



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Posgrado en Ingeniería Biomédica

**“Estudio sobre la interacción de nanopartículas
polimerizadas por plasma con sistemas celulares”**

TESIS

Que presenta:

M. en C. Omar Eduardo Uribe Juárez

Matrícula: 2123808115

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias (Ingeniería Biomédica)

Asesores:

Dr. José Rafael Godínez Fernández

Dr. Roberto Olayo González

Jurado:

PRESIDENTE: Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

SECRETARIO: Dr. Ramón González Camarena

VOCAL: Dr. José Campos Terán

VOCAL: Dr. Carlos Alfonso Larqué Velázquez

VOCAL: Dra. Gisela Gutiérrez Iglesias

Iztapalapa, Ciudad de México, 22 de junio de 2023

Índice

Agradecimientos	iii
Resumen.....	iv
1 Introducción	1
1.1 Biomateriales	1
1.1.1 Cerámicos.....	3
1.1.2 Metales.....	4
1.1.3 Polímeros.....	4
1.1.4 Compositos.....	5
1.2 Polimerización	5
1.2.1 Polimerización por adición.....	7
1.2.2 Polimerización por condensación	7
1.2.3 Polimerización por plasma	7
1.3 Interacciones Célula-Biomaterial	9
1.3.1 Biomateriales dentro del cuerpo	9
1.3.2 Células y su entorno	11
2 Antecedentes	13
2.1 Estudio sobre la interacción célula-biomaterial.....	13
2.2 Nanopartículas de polipirrol y polianilina polimerizadas por plasma (NPPPy y NPPAn) ..	14
2.3 Terapias celulares cardíacas (TCC)	15
2.4 Terapias de reemplazo de células beta pancreáticas (TRCBP).....	17
3 Hipótesis.....	21
4 Objetivos	22
4.1 Objetivo general.....	22
4.2 Objetivos particulares	22
5 Material y métodos.....	23
5.1 Animales.....	23
5.2 Reactivos	23
5.3 Nanopartículas de polipirrol (NPPPy), polianilina-pirrol (NPPAn-Py) y polianilina (NPPAn)	24
5.4 Aislamiento y cultivo	25
5.4.1 Cardiomiocitos ventriculares de rata adulta (CVRA).....	25

5.4.2	Islotes pancreáticos (IP) y Células del IP (CIP)	26
5.4.3	Cultivo	27
5.5	Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	28
5.6	Espectro infrarrojo	28
5.7	Registro de la secreción de insulina	28
5.8	Análisis estadístico	29
6	Resultados y discusión	30
6.1	Nanopartículas de polianilina (NPPAn), polianilina-pirrol (NPPAn-Py) y polipirrol (NPPPy) 30	
6.2	Cardiomiocitos ventriculares de rata adulta (CVRA).....	33
6.3	Células de Islotes Pancreáticos (CIP).....	44
7	Conclusiones.....	53
8	Perspectivas a futuro.....	54
9	Bibliografía	55

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca de Doctorado número: 283371, al Posgrado en Ciencias (Ingeniería Biomédica) de la Universidad Autónoma Metropolitana, a mis padres, a mis hermanos y a todos mis compañeros de laboratorio que me ayudaron y acompañaron durante todo este proceso, muchas gracias.

Resumen

Nanopartículas de polianilina (NPPAn) y polipirrol (NPPPy) fueron sintetizadas mediante la técnica de polimerización por plasma, el diámetro medio de las NPPAn y NPPPy fue de 730 y 330 nm respectivamente. El espectro infrarrojo de ambos polímeros mostró características esperadas de la técnica de polimerización por plasma (como fragmentación y deshidrogenación de algunos monómeros durante la síntesis), el espectro infrarrojo también mostró la presencia de grupos amino y OH en la estructura de los polímeros, la presencia de estos grupos funcionales en las nanopartículas estuvo relacionada con la adhesión celular, así como con su capacidad para formar agregados celulares tridimensionales. Las NPPAn y NPPPy ayudaron a mantener en cultivo células de islotes pancreáticos (CIP) y cardiomiocitos ventriculares de rata adulta hasta por treinta días, además, ayudaron a mantener la forma característica de los cardiomiocitos retrasando probablemente procesos de desdiferenciación, necrosis y apoptosis. Por último, las CIP cultivadas con las NPPPy formaron agregados celulares con diámetros $\leq 60 \mu\text{m}$, los cuales deberían tener un adecuado suministro de oxígeno, el cual, es uno de los principales retos que enfrentan las terapias de reemplazo de células beta pancreáticas en la actualidad.

1 Introducción

1.1 Biomateriales

Desde tiempos inmemoriales, los humanos han tratado de restaurar la función de órganos y extremidades que han dejado de funcionar adecuadamente, uno de los reportes más antiguos lo podemos encontrar en el Rigveda (3500 a 1600 A.C.), este antiguo libro sagrado indio narra la historia de Vishpala una reina guerrera que perdió su pierna en batalla, sus miembros lacerados fueron tratados con sutura y fue provista de una pierna de hierro. Las formas más tempranas de biomateriales fueron generalmente materiales con forma humana empleados de forma externa sobre el cuerpo [1], los materiales puestos dentro del cuerpo (implantes) generalmente no eran viables debido a las infecciones. En la década de 1860 el Dr. Joseph Lister desarrollo las primeras técnicas quirúrgicas asépticas; además, a mediados del siglo XX fueron descubiertos los primeros antibióticos, estos dos acontecimientos permitieron superar la severa restricción que representaban las infecciones para implantar materiales en el cuerpo humano [1][2].

La definición de biomaterial ha ido cambiando en el tiempo con el progreso de la ciencia y la tecnología. Desde los primeros registros de biomateriales hasta mediados del siglo XX los trabajos con biomateriales estaban centrados en algunas propiedades fisicoquímicas básicas como la resistencia, rigidez, ductilidad, resistencia a la fractura y la corrosión. Los biomateriales no necesariamente deben de ser inertes en el cuerpo humano; por el contrario, los biomateriales interactúan con el cuerpo humano a niveles celulares y moleculares. En años más recientes, los trabajos con biomateriales se han centrado en estudiar y manipular la respuesta biológica de los biomateriales. Una de las definiciones más completas de biomaterial es la siguiente:

Biomaterial. - material destinado a interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar, o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo [1].

Para comenzar a estudiar los biomateriales, es necesario entender el tipo de enlaces químicos que mantienen unidos sus átomos [1]. Los enlaces primarios mantienen juntos los átomos de una molécula, las fuerzas atractivas que actúan entre moléculas se les denomina enlaces secundarios, fuerzas de valencia secundarias, fuerzas intermoleculares o fuerzas de van der Waals [3]. Los enlaces primarios son el enlace iónico, metálico, covalente y coordinado [1][4], estos enlaces producen estados más estables mediante diversos tipos de interacciones entre los electrones de las capas más externas de los átomos [3].

Enlace iónico. – Este enlace es formado entre un átomo metálico y un átomo no metálico. La configuración electrónica más estable para la mayoría de los átomos, es una capa externa de ocho electrones llamada octete. El octete puede obtenerse por la donación de electrones de un átomo a otro átomo, al donar y recibir electrones, el átomo que dona su electrón queda cargado positivamente y se le denomina catión; por otro lado, el átomo que recibe el electrón queda cargado negativamente y se le denomina anión, la fuerte fuerza de atracción electromagnética entre el anión y el catión crean un enlace iónico que los mantiene unidos. En las moléculas con enlaces iónicos

cada catión es rodeado por tantos aniones como sea posible, para reducir la fuerza de repulsión catión-catión y anión-anión; por lo tanto, los enlaces iónicos son adireccionales, es decir, los enlaces tienen la misma fuerza en todas las direcciones. La materia con este tipo de enlaces tiene estructura altamente ordenada, generalmente son sólidos con alta resistencia y rigidez, pero, relativamente frágiles, además, son malos conductores térmicos y eléctricos; ya que, tanto los átomos como los electrones se encuentran fijos y son incapaces de moverse ante estímulos externos.

Enlace metálico. – Este enlace es formado entre átomos metálicos. Los átomos metálicos tienen un número bajo de electrones de valencia; además, los electrones de valencia no están firmemente unidos a ningún átomo; por lo tanto, los electrones de valencia pueden perderse y ganarse fácilmente; sin embargo, no todos los átomos podrán tener capas completas de ocho electrones. El enlace metálico es modelado como átomos con carga positiva (cationes) inmersos en un mar de electrones, la nube de electrones actúa como una especie de adhesivo para los cationes evitando además la repulsión catión-catión. Los enlaces metálicos son adireccionales y los planos de iones tienen la capacidad de deslizarse unos sobre otros. La materia con enlaces metálicos (metales) tiene estructura altamente ordenada, generalmente son buenos conductores térmicos y eléctricos; además, pueden deformarse cuando se aplican fuerzas externas sobre ellos.

Enlace covalente. - Este enlace es formado entre átomos no metálicos, en este enlace los átomos comparten electrones de valencia para formar capas eléctricamente estables (octete). Los electrones compartidos no pueden moverse libremente de un átomo a otro; además, rara vez son igualmente compartidos por los dos átomos. Si la electronegatividad de los dos átomos es aproximadamente igual el enlace generado será no polar (apolar); de lo contrario, el enlace formado puede ser polar, es decir, se comportará como un dipolo. Los enlaces covalentes son fuertes y altamente direccionales; sin embargo, los átomos tienen la habilidad de rotar alrededor de enlaces simples, es decir, enlaces en donde se comparten solo un par de electrones de valencia. Los materiales con enlaces covalentes suelen deformarse cuando se aplica sobre ellos una fuerza externa y generalmente son malos conductores térmicos y eléctricos.

Enlaces coordinados. - Es un enlace similar al covalente, en el que se comparten electrones para formar octetes estables, pero en el enlace coordinado solo uno de los átomos comparte sus electrones, a este átomo se le denomina donante, al átomo que recibe los electrones para completar su octete se le denomina receptor. El enlace coordinado tiene propiedades intermedias entre los enlaces iónicos y covalentes.

Los enlaces secundarios son el puente de hidrógeno, fuerza de dipolo, fuerza de inducción y fuerza de dispersión. En este tipo de enlaces no se comparten ni se intercambian electrones, están relacionados con la formación de dipolos, poseen menos del 10% de la fuerza de los enlaces covalentes y son menos direccionales; sin embargo, pueden influir significativamente en las propiedades de los materiales.

Puente de hidrógeno. – Cuando el hidrógeno se une covalente a átomos electronegativos como el oxígeno, nitrógeno y flúor, se forma un dipolo debido a la distribución desigual de los electrones, el átomo de hidrógeno adquiere una carga parcial positiva δ^+ mientras que el átomo de oxígeno, nitrógeno o flúor una carga parcial negativa δ^- , el dipolo (δ^+ , δ^-) produce fuerzas de atracción electromagnéticas en los dipolos y iones vecinos, a este enlace se le denomina puente de hidrógeno y es el enlace secundario más fuerte.

Fuerza de dipolo. - Debido a la polaridad de muchos enlaces covalentes, diferentes partes de una molécula pueden tener cargas iguales y opuestas. A distancias grandes dicha molécula actúa como sistema eléctricamente neutro, pero, a distancias pequeñas la molécula actúa como un dipolo y puede atraer grupos de moléculas vecinas con cargas opuestas. La fuerza de atracción dependerá de la alineación de los dipolos, dado que la fuerza de atracción entre dipolos alineados se opone al movimiento térmico, las fuerzas dipolares dependen críticamente de la temperatura.

Fuerza de inducción. – El campo eléctrico de un dipolo permanente puede causar ligeros desplazamientos en los electrones de moléculas vecinas. Estos ligeros desplazamientos pueden producir a su vez distribuciones asimétricas o desiguales de los electrones formando así dipolos temporales en moléculas que no tenían dipolos permanentes, a estos dipolos se les denomina dipolos inducidos y a la fuerza de atracción intermolecular entre el dipolo permanente y el dipolo inducido se le denomina fuerza de inducción.

Fuerza de dispersión. – Los electrones de los átomos y moléculas se encuentran en constante movimiento y pueden originar dipolos temporales instantáneos en cualquier momento. Estos dipolos pueden a su vez perturbar los electrones de un átomo o molécula vecina, produciendo un dipolo inducido. Las fluctuaciones de estos dipolos instantáneos generan fuerzas de atracción relativamente débiles, a estas fuerzas de atracción se les denomina fuerzas de dispersión o fuerzas de London. Las fuerzas de dispersión están presentes en todas las moléculas y en las moléculas apolares es la única fuerza intermolecular presente [1] [3] [4] [5].

Existen diversas formas de clasificar los biomateriales, una de ellas es dividirlos en dos categorías (naturales y sintéticos) dependiendo de su origen. Sin embargo, la forma más general de clasificar los biomateriales, es decir, la clasificación más comúnmente utilizada divide los biomateriales en cuatro categorías (cerámicos, metales, polímeros y composites) dependiendo de su estructura molecular y el tipo de enlaces que los componen. Cada uno de estos tipos de materiales tienen propiedades distintas, que determinan su comportamiento y los hacen más o menos apropiados para diferentes aplicaciones como biomaterial.

1.1.1 Cerámicos

Los cerámicos son materiales sólidos caracterizados por tener enlaces iónicos o combinaciones de enlaces iónicos y covalentes. Usualmente están compuestos por elementos metálicos y no metálicos (comúnmente nitruros, carburos y óxidos), pueden tener estructura cristalina o amorfa (no cristalina). Debido a la naturaleza de sus enlaces los materiales cerámicos son extremadamente duros, frágiles y difíciles de deformar, tienen un alto módulo elástico, alta resistencia a la compresión, pero, baja tenacidad y resistencia a la tracción, en general son buenos aislantes térmicos y eléctricos, pueden resistir mejor que la mayoría de las otras clases de materiales altas temperaturas y ambientes químicos desafiantes [1].

1.1.2 Metales

Los metales son materiales inorgánicos cuyos átomos se mantienen unidos por enlaces metálicos. La estructura de los metales es principalmente cristalina con átomos estrechamente empaquetados y ordenados. Dado que sus electrones de valencia pueden ganarse y perderse fácilmente, los metales son buenos conductores térmicos y eléctricos. La fuerte naturaleza de sus enlaces y el empaquetamiento compacto de sus átomos hacen que los metales sean fuertes y tengan un alto módulo de elasticidad, resistencia y puntos de fusión; además, dado que los planos de iones pueden deslizarse unos sobre otros los metales son dúctiles y pueden moldearse en formas complejas. Sin embargo, pueden ser susceptibles a la corrosión, especialmente en medios con iones de cloruro, esto puede ser motivo de preocupación cuando se utilizan como biomateriales; por lo tanto, deben ser pasivados, es decir, cubiertos con películas de materiales inertes [1].

Aunque los metales son comúnmente utilizados como implantes de carga y dispositivos de fijación en los campos dentales y ortopédicos, también son utilizados en una gran variedad de otras aplicaciones como cables guía, stents, válvulas cardíacas y electrodos [1].

1.1.3 Polímeros

Los polímeros son macromoléculas de largas cadenas formadas por la unión química de un gran número de unidades repetidas llamadas monómeros [6]. Son materiales orgánicos usualmente compuestos por carbono, hidrogeno y otros átomos no metálicos unidos por enlaces covalentes. Los polímeros pueden tener estructura cristalina, amorfa o combinaciones de las dos, usualmente no son buenos conductores térmicos ni eléctricos, son altamente deformables y dúctiles ya que sus cadenas moleculares tienen la capacidad de deslizarse entre ellas (siempre y cuando no estén entrecruzadas); además, sus átomos pueden rotar alrededor de enlaces simples [1].

Los enlaces iónicos normalmente no se encuentran en sustancias macromoleculares, sin embargo, pueden ser utilizados para entrecruzar cadenas poliméricas [4], un claro ejemplo son los hidrogeles. Los hidrogeles son redes poliméricas hidrofílicas insolubles en agua [7] y se pueden entrecruzar al formar enlaces iónicos [8], los hidrogeles tienen la capacidad de absorber grandes cantidades de agua [7].

Otro enlace químico que puede estar presente en los polímeros es el enlace coordinado, los polímeros coordinados tienen arquitecturas periódicas definidas por el ensamblaje de entidades metálicas y ligandos generalmente orgánicos a través de enlaces coordinados [9]. Los polímeros coordinados están siendo activamente investigados, algunas propiedades importantes de los polímeros coordinados son: estabilidad térmica, porosidad, luminiscencia, conductividad eléctrica, y magnetismo [10].

En los últimos cincuenta años, el uso de polímeros como biomateriales ha ido en aumento y son utilizados extensamente como suturas, revestimientos para cables y dispositivos implantables como marcapasos, superficies de apoyo para articulaciones totales, mallas reabsorbibles, placas de fijación y tornillos, lentes de contacto y andamios de ingeniería de tejidos [1].

1.1.4 Compositos

Los compositos son materiales compuestos por dos o más tipos de materiales con diferentes propiedades físicas, químicas y mecánicas. Las propiedades o características de los compositos están determinadas por la forma, tamaño, orientación, distribución, proporciones relativas y propiedades individuales de cada uno de los materiales que lo componen.

La mayoría de los compositos están constituidos por solo dos materiales o fases llamadas comúnmente matriz y refuerzo. La matriz suele ser un material con relativamente alta ductilidad y baja resistencia a la fractura que rodea al otro componente, comúnmente llamada fase dispersa o refuerzo. Las propiedades finales de los compositos dependen en gran medida de la geometría y distribución del refuerzo; además, es necesario que la interfaz entre las dos fases (refuerzo y matriz) transfiera adecuadamente los esfuerzos y que mantenga las fases unidas.

El hueso es un ejemplo de un composito, a nivel microestructural tiene partículas de apatita (partículas cerámicas) actuando como refuerzo distribuido en una matriz de colágeno (polímero natural). Esta combinación de apatita y colágeno da al hueso su fuerza (resistencia a fracturas por esfuerzo o fatiga) y tenacidad (resistencia a aumentar de la longitud de grietas potencialmente peligrosas) [11] [12].

1.2 Polimerización

Polimerización es el proceso mediante el cual se producen polímeros. Durante la polimerización los monómeros (A) se unen entre sí para formar dímeros, trímeros, tetrámeros (Ec. 1.1). Los oligómeros (dímeros, trímeros, tetrámeros,...) son moléculas formadas por un número pequeño monómeros, y son esencialmente productos intermedios en la reacción de polimerización. Los monómeros y oligómeros se combinan entres si hasta formar largadas moléculas (macromoléculas). El punto en el que los monómeros se combinan en una solo molécula en un grado suficiente para ser llamadas polímero es en gran medida arbitrario [6] [13] [14] .

$$\text{Monomero} = A$$

$$\text{Dimero} = A - A$$

$$\text{Trimero} = A - A - A$$

$$\text{Tetramero} = A - A - A - A$$

⋮

$$\text{Polímero} = [A]_n$$

(Ecuación 1.1)

Los copolímeros son polímeros formados por dos o más tipos de monómeros diferentes (A, B, \dots). Según la forma en la que estén ordenados los monómeros, los copolímeros pueden ser clasificados en alternantes, aleatorios y de bloque.

Copolímero alternante = $A - B - A - B - A - B - A - B - A - B - A - B$

Copolímero aleatorio = $A - B - B - A - B - A - A - B - A - A - A - B$

Copolímero en bloque = $A - A - A - A - B - B - B - B - A - A - A - A$

Dependiendo de su estructura los polímeros pueden clasificarse en lineales, ramificados y entrecruzados (Fig. 1.1)

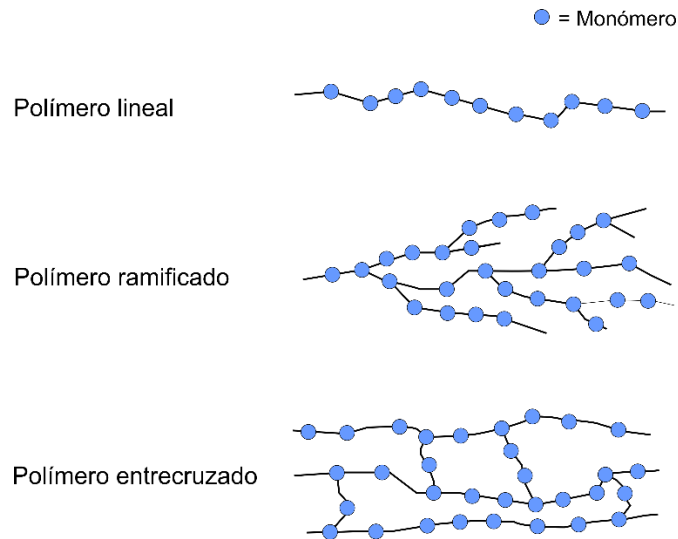


Fig. 1.1. Polímeros lineales, ramificados y entrecruzados

La capacidad de un monómero para unirse con monómeros vecinos es conocida como funcionalidad, la estructura de los polímeros depende tanto de la funcionalidad de los monómeros como de sus condiciones de reacción (temperatura, concentración, etc.) [15]. Los dos principales mecanismos de polimerización son adición y condensación.

1.2.1 Polimerización por adición

La polimerización por adición es el método de polimerización comúnmente más utilizado. Este tipo de polimerización ocurre en tres etapas distintivas llamadas iniciación, propagación y terminación. En la primera etapa la reacción de polimerización es iniciada por un “iniciador” externo que crea sitios reactivos, en la segunda etapa el crecimiento de las cadenas poliméricas procede exclusivamente por reacciones entre monómeros y sitios reactivos en las cadenas del polímero. Los monómeros se unen de uno en uno a la cadena polimérica y cada vez que se unen generan nuevos sitios reactivos al final de la cadena. En la última etapa los sitios reactivos son neutralizados y la propagación de las cadenas se detiene. Los monómeros comúnmente utilizados en la polimerización por adición son insaturados, es decir, monómeros con enlaces $C=C$ y/o $C\equiv C$, durante la polimerización por adición todos los monómeros son consumidos y no se forman subproductos [13].

1.2.2 Polimerización por condensación

La polimerización por condensación es el segundo método de polimerización más comúnmente utilizado. En este mecanismo se utilizan monómeros multifuncionales, es decir, con dos o más sitios reactivos; de modo que, tanto monómeros como oligómeros pueden reaccionar para formar nuevos enlaces. Además, cuando los monómeros u oligómeros reaccionan, eliminan átomos que forman pequeñas moléculas (condensación), subproducto de la polimerización. Dado que, en este mecanismo las reacciones pueden ser reversibles es necesario eliminar el subproducto para alcanzar el equilibrio y detener la reacción. En la polimerización por condensación generalmente se combinan dos monómeros en una estructura alternante [1] [13].

1.2.3 Polimerización por plasma

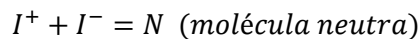
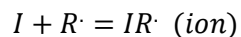
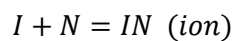
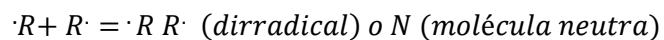
Los plasmas son gases casi-neutros que consisten en fotones, partículas neutras, partículas metaestables, iones, radicales y electrones. Los plasmas pueden ser generados artificialmente. La forma más común de generar plasma es mediante fuentes de energía eléctrica. Estos son llamados “plasmas fuera de equilibrio”, ya que la temperatura o energía cinética de los electrones y las partículas pesadas (incluidos los iones) es diferente; dado que, solo los electrones reciben energía del campo eléctrico (generado por la fuente de energía eléctrica); y por lo tanto, alcanzan una temperatura relativamente alta (varios miles de grados Kelvin) comparada con la temperatura de las partículas pesadas (alrededor de la temperatura ambiente, aproximadamente 300 grados Kelvin). Por esta razón, los plasmas generados por energía eléctrica son llamados “plasmas fríos” o “plasmas no térmicos” [16].

Una forma más conveniente de describir la temperatura es a través de la energía cinética, un electrón volt (eV) está definido como la cantidad de energía cinética que adquiere un electrón al

desplazarse de un punto “a” a un punto “b” cuando la diferencia de potencial eléctrico $V_a - V_b = 1 \text{ volt}$ ($1eV = 1.6 \times 10^{-19} \text{ Joules}$); además, la constante de Boltzmann ($K_B = 1.39 \times 10^{-23} \text{ Joules} * \text{Kelvin}^{-1}$) relaciona la energía y la temperatura de una molécula (Ec. 1.2); por lo tanto, podemos relacionar la energía cinética de los electrones con su temperatura ($1eV = 11600 \text{ Kelvin}$)

$$E = K_B T \quad (\text{Ecuación 1.2})$$

La temperatura promedio de los electrones en plasmas artificiales se encuentra generalmente entre 2-10 eV. Los electrones distribuyen energía por todo el plasma a través de colisiones con moléculas neutras y dependiendo de su energía pueden generar diferentes especies de plasma. Los electrones con energía $< 3 \text{ eV}$ producen colisiones elásticas con mínima transferencia de energía entre la molécula y el electrón, los electrones con energía entre 3 – 5 eV pueden romper homolíticamente enlaces covalentes fragmentando moléculas y creando así radicales, colisiones más energéticas (5 – 8 eV) entre electrones y moléculas neutras pueden excitar electrones de niveles centrales de la molécula neutra al absorber la energía cinética del electrón, produciendo moléculas excitadas que solo pueden existir durante breves periodos de tiempo hasta que el electrón excitado regresa a su estado energético inicial. La transición del estado excitado al estado inicial puede ser en un solo paso o en una serie de pasos emitiendo un fotón en cada paso de transición. Por último, colisiones $> 10 \text{ eV}$ pueden crear iones positivos al liberar un electrón de la molécula neutra como resultado de la colisión, los electrones liberados pueden ganar energía cinética del campo eléctrico o pueden ser atraídos por moléculas neutras con alta electronegatividad, creando iones negativos. Colisiones entre radicales, iones y moléculas neutras pueden producir reacciones químicas que pueden clasificarse de forma general en cinco tipos de colisiones (Ec. 1.3).



$$(N = \text{molécula neutra}, R \cdot = \text{Radical}, I = \text{ion}) \quad (\text{Ecuación 1.3})$$

Las moléculas neutras son las especies de plasma más abundantes (aproximadamente $> 99\%$), las siguientes especies más abundantes son los radicales. Algunos investigadores han determinado que en los plasmas generados en sus centros de investigación los iones, radicales y moléculas neutras encuentran en una proporción aproximada de $1 \text{ ion} : 500 \text{ radicales} : 10^5 \text{ moléculas neutras}$; por lo tanto, las colisiones entre moléculas neutras y radicales son las más probables. Como resultado de dicha colisión se obtienen radicales más grandes; sí además, la molécula neutra es insaturada podría iniciar procesos de polimerización en cadena, las siguientes colisiones más probables ocurren entre radicales. Como resultado de este tipo de colisiones los radicales pueden

combinarse para formar una molécula neutra o pueden formar dirradicales (moléculas con dos electrones de valencia no apareados). Las colisiones que implican iones son frecuentemente ignoradas debido a la baja proporción de iones en los plasmas fríos. No obstante, debido a la alta proporción de moléculas neutras las colisiones entre iones y moléculas neutras son bastante altas y las colisiones entre iones y moléculas neutras o radicales producen iones más grandes. Además, monómeros y oligómeros pueden protonarse debido a este tipo de colisiones, por último, las colisiones entre iones resultan en moléculas con carga neutra. En conclusión, las colisiones entre especies de plasma pueden dar como resultado la formación de especies más grandes.

