



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00028

Matrícula: 210383347

EFFECTO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED MULTIPLE SOBRE LAS SEÑALES BIOELECTRICAS DE NEURONAS DE HELIX ASPERSA

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 23 del mes de noviembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JUAN MORALES CORONA
- DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ
- DRA. ELIA MARTHA PEREZ ARMENDARIZ
- DR. JAVIER VARGAS SANCHEZ
- DRA. ANABEL JIMENEZ ANGUIANO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, 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: JUAN BERNAL MARTINEZ

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.



JUAN BERNAL MARTINEZ
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTE

DR. JUAN MORALES CORONA

VOCAL

DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ

VOCAL

DRA. ELIA MARTHA PEREZ ARMENDARIZ

VOCAL

DR. JAVIER VARGAS SANCHEZ

SECRETARIA

DRA. ANABEL JIMENEZ ANGUIANO



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Departamento de Ingeniería Eléctrica

**“Efecto de nanotubos de carbono de pared múltiple
sobre las señales bioeléctricas de neuronas de *Helix aspersa*”**

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias en Ingeniería Biomédica

presenta

M. en C. Juan Bernal Martínez

Asesores de tesis: Dr. José Rafael Godínez Fernández
Dr. Alfredo Aguilar Elguezabal

Jurado calificador:

Presidente

Dr. Juan Morales Corona

Secretario

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Vocales

Dra. Elia Martha Pérez Armendáriz

Dr. Javier Vargas Sánchez

Dr. José Rafael Godínez Fernández

Ciudad de México, 23 de noviembre de 2017

CONTENIDO:

	Pág.
i) Resumen.....	5
ii) Agradecimientos.....	11
iii) Lista de abreviaturas.....	13
iv) Lista de tablas.....	16
v) Lista de figuras.....	17
I. Introducción general.....	23
I.1 Propiedades morfofuncionales de las neuronas.....	23
I.2 Tipos de señales bioeléctricas en neuronas.....	23
I.3 Potencial de membrana y potencial de acción.....	24
I.4 Sinapsis química y sinapsis eléctrica.....	25
I.5 Agonistas y antagonistas de receptores membranales en sinapsis química.....	27
I.6 Tipos de agonistas y antagonistas de receptores muscarínico, dopaminérgico y glutamatérgicos en neuronas.....	28
I.7 Canales iónicos.....	29
I.8 Estudio de las propiedades eléctricas de las neuronas.....	30
I.9 Registro electrofisiológico intracelular.....	31
II Antecedentes.....	32
II.1 La nanotecnología y el desarrollo de nanomateriales de carbono.....	32
II.2 Clasificación de nanomateriales.....	32
II.3 Generalidades sobre nanotubos de carbono.....	33
II.4 Métodos de preparación de nanotubos de carbono.....	35
II.5 Funcionalización de nanotubos de carbono.....	35
II.6 Usos y aplicaciones biomédicas de los nanotubos de carbono.....	37
II.7 Nanotubos de carbono como conductores eléctricos.....	39
II.8 Nanotubos de carbono como moduladores de canales iónicos en células excitables.....	39

III	Justificación	41
IV	Hipótesis	42
V	Objetivos del proyecto	42
V.1	Objetivos generales.....	42
V.2	Objetivos específicos.....	42
VI	Material y Métodos	43
VI.1	Preparación biológica.....	43
VI.2	Dispositivo y arreglo experimental usado en el desarrollo de experimentos electrofisiológicos.....	46
VI.3	Microelectrodos de registro intracelular y electrodos de referencia.....	50
VI.4	Cámara de registro y sistema de perfusión.....	52
VI.5	Evaluación del sistema de registro y de las conexiones eléctricas en experimentos de registro intracelular.....	54
VI.6	Reactivos y soluciones experimentales.....	55
VI.7	Nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) usados en este proyecto.....	57
VI.8	Caracterización ultraestructural de NTCPM.....	60
VI.9.	Medición de las propiedades eléctricas de los NTCPM depositados en distintos materiales.....	69
VI.10	Estimulación de los NTCPM con irradiación láser.....	71
VII	Resultados Experimentales y Discusión	72
VII.1	Evaluación de distintos compuestos químicos como dispersantes de NTCPM.....	72
VII.2	Propiedades ultraestructurales y distribución topográfica de los NTCPM depositados en distintos materiales.....	75
VII.3	Propiedades ultraestructurales y distribución topográfica de NTCPM depositados sobre las neuronas del ganglio cerebral de <i>Helix aspersa</i> ...	85
VII.4	Efecto de NTCPM sobre las propiedades eléctricas de neuronas del ganglio cerebral de <i>Helix aspersa</i>	97
VII.5	Caracterización electrofisiológica y farmacológica del receptor colinérgico muscarínico presente en la neurona 1F de <i>Helix aspersa</i>	108

VII.6	Efecto de los NTCPM sobre la despolarización de membrana inducida por carbacol en la neurona 1F de <i>Helix aspersa</i>	114
VII.7	Efecto de los NTCPM sobre la despolarización de membrana inducida por L-glutamato en la neurona 1F de <i>Helix aspersa</i>	116
VII.8	Efecto de los NTCPM sobre la hiperpolarización de membrana inducida por agonistas dopaminérgicos en neurona 1F de <i>Helix aspersa</i>	120
VII.9	Medición de la resistencia eléctrica de los NTCPM y otros materiales electroconductores.....	128
VII.10	Uso de electrodos hechos a base NTCPM depositados en filtros de PVDF para registro de electrocardiograma en humanos.....	134
VII.11	La resistencia eléctrica de los NTCPM es modulada por la Irradiación del láser cercano al infrarrojo (nIR-láser).....	137
VIII	Conclusiones y perspectivas	142
IX	Bibliografía	144
X	Anexos	151
X.1.	Trabajos publicados como producto de esta tesis.....	151

i) Resumen.

i-1) Antecedentes y justificación.

Los nanotubos de carbono (NTC) son materiales desarrollados por la nanotecnología. Los NTC tienen la característica de poder adquirir y transmitir señales bioeléctricas debido a sus dimensiones nanométricas, a su alta capacidad de conducción eléctrica y a su capacidad de adherirse a las membranas celulares. Se han usado distintos nanotubos de carbono de pared simple (NTCPS) y nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) como andamios o “scaffolds” para cultivo de células nerviosas y se han reportado resultados controversiales en cuanto a su toxicidad, biocompatibilidad celular y crecimiento neuronal. No está claro si los NTC tienen un efecto bloqueante sobre los canales iónicos que subyacen a las señales bioeléctricas neuronales, tales como potenciales de acción y potenciales sinápticos. En particular no se ha demostrado ni evaluado la posible toxicidad de los NTCPM sobre los canales iónicos dependientes de voltaje (canales de calcio y canales de potasio) ni sobre los canales iónicos dependientes de agonista (canales acoplados al receptor de L-glutamato, acetilcolina y dopamina). Más aún, no se ha demostrado si los NTCPM pueden conectar eléctricamente a dos o más neuronas entre sí.

i-2) Objetivos.

- a).** Estudiar las propiedades ultraestructurales de los NTCPM dispersos en soluciones acuosas y depositados sobre distintos materiales incluyendo los depositados sobre las neuronas del ganglio del caracol de jardín *Helix aspersa*.
- b).** Estudiar las propiedades eléctricas de los NTCPM depositados sobre distintos materiales.
- c).** Estudiar los posibles efectos citotóxicos de los NTCPM sobre las señales eléctricas de las neuronas del caracol de jardín *Helix aspersa*. Específicamente, estudiar si los NTCPM bloquean o modifican la permeabilidad de canales iónicos dependientes del voltaje (canal de calcio y canal de potasio que dependen del calcio) y su efecto sobre canales iónicos dependientes de agonista químico o neurotransmisores (acetilcolina, dopamina y L-glutamato), que subyacen a los potenciales de acción y a los potenciales sinápticos de las neuronas de *Helix aspersa*.

i-3) Material y métodos.

Nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) usados en este proyecto.

Los NTCPM fueron sintetizados por el método de pirólisis de aspersión y fueron funcionalizados con soluciones ácidas de ácido nítrico - ácido sulfúrico; fueron dispersados en soluciones acuosas: agua desionizada y solución Ringer de caracol, usando polivinilpirrolidona (PVP) como agente dispersante. Los NTCPM ya dispersados en PVP fueron sometidos a ultrasonido y con ello se aseguró la homogeneidad de la dispersión.

Propiedades ultraestructurales de NTCPM.

Los NTCPM dispersados en soluciones acuosas fueron colocados sobre distintos materiales: papel bond, vidrio, filtros de PVDF y láminas de cobre. También los NTCPM se depositaron sobre las neuronas de *Helix aspersa*. Sus propiedades morfológicas y ultraestructurales se caracterizaron mediante el uso de diversos estudios: microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión, microscopía confocal y microscopía de fuerza atómica.

Preparación biológica.

Las neuronas identificadas del invertebrado caracol de jardín *Helix aspersa* fueron utilizadas como modelo biológico en este trabajo de tesis. Estas neuronas presentan propiedades bioeléctricas y canales iónicos similares a los que existen en neuronas de mamífero, por lo que estas neuronas de invertebrado han sido utilizadas como modelos biológicos en múltiples estudios en el campo de la investigación básica en neurociencias. Las neuronas del caracol *Helix aspersa* son fácilmente identificables, tanto morfológica como electrofisiológicamente; presentan actividad eléctrica espontánea y su membrana celular posee canales iónicos de K^+ y Ca^{2+} , así como canales iónicos acoplados a receptores membranales como dopamina, L-glutamato y acetilcolina.

Experimentos electrofisiológicos de registro intracelular.

En el desarrollo experimental de este proyecto se utilizaron técnicas electrofisiológicas convencionales de registro intracelular con microelectrodos en el modo de fijación de corriente. En estos experimentos se monitorearon señales bioeléctricas neuronales tales como: i). Potencial de membrana, ii). Actividad eléctrica espontánea, iii). Hiperpolarización postetánica, iv). Potencial de acción cálcico, v). Despolarización membranal activada por glutamato y carbacol y vi). Hiperpolarización membranal activada por dopamina.

i-4) Resultados experimentales.

a). Se estudiaron distintos compuestos para lograr una dispersión adecuada de los NTCPM en soluciones acuosas. Entre los diferentes compuestos ensayados se encontró que dimetilformamida es un buen dispersante, pero es tóxico para las células. Pluronic F-127 no era tóxico para las células, pero no se dispersaban eficientemente los NTCPM. La Polivinilpirrolidona (PVP) fue el mejor dispersante encontrado para NTCPM y no tiene ningún efecto tóxico en las neuronas y células estudiadas. Se demostró que la manipulación mecánica por sonicación de NTCPM, así como el uso de dispersantes biocompatibles, mejoran la dispersión de NTCPM en soluciones acuosas.

b). Mediante el uso de estudios de microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión, microscopía confocal y microscopía de fuerza atómica, se caracterizaron las propiedades ultraestructurales de los NTCPM depositados en distintos materiales: papel bond, vidrio, filtros de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y laminas de cobre; así como los aplicados sobre las neuronas de *Helix aspersa*.

c). En este trabajo de tesis se encontró que los electrodos hechos con NTCPM y depositados sobre papel bond y filtros de PVDF tienen una menor resistencia; por consiguiente una mejor conductividad en comparación con otros materiales electroconductores, tales como la plata y la pintura de grafeno. Se realizaron estudios de microscopía de fuerza atómica (AFM) y estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM) con el fin de caracterizar las propiedades ultraestructurales y de distribución de NTCPM en filtros de PVDF. Se observó que los electrodos hechos con NTCPM colocados sobre filtros de PVDF tienen una distribución topográfica caótica y éstos no están alineados; sin embargo, los NTCPM depositados sobre los filtros de PVDF mostraron una resistencia eléctrica lineal sin rectificación. Además se demostró que los electrodos de NTCPM pueden utilizarse para el registro y detección de señales bioeléctricas, ya que dichos electrodos fueron capaces de registrar señales electrocardiográficas en humanos con resolución y eficiencia similar a los registrados con electrodos convencionales de plata.

d). En otra serie de experimentos se obtuvieron resultados que demuestran que los NTCPM son sensibles a la irradiación del láser y que este estímulo reduce sistemáticamente su resistencia eléctrica intrínseca. La resistencia eléctrica de los NTCPM se midió en condiciones de control y cuando se les aplicó un haz de láser

continuo cercano al infrarrojo (nIR-láser) a una longitud de onda de 650 nm. Se encontró que los NTCPM mostraron un valor constante de la resistencia eléctrica y dicho valor de resistencia fue dependiente de la cantidad de nanotubos aplicada sobre los filtros de PVDF. La resistencia media de los NTCPM sobre filtros de PVDF fue como sigue (en ohms): 23, 307 y 2275 en diluciones 1, 1:10 y 1:100 de la solución madre de NTCPM (5 mg/mL) respectivamente. Se demostró que nIR-láser disminuyó la resistencia eléctrica en forma transitoria, ya que al suspender la irradiación láser dicho valor de resistencia se recuperó a valores normales. Además se observó un pequeño aumento de la temperatura (1.2 a 3.2 °C) durante la irradiación con láser. Los resultados aquí presentados apoyan la hipótesis de que la irradiación láser modula, con una alta sensibilidad, las propiedades eléctricas y térmicas intrínsecas de los NTCPM.

e). Existen reportes controversiales respecto a la toxicidad de los NTC en las células neuronales y su posible efecto de bloqueo de permeabilidad de canales iónicos presentes en neuronas y otras células excitables. En este trabajo de tesis se evaluó el posible efecto bloqueante de NTCPM sobre las permeabilidades iónicas dependientes de voltaje de las neuronas de *Helix aspersa*.

Se realizaron estudios de microscopía óptica, electrónica de barrido y microscopía confocal para demostrar que los NTCPM aplicados sobre las neuronas están dispersados adecuadamente; pueden adherirse a las membranas neuronales y eventualmente podrían bloquear las permeabilidades de canales iónicos localizados en la membrana celular. En experimentos iniciales, los NTCPM fueron marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y con técnicas de microscopía confocal, y se estudió la posible interacción de estos nanotubos fluorescentes con la membrana celular de neuronas del caracol *Helix aspersa*. En otra serie de experimentos se analizaron neuronas íntegras y cortes histológicos de neuronas del ganglio de *Helix aspersa* con técnicas de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido, así como microscopía confocal, en donde las neuronas fueron tratadas con NTCPM sin marcaje con fluoresceína. Se pudo demostrar que los NTCPM se adhieren a la membrana celular, atraviesan dicha membrana y tienden a acumularse al interior del citoplasma y sobre el núcleo.

f). Habiendo demostrado que los NTCPM se adhieren a la membrana celular y pueden atravesar dicha membrana, se realizaron experimentos de registro intracelular en la configuración de fijación de corriente con el propósito de evaluar el posible efecto de NTCPM sobre: i). La amplitud y la duración del potencial de acción normal, ii). La hiperpolarización postetánica y iii). La duración del potencial de acción de calcio (PA-Ca²⁺) en las neuronas de *Helix aspersa*. En estos experimentos se encontró que los NTCPM no bloquearon ni modificaron la amplitud ni la morfología de los potenciales de acción normales y potenciales de acción cálcicos; tampoco modificaron la hiperpolarización postetánica. Por lo anterior se puede inferir que los NTCPM no bloquean los canales de sodio, ni de potasio, ni de calcio dependientes de voltaje presentes en la membrana neuronal de las neuronas de *Helix aspersa*.

g). En otra serie de experimentos se estudiaron los posibles efectos tóxicos de los NTCPM sobre la permeabilidad iónica de los canales iónicos activados por agonistas y neurotransmisores. La técnica convencional de registro intracelular en el modo de fijación de corriente fue la utilizada para evaluar las propiedades electrofisiológicas de los canales iónicos activados por dopamina, L- glutamato y carbacol en la neurona 1F. En estos experimentos electrofisiológicos se caracterizaron la presencia de estos receptores membranales en las neuronas de *Helix aspersa*, así como sus propiedades farmacológicas. Se encontró que el receptor colinérgico en neurona 1F es de tipo muscarínico M1-M3, ya que la despolarización membranal activada por carbacol es inhibida por atropina y pirenzepina y es incrementada con oxotremorina. En el caso de la hiperpolarización activada por dopamina se encontró que dicha hiperpolarización es regulada por receptores dopaminérgicos tipo D2, ya que los fármacos metoclopramida y ergometrina (antagonistas específicos de los receptores dopaminérgicos D2) bloquean la respuesta de la dopamina. En el caso de la respuesta glutamatérgica se encontró que la despolarización activada por glutamato es moderadamente sensible a bloqueadores tipo ampa-kainato. Se encontró que esta respuesta muscarínica, glutamatérgica y dopaminérgica de la neurona 1F no es bloqueada por los NTCPM a concentraciones de hasta 0.5 mg/mL. De esta serie de experimentos se concluye que los NTCPM no bloquean los canales iónicos dependientes de agonistas.

h). Se evaluaron los efectos de NTCPM en otras preparaciones biológicas (células de protistas y de mamíferos) con el propósito de corroborar la no toxicidad y la biocompatibilidad de los NTCPM usados en este trabajo de tesis. Se encontró que los NTCPM son incorporados al interior del citoplasma del *Paramecium*; no por simple difusión, sino por un proceso membranal de endocitosis. Estos nanotubos no modificaron la sobrevivencia ni el nado normal del *Paramecium*; sin embargo, a altas concentraciones de NTCPM, de más de 200 µg/mL, se modificó la conducta de galvanotaxis del ciliado. En otra serie de experimentos se estudió el posible efecto citotóxico de NTCPM en neuronas del hipocampo de mamífero. En dichos experimentos, se encontró que las neuronas de hipocampo de rata cultivadas y depositadas sobre un andamio o “scaffold” hecho con los NTCPM presentaron propiedades electrofisiológicas similares a las neuronas cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio sin NTCPM. Se observó que la transmisión sináptica entre pares de neuronas no fue inhibida; más aún, dicha actividad sináptica se vio incrementada.

i-5) Conclusiones y perspectivas.

En los experimentos realizados para este trabajo de tesis, se logró una dispersión eficiente de NTCPM en soluciones acuosas. Los NTCPM tienen las siguientes características: i). Presentan una baja resistencia eléctrica y consecuentemente una alta conductividad, ii). No tienen un efecto deletéreo o tóxico sobre las propiedades eléctricas de las neuronas de caracol, iii). No bloquean los canales iónicos dependientes de voltaje, y iv). No bloquean los canales iónicos dependientes de agonista.

Se demostró que los NTCPM se pueden usar como electrodos de registro para sensar y registrar señales bioeléctricas, tales como el electrocardiograma en humanos. Además se demostró que la resistencia intrínseca de los NTCPM se disminuye al exponer dichos NTCPM a la irradiación láser cercano al infrarrojo. Sin embargo, queda aún pendiente el demostrar que los NTCPM incorporados a electrodos de registro puedan registrar la actividad eléctrica neuronal. También será necesario estudiar si los NTCPM pueden conectar eléctricamente a dos o más neuronas entre sí.

Considerando la alta sensibilidad de los NTCPM al láser, estos materiales podrán ser usados en futuros experimentos como alternativa terapéutica para el cáncer, al aplicarse dichos NTCPM en procesos tumorales para lograr ablación tumoral usando el método de hipertermia inducida por láser en tumores cancerosos.

ii) Agradecimientos.

A mis tutores de tesis:

Quiero agradecer a mis profesores tutores de tesis: Profesor José Rafael Godínez Fernández y Profesor Alfredo Aguilar Elguezabal, por su total apoyo académico en el inicio del proyecto; en el diseño del proyecto; durante el desarrollo en los experimentos; durante la revisión de la tesis y durante el proceso de publicación de los artículos in extenso. Mis tutores me ayudaron a vencer mis temores y dificultades para realizar experimentos y me dieron la confianza para reiniciar el trabajo científico experimental que había anhelado. Gracias a ese apoyo y como producto de este trabajo de tesis, se han publicado varios trabajos científicos en congresos y en revistas indexadas que fundamentan la relevancia de este proyecto. Con el apoyo de mis tutores, se ha podido establecer que al finalizar este trabajo de tesis se inicie un nuevo proyecto de investigación relacionado con el uso de nanomateriales de carbono para el tratamiento del cáncer.

A mis sinodales de tesis:

Agradezco a los profesores: Dra. Anabel Jiménez Anguiano, Dra. Elia Martha Pérez Armendariz, Dr. Juan Morales Corona, Dr. Javier Vargas Sanchez y Dr. José Rafael Godínez Fernández, quienes fungieron como sinodales y jurado calificador de este trabajo de tesis, ya que con sus críticas y observaciones, hechas al manuscrito y al trabajo experimental de tesis, favorecieron una mejora substancial al manuscrito final de la tesis.

A mis profesores que participaron en mi formación académica:

Al Profesor Francisco Javier Alvarez-Leefmans, al Profesor Jorge Aceves Ruíz y al Profesor René Valdiosera; todos ellos del CINVESTAV, quienes con sus consejos, asesorías y apoyo en el desarrollo de experimentos durante mis estudios de posgrado en neurociencias favorecieron en mí una sólida y rigurosa formación científica y académica que me ha acompañado durante toda mi actividad como investigador. A la Profesora Barbara Ehrlich, de la Universidad de Yale, USA; al Profesor Robin Preston, de la Universidad de Drexel, USA y al Profesor Ed Perez-Reyes, de la Universidad de Virginia, USA por haberme apoyado y aceptado en sus laboratorios para realizar estancias posdoctorales. La calidez de su trato y el extraordinario apoyo académico

brindado me marcaron de forma determinante y son, para mí, el ejemplo de cómo un profesor debe tratar a sus estudiantes y colaboradores. También agradezco a la Dra. Laura Ballerini del Centro de Investigación Sissa, en Trieste, Italia, por haberme apoyado en los experimentos realizados durante una estancia científica en su laboratorio.

A mi familia:

A mi esposa, la señora María Teresa Villalobos Enríquez, por ser la persona más importante en mi existencia. Le agradezco su amor, comprensión y total aceptación. Gracias por acompañarme y vivir conmigo los desasosiegos y satisfacciones, no sólo durante este trabajo de tesis, sino durante todos los años de formación académica: desde mis estudios de medicina, estudios de posgrado en neurociencias, de las estancias posdoctorales en Estados Unidos y últimamente en el posgrado de Ingeniería Biomédica. Además quiero agradecerle muy puntualmente su apoyo directo y valioso en la crítica, revisión y corrección misma de los manuscritos de trabajos publicados, incluyendo el texto de esta tesis.

A mis hijos: Teresita, Emmanuel y Carlos por ser motivo de inspiración personal en la lucha por mi superación académica y humana; por haberme acompañado muchas veces en el desarrollo de experimentos y haber juntado su desarrollo propio con el mio. Por haberme cedido, en múltiples ocasiones, su tiempo tan valioso de convivencia para poder yo realizar mis experimentos y mi trabajo científico.

A mis padres, la señora María Concepción Martínez Segura y el señor José de Jesús Bernal Vázquez, quienes con su amor y entrega total me educaron e inculcaron las bases y principios para la vida. Ellos, quienes fueron analfabetas, sabiamente me educaron e inculcaron el anhelo de la superación personal, en lo moral y en lo académico. Gracias por inculcarme los principios de integridad, honradez, responsabilidad y dedicación al trabajo. Me inculcaron el hábito del trabajo intenso como la alternativa más adecuada para lograr trascender en la vida. Gracias mamá y papá. Creo que con este trabajo de tesis estoy logrando también cumplir sus anhelos.

A mis hermanos y hermanas, sobrinos y demás familiares, que con sus convivencias y comentarios positivos, siempre apoyaron y promovieron el que yo continuara mis estudios como investigador científico.

iii) Lista de abreviaturas.

4-AP	4-aminopiridina
Ω	ohms
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados
μg	microgramos
μL	microlitros
μM	micromolar
A	amperes
Ach	acetilcolina
ACCV	voltaje de aceleración
ADN	ácido dexociribonucleico
Ag-AgCl ₃	plata-plata-clorurada
AFM	microscopio de fuerza atómica y/o Microscopía de fuerza atómica
Ar	argón
CaCl ₂	cloruro de calcio
CdCl ₂	cloruro de cadmio
CIMAV	Centro de Investigación en Materiales Avanzados
CsCl	cloruro de cesio
CVD	deposición química en fase vapor
DA	dopamina
DAPI	marcador fluorescente de núcleos celulares
DMF	eimetilformamida
ECG	electrocardiograma
EEG	electroencefalografía
EOG	electro-oculografía
EMG	electromiografía
EPSPs	potenciales sinápticos excitatorios
EDS	detector de energía dispersiva
FBS	suero bovino fetal

Fe	hierro
FESEM	microscopio electrónico de barrido de emisión de campo. y/o Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo
FITC	isotiaocianato de fluoresceína
g	gramos
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
HNO ₃	ácido nítrico
H, hrs	horas
I _{Ca2+}	corriente entrante de calcio
IPSPs	potenciales sinápticos inhibitorios
KCl	cloruro de potasio
KCl 1M	cloruro de potasio 1 molar
KCl 3M	cloruro de potasio 3 molar
L	litro
L-glut	l-glutamato
M	molar
MΩ	mega ohms
mAChR	receptor colinérgico mucarínico
mg	miligramos
MgCl ₂	cloruro de magnesio
mL	mililitro
mL/min	mililitros por minuto
mM	milimolar
ms	milisegundos
mV	milivolts
nA	nanoamperes
nAChR	receptores colinérgicos nicotínicos
NaOH	hidróxido de sodio
nIR-láser	láser cercano al infrarrojo

nm	nanómetro
NTC	nanotubos de carbono
NTCPM	nanotubos de carbono de pared múltiple
NTCPS	nanotubos de carbono de pared simple
PA-Ca ²⁺	potencial de acción cálcico
PFA	paraformaldehido
PVDF	fluoruro de polivinilideno
PVP	polivinilpirrolidona
PVP-40	polivinilpirrolidona de peso molecular 40,000 daltones
rMC	microscopía confocal en el modo de reflexión
s	segundos
SD	desviación estándar
SDS	dodecilsulfato de sodio
SEM	microscopio electrónico de barrido y/o Microscopía electrónica de barrido
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
SRC	solución Ringer de caracol
SRC-Ca ²⁺	solución Ringer de caracol alto calcio
TEM	microscopio electrónico de transmisión y/o Microscopía electrónica de transmisión.
TEA-Cl	cloruro de tetraetilamonio
V	volts
WGA	aglutinina de germen de trigo.
WGA-A594	fluorocromo para aglutinina de germen de trigo-Alexa Fluor 594

iv) Lista de tablas.

Tabla 1	Sustancias y reactivos utilizados en este proyecto	55
Tabla 2	Composición de soluciones Ringer de caracol	56
Tabla 3	Soluciones para preparación de microelectrodos	56
Tabla 4	Tratamiento de NTCPM con compuestos y soluciones dispersantes.....	73
Tabla 5	Mediciones de resistencia eléctrica en ohms (Ω) de materiales de cobre (Cu) y estaño (Sn).....	130
Tabla 6	Valores de resistencia eléctrica y peso de los distintos materiales electroconductores depositados en distintos materiales.....	132
Tabla 7	Valores de resistencia eléctrica de NTCPM a distintas concentraciones depositados en filtros de PVDF.....	132

v) Lista de figuras.

Figura 1	Representación gráfica de un potencial de acción, mostrando sus distintas fases.....	25
Figura 2	Representación gráfica de potenciales sinápticos excitatorios e inhibitorios y características del potencial de acción.....	26
Figura 3	Diagrama esquemático de receptores membranales y sus ligandos: endógeno, agonista y antagonista.....	28
Figura 4	Nanotubos de carbono de pared simple y Nanotubos de carbono de pared múltiple.....	34
Figura 5	Diagrama esquemático de la masa ganglionar periesofágica del caracol de jardín <i>Helix aspersa</i>	45
Figura 6	Diagrama esquemático del dispositivo experimental para registro de señales bioeléctricas.....	47
Figura 7	Dispositivo usado para fabricación de micropipetas o microelectrodos de registro.....	51
Figura 8	Arreglo experimental del sistema de registro en experimentos electrofisiológicos	52
Figura 9	Arreglo experimental para perfundir soluciones experimentales en la cámara de registro.....	53
Figura 10	Sistema de perfusión de soluciones extracelulares.....	54
Figura 11	Micrografías de NTCPM observados con microscopia electrónica de barrido.....	57
Figura 12	Diagrama esquemático del arreglo experimental usado para la síntesis de NTCPM por el método de pirólisis de aspersion.....	58
Figura 13	Proceso de preparación de NTCPM en soluciones acuosas.....	59
Figura 14	Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo FESEM	61
Figura 15	Equipo usado para la realización del baño ("sputtering") con oro o plata de las muestras de NTCPM estudiadas por microscopía electrónica de barrido.....	61
Figura 16	Microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700, utilizado este proyecto.....	63
Figura 17	Diagrama estructural y funcional del microscopio de fuerza atómica (AFM) utilizado en este proyecto.....	64

Figura 18	Histoquinete Lab-tek (A) y microtomo rotatorio manual marca Leica (B) para procesar y preparar cortes histológicos de las muestras del ganglio cerebral de <i>Helix aspersa</i> .	68
Figura 19	Arreglo experimental usado para medir la resistencia eléctrica de los NTCPM depositados en distintos materiales.....	69
Figura 20	Equipo Agilent 3497A, Data Acquisition/ Switch Unit usado para medir la resistencia intrínseca de NTCPM depositados en distintos materiales.....	70
Figura 21	Tarjeta de adquisición 34901A del equipo Agilent usado para medir resistencia eléctrica de nanomateriales.....	70
Figura 22	Puntas de registro para medir la resistencia eléctrica de nanomateriales.....	70
Figura 23	Arreglo experimental para medición de cambios de resistencia de electrodos hechos de nanomateriales y expuestos a la estimulación de NIR-láser.....	71
Figura 24	Termómetro Fluka-61-Infrared para medir los cambios de temperatura..... de los electrodos hechos con nanomateriales electroconductores.....	72
Figura 25	Pruebas de dispersión de NTCPM tratados con diferentes compuestos dispersantes.....	74
Figura 26	NTCPM dispersados en solución de PVP-agua desionizada vistos con microscopio electrónico de barrido de baja resolución.....	76
Figura 27	NTCPM depositados sobre vidrio y observados con SEM de alta resolución	76
Figura 28	NTCPM depositados sobre lámina de cobre y observados con microscopía electrónica de barrido de alta resolución.	77
Figura 29	NTCPM depositados sobre filtros PVDF observados con SEM de baja resolución.....	78
Figura 30	NTCPM a distintas concentraciones depositados sobre filtros de PVDF y estudiados por microscopía electrónica de barrido de alta resolución.....	79
Figura 31	NTCPM depositados sobre PVDF y estudiados con FESEM de alta resolución...	79
Figura 32	Dimensiones de NTCPM depositados sobre PVDF y estudiados con microscopía de fuerza atómica.....	80
Figura 33	Caracterización bidimensional y tridimensional de NTCPM depositados sobre filtros de PVDF. Estudios de microscopía de fuerza atómica.....	81
Figura 34	NTCPM a una dilución 1:10, depositados en cubreobjetos de vidrio y observados con microscopio confocal en el modo de reflexión a 460 nm.....	82

Figura 35	NTCPM en dilución 1:100, observados con microscopio confocal en el modo de reflexión a 460 nm.....	82
Figura 36	NTCPM a distinta concentración (1:0 y 1:100) observados con microscopio confocal en el modo de reflexión.....	83
Figura 37	Distribución tridimensional de NTCPM diluidos 1:10, visualizados con microscopía confocal Carl Zeis en el modo de reflexión a 460 nm.....	84
Figura 38	NTCPM a dilución 1:100 vistos con microscopio electrónico de transmisión	85
Figura 39	Micrografía de NTCPM (dilución 1:100) obtenida con microscopio electrónico de transmisión.....	85
Figura 40	Micrografía de corte histológico de la masa ganglionar de <i>Helix aspersa</i> tratada con NTCPM.....	86
Figura 41	Corte histológico de neuronas de <i>Helix aspersa</i> tratadas con NTCPM.....	87
Figura 42	Micrografías tomadas con FESEM para identificar los NTCPM en neuronas de <i>Helix aspersa</i>	88
Figura 43	Micrografía tomada con el FESEM, de los NTCPM adosados y distribuidos sobre la membrana celular de neuronas aisladas	88
Figura 44	Micrografía tomada con el FESEM, con mayor acercamiento, de los NTCPM Adosados y distribuidos sobre la membrana celular de neuronas aisladas	89
Figura 45	Micrografías de NTCPM depositados sobre neuronas de <i>Helix aspersa</i>	90
Figura 46	Micrografía de NTCPM depositados sobre neuronas de <i>Helix aspersa</i> observados con microscopio electrónico de barrido de baja resolución.	91
Figura 47	Micrografía de NTCPM depositados sobre neuronas de <i>Helix aspersa</i> observados con microscopio FESEM	92
Figura 48	Micrografía de NTCPM depositados sobre neuronas de <i>Helix aspersa</i> aplanadas.	93
Figura 49	Distribución topográfica de NTCPM-FITC en neuronas del ganglio E de <i>Helix aspersa</i> .	95
Figura 50	Distribución topográfica de NTCPM-FITC en las neuronas 1F y 2F de <i>Helix aspersa</i> ...	95
Figura 51	NTCPM depositados sobre neuronas de <i>Helix aspersa</i> y visualizados con microscopio confocal marca Leica en el modo de reflexión..	97

Figura 52	NTCPM depositados sobre neuronas de <i>Helix aspersa</i> y visualizados con microscopio confocal, marca Leica, en el modo de reflexión a 64x con zoom.....	.98
Figura 53	Efecto de los NTCPM sobre la actividad eléctrica espontánea de la neurona 1F, registros sobrepuestos.....	.99
Figura 54	Efecto de NTCPM sobre la amplitud y morfología del potencial de acción en la célula 2F.	100
Figura 55a.	Efecto de los NTCPM sobre la hiperpolarización postetánica de la célula IF, registros sobrepuestos.	102
Figura 55b.	Efecto de los NTCPM sobre la hiperpolarización postetánica de la célula IF, registros concatenados.....	103
Figura 56a	Efecto del cadmio sobre la duración del potencial de acción cálcico.....	105
Figura 56b	Efecto del cadmio sobre la duración del potencial de acción cálcico en la célula 76F.....	106
Figura 57	Gráfica que muestra el efecto del cadmio sobre la duración del PA-Ca ²⁺	106
Figura 58	Efecto de NTCPM sobre la duración del PA-Ca ²⁺ en la neurona 77F, registros concatenados.	107
Figura 59	Efecto de NTCPM (5 µg/mL) sobre la duración del PA-Ca ²⁺ . Registros aislados en la neurona 76 F.....	108
Figura 60	Efecto de NTCPM (100 µg/mL) sobre la duración del PA-Ca ²⁺ . Registros aislados y sobrepuestos obtenidos en la neurona 76F.....	109
Figura 61	Efecto del carbacol sobre la actividad eléctrica espontánea de la neurona 1F de <i>Helix aspersa</i>	111
Figura 62	Efecto del Carbacol sobre la actividad eléctrica espontánea y sobre la conductancia de entrada de la neurona 1F de <i>Helix aspersa</i>	112
Figura 63	Efecto de agonista nicotínico y antagonista muscarínico sobre la respuesta despolarizante producida por carbacol en la neurona 1F de <i>Helix aspersa</i>	113
Figura 64	Efecto de la oxotremorina sobre la respuesta al carbacol en la neurona 1F de <i>Helix aspersa</i>	114
Figura 65	Efecto de los NTCPM sobre la despolarización membranal activada por carbacol	

	en neurona 1F de <i>Helix aspersa</i>	116
Figura 66	Efecto de NTCPM a concentración de 100 µg/mL sobre la despolarización membranal producida por carbacol en neurona 1F de <i>Helix aspersa</i>	117
Figura 67	Efecto dosis-respuesta del L-glutamato sobre la neurona 1F de <i>Helix aspersa</i>	118
Figura 68	Efecto del L-glutamato sobre la conductancia de entrada y del potencial de membrana de la neurona 1F de <i>Helix aspersa</i>	119
Figura 69	Efecto de los NTCPM sobre la despolarización membranl activada por L-glutamato en la neurona 1F de <i>Helix aspersa</i>	120
Figura 70	Efecto de NTCPM a concentración de 100 µg/mL sobre la despolarización membranl activada por L-glutamato en neurona 1F de <i>Helix aspersa</i>	121
Figura 71	Actividad eléctrica espontánea de neurona 1F y la respuesta a dopamina.....	122
Figura 72	Curva dosis-respuesta de la dopamina en la neurona 1F y su efecto sobre la conductancia de entrada.....	123
Figura 73	Efecto de la metoclopramida sobre la hiperpolarización producida por dopamina.....	125
Figura 74	Curva dosis-respuesta de la dopamina en la neurona 1F y efecto de DA en presencia de metoclopramida.....	125
Figura 75	Control y efecto de dopamina en presencia de ergometrina	127
Figura 76	Efecto irreversible de ergometrina sobre la respuesta activada por dopamina	127
Figura 77	Efecto de NTCPM a distintas concentraciones sobre la hiperpolarización producida por dopamina.....	129
Figura 78	Mediciones de resistencia de lámina de cobre y película de estaño.	131
Figura 79	Arreglo experimental para medición de resistencia eléctrica de distintos materiales electroconductores.....	133
Figura 80	Medición de resistencia de electrodos hechos a base de pintura de plata depositada en papel bond.	134
Figura 81	Comportamiento de la resistencia eléctrica de diferentes materiales electroconductores	134

Figura 82	Trazos electrocardiográficos típicos obtenidos de un paciente, utilizando electrodos de plata.....	135
Figura 83	Colocación de electrodos hechos de NTCPM para registro de electrocardiograma en humanos.....	136
Figura 84	Los NTCPM depositados en filtros de PVDF, pueden registrar las señales de ECG en los seres humanos.	137
Figura 85	Efecto del nIR-láser sobre la resistencia eléctrica de los NTCPM depositados sobre filtros de PVDF.....	139
Figura 86	Efecto del nIR-láser sobre la resistencia de los NTCPM depositados sobre papel y vidrio.....	140
Figura 87	Efecto del nIR-láser sobre la temperatura de los NTCPM depositados sobre filtros de PVDF	141

I Introducción General.

