura existente [3]. La polimerización se llevó a cabo utilizando una emulsificación con  $\kappa$ -carragenato, KCl 0.2M y el monómero EDOT 10 mM. De manera paralela, se realizó el mismo experimento, pero se incorporó en esta ocasión una molécula aniónica para estimulación de la respuesta biológica de células madre mesenquimales y de músculo esquelético.

### **Actividad 1.3: Prueba de sistema y optimización.**

Se preparó un sistema electrónico completo de generación de señales que adaptó las características de frecuencia, amplitud y forma de las señales eléctricas de voltaje adecuadas para lograr la estimulación celular para su desarrollo y diferenciación, por medio de un aparato de análisis de señales electroquímicas de alta precisión. Se realizó su caracterización y se confirmó su funcionamiento en estimulación de cultivos biológicos mediante el uso de electrolitos fuertes (KCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub>), medios de cultivo celular estándar (DMEM) y cultivos celulares básicos.

Los circuitos alimentaron a los electrodos diseñados en el proyecto, en placas de cultivo celular, utilizado dentro de una incubadora. Además, se fabricó un circuito que permite realizar la estimulación eléctrica con una señal de pulsos de corriente controlada, basado en una fuente de Howland. La estimulación se realiza con pulsos controlados de tensión o de corriente, con un ancho de pulso de 6 ms.

### **Objetivo específico 2: Sintetizar materiales porosos conductores para el estudio de crecimiento celular de células C2C12**

#### **Actividad 2.1 Preparación andamios de almidón/ $\kappa$ -carragenato**

La metodología llevada a cabo para la preparación de los andamios cilíndricos a base de almidón fue adaptada a partir de la propuesta original, no obstante, de acuerdo con los problemas encontrados relacionados con la solubilidad de las matrices en medios acuosos, se llevaron a cabo una serie de modificaciones con polímeros naturales y sintéticos, así como otras metodologías de secado, como se describen a continuación.

Se prepararon dispersiones acuosas de almidón de maíz al 9% m/v, y se mezcló con 0,5 % m/v de  $\kappa$ -carragenato. Se empleó una solución de PVA modificado químicamente con el agente de entrecruzamiento stirilpiridinium (PVA-SbQ), el cual, después de irradiación con luz UV sufre una reacción de ciclo adición, favoreciendo la unión de las moléculas de los polímeros.

Las disoluciones homogéneas de almidón/ $\kappa$ -carragenato resultantes con diferentes concentraciones de PVA-SbQ se sometieron a un proceso de autoclavado a 121°C durante 15 min y luego se transfirieron a moldes cilíndricos y se sellaron con papel Parafilm. Serán almacenaron a 4 °C durante 96 h para inducir la retrogradación del almidón. Después de esto, los cilindros de hidrogel se congelaron a -20°C durante 4 horas, y finalmente se liofilizaron a -60°C durante 24 horas.

Con la finalidad de evaluar la calidad de las matrices obtenidas, de manera adicional se realizó un análisis de ganancia de masa para monitorear el hinchamiento de las matrices sin recubrimiento. Se

midió la masa inicial de los criogeles secos y después se colocaron en 4 mL de buffer fosfato pH 7.5 a 37 °C. Para las mediciones, las muestras de criogel se drenaron del exceso de líquido y se pesaron inmediatamente. La cinética de ganancia de masa para cada muestra se evaluó a los 15, 30, 45 y 60 minutos.

Por otra parte, para analizar la solubilidad en agua, se determinó la masa de los criogeles y posteriormente se sumergieron en buffer fosfato pH 7.5 a 37 °C. Después de 1 h, 24 h, 4 días y 7 días de inmersión en buffer, los criogeles se secaron a 40 °C en condiciones de vacío, y se determinó la masa perdida para establecer la cinética de solubilidad.

Finalmente, se estudió la respuesta del material compuesto de manera macroscópica usando análisis dinámico mecánico, se realizaron en modo de compresión para todos los materiales con rangos de temperatura de -10 hasta 180 °C, con una velocidad de calentamiento de 1 a 5 °C/min<sup>-1</sup>, mientras se optimiza la respuesta de frecuencia y deformación. Estos datos segregaron el aporte de cada componente que constituye el material.

En relación con lo anterior, la respuesta local a nanoescala se obtuvo utilizando un microscopio de fuerza atómica con un módulo PeakForce y Pinpoint. Se realizaron barridos de topografía obteniendo el módulo de cada componente. La respuesta electroquímica a nanoescala se realizó con el mismo dispositivo, con un módulo de medición de resistencia eléctrica, así como de electroquímica. Esta metodología es muy prometedora para este tipo de estudios, pero deben de realizarse más investigación en esta línea con equipos adaptados y con esto comprender el mecanismo de deposición y su efecto en las propiedades del material compuesto.

### **Actividad 2.2 Secado supercrítico del cilindro de gel de almidón / $\kappa$ -carragenato.**

Además de la liofilización, cabe recalcar que también se llevó el método de secado por CO<sub>2</sub> supercrítico, tal como lo indicó la propuesta original, y se obtuvieron resultados exitosos, sin embargo, el equipo que empleamos para el secado se encuentra en la universidad de Santiago de Compostela, España y la preparación de los andamios en España aumentaba mucho los costos, el proyecto no contó con presupuesto operativo, por lo que se adaptó el secado por liofilización en cooperación con el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) y el Centro en Protección Ambiental (CIPA) del ITCR.