Las especies del plasma también interactúan con la superficie, el flujo de electrones del plasma hacia la superficie, carga negativamente a la superficie. Por otro lado, al perder electrones el plasma adquiere una carga eléctrica positiva, produciendo así una diferencia de potencial entre la superficie y el plasma denominado potencial de vaina. Cuando el potencial de vaina llega al equilibrio, la diferencia entre el flujo de electrones y iones positivos hacia la superficie es igual a cero, solo los electrones con mayor energía pueden llegar a la superficie (los electrones de menor energía son repelidos por las fuerzas electromagnéticas). La energía cinética de los iones les permite depositarse en la superficie y crear radicales, pero, también puede erosionar el material ya depositado. Los radicales y partículas neutras llegan a la superficie sin energía cinética y dependen de su energía química (electrones de valencia y dobles enlaces) para injertarse en la superficie [17].

La polimerización por plasma es frecuentemente utilizada para formar películas delgadas en distintos tipos de superficies (incluidas metales y otros polímeros). Las películas sintetizadas por plasma son ultradelgadas (de 10 nm a algunos cientos de nanómetros), sin poros, homogéneas y tienen buena adhesión. Los polímeros sintetizados por plasma son frecuentemente diferentes a los sintetizados por métodos convencionales debido a su mecanismo de reacción único, en el cual los monómeros se entrecruzan, fragmentan y reorganizan para formar un polímero con estructura irregular en lugar de los polímeros con unidades repetitivas. La estructura irregular mejora las propiedades mecánicas de las películas y la resistencia al envejecimiento, oxidación y contracción [18]. En la polimerización por plasma se pueden utilizar compuestos orgánicos saturados e insaturados como monómero, a diferencia de los métodos convencionales de polimerización que requieren características específicas para los monómeros, como presencia de dobles enlaces [19]. Además, la polimerización por plasma está libre de agentes contaminantes, ya que, no requiere iniciadores, no se generan subproductos y la deposición del polímero está libre de solventes [17].

1.3 Interacciones Célula-Biomaterial

1.3.1 Biomateriales dentro del cuerpo

La resistencia, elasticidad, conductividad eléctrica, térmica, resistencia a envejecimiento o corrosión son algunas de las propiedades deseadas de los biomateriales. Sin embargo, aun cuando se logren

obtener todas estas propiedades deseadas, el comportamiento de un biomaterial con el entorno que lo rodea es crucial para su desempeño, adaptar las superficies de los biomateriales para una interacción perfecta con el cuerpo humano es una tarea compleja [1,20].

Cuando se implanta un biomaterial en el cuerpo se inicia un proceso llamado reacción de cuerpo extraño (RCE), este proceso tiene dos etapas (aguda y crónica). El daño tisular y la extravasación de sangre que inevitablemente se produce durante el proceso de implantación desencadena la etapa aguda. Después de implantar un biomaterial en el cuerpo, el biomaterial tiene contacto con fluidos biológicos, las proteínas en los fluidos biológicos son adsorbidas aleatoriamente por la superficie del biomaterial (muchas de las cuales se derivan de sangre extravasada, como albúmina y fibrinógeno), tardando de segundos a minutos en cubrir su superficie (formando la llamada matriz provisional). Las propiedades superficiales de los biomateriales determinarán el tipo, cantidad y conformación de las proteínas adsorbidas. La composición de la matriz provisional, así como, la conformación y la orientación de las proteínas pueden cambiar con el tiempo. Las proteínas adsorbidas transforman el biomaterial en un material biológicamente reconocible y son estas proteínas la base de todas las reacciones que pueden seguir ocurriendo en el cuerpo [20,21].

A los pocos minutos de la implantación, los neutrófilos migran al sitio de la lesión, se adhieren a la matriz provisional y comienzan a liberar factores que promueven el proceso inflamatorio, aumentando la permeabilidad vascular y atrayendo monocitos al sitio de la implantación. Los monocitos comienzan a diferenciarse en macrófagos, que a su vez proliferan, pueblan el sitio de la lesión y se adhieren a la superficie del implante. La adhesión ocurre a través de algunos tipos particulares de integrinas (receptores de adhesión que median la comunicación entre los ambientes extracelular e intracelular [22]) como el $\alpha_M\beta_2$ que tiene afinidad a algunas proteínas séricas como fibronectina y fibrinógeno. Los macrófagos adheridos se aplanan sobre la superficie del implante en un intento de engullirlo y fagocitarlo. Algunos macrófagos adheridos al implante comienzan a fusionarse entre sí formando células gigantes de cuerpo extraño polinucleadas capaces de fagocitar partículas más grandes. Al no poder fagocitar todo el implante (debido a su gran tamaño) los macrófagos secretan enzimas y especies reactivas de oxígeno en un intento de descomponer el cuerpo extraño en fragmentos más pequeños. Si los macrófagos degradan y fagocitan con éxito el implante la RCE termina y el tejido vuelve lentamente a la normalidad; de lo contrario, inicia la etapa crónica.

Durante la transición a la etapa crónica los macrófagos cambian de un fenotipo de activación pro-inflamatoria (macrófagos M1) a un fenotipo anti-inflamatorio y generador de tejidos (macrófagos M2). Los macrófagos M2 atraen y activan poblaciones de fibroblastos locales que proliferan, se adhieren, cubren a la superficie del implante y comienzan a depositar capas de proteínas de la ECM formando una capsula. Dicha capsula aísla el implante del tejido circundante y alcanza un estado estacionario cuando la actividad de los macrófagos M2 ya no es lo suficientemente intensa como para continuar con la fibrosis del implante. Sin embargo, dado que la fuente de la RCE permanece presente dentro del cuerpo, si la capsula se daña o se remueve, la capsula es capaz de volver a crecer y puede adaptarse si las propiedades del implante cambian. Si bien los procesos celulares de la RCE están bien caracterizados, aún se desconoce cuáles características o propiedades del implante son las que inicialmente lo etiquetan como extraño [21].

1.3.2 Células y su entorno

Las células y su microambiente están vinculadas por una interacción dinámica y bidireccional que rige la fisiología de todo órgano y tejido [23]. Las integrinas son la principal conexión entre la célula y su entorno [1]. Una característica única de las integrinas es la transmisión de señales en ambas direcciones (las células producen, secretan y remodelan la ECM; a su vez, la ECM transmite señales a las células que influyen en sus características y funciones, incluidas proliferación, migración y diferenciación celular [24] [1]) a través de la membrana plasmática celular [25]. Las integrinas son glucoproteínas heterodiméricas transmembranales que funcionan como receptores y consisten en subunidades α y β (no asociadas covalentemente) con grandes porciones extracelulares (ectodominio), una región transmembrana de un solo paso y una cola citoplasmática generalmente corta [22]. Las colas citoplasmáticas de las integrinas pueden interactuar con varias proteínas del citoesqueleto (como talina y kindlina) que pueden producir cambios conformacionales de largo alcance en las integrinas y que modulan positivamente su afinidad por una amplia gama de ligandos extracelulares, incluidas algunas proteínas de la ECM (como fibronectina, laminina, vitronectina y el colágeno) [26]. Cuando las integrinas se unen a ligandos extracelulares, conectan al citoesqueleto de actina con su microentorno, transduciendo estímulos mecánicos y promoviendo la formación de adhesiones focales (grupos densos de integrinas localizados en sitios específicos [1]). La señalización de integrinas finalmente culmina en la inactivación de integrinas, que es impulsada por procesos como la inhibición de la cola citoplasmática y el reciclaje endocítico [22,26]. En consecuencia, las integrinas modulan una amplia gama de funciones celulares, incluida la adhesión, migración, organización de la ECM, apoptosis y diferenciación celular [27,28].

La ECM es una red tridimensional dinámica compuesta de una matriz de proteínas (incluidas colágeno, elastina, fibronectina y laminina), proteoglicanos y glicosaminoglicanos. La ECM rodea y alberga a las células, proporciona soporte estructural para las células y tejidos, determina y controla los comportamientos y características más fundamentales de las células, como la proliferación, adhesión, migración, polaridad, diferenciación y apoptosis. La ECM puede cambiar de un órgano a otro; no obstante, su composición es bastante similar en todo el cuerpo. La proteína más común de la ECM (así como la proteína más abundante en el cuerpo humano) es el colágeno, representando aproximadamente el 30% de las proteínas de la ECM, el colágeno es uno de los materiales biológicos más resistentes a la tensión aplicada o fuerza de tracción [1]. El colágeno y su organización contribuyen en gran medida a establecer las propiedades mecánicas de los tejidos y aunque su función es considerada como material tisular de soporte (aportando elasticidad y estabilidad), también posee dominios con afinidad a proteínas de adhesión celular como integrinas.

Al igual que el colágeno, la fibronectina es otro componente muy abundante de la ECM. Se considera que la función principal de la fibronectina es como proteína de adhesión; puesto que, la

fibronectina posee múltiples dominios con afinidad a diversas moléculas como colágeno, integrinas, fibrina, heparina, factores de crecimiento y citocinas. La laminina es otro de los principales componentes de la ECM y es el componente principal de la membrana basal (un tipo de ECM pericelular), también posee múltiples dominios con afinidad a receptores de la superficie celular como integrinas, otras moléculas de laminina, colágeno tipo IV y proteoglicanos. La laminina comúnmente se organiza en grandes cuadrículas poligonales, tejidas junto con el colágeno IV en una configuración de malla (lattice), el rol de la laminina en la ECM está asociado con arquitectura y estabilidad.

La elastina es un componente clave de la ECM, ésta es aproximadamente mil veces más flexible que el colágeno. Su función principal en la ECM es aportar elasticidad y resiliencia, es decir, la capacidad de deformarse y recuperar su forma original.

Los proteoglicanos consisten en una proteína central a la que se unen covalentemente cadenas laterales de glucosaminoglucanos. Los glucosaminoglucanos son polisacáridos aniónicos lineales formados por unidades repetidas de disacáridos. Dado que las cadenas de los glucosaminoglucanos permiten que los proteoglicanos secuestren agua y cationes divalentes. Los proteoglicanos confieren resistencia mecánica a la compresión, hidratación de los tejidos y llenado de espacios, proteoglicanos y glucosaminoglucanos también desempeñan funciones biológicas ya que pueden almacenar factores de crecimiento y citocinas. Además, glucosaminoglucanos como el ácido hialurónico tienen dominios para proteínas de adhesión celular (como CD44 y RHAMM) y otros componentes de la ECM [1,24,29–34]. Uno de los principales objetivos en la investigación moderna de biomateriales es reclutar la organización nativa de la ECM en la superficie del biomaterial [1].

2 Antecedentes

2.1 Estudio sobre la interacción célula-biomaterial

Una gran parte de la investigación actual en biomateriales está dedicada a estudiar la interacción entre células y biomateriales [1]. Estudiar la interacción de células con biomateriales puede proporcionar una gran cantidad de datos particularmente útiles para dilucidar y controlar los mecanismos específicos por los cuales las células reciben información de su microentorno. Esta información también puede ser útil tanto en modificaciones tempranas de biomateriales como en el desarrollo de nuevos biomateriales [23]. Las técnicas *in vitro* representan uno de los entornos más controlables para explorar las interacciones biomaterial-célula; sin embargo, este tipo de técnicas tienen limitaciones importantes.

El cultivo celular es la técnica comúnmente más utilizada y pueden dividirse en dos tipos: 2D y 3D. Los cultivos celulares sobre superficies planas (2D) no proporcionan un entorno natural para las células. Las células sembradas en sustratos 2D se polarizan, manteniendo anclada solo una parte de su superficie y exponiendo las partes restantes al medio de cultivo. El contacto con las células vecinas se limita a los bordes planos que comparten entre sí, esto contrasta marcadamente con el entorno natural de los tejidos, en donde cada célula interactúa estrechamente con las células cercanas. El transporte de masa está alterado, algunas proteínas como las citocinas y factores de crecimiento se difunden rápidamente en los medios de los cultivos 2D y llegan a las células de manera uniforme, mientras que la ECM nativa produce gradientes de difusión que desempeñan un papel clave en la señalización y el desarrollo de tejidos [23]. Las deformaciones mecánicas son inexistentes incluso en células de tejidos que naturalmente se encuentran sometidas a esfuerzos mecánicos [1].

Los cultivos celulares 3D generalmente emplean biomateriales como plataformas de cultivo (andamios) con el objetivo de mimetizar o imitar el entorno nativo de las células [35]. Uno de los principales desafíos al utilizar cultivos 3D es garantizar un adecuado suministro de nutrientes y gases [23]. Además, los andamios restringen temporalmente las células a arquitecturas predefinidas [36], por lo tanto, las células afrontan limitaciones físicas que pueden dificultar la proliferación, migración y morfogénesis celular [23].

Imitar el entorno nativo de las células no es simple, las células interactúan con la ECM en formas complejas que aún no terminamos de comprender. Muchos autores coinciden en que un alto nivel de complejidad no es necesario para muchas aplicaciones; en cambio, sistemas artificiales capaces de inducir efectos deseados en las células pueden ser empleados como modelos simples [23].

2.2 Nanopartículas de polipirrol y polianilina polimerizadas por plasma (NPPPy y NPPAn)

Como se mencionó anteriormente, la estructura química de los polímeros sintetizados por plasma es irregular [18]. En la Fig. 2.1 se muestra la estructura química del polipirrol polimerizado por plasma (PPPy) propuesta por Kumar et al. [37].

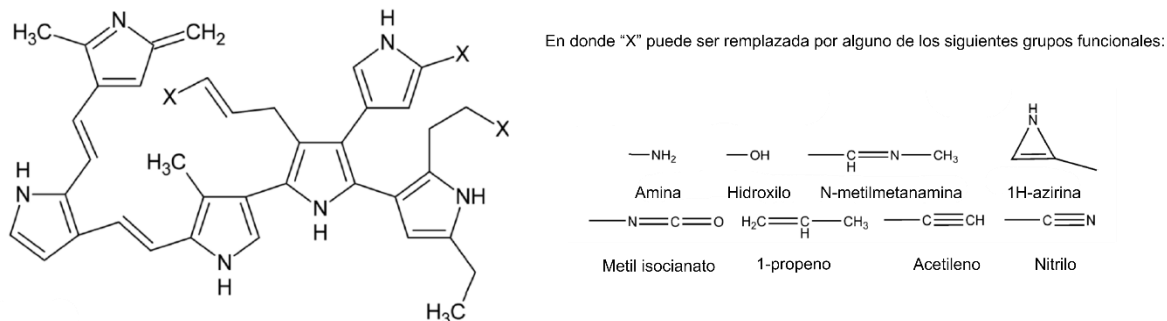


Fig. 2.1. Estructura química del PPPy propuesta por Kumar et al. [37]. Imagen reportada en el estudio publicado por Serratos et al. [38].

El polipirrol polimerizado por plasma (PPPy) es un polímero que ha sido utilizado para cubrir tanto superficies como plataformas de cultivo mostrando promover la adhesión de diversos tipos celulares [17,39–41]. La adhesión celular es esencial para la formación, estructura e integración de un tejido [42]. La adhesión celular de las superficies cubiertas con PPPy está asociada en parte con los grupos amino presentes en la estructura química del PPPy [37,43], ya que, los grupos amino promueven la adhesión celular [44,45] atrayendo biomoléculas cargadas negativamente [46]. Además, el PPPy ha mostrado ser más biocompatible que el polimerizado por otros métodos [47,48]. En líneas celulares (RIN-m y NG 105-15), las nanopartículas de PPPy (NPPPy) han sido empleadas para cultivar células en ambientes 3D sin utilizar andamios. A diferencia de los andamios, las NPPPy no restringen las células a arquitecturas predefinidas, por el contrario, permiten a las células autoorganizarse formando “microtejidos”. En algunos trabajos, se ha observado que las células de la línea RIN-m se organizan en una especie de epitelio cuando son cultivadas en NPPPy [48]. Recientemente se mostró mediante simulaciones moleculares que algunas integrinas como las $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_{II}\beta_3$ pueden unirse favorablemente a sitios del PPPy [38]. Por lo tanto, las NPPPy pueden ser utilizadas como un sistema artificial simple para emular el entorno nativo de las células, ya que, permiten realizar cultivos en ambientes 3D, en los cuáles, las células pueden autoorganizarse. Además, las NPPPy pueden emular interacciones célula-ECM mediadas por integrinas.

La anilina es una amina aromática con estructura química similar al pirrol [49,50]. Al igual que el pirrol, la anilina también puede ser polimerizada por plasma [51]. Tanto el polipirrol (PPy) como la polianilina (PAn) han mostrado ayudar en la adhesión, proliferación y diferenciación de una gran variedad de tipos celulares [52–58]. Nanopartículas de PAn polimerizadas por plasma (NPPAn)

también podrían ser utilizadas como un sistema artificial simple para cultivos 3D y hasta donde tenemos conocimiento no existen reportes publicados de NPPAn utilizadas para cultivos celulares. Las NPPPy y NPPAn podrían ayudar a superar algunos de los problemas que actualmente enfrentan las terapias celulares.

2.3 Terapias celulares cardíacas (TCC)

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en el mundo. La Organización Mundial de la Salud estima que el 80% de las muertes por ECV corresponden a infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares [59,60]. El infarto de miocardio ocurre como consecuencia del bloqueo repentino de uno o más vasos sanguíneos que irrigan el corazón [61]. Las arterias coronarias, que son las primeras ramificaciones de la raíz aórtica, son los vasos sanguíneos que irrigan al corazón [61,62].

El miocardio es la capa muscular del corazón, consiste en células llamadas cardiomiocitos dispuestos en patrones, helicoidal y envolvente circunferencial [63,64], de espirales superpuestas [65] y unidos a cardiomiocitos vecinos en sus extremos terminales mediante discos intercalados creando un sincitio cardíaco (Fig. 2.2 a) [62]. Los cardiomiocitos son células estriadas, ramificadas (“apantalonadas”), tienen muchas mitocondrias, mioglobina, un núcleo central (cardiomiocitos humanos) [66,67] y estructura tubular compuesta por cadenas de miofibrillas (Fig. 2.2 b) [62]. Las miofibrillas son haces de fibras formadas por la unión en serie de sarcómeros (la unidad funcional de los cardiomiocitos) [62,67,68].

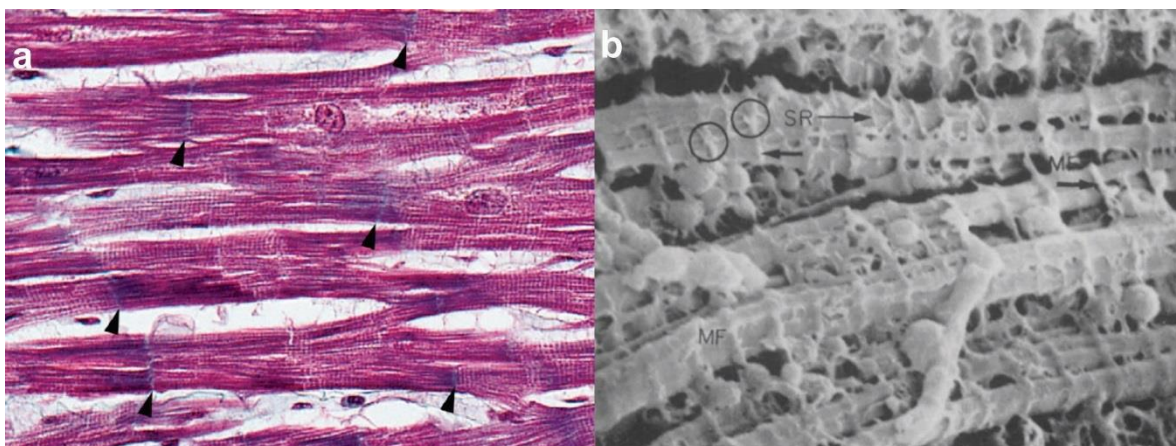


Fig. 2.2. (a) Microscopía óptica de un miocardio ventricular humano, con tinción tricrómica de Gömöri para resaltar las estrías transversales de los cardiomiocitos y los discos intercalados (uniones electromecánicas especializadas entre miocitos adyacentes) marcados con cabezas de flechas [66]. (b) Microscopía SEM de un miocardio ventricular de oveja, en donde se pueden apreciar las miofibrillas (MF), el retículo sarcoplásmico (SR) y el acoplamiento entre el túbulo T y el retículo sarcoplásmico (círculos negros). (x11,360 aumentos) [69].

Aunque en determinados casos las enfermedades del corazón pueden tratarse, actualmente no existen tratamientos para recuperar el tejido cardíaco dañado tras un infarto de miocardio. Algunas terapias emergentes para reparar o retrasar la remodelación celular después de un infarto de miocardio son los tratamientos farmacológicos [70,71] y las terapias celulares cardíacas (TCC) [72,73]. Las TCC con células madre pluripotentes humanas, que hasta ahora son la única fuente demostrada y sólida de auténticos progenitores cardiomiogénicos humanos o cardiomiocitos diferenciados, han mostrado recuperar la función cardíaca en monos macacos con grandes infartos de miocardio, y su seguridad clínica en humanos está comenzando a ser estudiada [74–76].

No obstante, los cardiomiocitos son células altamente sensibles a su entorno, se ha mostrado que cardiomiocitos maduros aislados de ratas sanas cultivadas en superficies 2D comienzan a tener cambios morfológicos asociados con procesos de dediferenciación, necrosis y apoptosis al tercer día de cultivo [77,78]. Cardiomiocitos maduros trasplantados en sitios de infarto tendrán que afrontar no solo entornos nativos alterados por la formación de cicatriz [79], si no diversos retos como diferenciación celular, integración, supervivencia y retención de las células trasplantadas [76,80]. Algunos de estos problemas pueden ser superados utilizando andamios para células cardíacas [81].

Los andamios son biomateriales que proporcionan un entorno saludable para la adhesión, diferenciación, proliferación y migración celular [82]. La interacción de los cardiomiocitos con la ECM cardíaca (Fig. 2.3) está mediada principalmente por las integrinas [42]; por lo tanto, es probable que los cardiomiocitos se adhieran a las superficies cubiertas con PPPy. La interacción con integrinas influye en una amplia gama de funciones celulares, incluida la adhesión, migración, organización de la ECM, apoptosis y diferenciación celular [27,28]. Además, los cardiomiocitos también interactúan con los cardiomiocitos vecinos y con otros tipos de células, realizando funciones mecánicas y eléctricas en el corazón [83]. Por lo tanto, en la ingeniería de tejidos de cardiomiocitos, es de vital importancia que el biomaterial utilizado como andamio no limite o interfiera con las interacciones celulares y funciones mecánicas o eléctricas.

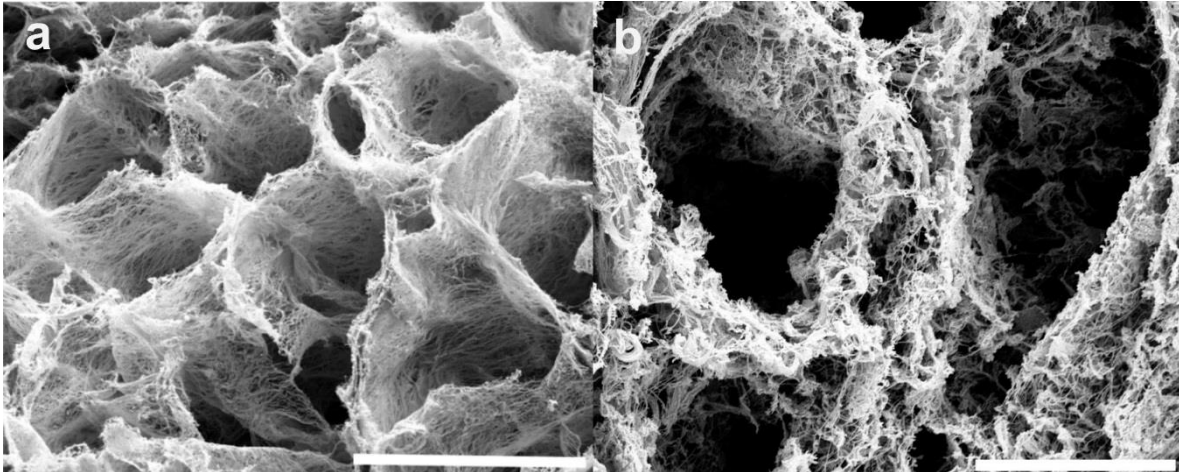


Fig. 2.3. ECM cardíaca del ventrículo izquierdo de (a) humano (barra de escala 50 μm) y (b) ratón (barra de escala 10 μm) [84].

Las NPPPy han sido empleadas para cultivar células en ambientes 3D sin utilizar andamios [48]. A diferencia de los andamios, las NPPPy no restringen las células a arquitecturas predefinidas; por el contrario, permiten a las células autoorganizarse formando “microtejidos” [48]. Los nanomateriales se utilizan cada vez más como parte de los andamios en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa [85,86]. Si bien existen informes de micropartículas poliméricas (50-100 μm) utilizadas como andamios para terapias celulares [87], hasta donde tenemos conocimiento, no conocemos reportes de nanopartículas utilizadas para cultivos 3D ni como ayuda en terapias celulares. Las NPPPy y NPPAn podrían ser utilizadas como un sistema artificial simple para emular el entorno nativo de células como cardiomiocitos y ayudar a superar algunos de los retos que actualmente enfrentan las TCC.

2.4 Terapias de reemplazo de células beta pancreáticas (TRCBP)

La diabetes mellitus es una de las principales causas de muerte en el mundo [60]; además, el índice de prevalencia de esta enfermedad ha ido en aumento los últimos 30 años [88]. El trasplante de islotes pancreáticos (IP) es un tratamiento que ha mostrado una marcada mejoría, principalmente en pacientes con Diabetes mellitus tipo 1. Si bien los efectos adversos de algunos inmunosupresores son mínimos, cuanto más prolongada sea la exposición a la terapia inmunosupresora, mayor será el riesgo de tener efectos secundarios potencialmente graves (infecciones, cáncer y toxicidad en tejidos y sistemas) [89–91]. Además, no todos los pacientes que recibieron un trasplante de IP registraron periodos largos de independencia a la insulina (5 a 10 años) [91]. Para superar este problema, grupos de investigación se encuentran desarrollando nuevas técnicas y biomateriales para encapsular (IP) y evitar el uso de inmunosupresores en las TRCBP [92,93]. Sin embargo, mantener la función de los islotes después del trasplante sigue siendo un gran desafío.