I.1 Propiedades morfofuncionales de las neuronas.

La unidad funcional, morfológica y genética del sistema nervioso es la neurona. El sistema nervioso de mamíferos posee millones de neuronas integradas en ganglios y en acúmulos neuronales denominados núcleos, a partir de los cuales se crean y forman diversos tipos de fibras nerviosas o nervios que se distribuyen en la periferia del organismo. Gracias a estos nervios las neuronas, al conectarse con receptores específicos, pueden detectar información aferente del medio exterior o interior: dolor, tacto, temperatura y presión; así como aromas y sabores, cambios de posición del organismo y ondas acústicas y de luz. Las fibras nerviosas que emergen de los núcleos del sistema nervioso central o de ganglios también envían información eferente para regular la contractura de músculo esquelético; la movilidad visceral; la secreción de glándulas, etc. [1,2,3,5].

Desde el punto de vista histológico y funcional, una neurona tiene tres zonas principales: el cuerpo o soma, las dendritas y el axón. Estos dos últimos elementos son los encargados de establecer las relaciones de conexión con otras neuronas o células efectoras. Las dendritas son como antenas o tentáculos que reciben la mayor parte de la información que proviene de otras células. El axón, por su parte, es como un cable con el que una neurona se conecta a otras. La señal bioeléctrica que generan las neuronas se denomina potencial de acción. Dicho potencial de acción es la respuesta eléctrica que una neurona da como resultado de una suma espacial y temporal de los distintos estímulos excitatorios e inhibitorios, llamados potenciales sinápticos. El potencial de acción viaja a través del axón y favorece la liberación de neurotransmisores (sinapsis química) o conecta eléctricamente (sinapsis eléctrica) a otras neuronas para permitir la propagación de dicho potencial de acción [2-3].

I.2 Tipos de señales bioeléctricas en neuronas.

Las señales bioeléctricas que pueden generarse en las neuronas pueden clasificarse de la manera siguiente:

a). Potenciales sinápticos excitatorios. Son cambios del potencial de membrana de la neurona en dirección despolarizante debido a la acción de neurotransmisores químicos excitatorios o de señales eléctricas.

b). Potenciales sinápticos inhibitorios. Son cambios del potencial de membrana de la neurona en dirección hiperpolarizante debido a la acción de neurotransmisores químicos inhibitorios o de señales eléctricas.

c). Potencial de acción. Es la señal de todo o nada generada en una neurona como respuesta de la integración espacial y temporal de estímulos excitatorios e inhibitorios recibidos por la neurona.

d). Actividad eléctrica espontánea. En muchas neuronas, pueden generarse cambios de potencial de membrana en el sentido despolarizante hasta llegar a un potencial de acción repetitivo. Las neuronas tienen un patrón de disparo espontáneo. Son células marcapaso que presentan actividad eléctrica espontánea [1-7, 103].

I.3 Potencial de membrana y potencial de acción.

El potencial de membrana es la diferencia de voltaje eléctrico a ambos lados de la membrana celular: producto de la distribución asimétrica de iones. Existe una distribución desigual de cargas a través de la membrana, y esto es debido a la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática a ciertos iones, a la presencia de moléculas con carga negativa en el interior de la célula (proteínas y compuestos iónicos) que no se difunden al exterior celular, así como a la acción de varias unidades de bomba sodio-potasio. Como consecuencia, el interior de la célula tiene mayor cantidad de cargas negativas en comparación con el exterior. A esta diferencia de carga, o diferencia de potencial, se le conoce como el potencial de membrana.

Los iones sodio, potasio y cloruro son los iones más importantes que participan en la generación de los potenciales de membrana en las fibras nerviosas y musculares, así como en las células neuronales del sistema nervioso. Na^+ y K^+ son iones positivos univalentes; Cl^- un ion negativo univalente. El gradiente de concentración de cada uno de estos iones a través de la membrana ayuda a determinar el voltaje del potencial de membrana. La permeabilidad de los canales de Na^+ y de K^+ experimenta cambios rápidos durante la transmisión de un impulso nervioso, mientras que la permeabilidad de los canales de Cl^- no se modifica mucho durante este proceso. Por tanto, los cambios rápidos de la permeabilidad al sodio y al potasio son los principales responsables de la transmisión de las señales en los nervios.

El potencial de membrana en reposo de las fibras nerviosas grandes, cuando no transmiten señales nerviosas, es aproximadamente de -45 a -60 mV. Los factores

principales que establecen este potencial de membrana son el potencial de difusión de potasio y de sodio a través de la membrana nerviosa y la contribución de la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. En la fibra nerviosa normal, la permeabilidad de la membrana al potasio es aproximadamente 100 veces mayor que la permeabilidad al sodio; por lo tanto la difusión del potasio contribuye mucho más al potencial de membrana que la difusión del sodio.

Las señales nerviosas se transmiten mediante potenciales de acción, que son cambios rápidos del potencial de membrana que se extienden rápidamente a lo largo de la membrana de la fibra nerviosa. Cada potencial de acción comienza con un cambio súbito, desde el potencial de membrana negativo en reposo normal hasta un potencial positivo, y después termina con un cambio casi igual de rápido de vuelta hacia el potencial negativo. De acuerdo con el tipo de estímulo que la neurona reciba, la diferencia de potencial puede aumentar o puede disminuir; cuando aumenta se le llama “hiperpolarización” (el interior de la neurona se hace más negativo); cuando disminuye se le llama “despolarización” (el interior de la neurona se hace menos negativo). Si el estímulo supera un umbral, la despolarización dispara el potencial de acción. [1-7, 119-122]

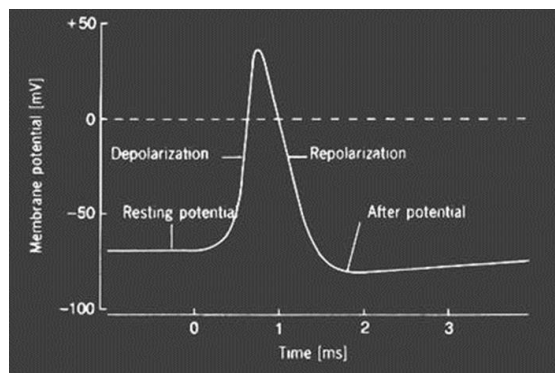


Figura 1. Representación gráfica de un potencial de acción, mostrando sus distintas fases.

I.4 Sinapsis química y sinapsis eléctrica.

Las neuronas se comunican a través de sinapsis: una unión intercelular especializada entre neuronas para realizar así las funciones complejas de manejo de la información aferente o eferente. En estos contactos sinápticos se lleva a cabo la transmisión del impulso nervioso. El impulso nervioso de la neurona presináptica (célula transmisora o emisora de la señal) se propaga hasta alcanzar el extremo del axón; en este sitio, la neurona presináptica segrega un tipo de compuesto químico denominado

neurotransmisor que se deposita en el espacio sináptico (espacio intermedio entre esta neurona transmisora y la neurona postsináptica o receptora). A estas sustancias segregadas se les llama neurotransmisores y son los encargados de excitar o inhibir la acción de la célula postsináptica. Como ejemplo de estos neurotransmisores tenemos: glutamato, acetilcolina y dopamina, entre otros. A este tipo de sinapsis se le denomina sinapsis química. [1-6, 103].

Las células nerviosas también se pueden conectar entre sí por sinapsis eléctricas. Una sinapsis eléctrica es aquella en la que la transmisión entre la primera neurona y la segunda no se produce por la secreción de un neurotransmisor, como en la sinapsis química, sino por el paso de iones de una célula a otra a través de uniones “gap”, o uniones comunicantes, constituidas por macro canales iónicos formados por el acoplamiento de complejos proteínicos denominados conexinas. Las sinapsis eléctricas son más rápidas que las sinapsis químicas, pero menos plásticas; facilitan el intercambio de iones y otras sustancias químicas entre dos neuronas. Las sinapsis eléctricas poseen una transmisión bidireccional de los potenciales de acción. En cambio, las sinapsis químicas sólo poseen comunicación unidireccional. En las sinapsis eléctricas hay una sincronización en la actividad neuronal, lo cual hace posible una acción coordinada entre las neuronas. [1-6].

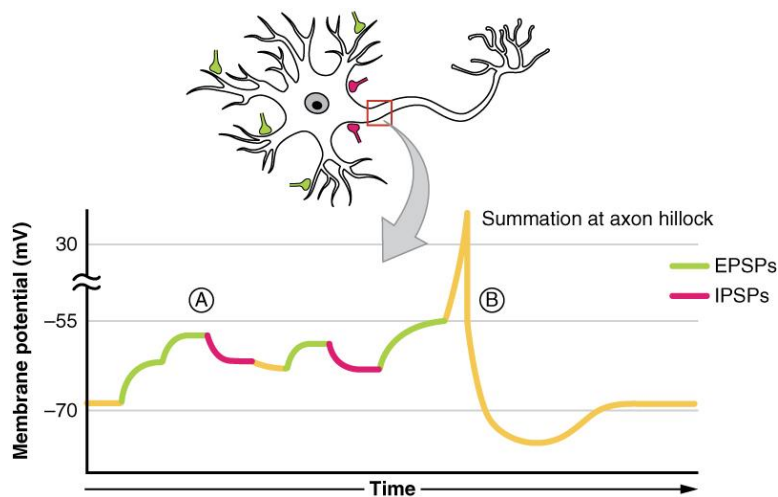


Figura 2. Representación gráfica de potenciales sinápticos excitatorios e inhibitorios y características del potencial de acción. En A se indican los potenciales sinápticos excitatorios (EPSPs) en verde y los potenciales sinápticos inhibitorios (IPSPs) en rojo. B representa el resultado de la sumatoria de potenciales sinápticos que es la generación de un potencial de acción.

I.5 Agonistas y antagonistas de receptores membranales en sinapsis química.

En el estudio bioquímico de las sinapsis químicas se manejan los términos agonista y antagonista. Los agonistas son sustancias químicas o fármacos que activan los receptores presentes en la membrana de la sinapsis química, en forma similar a los ligandos endógenos o neurotransmisores. Los antagonistas son sustancias químicas o fármacos que bloquean la acción de neurotransmisores naturales o fármacos agonistas sintéticos. El agonista no es la sustancia original de nuestro cuerpo (neurotransmisor) pero actúa de forma parecida, imitando la acción de los neurotransmisores endógenos sobre los receptores membranales de la célula postsináptica. Si un agonista imita a la sustancia producida de forma natural, dicho agonista estimula al receptor y se logran los efectos que la sustancia natural produce en las células. El antagonista es una sustancia que imita la acción del neurotransmisor para poder ocupar su lugar en el receptor, bloqueándolo sin producir efecto. El antagonista “engaña” al receptor simulando ser la sustancia natural sin serlo; de esta forma la sustancia original no podrá actuar, ya que su “sitio” está ocupado por ese antagonista. Podemos encontrar diferentes tipos de antagonistas, por ejemplo:

- Antagonista competitivo. Es un tipo de fármaco que actúa sobre el receptor evitando, compitiendo con el sitio de acción del agonista natural, impidiendo que el agonista produzca el efecto. La acción de este tipo de antagonista depende de la concentración que del mismo se usa. A este tipo de antagonista también se le suele llamar antagonista reversible.
- Antagonista no competitivo. Es un tipo de antagonista que también actúa sobre el receptor evitando que el neurotransmisor produzca sus efectos, pero en este caso su eficacia no está delimitada por la concentración de agonistas; es decir, cumple su cometido sea cual sea la concentración de agonistas [1-6, 123].

En la Figura 3 se muestra un esquema de las distintas respuestas de los receptores: a un ligando endógeno, a una sustancia agonista y a una sustancia antagonista.

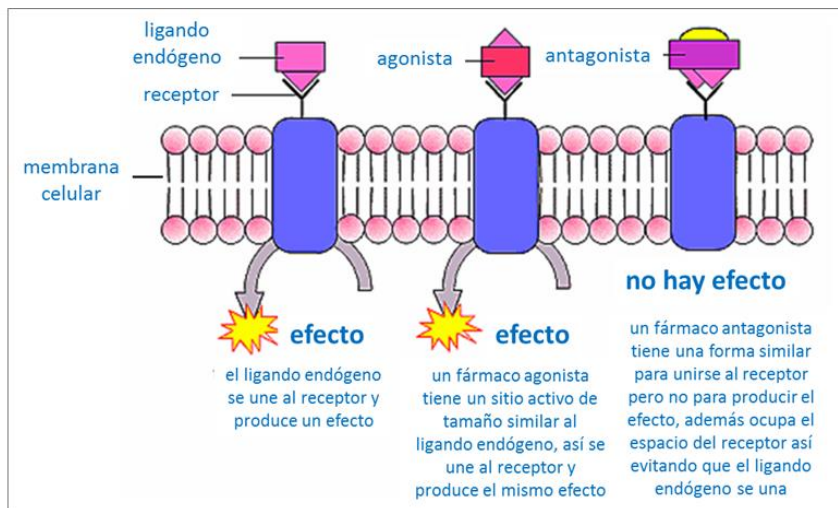


Figura 3. Diagrama esquemático de receptores membranales y sus ligandos: endógeno, agonista y antagonista [123]

I.6 Tipos de agonistas y antagonistas de receptores dopaminérgicos, colinérgicos y glutamatérgicos en neuronas.

Existen varios fármacos que son conocidos como antagonistas de los receptores dopaminérgicos. Tal es el caso de la domperidona que actúa como antagonista del receptor D2 a nivel del sistema nervioso periférico (SNP), la metoclopramida que actúa como antagonista del receptor D2 a nivel del SNP y del sistema nervioso central (SNC), el haloperidol que actúa sobre el receptor D2 a nivel SNC y la ergometrina que actúa como antagonista de los receptores D1 y D2 en moluscos e invertebrados [132, 146-149].

Otro receptor de importancia es el receptor colinérgico muscarínico. El cloruro de carbamilcolina, comúnmente conocido como carbacol, es un excelente agonista de receptores colinérgicos. La farmacología, propiedades de conductancia iónica y efectos membranales de este receptor han sido estudiados en preparaciones tanto de vertebrados como de invertebrados y moluscos, y se ha caracterizado que dicho receptor colinérgico puede ser bloqueado por sulfato de atropina y activado por oxotremorina [120-139].

Así mismo, en neuronas de invertebrados y de mamíferos se han estudiado las propiedades de conductancia iónica, su farmacología y los efectos sobre el potencial de membrana del receptor activado por el L-glut [140-146].

I.7 Canales iónicos.

Las señales bioeléctricas de las neuronas son el resultado de la permeabilidad de iones a través de distintos elementos proteínicos de la membrana neuronal, y son denominados canales iónicos [4, 6, 7]. Muchas tareas importantes en las células vivas, como la contracción muscular y la transmisión del impulso nervioso, son impulsadas por la energía eléctrica; generada por iones cargados positiva y negativamente que fluyen dentro y fuera de las células. Este transporte de iones está regulado por canales de tipo túnel enclavados dentro del límite exterior de la célula. Durante décadas fue casi imposible estudiar estos canales individualmente. El Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 1991 recompensó a dos científicos por crear el dispositivo experimental de medición que probó, de manera concluyente, la existencia y la función de estos canales iónicos. La técnica de patch clamp de Erwin Neher y Bert Sakmann [124] se basa en una idea muy simple. Una pipeta de vidrio extremadamente fina con una abertura muy pequeña se utiliza para hacer contacto con una pequeña área o parche de la membrana externa de la célula que, con cierta suerte, contendrá sólo un canal iónico. La aplicación de una pequeña cantidad de succión a través de la pipeta forma un sello lo suficientemente ajustado para que los iones sólo puedan fluir desde el canal hacia la pipeta. Al colocar la pipeta con un electrodo altamente sensible, Neher y Sakmann pudieron registrar el cambio en la corriente producida cuando los iones fluyeron a través del canal fijado en la pipeta. Con este dispositivo de registro, ellos mostraron cómo funcionan estos canales: abriendo y cerrando en forma aleatoria para permitir que ciertos iones pasen a través de canales iónicos específicos.

Existen diferentes tipos de canales iónicos:

i) Canales iónicos dependientes de voltaje. Son elementos proteínicos incorporados en la membrana celular que se activan por cambios en el voltaje de dicha membrana. Ejemplo típico de estos canales iónicos son los canales de Na^+ , de Ca^{2+} y de K^+ dependientes de voltaje. La apertura de los canales de Na^+ y Ca^{2+} genera el flujo iónico masivo a nivel intracelular de dichos iones y éstos son el sustrato molecular de la fase de espiga o despolarización del potencial de acción. Por otro lado, los canales iónicos de K^+ que dependen del voltaje son los responsables de la fase de caída o hiperpolarización del potencial de acción en las neuronas. [1-4, 6, 103-107].

ii) Canales iónicos dependientes de agonista. Son elementos proteínicos membranales que se activan por la unión de neurotransmisores y permiten el flujo de iones al interior o exterior de la célula, produciendo macroscópicamente cambios de

potencial de membrana denominados potenciales sinápticos excitatorios o inhibitorios. Ejemplo de estos canales son los activados por L-glutamato, la acetilcolina y la dopamina [3,4,6, 103].

iii) *Canales iónicos que dependen de Ca^{2+}* . Son elementos proteínicos membranales que favorecen la permeabilidad de iones específicos, solamente cuando existe una elevación del calcio intracelular. Ejemplo de estos son los canales de cloro que dependen del Ca^{2+} y los canales de K^+ que dependen del Ca^{2+} [3, 4, 6 105-110, 119-122].

I.8 Estudio de las propiedades eléctricas de las neuronas.

La electrofisiología es la técnica experimental para el estudio de las propiedades eléctricas de células y tejidos; incluye medidas de cambio de voltaje o corriente eléctrica en una variedad amplia de escalas, desde el simple canal iónico hasta órganos completos como el corazón. En neurociencias se incluyen las medidas de la actividad eléctrica de neuronas: potenciales sinápticos excitatorios e inhibitorios, la actividad del potencial de acción, la actividad eléctrica espontánea tipo “marcapaso” y las corrientes iónicas que subyacen a dichos potenciales sinápticos y/o potenciales de acción. Los registros a gran escala de señales eléctricas del sistema nervioso, como el electroencefalograma, también se clasifican como registros electrofisiológicos. [2,3,4,6]

Las técnicas de electrofisiología implican el colocar electrodos en varias preparaciones de tejido biológico. Los principales tipos de electrodos son: i). Conductores sólidos simples como discos y agujas (individuales o arreglos), usualmente aislados exceptuando la punta. ii). Circuitos impresos, también aislados, y iii). Pipetas de vidrio llenas de solución de cloruro de potasio. Las preparaciones biológicas más usuales incluyen: i). Animales íntegros, ii). Tejidos extirpados, iii). Células identificadas de ganglios y núcleos o células dissociadas o dispersadas enzimáticamente del tejido nervioso extirpado, iv). Células y tejidos en cultivo artificial, o v). Híbridos de los anteriores. Si un electrodo es lo suficientemente pequeño en diámetro (micrómetros) entonces el electrofisiólogo puede insertar la punta del electrodo en una sola célula. El experimentador también puede escoger no insertar la punta dentro de una célula; en cambio, la punta del electrodo puede ser dejada en continuidad con el espacio extracelular para registros extracelulares. Si la punta del electrodo es lo suficientemente

pequeña, esa configuración permite el registro de potenciales de acción de una sola célula, a lo cual se le denomina registro de unidad-celular o registro intracelular. Una configuración de registro extracelular puede recoger la actividad de varias células cercanas simultáneamente dependiendo de la preparación y ubicación precisa de los electrodos; a esto se le denomina registro de multi-unidad o registro de campo. A medida que el tamaño del electrodo aumenta, el poder de resolución disminuye. Los electrodos más grandes son solamente sensibles a la actividad neta de muchas células, denominado esto potencial de campo local. Aun electrodos grandes, como las agujas sin aislamiento y electrodos de superficie, son usados por cirujanos y neurofisiólogos clínicos; estos electrodos son sensibles solamente a cierto tipo de actividad sincrónica dentro de las poblaciones de células. Otras técnicas clásicas de electrofisiología incluyen registro de canal individual o canal único y amperometría [3-6].

I.9 Registro electrofisiológico intracelular.

Un registro electrofisiológico intracelular consiste en medir la diferencia de voltaje a través de la membrana celular (modo de fijación de corriente) o bien, el flujo de la corriente iónica a través de la membrana de una célula (modo de fijación de voltaje) [1-7]. Para realizar un registro intracelular se debe insertar la punta de uno o más microelectrodos muy finos dentro de la célula, de modo que se pueda medir el potencial de membrana. Por lo general, el potencial de membrana de una célula sana en reposo estará entre los -40 y -80 mV, y durante un potencial de acción el potencial de membrana podría alcanzar los 40 mV (Ver Figuras 1 y 2). Hoy en día, la mayoría de los microelectrodos utilizados para el registro intracelular son micropipetas de vidrio con un diámetro de punta menor a 1 micrómetro y una resistencia de varios mega ohms (M Ω). Las pipetas se llenan con una solución que tiene una composición iónica similar al líquido intracelular de la célula. Un alambre de plata Ag-AgCl₃ insertado en la pipeta conecta eléctricamente el electrolito de la pipeta al amplificador, el cual registra y monitorea las señales bioeléctricas de la célula.

En 1963, Alan Lloyd Hodgkin y Andrew Fielding Huxley obtuvieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina por su contribución a la comprensión de los mecanismos subyacentes a la generación de potenciales de acción en las neuronas. Sus experimentos consistieron en registros intracelulares del axón gigante del calamar

atlántico (*Loligo pealei*) y fueron las primeras aplicaciones de la técnica de "fijación de voltaje" [119-122].

II Antecedentes.

II.1 La nanotecnología y el desarrollo de nanomateriales de carbono.

La palabra "nanotecnología" es usada extensivamente para definir las ciencias y técnicas que se aplican a nivel de nanoescala, que permiten trabajar y manipular las estructuras moleculares y sus átomos. El desarrollo de esta disciplina se produce a partir de las propuestas de Taniguchi Norio y Richard Feynman. Feynman, en 1959, en una conferencia dijo: "Hay mucho espacio en el interior de los materiales por descubrir, hasta que los investigadores tengan las herramientas del tamaño adecuado para la manipulación directa de átomos y moléculas". En 1974, Norio Taniguchi publica "On the basic concept of Nano Technology", en donde el término nanotecnología es definido por primera vez [23, 24]. La nanociencia es el estudio del control de sistemas cuyo tamaño es de unos pocos nanómetros (1-100). La nanociencia es un campo de las ciencias aplicadas dedicado al control y manipulación de la materia a una escala menor a la de un micrómetro; es decir, a nivel de átomos, moléculas y nanomateriales [23, 24, 25]. La nanotecnología se caracteriza por ser un campo esencialmente multidisciplinario y cohesionado exclusivamente por la escala de la materia con la que se trabaja. Para comprender el potencial de esta tecnología es clave saber que las propiedades físicas y químicas de la materia cambian a escala nanométrica, lo cual se debe a efectos cuánticos. La conductividad eléctrica, el calor, la resistencia, la elasticidad y la reactividad, entre otras propiedades, se comportan de manera diferente a como lo hacen con los mismos elementos a mayor escala. Por lo tanto, las aplicaciones actuales y futuras de los nanomateriales son muy amplias, particularmente las de los nanotubos de carbono utilizados en la industria eléctrica, la microelectrónica y la biomedicina [23-26].

II.2 Clasificación de nanomateriales.

La Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos [27] ha clasificado a los nanomateriales actuales en cuatro tipos que son:

Basados en carbono. Estos nanomateriales están compuestos en su mayoría por carbono y suelen adoptar formas como esferas huecas, elipsoides o tubos. Los

nanomateriales de carbono con forma elipsoidal o esférica son conocidos como fullerenos, mientras que los de forma cilíndrica reciben el nombre de nanotubos. El uso de estas partículas tiene muchas aplicaciones tecnológicas: el desarrollo de recubrimientos y películas mejoradas, la elaboración de materiales más ligeros y resistentes, y diversas aplicaciones en el campo de la electrónica.

Basados en metales. Estos nanomateriales incluyen puntos cuánticos, nanopartículas de oro y plata y óxidos metálicos como el dióxido de titanio.

Dendrímeros. Estos nanomateriales son polímeros de tamaño nanométrico contruidos a partir de unidades ramificadas. La superficie de un dendrímero tiene numerosos extremos de cadena que se pueden adaptar para desempeñar funciones químicas específicas. Esta propiedad se utiliza también para la catálisis; además, debido a que los dendrímeros tridimensionales contienen cavidades interiores en las que se pueden introducir otras moléculas, éstos pueden ser útiles para la administración de fármacos.

Compuestos. Los compuestos combinan unas nanopartículas con otras nanopartículas o con materiales de mayor tamaño. Las nanopartículas, como arcilla a nanoescala, ya se están añadiendo a numerosos productos, como piezas para automóviles o materiales de empaquetado para mejorar sus propiedades mecánicas, térmicas, protectoras, etc.

II.3 Generalidades sobre nanotubos de carbono.

El precursor de los NTC es el fullereno. Los fullerenos son una forma alotrópica del carbono y fueron descubiertos accidentalmente por los grupos de Smalley y Kroto en 1985 [28]. El intento de producir fullerenos dopados con metales resultó en el descubrimiento de los nanotubos, que fueron inicialmente denominados “Buckytubes”. Los nanotubos obtenidos eran cilindros cerrados en los extremos por un casquete esférico con la estructura de un fullereno. Los NTC fueron descubiertos en 1991 por Sumio Iijima [29] quien, trabajando en un microscopio electrónico, observó la existencia de moléculas tubulares en el hollín formado a partir de las descargas de arco eléctrico empleando grafito. Los nanotubos presentan diferentes estructuras en función de la orientación de los hexágonos del grafeno respecto del eje. Los nanotubos de carbono pueden ser de dos tipos: nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) y nanotubos de carbono de pared simple (NTCPS). Los NTCPM consisten en varios cilindros

coaxiales; cada uno hecho a partir de una lámina de grafeno alrededor de un hueco cilíndrico. El diámetro externo de un NTCPM es de 2 a 100 nm; el diámetro interno es de entre 1-3 nm, mientras que su longitud es de 1 a varios micrómetros [29a, 30].

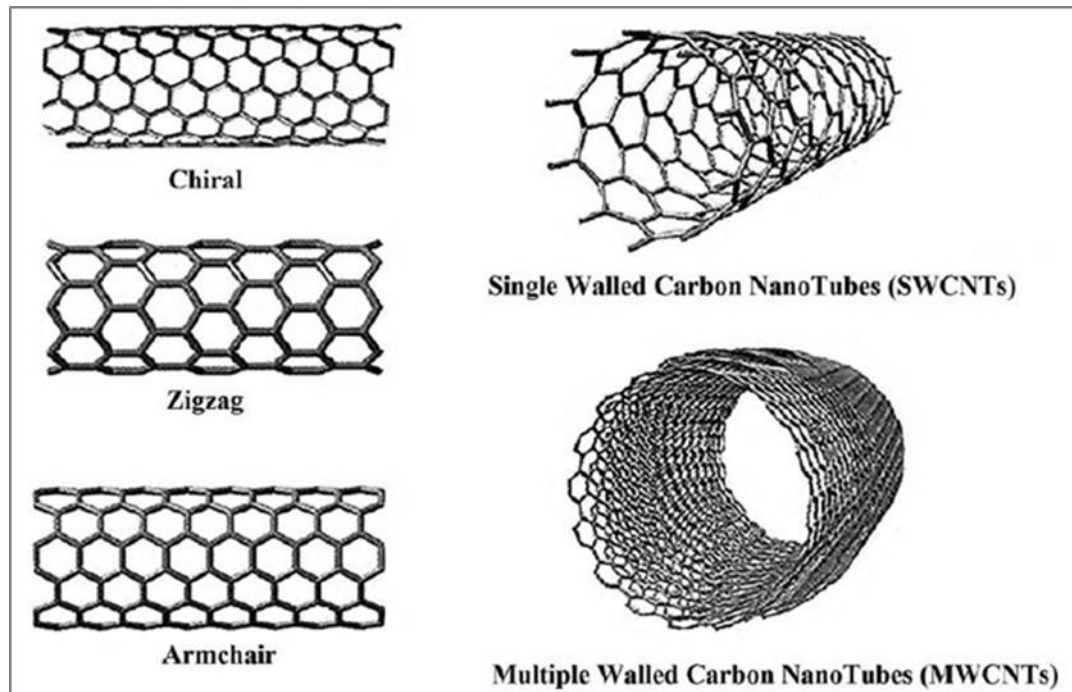


Figura 4. Nanotubos de carbono de pared simple y nanotubos de carbono de pared múltiple. Direcciones de los hexágonos. [29a]

Ha habido una intensa actividad científica relacionada a la síntesis y propiedades de los NTC, así como también al estudio de sus aplicaciones en varias áreas de la ciencia. Por ejemplo, la funcionalización química de los NTC permite su empleo como catalizadores, sensores moleculares y como interfase en sistemas biológicos. Los nanotubos de carbono presentan propiedades morfológicas, mecánicas y electrónicas excepcionales que permiten su aplicación en muchos campos de la ciencia: han sido utilizados en componentes electrónicos debido a su conductividad eléctrica y al reforzamiento de materiales dada su alta resistencia mecánica; o bien, han sido útiles para el almacenamiento de gases, destacando el almacenamiento de hidrógeno y su uso como soportes catalíticos [30,30a-30c, 31 y 32].

II.4 Métodos de preparación de nanotubos de carbono.

Existen varios métodos para producir nanotubos y nanofibras de carbono:

a). Arco de descarga eléctrica (grafito a 3000° C).

b). Ablación o erosión láser (1200° C).

c). Pirólisis de hidrocarburos (~ 1100 °C) [33].

d). La deposición química en fase vapor (CVD por sus siglas en inglés, Chemist Vapor Deposition) (~ 600-800 °C) utilizando metano e H₂ como reactivos [34, 35, 36].