### **Actividad 2.3 Polimerización del EDOT sobre la matriz.**

De acuerdo con la propuesta original, los criogel serían recubiertos con el polímero conductor PEDOT durante el proceso de intercambio de solventes previo al proceso de secado, sin embargo, al carecer de las condiciones para el secado por CO<sub>2</sub> supercrítico, estas actividades no fueron concretadas.

Para solventarlo, se buscaron metodologías alternativas: se emplearon 150 mg de criogel y se colocaron en una solución de p-toluenosulfonato de hierro (III) e isopropanol durante un tiempo indefinido, posteriormente, se extrajo el criogel y se colocó en una dispersión de isopropanol y EDOT, después de 1 semana, el criogel se tornó a color azul oscuro por el recubrimiento y se realizaron lavados con una solución alcohólica. Estudios sobre este proceso deben de ser realizados y con esto comprender el mecanismo de deposición y su efecto en las propiedades del material compuesto.

**Objetivo específico 3:** Evaluar el crecimiento de las células C2C12 inoculadas en las matrices conductoras porosas bajo estimulación eléctrica.

### **Actividad 3.1. Inocular las células en un sistema con la matriz conductora**

La incorporación de polisacáridos sintéticos y naturales durante la fabricación de la matriz disminuyó su solubilidad considerablemente en medios salinos, por lo tanto, se procedió con la evaluación de la viabilidad celular de células C2C12 expuestas a la matriz para evaluar la posibilidad de cultivarlas directamente sobre el andamio.

Para determinar si la matriz no afectó de manera negativa la viabilidad celular, células C2C12 fueron inoculadas con los andamios generados y previamente esterilizados, posteriormente se determinó la proliferación celular con Alamar blue. Este método consistió en inocular las células con los andamios en placas de 24 pozos, posterior a 48 horas en cultivo, se agregó Alamar Blue al 10% disuelto en medio de cultivo y se incubó por un periodo de 1 hora; posteriormente se midió la fluorescencia a 570/590 nm (ExEm), en un lector de placas multipozo. Este valor se transformó en porcentaje de viabilidad utilizando los valores obtenidos en células cultivadas en condiciones estándar y se comparó entre los diferentes tiempos de medición.

Por los resultados obtenidos en cuando a viabilidad y por problemas presentados con la degradación de la matriz en componentes del medio de cultivo celular, no fue posible continuar con la metodología de siembra de las células dentro de la matriz, y por lo tanto, tampoco su estimulación. Por consiguiente, los sistemas de electrodos obtenidos a partir del objetivo 1, fueron empleados como sustitutos a los andamios, siguiendo la metodología citada a continuación:

### **Actividad 3.2: Inducción de la diferenciación y estímulo eléctrico.**

Para inducir la diferenciación celular, a las 48 horas aproximadamente de haber inoculado las células sobre el electrodo, se les realizó un cambio de medio, sustituyendo el DMEM con SFB al 10% por DMEM con 2% de suero de caballo. Las células se mantuvieron en este medio de cultivo por alrededor de 4 días y bajo estímulos eléctricos. La estimulación eléctrica se realizó con un electrodo de oro desnudo que rodeaba el pocillo de cultivo celular. Una vez terminado el estímulo, la muestra se fijó en paraformaldehído al 4% y se detectó la presencia de los marcadores de nivel o grado de diferenciación. Se compararon con los marcadores de las células cultivadas con suero de caballo (diferenciación estándar), pero sin estimulación eléctrica, con el fin de evaluar si existe diferencias en el tiempo de diferenciación.

### **Actividad 3.3: Análisis de la morfología celular de las células cultivadas.**

Para determinar la morfología, las células diferenciadas con estímulos eléctricos y químicos (cultivadas en los andamios y sobre placas), así como las de control positivo, se tiñeron con faloidina y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para evaluar el citoesqueleto y el núcleo, respectivamente. Dichas muestras se compararon con células inoculadas que no fueron estimuladas eléctricamente y con las células cultivadas en el frasco de cultivo sin estímulo (control). Las muestras se analizaron por medio de microscopía de fluorescencia.

## 9 Resultados

Los resultados obtenidos a partir del proyecto se ven reflejados en dos artículos científicos y participaciones en eventos nacionales e internacionales, con comité científico, que se citan a continuación (ver la sección de anexos para consultar los archivos):

**Objetivo específico 1:** Fabricar un sistema de estimulación eléctrica para aplicaciones *in vitro*.

Se publicó un artículo científico relacionado con la preparación de electrodos para cultivo celular y el sistema de estimulación, dicho artículo fue publicado en el congreso de la IEEE y se cita a continuación:

- Montero-Rodríguez, J. J., Ramirez-Sanchez, K., Valladares-Castrillo, G., Avendano-Soto, E. D., & Starbird-Perez, R. (2020, February). Design and simulation of flexible thin-film electrodes for cell culture stimulation. In 2020 IEEE Latin America Electron Devices Conference (LAEDC), pp. 1-4, IEEE. (ver Anexo 1).

El circuito estimulador permite aplicar pulsos de tensión con una duración en alto de 6 ms y en bajo de 1 s. El circuito se implementa utilizando un circuito integrado multivibrador astable LM555 y componentes pasivos como resistencias y condensadores. El diagrama esquemático del circuito se muestra en la Figura 3, donde se incluyen dos transistores 2N2222 como etapa de salida, el primero es un inversor bipolar y el segundo es un amplificador seguidor de emisor. El circuito entrega pulsos cuadrados con amplitud de 5 V, y opcionalmente se puede conectar el colector de T2 a una batería de 9 V para aumentar la tensión de estimulación.