Múltiples factores, incluidos eventos asociados con hipoxia, desencadenan la pérdida de la función de los islotes antes y después del trasplante [94]. Los islotes pancreáticos reciben del 10% al 15% de la sangre arterial a pesar de ocupar sólo el 1-2% de la masa total del páncreas; por lo tanto, los IP reciben mayor cantidad de O₂/volumen que el parénquima pancreático. Esto indica que, el O₂ está fácilmente disponible en las células del IP para satisfacer las demandas metabólicas y necesidades fisiológicas.

Los IP utilizados en para trasplante se aíslan del páncreas de un donante por digestión enzimática y mecánica. Este proceso de aislamiento desconecta los islotes de los tejidos circundantes, incluidos los vasos sanguíneos [94]. Los IP aislados son avasculares, dependen de la difusión para su nutrición y oxigenación [95]. El oxígeno que permea a través de la superficie del IP es utilizado por células en el manto. El desequilibrio entre el suministro y consumo de O₂ forma un gradiente de O₂ dentro de la estructura de los IP. Cuando el suministro de O₂ es insuficiente, las células del IP sufren de isquemia que a su vez resulta en necrosis (las áreas necróticas pueden verse como manchas oscuras, llamadas cuerpos necróticos) [94,95]. Aunado a esto, después del trasplante los islotes están expuestos a un ambiente hipóxico hasta que logren injertarse y vascularizarse; y si bien, se están investigando métodos para revascularizar los IP después de su aislamiento [96,97], esto no resuelve el problema asociado con el uso de inmunosupresores. Un suministro adecuado de oxígeno es el factor clave para promover la supervivencia y funcionalidad de los IP trasplantados [94]. Estudios in vitro han mostrado que los IP pequeños tienen mejor secreción de insulina y mayor tasa de supervivencia que los IP grandes [98]. En estudios clínicos, los pacientes trasplantados con IP más pequeños tenían mayor probabilidad de obtener independencia a la insulina [99]. Utilizar IP más pequeños podría ayudar a tener mejores resultados en las terapias de reemplazo de las células beta pancreáticas [94,98–100]; por lo tanto, dispersar los IP en células aisladas o pequeños agregados celulares podría parecer una buena idea.

Sin embargo, al dispersar las células del islote se pierde la interacción de las células con las proteínas de la matriz extracelular, incluso el aislamiento de los IP tiene efectos adversos en las células del IP como muerte principalmente de células beta y disminución de la expresión de integrinas ($\alpha 3$, $\alpha 5$ y αv) [101,102]. Además, las células beta dispersas tienen niveles basales de secreción de insulina elevados y secretan menos insulina en respuesta a glucosa [103,104]. Por lo tanto, las células beta dispersas probablemente no son adecuadas para restablecer la homeostasis de la glucosa.

Algunos de los posibles factores que pueden explicar estas diferencias funcionales son las interacciones célula beta-célula beta, célula beta-vasculatura y célula beta-células alfa y delta [104]. En islotes de roedores, las células beta se agrupan en el centro del islote, y los otros tipos celulares endócrinos en la periferia del islote rodeando a las células beta [105]. Los islotes humanos pequeños (40-60 μm) tienen una composición celular similar a los islotes de ratón. En estos, las células beta se agrupan en el centro del islote, las células alfa

en el manto y tienen vasos sanguíneos en su periferia. En islotes humanos más grandes (> 60 μm), los vasos sanguíneos penetran el islote y se ramifican dentro de él, la fracción de células alfa y delta aumenta; y mientras más aumenta la fracción de células alfa, las células alfa se encuentran más abundantemente intercaladas con las células beta en el núcleo del islote, así como en su periferia (Fig. 2.4) [106].

Interacción célula beta - célula beta. El principal tipo celular en IP sanos son células beta; por lo tanto, es probable que la mayor parte del área de superficie de la membrana de las células beta se encuentre en contacto con la membrana de otras células beta [103]. Las células beta dentro del islote están acopladas eléctricamente a través de uniones comunicantes en sus membranas [107].

A niveles basales de glucosa (3.9 – 5.6 mM [108]) las células beta dentro del islote están en gran parte inactivas. Las poblaciones de células beta inactivas suprimen en gran medida (aunque no por completo) la actividad de otras poblaciones de células beta. Por el contrario, al aumentar los niveles de glucosa tenderá a incrementar la actividad de diferentes poblaciones de células beta y el reclutamiento de células beta vecinas [103,107].

Interacción célula beta - células alfa y delta. Las diferentes células endocrinas dentro del islote podrían comunicarse de manera local. La evidencia más fuerte de este tipo de comunicación es la acción paracrina positiva de las células alfa en la secreción de insulina, mientras que, el papel inhibitorio de las células delta aún requiere una demostración directa. En los últimos años, un número asombrosamente grande de factores liberados por las células de los islotes se han sugerido como reguladores autocrinos o paracrinos de la secreción de insulina. No obstante, la regulación local in vivo (dentro del islote) de la mayoría de estos factores candidatos sigue siendo hipotética. Algunos autores consideran inverosímil que las células beta necesiten tantos niveles locales de control e incluso dudoso que puedan lograr una integración armoniosa de tantas señales, a veces contradictorias [103,109].

Interacción célula beta-vasculatura. La mayoría de las células beta tienen uno o más puntos de contacto con los vasos sanguíneos del lecho capilar. Las células endoteliales y pericitos secretan membrana basal, que es utilizada por las células beta como señal para su crecimiento, posiblemente orientación, función y expresión génica [103,110].

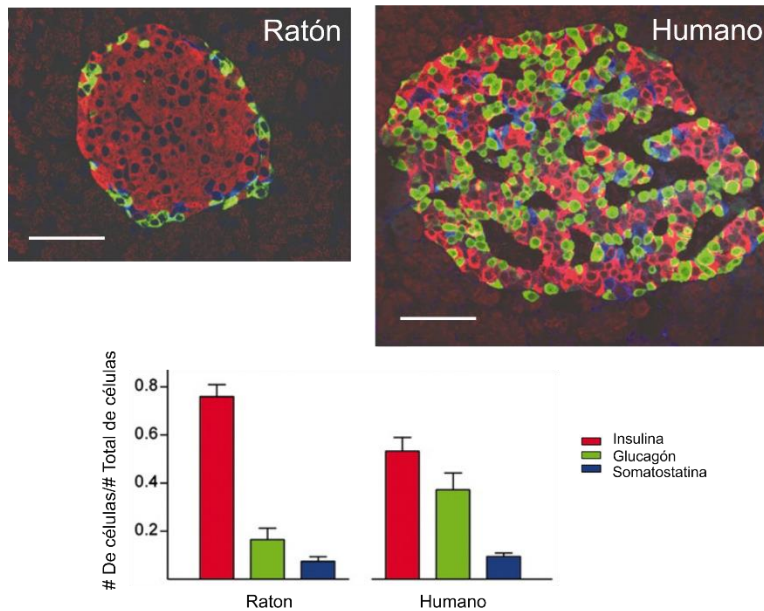


Fig. 2.4. Inmunofluorescencia para la detección de diferentes hormonas dentro de IP de ratón y humano. Células inmunorreactivas a insulina (células beta) fueron marcadas en rojo, inmunorreactivas a glucagón (células alfa) en color verde e inmunorreactivas a somatostatina (células delta) en color azul. Imágenes adquiridas en un microscopio confocal. Barra de escala 50 μm [105].

Las técnicas de cultivo estándar restringen a las células a una superficie de cultivo bidimensional limitando y reduciendo aún más las interacciones célula-célula presentes en el IP [102,111]. Algunos autores han utilizado proteínas de la matriz extracelular para funcionalizar micropartículas poliméricas (21 μm) y cultivar sobre ellas células del IP, incrementando la supervivencia de células beta de “algunos días” hasta por veintiún días [112]. Las NPPPy y NPPAn podrían ser utilizadas como un sistema artificial simple para cultivar células dispersas de IP (CIP), que permitan la formación de agregados celulares que emulen el microentorno nativo de los IP. Además, si los agregados celulares formados tienen un adecuado suministro de oxígeno, las NPPPy y NPPAn podrían ayudar a superar algunos de los retos que actualmente enfrentan las TRCBP.

3 Hipótesis

Dado que las nanopartículas de polipirrol polimerizadas por plasma (NPPPy) tienen la capacidad de formar agregados tridimensionales en donde las células pueden autoorganizarse, promueven las interacciones célula-célula, y el polipirrol polimerizado por plasma promueve la supervivencia celular, un sistema celular constituido con las NPPPy, y las nanopartículas de polianilina polimerizadas por plasma (NPPAn) podrían proporcionar un ambiente saludable y en 3D a cardiomiocitos ventriculares de rata adulta (CVRA), y a células dispersas de islotes pancreáticos (CIP) por periodos de tiempo más prolongados que los cultivos tradicionales en 2D.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Estudiar la interacción de nanopartículas polimerizadas por plasma, de polipirrol y polianilina, con sistemas celulares compuestos por células cardiacas, y células dispersas de islotes pancreáticos mediante la técnica de cultivo celular.

4.2 Objetivos particulares

- Sintetizar nanopartículas de polipirrol (NPPPy) y polianilina (NPPAn) mediante la técnica de polimerización por plasma para caracterizarlas con espectroscopía infrarroja (IR) y microscopia electrónica de barrido (SEM).
- Aislar cardiomiocitos ventriculares (CVRA) de ratas adultas (3 meses de edad) de la cepa Wistar para comparar las características morfológicas de los CVRA obtenidos con los CVRA reportados en otros estudios e identificar mediante SEM algunas de sus estructuras características (miofibrillas, retículo sarcoplásmico y sarcómero).
- Aislar islotes pancreáticos (IP) de ratas adultas (3 meses de edad) de la cepa Wistar para comparar las características morfológicas de los IP obtenidos con los reportados en otros estudios y registrar su secreción de insulina.
- Examinar características morfológicas de los CVRA y CIP (como la R_{L:A}, blebbings y daños en la membrana celular) y de los agregados celulares (como el tamaño, organización celular y expresión de ECM) mediante imágenes SEM para identificar cambios morfológicos asociados con procesos de desdiferenciación, necrosis y apoptosis, así como, comparar las características de los agregados celulares con las de sus tejidos nativos.

5 Material y métodos

5.1 Animales

Los IP, CIP y CVRA fueron aislados de ratas macho de la cepa Wistar de cuatro meses de edad (280 a 350 g). Las ratas fueron proporcionadas por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Las ratas se mantuvieron en un ciclo invertido de luz/obscuridad (12/12 horas) con acceso libre a comida y agua, y fueron manejadas de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

5.2 Reactivos

La solución salina balanceada de Hank (HBSS) y HBSS sin calcio y magnesio fueron preparadas como se muestra en la tabla 3.1. Todas las sales (#C5670, #M2393, #M2773, #P5405, #P5655, #S5761, #S3014 y #S5136), D-Glucosa (#G8270), HEPES (#H4034), EDTA (#03609), pirrol (#131709, grado reactivo, $\geq 98\%$), anilina (#242284, reactivo grado ACS, $\geq 99.5\%$) y colagenasa tipo V (#C9263) fueron compradas en Sigma Aldrich. Los medios M199 (#11150059), RPMI1640 (#A1049101, #11875093 y #11879020), suero fetal bovino (#26140079), antibiótico con antimicótico (#15240062) y colagenasa tipo II (#17101015) fueron comprados en GIBCO. El suero de caballo (#35-030-CV) fue comprado en CORNING.

Tabla 3.1. Reactivos utilizados para preparar la HBSS y la HBSS sin calcio y sin magnesio.

HBSS		HBSS sin calcio y sin magnesio	
Reactivos	Concentración (mM)	Reactivos	Concentración (mM)
CaCl ₂	1.26	KCl	5.33
MgCl ₂	0.49	KH ₂ PO ₄	0.44
MgSO ₄	0.41	NaHCO ₃	4.17
KCl	5.33	NaCl	137.93
KH ₂ PO ₄	0.44	Na ₂ HPO ₄	0.33
NaHCO ₃	4.17	D-Glucosa	5.55
NaCl	137.93	HEPES	25
Na ₂ HPO ₄	0.33	EDTA	0.25
D-Glucosa	5.55		
HEPES	25		

5.3 Nanopartículas de polipirrol (NPPPy), polianilina-pirrol (NPPAn-Py) y polianilina (NPPAn)

Las NPPAn, NPPAn-Py y NPPPy se sintetizaron en un reactor de plasma cilíndrico. El reactor estaba formado por un tubo de borosilicato de 20 cm de largo, 9 cm de diámetro exterior y 5 mm de espesor. Los extremos del reactor fueron sellados con dos tapas de acero inoxidable, a través de las cuales se insertaron dos electrodos redondos de acero inoxidable, de 7 cm de diámetro. Los electrodos fueron conectados a un generador de radiofrecuencias. Cada una de las tapas de acero inoxidable utilizadas para sellar el reactor tenía dos aperturas, a través de las aperturas de una de las dos tapas se introdujeron al reactor los monómeros para la síntesis. Las aperturas de la segunda tapa se conectaron a un sensor de presión y una trampa de gases conectada en serie a una bomba de vacío (Fig. 5.1). Las condiciones de síntesis con las cuales se obtuvieron suficientes nanopartículas para realizar todos nuestros experimentos fueron las siguientes: para las NPPAn y NPPAn-Py la presión en el interior del reactor fue de aproximadamente 0.7 Torr; la frecuencia y la potencia del generador de radiofrecuencias fueron de 13.56 MHz y 30 W; para las NPPPy la presión en el interior del reactor fue de 1.6 Torr; la frecuencia y la potencia del generador de radiofrecuencias fueron de 13.56 MHz y 45 W.

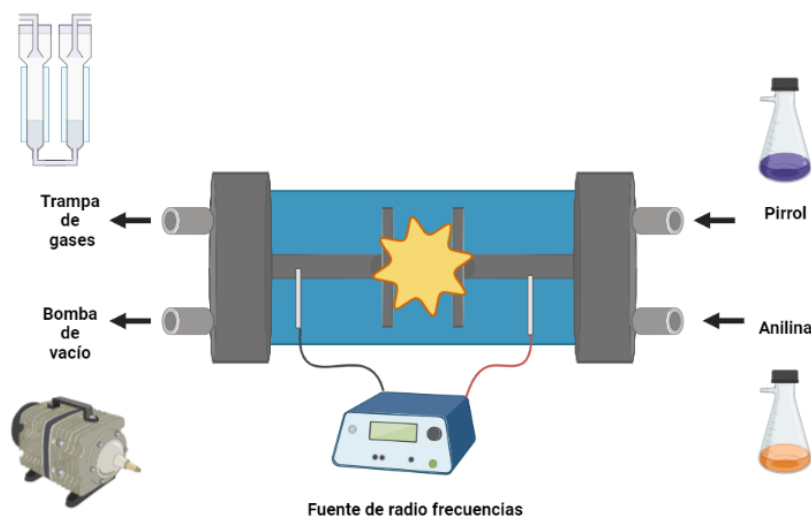


Fig. 5.1. Diagrama del reactor de plasma para la síntesis de NPPAn y NPPAn-Py y NPPPy.

5.4 Aislamiento y cultivo

5.4.1 Cardiomiocitos ventriculares de rata adulta (CVRA)

Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico usando una dosis de 60 mg/kg. El abdomen y el tórax de la rata fueron rasurados, bañados con alcohol al 70% y una incisión fue hecha desde el abdomen hasta las axilas para exponer la cavidad torácica. Una vez expuesta la cavidad torácica, se sacrificó a la rata mediante dislocación cervical. El corazón se extirpó y se colocó en un tubo de centrifuga de 25 ml con 10 ml de HBSS frío sin calcio y sin magnesio. El corazón se perfundió utilizando un sistema Langendorff con 40 ml de HBSS sin calcio y sin magnesio 37°C durante 5 minutos. Se realizó una segunda perfusión con 40 ml de HBSS con 0,45 mg/ml de colagenasa tipo II a 37°C durante 25 minutos. El corazón se colocó en un tubo de centrifuga de 25 ml con 10 ml de HBSS con 0,45 mg/ml de colagenasa tipo II en un baño de agua a 37°C durante 20 minutos. A continuación, se colocó el corazón en un vaso de precipitados de vidrio de 50 ml con 10 ml de HBSS frío, en donde la aorta y las aurículas fueron extraídas con ayuda de unas tijeras quirúrgicas. Los ventrículos se cortaron en trozos de aproximadamente 1 mm² con ayuda de dos bisturís, los trozos de ventrículos se colocaron en un tubo de centrifuga de 25 ml con 10 ml de HBSS frío y se disgregaron mecánicamente agitando gentilmente el tubo de centrifuga durante 1 minuto. La mezcla obtenida se filtró dos veces, la primera vez se filtró con una malla de nailon de 250 µm para descartar las partes del tejido cardiaco no digerido y la segunda vez se filtró con un colador celular de 40 µm para eliminar el detritus y los restos celulares. Los cardiomiocitos obtenidos se lavaron con 30 ml de HBSS frío, se recolectaron en un tubo de centrifuga de 25 ml con 20 ml de medio M199 y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado, se añadieron 5 ml de medio M199 suplementado con suero de caballo al 5%, suero bovino fetal al 5% y antibiótico con antimicótico al 1%. El botón celular se resuspendió gentilmente con ayuda de una pipeta y los cardiomiocitos fueron almacenados para su uso posterior [77].



Fig. 5.2. Diagrama de la metodología para el aislamiento de los CVRA.

5.4.2 Islotes pancreáticos (IP) y Células del IP (CIP)

Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico usando una dosis de 60 mg/Kg. El abdomen de la rata fue rasurado, bañado con alcohol al 70% y una incisión fue hecha desde la región púbica hasta el diafragma para exponer la cavidad abdominal. El conducto biliar fue localizado y su extremo en el duodeno fue bloqueado con ayuda de unas pinzas hemostáticas. En el otro extremo del conducto biliar se introdujo una cánula para distender el páncreas perfundiéndolo con 10 ml de HBSS fría suplementada con 1% de antibiótico con antimicótico. El páncreas distendido fue limpiado de tejido adiposo, extirpado y puesto en una caja Petri de 100 × 15 mm, en donde fue cortado con tijeras en pequeñas piezas de aproximadamente 1 mm². El páncreas triturado se colocó en un matraz Erlenmeyer de 50 ml con 20 ml de HBSS suplementada con 1% de antibiótico con antimicótico y colagenasa tipo V con una concentración de 0.3 mg/ml. La digestión se llevó a cabo en un baño María con agitación durante 5 minutos a 37°C, el matraz Erlenmeyer se agitó manualmente hasta obtener una mezcla homogénea. La digestión enzimática se detuvo añadiendo 30 ml de HBSS fría con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico con antimicótico. La solución fue centrifugada a 900 rpm por 10 minutos y el sobrenadante fue cuidadosamente removido. Este procedimiento se repitió dos veces más para finalizar de lavar el tejido digerido. Los islotes pancreáticos fueron recolectados a mano con ayuda de una pipeta bajo un microscopio estereotáxico. Los islotes pancreáticos recolectados fueron puestos en tripsina y cultivados a 37 °C por 15 minutos. Los islotes casi

dispersos se colocaron en medio de cultivo fresco y se dispersaron mecánicamente con la ayuda de una pipeta [113].

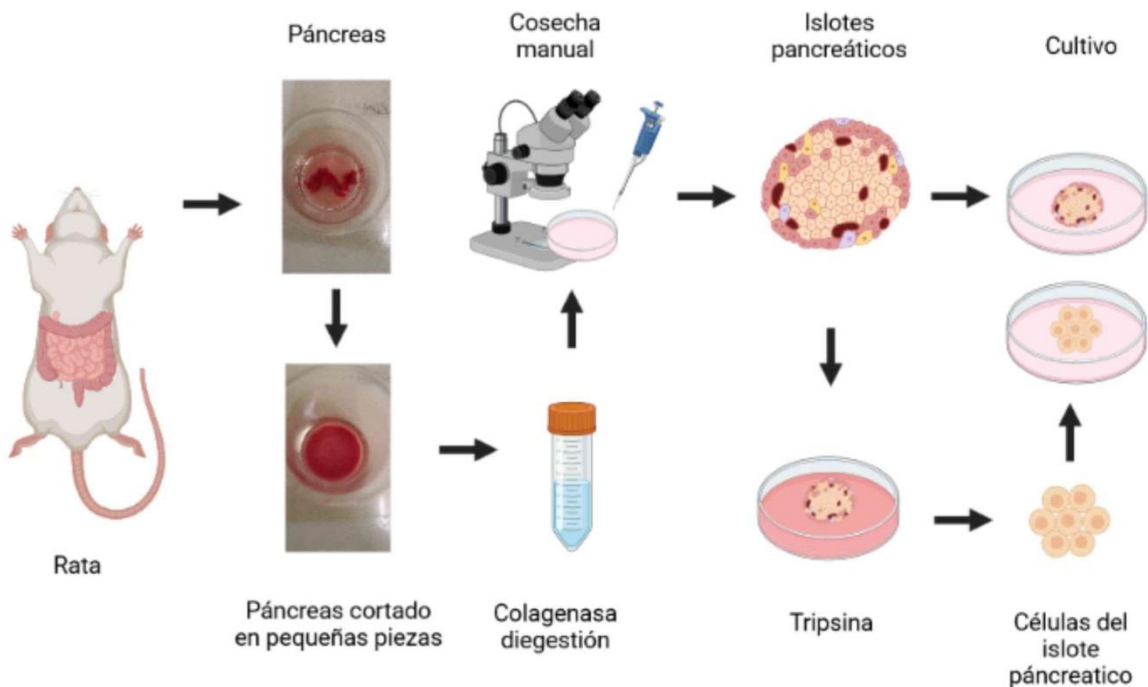


Fig. 5.3. Diagrama de la metodología para el aislamiento de los IP y las CIP.

5.4.3 Cultivo

Como medio de cultivo para los CVRA se utilizó medio M199 suplementado con 5% de suero de caballo, 5% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico con antimicótico. Para los IP y las CIP se utilizó medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico con antimicótico. Se utilizaron cajas de cultivo de 35 × 10 mm, la densidad celular empleada en el estudio de CVRA fue de 1×10^4 CVRA por caja, en el estudio de IP fue de 20 IP por caja y en el estudio de CIP fue de 40 isletos dispersados por caja.

Para favorecer el contacto entre las células (CVRA, IP y CIP) con las NPPPy, NPPAn-Py y NPPAn, al inicio del cultivo, las células se depositaron en un tubo de centrifuga de 15 ml con 1 ml de medio de cultivo fresco, se añadieron 200 μ g partículas. El tubo fue centrifugado a 1,200 rpm por 5 minutos, el botón de células y partículas formado, fue gentilmente dispersado con ayuda de una pipeta, los dos últimos pasos fueron repetidos dos veces más y la suspensión resultante fue puesta en una caja de cultivo. Por último, se agregó 1 ml de medio de cultivo fresco en cada caja. El mismo protocolo fue empleado para los grupos control, pero sin usar partículas. El medio de cultivo fue cambiado cada tercer día, cambios parciales de medio de cultivo fueron realizados tomando 1 ml de medio de cultivo de la caja, el medio extraído fue puesto en un tubo de centrifuga de 15 ml y centrifugado a 1,200

rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue cuidadosamente descartado y 1ml de medio de cultivo fresco fue añadido al tubo de centrifuga, el medio de cultivo se resuspendió gentilmente con ayuda de una pipeta y el contenido del tubo fue puesto de regreso en la caja de cultivo.

5.5 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Para observar las muestras biológicas en el microscopio electrónico de barrido se realizó el siguiente procesamiento. Las muestras se colocaron en un tubo de centrifuga de 15 ml, los tubos con las muestras fueron centrifugados a 1200 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue descargado cuidadosamente. Dos ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 5% de paraformaldeído fueron añadidos al tubo de centrifuga. Las muestras con paraformaldeído se incubaron durante 48 horas, después de las 48 horas, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS, se retiró el PBS de las muestras y se añadió 1 ml de tetraóxido de osmio. Las muestras fueron incubadas 2 horas en tetraóxido de osmio, después de las 2 horas, el tetraóxido de osmio fue removido y las muestras fueron deshidratadas lavándolas con soluciones de etanol con concentraciones crecientes, empezando con 20% de etanol y terminando en 100% etanol, las muestras se secaron por punto crítico, se cubrieron con oro y fueron observadas en un microscopio Jeol JSM 5900 LV.

Las NPPPy, NPPAn-Py y NPPAn se observaron en un microscopio Joel 7600F HRSEM.

5.6 Espectro infrarrojo

El espectro infrarrojo de las NPPPy, NPPAn-Py y NPPAn fue adquirido en un espectrofotómetro infrarrojo ThermoScientific Nicolet iS5 equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR), el espectro se adquirió en la región de 600 a 4000 cm^{-1} .

5.7 Registro de la secreción de insulina

Para el registro de la secreción de insulina los IP se cultivaron una hora en RPMI-1640 con baja glucosa (2.75 mM), posteriormente se lavaron con solución fosfato salina (PBS) y se cultivaron una hora en RPMI-1640 con alta glucosa (25 mM). Al término del tiempo de incubación, se tomaron 75 μl del sobrenadante en la periferia de cada una de las cajas de cultivo con ayuda de un microscopio, teniendo cuidado de no tomar IP al adquirir cada una de nuestras muestras, las muestras se depositaron en crioviales de 1 ml y se almacenaron en un ultracongelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. La secreción de insulina de los IP fue cuantificada con un Kit Elisa para insulina de tipo sándwich de la marca ALPACO con número de catálogo 80-INSRT-

E01 siguiendo las instrucciones del fabricante, empleando un espectrofotómetro para medir la densidad óptica de las muestras a una longitud de onda de 450 nm.

5.8 Análisis estadístico

El largo y ancho de cada cardiomiocito fue medido usando ImageJ. La relación Largo:Ancho ($R_{L:A}$) de cada cardiomiocito fue determinada usando Wolfram Mathematica 11. Para el análisis de nuestros datos se utilizó el software Statistical Analysis System (SAS), para determinar si alguno de nuestros grupos tenía diferencias significativas se realizó una prueba ANOVA no balanceada y como pruebas “post hoc” se utilizaron las pruebas de Tukey y de Scheffé [114]. Dado que no se pudieron normalizar los datos de los cuatro grupos, para verificar los resultados obtenidos se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, como prueba “post hoc” se utilizó el método de Dwass, Steel, Critchlow-Fligner [115].

6 Resultados y discusión

6.1 Nanopartículas de polianilina (NPPAn), polianilina-pirrol (NPPAn-Py) y polipirrol (NPPPy)

Nanopartículas de polianilina (NPPAn), polianilina-pirrol (NPPAn-Py) y polipirrol (NPPPy) fueron polimerizadas por plasma y observadas en el microscopio electrónico de barrido (Fig. 6.1). El diámetro medio de las NPPAn fue de 730 nm con una desviación estándar de 190 nm (n=312), el diámetro medio de las NPPAn-Py fue de 996 nm con una desviación estándar de 370 nm (n=100) y el diámetro medio de las NPPPy fue de 330 nm con una desviación estándar de 20 nm (n=105) (Fig. 6.1 b,d y f).