Este último método, a través de la CVD, tiene la ventaja de que las estructuras de los catalizadores que inician el crecimiento de los nanotubos pueden ser definidos litográficamente. Así, los métodos catalíticos parecen ser de los más prometedores para la producción de nanotubos a gran escala. Además, las propiedades de estos materiales están fuertemente ligadas a su morfología y estructura, por lo que la síntesis de grandes cantidades de nanotubos y/o nanofibras de morfología y estructura específicas puede ser esencial, en vista de sus aplicaciones biomédicas [31, 37],

e). Pirólisis de aspersion o spray pirólisis [38, 39]. En esta técnica se hace uso de un horno tubular que se calienta a una temperatura estable de ~800°C, donde se encuentra un tubo de cuarzo por donde se hace pasar el gas argón como gas de arrastre y una mezcla de una fuente de carbono y un catalizador. Los nanotubos que se obtienen de este método de síntesis son de pared múltiple y se forman en las paredes del tubo de cuarzo. La síntesis y producción de los nanotubos de carbono de pared múltiple a usar en este trabajo fueron por el método de pirólisis de aspersion, en base al trabajo de Aguilar-Elguezabal y col. [38].

II.5 Funcionalización de nanotubos de carbono.

La funcionalización de los nanotubos de carbono tiene como objetivo principal el volver biocompatible al material. En varios estudios se ha observado que la aglomeración y baja dispersabilidad de los NTC prístinos (recién sintetizados) son factores que contribuyen a una alta toxicidad. La biocompatibilidad y biodegradabilidad de los NTC fue estudiada por Kostarelos y col. [40a, 40b] quienes demostraron que los NTC pueden ser degradados por enzimas oxidativas, así como también indicaron los distintos factores que afectan la tóxico-cinética y la acumulación de NTC en tejidos. La funcionalización de los NTC representa, en este sentido, una poderosa herramienta para lograr una adecuada dispersabilidad de los NTC en medios acuosos y de esta forma

hacerlos más biocompatibles. Hu y col. [40c] demuestran, en su trabajo, que es posible controlar el crecimiento y la ramificación de neuritas al modificar químicamente los NTC; su estudio indica que una adecuada funcionalización puede servir para diseñar andamios basados en NTC con un mejor desempeño para promover el crecimiento neuronal y el alargamiento de neuritas. En otro estudio, Jin y col. [40d] funcionalizaron NTCPM por un método de ionización con el cual lograron hacer que los nanotubos fueran solubles en agua.

Adicionalmente, otro objetivo de la funcionalización de NTC es la creación de grupos funcionales. En el trabajo de Kumar y col. [40e] se llevaron a cabo tres experimentos para controlar la localización y densidad de los grupos carboxílicos en la superficie de los NTCPM. El tratamiento con HNO_3 solamente atacó las puntas, resultando mínima o nula la oxidación de las paredes. Por otra parte, el tratamiento con $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ provocó oxidación no sólo en las puntas sino también en las paredes laterales de los nanotubos. El aumento en el tiempo de reacción durante el segundo tratamiento logró un incremento en la cantidad de grupos carboxílicos formados. Sin embargo, en el trabajo de Bardi y col. [40f] se observaron mejores resultados de los NTCPM funcionalizados solamente con la adición de grupos amino; es decir, sin haber pasado por el proceso de oxidación, mostrando una mayor tolerancia y una menor respuesta inflamatoria. Zhang y col. [40g] determinaron un método eficiente de caracterización de grupos funcionales formados con NTCPM que habían sido funcionalizados por algún método oxidativo. Para dicho trabajo primeramente funcionalizaron NTCPM con tres métodos distintos: HNO_3 , H_2O_2 y $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ (este último en relación 3:1) y llevaron a cabo una valoración ácido-base. Ellos resaltaron la importancia de caracterizar los grupos funcionales para poder potencializar el uso de estos NTCPM en distintas aplicaciones, principalmente como soportes catalíticos. La funcionalización de los NTCPM usados en este proyecto de tesis se realizó por el método ácido, usando ácido sulfúrico-ácido nítrico ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$) en relación 3:1 [40h]. Ramanathan y col. [40i] funcionalizaron NTCPM con grupos amino y amido a través de productos químicos que modificaron los grupos carboxilo introducidos en la superficie del nanotubo de carbono. Los nanotubos funcionalizados con amino permiten agregación de químicos adicionales a los NTCPM funcionalizados, y hacen posible el enlace covalente a polímeros y sistemas biológicos tales como ADN y carbohidratos.

II.6 Usos y aplicaciones biomédicas de los nanotubos de carbono.

Los nanotubos de carbono se han usado como andamios o “scaffolds” para el cultivo y crecimiento neuronal. Matson y col. [48] fueron los primeros que plantearon el uso de nanotubos de carbono funcionalizados como sustratos para el crecimiento neuronal en cultivo. Posteriormente, distintos investigadores han utilizado nanotubos de carbono, tanto de pared simple como de pared múltiple, como material de soporte o andamio para cultivo de células nerviosas aisladas o bien para el cultivo de tejido nervioso de cerebro y médula espinal [41- 48]. Los estudios realizados por Vladimir Purpura [41, 47] demostraron que existe crecimiento neuronal con nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados. También resaltan los trabajos realizados por Laura Bellerini y col. [42, 43] quienes cultivaron explantes (rebanadas) de médula espinal de rata, demostrando que los nanotubos de carbono pueden ser adecuados para favorecer el crecimiento neuronal y el fortalecimiento de circuitos sinápticos entre neuronas.

Las propiedades de biocompatibilidad y baja toxicidad de los NTC han sido ampliamente aprovechadas para el cultivo de células; inclusive para el cultivo de células troncales o progenitoras de distinta especie, encaminando este abordaje experimental a la terapia regenerativa y a la ingeniería de tejidos [49-56]. Shin y col. [50] recientemente reportaron que la asociación de nanotubos de carbono reforzados con hidro-micro-geles favorece una encapsulación de las células que pueden ser utilizadas para trasplante. Los nanotubos de carbono solos o en distintas compostas han permitido el cultivo y diferenciación de células troncales neuronales humanas [49], así como la diferenciación y proliferación de células troncales pluripotentes [54], el desarrollo y absorción de células troncales mesenquimales [53, 56] y el de células troncales neurales corticales [53, 55]. Vittorio y col. realizaron investigaciones muy relevantes con los NTCPM asociados a células troncales o “stem cells”. Estos investigadores cultivaron células progenitoras de sangre periférica con NTCPM; las células fueron inyectadas vía intravenosa a especímenes de laboratorio y pudieron ser visualizadas y monitoreadas usando técnicas de resonancia magnética nuclear [51]. Al cargar las células troncales de sangre periférica con NTCPM magnetizados, estos autores pudieron guiar a las células, usando magnetos de alta potencia, a sitios específicos en el hígado de rata [52].

Tomando en cuenta las propiedades de baja resistencia, alta conductividad eléctrica y poca toxicidad que tienen los NTC, diversos investigadores han realizado experimentos usando estos nanomateriales como medios o interfaces para estimulación y registro de células nerviosas. Para esto han usado células nerviosas aisladas en cultivo o tejido nervioso (rebanadas de cerebro) y las han conectado con electrodos o dispositivos hechos a base de NTCPs o NTCPM [18, 57-64]. Los NTCPM se han utilizado en la configuración de microarreglo de multielectrodos para el estudio de las propiedades eléctricas y químicas de neuronas [57]. Electrodos hechos a base de NTCPM o NTCPs en forma de placa y colocados en la base de cámaras de cultivo de tejidos se han utilizado para el registro extracelular de células neuronales en cultivo [58-63]. Por último, electrodos convencionales de registro extracelular hechos a base de platino o tungsteno han sido recubiertos con NTC [64]. Entre estos trabajos destaca el realizado por el grupo liderado por Laura Bellerini, quienes han demostrado que es factible la interacción de células nerviosas cultivadas sobre placas de nanotubos de carbono, permitiendo registros de la actividad eléctrica sináptica de células nerviosas aisladas y en circuitos neuronales [58-63]. Sin embargo, todos los estudios referidos no respaldan la hipótesis de que los nanotubos de carbono por sí mismos establezcan conexiones eléctricas o sinapsis eléctricas para conectar células nerviosas entre sí.

Además de la capacidad que tienen los NTC de favorecer el crecimiento neuronal, estos materiales también se han usado para el monitoreo y biosensado de células vivas [65-68]. McLamaore y col. han utilizado específicamente NTC como biosensores de glutamato y han podido medir, en tiempo real, el flujo de L-glutamato neuronal [65]. Schrlau y col. utilizaron nanopipetas de carbono para inyección de sustancias y registro celular [66]. Raffa y col. han llevado a cabo la permeabilización de células sin uso de cables, usando NTC para depósito de drogas y captura de material genético [67]. Recientemente se ha reportado el uso de NTCPM para el monitoreo de glucosa [68].

II.7 Nanotubos de carbono como conductores eléctricos.

Los NTC han sido identificados como superconductores, acarreadores de carga y de corrientes eléctricas [69-74]. Recientemente, Zhang y col. [69] alinearon cordones hechos de NTC y los colocaron en medio de una bicapa tipo sándwich de superconductores epitaxiales con lo que demostraron que se mejora la conductividad de este dispositivo. Murata y col. [71] también han demostrado la superconductividad de NTC dopados con boro. Kasumov y col. [74] demostraron la presencia de súper corrientes a través de NTCPs; mientras que Pang y col. [70] identificaron corrientes iónicas gigantes en canales formados por NTC. Se ha podido medir, en forma confiable, la capacidad que tienen los NTC como acarreadores de carga alcanzando niveles por arriba de 10^9 A/cm² [73]. Berger y col. [72] han sugerido que esta gran conductividad eléctrica que poseen los NTC se debe a la conducción balística de cargas a través de los NTCPM. Con base en todos estos hallazgos experimentales podemos concluir que los NTCPM no bloquean las corrientes eléctricas en dispositivos electrónicos; más bien son favorecedores de la conducción eléctrica. Esto último fundamentaría la hipótesis de que los NTCPM no bloquean las corrientes que subyacen a las propiedades eléctricas de células nerviosas.

II.8 Nanotubos de carbono como moduladores de canales iónicos en células excitables.

Existen datos controversiales sobre el papel de los nanomateriales de carbono como facilitadores o bloqueadores de flujos de corriente en canales iónicos membranales. Siwy y Devenport [75] han planteado que los NTCPs pueden ser usados para detectar moléculas aisladas de ácido desoxirribonucleico (ADN), dada la capacidad que tienen estas moléculas de pasar a través de los nanotubos bajo la influencia de la aplicación de un campo eléctrico. Los eventos de translocación del DNA al pasar por los nanotubos crean corrientes pico equivalentes a 10^7 electrones de carga, lo que indica que esto puede estar relacionado con el fenómeno de polarización que ocurre a la entrada de los nanotubos. En un interesante arreglo experimental, Huang y col. [76] han planteado la integración de una bicapa lipídica artificial con NTCPs acoplados a un transistor FET. Este arreglo experimental puede sensor la actividad de ionóforos como son la gramicidina y la alcymicina incorporados al medio lipídico. Estos experimentos muestran la capacidad que presentan los NTC para permitir flujos iónicos, de tal manera

que dicho arreglo pudiera usarse en los estudios de receptores membranales que activan canales iónicos dependientes de ligando y de voltaje. Aunado a los trabajos mencionados, Lacerda y col. [77] así como Semberova y col. [78] han reportado que los NTCPM pueden producir la activación de plaquetas sanguíneas al favorecer un influjo masivo de Ca^{++} al interior celular, permitiendo un aumento en la secreción de micropartículas y gránulos plaquetarios; más aún, dichos autores demostraron que los NTCPM causan una liberación de Ca^{++} de almacenes intracelulares. Por otro lado, contrario a lo anteriormente expuesto, otros investigadores han planteado que los NTC pueden ser bloqueadores específicos de canales iónicos membranales [79-81]. Jakubeek y col. [79] reportaron que los NTCPM dispersados en soluciones fisiológicas y aplicados en células neuronales inhibieron la corriente de calcio $I_{\text{Ca}^{2+}}$ a través del canal de calcio de dichas neuronas con una IC_{50} de 1.2 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo se demostró que dicho bloqueo no es debido a la acción misma de los nanotubos sino a la presencia de material contaminante de Yttrium presente en los nanotubos. En otro interesante trabajo, Xu y col. [80] mostraron que los NTCPM suprimen las corrientes de canales de K^+ tipo I_{to} , I_{K} y I_{K1} presentes en células PC-12. Reforzando dichos resultados, Park y col. [81] demostraron que los NTCPM funcionalizados resultan ser bloqueadores específicos de canales de K^+ . Recientemente, Gavelo y col. [82] estudiaron los efectos de los NTCPM sobre las propiedades electrofisiológicas de las células cromafines de ratón. La exposición de los NTCPM a concentraciones crecientes entre 30-263 $\mu\text{g/mL}$ aplicados por 24 horas redujo la resistencia de entrada de la membrana celular y la actividad eléctrica espontánea de las células. Las células activas que resistieron los efectos de los nanotubos de carbono presentaron un potencial de reposo más positivo; es decir, estuvieron ligeramente despolarizadas teniendo una mayor frecuencia de disparo y no presentaron alteraciones en la magnitud de las corrientes de Ca^{2+} , Na^+ ni K^+ . Sin embargo, la cinética de inactivación del canal BK de potasio que depende del Ca^{2+} sí disminuyó. También se observó la internalización de los NTCPM, confirmándose lo anterior con estudios de microscopía electrónica de transmisión. Los resultados experimentales presentados aquí no permiten concluir en forma definitiva que los NTCPM son bloqueadores selectivos de canales iónicos. Más aún, no existe evidencia experimental donde se reporte el efecto bloqueante de los NTCPM sobre los canales iónicos que dependen de ligando, como son los canales iónicos activados por L-glutamato, acetilcolina o dopamina.

III Justificación.

Las secuelas clínicas derivadas de lesiones neurológicas, ya sean traumáticas o degenerativas, dependen del área donde las lesiones se originen; en caso de que exista una posible regeneración neuronal es poco probable que las terminales nerviosas recuperen su trayectoria original, por lo que la persona que sufre la lesión adquiere cierto grado de discapacidad [8-11]; por lo tanto, es indispensable buscar la forma de disminuir las consecuencias de estas lesiones intentando restaurar las funciones del sistema nervioso.

Actualmente se han desarrollado distintos dispositivos en ingeniería biomédica, los cuales emplean interfaces neuronales para estimular o registrar las señales bioeléctricas del sistema nervioso. En una interfaz neuronal, el electrodo es el elemento que se encuentra en contacto directo con el material celular; y es precisamente el electrodo el encargado de establecer la conexión con el sistema nervioso para favorecer la estimulación eléctrica, o bien para efectuar la transducción de señales bioeléctricas a movimientos mecánicos [12-17]. En el diseño de los electrodos actuales utilizados en interfaces neuronales se emplean materiales que no satisfacen completamente los criterios de biocompatibilidad a largo plazo, ni satisfacen la especificidad de adquisición/estimulación; pero sobre todo, son de dimensiones físicas muy grandes: del orden de milímetros o centímetros [12-17 y 20-22]. Con base en lo anterior es que resulta indispensable buscar nuevas alternativas tecnológicas que optimicen y mejoren las interfaces neuronales. Esto se puede lograr con el uso de nanomateriales de carbono, específicamente los NTCPM. Se ha planteado que los NTCPM pueden usarse en la construcción de electrodos que permitan registrar e interconectar al tejido neuronal con dispositivos de estimulación y registro de señales. El proceso de adquirir y transmitir señales bioeléctricas a partir de estos nanotubos se fundamenta en las dimensiones nanométricas de los nanotubos, en su alta capacidad de conducción eléctrica y en su capacidad de adherirse a las membranas celulares.

Ya se han usado distintos NTCPM y NTCPS como andamios o “scaffolds” para cultivo de células nerviosas, y se han reportando resultados controversiales de supervivencia y crecimiento neuronal. Debido al tamaño y a la morfología de los NTCPM y de los NTCPS, y a su hidrofobicidad intrínseca, ha sido difícil identificar su dispersión adecuada en medios acuosos y sobre todo demostrar la posible interacción directa de los NTC con

la membrana celular neuronal. No se ha estudiado a profundidad la interacción que los NTCPM tienen cuando están dispersos en soluciones extracelulares y su posible adhesividad a la membrana celular, ni el posible bloqueo de señales eléctricas en neuronas. En este sentido, no se ha demostrado si los NTCPM bloquean la actividad eléctrica de neuronas y otras células excitables cuando son depositados en el exterior celular; es decir, no está claro si dichos NTCPM bloquean canales iónicos, dependientes de voltaje y dependientes de agonista, que subyacen a las señales bioeléctricas neuronales. Falta por resolver si los NTC, dadas sus propiedades físicas y electroconductoras, pueden lograr una continuidad morfológica y eléctrica entre dos neuronas.

IV Hipótesis.

Los NTCPM interactúan con la membrana celular de neuronas de *Helix aspersa* sin tener efectos citotóxicos ni efectos bloqueantes de las señales bioeléctricas neuronales.

V Objetivos del proyecto.

V.1 Objetivos generales.

- V.1.1 Estudiar las propiedades ultraestructurales de los NTCPM dispersos en soluciones acuosas y depositados en las neuronas del ganglio del caracol de jardín *Helix aspersa*.
- V.1.2 Estudiar las propiedades eléctricas de los NTCPM depositados sobre distintos materiales.
- V.1.3 Estudiar los posibles efectos citotóxicos de los NTCPM sobre las señales eléctricas de las neuronas del caracol de jardín *Helix aspersa*.

V.2 Objetivos específicos.

- V.2.1 Evaluar distintos compuestos químicos y medios físicos para dispersar los NTCPM en soluciones acuosas.
- V.2.2 Evaluar los posibles efectos de cito-toxicidad y bloqueo de señales bioeléctricas de NTCPM dispersados y disueltos en la solución extracelular Ringer de caracol que baña a las neuronas en fase aguda (1-30 minutos).

Las señales bioeléctricas a analizar son:

- i) Potencial de membrana.
- ii) Actividad eléctrica espontánea.
- iii) Hiperpolarización postetánica.
- iv) Potencial de acción cálcico.
- v) La despolarización membranal activada por receptores a glutamato y acetilcolina.
- vi) La hiperpolarización de membrana inducida por receptores a dopamina.

V.2.3 Realizar estudios morfológicos y ultraestructurales usando técnicas de: microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión; así como estudios de microscopía de fuerza atómica y de microscopía confocal con el propósito de:

- i) Caracterizar las propiedades morfológicas y ultraestructurales de los NTCPM dispersados en soluciones acuosas.
- ii) Estudiar la distribución topográfica de los NTCPM depositados en distintas superficies: papel bond, vidrio, cobre y filtros de PVDF.
- iii) Estudiar la interacción de los NTCPM con las membranas celulares de las neuronas de *Helix aspersa* y la distribución de los NTCPM en dichas membranas celulares.

V.2.4 Estudiar las propiedades electroconductoras de los NTCPM cuando son incorporados a electrodos de registro extracelular con el propósito de evaluar si dichos nanotubos pueden detectar y registrar señales bioeléctricas.

VI Material y métodos.

VI.1 Preparación biológica.

Las neuronas identificadas del invertebrado caracol de jardín *Helix aspersa* se usaron como preparación biológica en esta tesis. En esta preparación se estudiaron los posibles efectos que los NTCPM tienen sobre la morfología neuronal y sobre las propiedades bioeléctricas de dichas neuronas.

Estas neuronas presentan propiedades bioeléctricas y canales iónicos similares a los que se presentan en neuronas de mamífero, por lo que dichas neuronas se han utilizado como modelos biológicos en múltiples estudios en el campo de la investigación básica en las neurociencias.

Las neuronas identificadas del ganglio de caracol de jardín *Helix aspersa* fueron seleccionadas porque presentan distintas ventajas para el desarrollo de este proyecto:

i).- Existen mapas, como el que se muestra en la Figura 5, que permiten identificar topográfica, morfológica y electrofisiológicamente el tipo de célula con la que se desea trabajar [103].

ii).- Las neuronas que se utilizaron en esta investigación (1F, 2F, 76F, 77F, 1D y 2D) son las más grandes de la masa ganglionar. Estas neuronas llegan a medir hasta 250 micrómetros de diámetro, por lo que resulta fácil identificarlas morfológica y funcionalmente pues presentan actividad eléctrica espontánea y pueden ser penetradas con más de un microelectrodo para su estudio electrofisiológico.

iii).- Ya se conocen las concentraciones libres de los diversos iones en estas neuronas, tanto extracelular [104] como intracelularmente [105, 106, 107].

iv).- Se conoce la naturaleza y la cinética de las corrientes iónicas que subyacen a sus potenciales de acción, como son las corrientes iónicas de sodio, potasio y calcio. [108-116]. En ausencia de sodio, las neuronas de caracol pueden generar potenciales de acción dados exclusivamente por calcio, conocidos como potenciales de acción cálcicos. Los potenciales de acción cálcicos (PA-Ca²⁺) y la corriente entrante de calcio que depende del voltaje (I_{Ca2+}) son dos maneras indirectas de evaluar la activación de canales de calcio dependiente de voltaje en estas neuronas [113-117].

v).- Las corrientes de calcio dependientes de voltaje (I_{Ca²⁺}) en las neuronas de *Helix aspersa* han sido caracterizadas y demostradas tanto cualitativa como cuantitativamente [108, 109, 110, 111, 113, 114, 115 y 116]. Existen evidencias experimentales que sugieren que el canal de calcio presente en las neuronas del invertebrado *Helix aspersa* es fundamentalmente del tipo L [117], el cual tiene una alta conductancia iónica y es altamente sensible a las dihidropiridinas.

vi).- Además, en dichas neuronas se ha identificado la presencia de distintos receptores transmembranales del tipo colinérgico, glutamatérgico y dopaminérgico [103].

vii).- La mayoría de las células del ganglio cerebral de *Helix aspersa* tienen actividad eléctrica espontánea; es decir, tienen actividad eléctrica tipo marcapaso con generación espontánea de potenciales de acción en forma de trenes o ráfagas.

viii).- Por último, estas neuronas pueden ser estudiadas a temperatura ambiente sin requerir de mantenimiento ni de control de temperatura, ni de oxigenación.

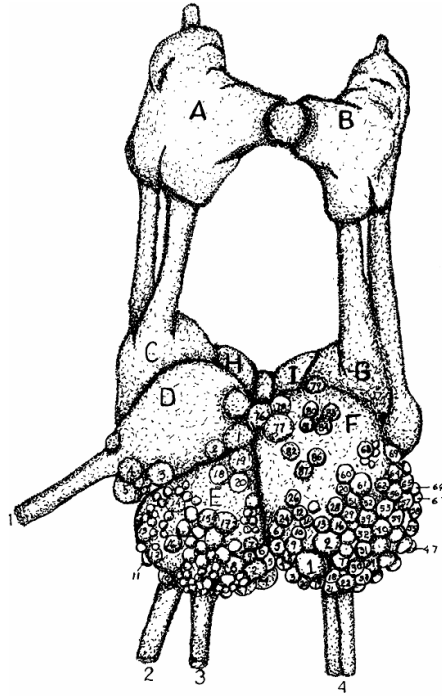


Figura 5. Diagrama esquemático de la masa ganglionar periesofágica del caracol de jardín *Helix aspersa*. Tomado de Kerkut y col., 1975 [103].

VI.1.2 Disección y aislamiento del ganglio cerebral de *Helix aspersa*.

Los caracoles fueron hidratados y alimentados con lechuga tres horas antes de iniciar los experimentos. La masa ganglionar subesofágica y periesofágica del caracol se extrajo cuidadosamente usando técnicas de microdissección; dicha masa se colocó en una caja de Petri cuyo fondo estaba recubierto con polímero plástico tipo “Sylgard-184”. La caja de Petri estaba previamente llena con solución Ringer de caracol. Utilizando un microscopio estereoscópico (Meiji, Japan) y material de microdissección, se procedió a fijar la masa ganglionar a la base de la cámara con minucias o mini-alfileres. Se retiró la membrana de tejido conectivo que envuelve a la masa ganglionar. Posteriormente, con el propósito de reblandecer una segunda membrana que cubre de forma directa a las neuronas de los ganglios, se aplicó la enzima proteasa tipo XIV

(Sigma-Aldrich) a una concentración de 5 mg/mL en solución Ringer de caracol; incubándose las neuronas en esta solución durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Después de la acción de la proteasa, la preparación se lavó con Ringer de caracol fresco para detener la acción de la enzima. Se procedió entonces a exponer las neuronas de los ganglios parietales derecho e izquierdo mediante microdissección. Esto se logró retirando la membrana que cubre a las neuronas (la cual para esta etapa ya había sido reblandecida por la acción enzimática) utilizando pinzas de relojero y tijeras de microdissección tipo “castro viejo”. Se utilizó una fuente de luz fría para lograr una observación adecuada de las neuronas, que por iluminación tangencial incidía directamente en la caja de Petri.

VI.2 Dispositivo y arreglo experimental usado en el desarrollo de experimentos electrofisiológicos.

En este trabajo de tesis se realizaron experimentos electrofisiológicos de registro intracelular en el modo de fijación de corriente para el monitoreo de señales bioeléctricas de neuronas del caracol de jardín *Helix aspersa*.

El dispositivo o arreglo experimental consistió de un preamplificador (Dagan 8500) al cual se le conectó un microelectrodo de vidrio insertado en un “holder” o soporte de electrodo hecho a base de plexiglás. Los microelectrodos de vidrio fueron llenados con una solución de KC 1M ó 3M. Dichos microelectrodos de registro intracelular permiten pasar corriente y registrar el potencial transmembranal a través del mismo microelectrodo. Las señales de corriente y voltaje que se obtuvieron del preamplificador (canal de corriente y canal de voltaje) fueron enviadas a un osciloscopio HITACHI modelo V-212 de 20MHz y a un registrador de dos canales marca General Scanning Inc. modelo RS2-59. Las señales de corriente y voltaje también fueron conectadas a una interface Digidata 1200 (Axon Instruments) y a una unidad de captura y digitalización marca DAQ para registro, adquisición y digitalización de señales bioeléctricas de neuronas. En los experimentos en que se usó la interface Digidata 1200 se utilizó el programa pClamp para la adquisición y análisis de señales. Este arreglo experimental también incluyó un estimulador de señales eléctricas modelo S5-Stimulator (Grass Inst.) el cual se utilizó para la aplicación de pulsos estimulantes, tanto hiperpolarizantes como despolarizantes. Con estos pulsos aplicados al “input” de corriente del amplificador, se

pudo medir la resistencia de los microelectrodos y la resistencia de transmembrana de las neuronas. El arreglo experimental se ilustra en la Figura 6.

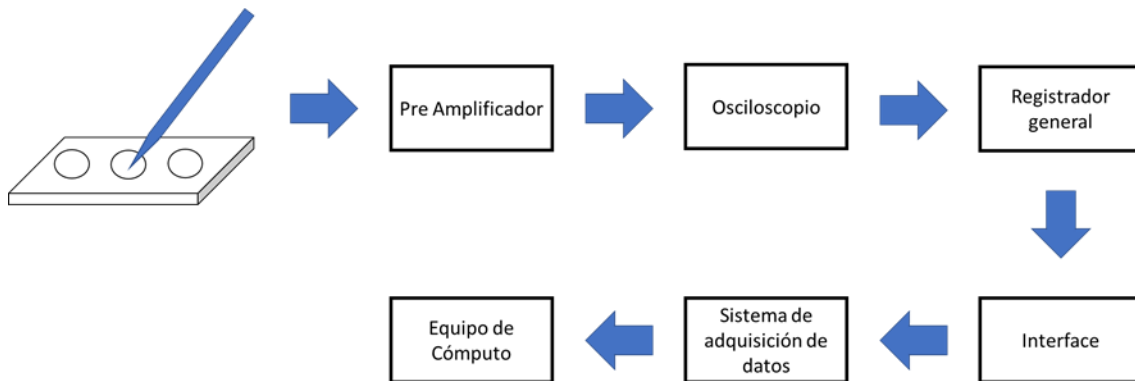


Figura 6. Diagrama esquemático del dispositivo experimental para registro de señales bioeléctricas.

VI.2.1 Conexiones del amplificador DAGAN 8500 y de la interface Digidata 1200 A/D para la realización de experimentos electrofisiológicos en el modo de fijación de corriente.

1.- Primeramente se conecta el conector BNC localizado en la parte posterior del amplificador Dagan 8500, el cual es una salida de voltaje x10. Esta conexión transmite la señal de potencial de membrana de la célula, amplificada x10. Dicha conexión es llevada al canal 1 del osciloscopio, al canal 1 del graficador y al convertidor analógico digital (A/D Digidata 1200) en el canal 1 de la entrada "Analog in".

2.- El monitor de corriente del amplificador Dagan 8500 tiene conexiones BNC que reciben los estímulos de corriente; una de ellas se encuentra en la parte frontal del amplificador y es denominada "stimulus input", la cual se conecta a un estimulador Grass S5.

3.- Por otro lado, en la parte trasera del amplificador se encuentra una entrada analógica de corriente que es conectada al canal 0 del "Analog out" de la Digidata 1200; esta conexión servirá para aplicar estímulos de corriente usando la interface Digidata 1200.

4.- Existe otra conexión denominada "stimulus monitor", que es la salida del monitor de corriente y se conecta al canal 0 del convertidor A/D Digidata 1200 de la entrada "Analog in" y al canal 2 del osciloscopio.

5.- El propósito de estas conexiones, entre el amplificador Dagan 8500 y el convertidor A/D Digidata 1200, es permitir la aplicación de pulsos de corriente y monitorear los cambios de corriente y voltaje de la célula, utilizando el programa pCLAMP 5.7.1.

VI.2.2 Conexiones del amplificador Dagan 8500 y el convertidor analógico-digital DAQ modelo USB1208FS.

El uso del convertidor A/D DAQ modelo USB-1208FS permite un mayor tiempo de adquisición de datos, mayor a 1KHz. Esto resultó conveniente para registros en los que fue necesario registrar y analizar señales eléctricas por largos períodos (entre 10 y 32 segundos) como sucedió al evaluar el efecto de un fármaco sobre la actividad eléctrica de las neuronas y sobre la activación de receptores membranales. A continuación se describen los pasos necesarios para conectar la interface DAQ, con el amplificador Dagan 8500:

1. Para el funcionamiento adecuado de la tarjeta USB-1208FS es necesario calibrarla; esto se hace conectando el puerto USB de la tarjeta a la PC. Posteriormente, de forma manual, se prosigue a abrir el programa "Instacal". Se selecciona la tarjeta que se está utilizando y se da click en la opción "Calibrate" (se encuentra en la parte superior de la ventanilla); se da nuevamente click en A/D y se espera un minuto a que el programa reconozca la tarjeta.
2. Una vez que se han seguido los pasos del punto 1 se abrirá una nueva ventana en donde se seleccionarán el canal 0 y el canal 1. Ya hecho esto, se le dará click en la opción Ok y se seguirán las instrucciones que la ventana indique. Es necesario tener un protoboard y cables cercanos y disponibles para ser usados en el proceso de calibración.
3. Una vez calibrada la tarjeta se deben cerrar todas las ventanas y acceder al programa "TracerDAQ". Inmediatamente se abrirá una ventana en donde se marcará la opción "Strip Chart" y posteriormente "Run".
4. Se abrirá la ventana en donde se visualizará el registro de los datos adquiridos. Ir al menú "Edit" y dar click en la opción "DAQ Hardware Settings" en donde se seleccionarán los canales 0 y 1 (también los otros dos si se lo solicita para 2 células) para activarlos y también seleccionar el rango de voltaje (± 10 V) que sea

necesario. En la opción “DAQ Selection Filter” dar click y seleccionar “Analog in only” y finalmente dar Ok.

5. Ir al menú “Edit” y dar click en la opción “Channel Settings” en donde se podrá cambiar el color del canal 0, 1, 2 ó 3. También aquí se puede elegir que alguno de estos canales sea invisible al momento de adquirir los datos. Por lo general, los canales 2 y 3 son invisibles por default.
6. Por último, ir al menú “Edit” y dar click en la opción “Scan Rate/Trigger Settings”. En esta opción podrán modificarse la frecuencia de muestreo y el tiempo de adquisición de los datos. Recordar que al incrementar el tiempo de adquisición la frecuencia de muestreo es menor y por lo tanto será menor el número de muestras; eso afecta la calidad del registro y se debe modificar el tiempo y la frecuencia de muestreo. El programa avisa, por medio de una nota en color rojo, si el tiempo es muy largo para la frecuencia de muestreo seleccionada.

Nota: para una frecuencia de muestreo de 1KHz se pueden adquirir datos durante 32 segundos, lo cual es adecuado ya que en la tarjeta Digidata, para una frecuencia de 1KHz, sólo se puede adquirir 1 segundo.

VI.2.3 Adquisición de señales con el sistema DAQ.

Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Encender la computadora. Se requiere que al encender la computadora el sistema DAQ se encuentre conectado por una de las entradas USB de la computadora.
2. Configuración. Abrir el programa InstaCal e ir al menú; en la opción install dar click en la pestaña No. of Channels; seleccionar la opción 8 single ended; ir a la pestaña External Clock Type y seleccionar Continuous, aceptar y cerrar InstaCal.
3. Visualizar las señales. Abrir el programa TracerDAQ, seleccionar en forma secuencial las opciones Strip Chart y Run.
4. Configuración. En el menú de Strip Chart dar click en Edit, seleccionar DAQ hardware settings y seleccionar el sistema de adquisición DAQ. El número de canales a muestrear se selecciona desde channel settings.
5. Editar. En la opción de Edit, Scan Rate/Trigger Settings se modifica la frecuencia de muestreo y el tiempo de adquisición de señal.

6. Pantalla. En la vista preliminar del sistema TracerDAQ se puede controlar el momento en que la adquisición deba iniciar, así como también controlar la resolución de los datos. Esto se realiza en el ícono de play y en el ícono A.
7. Espacio temporal. La resolución espacial y temporal puede ser modificada al mismo tiempo que los datos son adquiridos. En la parte superior izquierda se encuentra la opción TimeBase; esta opción se puede manipular mediante un par de botones, ya sea para incrementar la resolución del tiempo o para disminuirla.
8. Ejes. Existen dos ejes en la pantalla con los cuales se puede realizar una medición para tiempo o voltaje. Al abrir el programa TracerDAQ, en la pantalla aparecen estos ejes todo el tiempo, incluso durante la adquisición de datos; normalmente se encuentran de forma vertical, pero pueden ser cambiados a forma horizontal dando doble click sobre cada uno de ellos.