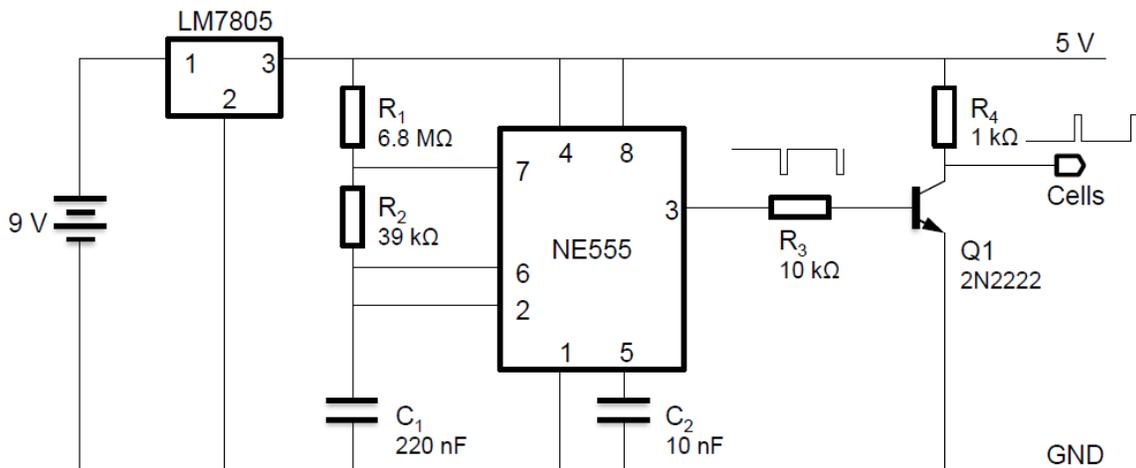


Figura 3. Circuito multivibrador astable con pulsos de 6 ms y periodo de 1 s, con etapa de salida bipolar. El circuito se alimenta con una única batería de 9 V en la entrada, con autonomía para al menos 48 h [Anexo 6].

Para caracterizar la respuesta de los electrodos se utilizó el programa de simulación de método de elementos finitos COMSOL Multiphysics. En la Figura 4 se muestran las distribuciones de corriente en el electrodo y el electrolito, junto con la respuesta de impedancia de electrodos de placas paralelas.

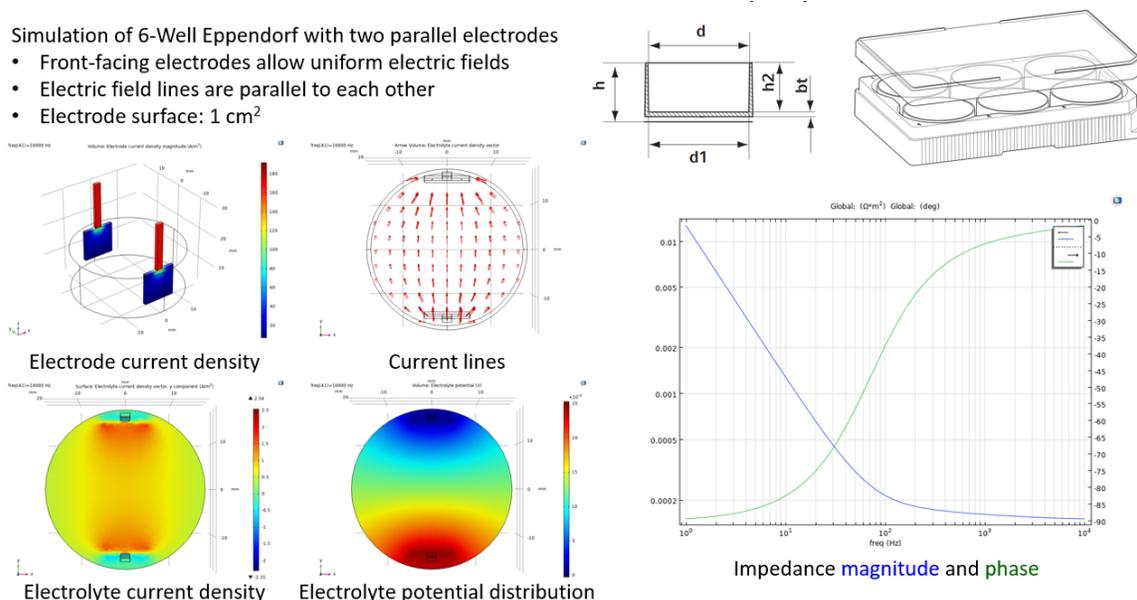


Figura 4. Simulación de electrodos de placas paralelas en una placa para cultivos de tipo Eppendorf de 6 pozos. La respuesta de impedancia los electrodos de oro, tanto experimental como simulada, se muestra en la Figura 5, con las distribuciones de densidad de corriente dentro del electrodo y en el electrolito.