Dado que, el diámetro de las NPPPy decrece linealmente con la potencia [116] y que las NPPAn y NPPAn-Py se sintetizaron a una potencia de 30 W, esto podría explicar porque el diámetro medio de las NPPAn y NPPAn-Py fue mayor que el diámetro medio de las NPPPy. Nanopartículas más pequeñas podrían ser obtenidas incrementando la potencia de síntesis; sin embargo, estudios previos han mostrado que nanopartículas con tamaños menores a 100 nm no son adecuadas para ser usadas en cultivos celulares. Por ejemplo, nanopartículas de polipirrol sintetizadas por polimerización oxidativa fueron endocitadas por células IMR90 y J774A1 [117]. Si bien algunos autores sugieren que el tamaño de las nanopartículas no es el principal factor para la endocitosis, se entiende que partículas más pequeñas ingresan a la célula con mayor facilidad [118]. Además, nanopartículas sintetizadas a potencias más altas probablemente no sean adecuadas para mantener diferenciados a los CVRA. Películas aminadas (PPy, PAn y PAn-Py) polimerizadas por plasma empleando diferentes potencias de síntesis (20, 30 y 40 W) fueron utilizadas como superficie de cultivo para células N1E-115. las películas sintetizadas a potencias menores a 40 W mostraron ser más adecuadas para diferenciar las células N1E-115 obteniendo mayor prolongación de neuritas [119]; por lo tanto, consideramos que la potencia de síntesis y el tamaño de las NPPAn, NPPAn-P y NPPPy son adecuados para los fines de este estudio.

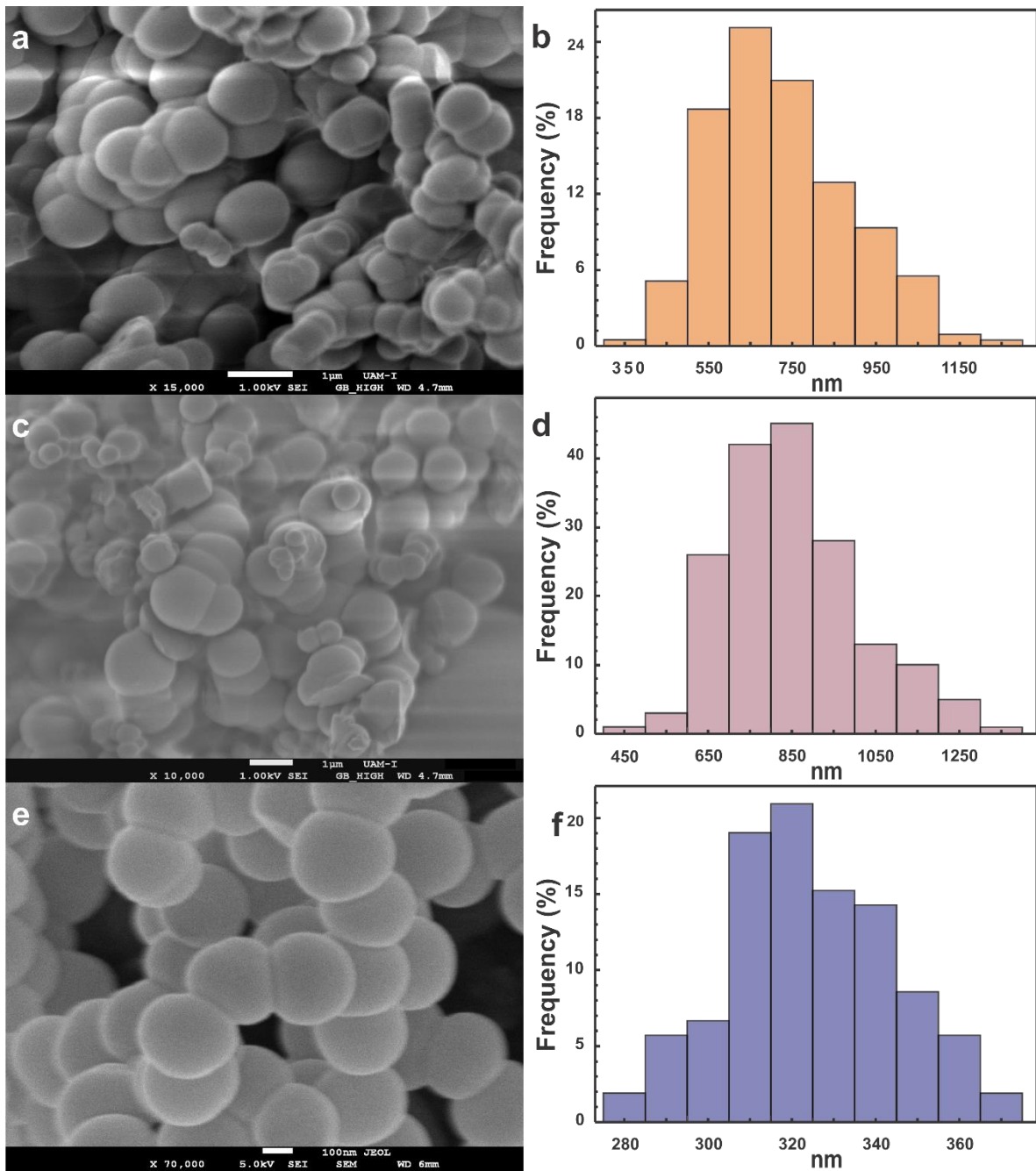


Fig. 6.1. Imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido de las nanopartículas de polianilina (a), polianilina-pirrol (c) y polipirrol (e) polimerizadas por plasma. Al lado derecho de cada microscopia se puede observar un histograma de la distribución de los diámetros de las nanopartículas.

En la Fig. 6.2 se puede observar el espectro infrarrojo de las NPPAn, NPPAn-Py y NPPPy. En el espectro infrarrojo de las NPPAn (Fig. 6.2, espectro color amarillo), la banda ancha entre 3600 y 3000 cm^{-1} centrada en 3337 cm^{-1} corresponden a grupos amina y posiblemente a grupos OH; ya que, al igual que en el PPPy, la PAn polimerizada por plasma (PPAn) podría oxidarse con el oxígeno atmosférico cuando se abre el reactor al final de la síntesis. Sí bien algunos autores sugieren que el pico en 1603 cm^{-1} también puede estar asociado con grupos amino, la mayoría de los autores sugiere que los picos dentro de la banda de 1650 a 1400 cm^{-1} están asociados a enlaces C=C de estructuras quinoides y benzoides de los anillos de benceno en la PPAn. La banda centrada en 2942 cm^{-1} corresponde a enlaces C-H alifáticos, mientras que la señal en 2213 cm^{-1} indica la presencia de enlaces C \equiv C. La presencia de estos enlaces es evidencia de que los anillos de anilina pueden fragmentarse durante la síntesis y algunos de los fragmentos pueden deshidrogenarse.

En el espectro infrarrojo de las NPPPy (Fig. 6.2, espectro color azul), tanto la banda ancha entre 3700 y 3000 cm^{-1} centrada en 3337 cm^{-1} como la banda en 1604 cm^{-1} corresponden a grupos amina, la presencia de estos grupos es esperada dado que el monómero es pirrol. La banda ancha centrada en 3337 cm^{-1} también se asocia con grupos OH. La presencia de grupos hidroxilo probablemente se deba a la oxidación de las NPPPy por el oxígeno atmosférico cuando se abre el reactor al final de la síntesis. La banda centrada en 2937 cm^{-1} corresponde a enlaces C-H alifáticos, mientras que la señal en 2217 cm^{-1} indica la presencia de enlaces C \equiv C o C \equiv N. La presencia de estos enlaces es evidencia de que los anillos de pirrol pueden fragmentarse durante la síntesis y algunos fragmentos pueden deshidrogenarse. La señal a 1452 cm^{-1} sugiere vibraciones en el plano de los enlaces C=C y C-H. Finalmente, la banda a 749 cm^{-1} podría atribuirse a la vibración del esqueleto y es indicativa de la formación de cadenas poliméricas [37,38,43,120].

La diferencia más importante entre los espectros de las NPPAn y NPPPy se encuentra en la región entre 650 y 850 cm^{-1} , los picos de esta región corresponden a las disustituciones 1,4 en el anillo de anilina, así como a enlaces N-H del grupo difenilamina [51,121–124]. El espectro infrarrojo de las NPPAn-Py (Fig. 6.2, espectro color morado) parece seguir más la forma del espectro del polipirrol; sin embargo, es posible observar algunos de los picos característicos de la polianilina (región entre 650 y 850 cm^{-1}), estos resultados indican que tanto el pirrol como la anilina se co-polimerizaron adecuadamente.

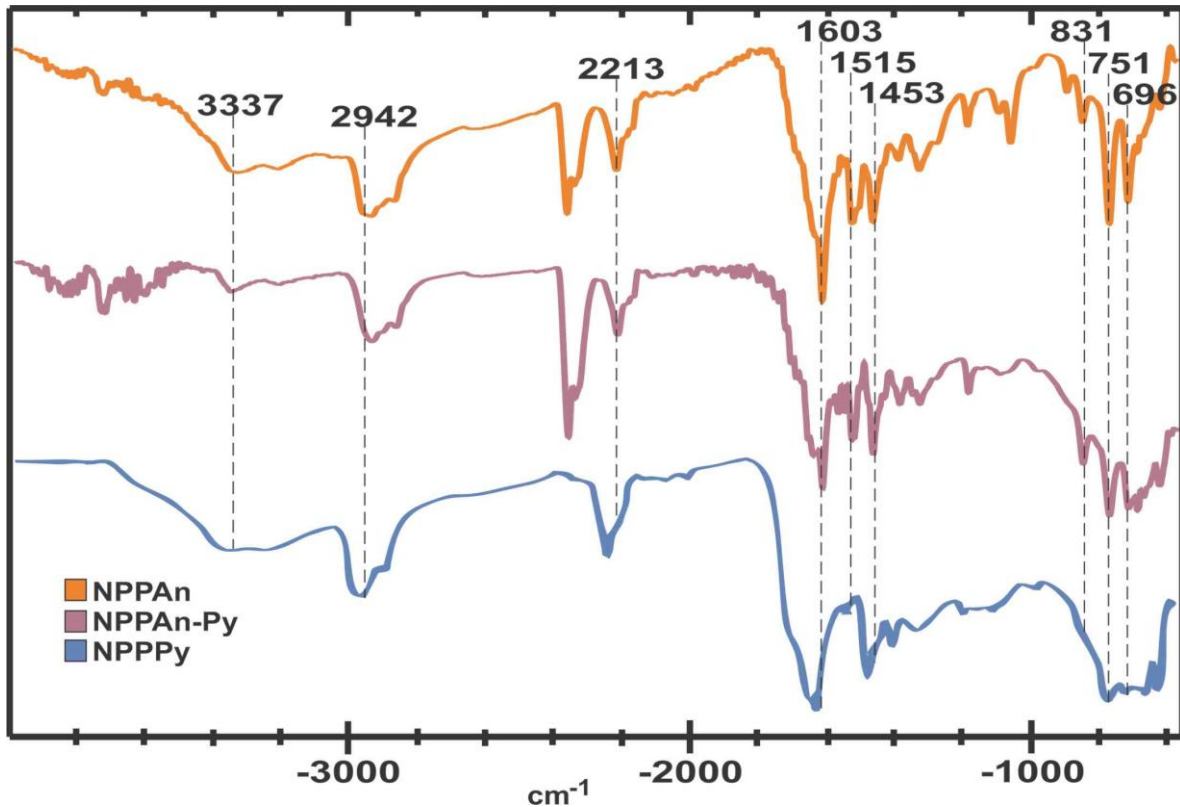


Fig. 6.2. Espectros infrarrojos de las nanopartículas de polianilina (NPPAn), polianilina-pirrol (NPPAn-Py) y polipirrol (NPPPy) polimerizadas por plasma.

6.2 Cardiomiocitos ventriculares de rata adulta (CVRA)

Los CVRA fueron aislados de un modelo animal murino. Las células tenían la forma característica de barra y una longitud aproximada de 100 μm (Fig. 6.3a) [77,125]. En las imágenes SEM de los CVRA, fue posible apreciar las miofibras (MF) y retículo sarcoplásmico (RS) (Fig. 6.3b) [69]. El RS forma una red continua que une el sistema tubular transversal [126]. El sistema tubular transversal forma matrices regulares periódicas que se correlacionan con la posición de las líneas Z [126,127]. Las líneas Z se encuentran en los bordes laterales del sarcómero (la unidad fundamental del músculo estriado) [128]. Los sarcómeros de los CVRA podrían; por tanto, ser localizados entre dos RS contiguos de una miofibrila.

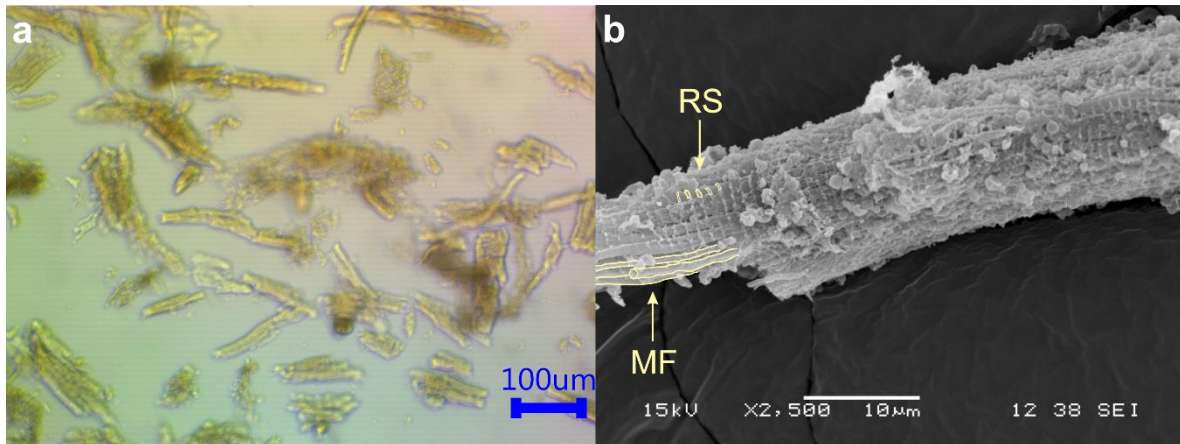


Fig. 6.3 Cardiomiocitos ventriculares de rata adulta (CVRA) un día de cultivo. (a) Microscopía óptica, podemos observar que los CVRA tienen la forma característica de barra. (b) SEM, podemos observar estructuras características de los CVRA como el retículo sarcoplásmico (RS) y las miofibrillas (MF).

Al séptimo día de cultivo, los CVRA habían perdido su forma característica de barra y adquirieron una morfología cuadrada o redonda (Fig. 6.4a). La $R_{L:A}$ media de los CVRA a siete días de cultivo fue de 2, con una desviación estándar de 1,4 ($n = 156$). Aproximadamente el 86% de los CVRA tenían una $R_{L:A}$ entre 1 y 3 (Fig. 6.4b). Los cambios en la morfología de los CVRA comienzan a ser perceptibles al tercer día de cultivo. Después de siete días de cultivo, la mayoría de las CVRA pierden su forma característica de barra y adquieren una forma cuadrada o redonda ($R_{L:A} \sim 1$) [77,129]. La morfología de los cardiomiocitos está relacionada con su expresión génica, la relación $R_{L:A}$ es un parámetro que ha sido utilizado para relacionar la forma de los cardiomiocitos con su expresión génica [78], los cardiomiocitos cuadrados ($R_{L:A} = 1$) tienen aumentados genes implicados en procesos de necrosis, apoptosis y dediferenciación [77,78]. La esperanza de vida de los CVRA en cultivo es limitada, aunque se ha reportado mantener CVRA en cultivo hasta por quince días [130,131], algunos investigadores reportan que 6-8 días es un periodo de tiempo óptimo para el cultivo de CVRA [132,133].

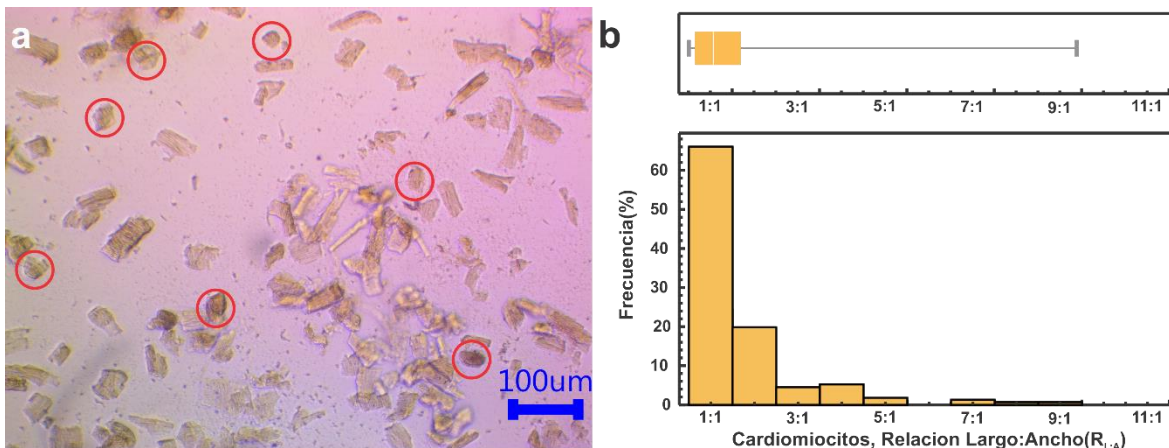


Fig. 6.4. Cardiomiocitos ventriculares de rata adulta al séptimo día de cultivo. (a) Microscopía óptica, (b) Histograma y grafica de barras de la relación Largo:Ancho.

Los CVRA con NPPAn, NPPAn-Py y NPPPy se mantuvieron en cultivo hasta treinta días, si bien se observaron comportamientos similares a lo largo del cultivo, también fue posible observar diferencias entre los tres tipos de nanopartículas (NPPAn, NPPAn-Py y NPPPy). Como comportamiento general se observó que los CVRA se adhirieron a las nanopartículas desde el inicio del cultivo, cubriéndose de nanopartículas generalmente a una semana de cultivo. Las nanopartículas con mayor adhesión celular fueron las NPPAn, seguidas por las NPPPy y por último las NPPAn-Py. Los agregados celulares comenzaron a formarse desde el inicio del cultivo, alcanzando su máximo tamaño a la tercera semana y durante la cuarta semana su tamaño permaneció constante. En las primeras dos semanas de cultivo, los agregados celulares de mayor tamaño se formaron con las NPPAn, seguido por las NPPPy y por último las NPPAn-Py. Las NPPAn formaron agregados celulares largos, las NPPPy agregados celulares amplios y las NPPAn-Py solo algunos pequeños agregados (Fig. 6.5, 6.6 y 6.7).

Los grupos amina son conocidos por promover la adhesión celular debido a sus cargas positivas que pueden atraer biomoléculas cargadas negativamente [46]. Además de biomoléculas cargadas negativamente, los grupos amino de las nanopartículas también podrían atraer partes de otras nanopartículas cargadas negativamente; por lo tanto, tendría sentido que las nanopartículas con mayor adhesión celular formen también los agregados celulares de mayor tamaño. Además de los grupos amino, los grupos OH también pueden formar dipolos debido a la electronegatividad del oxígeno; por lo tanto, este grupo funcional también podría llegar a atraer tanto biomoléculas como partes de otras nanopartículas cargadas negativamente. La banda ancha entre 3700 y 3000 cm^{-1} centrada en 3337 cm^{-1} del espectro infrarrojo está asociada con grupos amino y OH, y precisamente esta región se encuentra disminuida en el espectro de las NPPAn-Py (Fig. 6.2); por lo tanto, esto podría explicar porque estas nanopartículas tuvieron menor adhesión celular y no formaron grandes agregados celulares.

En la periferia de algunos agregados celulares fue posible observar lo que parecían ser CVRA que aun mantenían su forma característica de barra (Fig. 6.7). Dado que es difícil ver los agregados celulares con microscopía óptica, estos se describen mejor mediante SEM.

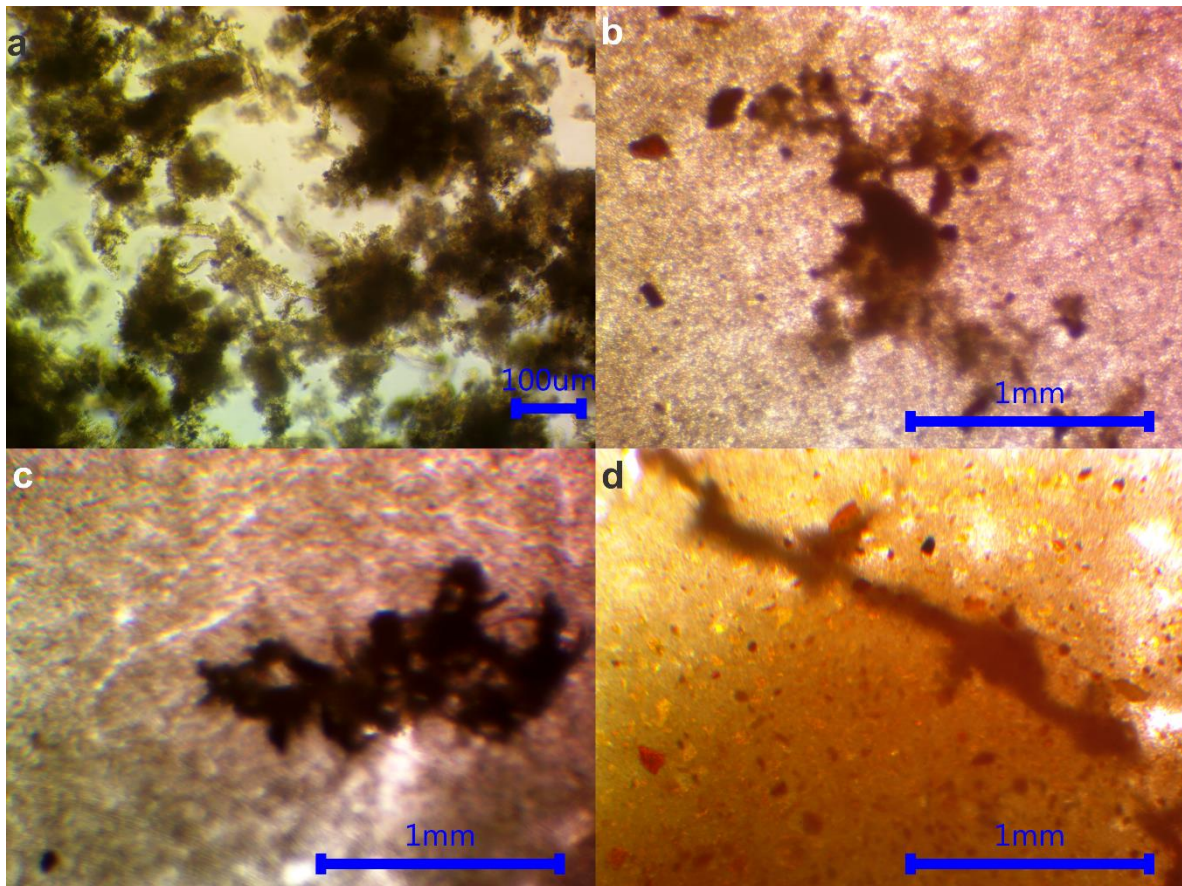


Fig. 6.5. Cardiomiocitos ventriculares de rata adulta con nanopartículas de polianilina polimerizadas por plasma. (a) Un día de cultivo. (b) Ocho días de cultivo. (c) Quince días de cultivo. (d) Treinta días de cultivo.

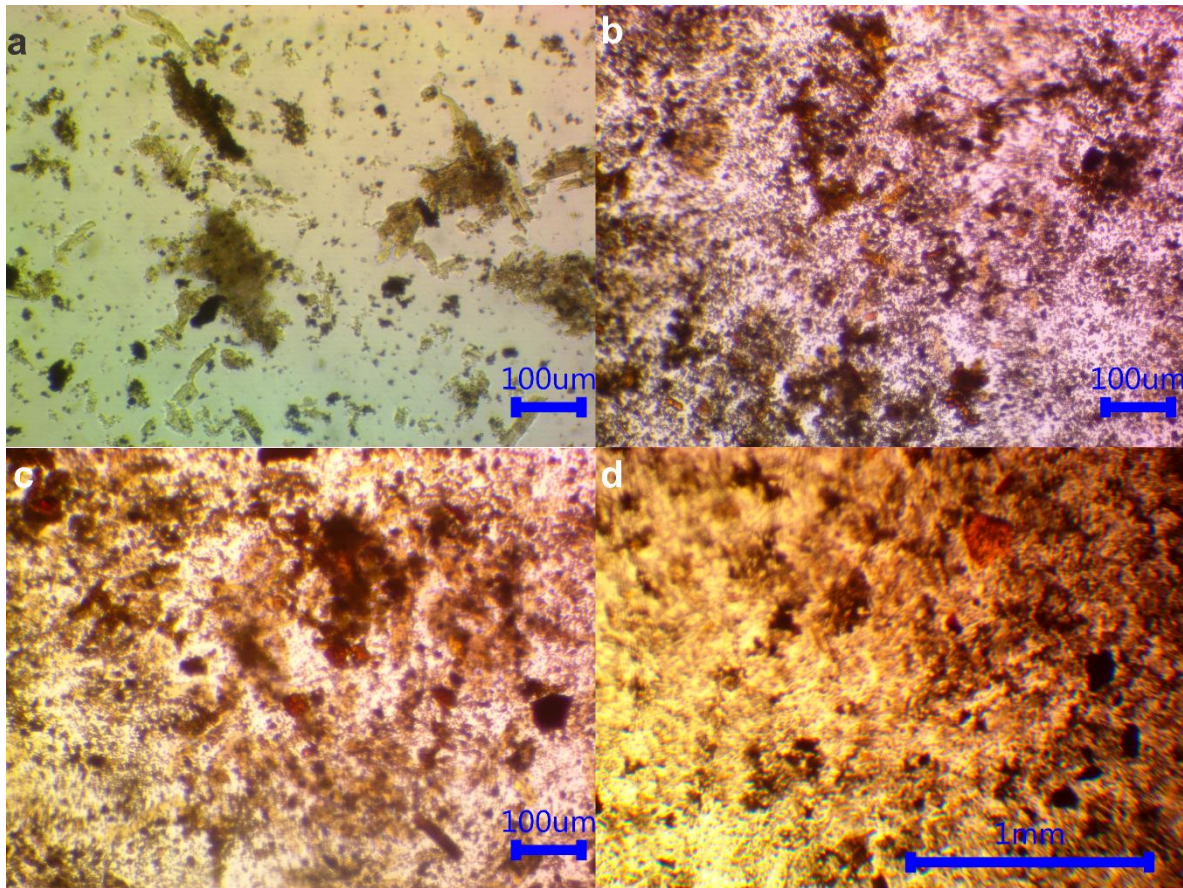


Fig. 6.6. Cardiomiocitos ventriculares de rata adulta con nanopartículas de polianilina-pirrol polimerizadas por plasma. (a) Un día de cultivo. (b) Ocho días de cultivo. (c) Quince días de cultivo. (d) Treinta días de cultivo.