VI.3 Microelectrodos de registro intracelular y electrodos de referencia.

VI.3.1 Microelectrodos de registro intracelular.

Los microelectrodos utilizados para el registro intracelular son pipetas capilares de vidrio de borosilicato conteniendo, en su luz, un filamento interno que permite su fácil llenado. Para obtener pipetas con resistencia y forma óptimas, se utilizó un estirador vertical (Vertical Pipette Puller Model DKI 700-C). El método para la obtención de microelectrodos consistió en fijar un tubo de vidrio en ambos extremos del estirador sostenido por las gomas del mismo, de modo que el tubo de vidrio quedara en el centro de la resistencia del estirador; al calentarse la resistencia y jalarse los extremos se lograron obtener dos electrodos con puntas micrométricas (entre 1-2 micrómetros). En la figura 7a se muestra el tubo de vidrio fijado en el estirador. En la figura 7b se muestra cómo la aplicación de corriente a la resistencia del estirador calienta la pipeta de vidrio en la parte central, y por la aplicación del “pulling” o jalado del estirador forma dos micropipetas o microelectrodos. El paso siguiente consistió en hidratar a los microelectrodos. Este proceso de hidratación es fundamental, ya que favorece el llenado de la punta de los electrodos al abatir la tensión superficial. Para hidratarlos, éstos fueron colocados en una caja Petri con un filtro Whatman No. 40 en la base de la caja de Petri. El filtro se humedeció con agua destilada y los microelectrodos se dejaron en

reposito durante 30 minutos a 4°C. Después de haberlos hidratado se puso una gota de KC 1M en la parte posterior de cada electrodo y éste se dejó en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Esta gota del KCl 1M pasa a la punta del electrodo por capilaridad. Por último se llenaron los electrodos con solución KCl 1M, filtrada a través de un filtro Corning 20 CA de 0.22 µm. Para el llenado se utilizó una aguja Microfil 34 Gauge de 67 mm de longitud (World Precision Instruments), Ver Figura 7c.

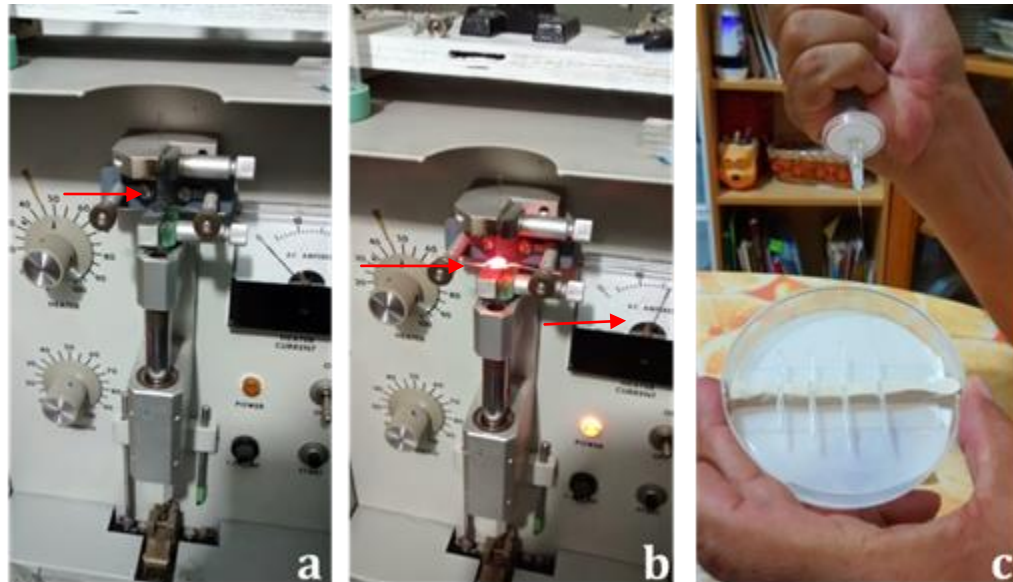


Figura 7. Dispositivo usado para fabricación de micropipetas o microelectrodos de registro. Se presenta en a) el estirador vertical de pipetas soportando el tubo capilar de borosilicato antes de estirarse por calor. En b) se muestra cómo la resistencia del estirador se calienta por la aplicación de una corriente; esto calienta la parte central de la pipeta que al ser jalada hacia abajo forma dos micropipetas o microelectrodos. Las flechas rojas indican el calentamiento de la resistencia por la aplicación de una corriente. En c) se ilustra cómo son llenados los microelectrodos con la solución de KCl 1 M

Una vez que los electrodos de registro ya fueron llenados con KCl 1M se insertan en el soporte de electrodos hecho de lucita (“holder” del electrodo) como se muestra en la Figura 8b, el cual tiene una peleta de plata-plata clorurada (Ag-AgCl_3) que al estar en contacto con la solución de KCl 1 M establece la conexión eléctrica con el preamplificador Dagan 8500. De esta manera el microelectrodo puede monitorear las señales bioeléctricas de las neuronas.

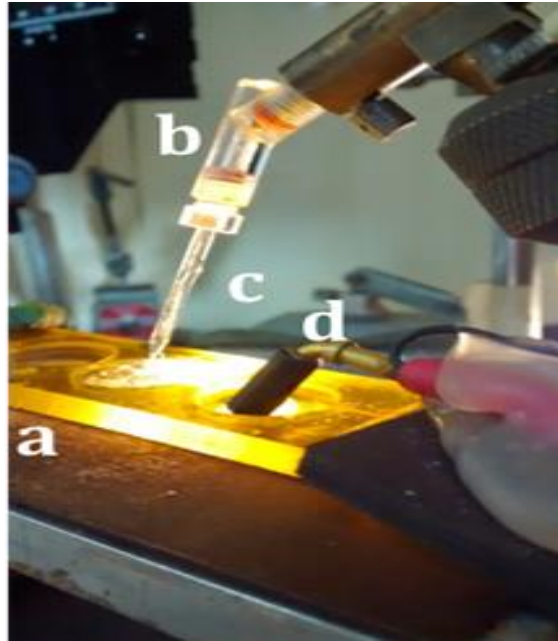


Figura 8. Arreglo experimental del sistema de registro en experimentos electrofisiológicos. a). Cámara de registro donde se coloca la masa ganglionar de *Helix aspersa.*, b). Soporte o holder del electrodo que contiene, en el interior, un alambre de plata-plata clorurada, c). Microelectrodo de registro, d). Electrodo de referencia, el cual es una pastilla de plata-plata clorurada que se conecta a la tierra o “ground” del amplificador de registro Dagan 8500.

VI.3.2 Electrodo de Referencia.

El electrodo de referencia utilizado en los experimentos de registro intracelular consiste en una pastilla o “pellet” de Ag-AgCl₃. Este electrodo se coloca en la poza C de la cámara de registro (ver Figura 8d). Este electrodo de referencia se conecta a través de un cable tipo BNC a la entrada de tierra o “ground” del preamplificador Dagan 8500.

VI.4 Cámara de registro y sistema de perfusión.

VI.4.1 Cámara de registro.

En los experimentos reportados en esta tesis se utilizó una cámara de registro (ver Figura 9) la cual fue fabricada a base de plexiglás. A esta cámara se le realizaron 3 perforaciones, se montó sobre un portaobjetos de vidrio y se pegó con silicón transparente para peseras. Cada poza fue cubierta con silicón transparente tipo Sylgard-184 (Dowconrning). La cámara consta de 3 pozas: A, B y C. La poza A se utiliza como entrada o “input” de la perfusión de soluciones experimentales; en la poza B se coloca el ganglio de caracol a utilizar en cada experimento, así como el microelectrodo de registro;

la poza C se utiliza para colocar el electrodo de referencia, además de la colocación de la salida o succión (output) de la perfusión, como se ilustra en la Figura 9.

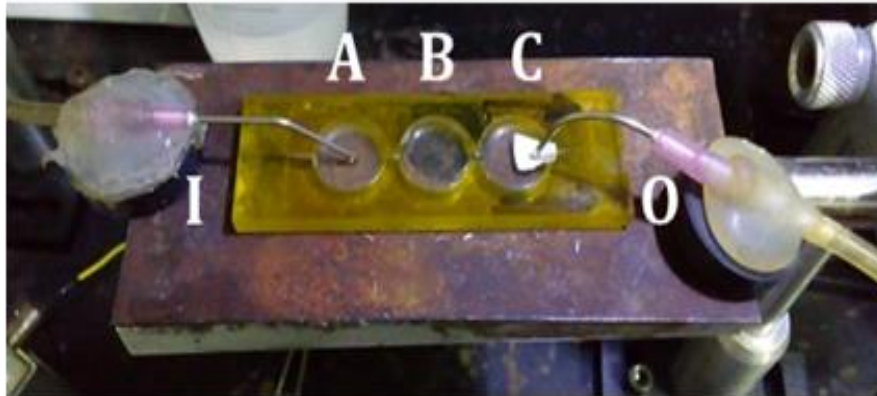


Figura 9. Arreglo experimental para perfundir soluciones experimentales en la cámara de registro. I es el input o entrada de la perfusión; O es el output o salida de la perfusión de la solución extracelular; A es la fosa que recibe la perfusión; C es la fosa que contiene la conexión para salida de la perfusión; B es la fosa central donde se deposita el ganglio cerebral de *Helix aspersa*.

VI.4.2 Sistema de perfusión.

Durante el desarrollo de los experimentos electrofisiológicos, el ganglio cerebral de *Helix aspersa* fue perfundido constantemente con la solución Ringer de caracol (SRC) sola o complementada con distintas sustancias experimentales tales como: cadmio, NTCPM, agonistas y antagonistas de receptores membranales, etc. Para lograr una perfusión constante, estable, de tipo flujo laminar y sin perturbaciones mecánicas, se implementó un sistema de perfusión que consistió de cuatro jeringas de plástico de 60 mL cada una, a las cuales se les adaptaron tubos de plástico de equipos de venoclisis con normogotero. Estos tubos de plástico se conectaron a una llave de perfusión de seis vías. En la primera jeringa se colocó la SRC que actuó como solución control en los experimentos, y además fue utilizada para realizar los “lavados” correspondientes después de haber usado las distintas sustancias experimentales y así regresar a la célula a su estado basal. Las jeringas restantes se llenaron con las sustancias con las que se trabajó en cada experimento. La figura 10 muestra este sistema. La letra K señala la llave de seis vías; la salida común de la llave de seis vías se conectó al sistema de “input” o entrada de la cámara de registro que se deposita en la fosa A de la misma cámara (ver Figura 9).

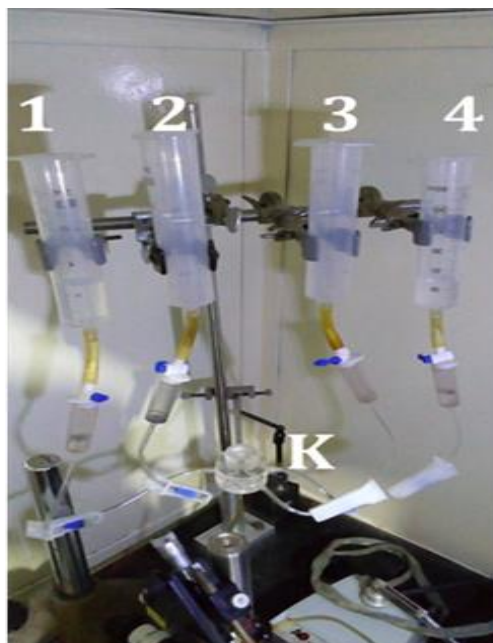


Figura 10. Sistema de perfusión de soluciones extracelulares. 1, 2, 3 y 4 son jeringas de 60 mL que contienen la solución control (1) y las distintas soluciones experimentales (2,3,4), las cuales se perfunden en distintos tiempos a la cámara de registro con sólo mover el conector de 6 vías (K).

VI.5 Evaluación del sistema de registro y de las conexiones eléctricas en experimentos de registro intracelular.

Se realizaron pruebas preliminares para optimizar las condiciones experimentales de registro intracelular. Para hacer estas pruebas se utilizó un circuito electrónico RC: tiene una resistencia “R” y una capacitancia “C” conectadas en paralelo, denominado modelo electrónico de membrana celular o “dummy cell”. El input del “dummy cell” se conectó a la entrada o “probe” del amplificador DAGAN 8500. El output del “dummy cell” se conectó a la tierra del amplificador Dagan 8500 denominada “ground chamber”. Lo que primeramente se midió fue la resistencia de membrana, para lo cual se hizo uso de la Ley de Ohm ($V = IR$). Se aplicó una corriente conocida en nanoamperes (nA) y se observó la caída del voltaje resultante en milivolts (mV); de esa manera sólo se sustituyeron estos valores en la relación $R=V/I$ y se obtuvo la resistencia del modelo electrónico de membrana.

En el momento de realizar registros electrofisiológicos intracelulares es necesario saber la resistencia que presenta el electrodo de registro para poder restar este valor a los valores reales de resistencia de membrana. La manera correcta de restar esta resistencia del electrodo es por medio de un “balance de puente de Wheatstone”. La función de este balance consiste en nulificar la resistencia problema (que es la

resistencia desconocida del electrodo); esto se logra balanceando el puente al igualar una resistencia variable con la resistencia problema. Para lograrlo se aplicó un pulso de corriente al preamplificador Dagan 8500 usando un estimulador de voltaje (S5-Stimulator, Grass Medical Instruments). Al aplicar el pulso en el osciloscopio se observó una caída de voltaje que correspondía al estímulo de corriente que se estaba aplicando; esta caída del voltaje se ajustó con el control de balance del puente “bridge balance” del amplificador Dagan 8500. La lectura final de este botón dio el valor específico de la resistencia del microelectrodo de registro.

VI.6 Reactivos y soluciones experimentales.

VI.6.1 Reactivos utilizados en la preparación de las soluciones.

Los reactivos utilizados en los experimentos aquí presentados se describen en la Tabla 1. Se utilizó agua desionizada para la preparación de las soluciones.

Tabla 1: Sustancias y reactivos utilizados en este proyecto			
SIGMA	ALDRICH	J-T- BAKER	OTROS LABORATORIOS
Medio de Cultivo L-15		BaCl ₂	
CaCl ₂	Pluronic F-127	NaCl	Colágena 10%
Agarosa tipo 1	DMF (dimethylformamide)	KCl	Alcohol etílico al 70%
Hepes	Paraformaldehido	NaOH	Alcohol-isopropílico
		KOH	Acetona
CsOH		Ethanol 96 °	
CdCl ₂		HCl	
CsCl			
PVP 40 000			
Proteasa tipo XIV			
MgCl ₂			
Dextrosa			
TEA-Cl			
4-AP			
Metoclopramida Dopamina			Ergometrina
Carbacol, atropina, oxotremorina			Pirenzepina

VI.6.2 Preparación de soluciones Ringer y solución de llenado de microelectrodos.

La composición de la solución Ringer de caracol normal (SRC) usada para bañar la preparación de ganglio cerebral de *Helix aspersa* se muestra en la Tabla 2. En esta tabla también se indican los componentes de la solución Ringer de caracol alto calcio (SRC-Ca²⁺) que sirvió en los experimentos en donde se estudiaron los potenciales de acción cálcicos de las neuronas de caracol.

	Solución Ringer de caracol normal (SRC)	Solución Ringer de caracol alto calcio (SRC-Ca ²⁺)
Compuesto	Concentración (mM/L)	Concentración (mM/L)
NaCl	75	-----
TEA-Cl	-----	75
KCl	5	-----
4-AP	-----	5
CaCl ₂	10	15
MgCl ₂	5	-----
HEPES	5	5
Dextrosa	5	5
* pH	7.5	7.5

* Se ajustó el pH a 7.5 con Hidróxido de sodio 1 M a la solución de Ringer normal. Se usó Hidróxido de Cesio 1 M para ajustar el pH de la solución Ringer alto calcio.

Compuesto	Peso Molecular	Concentración (M)	Cantidad pesada en g
KCl	74.557	3	4.473 para 20 mL
KCl	74.557	1	7.5 para 100 mL
CsCl	168.4	2	3.368 para 10 mL

VI.7 Nanotubos de carbono de pared múltiple usados en este proyecto.

Los NTCPM usados en esta tesis fueron obtenidos del Centro de Investigación y Materiales Avanzados (CIMAV), Chihuahua, México. Estos nanotubos son de pared múltiple; tienen un diámetro promedio de 80 nm y una longitud del orden de 70-120 micras; presentan una pureza del orden de 90-95%; tienen un contenido de hierro de aproximadamente 4%, el cual se encuentra en el interior de los NTCPM en estado metálico y fueron producidos con un tiempo de reacción de 10 min, a una temperatura de 900 grados centígrados [38 y 39].

VI.7.1 Método de obtención y síntesis de nanotubos de carbono de pared múltiple.

Los NTCPM fueron sintetizados y obtenidos dentro de un tubo de cuarzo por el método de pirólisis de aspersión (Spray-pyrolisis) de ferroceno/benceno bajo condiciones de flujo de argón (ver Figura 12) [38].

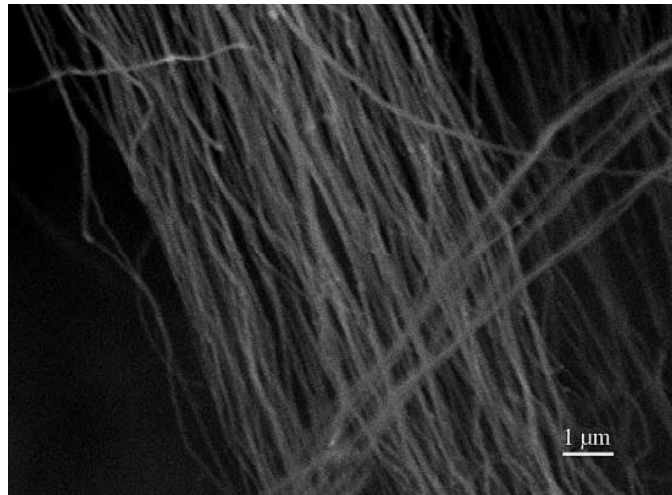


Figura 11. Micrografías de NTCPM observados con microscopía electrónica de barrido, tomada de Aguilar-Elguezabal y col., 2006 [38]. Los NTCPM fueron producidos y sintetizados por el método de Spray-Pyrolisis (pirólisis de aspersión) a 900 grados centígrados bajo condiciones de flujo de argón de 4 litros por minuto. La concentración de ferroceno sobre benceno es de 18.7 g/L durante 10 min de la aspersión de la solución (tomado de Aguilar-Elguezabal y col., 2006) [38].

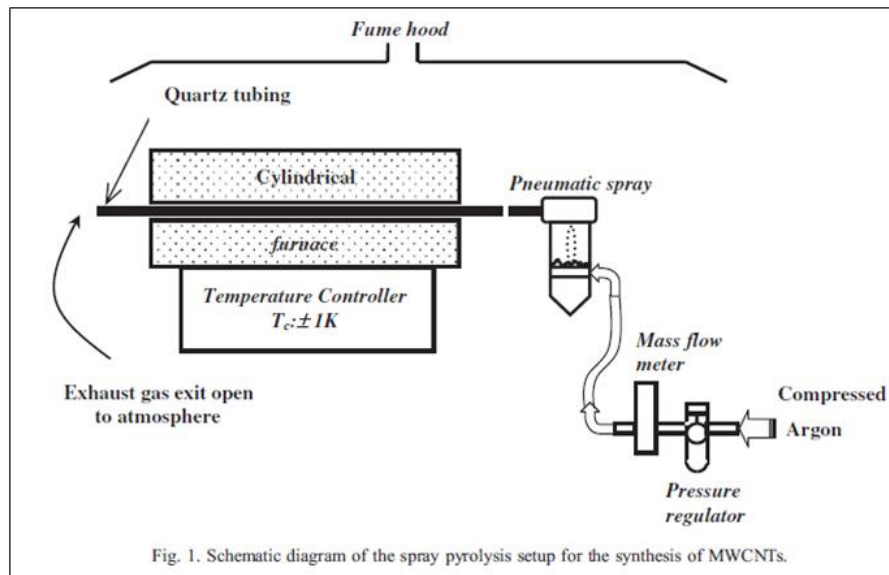


Figura 12. Diagrama esquemático del arreglo experimental usado para la síntesis de NTCPM por el método de pirólisis de aspersión.

VI.7.2 Funcionalización de nanotubos de carbono de pared múltiple.

Se realizó el protocolo de tratamiento ácido para lograr la funcionalización de NTCPM. Se preparó un volumen final de 400 mL de una solución 4 molar de HNO₃ y 4 molar de H₂SO₄, en una proporción 3 a 1. Los nanotubos se agregaron a la solución y la mezcla se trató durante una hora con ultrasonido para promover la dispersión. Posteriormente, el recipiente se colocó en una parrilla de calentamiento y se llevó a ebullición, manteniendo el tratamiento a reflujo durante una hora; cuando la dispersión alcanzó la temperatura ambiente se diluyó con agua destilada a la mitad de concentración para realizar la filtración. Para la filtración se utilizaron un embudo y papel de filtración Whatman # 40. Una vez que los NTCPM se encontraron en el papel filtro, éstos se enjuagaron con 400 ml de agua destilada caliente (50 - 60 °C); se realizó un segundo enjuague con 400 mL de agua destilada a temperatura ambiente. Los NTCPM se desprendieron mecánicamente del papel filtro y se colocaron en una caja Petri para su secado en estufa a 80 °C. El tiempo de secado fue durante la noche, entre 12 y 14 horas.

VI.7.3 Dispersión de NTCPM en soluciones acuosas.

La presentación de los NTCPM viene en polvo después de ser sintetizados; están aglomerados y unidos entre sí debido a sus propiedades hidrofóbicas y por las fuerzas de Van der Waals que los mantienen unidos. La dispersión de NTCPM en soluciones

acuosas juega un papel importante en la investigación y ciencia aplicada de nanomateriales. La técnica más común utilizada para dispersar a los nanotubos de carbono es la ultrasonificación [94,95]. Sin embargo, también se han utilizado distintos compuestos químicos para la dispersión, algunos de ellos son compuestos surfactantes tales como: dodecilsulfato de sodio (SDS) y el Pluronic F-127 [83, 84, 85, 86]; otros compuestos orgánicos como polivinilpirrolidona [87, 88, 89], o bien la dimetilformamida (DMF) [90, 91, 92]; otros más son solventes tales como: alcohol, acetona, alcohol isopropílico, además de algunos otros no enlistados aquí [93].

Se ha propuesto que tanto los métodos físicos (aplicación de ultrasonido o calentamiento a ebullición) como el uso de compuestos químicos dispersantes ayudan a desunir y dispersar a los NTC por una interacción hidrofílica permitiendo que la fuerza de Van der Waals, entre nanotubos individuales, pueda ser abolida. En este trabajo de tesis se estudiaron y evaluaron distintos compuestos químicos y distintas soluciones para lograr una dispersión adecuada de los NTCPM (ver sección de Resultados).

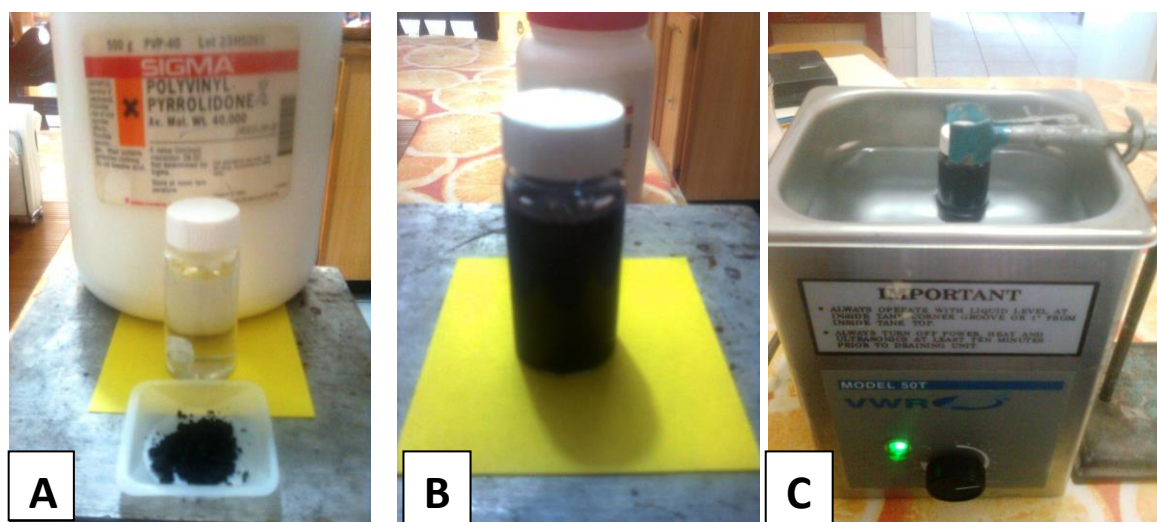


Figura 13. Proceso de preparación de NTCPM en soluciones acuosas. En A se muestra el vial que contiene 20 ml de agua desionizada al cual se agregó previamente 1 gr de PVP 40 (PVP con peso molecular de 40000 daltones). En la parte inferior de esta fotografía se muestran los nanotubos de carbono a dispersar. En la foto B se muestran los nanotubos ya dispersados por agitación mecánica en plancha magnética. En la foto C se muestra el proceso de sonicación de los nanotubos usando un sonicador de baño tipo VWR modelo 50T.

El compuesto químico PVP-40 fue usado como dispersante sistemáticamente en esta tesis, con base en trabajos experimentales preliminares donde lo caracterizaron como excelente dispersante de NTC [96-102].

VI.8 Caracterización ultraestructural de NTCPM.

VI.8.1 Técnicas de microscopía para la caracterización morfológica y ultraestructural de NTCPM.

VI.8.1.1 Microscopía electrónica de barrido como herramienta para estudiar las propiedades ultraestructurales de los NTCPM.

La microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés, Scanning Electron Microscopy) se basa en el principio de la microscopía óptica, en el cual el haz de luz se sustituye por un haz de electrones. Con esta técnica de microscopía se pueden obtener imágenes con una resolución de hasta los 100 Å; resolución muy superior a la que se obtiene con cualquier otro instrumento óptico. El funcionamiento del microscopio electrónico de barrido consiste en hacer incidir un barrido de haz de electrones sobre la muestra. La muestra a estudiar puede ser recubierta con una capa fina de oro o plata por el método de baño o “sputtering”, lo que a dicha muestra le otorga propiedades conductoras. Así, a la técnica de preparación de las muestras se le denomina “sputtering” o pulverización catódica. Cuando la superficie de la muestra alcanza el haz de electrones, se generan principalmente las siguientes partículas: electrones retrodispersados (ER) y electrones secundarios (ES), además se genera radiación electromagnética (rayos X) y otras partículas.

El microscopio se encuentra internamente equipado con unos detectores que recogen la energía y la transforman en las siguientes imágenes y datos: i). Detector de electrones secundarios (SEI – Secondary Electron Image), mediante el cual se obtienen imágenes morfológicas de alta resolución. ii). Detector de electrones retrodispersados (BEI – Backscattered Electron Image), con el que se obtienen imágenes de contraste relacionadas al peso molecular, lo cual sirve para identificar y comparar los elementos presentes en las distintas muestras. iii). Detector de energía dispersiva (EDS – Energy Dispersive Spectrometer), el cual detecta los rayos X generados y permite realizar un análisis espectrográfico de la composición de la muestra, lo que nos sirve para poder identificar distintos elementos presentes en la región de estudio [66].

El microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM – Field Emission Scanning Electron Microscope) se diferencia del microscopio electrónico de

barrido (SEM) convencional principalmente por el cañón de electrones. El SEM tiene un cañón termo-iónico y el FESEM tiene un cañón de emisión de campo, lo que lo hace un microscopio de alta resolución que, a su vez, puede también manejar bajos voltajes para analizar muestras no conductoras sin la necesidad de una preparación especial.

En la figura 14 se muestra una fotografía del FESEM modelo JSM 5800 con un voltaje de aceleración (ACCV) de 15 kV y aumentos entre 1000x y 40 000x usado en el análisis ultraestructural de las muestras de NTCPM. En la figura 15 se muestra una fotografía del equipo Dentum Vacum Desk II; equipo usado para la realización del baño con oro o plata de las muestras de NTCPM.



Figura 14. Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo. FESEM – (Field Emission Scanning Electron Microscope). Este equipo fue usado en el análisis ultraestructural de las muestras de los NTCPM depositadas en distintas superficies.



Figura 15. Equipo usado para la realización del baño con oro o plata, método de pulverización catódica o “sputtering” a las muestras de NTCPM.

VI.8.1.2 Microscopía confocal como herramienta para estudiar las propiedades ultraestructurales de los NTCPM.

La microscopía confocal es una tecnología que permite observaciones a una resolución mayor que la que se puede lograr con la microscopía óptica convencional; emplea un sistema láser que aplica el haz de luz en forma de barrido a una pequeña parte del espécimen. El láser aplicado a la muestra, a una longitud de onda determinada, hace que moléculas excitadas de la misma emitan fluorescencia a una longitud de onda mayor a la aplicada. La fluorescencia en una muestra puede ser debida a moléculas que se encuentran de forma natural (autofluorescencia), como en el caso de la clorofila, o puede ser producida por moléculas aplicadas artificialmente a la muestra a estudiar, llamadas fluorocromos. Existe una gran cantidad de fluorocromos en el mercado usados para diferentes estructuras celulares y para diferente emisión de fluorescencia. Por ejemplo, DAPI es un fluorocromo verde o azul-fluorescente que tiñe el núcleo y el ADN de las células y es excitado por el haz de láser a 405 nm. Otro ejemplo de fluorocromo es el marcador de membrana celular, el cual es un conjugado de aglutinina de germen de trigo (WGA) denominado Alexa Fluor 594 (WGA-A594); este fluorocromo presenta un color rojo brillante (máximo de excitación / emisión de aproximadamente 590/617 nm). El uso de varias combinaciones de láser capaces de detectar y producir fluorescencia a diferentes longitudes de onda permite un escaneo de la muestra en un amplio rango del espectro de luz, favoreciendo la observación, con gran detalle, de estructuras teñidas.

Debido a que el láser del microscopio confocal penetra fácilmente la muestra se logran imágenes en diferentes planos focales, que ligadas a un programa de cómputo hacen que se pueda reproducir una imagen tridimensional del material observado. Las siguientes características han hecho de la microscopía confocal una de las herramientas de trabajo predilectas por científicos de las ciencias biológicas, médicas y de materiales de todo el mundo: a). Alta sensibilidad en la observación, b). Especificidad en la emisión de la fluorescencia, c). Alta resolución y d). Obtención de imágenes tridimensionales.

En este trabajo de tesis se utilizaron dos tipos de microscopios confocales: Microscopio confocal Carl Zeiss, modelo LSM 700 (del cual se muestra una fotografía en la Figura 16) y el microscopio confocal Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania. Ambos microscopios se utilizaron en los experimentos para analizar la

distribución ultraestructural de NTCPM depositados sobre cubreobjetos de vidrio y depositados sobre las neuronas de caracol.



Figura 16. Microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700, utilizado en este trabajo de tesis. Este equipo se usó en los experimentos para analizar las propiedades ultraestructurales de los NTCPM depositados en cubreobjetos de vidrio y sobre las neuronas de caracol.

VI.8.1.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM, Atomic force microscopy) como herramienta para estudiar las propiedades ultraestructurales de los NTCPM.

El microscopio de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés Atomic Force Microscope) es un instrumento mecano-óptico capaz de detectar fuerzas del orden de los piconewtons. Al rastrear una muestra, el microscopio de fuerza atómica es capaz de registrar continuamente su topografía mediante una sonda o punta afilada de forma piramidal o cónica; la sonda va acoplada a un listón o palanca microscópica muy flexible de sólo unos 200 μm . El microscopio de fuerza atómica ha sido esencial en el desarrollo de la nanotecnología para la caracterización y visualización de muestras a dimensiones nanométricas ($1 \times 10^{-9} \text{ m} = 1 \text{ nm}$).

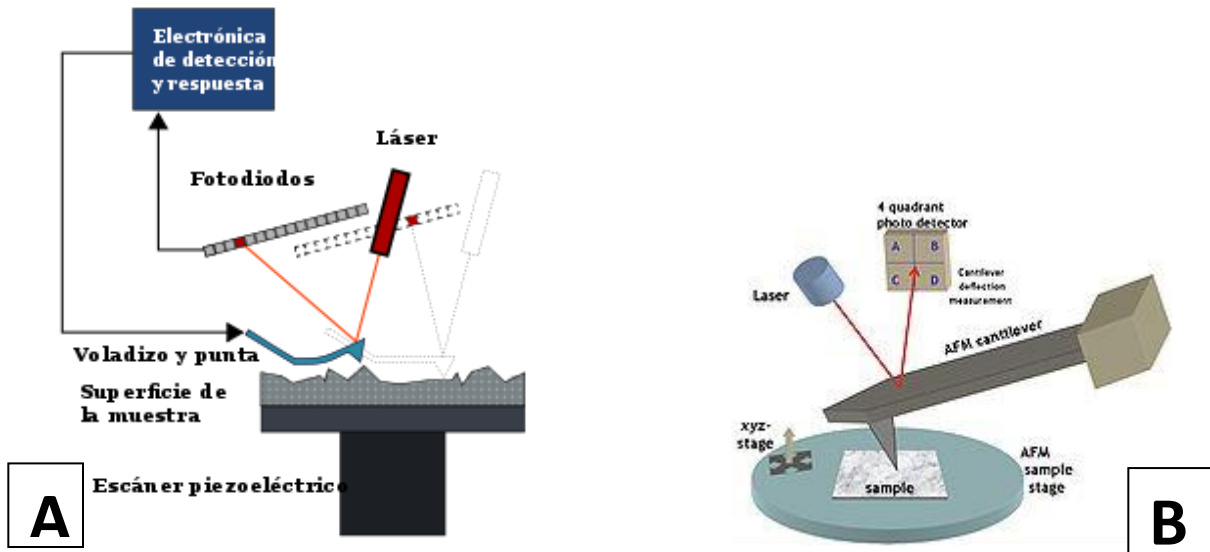


Figura 17. Diagrama estructural y funcional del microscopio de fuerza atómica (AFM) utilizado en este proyecto. B). Arreglo experimental del cantilever para escanear las propiedades ultraestructurales de muestras nanométricas. Los componentes de un microscopio de fuerza atómica son: i). Diodo láser, ii). Micropalanca, iii). Fotodiodo y iv). Tubo piezoeléctrico.