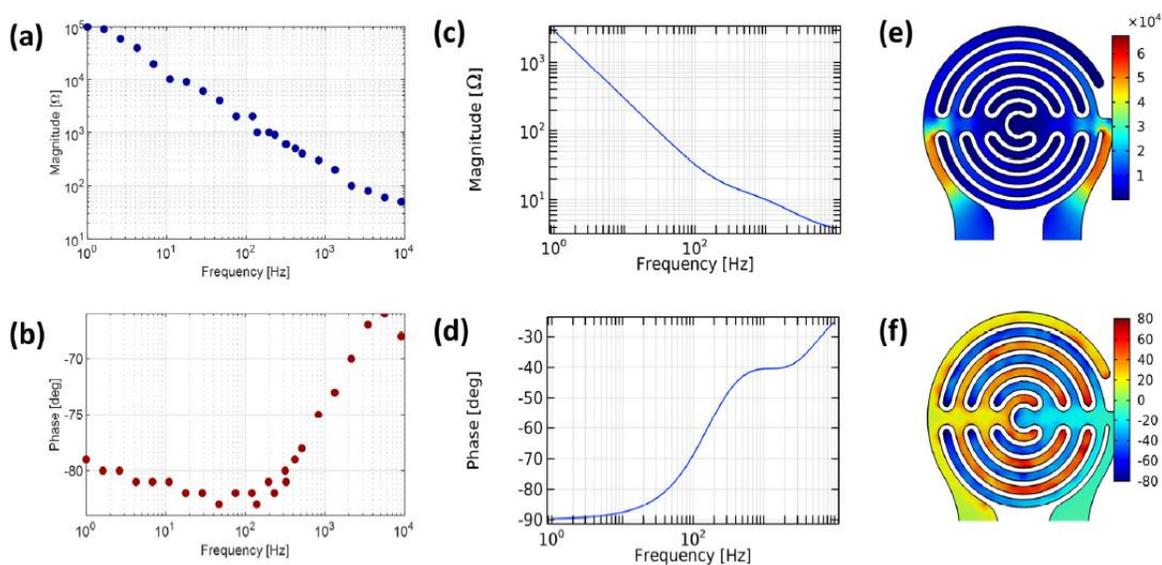


Figura 5. Respuesta de los electrodos en: (a) magnitud experimental, (b) fase experimental, (c) magnitud simulada, (d) fase simulada, (e) corriente del electrodo, (f) densidad de corriente en electrolito. [Anexo 1].

**Objetivo específico 2:** Sintetizar materiales porosos conductores para el estudio de crecimiento celular de células C2C12: Este objetivo permitió publicar un artículo científico relacionado con el uso de sistemas conductores para aplicaciones en liberación de fármacos y cultivo celular, publicado en la revista *Molecules*, además de participaciones en eventos internacionales de carácter científico:

- Ramírez Sánchez, K., Ledezma-Espinoza, A., Sánchez-Kopper, A., Avendaño-Soto, E., Prado, M., & Starbird Perez, R. (2020). Polysaccharide  $\kappa$ -Carrageenan as Doping Agent in Conductive Coatings for Electrochemical Controlled Release of Dexamethasone at Therapeutic Doses. *Molecules*, 25(9), 2139. (ver Anexo 2)
- Fernando Alvarado-Hidalgo, Karla Ramírez-Sánchez, Laria Rodriguez, Roy Zamora-Sequeira, Esteban Avendaño-Soto, Ricardo Starbird-Perez and Carlos A. García-González, (March 2021), Hybrid Porous Materials from Starch/ $\kappa$ -Carrageenan/ PVA and Starch/ $\kappa$ -Carrageenan/PVA-SbQ for Tissue Engineering, Athens Conference on Advances in Chemistry. (On-line) (ver Anexo 3)
- Ramírez-Sánchez, Karla; León-Carvajal, Sebastián; Montero-Rodríguez, Juan José; Castro-Piedra, Silvia; Ulloa-Fernández, Andrea; Avendaño-Soto, Esteban; Prado-Mónica and Starbird-Pérez, Ricardo. Myoblasts in vitro differentiation by exogenous electric field stimulation on custom-made patterned gold electrodes Advanced technologies for the processing and characterization of nanostructured materials CONTACTS 5th - 7th July 2021, Cracow, Poland. (On-line) (ver Anexo 4)
- Ramírez-Sánchez K., Alvarado-Hidalgo F., Rodríguez-Quesada L., Starbird-Perez R. , Castro-Piedra S., Ulloa-Fernández A., Vázquez, F., Prado, M., Avendaño-Soto, E., García-González, C. Biocompatible conductive porous cryogel based on polysaccharides as extracellular matrix for skeletal muscle cells 7th International Polysaccharide Conference of the European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE). 11th – 15th October 2021 in Nantes, France. (ver Anexo 5)

Para este objetivo, la síntesis de películas delgadas de PEDOT: $\kappa$ C:Dx se obtiene por deposición electroquímica bajo condiciones galvanostáticas. La topografía de los electrodos se caracterizó utilizando la técnica de profilometría y los resultados se muestran en la Figura 6. Además, se utilizó microscopía confocal Raman 2D en dos bandas para verificar la presencia de PEDOT y  $\kappa$ C/Dx, los resultados se presentan en la Figura 7. En ambas figuras se demuestra que la síntesis de películas delgadas de polímero conductor se realizó con éxito.