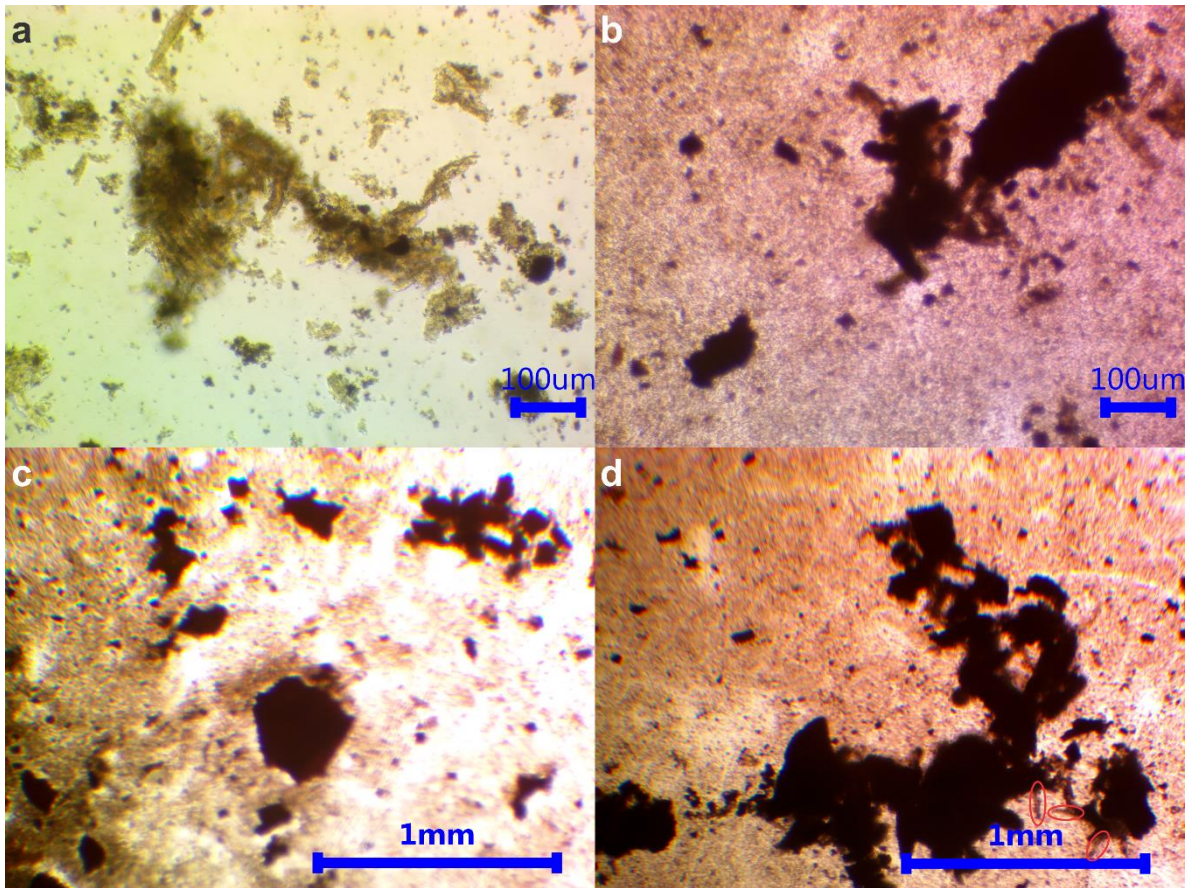


Fig. 6.7. Cardiomiocitos ventriculares de rata adulta con nanopartículas de polipirrol polimerizadas por plasma. (a) Un día de cultivo. (b) Ocho días de cultivo. (c) Quince días de cultivo. (d) Treinta días de cultivo.

Las imágenes SEM de los CVRA cultivados con las NPPAn, NPPAn-Py y NPPPy después de 30 días, mostraron que algunos CVRA aún mantenían su forma característica de barra y tenían nanopartículas adheridas en su superficie. Además, también fue posible observar pequeños grupos de cardiomiocitos alineados (Fig. 6.8). La organización de los CVRA en fibras es de gran importancia para obtener tejidos cardíacos funcionales y sigue siendo uno de los principales desafíos para la regeneración del tejido cardíaco [134,135].

Las imágenes de microscopía electrónica concuerdan con lo observado en la microscopía óptica, las NPPAn fueron las nanopartículas con mayor adhesión celular y capacidad de formar agregados celulares, seguidas por las NPPPy y por último las NPPAn-PY.

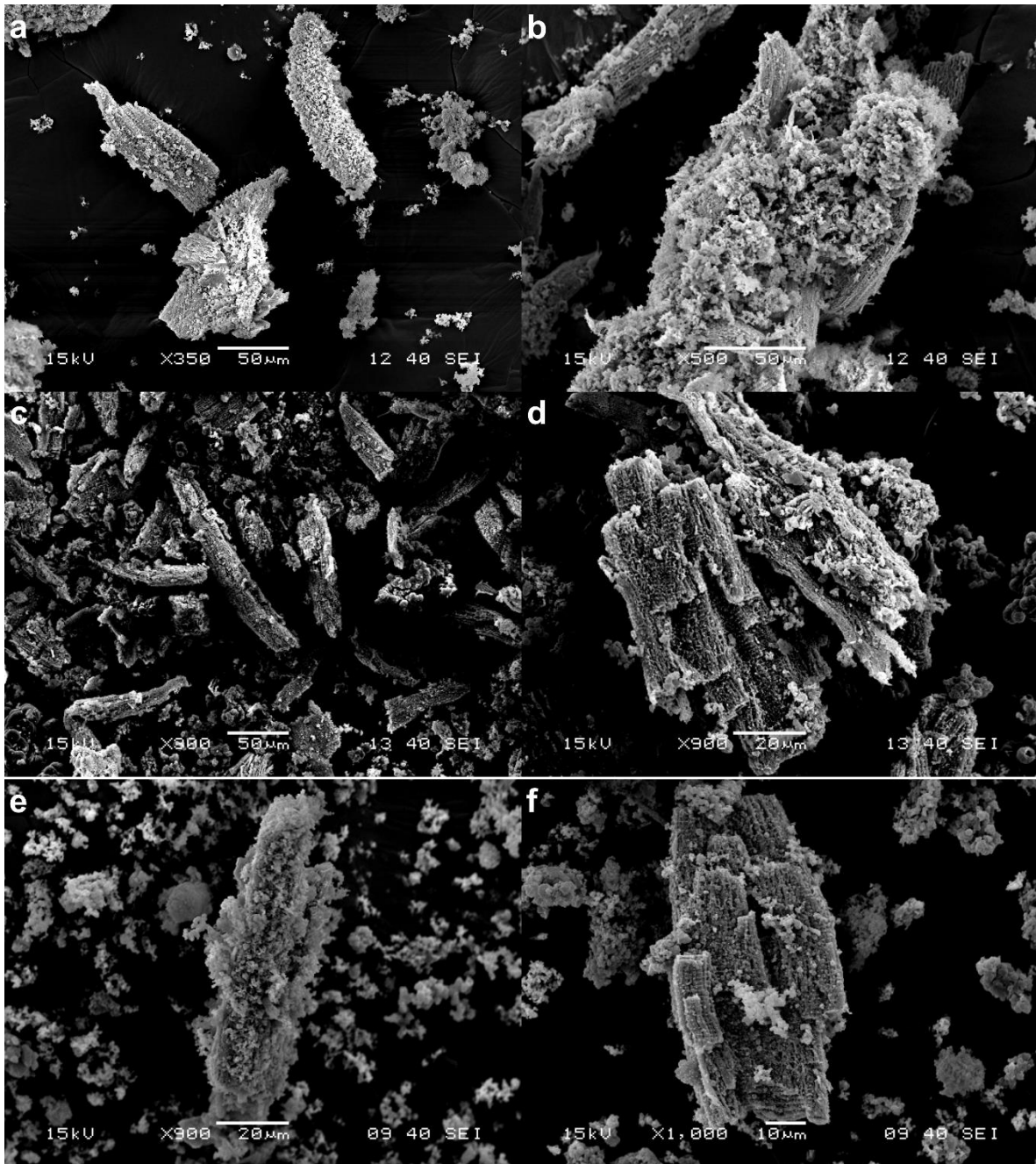


Fig. 6.8. Microscopia electrónica de barrido de los cardiomiocitos ventriculares de rata adulta (CVRA) a treinta días de cultivo (a y b) NPPAn, (c y d) NPPAn-Py y (e y f) NPPPy. Al lado derecho podemos observar como algunos cardiomiocitos aún conservan su forma característica de barra mientras que al lado izquierdo podemos observar algunos agregados celulares con cardiomiocitos alineados.

Aunque los agregados celulares se fijaron y deshidrataron gentilmente para ser observados en microscopia electrónica de barrido, durante el proceso de secado a punto crítico los agregados celulares se fragmentaron. Esto nos permitió analizar la morfología de los CVRA que formaban los agregados celulares (Fig. 6.9). La $R_{L:A}$ media de los CVRA cultivadas con las NPPAn fue de 2.5 con una desviación estándar de 1.34 ($n = 194$), y el 68% de los CVRA tenían $R_{L:A}$ entre 1 y 3 (Fig. 6.8 a y

b). La $R_{L:A}$ media de los CVRA cultivadas con las NPPAn-Py fue de 2.9 con una desviación estándar de 1.29 ($n = 101$), y el 64% de los CVRA tenían $R_{L:A}$ entre 1 y 3 (Fig. 6.8 c y d). La $R_{L:A}$ media de los CVRA cultivadas con las NPPPy fue de 5 con una desviación estándar de 2,12 ($n = 88$), y solo el 13% de los CVRA tenían $R_{L:A}$ entre 1 y 3 (Fig. 6.8 e y f).

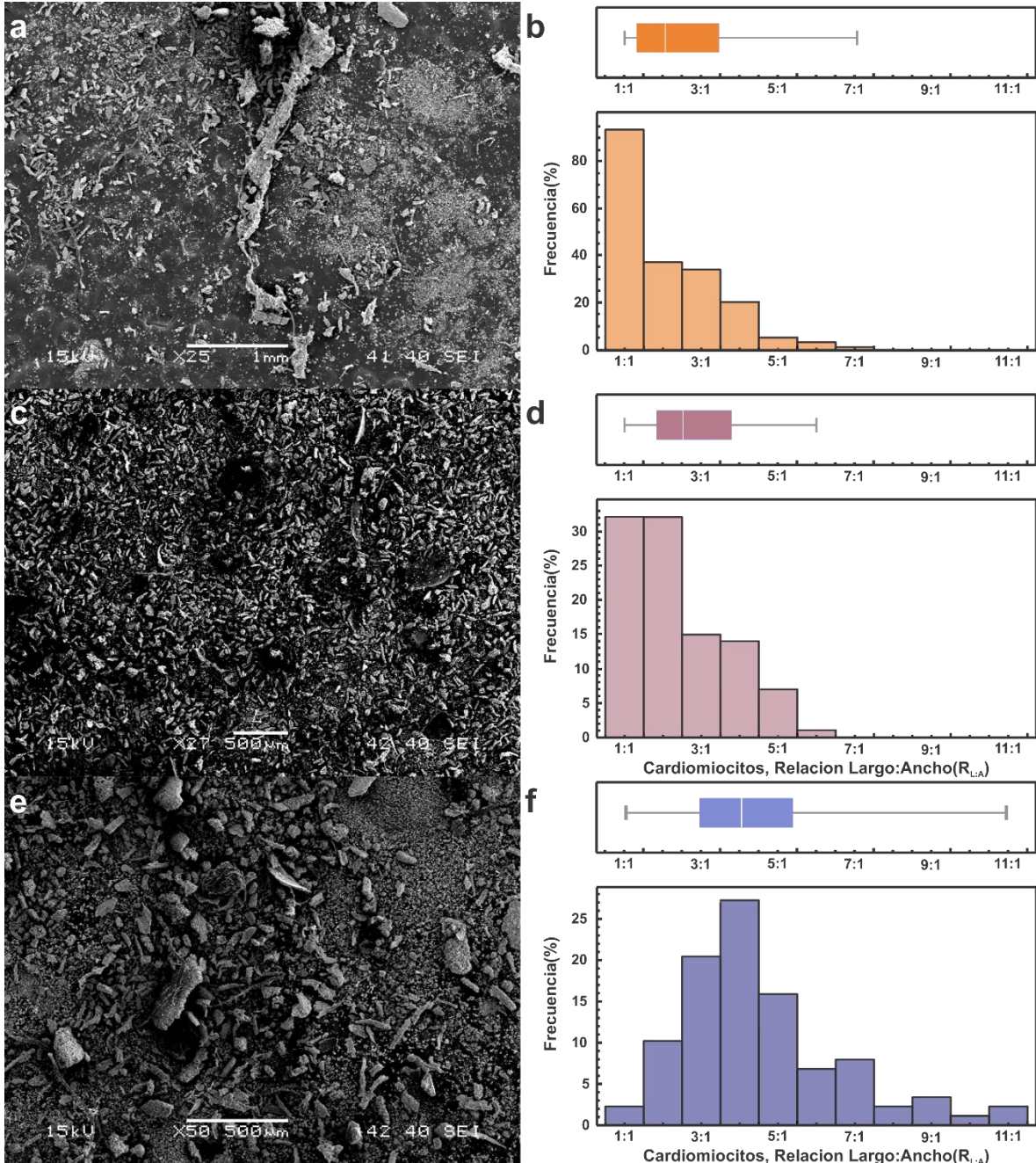


Fig. 6.9. Microscopia electrónica de barrido de los cardiomiocitos ventriculares de rata adulta (CVRA) a treinta días de cultivo (a) NPPAn, (c) NPPAn-Py y (e) NPPPy. Al lado derecho de cada microscopia podemos observar un histograma y una gráfica de barras de la relación Largo:Ancho de los CVRA.

Para determinar si al menos uno de los grupos (Control, NPPAn, NPPAn-Py, NPPPy) tenía diferencias significativas se realizó una prueba ANOVA de una vía. Dado que el tamaño de nuestras muestras era diferente, se realizó una prueba ANOVA no balanceada [114]. La prueba determinó que al menos uno de los grupos tenía diferencias significativas ($P < 0.05$). Para determinar qué grupos tenían diferencias significativas se realizaron las pruebas de Tukey y Scheffé. Ambas pruebas determinaron que los únicos grupos **sin** diferencias significativas fueron los grupos NPPAN y NPPAN-Py ($P < 0.05$).

Uno de los requisitos para realizar una prueba ANOVA es que los datos se distribuyan de manera normal; y dado que, los datos de nuestros grupos no se distribuyen de manera normal (Shapiro-Wilk, $P < 0.05$). Para verificar los resultados obtenidos con la prueba ANOVA se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, la cuál no asume que los datos se distribuyan de manera normal [115]. La prueba de Kruskal-Wallis determinó que al menos uno de nuestros grupos tenía diferencias significativas ($P < 0.001$). Para determinar que grupos tenían diferencias significativas se utilizó el método de Dwass, Steel, Critchlow-Fligner, este método también determinó que los únicos grupos **sin** diferencias significativas fueron los grupos NPPAn y NPPAn-Py ($P < 0.001$); por lo tanto, estos resultados coinciden con los resultados obtenidos con la prueba ANOVA (Fig. 6.10). Al menos hasta por treinta días, las NPPAn, NPPAn-Py y NPPPy tuvieron un impacto significativo en la forma de los cardiomiocitos, y probablemente, en su expresión génica retrasando procesos de desdiferenciación, necrosis y apoptosis [77,78].

La opinión común en la comunidad científica es que el PPy es más biocompatible que la PAn. Esta opinión generalmente aceptada se basa tanto en el número de trabajos que emplean PPy y PAn publicados en la literatura como en comparaciones indirectas de los estudios realizados con estos dos polímeros [136]. Nuestros resultados muestran una comparación directa entre el PPy y la PAn, y son evidencia de que esta opinión podría considerarse generalmente como cierta.

Algunos autores sugieren que la mayor biocompatibilidad del PPy puede ser debida a que el pirrol (Py) es una molécula bioactiva con numerosas aplicaciones en compuestos terapéuticos (fungicidas, antibióticos, antiinflamatorios, medicamentos para reducir el colesterol y agentes antitumorales) [137]. En el caso particular de la polimerización por plasma, resulta interesante preguntarse si la diferencia en los resultados es debida a que las integrinas pueden unirse favorablemente a algunos sitios del PPPy. Otra pregunta interesante es si las integrinas pueden unirse favorablemente a algunos sitios de la PPAAn, dado que la PPAAn también tiene grupos NH y OH en su estructura química, y son

precisamente estos grupos los que produjeron en el PPPy las interacciones más favorables con las integrinas [38].

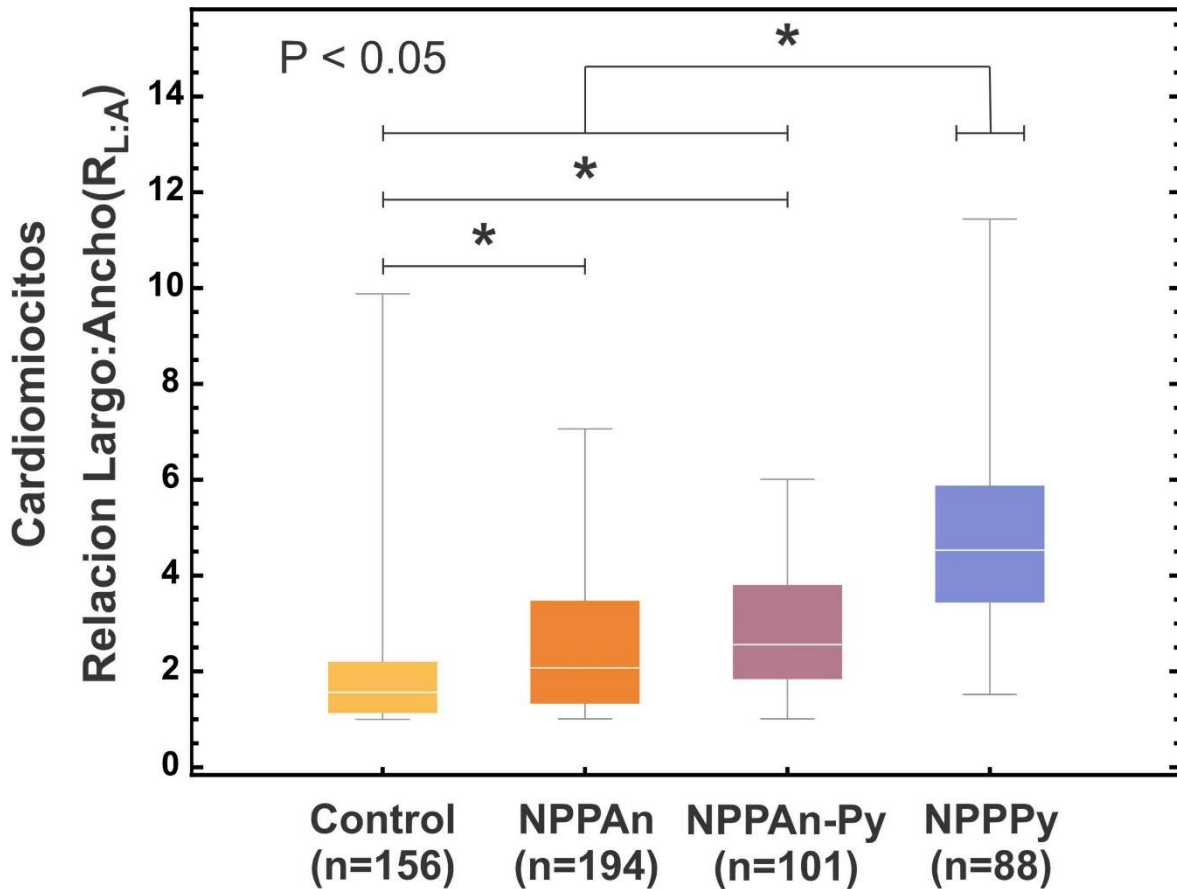


Fig. 6.10. Gráfica de barras de la relación Largo:Ancho de los cardiomiocitos ventriculares de rata adulta para nuestros cuatro grupos de estudio (Control, NPPAn, NPPAn-Py y NPPPy).

Fibras similares a la ECM cardiaca [138,139] fueron observadas en la superficie de los CVRA cultivados con las NPPAn, NPPAn-Py y NPPPy (Fig. 6.11). El grupo de estudio en donde se observó mayor expresión de esta clase de fibras fue en el grupo de las NPPAn, después el grupo de las NPPPy y por último en el grupo de NPPAn-Py. Este resultado concuerda tanto con la adhesión celular observada como con la capacidad de formar agregados celulares de las NPPAn, NPPAn-Py y NPPPy. Recientemente se ha mostrado que los cardiomiocitos pueden expresar algunas de las proteínas componentes de la ECM cardiaca [140].

Como se mencionó anteriormente, algunos sitios del PPPy pueden unirse favorablemente a algunos tipos de integrinas [38]. Además, quizás algunos sitios de la PPA también podrían unirse favorablemente a algunos tipos de integrinas. Y dado que, las integrinas influyen en una amplia gama de funciones celulares, incluida la organización de la ECM [27,28]. Las NPPAn, NPPAn-Py y NPPPy podrían ayudar a que los CVRA comiencen a expresar su propia

ECM. Resulta interesante preguntarse si los cardiomiocitos con ECM circundante sana podrían ayudar a revertir la fibrosis cardíaca.

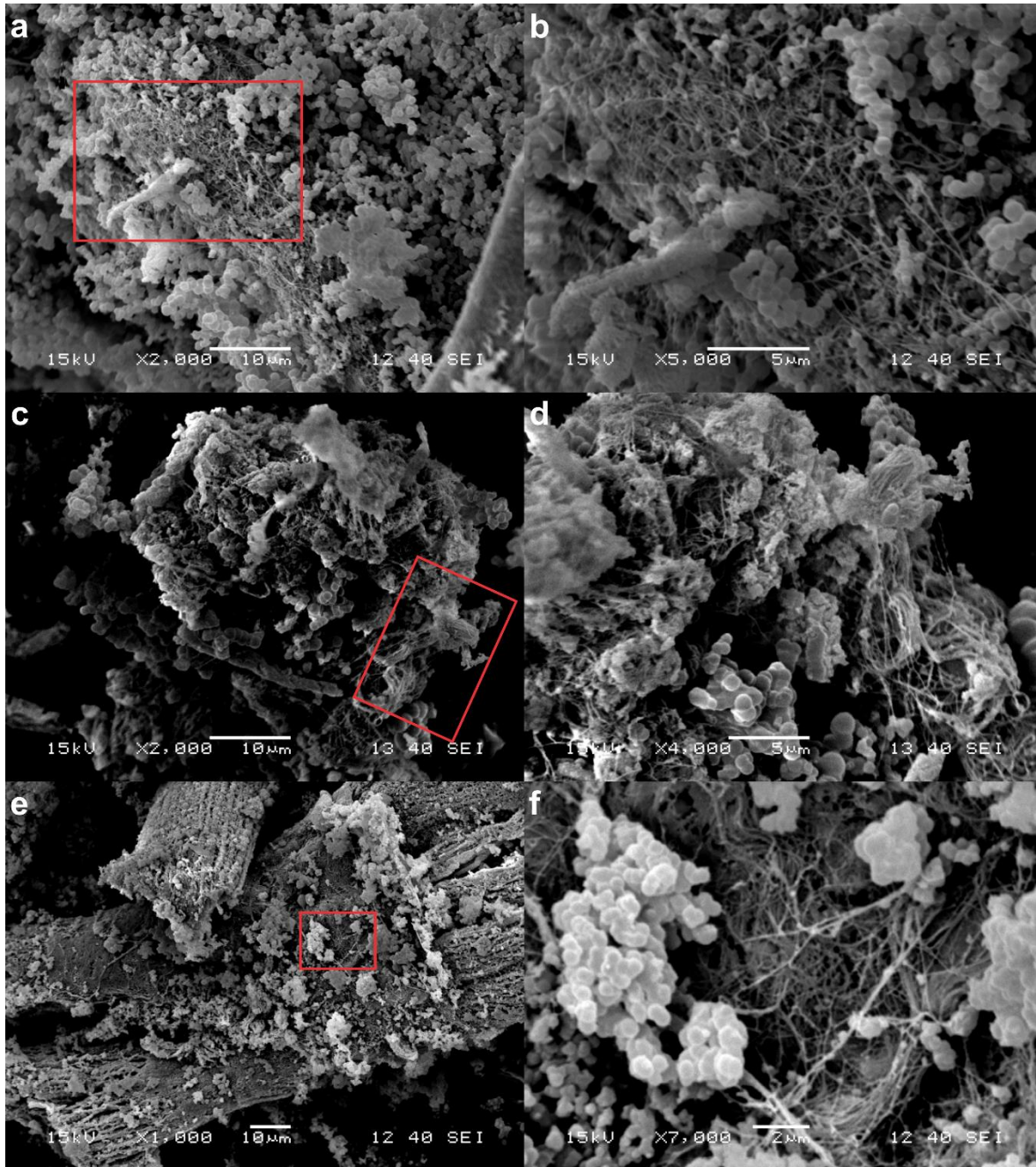


Fig. 6.11 Microscopia electrónica de barrido de los cardiomiocitos ventriculares de rata adulta (CVRA) a treinta días de cultivo. En estas imágenes podemos observar fibras similares a la ECM cardíaca [138,139] en los CVRA cultivados con las NPPAn (a y b), NPPAn-Py (c y d) y NPPPy (e y f). Del lado derecho se muestran los acercamientos de las zonas marcadas en rojo en las imágenes del lado izquierdo.

Algunos de los desafíos actuales en terapias celulares cardíacas (TCC) son la retención de las células en el sitio del infarto [141], el desarrollo de protocolos efectivos para diferenciar células en cardiomiocitos maduros [142] y entornos nativos alterados por la formación de cicatriz o tejido fibrótico [79,140]. La adhesión celular del PPPy y la PPA_n podría contribuir a mantener las células (o microtejidos cardíacos) en el sitio del infarto, las NPPA_n, NPPA_n-Py y NPPPy podrían ayudar a mantener diferenciados los cardiomiocitos trasplantados; además, resulta interesante preguntarse si cardiomiocitos con ECM circundante sana podrían ayudar a revertir la fibrosis cardíaca, y aún cuando esto no sea posible, las TCC podrían ser utilizadas en etapas tempranas posteriores a un infarto de miocardio antes de que se forme el tejido fibrótico en el sitio de la lesión; por lo tanto, las NPPA_n, NPPA_n-Py y NPPPy podrían ayudar a resolver algunos de los mayores desafíos que actualmente tienen las TCC.