Se describen las características de la micropalanca del AFM. Históricamente las primeras palancas tenían un tamaño de varios mm y solían fabricarse con metal, algunas a partir de un hilo de tungsteno con un extremo afilado y doblado en ángulo recto para producir la punta. En la actualidad las micropalancas se producen empleando métodos de microfabricación heredados inicialmente de la industria microelectrónica, como litografía de superficie y grabados reactivos de plasma de iones (RIE y DRIE siglas en inglés de Reactive Ion Etching y Deep Reactive Ion Etching). Actualmente las puntas suelen fabricarse a partir de deposiciones de vapor de algún material idóneo sobre la palanca ya fabricada, en cuyo caso el resultado suele ser una punta cónica; más comunmente, cuando el silicio es el material de elección, se recurre a técnicas de grabado anisótropo. El grabado anisótropo involucra el uso de una solución grabadora que excava el material sólo o preferentemente en ciertas direcciones cristalográficas; de esta manera es posible producir puntas piramidales limitadas por planos cristalográficos del material. Uno de los aspectos más importantes en la resolución de las imágenes obtenidas por el AFM es la agudeza de la punta. Las primeras utilizadas por los precursores del AFM consistieron en pegar el diamante sobre pedazos de papel de aluminio. Las mejores puntas se encuentran con un radio de curvatura de alrededor de los 5nm.

El AFM puede realizar dos tipos de medidas: imagen y fuerza. En los experimentos realizados en este trabajo de tesis se utilizó el modo de imagen. En el modo de imagen la superficie es barrida en el plano de la superficie (X-Y) por la punta. Durante el barrido, la fuerza interatómica entre los átomos de la punta y los átomos de la superficie de la muestra provoca una flexión de listón; esta flexión es registrada por un sensor adecuado (normalmente balanza óptica) y la señal obtenida se introduce en un circuito o lazo de realimentación; este último controla un actuador piezoeléctrico que determina la altura (Z) de la punta sobre la muestra, de forma que la flexión del listón se mantiene a un nivel constante (normalmente el introducido por el operador). Representando la altura de la punta (Z) frente a su posición sobre la muestra (X, Y) se logra trazar un mapa topográfico de la muestra $Z=Z(X, Y)$. La fuerza interatómica se puede detectar cuando la punta está muy próxima a la superficie de la muestra.

El equipo utilizado en los experimentos aquí reportados fue el microscopio de fuerza atómica SPM, modelo MultiMode IVa, Veeco Instruments, Inc. En particular, este microscopio tiene cabezal MultiMode SPM (Tapping, Contacto, STM), con ruido $> 0.3 \text{ \AA}$ RMS (Root mean square), en eje Z, con aislamiento de vibraciones. El tamaño de la muestra debe ser $\leq 12 \text{ mm}$ en diámetro y $\leq 5 \text{ mm}$ en espesor. Este microscopio presenta porta sondas o puntas de modo tapping/modo contacto en aire, modo tapping/fuerza eléctrica/fuerza magnética y modulación de fuerza en aire con convertidor STM. Este microscopio cuenta con sistema de aislamiento de vibraciones, ya que es colocado en una campana de aislamiento termo-acústica con mesa de aislamiento de vibración mecánica integrada ($> 1 \text{ Hz}$). Este equipo presenta un escáner tipo AS-12NM, con rango lateral (X-Y) de $10 \text{ \mu m} \times 10 \text{ \mu m}$ y rango vertical (Z) de 2.5 \mu m .

VI.8.2 Elaboración de muestras de NTCPM depositados sobre distintos materiales para su estudio por microscopía electrónica de barrido y microscopía de fuerza atómica.

Para estudiar las características y propiedades ultraestructurales de los NTCPM con técnicas de microscopía electrónica de barrido SEM y microscopía de fuerza atómica AFM, dichos nanotubos se depositaron en distintos materiales.

Primeramente los NTCPM se depositaron en filtros de PVDF. Para lograr lo anterior, se prepararon diferentes diluciones de la solución madre de NTCPM (5 mg/mL)

en agua desionizada (1:10, 1: 100 y 1: 1000). La concentración final de NTCPM de estas diluciones fue de 0,5, 0,05 y 0,005 mg/mL, respectivamente. Ya teniendo estas diluciones de NTCPM se tomaron 2 mililitros de cada dilución, los cuales fueron depositados con una jeringa en un soporte tipo Swinnex, Millipore que contenía filtros de PVDF de 0.45 micras de tamaño de poro. Los NTCPM atrapados en los filtros de PVDF se secaron a 60°C durante 30 min.

En otros experimentos, los NTCPM fueron depositados en papel bond aplicándose 200 µL de la solución madre de NTCPM a la superficie de un disco de papel bond Xerox de 25 mm de diámetro, posteriormente dichos nanotubos se secaron en un horno de convección a 60 ° C durante 30 min. Para el caso donde los NTCPM fueron depositados sobre cubreobjetos de vidrio, o sobre láminas de cobre de 1 cm cuadrado, se aplicaron 20 µL de NTCPM a distintas diluciones; se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se calentaron en horno de convección a temperatura de 120 °C durante 2 hrs.

VI.8.3. Preparación de las muestras de NTCPM depositadas en vidrio para su estudio por microscopía confocal.

Para preparar los NTCPM sobre un cubreobjetos de vidrio, se tomaron 50 microlitros de las soluciones de NTCPM (a dilución 1, 1:10, 1:100 y 1:1000) y se aplicaron a un cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro. Posteriormente dichos nanotubos se calentaron en un horno de convección a 60 ° C por 30 min. En otra serie de experimentos se aplicaron 20 uL de NTCPM a diferentes diluciones (1, 1:10 y 1: 100) y se depositaron sobre un cubreobjetos de vidrio rectangular (7 por 12 mm). A continuación, estas muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 12 h; posteriormente, las muestras se calentaron durante 12 h a 120 °C en un horno de convección.

VI.8.4 Neuronas de *Helix aspersa* tratadas con NTCPM y estudiadas con microscopía confocal en el modo de reflexión.

Las neuronas de *Helix aspersa* fueron tratadas con NTCPM. Dichos NTCPM fueron aplicados a las neuronas a concentraciones de 0.05 a 0.5 mg/mL en SRC y se incubaron durante 12 horas. Para retirar los NTCPM no adheridos a las neuronas, los

ganglios fueron lavados dos veces con SRC. Los ganglios se fijaron en paraphormaldehide al 4% en SRC durante 12 horas a temperatura ambiente. Después de la fijación, las neuronas de los ganglios se permeabilizaron con Triton X-100 al 1% durante 30 min. Para bloquear la unión inespecífica de fluorocromos, las neuronas se trataron con una solución de suero bovino fetal (FBS) al 5% en SRC y se incubaron en este medio durante 30 min a temperatura ambiente. Los ganglios fueron tratados con DAPI-Hoestch para tinción de los núcleos y WGA-A594 para tinción de la membrana celular y se incubaron durante 30 min. DAPI es un fluorocromo verde o azul-fluorescente que tiñe el ADN y los núcleos de neuronas y es excitado por el haz del láser de 405 nm. La aglutinina del germen de trigo (WGA) es uno de los fluorocromos más ampliamente utilizados en biología para el marcaje de membrana celular. El fluorocromo para lectinas Alexa Fluor 594 (WGA-A594) presenta un colorante rojo brillante (máximo de excitación / emisión de aproximadamente 590/617 nm). Finalmente, las muestras de ganglios se montaron sobre un portaobjetos de vidrio; se trataron con Vectashield (Vector Laboratories); se cubrieron con cubreobjetos de 1 mm de espesor; se sellaron los cubreobjetos con barniz para uñas y las muestras se observaron al microscopio confocal. En esta serie de experimentos se usó el microscopio confocal marca Leica Microsystems modelo GmbH (Wetzlar, Alemania). Varias imágenes fueron adquiridas a 23x y 63x aumentos y a distintos planos focales (z-stack) a diferente profundidad entre 10-100 nm y en una configuración 2D. Las reconstrucciones de las imágenes se realizaron fuera de línea con el paquete de procesamiento de imágenes Fiji. Los NTCPM depositados en las neuronas se visualizaron mediante el modo de reflexión del microscopio confocal.

VI.8.5. Preparación de muestras de cortes histológicos del ganglio de *Helix aspersa*, tratadas con nanotubos y estudiadas con microscopía óptica y electrónica.

Los NTCPM se aplicaron a los ganglios de *Helix aspersa* a concentraciones entre 0.05 a 0.1 mg/mL en SRC y se incubaron durante 12 horas. Para retirar los nanotubos no adheridos a las neuronas, los ganglios se lavaron dos veces con SRC; los ganglios fueron fijados en paraphormaldehide al 4% en SRC durante 12 h a temperatura ambiente. Para el manejo de los cortes histológicos del ganglio del caracol, primeramente se utilizó un equipo de muestras histológicas tipo histoquinette automático marca Lab-tek (ver Figura 18A). Este equipo se programó por 12 horas para procesar las

muestras histológicas de neuronas de caracol por una hora en cada cubeta del histoquinette: 1, 2, formaldehído; 3, 4, 5, alcohol de 96%; 6, 7, alcohol etílico absoluto; 8, mezcla alcohol absoluto-xilol 50/50; 9, 10, xilol y 11, 12, parafina histológica. En seguida, los ganglios ya tratados en el histoquinette se colocaron en recipientes en forma de escuadras de aluminio llenados con parafina para preparar bloques de parafina en donde se incluyeron los ganglios para que se pudieran hacer cortes histológicos de estas muestras usando el microtomo, el cual se presenta en la Figura 18B.



Figura 18. Histoquinette Lab-tek (A) y microtomo rotatorio manual marca Leica (B) para procesar y preparar cortes histológicos de las muestras del ganglio cerebral de *Helix aspersa*.

Los cortes histológicos se realizaron en un microtomo rotatorio manual marca Leica (ver Figura 18B). Se realizaron cortes de la muestra del ganglio del caracol a 4, 10, y 20 micras de espesor y se colocaron en portaobjetos de vidrio de 25x75 mm. En seguida, las laminillas se colocaron dentro de un horno (marca Lab-line Instruments) durante 30 minutos a 65 °C para desparafinarlas. El proceso de tinción se llevó a cabo con un tren de tinción en recipientes de vidrio en el siguiente orden: 1). Se desparafinó el corte histológico, 2). Se aclaró en xilol, y 3). Se deshidrató la muestra con alcoholes descendentes (70%, 96% y alcohol absoluto). Posteriormente se lavó la muestra histológica con agua corriente. Las laminillas ya lavadas se colocaron en solución de azul de toluidina al 1% (1 gramo en 100 mL de agua destilada) durante 5 minutos. Las laminillas se lavaron en agua corriente, se deshidrataron, se aclararon en xilol y se observaron al microscopio óptico. En los experimentos en los que los cortes histológicos

del ganglio de caracol fueron estudiados con microscopía electrónica de barrido de alta resolución (FESEM), dichos cortes fueron cubiertos con oro por el método de pulverización catódica (sputtering).

VI.9. Medición de las propiedades eléctricas de los NTCPM depositados en distintos materiales.

En la Figura 19 se presenta arreglo experimental para medir la resistencia, tanto de los NTCPM como la de otros materiales electroconductores, el cual consiste de: i). Un soporte mecánico hecho a base de lucita que soporta las muestras de nanomateriales a estudiar, ii). Un instrumento Data Acquisition/Switch Unit Agilent 34970-A (ver Figura 20), y iii). Una tarjeta multichannel Agilent 34901a acoplada a una computadora. En la Figura 21 se muestra el tipo de tarjeta usada.

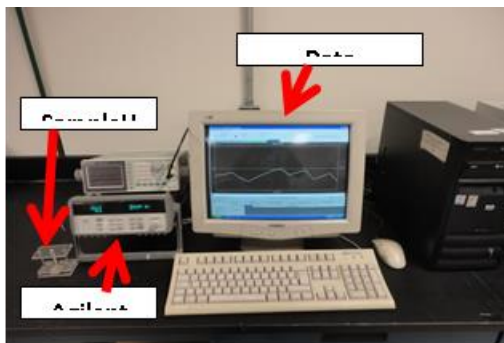


Figura 19. Arreglo experimental usado para medir la resistencia eléctrica de los NTCPM depositados en distintos materiales.

Las mediciones de las propiedades eléctricas de los NTCPM depositados en diferentes materiales se realizaron mediante el uso de dos electrodos metálicos de oro con la resistencia intrínseca de 0,0001 ohmios. Los electrodos se montaron en un soporte de plexiglás con resortes de presión controlada para mantener el contacto permanente con los materiales electroconductores. Los electrodos se colocaron a 5 mm de distancia entre sí (ver Figura 22 y Figura 23).



Figura 20. Equipo Agilent 3497A, Data Acquisition/ Switch Unit usado para medir la resistencia intrínseca de NTCPM depositados en distintos materiales.

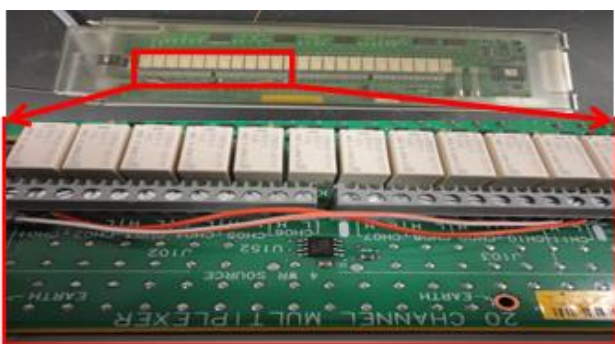


Figura 21. Tarjeta de adquisición 34901A del equipo Agilent usado para medir resistencia eléctrica de nanomateriales. Canales 1 y 11 interconectados de acuerdo al esquema mostrado en el manual de operación del equipo.

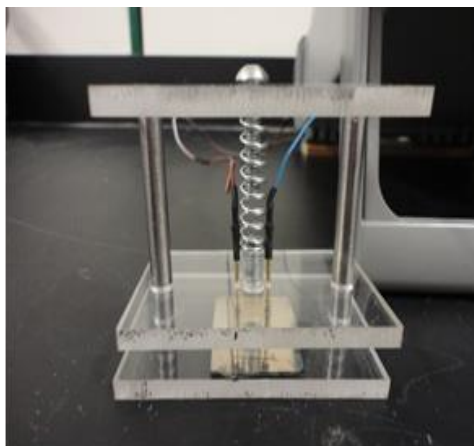


Figura 22. Puntas de registro para medir la resistencia eléctrica de nanomateriales.

VI.10 Estimulación de los NTCPM con irradiación láser.

Para estimular a los NTCPM depositados en distintos materiales tales como filtros de PVDF, papel bond y vidrio, se utilizó un dispositivo láser cercano al infrarrojo (nIR-láser) marca Lazerpoint, SKU 5074621, modelo 900, con longitud de onda de 650 nm y 500 mW de potencia nominal. El dispositivo láser se fijó en un ángulo de 47 °. La distancia entre la muestra de los NTCPM y el dispositivo de láser fue de 170 mm. El punto del haz del láser fue de 3 mm de diámetro. Se realizaron mediciones de resistencia de los NTCPM en condiciones control, durante la estimulación láser y después de la acción del láser. Estas mediciones se realizaron a temperatura ambiente (21,5 ° C).

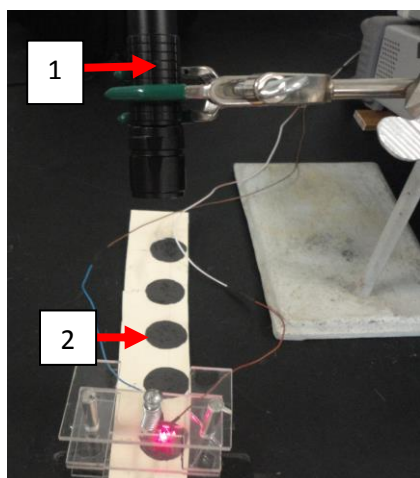


Figura 23. Arreglo experimental para medición de cambios de resistencia de electrodos hechos de nanomateriales y expuestos a la estimulación de nIR-laser. 1 es el dispositivo de láser, 2 son las muestras de nanomateriales

Además de las mediciones de resistencia de los NTCMP durante la aplicación de láser, se realizaron mediciones de la temperatura de los NTCMP durante la irradiación con láser usando un termómetro Fluka-61-Infrared (ver Figura 24) que mide la temperatura a distancia sin hacer contacto con el material, y es rápido y fácil de ejecutar al usar un rayo láser infrarrojo brillante. Este dispositivo emite un haz láser de punto de 1.2 mm de diámetro, con una resolución de temperatura de 0.2 ° C. El punto de luz roja del termómetro de infrarrojo se asignó en el mismo punto de la luz del láser nIR-650 nm. En estos experimentos el dispositivo láser se fijó en un ángulo de 47° y la distancia entre las muestras de los NTCPM y el láser fue de 170 mm. El termómetro de infrarrojos se situó en dirección de 90 ° y a 200 mm de distancia de las muestras de los NTCPM.



Figura 24. Termómetro Fluka-61-Infrared para medir los cambios de temperatura de los electrodos hechos con nanomateriales electroconductores.

VII Resultados experimentales y discusión.

VII.1 Evaluación de distintos compuestos químicos como dispersantes de NTCPM.

Los NTCPM sintetizados por el método de pirólisis de aspersión y funcionalizados en soluciones ácidas (ver Material y métodos) tienen una presentación en polvo negrozco (ver Figura 13); están aglomerados entre sí debido a sus propiedades hidrofóbicas y por las fuerzas de Van der Waals que los mantienen unidos. Los NTCPM usados en este proyecto se dispersaron eficientemente con el uso de distintos compuestos químicos [83-93]. La dispersión de los nanotubos fue mejorada cuando se sometieron a tratamiento de ultrasonido para favorecer su dispersión [94 y 95].

Se estudió la dispersión de NTCPM con distintos compuestos químicos. Se pesó una misma cantidad de NTCPM (50 mg) depositados en distintas soluciones: acetona-alcohol etílico 96% en relación 1:2, alcohol isopropílico, dimetilformamida (DMF), Pluronic F-127 y polivinilpirrolidona (PVP) (ver Tabla 4). Todas las muestras se mezclaron por agitación magnética durante 30 minutos y posteriormente fueron sometidas a sonicación por 30 minutos. Para el caso particular de la solución dispersante de PVP, peso molecular 40,000 (PVP-40), se manejó de la siguiente

manera: i). Se pesaron 500 mg de PVP-40 y se agregaron en un vial con 10 ml de agua desionizada, ii). La mezcla se agitó magnéticamente durante 30 min, iii). Al vial que contenía PVP-40 se le aplicaron 50 mg de NTCPM secos y funcionalizados, iv). La mezcla se agitó magnéticamente durante otros 30 min, y v). El frasco con los NTCPM dispersos en PVP-40 se sometió a ultrasonido durante 30 min (VWR-International, limpiador ultrasónico modelo 50T).

Tabla 4:
Tratamiento de NTCPM con compuestos y soluciones dispersantes

Soluciones dispersantes	Compuestos y cantidad	Cantidad de NTCPM
Solución 1	Polivinilpirrolidona 500mg + 10 mL de agua	50 mg
Solución 2	Dimetilformamida 10 mL	50 mg
Solución 3	Pluronic F-127 50 mg +10 mL de agua	50 mg
Solución 4	Alcohol absoluto	50 mg
Solución 5	Acetona 3.33 ml + Alcohol etílico 70% 6.66 ml	50 mg
Solución 6	Alcohol isopropílico 10 ml	50 mg

En la Figura 25 se muestran viales con NTCPM tratados con distintos compuestos dispersantes. Los NTCPM dispersados en PVP, DMF y Pluronic F-125 permanecieron como suspensiones estables sin sedimentación; en contraste con los NTCPM dispersados en soluciones de alcohol absoluto, acetona-alcohol y alcohol isopropílico, las cuales se sedimentaron después de 72 horas de mantenerse en reposo. Se encontró que la PVP-40 (Sigma Aldrich) fue el mejor compuesto dispersante ya que después de 72 hrs de estar en reposo se siguió apreciando como una solución homogénea, sin sedimentación de nanotubos. Entre los diferentes compuestos ensayados se encontró que DMF es un buen dispersante, pero es tóxico para las células vivas. Pluronic F-127 no era tóxico para las células vivas, pero no dispersaba eficientemente a los NTCPM. La PVP fue el mejor dispersante encontrado para NTCPM ya que no tiene ningún efecto tóxico en las neuronas y células estudiadas. A partir de estos experimentos preliminares, los NTCPM usados en los experimentos presentados en esta tesis fueron dispersados en PVP.

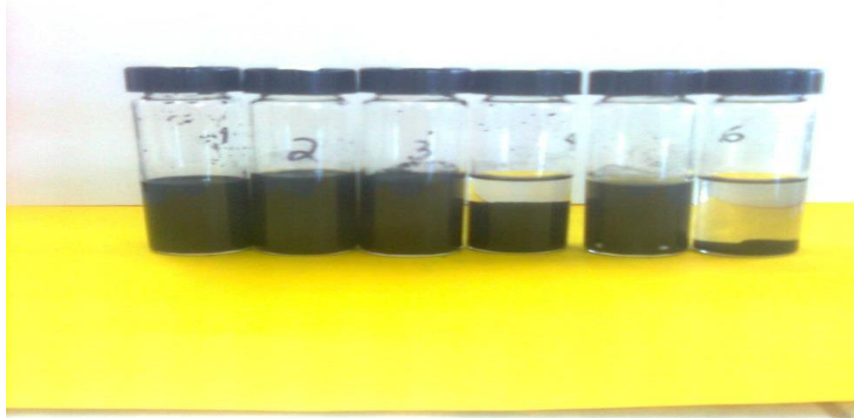


Figura 25. Pruebas de dispersión de NTCPM tratados con diferentes compuestos dispersantes. 1). NTCPM en PVP, 2). NTCPM en DMF, 3). NTCPM en Pluronic F127, 4). NTCPM en alcohol etílico absoluto, 5). NCPM en alcohol-acetona, y 6). NTCPM en alcohol isopropílico.

A continuación se discute el mecanismo de dispersión de los NTCPM tratados con PVP. La PVP es un compuesto tensioactivo no iónico, el cual se usó como un agente dispersante de los NTCPM en todas las soluciones acuosas usadas en este proyecto de tesis. La PVP con diferentes pesos moleculares se ha utilizado como dispersante tanto para NTCPS como para NTCPM basándose en su no toxicidad y en su alta compatibilidad con nanomateriales de carbono [96 - 102]. Se ha reportado que la PVP tiende a envolver o girar alrededor del centro de los NTC a través de sus componentes flexibles o semiflexibles [96,98 y 99]. Actualmente existen dos teorías principales sobre el mecanismo de dispersión de nanotubos por polímeros: envoltura y no envoltura. El envoltorio se produce cuando una monocapa fuerte de polímero envuelve helicoidalmente un nanotubo. En la teoría de no envoltura, los polímeros están interactuando débilmente con el nanotubo a través de interacciones de Van der Waals. El mecanismo de envoltura o “wrapping” fue considerado el único mecanismo por el cual los polímeros interactúan con los nanotubos [96,97]. O’Connell y col. [101] mostraron, con imágenes de AFM, que cualquier monocapa acuosa de PVP envolvería la superficie del nanotubo; esto lo dedujeron observando cambios en las distribuciones de longitud y altura de las imágenes de microscopía de fuerza atómica, observando que también había una disminución de la presencia de cuerdas agrupadas. En los experimentos presentados en apartados subsiguientes, en donde se realizaron estudios ultraestructurales de NTCPM con AFM y con SEM, no se pudo identificar ni distinguir

una envoltura específica de PVP sobre los NTCPM. Por lo tanto, con base en los estudios preliminares realizados por otros podemos sustentar que la PVP-40 utilizada como dispersante para NTCPM puede recubrir y envolver a los NTCPM.

VII.2 Propiedades ultraestructurales y distribución topográfica de los NTCPM depositados en distintos materiales.

Se tomaron muestras de NTCPM dispersados en PVP y resuspendidos en soluciones acuosas (agua desionizada y SRC) y se colocaron en distintos materiales (portaobjetos de vidrio, papel bond, filtros PVDF y láminas de cobre) para ser observados con microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía confocal en el modo de reflexión (rMC) y comprobar, con estas metodologías, su grado de dispersión en soluciones acuosas.

VII.2.1 NTCPM depositados en cubreobjetos de vidrio y analizados por microscopía electrónica de barrido.

En la Figura 26 se presentan micrografías de NTCPM estudiados con SEM de baja resolución. Como puede apreciarse en los tres paneles, los NTCPM a una dilución de 1:000 en agua destilada y depositados en vidrio se observan bien dispersados y en forma independiente; más aún, en el panel C se puede apreciar “la boca” o el agujero interno que se mantiene por el envolvimiento concéntrico de los NTCPM.

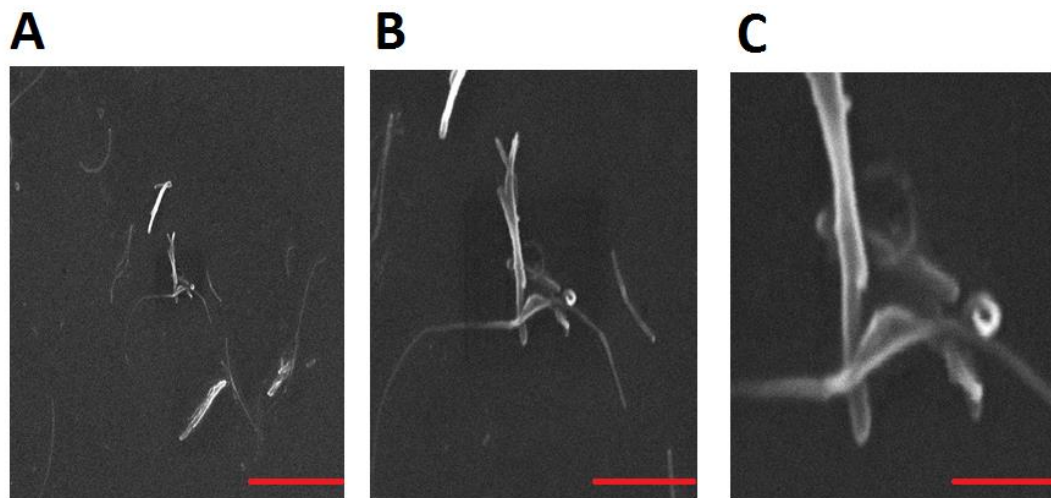


Figura 26. NTCPM dispersados en solución de PVP-agua desionizada vistos con microscopio electrónico de barrido de baja resolución. Los NTCPM fueron dispersados en solución acuosa de agua desionizada y depositados en portaobjetos de vidrio. La escala de la barra es: A). 10 μm , B). 1 μm , y C). 100 nm.

En la Figura 27 se muestran los NTCPM dispersados en solución de PVP- agua desionizada y depositados sobre cubreobjetos de vidrio. Estos nanotubos estudiados con SEM de alta resolución no están aglomerados y están totalmente dispersos, lo cual permite medir en forma independiente el diámetro de los nanotubos aislados.

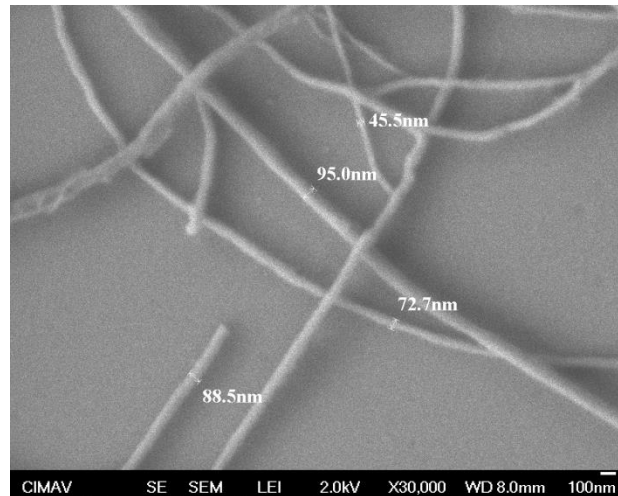


Figura 27. NTCPM depositados sobre vidrio y observados con SEM de alta resolución. Se observan nanotubos de carbono perfectamente aislados, no aglomerados ni precipitados. Estos NTCPM fueron dispersados con PVP en agua desionizada y depositados sobre cubreobjetos de vidrio. El diámetro de los nanotubos está en el rango de 85 nm. La escala de la barra es de 100 nm.

VII.2.2 Propiedades ultraestructurales y distribución topográfica de NTCPM dispersados en agua desionizada, depositados sobre lámina de cobre y analizados con técnicas de microscopía electrónica de barrido de alta resolución.

En la Figura 28 se muestran micrográficas de NTCPM depositados sobre placas de cobre y dispersados en solución PVP-agua desionizada y analizados con SEM de alta resolución. Como se puede observar: en los paneles A y B, los NTCPM están aglomerados, mientras que en el panel C están totalmente dispersados y se pueden identificar NTCPM independientes. Lo anterior se puede explicar por la cantidad y concentración de NTCPM depositados en cada placa de cobre, la cual fue como sigue: A). 5 mg/MI, B). 0.5 mg/mL, y C). 0.05 mg/mL.

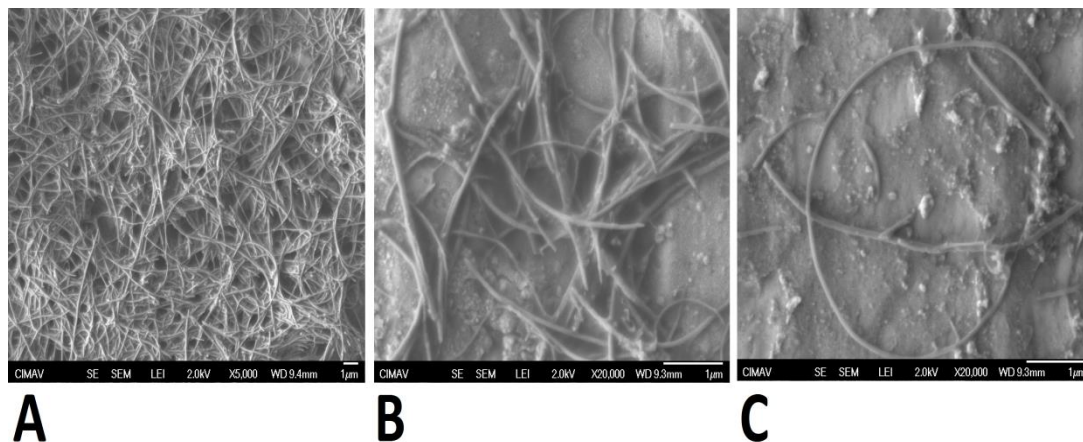


Figura 28. NTCPM depositados sobre lámina de cobre y observados con microscopía electrónica de barrido de alta resolución. Los NTCPM se dispersaron en solución acuosa de PVP-agua desionizada y fueron depositados en láminas de cobre de 1 cm^2 . La concentración de NTCPM fue: en A) 5 mg/mL, en B) 0.5 mg/mL, y en C) 0.05 mg/mL. La escala de la barra es de $1 \mu\text{m}$ en todos los paneles.

VII.2.3 Propiedades ultraestructurales y distribución topográfica de NTCPM dispersados en agua desionizada depositados en filtros de PVDF y analizados con técnica de microscopía electrónica de barrido.

Los NTCPM (a concentración de 5 mg/dL) fueron depositados sobre filtros de PVDF, usando el portafiltros Swinnex, Millipore (ver Material y métodos). En la Figura 29 se muestran micrografías de los NTCPM tomadas con el SEM de baja resolución a distintos aumentos. Como se puede apreciar, en todos los paneles A, B y C se pueden identificar NTCPM; sin embargo, éstos se muestran aglomerados. Lo anterior no significa que no estén bien dispersados; dicha aglomeración se debe a la gran cantidad de NTCPM aplicados (a una concentración de 5 mg/mL).

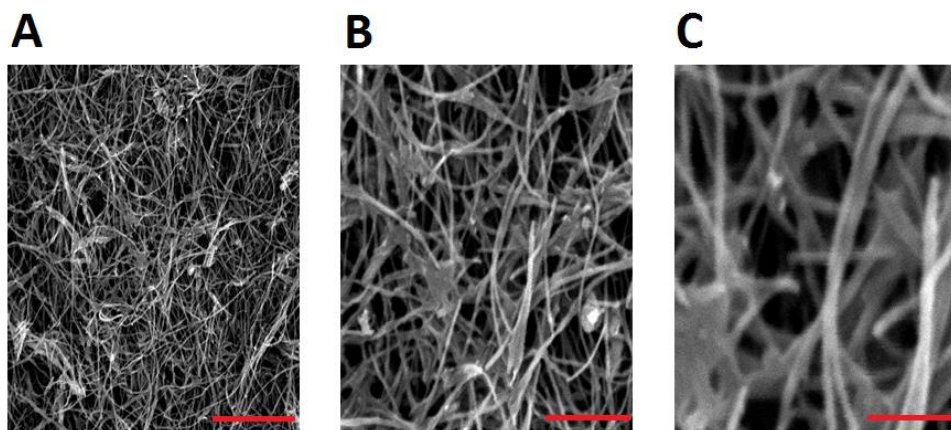


Figura 29. NTCPM depositados sobre filtros de PVDF observados con SEM de baja resolución. Los NTCPM se dispersaron en solución acuosa de PVP-agua desionizada y fueron depositados en filtros de PVDF a una concentración de 5mg/mL. Se tomaron tomas a diferentes aumentos: A). X5000, B). X15000, y C). X40000. La escala de la barra es de $6 \mu\text{m}$, en A; de $3 \mu\text{m}$, en B; y de $1 \mu\text{m}$, en C.