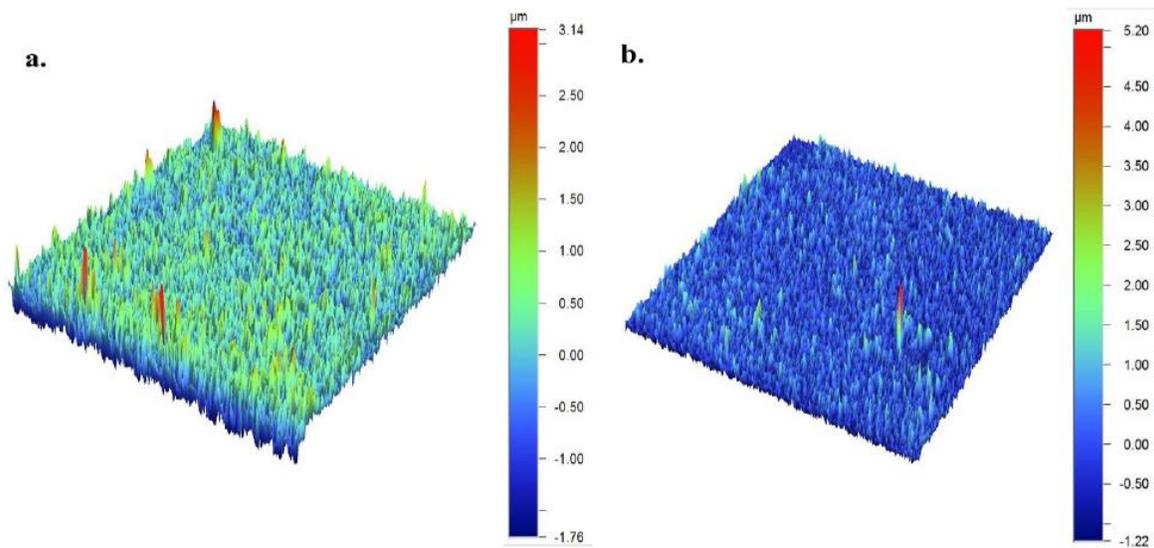


Figura 6. Imágenes de profilometría obtenidas para capas delgadas de PEDOT:C:Dx (a) antes y (b) después de 160 ciclos de voltamperometría cíclica en una solución de acetato de amonio 0.10 M. [Anexo 2].

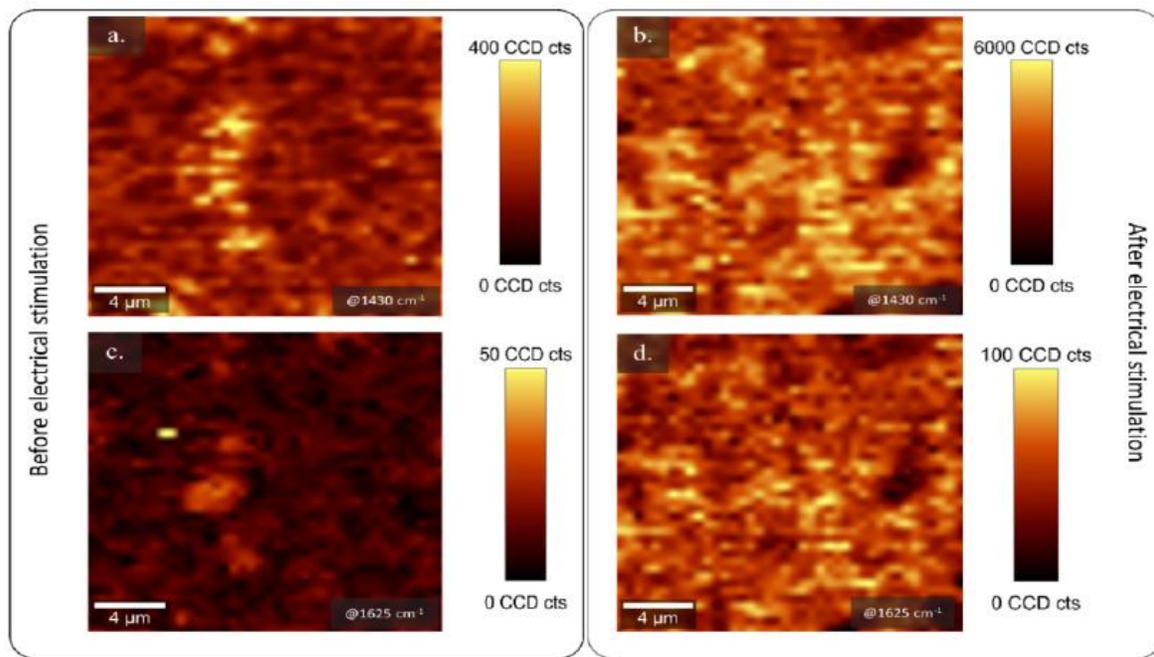


Figura 7. Imágenes de microscopía confocal Raman 2D en la banda de  $1430\text{ cm}^{-1}$  (a) antes del proceso de liberación y (b) después de 160 ciclos, y en la banda de  $1625\text{ cm}^{-1}$  (c) antes del proceso de liberación y (d) después de 160 ciclos. Las áreas amarillas evidencian la presencia de PEDOT y  $\kappa\text{C/Dx}$ . [Anexo 2].

**Objetivo específico 3:** Evaluar el crecimiento de las células C2C12 inoculadas en las matrices conductoras porosas bajo estimulación eléctrica.

Se obtuvo como resultado la participación en eventos nacionales e internacionales de carácter científico, relacionados con el uso de células C2C12 y los sistemas preparados en la regeneración tisular:

- Ramírez-Sánchez, Karla; Ulloa-Fernández, Andrea, Castro-Piedra, Silvia; Montero-Rodríguez, Juan José Prado Porras, Mónica, Avendaño, E; Starbird-Pérez, Ricardo (2019). Myoblasts proliferation and differentiation by electrical impedance spectroscopy and electric field stimulation on a patterned gold electrode. In 2019 Frontiers in Myogenesis Conference: Skeletal Muscle: Development, Regeneration and Disease. (poster). (Anexo 6)
- Ramírez-Sánchez, Karla; León-Carvajal, Sebastián; Montero-Rodríguez, Juan José; Castro-Piedra, Silvia; Ulloa-Fernández, Andrea; Avendaño-Soto, Esteban; Prado-Mónica and Starbird-Pérez, Ricardo. Myoblasts in vitro differentiation by exogenous electric field stimulation on custom-made patterned gold electrodes Advanced technologies for the processing and characterization of nanostructured materials CONTACTS 5th - 7th July 2021, Cracow, Poland. (On-line) (Anexo 4)
- Ramírez-Sánchez K., Alvarado-Hidalgo F., Rodríguez-Quesada L., Starbird-Perez R., Castro-Piedra S., Ulloa-Fernández A., Vázquez, F., Prado, M., Avendaño-Soto, E., García-González, C. Biocompatible conductive porous cryogel based on polysaccharides as extracellular matrix for skeletal muscle cells 7th International Polysaccharide Conference of the European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE). 11th – 15th October 2021 in Nantes, France. (Anexo 5)
- Fernando Alvarado-Hidalgo; María Paula Palma-Calvo; Laria Rodríguez-Quesada; Karla Ramírez-Sánchez; Carlos A. García-González; Silvia Castro-Piedra, Andrea Ulloa-Fernández and Ricardo Starbird. Biocompatible electroactive porous materials for tissue engineering applications. Advanced technologies for the processing and characterization of nanostructured materials CONTACTS 5th - 7th July 2021, Cracow, Poland (On-line). Ver Anexo 7.

Para validar el cumplimiento de este objetivo, se estimulan eléctricamente células de C2C12. En la Figura 8 se muestra el análisis de inmunofluorescencia, donde se aprecia el control negativo, el control positivo, y el resultado después de estimular las células por 72 horas utilizando el circuito electrónico de pulsos. En estas imágenes se evidencia que el uso de pulsos sí afecta la proliferación y diferenciación celular de células de mioblastos.

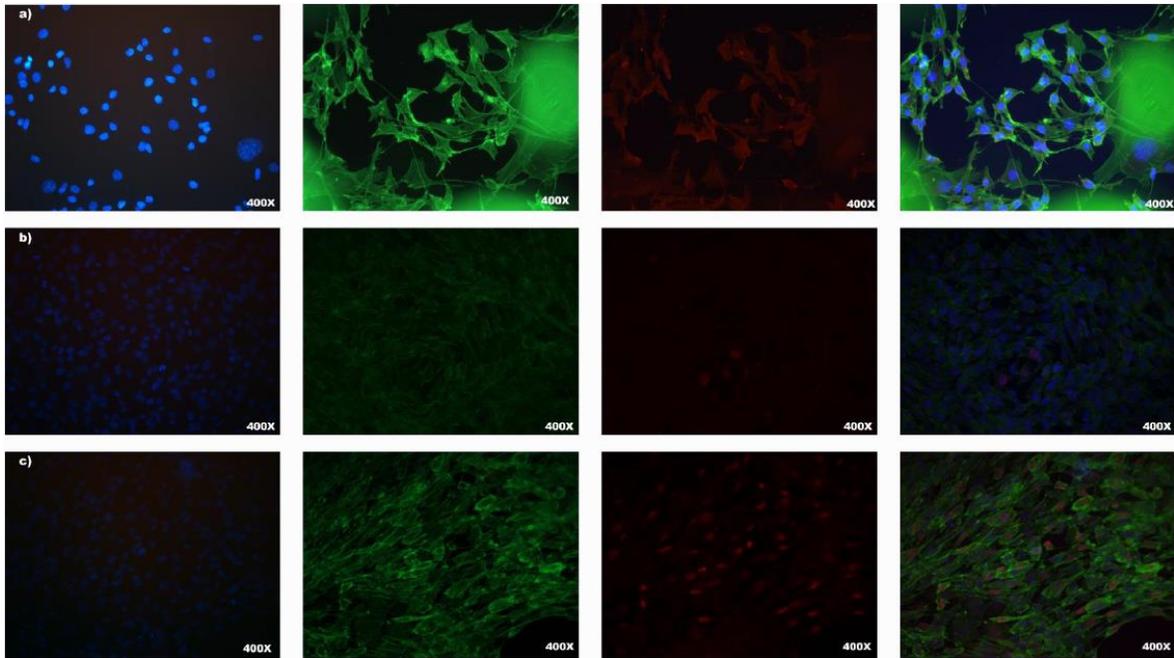


Figura 8. Inmunofluorescencia de células C2C12 con el anticuerpo anti-miogenina (ab1835), Alexa Fluor™ 594: a) C2C12 en medio de crecimiento (control negativo), b) C2C12 en medio de diferenciación (control positivo) y c) C2C12 en medio de diferenciación con estimulación eléctrica después de 72 h (pulsos de 6 ms, 5 V pico, 1 Hz). [Anexo 5].

Se aprecia una diferencia en la respuesta entre el control positivo de células C2C12 y en las células estimuladas, ambas con medio de cultivo de diferenciación, donde las células C2C12 con un campo eléctrico exógeno expresaron niveles más elevados de miogenina en comparación con células sin estimulación eléctrica.

La diferenciación de mioblastos a miotubos funcionales por estimulación eléctrica podría ser beneficiosa para la regeneración muscular en ingeniería de tejidos. Finalmente, el uso de espectroscopía de impedancia se puede aplicar posteriormente para la caracterización de eventos celulares que pueden ser aplicados en el análisis de proliferación y diferenciación celular.

## 10 Conclusiones

El proyecto permitió estudiar el efecto *in vitro* de materiales conductores porosos en el crecimiento celular como lo demuestran los productos presentados a la comunidad científica especializada. Se diseñó y fabricó un sistema de estimulación eléctrica para aplicaciones *in vitro*, para ser utilizado en el futuro con los materiales porosos conductores sintetizados para el estudio de crecimiento celular de células C2C12. Y finalmente, se evaluó el crecimiento de las células C2C12 bajo estimulación eléctrica.