6.3 Células de Islotes Pancreáticos (CIP)

Se aislaron islotes pancreáticos (IP) de rata (Fig. 11a). El diámetro medio de nuestros islotes fue de aproximadamente $160 \pm 50 \mu\text{m}$ ($n=97$), el cuál varió entre 65 y 330 μm , tanto la forma como el tamaño concuerda con lo reportado por otros autores [143,144]. La secreción de insulina de los IP fue registrada durante los primeros cinco días (Fig. 11b, $n=3$) al estimularlos una hora con alta glucosa (25 mM). En los primeros dos días de cultivo la secreción de insulina se mantuvo constante (día 1=5.71 ng/ml, día 2=5.59 ng/ml), al tercer día de cultivo la secreción de insulina alcanzó su máximo valor (13.93 ng/ml). El cuarto y quinto día la secreción de insulina decreció con respecto al tercer día y se mantuvo aparentemente constante (día 4=8.31 ng/ml, día 5=8.97 ng/ml). No obstante, la mayor dispersión de nuestros datos se registró al quinto día de cultivo (Fig. 3c). La secreción máxima de insulina (registrada al tercer día) puede estar relacionada con la recuperación de los IP después de su aislamiento. Por otro lado, la disminución en la secreción de insulina (observadas al cuarto y quinto día) y el aumento en la dispersión de los datos (registrado al quinto día) es probable que esté relacionada con la necrosis, que puede empezar a aparecer en algunos IP de 14 a 16 horas después de su aislamiento [145].

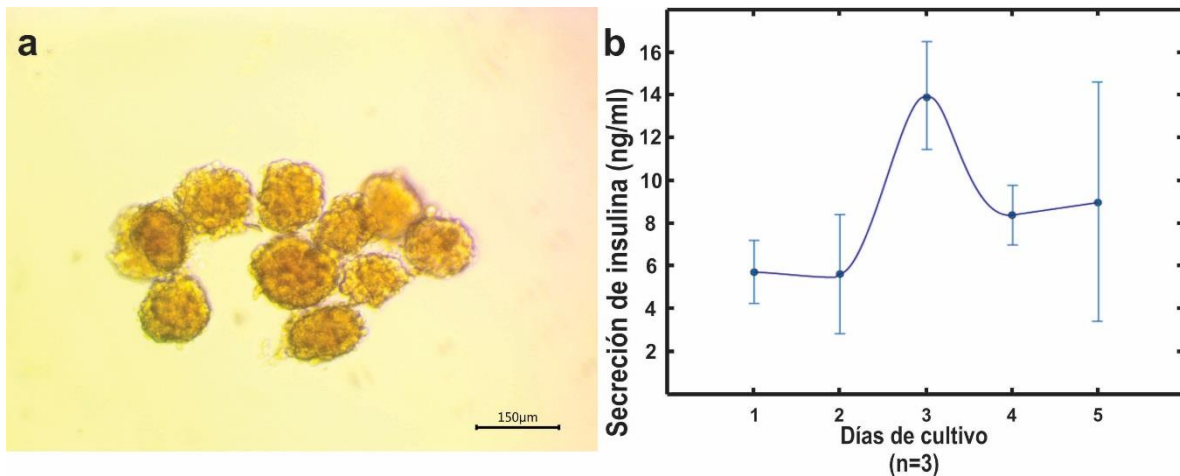


Fig. 6.12 (a) Microscopia de los islotes pancreáticos (IP) aislados, el diámetro medio de los IP fue de 160 μm , tanto la forma como el tamaño de los IP coincide con lo reportado en la literatura por otros autores. (b) Grafica de la secreción de insulina de los IP durante los primeros cinco días de cultivo, los puntos azules representan el valor medio de la secreción de insulina y las barras verticales arriba y abajo del valor medio representan la desviación estándar.

Los IP se cubrieron con NPPPy (Fig. 6.13 a). Existen diversos estudios en la literatura sobre el desarrollo de nuevos biomateriales para encapsular IP y protegerlos del sistema inmune del huésped después del trasplante [93,146,147].

Uno de los desafíos aún por resolver es la baja estabilidad de las cápsulas. Las membranas poliméricas se agrietan, lo cual limita tanto su estabilidad así como sus potenciales aplicaciones clínicas [148]. Las NPPPy no forman una membrana “continua”; por el contrario, el recubrimiento con NPPPy forma una membrana de pequeñas partículas (330 nm) agregadas; por lo cual, la fractura del polímero no debería de ser un problema. Membranas poliméricas delgadas han llegado a reportar estabilidad de largo plazo (44 días); sin embargo, la estabilidad fue evaluada en eritrocitos y no IP [148]. La estabilidad del recubrimiento con la NPPPy fue 15 días, después de este tiempo algunos islotes empezaron a perder parte del recubrimiento. No obstante, este resultado podría estar más relacionado con cambios en la estructura del IP que con la estabilidad de las NPPPy. A siete días de cultivo la mayoría de los IP en el grupo control presentaban signos de cuerpos necróticos (Fig. 6.13 b). Durante la necrosis, las células se hinchan y lisan, el contenido celular se libera de forma descontrolada en el tejido circundante y atrae células inmunitarias, lo que lleva a reacciones inflamatorias [149]. Por lo tanto, antes de encapsular o cubrir IP con biomateriales, se debería garantizar un adecuado suministro de oxígeno.

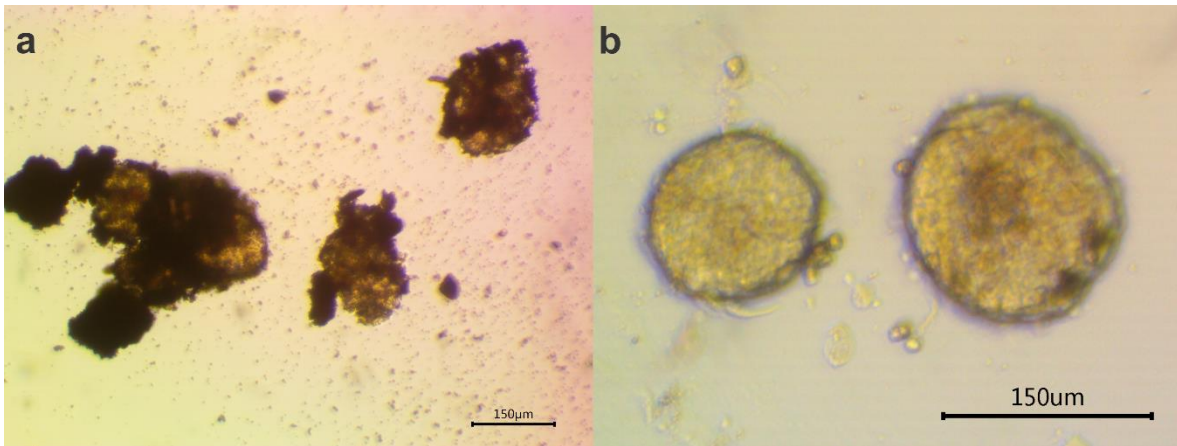


Fig. 6.13 (a) Islotes pancreáticos (IP) cubiertos con nanopartículas de polipirrol polimerizadas por plasma, un día de cultivo. (b) IP a siete días de cultivo en donde podemos apreciar cuerpos necróticos en el centro de los IP.

IP fueron dispersados en células aisladas y se cultivaron con NPPAn y NPPPy, hasta por treinta días. Si bien se observaron comportamientos similares a lo largo del cultivo entre las NPPAn y NPPPy, también fue posible observar algunas diferencias entre los dos tipos de nanopartículas. Las CIP se adhirieron a las NPPAn y NPPPy desde el inicio del cultivo. Muchas de las CIP quedaron cubiertas por nanopartículas desde el primer día de cultivo, las células restantes terminaron de cubrirse con nanopartículas durante la primera semana. También desde el primer día de cultivo, se observó la formación de agregados celulares; no obstante, la mayoría se hicieron más pequeños durante los siguientes días. Solo algunos pocos agregados celulares mantuvieron o aumentaron su tamaño, observando en su mayoría pequeños agregados celulares durante el resto del cultivo. Los agregados celulares de mayor tamaño fueron observados entre la primera y segunda semana, durante la tercera y cuarta semana los agregados celulares no aumentaron su tamaño y algunos agregados celulares se fragmentaron o dividieron en agregados celulares más pequeños. Las NPPAn mostraron de nuevo tener mayor adhesión celular y formar agregados celulares de mayor tamaño (fig. 6.14 y 6.15). La adhesión la evaluamos cualitativamente observando el tamaño de los agregados celulares formados al inicio del cultivo, así como su evolución temporal. También relacionamos la adhesión celular con la capacidad de mantener el tamaño de los agregados celulares después del secado a punto crítico.

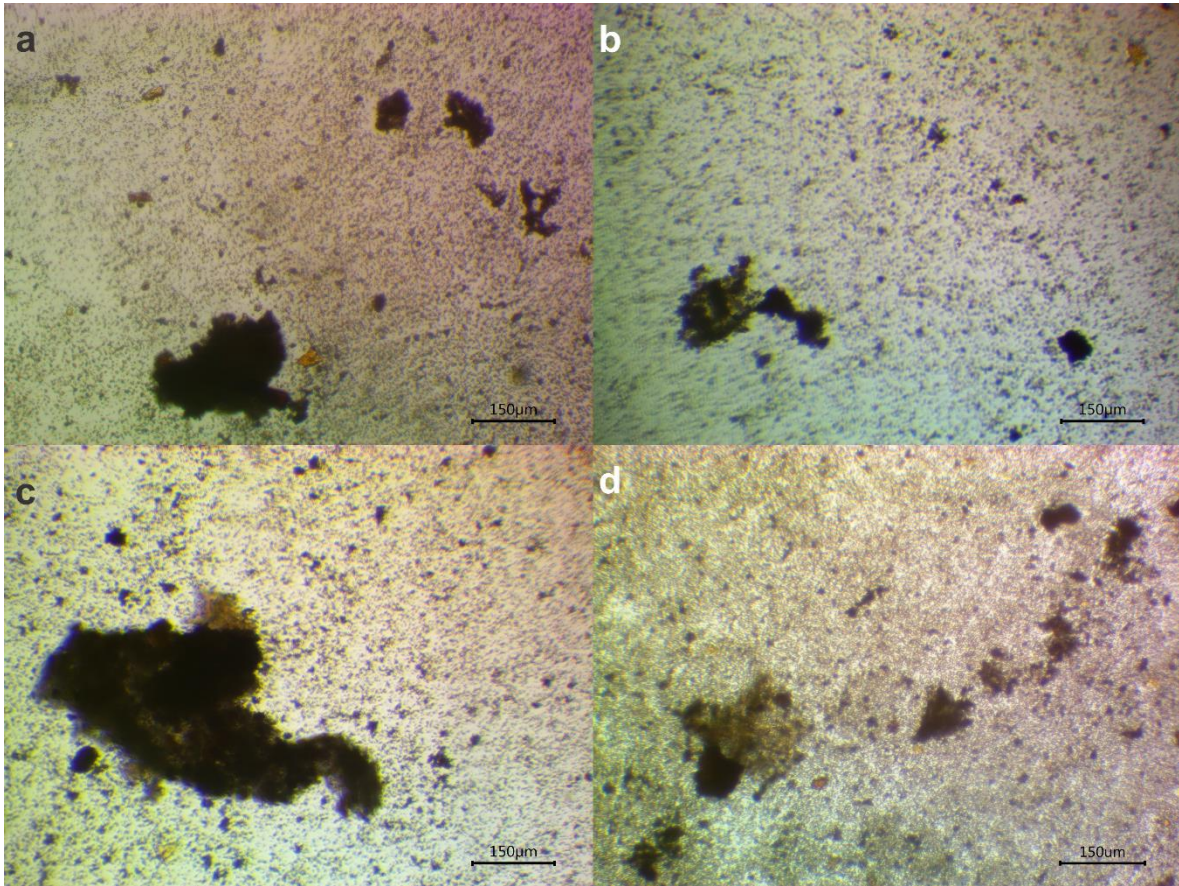


Fig. 6.14 Células dispersas de Islotes pancreáticos (CIP) cultivadas con nanopartículas de polianilina polimerizadas por plasma (NPPAN). (a) Un día de cultivo. (b) Ocho días de cultivo. (c) Quince días de cultivo. (d) Treinta días de cultivo.

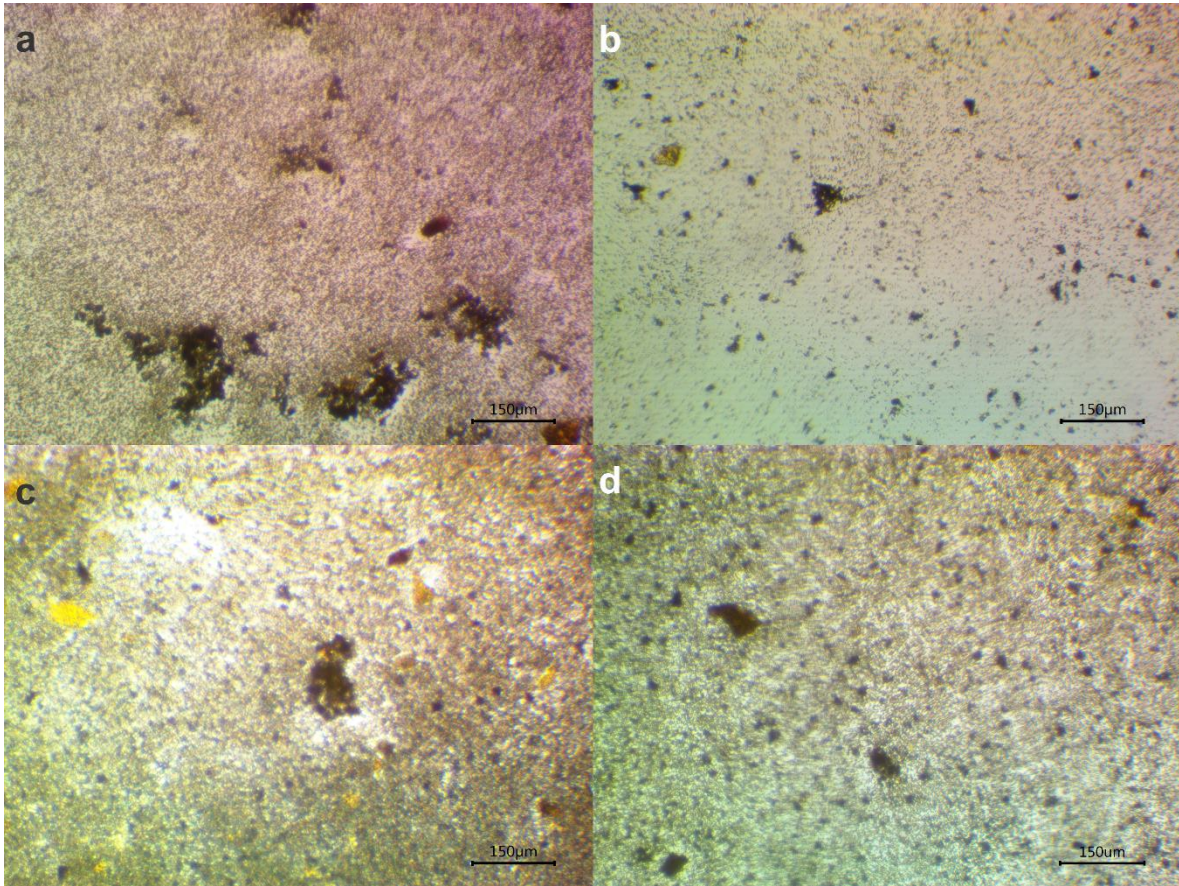


Fig. 6.15 Células dispersas de Islotes pancreáticos (CIP) cultivadas con nanopartículas de polipirrol polimerizadas por plasma (NPPPy). (a) Un día de cultivo. (b) Ocho días de cultivo. (c) Quince días de cultivo. (d) Treinta días de cultivo.

Las CIP cultivadas con las NPPPy formaron pequeños agregados celulares, generalmente menores a $60\ \mu\text{m}$ y solo algunos pocos agregados tenían un tamaño mayor a $60\ \mu\text{m}$, simulaciones computacionales han mostrado que el oxígeno se distribuye uniformemente en islotes pequeños ($\leq 60\ \mu\text{m}$) [150]. Por lo tanto, la mayoría de los agregados celulares que se formaron con las NPPPy deberían tener un adecuado suministro de oxígeno. Por otro lado, las CIP cultivadas con las NPPAn formaron algunos agregados celulares con diámetros mayores a $60\ \mu\text{m}$, que pueden no tener un adecuado suministro de oxígeno. Por lo tanto, las NPPPy parecen ser más adecuadas para ser utilizadas en las TRCB.

Para observar con mayor detalle los agregados celulares formados a treinta días de cultivo las CIP se fijaron y fueron observadas en microscopía electrónica de barrido. En las CIP cultivadas con las NPPAn se observaron algunas CIP con daños en su membrana celular (fig. 6.16). Además, también fue posible observar evaginaciones de la membrana celular denominadas blebbings o ampollas (que concuerdan con las características de blebbings reportadas por otros autores [151]), estas ampollas son una característica morfológica de las células que experimentan una etapa tardía de apoptosis, así como, evidencia inminente de muerte celular [152,153]. Además, son un marcador importante de lesión celular

[154,155] y puede ser un indicador de viabilidad celular [156]. El encogimiento celular es otro cambio morfológico descrito generalmente en etapas tardías de muerte celular (aunque en algunos tipos celulares este cambio puede ocurrir en etapas tempranas) [157]; por lo tanto, es probable que las CIP de la fig. 6.16 sean CIP en etapas tardías de apoptosis.

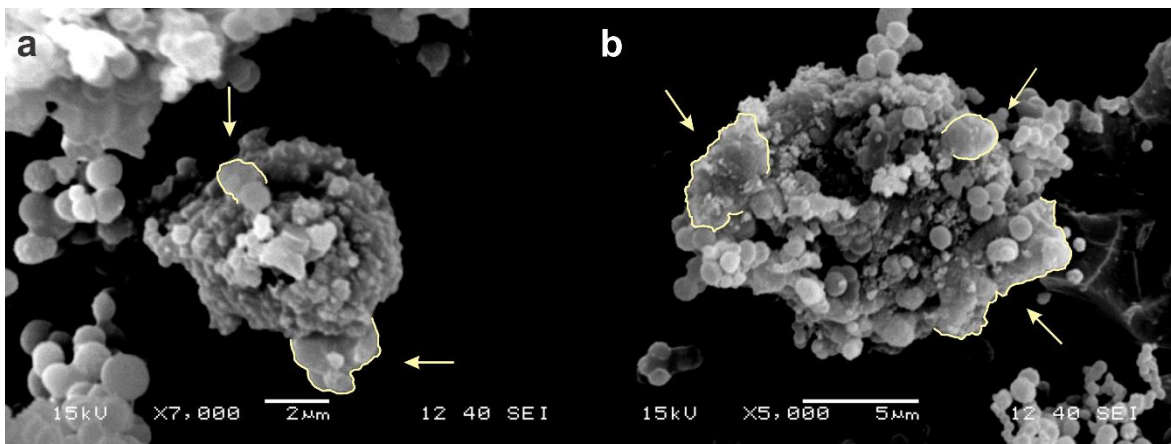


Fig. 6.16 Células dispersas de Islotes pancreáticos (CIP) cultivadas con nanopartículas de polianilina polimerizadas por plasma (NPPAn) a treinta días de cultivo. (a y b) CIP con daños en su membrana celular, también se pueden observar evaginaciones esféricas en la membrana (blebbings) relacionadas con procesos de apoptosis.

También fue posible observar CIP aisladas sin aparentes daños o ampollas en la membrana celular (fig. 6.17 a), CIP con algunas fibras sobresu superficie (fig. 6.17 a y b) y pequeños agregados celulares ($\leq 60 \mu\text{m}$) con y sin daño aparente en su membrana celular (fig. 6.17 d, e y f). En las CIP con daños en su membrana celular que formaban parte de los agregados, la presencia de blebbings o cambios en su tamaño no fue tan evidente como en las células aisladas de la fig. 6.16. No obstante, este tipo de daño celular podría explicar porque los agregados celulares se fragmentaron en agregados más pequeños o células aisladas (fig. 6.17 c y e).

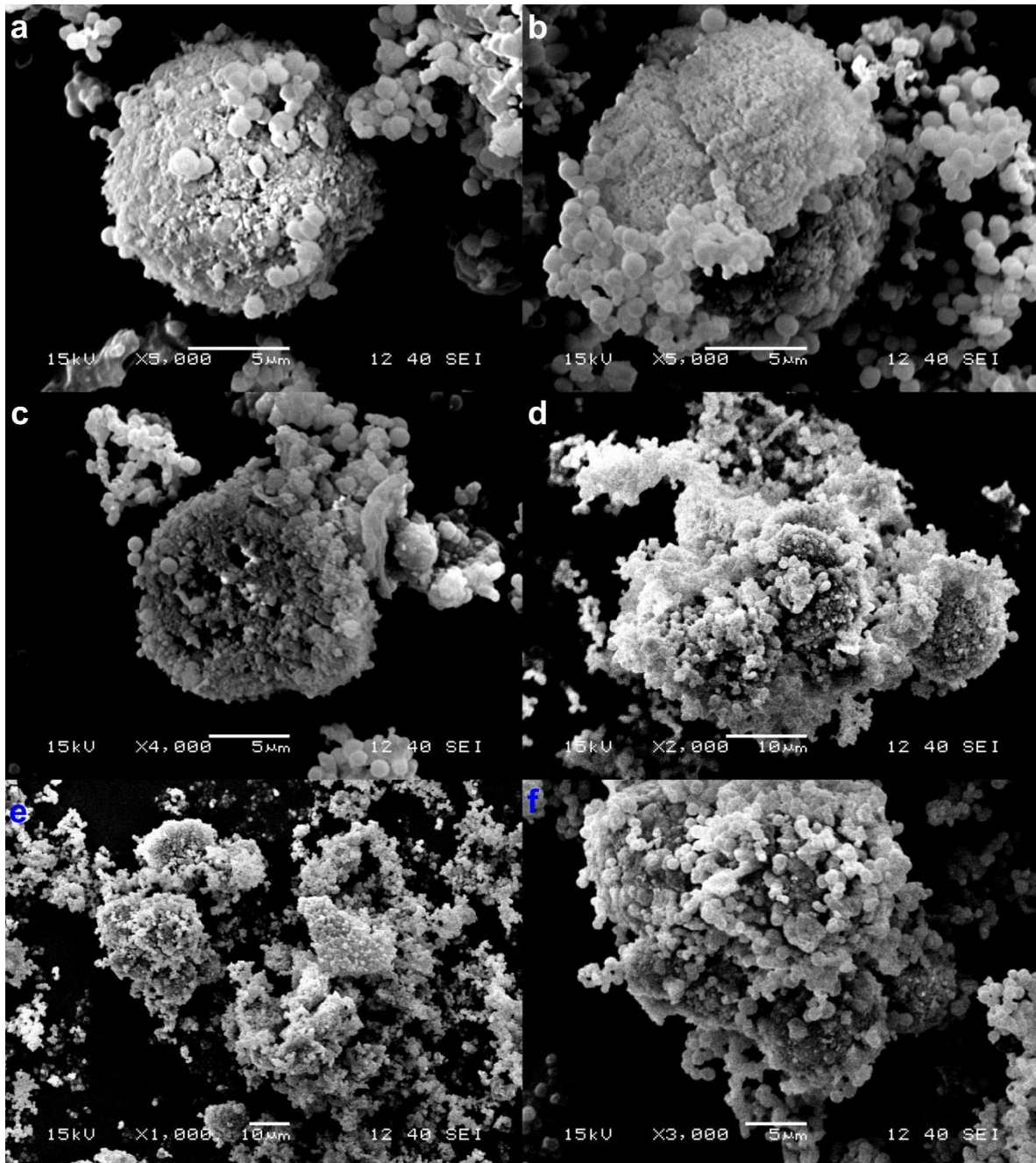


Fig. 6.17 Células dispersas de Islotes pancreáticos (CIP) cultivadas con nanopartículas de polianilina polimerizadas por plasma (NPPAN) a treinta días de cultivo. (a) CIP sin aparente daño o ampollas en su membrana celular. (a y b) CIP con algunas fibras en su superficie. (c) CIP que parece haber estado formando parte de un agregado celular. (d, e y f) Agregados celulares formados por las CIP y NPPAN, (e) algunos agregados pueden haberse fragmentado en agregados celulares más pequeños o en CIP aisladas. (d y f) CIP con y sin aparentes daños en su membrana celular formando agregados celulares.

En la mayoría de las CIP cultivadas con las NPPPy no se observaron CIP con daños evidentes en su membrana celular, ampollas o encogimiento (fig. 6.18 b). Sin embargo, fue posible observar CIP que parecen estar empezando a desarrollar ampollas en su membrana celular (fig. 6.18 a), lo cuál podría ser un indicador de etapas más tempranas de apoptosis. También se observaron algunos agregados que parecen haberse fragmentado o dividido en CIP aisladas o agregados más pequeños (fig. 6.18 c, d y e). No se observaron fibras sobre la superficie de las CIP cultivadas con las NPPPy.

A treinta días de cultivo, aproximadamente en el 41% de las CIP cultivadas con las NPPAn no se observaron signos de algún tipo de daño, ampolla o encogimiento de su membrana celular (n=17); mientras que en las CIP cultivadas con las NPPPy dicho porcentaje fue de aproximadamente 53% (n=15). Las CIP pueden sobrevivir hasta por tres semanas con técnicas estándar de cultivo (2D), aunque, con un porcentaje de viabilidad celular de alrededor del 11% [112], es decir, que aproximadamente solo una de cada diez células permanecía viva. Además, en comparación con las NPPAn, las NPPPy parecen promover de mejor manera la supervivencia de las CIP, lo cual concuerda con los resultados obtenidos con los CVRA. Si bien estos resultados son preliminares y es necesario realizar más estudios para comprobarlos, estos resultados indican que las NPPAn y NPPPy pueden estar promoviendo la supervivencia de las CIP.

Dependiendo del sitio del trasplante y de la especie, la revascularización de IP ocurre de diez a treinta días después del trasplante [94,158–160]; por lo tanto, las NPPAn y NPPPy podrían ser utilizadas para promover la supervivencia de agregados celulares hasta que sean revascularizados. Promover la supervivencia de las CIP es un resultado importante; no obstante, algunos investigadores sugieren no utilizar las células beta en cultivo por más de una semana, dado que las células beta cambian con el tiempo durante el cultivo, envejecen y pierden algunas de sus características [161]. Dado que las NPPAn, NPPAn-Py y NPPPy ayudaron a retrasar procesos de desdiferenciación en CVRA; por lo tanto, las NPPAn y NPPPy podrían no solo ayudar a promover la supervivencia de las CIP sino también a mantener diferenciadas las células beta por mayores periodos de tiempo. En particular sería interesante estudiar la secreción de insulina durante el tiempo de cultivo; sin embargo, este estudio se deja como investigación para trabajos futuros.