Para estudiar la distribución topográfica de los NTCPM depositados en filtros de PVDF a distintas diluciones se utilizó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) de alta resolución modelo JSM 5800 con un voltaje de aceleración (ACCV) de 15 kV y aumentos entre 1000x y 40 000x. Con el fin de evitar la carga eléctrica producida por descarga de electrones sobre los electrodos de NTCPM, estos nanomateriales se recubrieron con oro (método de pulverización catódica al vacío o “sputtering”) usando el dispositivo de pulverización catódica Denton Desk II. En la Figura 30 se muestran micrografías obtenidas con el FESEM en donde se observan la distribución topográfica y las propiedades ultraestructurales de los NTCPM depositados sobre filtros de PVDF a diferentes diluciones de una solución madre (5 mg/mL): 1 en A, 1:10 en B, 1:100 en C y 1:1000 en D. Como puede verse en todos los paneles de esta Figura 30, los NTCPM se dispersaron en forma aleatoria, sin alineación particular. La cantidad de NTCPM atrapados en los filtros de PVDF disminuyó con respecto a la concentración de NTCPM usada.

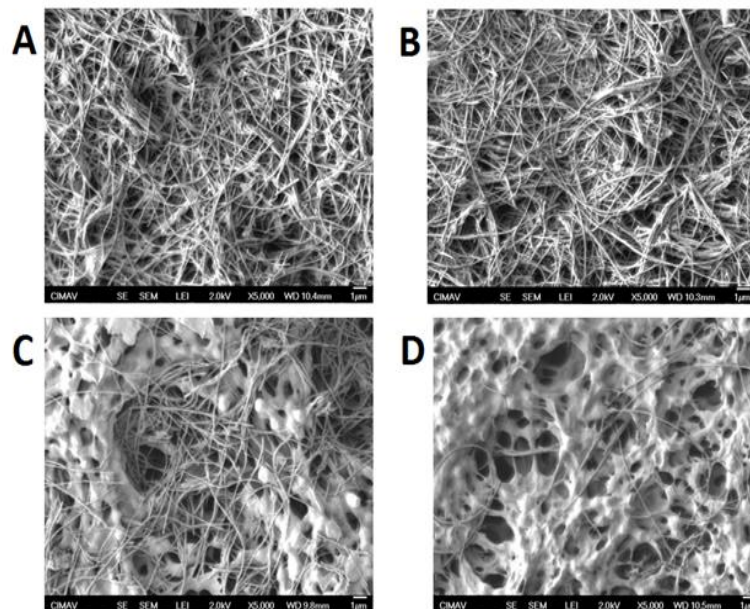


Figura 30. NTCPM a distintas concentraciones depositados sobre filtros de PVDF y estudiados por microscopía electrónica de barrido de alta resolución. Se presenta la distribución topográfica de NTCPM aplicados sobre filtros de PVDF a distintas diluciones de la solución stock (5 mg/mL de NTCPM): A). 1, B). 1:10, C). 1:100, y D). 1:1.000. La escala de aumentos en las cuatro imágenes es de 5000X y la escala de la barra es de 1 µm.

En otra serie de experimentos se analizaron los NTCPM (a una concentración de 5 mg/mL) depositados en filtros de PVDF, pero analizados a distinta resolución: A, x5000

y B, x30000, como se muestra en la Figura 31. En ambas micrografías se pueden identificar nanotubos aislados, a pesar de estar aglomerados.

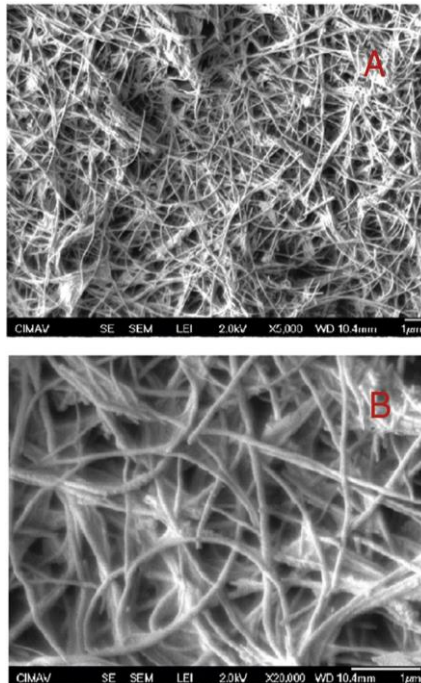


Figura 31. NTCPM depositados sobre filtros de PVDF y estudiados con FESEM de alta resolución. Se muestra la distribución topográfica de NTCPM (5 mg/mL) depositados en filtros de PVDF y observados a una resolución de X5000 (A) y X20000 (B). La barra de escala es de 1 μ m.

VII.2.4 Propiedades ultraestructurales y distribución topográfica de NTCPM depositados sobre filtro de PVDF y analizados con técnicas de microscopía de fuerza atómica (AFM).

En este trabajo se encontró que los NTCPM se adhieren de manera eficiente a filtros de PVDF. Mediante el uso de microscopía de fuerza atómica (AFM) se demostró que los NTCPM fueron distribuidos de manera caótica sin ninguna linealidad sobre la superficie del filtro de PVDF. Fue posible identificar nanotubos independientes y medir sus grosores (ver Figura 32), así como observar su distribución bidimensional en la Figura 33-A y tridimensional en la Figura 33-B.

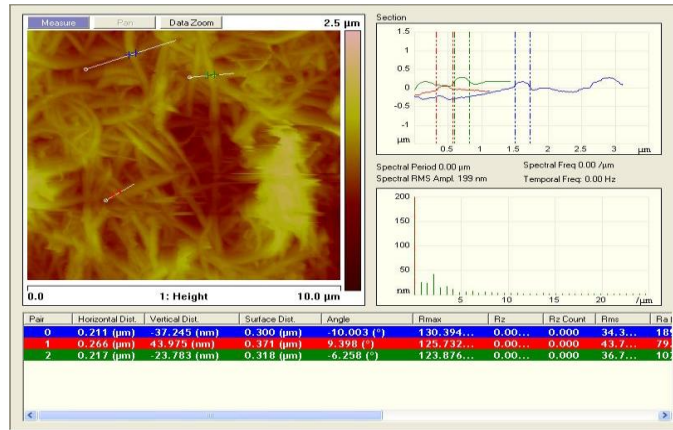


Figura 32. Dimensiones de los NTCPM depositados sobre filtros de PVDF y estudiados con microscopía de fuerza atómica. Los NTCPM se presentan en el recuadro en donde se identifican sus respectivos diámetros en azul, verde y rojo.

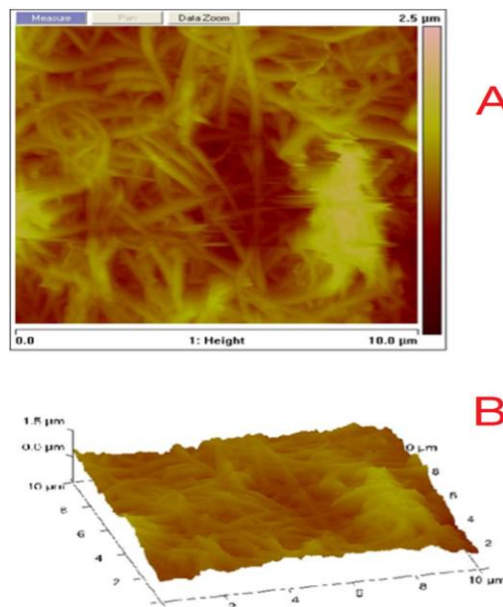


Figura 33. Caracterización bidimensional y tridimensional de NTCPM con microscopía de fuerza atómica. Se presenta la distribución topográfica de NTCPM disueltos en solución de PVP (5 mg/mL) y aplicados sobre un filtro de PVDF. "A" representa el escaneado bidimensional en un plano horizontal. La ganancia total de la exploración es de 10 μm. "B" es una representación tridimensional de NTCPM en el filtro de PVDF. La ganancia total en la dimensión vertical de esta representación tridimensional es de 1.5 μm.

VII.2.5 Propiedades ultraestructurales y distribución topográfica de NTCPM depositados sobre portaobjetos de vidrio y analizados con técnicas de microscopía confocal en el modo de reflexión.

En el desarrollo de estudios de nanotecnología ha sido difícil identificar las características y propiedades de NTCPS y de NTCPM en medios acuosos y en

membranas celulares de distinto origen filogenético. Es por lo anterior que tanto los NTCPM como los NTCPS han sido etiquetados con compuestos fluorescentes para poder ser identificados en células y tejidos aislados [16] [17] [18] [19]. Sin embargo, Bosi y col. [10] informaron que los NTCPM pueden ser visualizados en color blanco-gris por microscopía confocal en el modo de reflexión, sin haber sido marcados o etiquetados con compuestos fluorescentes.

En este trabajo de tesis presentamos un enfoque experimental innovador para identificar NTCPM sobre cubreobjetos de vidrio, sin tinción fluorescente. En esta serie de experimentos se utilizaron dos tipos de microscopio confocal: el primero fue un Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany, usado en experimentos realizados en el centro de investigación SISSA, Trieste, Italia y el segundo fue el microscopio confocal Carl Zeis LSM 700 usado en el laboratorio del CIMAV, Chihuahua, México.

En las Figuras 34 Y 35 se muestran resultados experimentales de los NTCPM observados con el microscopio confocal Leica. Los nanotubos aislados pudieron ser identificados tanto en diluciones 1:10 (Figura 34) como en diluciones 1:100 (Figura 35). El inserto de la Figura 35-B muestra un zoom de aumento a 63X de los nanotubos depositados sobre vidrio y observados con microscopio confocal en el modo de reflexión. Resulta claro identificar nanotubos aislados y no precipitados en esta figura, dada la baja concentración de 0.5 mg/mL usada.

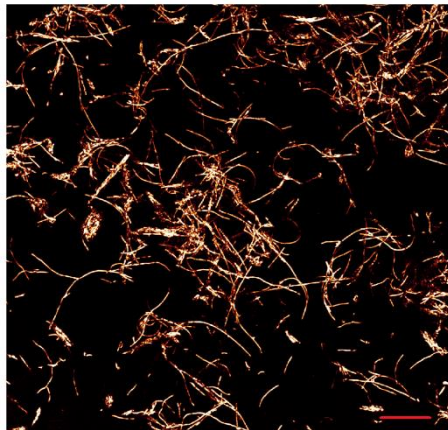


Figura 34. NTCPM con dilución 1:10 depositados en cubreobjetos de vidrio y observados con microscopio confocal en el modo de reflexión a 460 nm. La concentración de NTCPM fue de 0.5 mg/mL. La escala de la barra es 10 μ m. Micrografías tomadas con el microscopio confocal Leica.

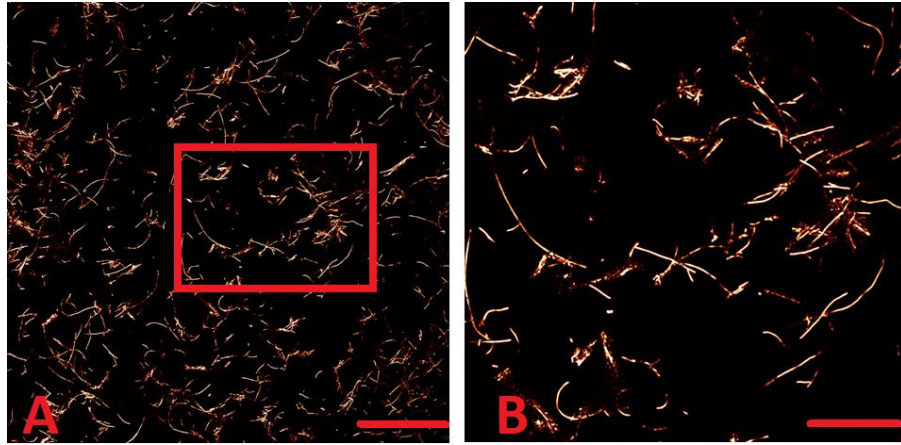


Figura 35. NTCPM en dilución 1:100 observados con microscopio confocal en el modo de reflexión a 460 nm. En A se muestra la dispersión de los NTCPM a una concentración de 0.05 mg/mL. En B se presenta un aumento del recuadro de A. En ambas micrografías se observa la dispersión de NTCPM tratados con PVP. La escala de la barra en A es de 50 μm , mientras que en B es de 20 μm . Micrografías tomadas con el microscopio confocal Leica.

Con el propósito de corroborar los resultados descritos en los párrafos anteriores, en donde se estudio la dispersión de NTCPM con microscopia confocal en el modo de reglexion, se repitieron estos experimentos en el laboratorio del CIMAV, Mexico, pero usando el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700. Se analizaron las mismas muestras de NTCPM preparadas en el Laboratorio de SISSA, encontrándose resultados muy similares. Como se muestra en la Figura 36, los NTCP se pudieron apreciar a concentraciones de 0.5 y 0.05 mg/mL. Como indica la Figura 36-B, dichos NTCPM están perfectamente dispersados en soluciones acuosas. Estos resultados de dispersión de nanotubos se corroboraron usando NTCPM a una dilución 1:10 (0.5 mg/ml) cuando los nanotubos fueron analizados con microscopía confocal en el modo de reflexión a distintos planos de profundidad (ver Figura 37); en dicha figura los distintos colores de nanotubos reflejan los distintos planos de profundidad de las imágenes tomadas con el microscopio confocal.

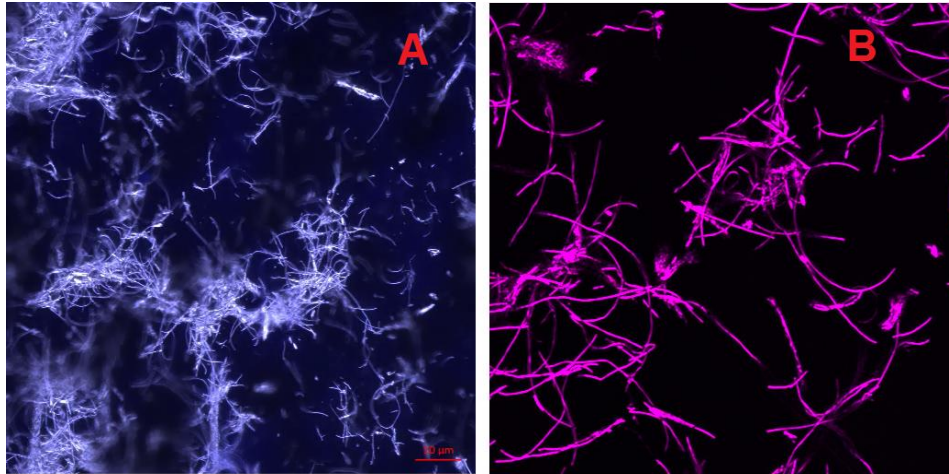


Figura 36. NTCPM a distinta concentración (1:0 y 1:100) observados con microscopio confocal en el modo de reflexión a 460 nm. Los NTCPM (5 mg/mL) fueron dispersados con PVP. Las micrografías fueron tomadas con objetivo de 63X: A). Dilución 1:10 (0.5mg/mL), y B). Dilución 1:100 (0.05 mg/mL). La escala de la barra es 10 µm. Micrografías tomadas con el microscopio confocal Carl Zeiss.

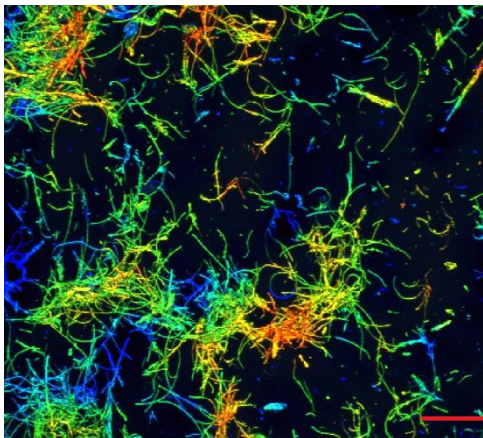


Figura 37. Distribución tridimensional de NTCPM diluidos 1:10, visualizados con el microscopio confocal Carl Zeiss en el modo de reflexión a 460 nm. Los distintos colores son las diferentes tomas a distintos planos de profundidad de los nanotubos depositados en portaobjetos de vidrio. La concentración de los NTCPM fue de 0.5 mg/mL. La escala de la barra es 10 µm.

VII.2.6 Propiedades ultraestructurales y distribución topográfica de NTCPM depositados sobre portamuestras y analizados con técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Considerando las dimensiones geométricas de los NTCPM sintetizados por pirólisis de aspersion: 70-100 nm de diámetro y varias micras de longitud, se usó la

técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) para identificar a los NTCPM aislados y dispersados con PVP-40 en soluciones acuosas.

En las Figuras 38 y 39 se presentan micrografías de NTCPM perfectamente aislados y depositados sobre la rejilla portamuestras en donde fueron depositados. Es de notar que todos los nanotubos identificados presentan la cavidad interna típica que permanece después del envolvimiento de multicapas, propia de los NTCPM. Inclusive, en la Figura 39 se puede apreciar la “boca” o cavidad remanente de un nanotubo de carbono de pared múltiple perfectamente aislado.

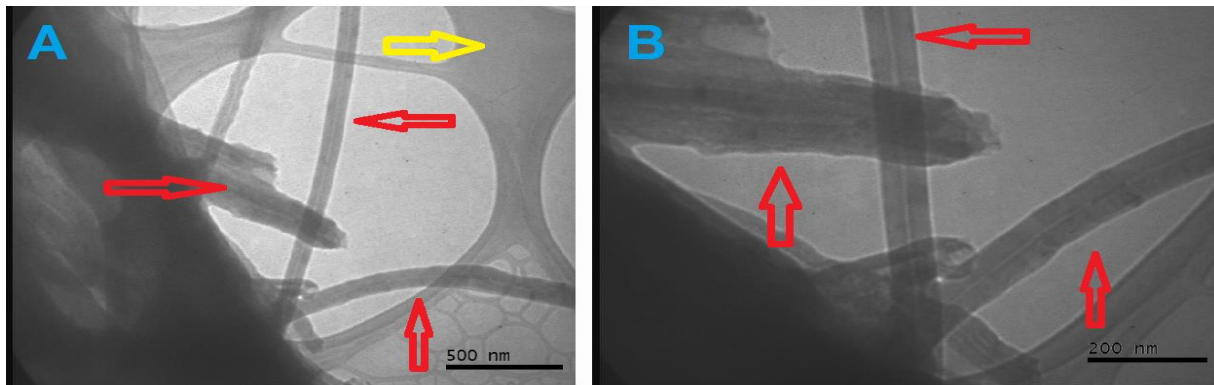


Figura 38 NTCPM a dilución 1:100 observados con microscopio electrónico de transmisión. Las flechas rojas indican la presencia de nanotubos depositados en la rejilla portamuestras. Nótese que no hay acumulación o precipitación de los nanotubos. La escala de la barra en A es de 500 nm, y en B es de 200 nm. La flecha amarilla en A indica la estructura de la rejilla portamuestras.

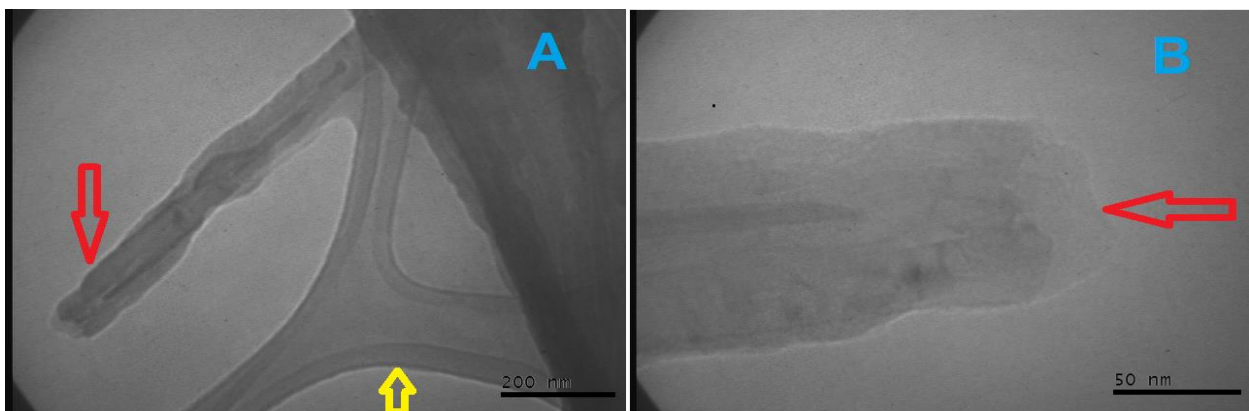


Figura 39. Micrografía de NTCPM (dilución 1:100) obtenida con microscopio electrónico de transmisión. **A** es una toma con magnificación de 11500X, donde la flecha roja señala a un NTCPM; la escala de la barra es de 200 nm. **B** es una toma a 50 000 X. La flecha roja en B indica el NTCPM y la cavidad o “boca” remanente de la envoltura de las múltiples capas de nanotubos enrollados entre sí y que dejan una cavidad en el interior del nanotubo. La escala de la barra es de 50 nm. La flecha amarilla en A indica la estructura de la rejilla portamuestras.

VII.3 Propiedades ultraestructurales y distribución topográfica de NTCPM depositados sobre las neuronas del ganglio cerebral de *Helix aspersa*.

VII.3.1 Estudios de microscopía óptica de cortes histológicos para conocer la distribución topográfica de los NTCPM depositados sobre neuronas del ganglio cerebral de *Helix aspersa*.

Se realizaron estudios histológicos para identificar la distribución topográfica de los NTCPM sobre la membrana celular de neuronas de *Helix aspersa*. La masa ganglionar de *Helix aspersa* fue fijada y tratada para la obtención de cortes histológicos de 4 y 10 micrómetros de espesor, los cuales fueron teñidos con azul de toluidina. En la Figura 40 se aprecia la distribución topográfica de los NTCPM rodeando la periferia de la membrana celular de neuronas identificadas. En estos estudios se observó que los NTCPM se acumularon en la superficie de la membrana celular de las células expuestas; sin embargo, en aquellas células que estuvieron cubiertas por tejido conectivo los NTCPM no se adhirieron sobre las neuronas, pero sí sobre la membrana de tejido conectivo que recubre estas masas ganglionares (Ver flechas amarillas en la Figura 40).

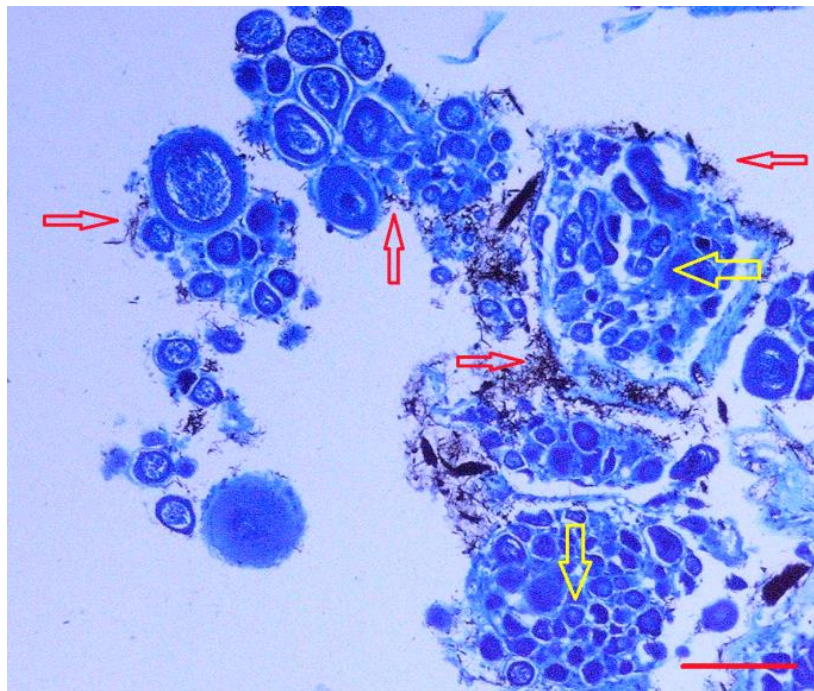


Figura 40. Micrografía de corte histológico de la masa ganglionar de *Helix aspersa* tratada con NTCPM. Este es un corte histológico a 4 μ m de espesor y teñido con azul de toluidina.

En la Figura 41 se muestra una micrografía con mayor aumento de un corte histológico de la masa ganglionar de *Helix aspersa* en donde claramente se puede identificar cómo los NTCPM se adhieren a la superficie de la membrana celular de neuronas aisladas.

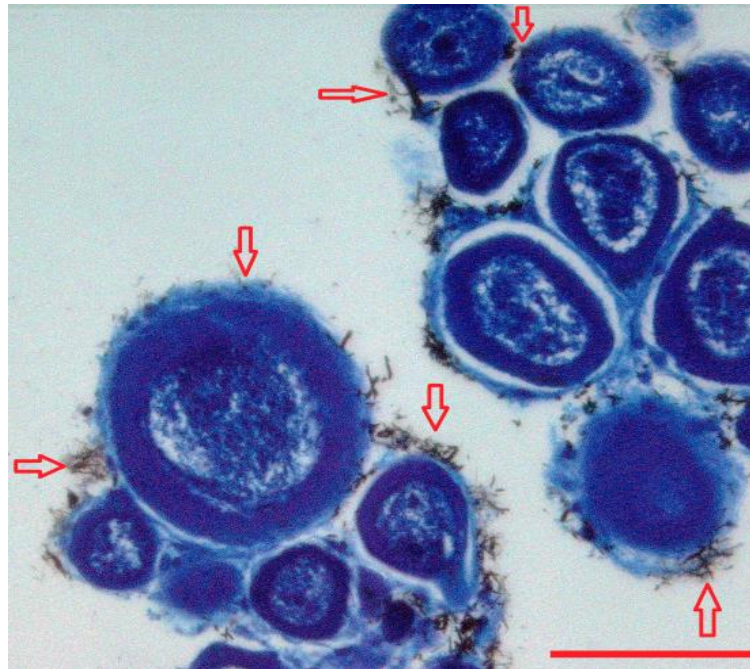


Figura 41. Corte histológico de neuronas de *Helix aspersa* tratadas con NTCPM. Se presenta un corte histológico de un espesor de 4 μm y teñido con azul de toluidina. Nótese la distribución extracelular de los NTCPM (en color negro), indicado con las flechas rojas.

VII.3.2 Propiedades ultraestructurales y distribución topográfica de NTCPM depositados sobre neuronas del ganglio cerebral de *Helix aspersa*. Estudios de microscopía electrónica de cortes histológicos.

Los resultados presentados en el apartado anterior indican que los NTCPM se acumulan en la superficie de la membrana celular de las neuronas de *Helix aspersa*. Este acúmulo de NTCPM se aprecia como mechones de nanotubos y no se logran identificar nanotubos aislados. Con base en lo anterior, decidimos realizar experimentos de microscopía electrónica de barrido en los cortes histológicos de la masa ganglionar de *Helix aspersa*, para identificar con mejor resolución a los NTCPM adheridos a la membrana celular de dichas neuronas.

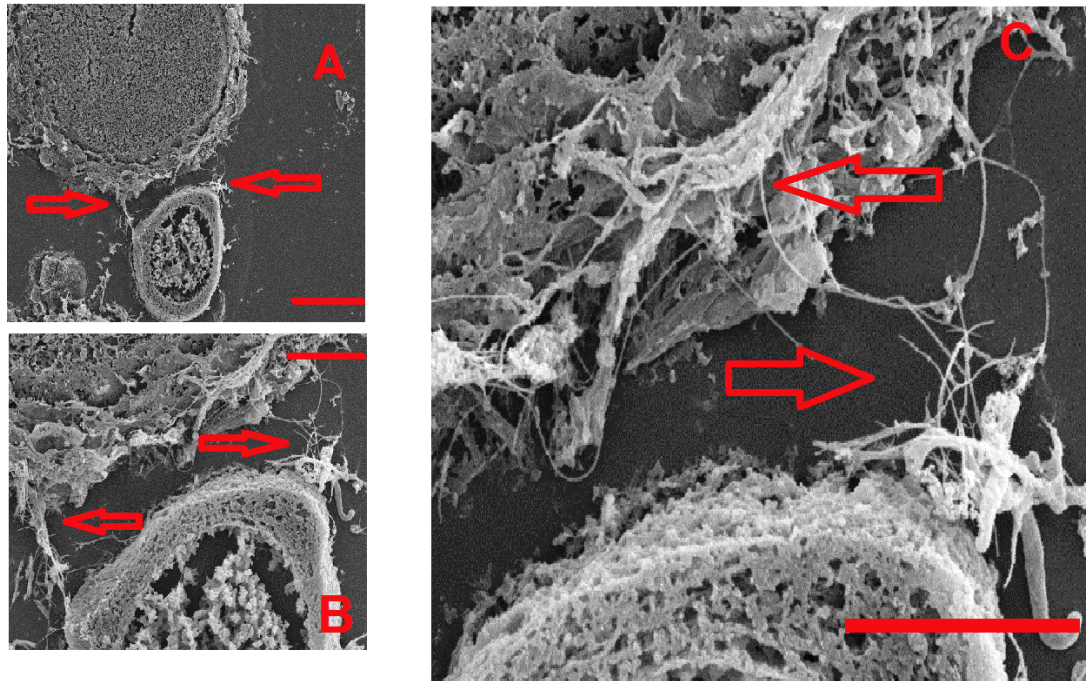


Figura 42. Micrografías tomadas con FESEM para identificar los NTCPM en neuronas de *Helix aspersa*. Los cortes histológicos aquí presentados fueron de 4 μm de espesor. Las muestras fueron tratadas con oro por el método de “sputtering”. Las flechas rojas en todos los paneles indican la identificación de NTCPM sobre la membrana neuronal. La escala de las barras en A, B y C es: 20 μm , 10 μm y 2 μm , respectivamente.

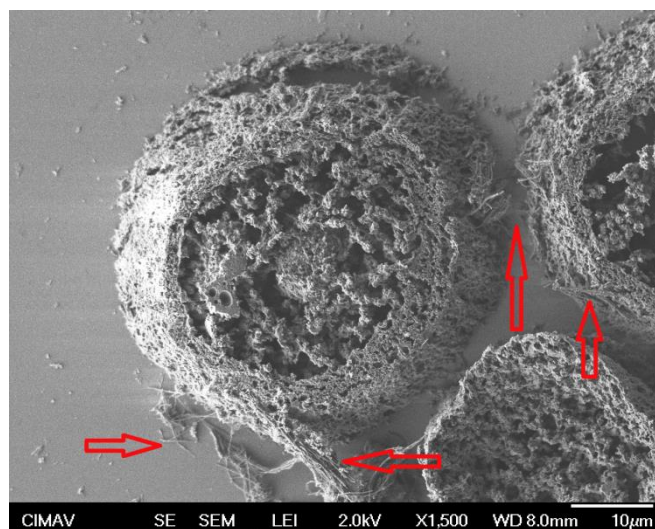


Figura 43. Micrografía tomada con el FESEM, de los NTCPM adosados y distribuidos sobre la membrana celular de neuronas aisladas. Las flechas indican la localización de los nanotubos. La micrografía fue tomada a 1500 aumentos. La escala de la barra es de 10 μm .

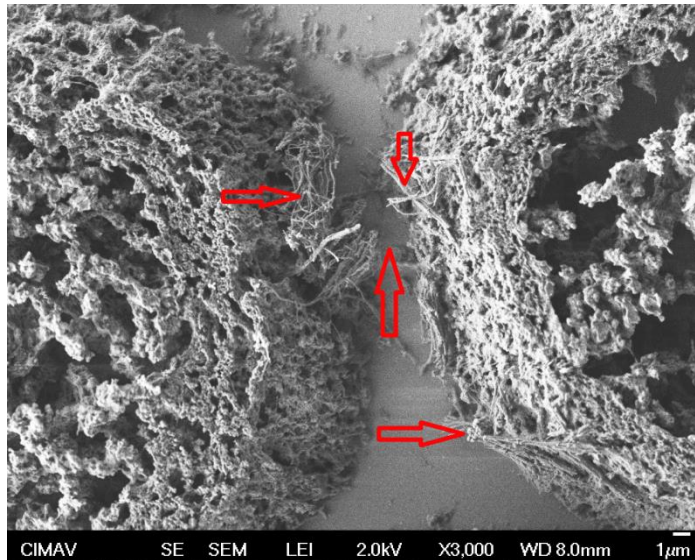


Figura 44. Micrografía tomada con el FESEM, con mayor acercamiento de los NTCPM adosados y distribuidos sobre la membrana celular de neuronas aisladas. Las flechas indican la localización de los nanotubos. Nótese cómo algunos NTCPM localizados sobre neuronas independientes conectan aparentemente ambas neuronas. La micrografía fue tomada a 3000 aumentos. La escala de la barra es de 1 μm .

La distribución topográfica de los NTCPM fue claramente identificada en la superficie de la membrana celular de neuronas aisladas (ver Figuras 42, 43 y 44). Esta distribución de los NTCPM sobre la membrana celular neuronal fue de dos formas: una, adosados y pegados sobre la membrana; otra, aparentemente insertados sobre la membrana con puntas de nanotubos expuestas al exterior de la membrana, tal como se observa con mayor resolución en las Figuras 43 y 44. Este hallazgo resulta ser de gran relevancia, ya que estas puntas de nanotubos presentes entre dos neuronas cercanas pudieran permitir la interconexión de estas dos neuronas entre sí por NTCPM.

VII.3.3 Propiedades ultraestructurales y distribución topográfica de NTCPM depositados sobre neuronas del ganglio cerebral de *Helix aspersa*. Estudios de microscopía electrónica de baja y alta resolución.