El proyecto de investigación muestra un porcentaje de éxito muy favorable en la mayoría de sus objetivos (Ver documento 2), gracias al apoyo de los centros de investigación del TEC (CIEMTEC, CIB, CEQIATEC) y cooperación de otras universidades (UCR y UNA). Se ha logrado el diseño de electrodos para placas multipozos de cultivo celular y la creación de los circuitos utilizados para la estimulación eléctrica de las células. A su vez, ha sido exitoso el diseño y síntesis de criogeles a base de polisacáridos, y se mantiene activa la investigación y mejora de los sistemas generados como la determinación de su tamaño de poro, el recubrimiento con polímeros conductores y la mejora de ciertas propiedades tales como solubilidad.

## **11 Recomendaciones**

De acuerdo con lo mencionado, los resultados que se han obtenido en la presente investigación han generado y generarán productos científicos de interés en el área de ingeniería biomédica. Confiamos en que los objetivos alcanzados serán de apoyo en el diseño novedoso de sistemas que funcionen como matrices extracelulares para su aplicación como sistemas implantables en personas con afectaciones a nivel tisular en músculo esquelético y que su uso pueda ser extendido y generalizado a otros problemas tisulares donde exista una pobre regeneración.

Si bien, todas estas actividades llevadas a cabo cumplen muchos de los requisitos para la obtención de una matriz extracelular (MEC) funcional, una MEC también requiere la incorporación de moléculas de señalización, así como una apropiada arquitectura de la matriz y propiedades mecánicas para mantener a las células implantadas vivas. Por lo tanto, es necesario realizar investigaciones complementarias como es la evaluación de otras formulaciones de biopolímeros como materiales base, estudio de propiedades tales como dureza y elasticidad de la matriz, así como del comportamiento de las células que hayan sido cultivadas en el andamio, esto es, estudiar el tipo de respuesta expresada a nivel celular que ayudarían a confirmar la adecuada formulación, diseño y síntesis de la matriz extracelular a base de polisacáridos.

Lo anterior, sumado al retraso en actividades del laboratorio producto de la COVID-19 que han limitado el acceso de ingreso al laboratorio tanto de investigadores como de estudiantes asistentes, puso en dificultades el cumplimiento de todas las actividades planteadas. Debido a lo anterior, en el proyecto MICITT FI-038B-19 se pretende dar continuidad a las actividades de este proyecto para realizar un cumplimiento más significativo de los mismos y que sea de mayor provecho para futuras investigaciones relacionadas con el tema.

## 12 Anexos

En las páginas siguientes se incluye una recopilación de todos los artículos científicos, ponencias, posters y tesis desarrolladas como producto de esta investigación.

- Montero-Rodríguez, J. J., Ramirez-Sanchez, K., Valladares-Castrillo, G., Avendano-Soto, E. D., & Starbird-Perez, R. (2020, February). Design and simulation of flexible thin-film electrodes for cell culture stimulation. In 2020 IEEE Latin America Electron Devices Conference (LAEDC), pp. 1-4, IEEE. (Anexo 1).
- Ramírez Sánchez, K., Ledezma-Espinoza, A., Sánchez-Kopper, A., Avendaño-Soto, E., Prado, M., & Starbird Perez, R. (2020). Polysaccharide  $\kappa$ -Carrageenan as Doping Agent in Conductive Coatings for Electrochemical Controlled Release of Dexamethasone at Therapeutic Doses. *Molecules*, 25(9), 2139. (Anexo 2)
- Fernando Alvarado-Hidalgo, Karla Ramírez-Sánchez, Laria Rodriguez, Roy Zamora-Sequeira, Esteban Avendaño-Soto, Ricardo Starbird-Perez and Carlos A. García-González, (March 2021), Hybrid Porous Materials from Starch/ $\kappa$ -Carrageenan/ PVA and Starch/ $\kappa$ -Carrageenan/PVA-SbQ for Tissue Engineering, Athens Conference on Advances in Chemistry. (On-line) (Anexo 3)
- Ramírez-Sánchez, Karla; León-Carvajal, Sebastián; Montero-Rodríguez, Juan José; Castro-Piedra, Silvia; Ulloa-Fernández, Andrea; Avendaño-Soto, Esteban; Prado-Mónica and Starbird-Pérez, Ricardo. Myoblasts in vitro differentiation by exogenous electric field stimulation on custom-made patterned gold electrodes Advanced technologies for the processing and characterization of nanostructured materials CONTACTS 5th - 7th July 2021, Cracow, Poland. (On-line) (Anexo 4)
- Ramírez-Sánchez K., Alvarado-Hidalgo F., Rodríguez-Quesada L., Starbird-Perez R. , Castro-Piedra S., Ulloa-Fernández A., Vázquez, F., Prado, M., Avendaño-Soto, E., García-González, C. Biocompatible conductive porous cryogel based on polysaccharides as extracellular matrix for skeletal muscle cells 7th International Polysaccharide Conference of the European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE). 11th – 15th October 2021 in Nantes, France. (Anexo 5)
- Ramírez-Sánchez, Karla; Ulloa-Fernández, Andrea, Castro-Piedra, Silvia; Montero-Rodríguez, Juan José Prado Porras, Mónica, Avendaño, E; Starbird-Pérez, Ricardo (2019). Myoblasts proliferation and differentiation by electrical impedance spectroscopy and electric field stimulation on a patterned gold electrode. In 2019 Frontiers in Myogenesis Conference: Skeletal Muscle: Development, Regeneration and Disease. (poster). (Anexo 6)