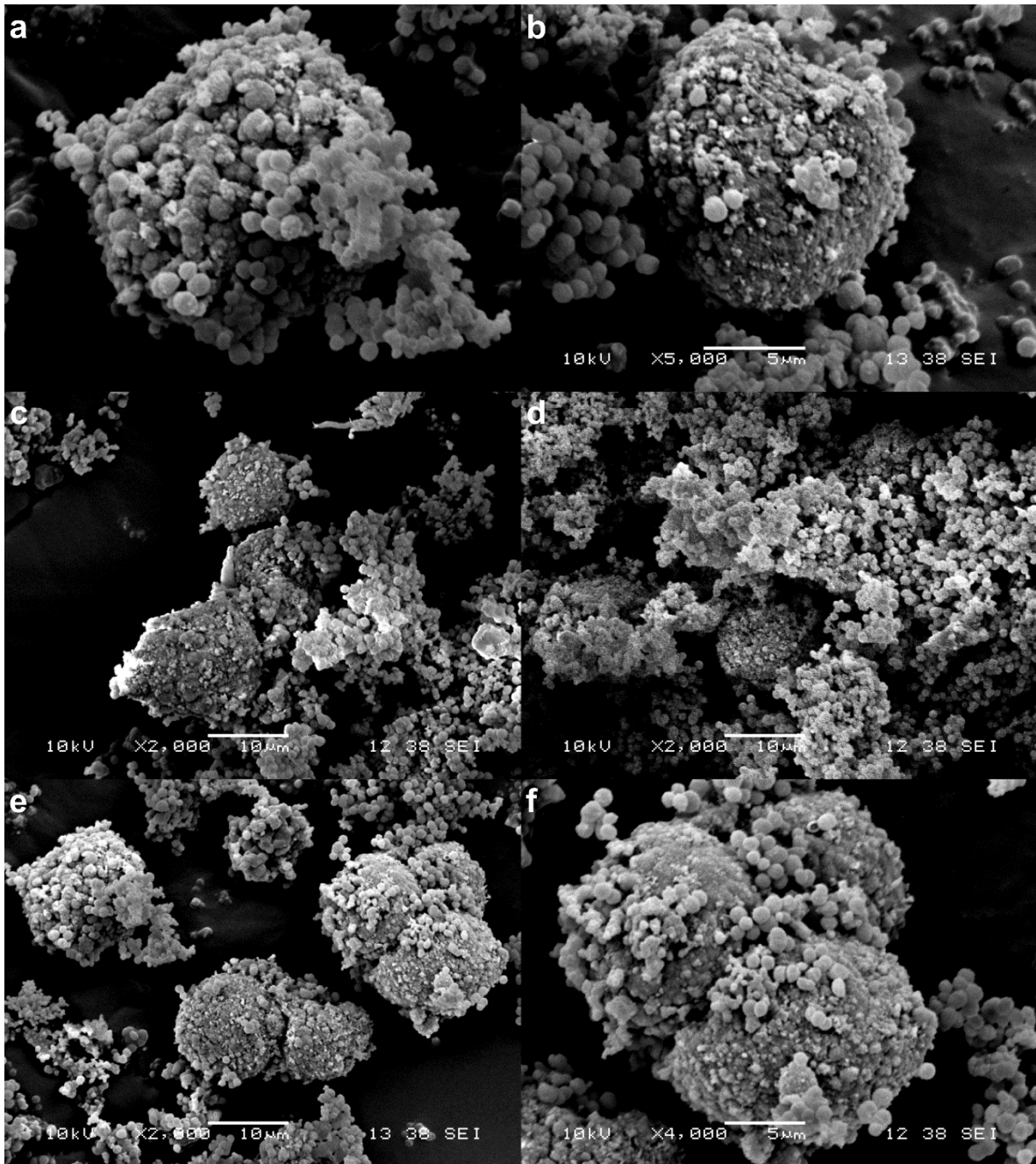


Fig. 6.18 Células dispersas de Islotes pancreáticos (CIP) cultivadas con nanopartículas de polipirrol polimerizadas por plasma (NPPPy) a treinta días de cultivo. (a) CIP con pequeñas ampollas en su membrana celular que podrían estar asociadas a etapas tempranas de apoptosis. (b) CIP sin aparente daño o ampollas en su membrana celular. (c, d, e y f) Agregados celulares formados por las CIP y NPPPy en donde se observa que algunos agregados parecen haberse fragmentado o dividido en agregados celulares más pequeños o CIP aisladas.

7 Conclusiones

Se obtuvieron nanopartículas de polianilina (NPPAn), polianilina-pirrol (NPPAn-Py) y polipirrol (NPPPy), mediante la técnica de polimerización por plasma, con forma esférica, diámetro medio de 730, 996 y 330 nm respectivamente, y con grupos amino y OH en su estructura química. Los grupos amino y OH en la estructura química de las nanopartículas estuvieron relacionados con la adhesión celular y con su capacidad para formar agregados celulares.

Los cardiomiocitos ventriculares aislados de las ratas adultas (CVRA), presentaron la morfología y estructuras características de los cardiomiocitos aislados y reportados por otros autores.

Los islotes pancreáticos (IP) aislados de las ratas adultas, presentaron la morfología característica de los islotes pancreáticos aislados y reportados por otros autores, secretaron insulina y continuaron secretando insulina al menos hasta por cinco días de cultivo.

Los cambios morfológicos de los CVRA en cultivo, relacionados con procesos de desdiferenciación, necrosis y apoptosis, son retrasados por las NPPAn, NPPAn-Py y NPPPy. La organización de algunos grupos de CVRA fue semejante a la organización de los cardiomiocitos en el miocardio, además, los CVRA expresaron fibras similares a la matriz extracelular cardiaca.

En el 41% y 53% de las CIP cultivadas con las NPPAn y NPPP durante treinta días, no se observaron marcadores de lesiones celulares. El tamaño de algunos agregados celulares que formaron las CIP con las NPPAn fueron semejantes al tamaño de IP. En general, el tamaño de los agregados celulares que formaron las CIP con las NPPPy fue menor a 60 μm .

Las NPPAn y NPPPy tienen la capacidad de interactuar con sistemas celulares como CVRA y CIP. Algunas de las interacciones que pueden proporcionar las NPPAn y NPPPy son: adhesión, capacidad para formar agregados celulares 3D, interacciones célula-célula, organización celular; además, promueven la supervivencia, expresión de ECM y retrasan procesos de desdiferenciación.

8 Perspectivas a futuro

Estudiar el efecto que tiene la potencia de síntesis en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de polianilina (NPPAn) y polipirrol (NPPPy) polimerizadas por plasma, así como en su capacidad para interactuar con sistemas biológicos, en particular con cardiomiocitos ventriculares de rata adulta (CVRA). Dados los resultados obtenidos en las películas aminadas polimerizadas por plasma (polialilamina, polialilamina-pirrol y polipirrol) [119], las NPPAn y NPPPy sintetizadas a potencias bajas (< 40 W) podrían retrasar más los cambios morfológicos de los CVRA, asociados con procesos de desdiferenciación, necrosis y apoptosis, que las NPPAn y NPPPy sintetizadas a potencias mayores (≥ 40 W).

Determinar mediante simulaciones moleculares y pruebas experimentales si algunos tipos de integrinas pueden unirse favorablemente en algunos sitios de la polianilina polimerizada por plasma (PPAn).

Determinar si las fibras observadas en los CVRA son ECM cardiaca, investigar el tipo y porcentaje de proteínas presentes, intentar estimar las características mecánicas de la ECM expresada por los CVRA y comparar los valores obtenidos con los valores reportados de la ECM de tejido cardiaco sano.

Estudiar la funcionalidad y estructura (tipo de poblaciones celulares y su organización) de los agregados celulares formados por las NPPAn y NPPPy; y emplearlos en modelos animales de terapias celulares cardiacas (TCC) y terapias de reemplazo de células beta pancreáticas (TRCBP).

9 Bibliografía

- [1] C. Mauli Agrawal, J.L. Ong, Mark R. Appleford, G. Mani, *Introduction to Biomaterials: Basic Theory with Engineering Applications*, Cambridge University Press, 2013.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781139035545>.
- [2] S. V. Bhat, *Biomaterials*, Springer, Dordrecht, 2002.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-010-0328-5>.
- [3] M. Gilbert, *Relation of Structure to Chemical Properties*, Brydson's *Plast. Mater.* Eighth Ed. (2017) 75–102. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35824-8.00005-0>.
- [4] F.W. Billmeyer, *Textbook of Polymer Science*, Wiley-Interscncei, 1984.
- [5] P. Flowers, K. Theopold, R. Langley, *Chemistry - 2e*, OpenStax, 2019.
- [6] S.E. Gad, *Polymers*, *Encycl. Toxicol.* Third Ed. (2014) 1045–1050.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00912-X>.
- [7] L. V. Korah, G. Anilkumar, S. Thomas, *Hydrogels, DNA, and RNA polypeptides for the preparation of biomaterials*, *Fundam. Biomater. Polym.* (2018) 85–104.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102194-1.00005-0>.
- [8] H.H. Lee, Y.W. Kim, J. Woo, H. Park, K. Hur, Z. Suo, J.Y. Sun, *Fast healing of ionic bonds in tough hydrogels under an acoustic excitation*, *Extrem. Mech. Lett.* 33 (2019) 100572.
<https://doi.org/10.1016/J.EML.2019.100572>.
- [9] C. Castillo-Blas, C. Montoro, A.E. Platero-Prats, P. Ares, P. Amo-Ochoa, J. Conesa, F. Zamora, *The role of defects in the properties of functional coordination polymers*, *Adv. Inorg. Chem.* 76 (2020) 73–119. <https://doi.org/10.1016/BS.ADIOCH.2020.03.002>.
- [10] N.F. Sunday, *Emerging Trends in Coordination Polymers and Metal-Organic Frameworks: Perspectives, Synthesis, Properties and Applications*, *Arch. Org. Inorg. Chem. Sci.* 1 (2018).
<https://doi.org/10.32474/AOICS.2018.01.000106>.
- [11] M.K. Egbo, *A fundamental review on composite materials and some of their applications in biomedical engineering*, *J. King Saud Univ. - Eng. Sci.* 33 (2021) 557–568.
<https://doi.org/10.1016/J.JKSUES.2020.07.007>.
- [12] J. Currey, *The structure and mechanical properties of bone*, *Bioceram. Their Clin. Appl.* (2008) 3–27. <https://doi.org/10.1533/9781845694227.1.3>.
- [13] A. Shrivastava, *Polymerization*, *Introd. to Plast. Eng.* (2018) 17–48.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39500-7.00002-2>.
- [14] G. Klaerner, R. Padmanabhan, *Multi-Step/Step-Wise Polymerization of Well-Defined Oligomers*, *Ref. Modul. Mater. Sci. Mater. Eng.* (2016). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.03768-1>.
- [15] V. V. Korshak, *Functionality of monomers and structure of polymers obtained by polycondensation*. *Review, Polym. Sci. U.S.S.R.* 24 (1982) 1783–1797.
[https://doi.org/10.1016/0032-3950\(82\)90132-0](https://doi.org/10.1016/0032-3950(82)90132-0).

- [16] H.J. Jang, E.Y. Jung, T. Parsons, H.S. Tae, C.S. Park, A Review of Plasma Synthesis Methods for Polymer Films and Nanoparticles under Atmospheric Pressure Conditions, *Polymers (Basel)*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/POLYM13142267>.
- [17] A. Michelmore, J.D. Whittle, J.W. Bradley, R.D. Short, Where physics meets chemistry: Thin film deposition from reactive plasmas, *Front. Chem. Sci. Eng.* 2016 104. 10 (2016) 441–458. <https://doi.org/10.1007/S11705-016-1598-7>.
- [18] J.A. Gan, C.C. Berndt, Plasma surface modification of metallic biomaterials, *Surf. Coat. Modif. Met. Biomater.* (2015) 103–157. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-303-4.00004-1>.
- [19] J. Carneiro de Oliveira, A. Airoudj, P. Kunemann, F. Bally-Le Gall, V. Roucoules, Mechanical properties of plasma polymer films: a review, *SN Appl. Sci.* 2021 36. 3 (2021) 1–15. <https://doi.org/10.1007/S42452-021-04655-9>.
- [20] S. Gonçalves, F. Dourado, L.R. Rodrigues, Overview on Cell-Biomaterial Interactions, *Adv. Polym. Med.* (2015) 91–128. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12478-0_4.
- [21] A. Carnicer-Lombarte, S.T. Chen, G.G. Malliaras, D.G. Barone, Foreign Body Reaction to Implanted Biomaterials and Its Impact in Nerve Neuroprosthetics, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9 (2021). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.622524>.
- [22] Y.A. Kadry, D.A. Calderwood, Chapter 22: Structural and signaling functions of integrins, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1862 (2020) 183206. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183206>.
- [23] E. Santos, G. Orive, R. M, J. Luis, Cell-Biomaterial Interaction: Strategies To Mimic The Extracellular Matrix, *On Biomimetics.* (2011). <https://doi.org/10.5772/21634>.
- [24] B. Yue, Biology of the extracellular matrix: An overview, *J. Glaucoma.* 23 (2014) S20–S23. <https://doi.org/10.1097/IJG.000000000000108>.
- [25] R.P. McEver, F.W. Luscinskas, Cell Adhesion, *Hematol. Basic Princ. Pract.* (2018) 127–134. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35762-3.00012-3>.
- [26] L. Pan, Y. Zhao, Z. Yuan, G. Qin, Research advances on structure and biological functions of integrins, *Springerplus.* 5 (2016). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2502-0>.
- [27] S. Israeli-Rosenberg, A.M. Manso, H. Okada, R.S. Ross, Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte, *Circ. Res.* 114 (2014) 572–586. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.301275>.
- [28] R.S. Ross, T.K. Borg, Integrins and the Myocardium, *Circ. Res.* 88 (2001) 1112–1119. <https://doi.org/10.1161/hh1101.091862>.
- [29] B.J. Tighe, A. Mann, Sulphonated biomaterials as glycosaminoglycan mimics in wound healing, in: *Adv. Wound Repair Ther.*, Elsevier Inc., 2011: pp. 321–357. <https://doi.org/10.1533/9780857093301.2.321>.
- [30] D.L. Kusindarta, H. Wihadmadyatami, The Role of Extracellular Matrix in Tissue Regeneration, in: *Tissue Regen.*, InTech, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75728>.
- [31] N.K. Karamanos, A.D. Theocharis, Z. Piperigkou, D. Manou, A. Passi, S.S. Skandalis, D.H.

- Vynios, V. Orian-Rousseau, S. Ricard-Blum, C.E.H. Schmelzer, L. Duca, M. Durbeej, N.A. Afratis, L. Troeberg, M. Franchi, V. Masola, M. Onisto, A guide to the composition and functions of the extracellular matrix, *FEBS J.* 288 (2021) 6850–6912. <https://doi.org/10.1111/febs.15776>.
- [32] J. Heino, The collagen family members as cell adhesion proteins, *Bioessays.* 29 (2007) 1001–1010. <https://doi.org/10.1002/BIES.20636>.
- [33] J. Ishihara, A. Ishihara, K. Fukunaga, K. Sasaki, M.J.V. White, P.S. Briquez, J.A. Hubbell, Laminin heparin-binding peptides bind to several growth factors and enhance diabetic wound healing, *Nat. Commun.* 2018 91. 9 (2018) 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04525-w>.
- [34] J.H. Kristensen, M.A. Karsdal, Elastin, *Biochem. Collagens, Laminins Elastin Struct. Funct. Biomarkers.* (2016) 197–201. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809847-9.00030-1>.
- [35] S. Campuzano, A.E. Pelling, Scaffolds for 3D Cell Culture and Cellular Agriculture Applications Derived From Non-animal Sources, *Front. Sustain. Food Syst.* 3 (2019). <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2019.00038>.
- [36] H.A. Declercq, T. Desmet, P. Dubrue, M.J. Cornelissen, The Role of Scaffold Architecture and Composition on the Bone Formation by Adipose-Derived Stem Cells, *Tissue Eng. Part A.* 20 (2014) 434. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEA.2013.0179>.
- [37] D. Sakthi Kumar, K. Nakamura, S. Nishiyama, S. Ishii, H. Noguchi, K. Kashiwagi, Y. Yoshida, Optical and electrical characterization of plasma polymerized pyrrole films, *J. Appl. Phys.* 93 (2003) 2705–2711. <https://doi.org/10.1063/1.1542692>.
- [38] I.N. Serratos, R. Olayo, C. Millán-Pacheco, J. Morales-Corona, J.O. Vicente-Escobar, A.M. Soto-Estrada, J.G. Córdoba-Herrera, O. Uribe, T. Gómez-Quintero, M.Á. Arroyo-Ornelas, R. Godínez-Fernández, Modeling integrin and plasma-polymerized pyrrole interactions: chemical diversity relevance for cell regeneration, *Sci. Rep.* 9 (2019) 7009. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43286-4>.
- [39] M.G. Flores-Sánchez, A.M. Raya-Rivera, D.R. Esquiliano-Rendon, P.G. Ontiveros-Nevarés, N.C. Islas-Arteaga, J. Morales-Corona, R. Olayo, Scaffolds of polylactic acid/hydroxyapatite coated by plasma with polypyrrole-iodine for the generation of neo-tissue–bone *in vivo* : Study in rabbit, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 67 (2018) 427–437. <https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1342249>.
- [40] N.C. Islas-Arteaga, A. Raya Rivera, D.R. Esquiliano Rendon, J. Morales-Corona, P.G. Ontiveros-Nevarés, M.G. Flores Sánchez, C. Mojica-Cardoso, R. Olayo, Electrospun scaffolds with surfaces modified by plasma for regeneration of articular cartilage tissue: a pilot study in rabbit, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1534109>.
- [41] E. Zuñiga-Aguilar, R. Olayo, O. Ramírez-Fernández, J. Morales, R. Godínez, Nerve cells culture from lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 25 (2014) 729–747. <https://doi.org/10.1080/09205063.2014.898124>.
- [42] I. Valiente-Alandi, A.E. Schafer, B.C. Blaxall, Extracellular matrix-mediated cellular

- communication in the heart, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 91 (2016) 228–237.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.01.011>.
- [43] M. Vasquez-Ortega, M. Ortega, J. Morales, M.G. Olayo, G.J. Cruz, R. Olayo, Core-shell polypyrrole nanoparticles obtained by atmospheric pressure plasma polymerization, *Polym. Int.* 63 (2014) 2023–2029. <https://doi.org/10.1002/pi.4756>.
- [44] A.P. Hopper, J.M. Dugan, A.A. Gill, O.J.L. Fox, P.W. May, J.W. Haycock, F. Claeysens, Amine functionalized nanodiamond promotes cellular adhesion, proliferation and neurite outgrowth, *Biomed. Mater.* 9 (2014). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/9/4/045009>.
- [45] P. Černochová, L. Blahová, J. Medalová, D. Nečas, M. Michlíček, P. Kaushik, J. Příbyl, J. Bartošíková, A. Manakhov, L. Bačáková, L. Zajíčková, Cell type specific adhesion to surfaces functionalised by amine plasma polymers, *Sci. Rep.* 10 (2020) 9357.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-65889-y>.
- [46] L. Martocq, T.E.L. Douglas, Amine-rich coatings to potentially promote cell adhesion, proliferation and differentiation, and reduce microbial colonization: Strategies for generation and characterization, *Coatings.* 11 (2021).
<https://doi.org/10.3390/COATINGS11080983>.
- [47] L. Alvarez Mejía, H. Salgado Ceballos, R. Olayo, G.. Cruz, M.. Olayo, A. Díaz Ruiz, C. Ríos5, R. Mondragón Lozano, A. Morales Guadarrama, S. Sánchez Torres, J. Morales, Effect of Pyrrole Implants Synthesized by Different Methods on Spinal Cord Injuries of Rats, *Rev. Mex. Ing. Biomédica.* 36 (2015) 7–21. <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-mexicana-de-ingenieria-biomedica/articulo/effect-of-pyrrole-implants-synthesized-by-different-methods-on-spinal-cord-injuries-of-rats> (accessed April 5, 2019).
- [48] O.E. Uribe Juárez, J.R. Godínez Fernández, R. Olayo Gonzáles, Interacción de nanopartículas de polipirrol sintetizadas por plasma con líneas celulares para aplicaciones biomédicas, Tesis, Universidad Autonoma Metropolitana, 2016.
<http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=17285&docs=UAMI17285.pdf>.
- [49] R. Sadeghbeigi, Chapter 15 - Emissions, 2020.
- [50] A. Florea, B. Feier, C. Cristea, In situ analysis based on molecularly imprinted polymer electrochemical sensors, *Compr. Anal. Chem.* 86 (2019) 193–234.
<https://doi.org/10.1016/BS.COAC.2019.05.005>.
- [51] J. Morales, M.G. Olayo, G.J. Cruz, R. Olayo, Synthesis by plasma and characterization of bilayer aniline-pyrrole thin films doped with iodine, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 40 (2002) 1850–1856. <https://doi.org/10.1002/POLB.10254>.
- [52] Gómez-Quintero, Arroyo-Ornela, López-Marín, Castaño-Meneses, G.-C. Acosta-Torres, Arenas-Arocena, Cytotoxicity of Polypyrrole and Polyaniline Matrixes for Biosensors, *Acta Sci. Med. Sci.* 3 (2019) 81–89.
- [53] A. Mirzaei, E. Saburi, S.E. Enderami, M. Barati Bagherabad, S.E. Enderami, M. Chokami, A. Shapouri Moghadam, R. Salarinia, A. Ardeshiryajimi, V. Mansouri, F. Soleimanifar, Synergistic effects of polyaniline and pulsed electromagnetic field to stem cells osteogenic differentiation on polyvinylidene fluoride scaffold, *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.*

47 (2019) 3058–3066. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1645154>.

- [54] K. Skopalová, K.A. Radaszkiewicz, V. Kašpárková, J. Stejskal, P. Bober, I. Junkar, M. Mozetič, Z. Capáková, M. Lehocký, M. Kašparová, J. Pacherník, P. Humpolíček, Modulation of Differentiation of Embryonic Stem Cells by Polypyrrole: The Impact on Neurogenesis, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 1–17. <https://doi.org/10.3390/IJMS22020501>.
- [55] K.J. Gilmore, M. Kita, Y. Han, A. Gelmi, M.J. Higgins, S.E. Moulton, G.M. Clark, R. Kapsa, G.G. Wallace, Skeletal muscle cell proliferation and differentiation on polypyrrole substrates doped with extracellular matrix components, *Biomaterials*. 30 (2009) 5292–5304. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.06.059>.
- [56] D.P. Bhattarai, S. Shrestha, B.K. Shrestha, C.H. Park, C.S. Kim, A controlled surface geometry of polyaniline doped titania nanotubes biointerface for accelerating MC3T3-E1 cells growth in bone tissue engineering, *Chem. Eng. J.* 350 (2018) 57–68. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2018.05.162>.
- [57] Y. Li, Z. Huang, X. Pu, X. Chen, G. Yin, Y. Wang, D. Miao, J. Fan, J. Mu, Polydopamine/carboxylic graphene oxide-composited polypyrrole films for promoting adhesion and alignment of Schwann cells, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 191 (2020) 110972. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2020.110972>.
- [58] N. Abdul Rahman, V. Feisst, M.E. Dickinson, J. Malmström, P.R. Dunbar, J. Travas-Sejdic, Functional polyaniline nanofibre mats for human adipose-derived stem cell proliferation and adhesion, *Mater. Chem. Phys.* 138 (2013) 333–341. <https://doi.org/10.1016/J.MATCHEMPHYS.2012.11.065>.
- [59] K. Mc Namara, H. Alzubaidi, J.K. Jackson, Cardiovascular disease as a leading cause of death: how are pharmacists getting involved?, *Integr. Pharm. Res. Pract.* Volume 8 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.2147/iprp.s133088>.
- [60] World Health Organization, The top 10 causes of death, (2021). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed March 15, 2021).
- [61] M. Tallawi, E. Rosellini, N. Barbani, M. Grazia Cascone, R. Raj, G. Saint-Pierre, A.R. Boccaccini, Strategies for the chemical and biological functionalization of scaffolds for cardiac tissue engineering: A review, *J. R. Soc. Interface*. 12 (2015). <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0254>.
- [62] A. Saxton, B. Bordoni, *Anatomy, Thorax, Cardiac Muscle*, StatPearls Publishing, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30570976> (accessed April 1, 2023).
- [63] M.J. Kocica, A.F. Corno, V. Lackovic, V.I. Kanjuh, The Helical Ventricular Myocardial Band of Torrent-Guasp, *Pediatr. Card. Surg. Annu.* 10 (2007) 52–60. <https://doi.org/10.1053/j.pcsu.2007.01.006>.
- [64] G.D. Buckberg, N.C. Nanda, C. Nguyen, M.J. Kocica, What is the heart? Anatomy, function, pathophysiology, and misconceptions, *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 5 (2018). <https://doi.org/10.3390/jcdd5020033>.
- [65] L.M. Miller, A. Gal, Cardiovascular System and Lymphatic Vessels, *Pathol. Basis Vet. Dis. Expert Consult.* (2017) 561-616.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35775-3.00010-2>.

- [66] B.S. Buetow, M.A. Laflamme, *Cardiovascular, Comp. Anat. Histol.* (2018) 163–189. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00010-5>.
- [67] R. Ripa, T. George, Y. Sattar, *Physiology, Cardiac Muscle*, StatPearls Publishing, 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34283436> (accessed April 1, 2023).
- [68] G.L.J. Galli, *DESIGN AND PHYSIOLOGY OF THE HEART | Cellular Ultrastructure of Cardiac Cells in Fishes*, in: *Encycl. Fish Physiol. From Genome to Environ. Vol. 1-3*, Elsevier, 2011: pp. 1006–1014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00242-2>.
- [69] R. Myklebust, H. Dalen, T.S. Saetersdal, A comparative study in the transmission electron microscope and scanning electron microscope of intracellular structures in sheep heart muscle cells, *J. Microsc.* 105 (1975) 57–65. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1975.tb04036.x>.
- [70] P.S. Azevedo, B.F. Polegato, M.F. Minicucci, S.A.R. Paiva, L.A.M. Zornoff, *Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment*, *Arq. Bras. Cardiol.* 106 (2016) 62–69. <https://doi.org/10.5935/abc.20160005>.
- [71] C. Dong, A. Ma, L. Shang, Nanoparticles for postinfarct ventricular remodeling, *Nanomedicine.* 13 (2018) 3037–3050. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0264>.
- [72] M. Madigan, R. Atoui, Therapeutic use of stem cells for myocardial infarction, *Bioengineering.* 5 (2018). <https://doi.org/10.3390/bioengineering5020028>.
- [73] X. Guan, W. Xu, H. Zhang, Q. Wang, J. Yu, R. Zhang, Y. Chen, Y. Xia, J. Wang, D. Wang, Transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial function and reverses ventricular remodeling in infarcted rat hearts, *Stem Cell Res. Ther.* 11 (2020) 73. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01602-0>.
- [74] Y.-W. Liu, B. Chen, X. Yang, J.A. Fugate, F.A. Kalucki, A. Futakuchi-Tsuchida, L. Couture, K.W. Vogel, C.A. Astley, A. Baldessari, J. Ogle, C.W. Don, Z.L. Steinberg, S.P. Seslar, S.A. Tuck, H. Tsuchida, A. V Naumova, S.K. Dupras, M.S. Lyu, J. Lee, D.W. Hailey, H. Reinecke, L. Pabon, B.H. Fryer, W.R. MacLellan, R.S. Thies, C.E. Murry, Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates, *Nat. Biotechnol.* 36 (2018) 597–605. <https://doi.org/10.1038/NBT.4162>.
- [75] P. Menasché, V. Vanneaux, A. Hagège, A. Bel, B. Cholley, A. Parouchev, I. Cacciapuoti, R. Al-Daccak, N. Benhamouda, H. Blons, O. Agbulut, L. Tosca, J.-H. Trouvin, J.-R. Fabreguettes, V. Bellamy, D. Charron, E. Tartour, G. Tachdjian, M. Desnos, J. Larghero, Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction, *J. Am. Coll. Cardiol.* 71 (2018) 429–438. <https://doi.org/10.1016/J.JACC.2017.11.047>.
- [76] K.R. Chien, J. Frisén, R. Fritsche-Danielson, D.A. Melton, C.E. Murry, I.L. Weissman, Regenerating the field of cardiovascular cell therapy, *Nat. Biotechnol.* 37 (2019) 232–237. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0042-1>.
- [77] F. Nippert, R. Schreckenberger, K.D. Schlüter, Isolation and cultivation of adult rat cardiomyocytes, *J. Vis. Exp.* 2017 (2017). <https://doi.org/10.3791/56634>.
- [78] P. Haftbaradaran Esfahani, Z. ElBeck, S. Sagasser, X. Li, M.B. Hossain, H.A. Talukdar, R. Sandberg, R. Knöll, Cell shape determines gene expression: cardiomyocyte morphotypic

transcriptomes, *Basic Res. Cardiol.* 115 (2020) 7. <https://doi.org/10.1007/s00395-019-0765-7>.