Los hallazgos experimentales presentados en las dos secciones anteriores sugieren que los NTCPM se adhieren o adosan sobre la membrana celular de las neuronas de *Helix aspersa*. Sin embargo, esos resultados no son concluyentes ya que el adosamiento de los nanotubos sólo se visualiza en porciones parciales de la membrana celular. Es por lo anterior que decidimos realizar experimentos en donde las neuronas íntegras localizadas “in situ” en los ganglios del cerebro de caracol *Helix aspersa* fueran

tratadas y expuestas a los NTCPM. Para lograr lo anterior, lo primero que hicimos fue hacer una microdissección de la masa ganglionar lo más adecuada posible para tener neuronas totalmente expuestas, sin el recubrimiento de tejido conectivo. Los NTCPM se aplicaron a los ganglios cerebrales de *Helix aspersa* a concentraciones finales de 0.1 a 0.5 mg/mL en solución Ringer de caracol (SRC) y se incubaron durante 12 h. Para retirar los NTCPM no adheridos a las neuronas, la preparación se lavó dos veces con SRC. Después de ese lavado, los ganglios fueron incubados y fijados en paraformaldehído al 4% en SRC durante 12 h a temperatura ambiente. Para los estudios de SEM de baja resolución, los ganglios se lavaron con SRC dos veces y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los ganglios ya fijados se depositaron sobre portamuestras cilíndricas de 1 cm de diámetro, hechas de latón. Los ganglios fueron tratados con plata por el método de pulverización catódica “sputtering”. En las Figuras 45 y 46 se muestran micrografías de neuronas de *Helix aspersa* tratadas con NTCPM. Se observó que los NTCPM fueron claramente identificados sobre la superficie externa de las neuronas y se adosaron a las neuronas en forma de mechón o acúmulo de nanotubos, no observándose nanotubos aislados. Lo anterior se puede explicar porque en estos experimentos se usó una concentración relativamente alta de nanotubos que fue de 0.5 mg/mL. Hay algo que resalta en las micrografías tomadas en estos experimentos, y es que a pesar de que las neuronas están claramente identificadas y aisladas están constreñidas y arrugadas, lo cual puede ser debido al tipo de sustancia fijadora usada, que en este caso fue el paraformaldehído al 4%.

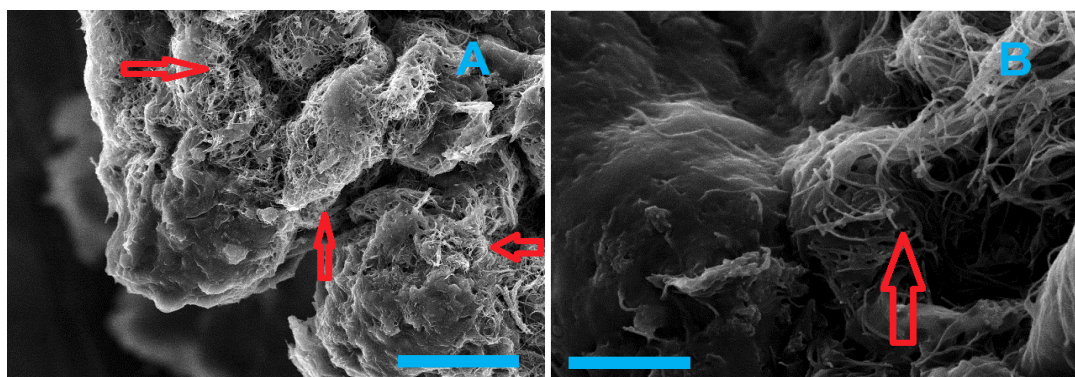


Figura 45. Micrografías de NTCPM depositados sobre neuronas de *Helix aspersa*. Imágenes tomadas con microscopía electrónica de barrido de baja resolución para identificar la distribución topográfica de NTCPM (dilución 1:10 en SRC) sobre la superficie de las neuronas de *Helix aspersa*. La escala de barra en A es 20 µm y en B es de 2 µm. A representa las neuronas a un aumento de 1500x y B representa las mismas neuronas con un aumento de 5000x. Las flechas rojas indican la distribución de NTCPM sobre las neuronas.

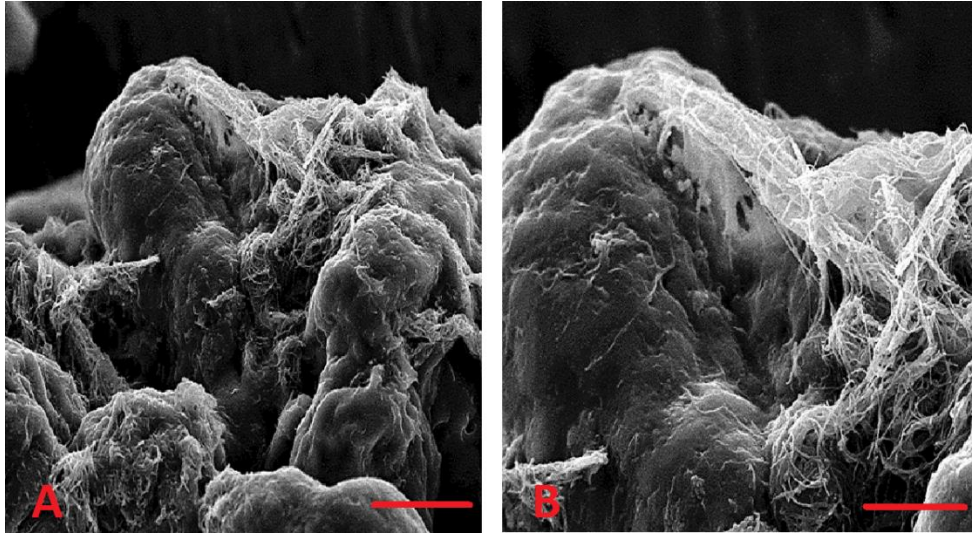


Figura 46. Micrografía de NTCPM depositados sobre neuronas de *Helix aspersa*, observados con microscopio electrónico de barrido (SEM) de baja resolución. Se identifica la distribución topográfica de NTCPM (dilución 1:10 en SRC). La escala de barra en A es de 20 µm y en B es de 2 µm. A representa las neuronas a un aumento de 1500x y B representa las mismas neuronas con un aumento de 3000x. Medio de fijación paraformaldehído al 4%.

Los experimentos para identificar a los NTCPM depositados sobre las neuronas de *Helix aspersa* se repitieron, pero usando en este último caso el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) de alta resolución. En estos experimentos las neuronas fueron tratadas con NTCPM a una concentración de 0.05 mg/dL, casi 10 veces menor a la que se usó en los experimentos descritos en el apartado anterior. La fijación de las neuronas, en este caso, se llevó a cabo utilizando la solución de Karnowski (glutaraldehído 2.5% y formaldehído al 2%, aforando el volumen final con solución Ringer de caracol). Esta última es la solución de fijación de muestras biológicas a estudiar con técnica de microscopía electrónica de barrido. Como se ilustra en la Figura 47, las neuronas tratadas con NTCPM y fijadas con solución de Karnowski presentan una morfología normal: de forma esférica, sin arrugas o constricciones membranales y en su superficie presentan NTCPM aislados y claramente identificables.

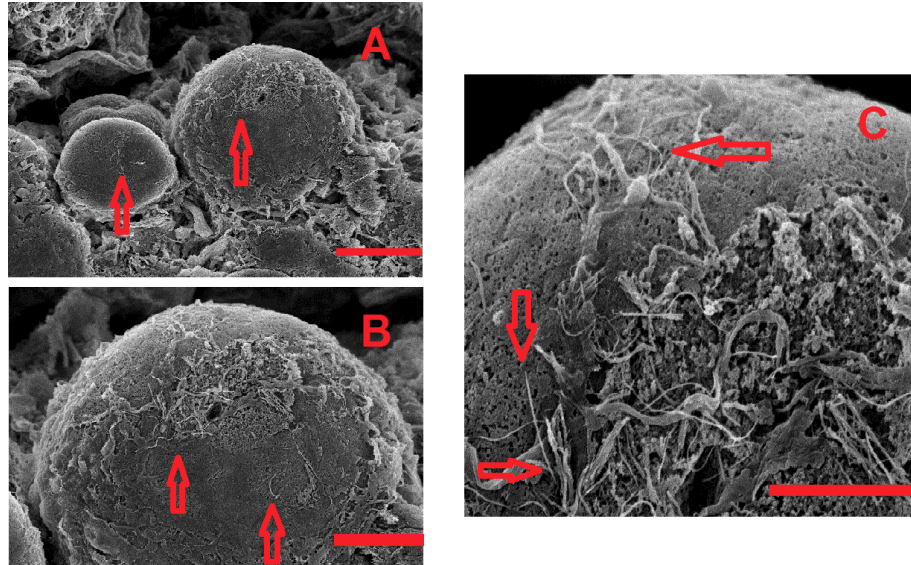


Figura 47. Micrografía de NTCPM depositados sobre neuronas de *Helix aspersa* observados con microscopio FESEM. Se identifica la distribución topográfica de NTCPM (0.05 mg/dL). La escala de barra en A es de 50 µm, en B es de 20 µm y en C es de 2 µm. A) Representa las neuronas a un aumento de 1500x, B) representa las mismas neuronas con un aumento de 3000x, y C) es un acercamiento de la neurona en B con aumento de 5000x. Medio de fijación: solución de Karnowski modificada.

Para poder tener una mejor apreciación de los NTCPM localizados sobre la superficie neuronal, en otra serie de experimentos se procedió a comprimir con un cubreobjetos a los ganglios ya fijados; es decir, a aplanar la preparación. En la Figura 48 se muestran los resultados de los experimentos con estas manipulaciones. Como puede observarse en esa figura, las neuronas perdieron su morfología esférica y se muestran aplanadas. Lo anterior permitió apreciar con mayor claridad a los nanotubos aislados adosados sobre la membrana neuronal. Más aún, en la Figura 48 del lado derecho se puede ver que los nanotubos no sólo están adosados sobre la membrana sino que algunos de ellos se insertan o se meten en la membrana neuronal. Esto último sugiere que los NTCPM pudieran penetrar y atravesar la membrana celular de la neurona y tener una acumulación final dentro del citoplasma o núcleo.

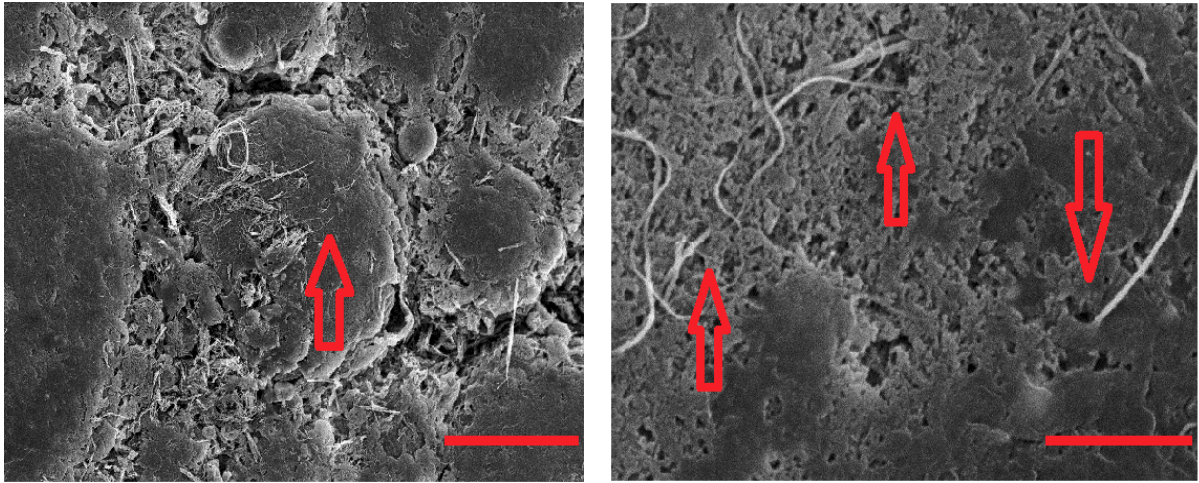


Figura 48. Micrografía de NTCPM depositados sobre neuronas de *Helix aspersa* aplanadas. Los NTCPM fueron observados con microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) de alta resolución. Se identifica la distribución topográfica de NTCPM (concentración 0.05 mg/mL en SRC). La escala de barra en la foto izquierda es de 10 μm y en la foto de la derecha es de 2 μm . La figura de la izquierda presenta las neuronas a un aumento de 1500x, la foto de la derecha presenta las mismas neuronas con un aumento de 10000x. Medio de fijación: solución de Karnowski.

VII.3.4 Propiedades ultraestructurales y distribución topográfica de NTCPM marcados con compuestos fluorescentes y depositados sobre neuronas del ganglio cerebral de *Helix aspersa*. Estudios de microscopía confocal.

Debido al tamaño y morfología de los nanotubos de carbono y a sus altas propiedades hidrofóbicas ha sido difícil identificar su dispersión y sus propiedades ultraestructurales, cuando son depositados en soluciones acuosas y cuando son depositados sobre la membrana celular de las neuronas y otras células. Como resultado de lo anterior es que los NTCPM y los NTCPs han sido marcados o etiquetados con compuestos fluorescentes, con el propósito de poderlos identificar en células y tejidos [125] [126] [127] [128]. Shityakov y col. [125] informaron que los NTCPM fueron funcionalizados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y estos nanotubos marcados con compuestos fluorescentes se utilizaron para el estudio de la dinámica molecular de la barrera hematoencefálica. Iancu y col. [126] utilizaron NTCPM funcionalizados con albúmina sérica humana y marcados con fluoresceína para permitir ablación tumoral de cáncer de hígado “in vitro” con la técnica de ablación térmica usando láser. Hao y col. [127] informaron del suministro de fluoresceína en células vegetales utilizando NTCPs

magnéticos. Chen y col. [128] reportaron la incorporación de conjugados de nanotubos de carbono-fluoresceína en células cancerosas de ovario en humanos.

Con base en los antecedentes presentados en el párrafo anterior, nos propusimos evaluar el posible marcaje de NTCPM con compuestos fluorescentes y su posible interacción con membranas de neuronas de *Helix aspersa*. Estas neuronas fueron tratadas con NTCPM marcados con compuestos fluorescentes durante 2 horas; se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% por 2 horas; se permeabilizaron con Triton X100 al 0.1% durante 30 min, y la preparación se incubó en Hoetchst 333742 también llamado DAPI durante 1 h. Posteriormente, la preparación se montó en portaobjetos: se le agregaron dos gotas de vectashield, se le cubrió con cubreobjetos, y se observó al microscopio confocal. En estos experimentos se encontró que los NTCPM marcados con FITC fueron claramente identificados en la masa ganglionar de *Helix aspersa* y estaban adheridos a la membrana celular que cubre a las neuronas. En la Figura 49 se pueden apreciar: 1). En el panel A, los núcleos de las neuronas del ganglio E de la masa cerebral del caracol de jardín *Helix aspersa*, los cuales están teñidos en azul por el marcaje específico de Hoetchst 333742; 2). En el panel B se puede apreciar cómo las membranas celulares de estas neuronas son cubiertas por los NTCPM-FITC que se distribuyen en forma de puntos o placas discontinuas rodeando la membrana celular. Tales resultados del marcaje neuronal con NTCPM-FITC se comprueban en la Figura 50. En el panel B de esa figura se observa cómo la membrana celular de las neuronas 1 y 2 F del ganglio cerebral de *Helix aspersa* aparece marcada con NTCPM-FITC, rebordeando la membrana celular sin aparente internamiento a nivel intracelular. El hecho de que no se observen los nanotubos marcados con fluoresceína en el interior de las células puede ser explicado por el corto tiempo de incubación de las neuronas con los nanotubos, que fue de 2 hrs.

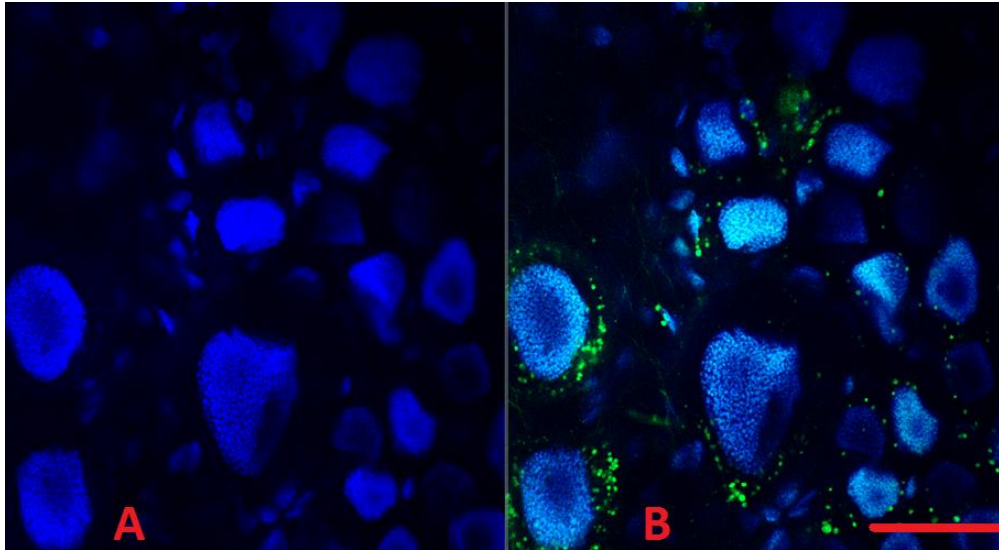


Figura 49. Distribución topográfica de NTCPM-FITC en las neuronas del ganglio E de *Helix aspersa*. Micrografías tomadas con microscopio confocal que muestran la distribución topográfica de NTCPM-FITC en las neuronas del ganglio E de *Helix aspersa*. En A se muestran los núcleos de las neuronas en azul, marcados con Hoetchst 333742. En B se muestran los núcleos de las neuronas en azul rodeados por la membrana neuronal a la cual se adhirieron los NTCPM-FITC señalados en verde. La escala de la barra es de 50 μ m.

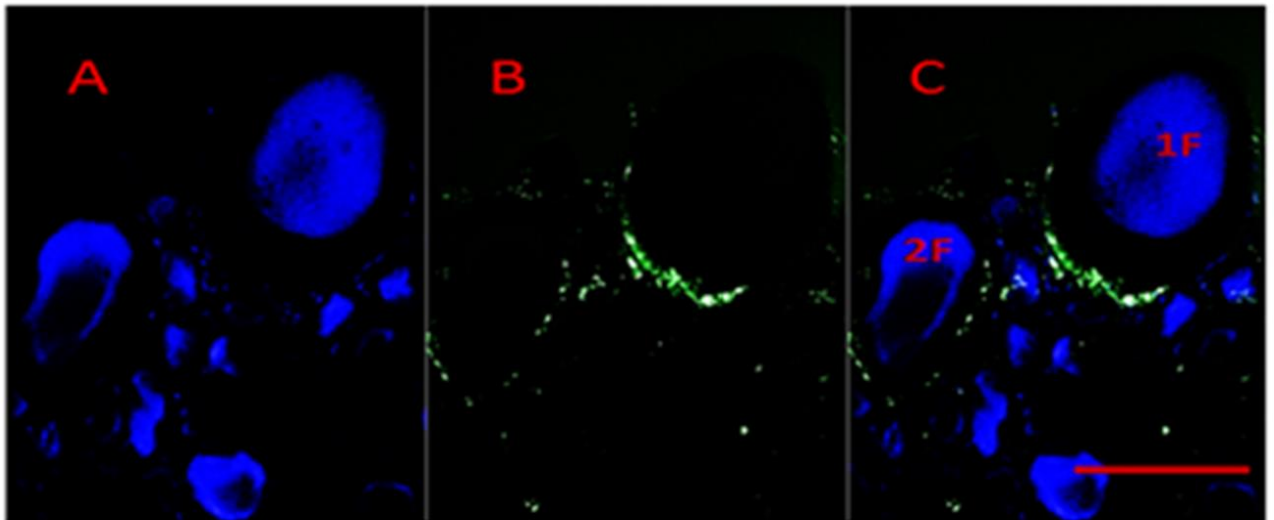


Figura 50. Distribución topográfica de NTCPM-FITC en las neuronas 1F y 2F de *Helix aspersa*. Las micrografías tomadas con microscopio confocal muestran la distribución topográfica de NTCPM-FITC en las neuronas 1F y 2F de *Helix aspersa*. En A se muestran los núcleos de las neuronas en azul, marcados con Hoetchst 333742. En B se muestran los NTCPM-FITC en verde, adheridos a la membrana neuronal. El panel C es la combinación de A + B. La escala de barra es de 50 μ m.

VII.3.5 Propiedades ultraestructurales y distribución topográfica de NTCPM depositados sobre neuronas del ganglio cerebral de *Helix aspersa*. Estudios de microscopía confocal en el modo de reflexión.

Como se discutió en la sección anterior, tanto los NTCPM como los NTCPS han sido etiquetados con compuestos fluorescentes para poder ser identificados al ponerlos en contacto con células y tejidos aislados [125] [126] [127] [128]. Sin embargo, Bosi y col. [129] han reportado que los NTCPM pueden ser visualizados en color blanco-gris por microscopía confocal en el modo de reflexión, permitiendo la visualización de dichos nanotubos en andamios estructurales 3D, sin haber sido marcados con compuestos fluorescentes. Con esta metodología de microscopía confocal en el modo de reflexión pudimos identificar a los NTCPM depositados sobre neuronas del ganglio cerebral del invertebrado *Helix aspersa*, sin haber sido marcados con compuestos fluorescentes. Como se puede apreciar en las Figuras 51 y 52, las neuronas fueron eficientemente teñidas con marcadores específicos para membrana celular (WGA-A594) el cual tiñó la membrana celular en rojo. Los núcleos de las neuronas se tiñeron en verde al usar un marcador selectivo del núcleo, como lo es el marcador fluorescente de núcleos celulares (DAPI). Los NTCPM fueron identificados en color blanco-grisáceo cuando el microscopio confocal fue usado en el modo de reflexión. Como puede apreciarse en ambas Figuras 51 y 52, los NTCPM se distribuyeron sobre la membrana celular de las neuronas marcada con rojo.

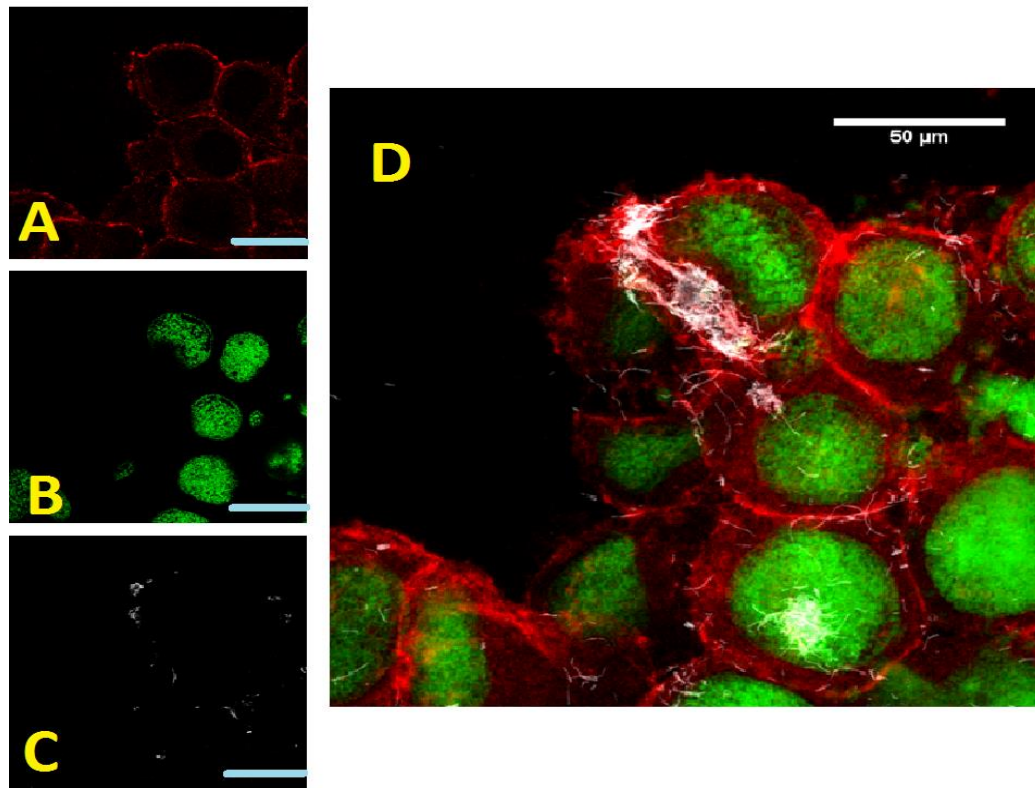


Figura 51. NTCPM depositados sobre neuronas de *Helix aspersa* y visualizados con microscopio confocal marca Leica en el modo de reflexión. En A se muestra la membrana celular marcada con WGA-A594, en rojo. En el panel B se muestran los núcleos de las neuronas marcados con DAPI, en verde. En el panel C se muestran los NTCPM en color gris-blanco identificados por el microscopio confocal en el modo de reflexión. En el panel D se presenta la combinación de los paneles A, B y C. Las micrografías fueron tomadas con objetivo 40 x. La escala de la barra es 50 μm .

Aunado a lo anterior, en estos experimentos se pudo demostrar que con la técnica de microscopía confocal en el modo de reflexión se puede hacer un análisis tridimensional de la distribución de nanotubos sobre las neuronas. Esto permitió observar que los nanotubos no sólo se depositan sobre la membrana celular y se adhieren a la misma, sino que dichos nanotubos además atraviesan la membrana celular y pueden acumularse al interior del citoplasma o sobre el núcleo (ver Figura 52). Estos resultados apoyan la hipótesis de que los NTCPM se adhieren con alta afinidad a la membrana celular, la atraviesan y pueden acumularse a nivel intracelular.

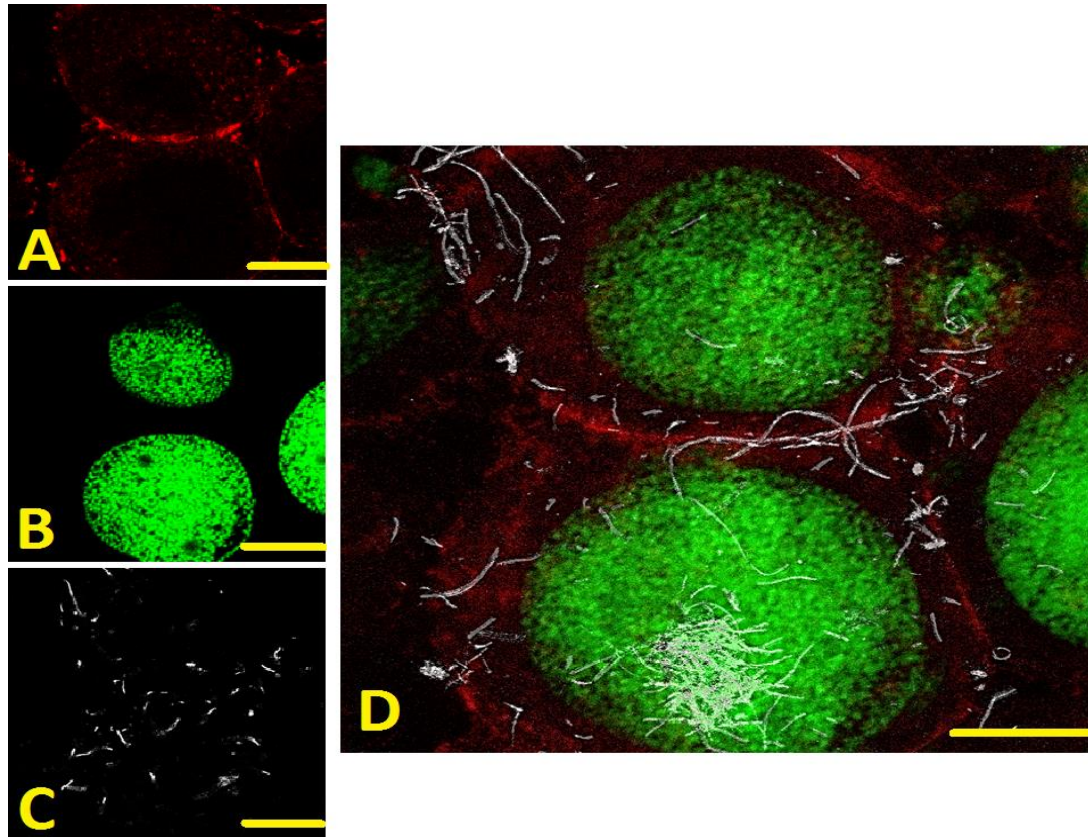


Figura 52. NTCPM depositados sobre neuronas de *Helix aspersa* y visualizados con microscopio confocal marca Leica, en el modo de reflexión a 64x con zoom. En el panel A se muestra la membrana celular marcada con WGA-A594, en rojo. En el panel B se muestran los núcleos de las neuronas marcados con DAPI, en verde. En el panel C se muestran los NTCPM en color gris-blanco identificados por el microscopio confocal, en el modo de reflexión. El panel D es la combinación de los paneles A, B y C. Las micrografías fueron tomadas con objetivo 63X. La escala de la barra es 10 μm .

VII.4 Efecto de NTCPM sobre las propiedades eléctricas de neuronas del ganglio cerebral de *Helix aspersa*.

Existen reportes controversiales sobre la toxicidad de los nanotubos de carbono en las neuronas y tejidos excitables. Los efectos de los NTC han sido evaluados en los canales iónicos dependientes de voltaje de transmembrana. Se ha propuesto que los NTCPM y los NTCPS son bloqueadores de canales iónicos de potasio y de calcio [79-82]. Los canales de potasio y calcio que subyacen a las señales bioeléctricas de las neuronas de *Helix aspersa* tienen propiedades similares a aquellos canales en los que se ha evaluado el efecto de NTCPM. En base a lo anterior, el objetivo de estos

experimentos fue caracterizar el efecto de los NTCPM sobre las propiedades bioeléctricas de las neuronas del caracol *Helix aspersa*: el potencial de acción normal, la actividad eléctrica espontánea, la hiperpolarización postetánica y el potencial de acción cálcico.

Como ya se mencionó en la sección de Material y métodos, las neuronas de *Helix aspersa* presentan actividad eléctrica espontánea; es decir, disparan potenciales de acción sin ningún estímulo externo. Tomando en cuenta lo anterior se evaluó el posible efecto que pudieran tener los NTCPM sobre la actividad eléctrica espontánea de neuronas de *Helix aspersa*. En estos experimentos se seleccionaron las neuronas 1F y 2F las cuales presentan esta característica de generar potenciales de acción en forma espontánea.

En la Figura 53 se muestran los registros de potenciales de acción de la neurona 1F en condiciones control (A) y cuando la célula es tratada con NTCPM (B). Como puede apreciarse en la Figura 53-B, la aplicación de NTCPM a una concentración de hasta 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no modificó la actividad eléctrica espontánea de la célula 1F. En algunos registros del potencial de acción, tanto en condiciones control como en los tratados con NTCPM, la amplitud de dicho potencial se observa ligeramente modificada; esto no fue debido a la acción de los nanotubos sino a la frecuencia con que las señales fueron adquiridas.

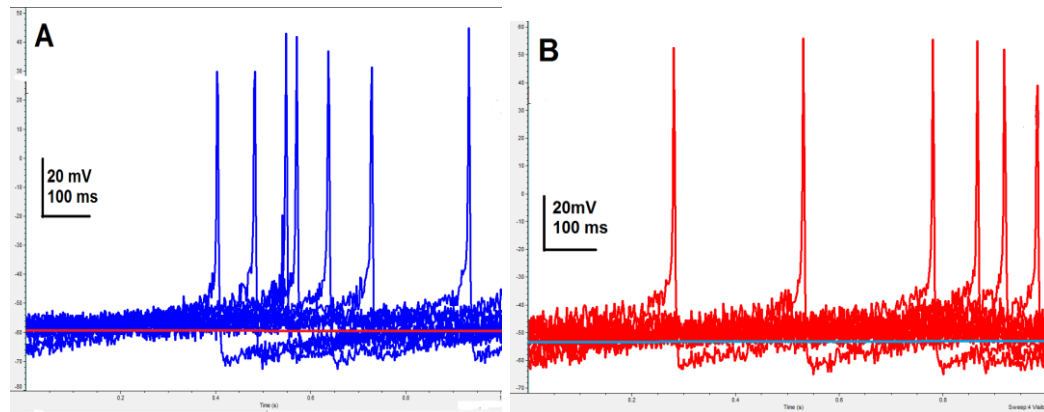


Figura 53. Efecto de los NTCPM sobre la actividad eléctrica espontánea de la neurona 1F de *Helix aspersa*. A). Condiciones control y B). Efecto de NTCPM a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Con el propósito de evaluar con más claridad el posible efecto de los NTCPM sobre la amplitud y la morfología de potenciales de acción en neuronas de caracol se

realizaron experimentos en donde la neurona fue estimulada con pulso despolarizante a una frecuencia de 0.5 Hz. En la Figura 54 se muestran los registros de un par de potenciales de acción en condiciones control (A) y cuando la preparación fue tratada con NTCPM (B). Como se puede observar en el panel B de esa figura, los NTCPM no modificaron la amplitud ni la duración del potencial de acción, ni tampoco la fase de hiperpolarización. Estos resultados sugieren que los nanotubos no interfieren con las conductancias iónicas de Na^+ ni de Ca^{++} que subyacen a la fase de ascenso del potencial de acción, ni tampoco modifican las conductancias iónicas de potasio que subyacen a la fase de hiperpolarización del potencial de acción.