## 13 Referencias

- [1] I. Plá Palacín and P. M. Baptista, "Generación de ductos biliares in vitro en organoides hepáticos 3D de bioingeniería.," Universidad de Zaragoza, 2014.
- [2] R. Starbird, C. A. García-González, I. Smirnova, W. H. Krautschneider, and W. Bauhofer, "Synthesis of an organic conductive porous material using starch aerogels as template for chronic invasive electrodes," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 37, no. 1, 2014.
- [3] R. Starbird, W. H. Krautschneider, G. Blume, and W. Bauhofer, "In vitro biocompatibility study and electrical properties of PEDOT/PEDOT collagen coat PEDOT nanotubes and PEDOT aerogels for neural electrodes," in *Proceedings of the IASTED International Conference on Biomedical Engineering, BioMed 2013*, 2013.
- [4] R. Starbird, C. A. García-González, I. Smirnova, W. H. Krautschneider, and W. Bauhofer, "Synthesis of an organic conductive porous material using starch aerogels as template for chronic invasive electrodes," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 37, pp. 177–183, 2014.
- [5] M. L. P. Langelaan, K. J. M. Boonen, K. Y. Rosaria-Chak, D. W. J. van der Schaft, M. J. Post, and F. P. T. Baaijens, "Advanced maturation by electrical stimulation: Differences in response between C2C12 and primary muscle progenitor cells," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 5, no. 7, pp. 529–539, Jul. 2011.
- [6] H. Park, R. Bhalla, R. Saigal, M. Radisic, N. Watson, R. Langer, and G. Vunjak-Novakovic, "Effects of electrical stimulation in C2C12 muscle constructs," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 2, no. 5, pp. 279–287, Jul. 2008.
- [7] J. Zhang, L. Zhong, Y. Sun, A. Li, J. Huang, F. Meng, B. K. Chandran, S. Li, L. Jiang, and X. Chen, "Enhanced Photoresponse of Conductive Polymer Nanowires Embedded with Au Nanoparticles," *Adv. Mater.*, vol. 28, no. 15, pp. 2978–2982, Apr. 2016.
- [8] R. a Green, S. Baek, L. a Poole-Warren, and P. J. Martens, "Conducting polymer-hydrogels for medical electrode applications," *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 11, no. 1, p. 014107, Feb. 2010.
- [9] J. J. S. Rickard, I. Farrer, and P. Goldberg Oppenheimer, "Tunable Nanopatterning of Conductive Polymers via Electrohydrodynamic Lithography.," *ACS Nano*, vol. 10, no. 3, pp. 3865–70, Mar. 2016.
- [10] B. H. Weiller, S. Virji, C. Baker, J. Huang, D. Li, and R. B. Kaner, "Polyaniline Nanofibers and Composite Materials for Chemical Detection."
- [11] N. K. Guimard, N. Gomez, and C. E. Schmidt, "Conducting polymers in biomedical engineering," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 8, pp. 876–921, 2007.
- [12] B. C. Thompson, S. E. Moulton, J. Ding, R. Richardson, A. Cameron, S. O'Leary, G. G. Wallace, and G. M. Clark, "Optimising the incorporation and release of a neurotrophic factor using conducting polypyrrole.," *J. Control. Release*, vol. 116, no. 3, pp. 285–94, Dec. 2006.
- [13] R. Starbird, W. Krautschneider, G. Blume, and W. Bauhofer, "In Vitro Biocompatibility Study and Electrical Properties of the PEDOT, PEDOT Collagen-Coat, PEDOT Nanotubes and PEDOT Aerogels for Neural Electrodes," in *Biomedical Engineering*, 2013.
- [14] U. Bilitewski, M. Genrich, S. Kadow, and G. Mersal, "Biochemical analysis with microfluidic systems.," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 377, no. 3, pp. 556–69, Oct. 2003.
- [15] C. Yi, C.-W. Li, S. Ji, and M. Yang, "Microfluidics technology for manipulation and analysis of biological cells," *Anal. Chim. Acta*, vol. 560, no. 1, pp. 1–23, 2006.
- [16] A. Khademhosseini, J. Yeh, G. Eng, J. Karp, H. Kaji, J. Borenstein, O. C. Farokhzad, and R. Langer, "Cell docking inside microwells within reversibly sealed microfluidic channels for fabricating multiphenotype cell arrays.," *Lab Chip*, vol. 5, no. 12, pp. 1380–6, Dec. 2005.
- [17] S. Vyawahare, A. D. Griffiths, and C. A. Merten, "Miniaturization and Parallelization of Biological and Chemical Assays in Microfluidic Devices," *Chem. Biol.*, vol. 17, no. 10, pp.

1052–1065, 2010.

- [18] H. Jo, M. Sim, S. Kim, S. Yang, Y. Yoo, J.-H. Park, T. H. Yoon, M.-G. Kim, and J. Y. Lee, “Electrically conductive graphene/polyacrylamide hydrogels produced by mild chemical reduction for enhanced myoblast growth and differentiation,” *Acta Biomater.*, vol. 48, pp. 100–109, 2017.
- [19] Informe proyecto: Desarrollo de microsistemas para aplicaciones de caracterización de compuestos en medio acuoso por impedancia eléctrica. Entidad financiadora: CONARE, Costa Rica. Duración: 01-2018/12-2019.