- [79] W.J. Richardson, S.A. Clarke, T. Alexander Quinn, J.W. Holmes, Physiological Implications of Myocardial Scar Structure, *Compr. Physiol.* 5 (2015) 1877. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C140067>.
- [80] M.F. Tenreiro, A.F. Louro, P.M. Alves, M. Serra, Next generation of heart regenerative therapies: progress and promise of cardiac tissue engineering, *Npj Regen. Med.* 2021 61. 6 (2021) 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00140-4>.
- [81] Y. Jang, Y. Park, J. Kim, Engineering Biomaterials to Guide Heart Cells for Matured Cardiac Tissue, *Coatings.* 10 (2020) 925. <https://doi.org/10.3390/coatings10100925>.
- [82] P. Deb, A.B. Deoghare, A. Borah, E. Barua, S. Das Lala, Scaffold Development Using Biomaterials: A Review, in: *Mater. Today Proc.*, Elsevier Ltd, 2018: pp. 12909–12919. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.02.276>.
- [83] K. Fountoulaki, N. Dagues, Cellular Communications in the Heart, *Card. Fail. Rev.* 1 (2015) 64. <https://doi.org/10.15420/cfr.2015.1.2.64>.
- [84] M.K. Stephenson, S. Lenihan, R. Covarrubias, R.M. Huttinger, R.J. Gumina, D.B. Sawyer, C.L. Galindo, Scanning electron microscopy of macerated tissue to visualize the extracellular matrix, *J. Vis. Exp.* 2016 (2016). <https://doi.org/10.3791/54005>.
- [85] J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y.S. Chan, A. Dufresne, M.K. Danquah, Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations, *Beilstein J. Nanotechnol.* 9 (2018) 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>.
- [86] M. Fathi-Achachelouei, H. Knopf-Marques, C.E. Ribeiro da Silva, J. Barthès, E. Bat, A. Tezcaner, N.E. Vrana, Use of Nanoparticles in Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7 (2019) 113. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00113>.
- [87] E. Bible, D.Y.S. Chau, M.R. Alexander, J. Price, K.M. Shakesheff, M. Modo, Attachment of stem cells to scaffold particles for intra-cerebral transplantation, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 1440–1453. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.156>.
- [88] World Health Organization, Global Report on Diabetes, 978 (2016) 27. [who.int/publications/i/item/9789241565257](https://www.who.int/publications/i/item/9789241565257) (accessed February 12, 2022).
- [89] V. Vaithilingam, S. Bal, B.E. Tuch, Encapsulated Islet Transplantation: Where Do We Stand?, *Rev. Diabet. Stud.* 14 (2017) 51. <https://doi.org/10.1900/RDS.2017.14.51>.
- [90] Y. Hussaina, H. Khan, Immunosuppressive Drugs, *WHO Drug Inf.* 12 (2022) 726–740. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00068-9>.
- [91] A.M.J. Shapiro, M. Pokrywczynska, C. Ricordi, Clinical pancreatic islet transplantation, *Nat. Rev. Endocrinol.* 13 (2017) 268–277. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.178>.
- [92] Q. Zhang, C. Gonelle-Gispert, Y. Li, Z. Geng, S. Gerber-Lemaire, Y. Wang, L. Buhler, Islet Encapsulation: New Developments for the Treatment of Type 1 Diabetes, *Front. Immunol.* 0 (2022) 1540. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.869984>.

- [93] T. Desai, L.D. Shea, Advances in islet encapsulation technologies, *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (2017) 338–350. <https://doi.org/10.1038/NRD.2016.232>.
- [94] H. Komatsu, F. Kandeel, Y. Mullen, Impact of Oxygen on Pancreatic Islet Survival, *Pancreas.* 47 (2018) 533–543. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001050>.
- [95] U. Johansson, M. Ria, K. Åvall, N.D. Shalaly, S. V. Zaitsev, P.O. Berggren, M. Hedhammar, Pancreatic Islet Survival and Engraftment Is Promoted by Culture on Functionalized Spider Silk Matrices, *PLoS One.* 10 (2015). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0130169>.
- [96] L. Nalbach, L.P. Roma, B.M. Schmitt, V. Becker, C. Körbel, S. Wrublewsky, M. Pack, T. Später, W. Metzger, M.M. Menger, F.S. Frueh, C. Götz, H. Lin, J.E. Manning Fox, P.E. MacDonald, M.D. Menger, M.W. Laschke, E. Ampofo, Improvement of islet transplantation by the fusion of islet cells with functional blood vessels, *EMBO Mol. Med.* 13 (2021). <https://doi.org/10.15252/EMMM.202012616>.
- [97] A.E. Vlahos, S.M. Kinney, B.R. Kingston, S. Keshavjee, S.Y. Won, A. Martyts, W.W.C. Chan, M. V. Sefton, Endothelialized collagen based pseudo-islets enables tuneable subcutaneous diabetes therapy, *Biomaterials.* 232 (2020). <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.119710>.
- [98] R. Lehmann, R.A. Zuellig, P. Kugelmeier, P.B. Baenninger, W. Moritz, A. Perren, P.A. Clavien, M. Weber, G.A. Spinas, Superiority of small islets in human islet transplantation, *Diabetes.* 56 (2007) 594–603. <https://doi.org/10.2337/DB06-0779>.
- [99] T.M. Suszynski, J.J. Wilhelm, D.M. Radosevich, A.N. Balamurugan, D.E.R. Sutherland, G.J. Beilman, T.B. Dunn, S. Chinnakotla, T.L. Pruett, S.M. Vickers, B.J. Hering, K.K. Papas, M.D. Bellin, Islet Size Index as a Predictor of Outcomes in Clinical Islet Autotransplantation, *Transplantation.* 97 (2014) 1286. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000441873.35383.1E>.
- [100] A.R. Pepper, C.P. Hasilo, C.W.J. Melling, D.M. Mazzuca, G. Vilck, G. Zou, D.J.G. White, The islet size to oxygen consumption ratio reliably predicts reversal of diabetes posttransplant, *Cell Transplant.* 21 (2012) 2797–2804. <https://doi.org/10.3727/096368912X653273>.
- [101] C.O. Medina, N. Nagy, P.L. Bollyky, Extracellular matrix and the maintenance and loss of peripheral immune tolerance in autoimmune insulinitis, *Curr. Opin. Immunol.* 55 (2018) 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.09.006>.
- [102] D. Ribeiro, A.J. Kvist, P. Wittung-Stafshede, R. Hicks, A. Forslöv, 3D-Models of Insulin-Producing β -Cells: from Primary Islet Cells to Stem Cell-Derived Islets, *Stem Cell Rev. Reports.* 14 (2018) 177–188. <https://doi.org/10.1007/s12015-017-9783-8>.
- [103] O. Hoang Do, P. Thorn, Insulin secretion from beta cells within intact islets: Location matters, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 42 (2015) 406–414. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12368>.
- [104] M.A. Miranda, J.F. Macias-Velasco, H.A. Lawson, Pancreatic β -cell heterogeneity in health and diabetes: Classes, sources, and subtypes, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 320 (2021) E716–E731. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00649.2020>.
- [105] O. Cabrera, D.M. Berman, N.S. Kenyon, C. Ricordi, P.O. Berggren, A. Caicedo, The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 2334–2339. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510790103>.

- [106] S. Bonner-Weir, B.A. Sullivan, G.C. Weir, Human Islet Morphology Revisited: Human and Rodent Islets Are Not So Different After All, *J. Histochem. Cytochem.* 63 (2015) 604–612. https://doi.org/10.1369/0022155415570969/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1369_0022155415570969-FIG2.JPEG.
- [107] R.K.P. Benninger, V. Kravets, The physiological role of β -cell heterogeneity in pancreatic islet function, *Nat. Rev. Endocrinol.* 18 (2022) 9–22. <https://doi.org/10.1038/S41574-021-00568-0>.
- [108] K. Dhatriya, L. Corsino, G.E. Umpierrez, Management of Diabetes and Hyperglycemia in Hospitalized Patients, *Endotext.* (2020). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279093/> (accessed March 26, 2023).
- [109] J.C. Henquin, Paracrine and autocrine control of insulin secretion in human islets: evidence and pending questions, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 320 (2021) E78–E86. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00485.2020>.
- [110] L. Sakhneny, A. Epshtein, L. Landsman, Pericytes contribute to the islet basement membranes to promote beta-cell gene expression, *Sci. Rep.* 11 (2021) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81774-8>.
- [111] C.-C. Lin, K.S. Anseth, Cell-cell communication mimicry with poly(ethylene glycol) hydrogels for enhancing β -cell function, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (2011) 6380–6385. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014026108>.
- [112] W. Li, S. Lee, M. Ma, S.M. Kim, P. Guye, J.R. Pancoast, D.G. Anderson, R. Weiss, R.T. Lee, P.T. Hammond, Microbead-based biomimetic synthetic neighbors enhance survival and function of rat pancreatic β -cells, *Sci. Rep.* 3 (2013) 2863. <https://doi.org/10.1038/srep02863>.
- [113] M. Velasco, C. Larqué, G. Gutiérrez-Reyes, R. Arredondo, C. Sanchez-Soto, M. Hiriart, Metabolic syndrome induces changes in K_{ATP} -channels and calcium currents in pancreatic β -cells, *Islets.* 4 (2012) 302–311. <https://doi.org/10.4161/isl.21374>.
- [114] M. McFarquhar, Testable Hypotheses for Unbalanced Neuroimaging Data, *Front. Neurosci.* 10 (2016). <https://doi.org/10.3389/FNINS.2016.00270>.
- [115] S. Guo, S. Zhong, A. Zhang, Privacy-preserving Kruskal-Wallis test, *Comput. Methods Programs Biomed.* 112 (2013) 135–145. <https://doi.org/10.1016/J.CMPB.2013.05.023>.
- [116] L.M. Gómez, M.G. Olayo, G.J. Cruz, O.G. López-Gracia, M. González-Torres, C. de Jesús, F. González-Salgado, Effect of energy in the size of pyrrole-derived particles synthesized by plasma | Request PDF, *Superf. y Vacío.* 25 (2012) 88–91.
- [117] S. Kim, W.-K. Oh, Y.S. Jeong, J.-Y. Hong, B.-R. Cho, J.-S. Hahn, J. Jang, Cytotoxicity of, and innate immune response to, size-controlled polypyrrole nanoparticles in mammalian cells, *Biomaterials.* 32 (2011) 2342–2350. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.11.080>.
- [118] L. Kou, J. Sun, Y. Zhai, Z. He, The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design, *Asian J. Pharm. Sci.* 8 (2013) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.001>.
- [119] E.J. Alvarado Muños, J. Morales Corona, E. Orozco Barrios Carlos, Estudio del efecto de

polímeros aminados sintetizados por plasma sobre la diferenciación neuronal en un modelo in vitro, Tesis, Universidad Autonoma Metropolitana, 2018.
http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/am/ver_texto.php?recno=122621&documento=UAM II122621.pdf.

- [120] G.J. Cruz, M.G. Olayo, O.G. López, L.M. Gómez, J. Morales, R. Olayo, Nanospherical particles of polypyrrole synthesized and doped by plasma, *Polymer (Guildf)*. 51 (2010) 4314–4318. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2010.07.024>.
- [121] C.S. Park, E.Y. Jung, D.H. Kim, D.Y. Kim, H.K. Lee, B.J. Shin, D.H. Lee, H.S. Tae, Atmospheric Pressure Plasma Polymerization Synthesis and Characterization of Polyaniline Films Doped with and without Iodine, *Mater. (Basel, Switzerland)*. 10 (2017). <https://doi.org/10.3390/MA10111272>.
- [122] G.J. Cruz, J. Morales, M.M. Castillo-Ortega, R. Olayo, Synthesis of polyaniline films by plasma polymerization, *Synth. Met.* 88 (1997) 213–218. [https://doi.org/10.1016/S0379-6779\(97\)03853-8](https://doi.org/10.1016/S0379-6779(97)03853-8).
- [123] G.B.V.S. Lakshmi, A. Dhillon, A.M. Siddiqui, M. Zulfequar, D.K. Avasthi, RF-plasma polymerization and characterization of polyaniline, *Eur. Polym. J.* 45 (2009) 2873–2877. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2009.06.027>.
- [124] H.R. Humud, T.K. Aubais, Nanostructured polyaniline thin films prepared by plasma polymerization at atmospheric pressure, *Netjorunals*. 1 (2013) 110–122.
- [125] M. V. Egorova, S.A. Afanas'ev, S. V. Popov, A simple method for isolation of cardiomyocytes from adult rat heart, *Bull. Exp. Biol. Med.* 140 (2005) 370–373. <https://doi.org/10.1007/s10517-005-0492-y>.
- [126] C. Pinali, H. Bennett, J.B. Davenport, A.W. Trafford, A. Kitmitto, Three-dimensional reconstruction of cardiac sarcoplasmic reticulum reveals a continuous network linking transverse-tubules: This organization is perturbed in heart failure, *Circ. Res.* 113 (2013) 1219–1230. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301348>.
- [127] C. Orchard, F. Brette, t-tubules and sarcoplasmic reticulum function in cardiac ventricular myocytes, *Cardiovasc. Res.* 77 (2008) 237–244. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm002>.
- [128] A. Khadangi, E. Hanssen, V. Rajagopal, Automated segmentation of cardiomyocyte Z-disks from high-throughput scanning electron microscopy data, *BMC Med. Inform. Decis. Mak.* 19 (2019) 272. <https://doi.org/10.1186/s12911-019-0962-1>.
- [129] J.M. Messerli, M.E. Eppenberger-Eberhardt, B.M. Rutishauser, P. Schwarb, P. von Arx, S. Koch-Schneidemann, H.M. Eppenberger, J.C. Perriard, Remodelling of cardiomyocyte cytoarchitecture visualized by three-dimensional (3D) confocal microscopy, *Histochemistry*. 100 (1993) 193–202. <https://doi.org/10.1007/BF00269092>.
- [130] A. Volz, H.M. Piper, B. Siegmund, P. Schwartz, Longevity of adult ventricular rat heart muscle cells in serum-free primary culture, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 23 (1991) 161–173. [https://doi.org/10.1016/0022-2828\(91\)90103-S](https://doi.org/10.1016/0022-2828(91)90103-S).
- [131] W.E. Louch, K.A. Sheehan, B.M. Wolska, Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51 (2011) 288–298. <https://doi.org/10.1016/J.YJMCC.2011.06.012>.

- [132] K.C. Woulfe, C. Ferrara, J.M. Pioner, J.H. Mahaffey, R. Coppini, B. Scellini, C. Ferrantini, N. Piroddi, C. Tesi, C. Poggesi, M. Jeong, A Novel Method of Isolating Myofibrils From Primary Cardiomyocyte Culture Suitable for Myofibril Mechanical Study, *Front. Cardiovasc. Med.* 6 (2019). <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00012>.
- [133] X. Tian, M. Gao, A. Li, B. Liu, W. Jiang, Y. Qin, G. Gong, Protocol for Isolation of Viable Adult Rat Cardiomyocytes with High Yield, *STAR Protoc.* 1 (2020) 100045. <https://doi.org/10.1016/J.XPRO.2020.100045>.
- [134] M.A. Fernandez-Teran, J.M. Hurle, Myocardial fiber architecture of the human heart ventricles, *Anat. Rec.* 204 (1982) 137–147. <https://doi.org/10.1002/ar.1092040207>.
- [135] D.A. Pijnappels, M.J. Schaliij, A.A. Ramkisoensing, J. Van Tuyn, A.A.F. De Vries, A. Van Der Laarse, D.L. Ypey, D.E. Atsma, Forced alignment of mesenchymal stem cells undergoing cardiomyogenic differentiation affects functional integration with cardiomyocyte cultures, *Circ. Res.* 103 (2008) 167–176. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.176131>.
- [136] P. Humpolíček, V. Kašpárková, J. Pacherník, J. Stejskal, P. Bober, Z. Capáková, K.A. Radaszkiewicz, I. Junkar, M. Lehocký, The biocompatibility of polyaniline and polypyrrole: A comparative study of their cytotoxicity, embryotoxicity and impurity profile, *Mater. Sci. Eng. C.* 91 (2018) 303–310. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2018.05.037>.
- [137] Z. Capáková, K.A. Radaszkiewicz, U. Acharya, T.H. Truong, J. Pacherník, P. Bober, V. Kašpárková, J. Stejskal, J. Pflieger, M. Lehocký, P. Humpolíček, The biocompatibility of polyaniline and polypyrrole 2: Doping with organic phosphonates, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 113 (2020). <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2020.110986>.
- [138] Y. Eitan, U. Sarig, N. Dahan, M. MacHluf, Acellular cardiac extracellular matrix as a scaffold for tissue engineering: In vitro cell support, remodeling, and biocompatibility, *Tissue Eng. - Part C Methods.* 16 (2010) 671–683. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0111>.
- [139] I. Perea-Gil, J.J. Uriarte, C. Prat-Vidal, C. Gálvez-Montón, S. Roura, A. Lluçà-Valldeperas, C. Soler-Botija, R. Farré, D. Navajas, A. Bayes-Genis, In vitro comparative study of two decellularization protocols in search of an optimal myocardial scaffold for recellularization, *Am. J. Transl. Res.* 7 (2015) 558–573. [/pmc/articles/PMC4448195/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34448195/) (accessed September 21, 2020).
- [140] C.O. Heras-Bautista, N. Mikhael, J. Lam, V. Shinde, A. Katsen-Globa, S. Dieluweit, M. Molcanyi, V. Uvarov, P. Jütten, R.G.A. Sahito, F. Mederos-Henry, A. Piechot, K. Brockmeier, J. Hescheler, A. Sachinidis, K. Pfannkuche, Cardiomyocytes facing fibrotic conditions re-express extracellular matrix transcripts, *Acta Biomater.* 89 (2019) 180–192. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.03.017>.
- [141] P. Menasché, Cardiac cell therapy: Current status, challenges and perspectives, *Arch. Cardiovasc. Dis.* 113 (2020) 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2020.01.002>.
- [142] A. Leitolis, A.W. Robert, I.T. Pereira, A. Correa, M.A. Stimamiglio, Cardiomyogenesis Modeling Using Pluripotent Stem Cells: The Role of Microenvironmental Signaling, *Front. Cell Dev. Biol.* 7 (2019). <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00164>.
- [143] G. Cavallari, R.A. Zuellig, R. Lehmann, M. Weber, W. Moritz, Rat Pancreatic Islet Size Standardization by the “Hanging Drop” Technique, *Transplant. Proc.* 39 (2007) 2018–2020.

<https://doi.org/10.1016/J.TRANSPROCEED.2007.05.016>.

- [144] J.D. Carter, S.B. Dula, K.L. Corbin, R. Wu, C.S. Nunemaker, A Practical Guide to Rodent Islet Isolation and Assessment, *Biol. Proced. Online*. 11 (2009) 3. <https://doi.org/10.1007/S12575-009-9021-0>.
- [145] H. Lee, F. Engin, Preparing Highly Viable Single-Cell Suspensions from Mouse Pancreatic Islets for Single-Cell RNA Sequencing, *STAR Protoc*. 1 (2020). <https://doi.org/10.1016/J.XPRO.2020.100144>.
- [146] A.U. Ernst, L.H. Wang, M. Ma, Islet encapsulation, *J. Mater. Chem. B*. 6 (2018) 6705–6722. <https://doi.org/10.1039/C8TB02020E>.
- [147] A. Mooranian, M. Jones, C.M. Ionescu, D. Walker, S.R. Wagle, B. Kovacevic, J. Chester, T. Foster, E. Johnston, J. Kuthubutheen, D. Brown, M. Mikov, H. Al-Salami, Artificial Cell Encapsulation for Biomaterials and Tissue Bio-Nanoengineering: History, Achievements, Limitations, and Future Work for Potential Clinical Applications and Transplantation, *J. Funct. Biomater*. 12 (2021). <https://doi.org/10.3390/JFB12040068>.
- [148] S. Toda, A. Fattah, K. Asawa, N. Nakamura, K.N. Ekdahl, B. Nilsson, Y. Teramura, Optimization of Islet Microencapsulation with Thin Polymer Membranes for Long-Term Stability, *Micromachines*. 10 (2019). <https://doi.org/10.3390/M10110755>.
- [149] K. Fehsel, V. Kolb-Bachofen, K.D. Kröncke, Necrosis Is the Predominant Type of Islet Cell Death During Development of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in BB Rats, *Lab. Investig.* 2003 834. 83 (2003) 549–559. <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000063927.68605.ff>.
- [150] H. Komatsu, C. Cook, C.-H. Wang, L. Medrano, H. Lin, F. Kandeel, Y.-C. Tai, Y. Mullen, Oxygen environment and islet size are the primary limiting factors of isolated pancreatic islet survival, (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183780>.
- [151] M.L. Coleman, E.A. Sahai, M. Yeo, M. Bosch, A. Dewar, M.F. Olson, Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I, *Nat. Cell Biol.* 2001 34. 3 (2001) 339–345. <https://doi.org/10.1038/35070009>.
- [152] F. Ris, E. Hammar, D. Bosco, C. Pilloud, K. Maedler, M. Donath, J. Oberholzer, E. Zeender, P. Morel, D. Rouiller, P. Halban, Impact of integrin-matrix matching and inhibition of apoptosis on the survival of purified human beta-cells in vitro, *Diabetologia*. 45 (2002) 841–850. <https://doi.org/10.1007/S00125-002-0840-7>.
- [153] W. Stillwell, *An Introduction to Biological Membranes: Composition, Structure and Function: Second Edition*, Elsevier Inc., 2016. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-06226-8>.
- [154] E. Straface, M. Falchi, P.U. Giacomoni, W. Malorni, Cytotoxicity and morphological endpoints of exposure to UV: cultured cells as a model system, *Compr. Ser. Photosciences*. 3 (2001) 321–336. [https://doi.org/10.1016/S1568-461X\(01\)80051-X](https://doi.org/10.1016/S1568-461X(01)80051-X).
- [155] A. Anadón, V. Castellano, M.R. Martínez-Larrañaga, *Biomarkers in drug safety evaluation*, Elsevier Inc., 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00055-5>.
- [156] L.A. Bosworth, S. Schüler, R. Lennon, Cell culture systems for kidney research, *Electrospinning Tissue Regen.* (2011) 343–358.

<https://doi.org/10.1533/9780857092915.3.343>.

- [157] L.A. Levin, D.M. Albert, Ocular Disease: Mechanisms and management, *Ocul. Dis. Mech. Manag.* (2010). <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2983-7.X0001-0>.
- [158] P. Vajkoczy, A.M. Olofsson, H.A. Lehr, R. Leiderer, F. Hammersen, K.E. Arfors, M.D. Menger, Histogenesis and ultrastructure of pancreatic islet graft microvasculature. Evidence for graft revascularization by endothelial cells of host origin., *Am. J. Pathol.* 146 (1995) 1397. [/pmc/articles/PMC1870898/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1870898/) (accessed March 28, 2022).
- [159] M.D. Menger, S. Jaeger, P. Walter, G. Feifel, F. Hammersen, K. Messmer, Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans, *Diabetes.* 38 Suppl 1 (1989) 199–201. <https://doi.org/10.2337/DIAB.38.1.S199>.
- [160] A. Sterkers, T. Hubert, V. Gmyr, F. Torres, G. Baud, N. Delalleau, M.C. Vantyghem, J. Kerr-Conte, R. Caiazzo, F. Pattou, Islet survival and function following intramuscular autotransplantation in the minipig, *Am. J. Transplant.* 13 (2013) 891–898. <https://doi.org/10.1111/AJT.12136>.
- [161] M. Velasco, C. Larqué, C.M. Díaz-García, C. Sanchez-Soto, M. Hiriart, Rat Pancreatic Beta-Cell Culture, *Methods Mol. Biol.* 1727 (2018) 261–273. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6_20.



Estudio sobre la interacción de nanoparticulas polimerizadas por plasma con sistemas celulares.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 22 del mes de junio del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA
DR. JOSE CAMPOS TERAN
DR. CARLOS ALFONSO LARQUE VELAZQUEZ
DRA. GISELA GUTIERREZ IGLESIAS
DR. RAMON GONZALEZ CAMARENA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:


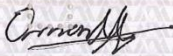
DOCTOR EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

DE: OMAR EDUARDO URIBE JUAREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

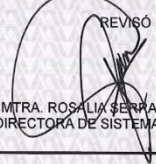
Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

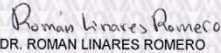
OMAR EDUARDO URIBE JUAREZ
ALUMNO

REVISO




MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI



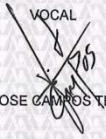
DR. ROMAN LINARES ROMERO

PRESIDENTE



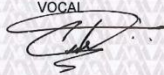
DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA

VOCAL



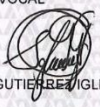
DR. JOSE CAMPOS TERAN

VOCAL



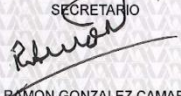
DR. CARLOS ALFONSO LARQUE VELAZQUEZ

VOCAL



DRA. GISELA GUTIERREZ IGLESIAS

SECRETARIO



DR. RAMON GONZALEZ CAMARENA