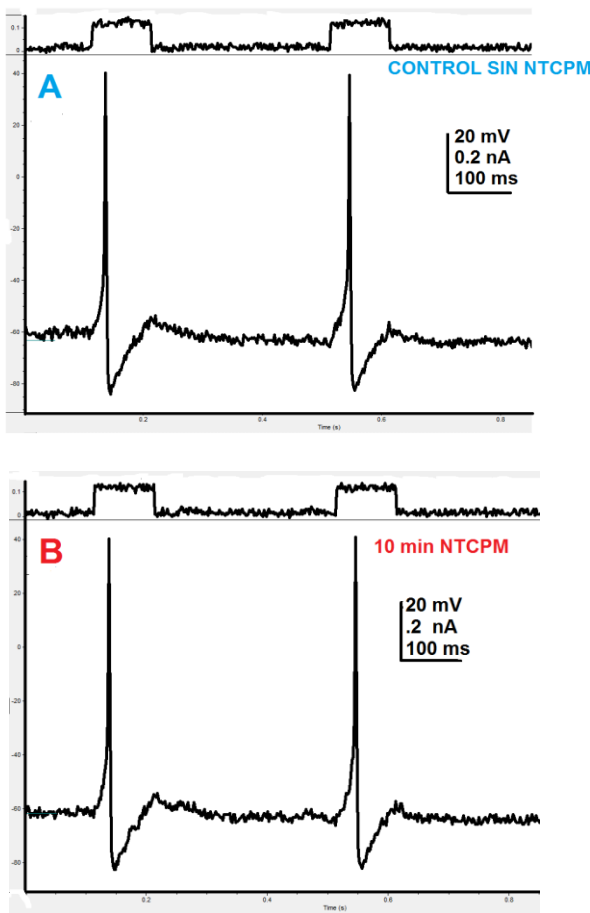


Figura 54. Efecto de NTCPM sobre la amplitud y morfología del potencial de acción en la célula 2F. El trazo cuadrado superior es el pulso de corriente despolarizante, y los trazos inferiores son los potenciales de acción: A). En condiciones control y B). Después de 10 min de perfusión de NTCPM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

En otra serie de experimentos se estudió el posible efecto de los NTCPM sobre la hiperpolarización postetánica presente en la neurona 1F de *Helix aspersa*. Se realizaron experimentos electrofisiológicos intracelulares convencionales con microelectrodos en

condiciones de fijación de corriente. En estos experimentos, la solución externa que bañó a las neuronas fue la SRC normal (ver Tabla 2) y se usaron microelectrodos de registro los cuales fueron llenados con solución de KCl 1 M, teniendo una resistencia de entre 2-10 M Ω .

Como se mencionó en la sección de Material y métodos, esta hiperpolarización post-tetánica ha sido caracterizada electrofisiológicamente en este tipo de células de *Helix aspersa* y se ha demostrado que dicha hiperpolarización es el resultado de la activación del canal de potasio que depende de calcio. La célula 1F tiene actividad eléctrica espontánea; es decir, dispara constantemente potenciales de acción en forma de trenes o ráfagas seguidas de una hiperpolarización de membrana (hiperpolarización posttetánica) la cual se asocia a una supresión de disparo de potenciales de acción. Esto es una característica típica de la neurona 1F (ver Figura 61). En condiciones experimentales, la hiperpolarización posttetánica se puede generar con la aplicación de pulsos despolarizantes por tiempos definidos de 2 a 10 segundos. Los potenciales de acción en forma de ráfaga, generados por esta despolarización, favorecen el influjo de calcio en forma masiva al interior de la célula; lo que activa al canal de potasio que depende de calcio.

Como se puede observar en la Figura 55a, la hiperpolarización posttetánica se produjo después de una ráfaga de potenciales de acción la cual, en este caso, se generó por la aplicación de un pulso despolarizante de 2 segundos de duración y de 0.2 nA de corriente. En la Figura 55a se presentan dos paneles (A y B), cada uno de ellos con 3 registros sobrepuestos de la hiperpolarización posttetánica: en el A son presentados registros en condiciones control, y en el B se presentan después de que la célula fue tratada durante 15 minutos con NTCP a una concentración de 50 μ g/mL. Como puede observarse en ambos paneles (A y B), las magnitudes de despolarización e hiperpolarización fueron similares en condiciones control y cuando las células fueron tratadas con NTCPM.

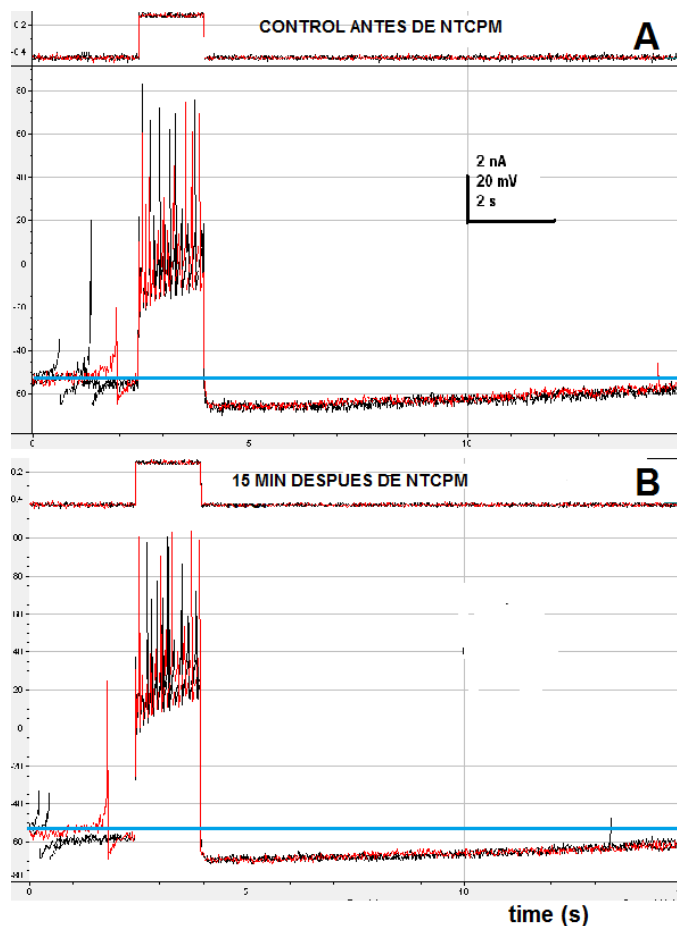


Figura 55a. Efecto de los NTCPM sobre la hiperpolarización posttetánica de la célula IF; registros sobrepuestos. El trazo cuadrado superior de cada panel es el estímulo de pulso despolarizante y los trazos inferiores son los potenciales de acción generados por dicho pulso. En A se muestran los registros control antes de la aplicación de nanotubos. En B se muestran registros de hiperpolarización posttetánica después de 15 min de aplicación de NTCPM a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La línea azul en ambos paneles es trazada a nivel del potencial de membrana en reposo con el propósito de evidenciar que la magnitud de la hiperpolarización posttetánica no se modificó con la aplicación de NTCPM.

En otros experimentos se encontraron resultados similares que se presentan en la Figura 55b. Como puede apreciarse en esa figura, la magnitud de la hiperpolarización posttetánica en los tres registros mostrados en el panel (A) fue similar a la observada en los registros del panel (B), a pesar de que en estos últimos la preparación fue tratada con NTCPM 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante quince minutos. Estos resultados sugieren que los NTCPM no modifican ni afectan la conductancia de potasio que depende del calcio que subyace a la hiperpolarización posttetánica; esto pudiera deberse a que los NTCPM no bloquearon el influjo de calcio producido en el tren de potenciales de acción, por lo tanto las concentraciones de calcio incrementadas a nivel intracelular pudieron activar la conductancia de potasio que depende de calcio.

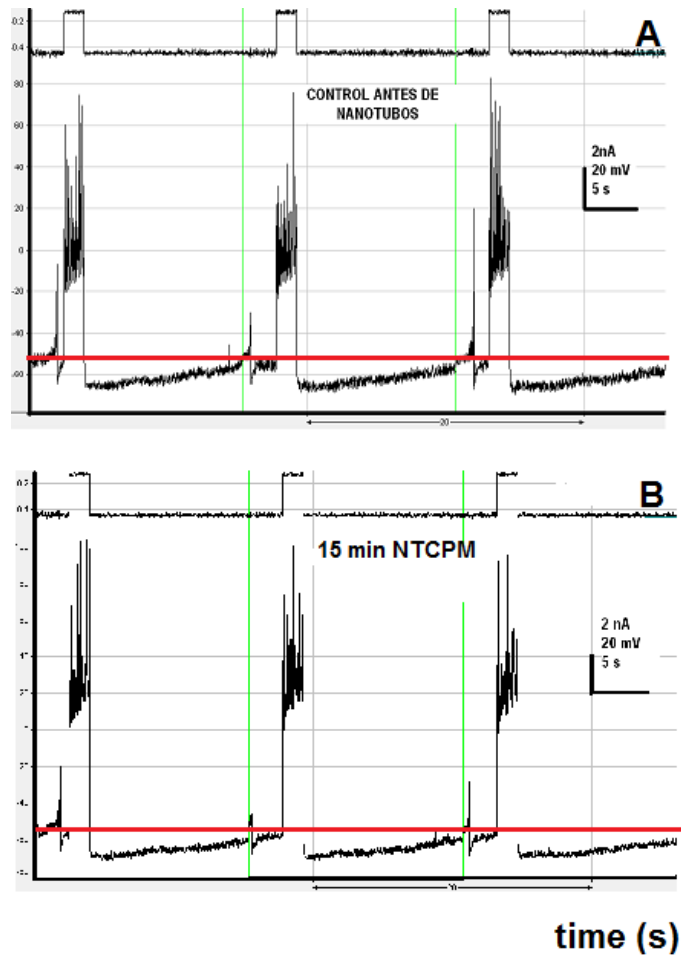


Figura 55b. Efecto de los NTCPM sobre la hiperpolarización posttetánica de la célula IF, registros concatenados. El trazo cuadrado superior de cada panel es el estímulo de pulso despolarizante y los trazos inferiores son los potenciales de acción generados por dicho pulso. En **A** se muestran 3 registros concatenados en condiciones control, antes de la aplicación de nanotubos. En **B** se muestran registros similares concatenados de hiperpolarización posttetánica después de 15 min de aplicación de NTCPM a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$. La línea roja en ambos paneles es trazada a nivel del potencial de membrana en reposo para evidenciar que la magnitud de la hiperpolarización posttetánica no se modificó.

Los resultados descritos en párrafos anteriores sugieren que el influjo de calcio a través del canal de calcio dependiente de voltaje, presente en el tren de potenciales de acción que precede a la hiperpolarización, no es afectado por los NTCPM. Sin embargo resulta indispensable realizar experimentos en donde el potencial de acción cálcico (PA- Ca^{2+}) sea el único parámetro de estudio, sin que intervengan ni el Na^+ ni el K^+ que fluyen en un potencial de acción normal, y estudiar la espiga despolarizante debida solamente al influjo de calcio. Para llevar a cabo lo propuesto, se realizaron

experimentos en donde se estudió el efecto de los NTCPM sobre la duración del potencial de acción cálcico en neuronas de *Helix aspersa*. Estos fueron experimentos electrofisiológicos intracelulares convencionales con microelectrodos en condiciones de fijación de corriente en las células 76F y 77F del caracol de jardín *Helix aspersa*. Para aislar el PA-Ca²⁺ las células se perfundieron con solución alto calcio (en mM): TEA-Cl, 75; CsCl, 5; 4-AP, 5; CaCl₂ 20; Glucosa, 5; Hepes, 5; y pH 7,5. Además los microelectrodos de registro fueron llenados con solución de CsCl 1 M, teniendo una resistencia de entre 2-10 MΩ. En estas condiciones de registro no existe Na⁺ y los canales de potasio fueron suprimidos usando bloqueadores selectivos de canales de potasio como son: TEA-Cl, 4-AP y CsCl.

Antes de tratar a las neuronas con NTCPM decidimos probar un bloqueador selectivo de canales de calcio, como lo es el cloruro de cadmio (CdCl₂) sobre el PA-Ca²⁺ de neuronas de *Helix aspersa*. Como puede observarse en la Figura 56a, el PA-Ca²⁺ en neuronas de *Helix aspersa* semeja a un potencial de acción de células cardíacas, ya que tiene una amplitud de aproximadamente 120 mV; tiene una fase de plato durante su despolarización, y el potencial de acción tiene una duración de casi un minuto. La duración de este PA-Ca²⁺ es marcadamente reducida después de 5 minutos de aplicación del CdCl₂ a una concentración de 1 mM (ver Figura 56a-B). Este efecto bloqueante es revertido cuando la preparación se baña con solución Ringer sin CdCl₂ (ver Figura 56a-C). Se pudo observar que el efecto de lavado del CdCl₂ no fue totalmente reversible, ya que después de más de 10 minutos de lavado la duración del PA-Ca²⁺ no se recuperó a su condición control; esto pudiera ser debido a la alta concentración de cadmio utilizada (1 mM).

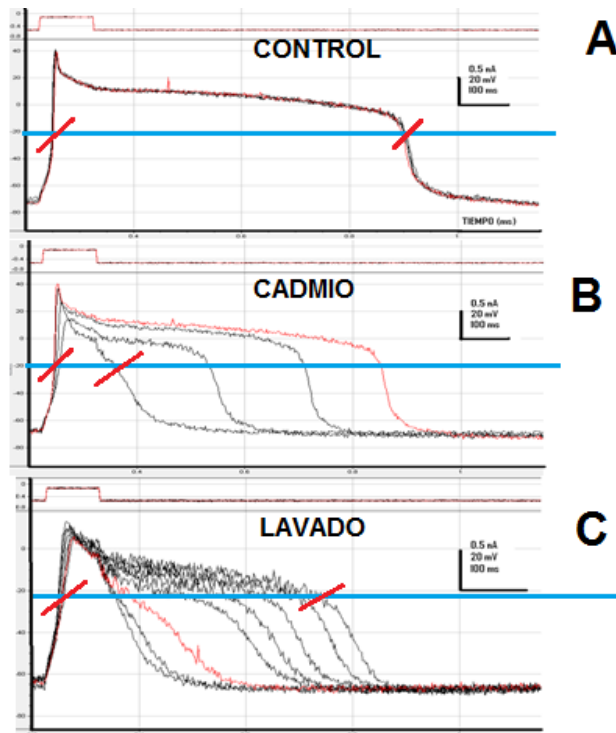


Figura 56a. Efecto del cadmio sobre la duración del potencial de acción cálcico. En A se muestran los PA-Ca²⁺ en condiciones control; en B se presentan los PA-Ca²⁺ durante la aplicación del cadmio, y en C se presentan los PA-Ca²⁺ después del lavado del cadmio. Como se indica con la línea azul definida a 20 mV, las inserciones oblicuas en rojo indican cómo se modificó la duración del PA-Ca²⁺. El CdCl₂ se aplicó a una concentración de 1 mM.

En la Figura 56b se muestran resultados similares a los presentados anteriormente, en relación al efecto del CdCl₂ sobre el PA-Ca²⁺ en la neurona 76F. En esta figura se aprecian trazos del PA-Ca²⁺ en condiciones control y después de 1 y de 8 min de tratamiento con CdCl₂. La gráfica de la Figura 57 presenta la medición de la duración del PA-C²⁺ de la misma célula de la Figura 56b: en condiciones control, después de la aplicación del CdCl₂ y después del lavado. Como puede apreciarse en ambas figuras, el CdCl₂ hizo que disminuyera marcadamente, la duración del PA-Ca²⁺. El lavado del CdCl₂ con SRC-Ca²⁺ permitió una recuperación del 100% de la duración del PA-Ca²⁺. Esto último puede ser explicado por el corto tiempo de aplicación del CdCl₂ y porque la concentración del cadmio en este experimento fue de 0.1 mM.

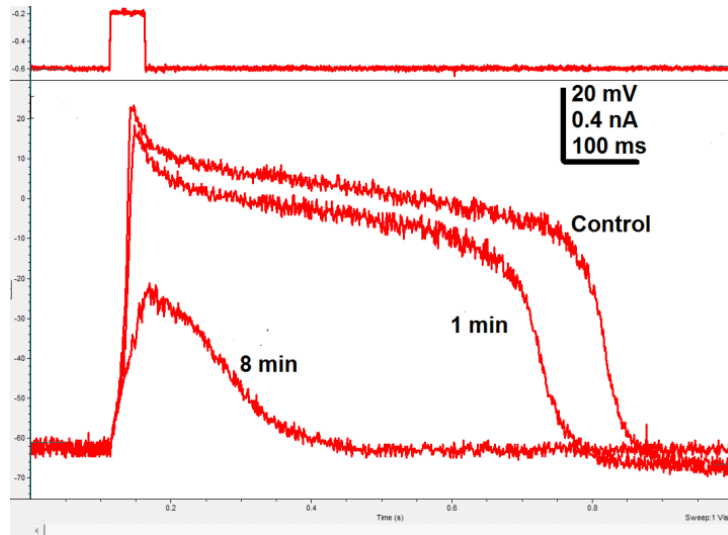


Figura 56b . Efecto del cadmio sobre la duración del potencial de acción cálcico en la célula 76F. El trazo cuadrado superior es el pulso de corriente despolarizante; los trazos inferiores son los PA- Ca^{2+} en condiciones control, después de 1 min y después de 8 min de perfusión de CdCl_2 a una concentración de 0.1 mM.

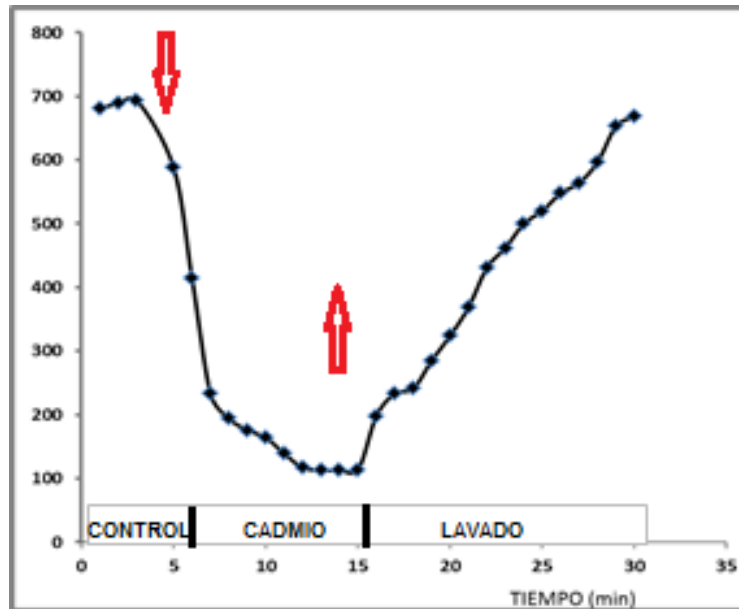


Figura 57. Gráfica que muestra el efecto del cadmio sobre la duración del PA- Ca^{2+} . En las ordenadas de esta figura se grafica la duración del potencial de acción cálcico (en ms) con respecto al tiempo (min). Como se indica en el recuadro, el PA- Ca^{2+} se monitoreó en condiciones control, durante la administración de cadmio indicado por las flechas y después del lavado del cadmio. El CdCl_2 se aplicó a una concentración de 0.1 mM.

Una vez que ya se demostró que la duración del PA- Ca^{2+} es claramente disminuida con un bloqueador selectivo de canales de calcio, como es el cadmio, decidimos estudiar si los NTCPM pudieran tener también un efecto bloqueante del PA-

Ca²⁺. En la Figura 58 se presentan, del lado izquierdo, los registros de PA-Ca²⁺ en condiciones de control y a la derecha los registros después de 15 minutos de perfusión con NTCPM (50 µg/mL). Estos registros fueron obtenidos en la célula 77F de *Helix aspersa*. La línea azul es la basal trazada a los 20 mV del potencial de membrana con el propósito de medir, a este nivel del potencial de membrana, la duración del PA-Ca²⁺. Las intersecciones en rojo determinan la duración misma del PA-Ca²⁺. La línea roja trazada a 80 mV indica que la amplitud del PA-Ca²⁺ no se modificó cuando los NTCPM fueron aplicados.

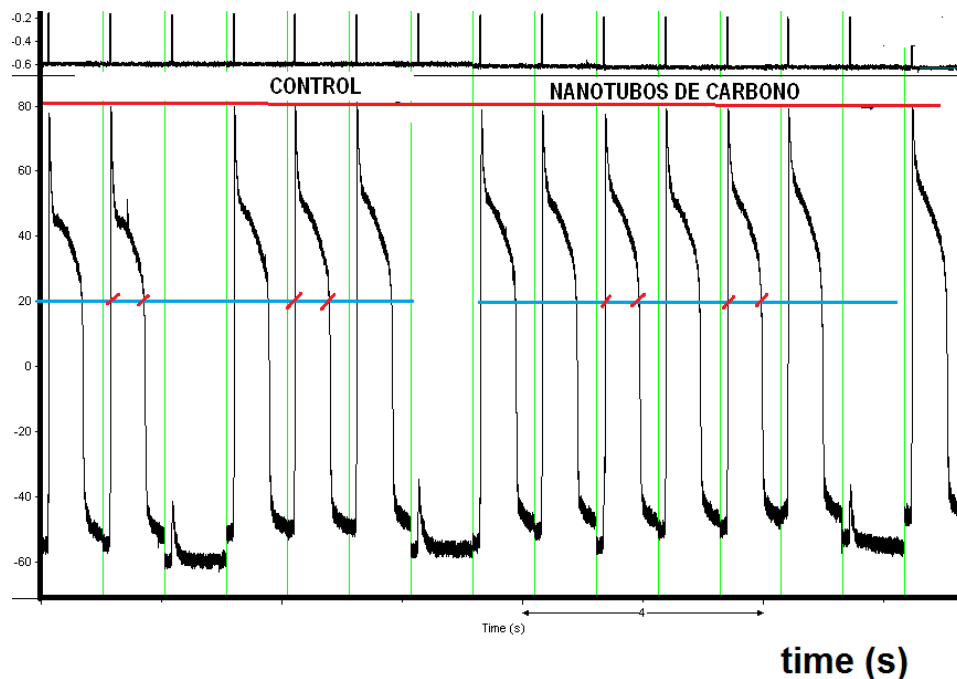


Figura 58. Efecto de NTCPM sobre la duración del PA-Ca²⁺ en la neurona 77F, registros concatenados. En la parte izquierda se presentan los registros de PA-Ca²⁺ en condiciones de control, y a la derecha después de 15 minutos de perfusión con NTCPM (50 µg/mL).

En la Figura 59 se presentan los resultados obtenidos en otro experimento, ahora en la neurona 76 F de *Helix aspersa*, en donde se estudio el efecto de NTCPM sobre la duración del PA-Ca²⁺. En A se presenta el PA-Ca²⁺ en condiciones control y en B se muestra el registro de PA-Ca²⁺ después de que la preparación fue tratada durante 9 min con NTCPM (50 µg/mL). La línea azul es la basal y fue trazada a 20 mV con el propósito de medir, en este nivel de potencial de membrana, la duración del PA-Ca²⁺. Las intersecciones en rojo determinan la duración misma del PA-Ca²⁺. Como se puede

apreciar en la Figura 59-B, los NTCPM no disminuyen la duración del PA-Ca²⁺; más bien producen un moderado incremento de su duración.

En otro experimento en la célula 76F se obtuvieron resultados similares a los anteriores. Se encontró que los NTCPM no modifican la amplitud, ni la morfología, ni la duración del PA-Ca²⁺, aun a concentraciones mayores de NTCPM (100 µg/mL), (ver Figura 60).

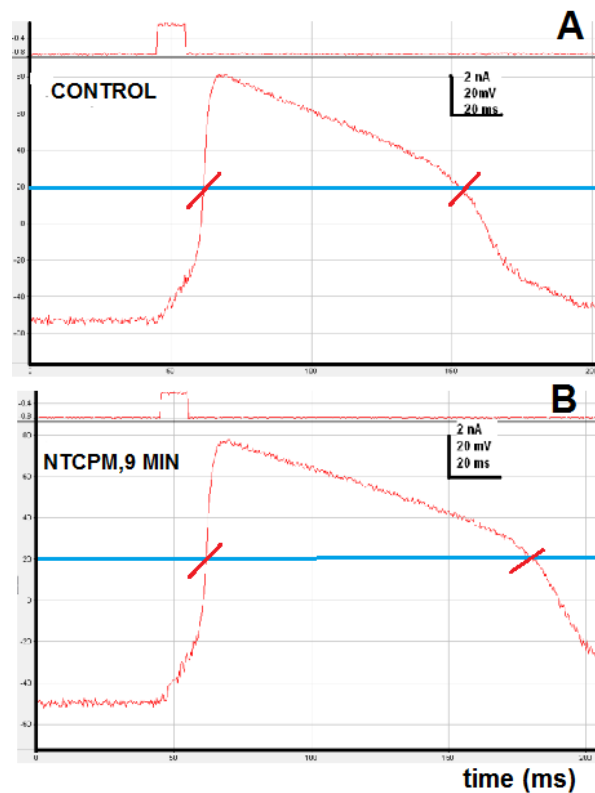


Figura 59. Efecto de NTCPM (50 µg/mL) sobre la duración del PA-Ca²⁺. Registros aislados en la neurona 76 F. En A se presenta el PA-Ca²⁺ en condiciones control y en B se muestra el registro de PA-Ca²⁺ después de que la preparación fue tratada durante 9 min con NTCPM (50 µg/mL).

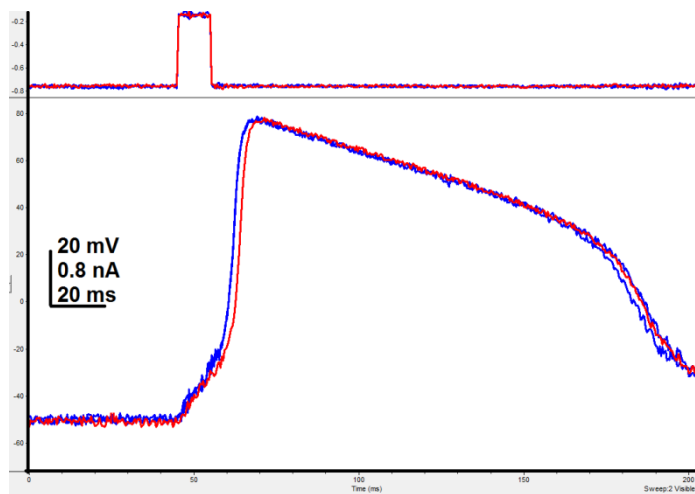


Figura 60. Efecto de NTCPM (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre la duración del PA- Ca^{2+} . Registros aislados y sobrepuestos obtenidos en la neurona 76 F. Los trazos en azul del PA- Ca^{2+} son los trazos control. El trazo en rojo del PA- Ca^{2+} es después de 10 min de perfusión de los NTCPM (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Con base en los resultados experimentales presentados en esta sección, podemos concluir que los NTCPM no modifican las propiedades eléctricas de las neuronas de *Helix aspersa*, y lo anterior sugiere que dichos NTCPM no bloquean las conductancias iónicas dependientes del voltaje de membrana.

VII.5 Caracterización electrofisiológica y farmacológica del receptor colinérgico muscarínico presente en la neurona 1F de *Helix aspersa*.

Los receptores colinérgicos de la membrana neuronal responden, por definición, a la acetilcolina (ACh); sin embargo, también responden a otras moléculas. Por ejemplo, los receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR) son particularmente sensibles a la nicotina. Los receptores muscarínicos de acetilcolina responden particularmente a la muscarina (mAChR). De esta manera, los receptores nicotínicos y muscarínicos son los dos tipos principales de receptores "colinérgicos". Ambos pueden ser considerados como receptores membranales asociados a canales de iones dependientes del ligando: la acetilcolina, la nicotina o la muscarina. Dependiendo de la especie y tipo neuronal, dichos canales iónicos dependientes de ligando permean los iones Na^+ y Ca^{++} , e inducen una despolarización membranal, o bien pueden permear Cl^- o K^+ e inducir una hiperpolarización membranal. El carbacol, también conocido como carbamilcolina, es un

fármaco colinomimético que se une y activa al receptor de la acetilcolina y ha sido clasificado como un agonista colinérgico. Ach y carbacol activan todos los tipos de receptores nicotínicos y muscarínicos (Nm, Nn, M1, M2 y M3). Sin embargo, además del carbacol existen compuestos muscarínicos específicos que se unen y activan a los receptores muscarínicos tales como la muscarina o la oxotremorina; existen otros que bloquean o inactivan a los receptores muscarínicos como la atropina y la pirenzepina. Por otro lado, en neuronas de invertebrados se ha reportado que la Ach y el carbacol tienen efectos controvertidos, ya que pueden hiperpolarizar la membrana (respuesta-H) o despolarizar la membrana (respuesta D) [130-139].

En este trabajo de tesis caracterizamos los efectos del carbacol sobre la neurona 1F del caracol *Helix aspersa* y estudiamos específicamente cómo el carbacol modifica las propiedades eléctricas de la neurona 1F. También estudiamos cuál es la farmacología del receptor colinérgico de la neurona 1F.

En la Figura 61 se presenta la actividad eléctrica espontánea de la neurona 1F. Se pueden apreciar trenes o ráfagas de potenciales de acción seguidos de una fase de hiperpolarización de membrana. Esta actividad eléctrica espontánea se ve modificada cuando se aplica carbacol. Al momento de aplicar el carbacol (indicado por la flecha) se observa que la célula se despolariza y presenta un tren más prologado de potenciales de acción; dicha despolarización tiende a suspenderse después de cierto tiempo y la célula vuelve a presentar su patrón de disparo original. Esta respuesta inducida por carbacol puede ser interpretada como una despolarización membranal asociada a la activación del receptor colinérgico y a la activación de canales iónicos, que acoplados al receptor favorecen el flujo de iones. El efecto despolarizante del carbacol es transitorio y esto se puede explicar por el hecho de que la preparación está perfundiéndose en forma continua con SRC, retirando y removiendo el carbacol aplicado.

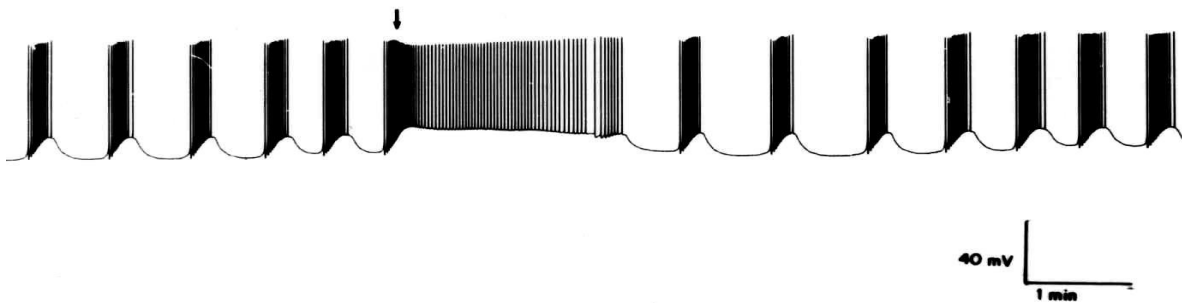


Figura 61. Efecto del carbacol sobre la actividad eléctrica espontánea de la neurona 1F de *Helix aspersa*. La flecha indica el momento de la aplicación de carbacol. En este experimento se aplicaron 50 μ L de solución de carbacol 1 mM, estando bañada la preparación con perfusión continua de SRC normal a una velocidad de 2 ml por minuto.

En la Figura 62 se muestra que el carbacol produce una despolarización membranal en la neurona y que dicha despolarización está asociada a un incremento de conductancia de entrada. Como puede observarse en la Figura 62 A, la célula está siendo estimulada por pulsos hiperpolarizantes los cuales permiten evaluar los cambios de conductancia de entrada antes, durante y después de la aplicación del carbacol, a una concentración definida de 50 μ M/L. Con base en la ley de Ohm, si conocemos la corriente aplicada en cada pulso hiperpolarizante y medimos la caída de voltaje de la membrana al final de cada pulso, podemos inferir la resistencia de entrada de la célula. La conductancia de entrada es el recíproco de la resistencia ($g=1/R$). Como se muestra en la Figura 62 B, al graficar la conductancia de entrada normalizada en función del tiempo antes, durante y después de la aplicación del carbacol podemos observar que dicha conductancia se incrementa marcadamente durante la aplicación del carbacol, y dicho efecto es transitorio y vuelve a su estado normal al retirar el fármaco. Estos resultados nos sugieren que el carbacol está favoreciendo una conductancia iónica que se manifiesta durante la despolarización de membrana. En otros experimentos, no presentados en este trabajo, encontramos que dicha despolarización está asociada a un aumento de conductancia de sodio y calcio, y no de cloro ni de potasio.

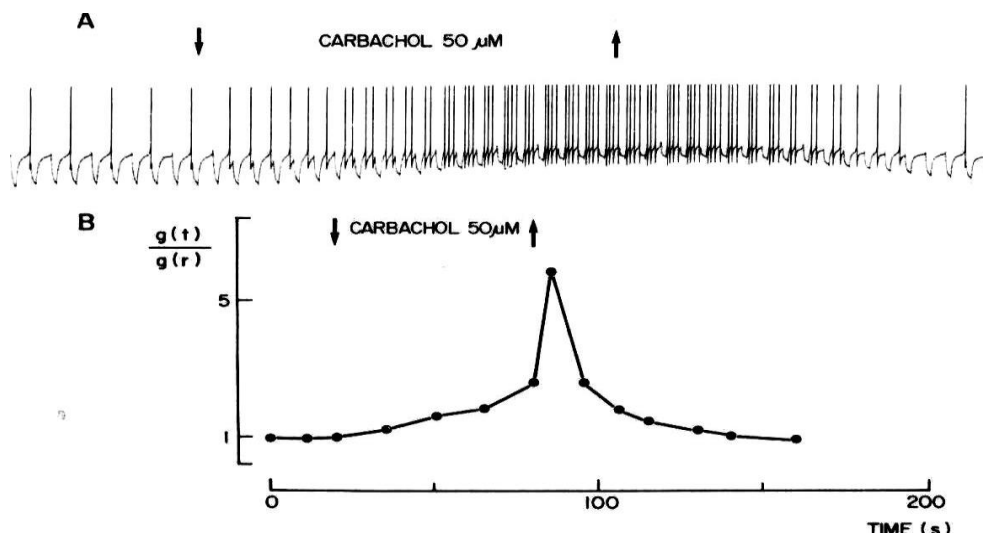


Figura 62. Efecto del carbacol sobre la actividad eléctrica espontánea y sobre la conductancia de entrada en la neurona 1F *Helix aspersa*. En A, se presenta la actividad eléctrica espontánea de la célula 1F, la cual es estimulada por pulsos hiperpolarizantes que permiten evaluar la conductancia de entrada de la célula. La flecha hacia abajo indica el momento de la aplicación del carbacol y la flecha hacia arriba indica el momento donde se dejó de perfundir el carbacol a una concentración definida de 50 μM . En B, se grafica el comportamiento de la conductancia de entrada (en segundos): antes, durante y después de la aplicación del carbacol.

Ya habiendo demostrado que el carbacol tiene un efecto despolarizante sobre la neurona 1F, nos propusimos estudiar las propiedades farmacológicas de esta respuesta para, de esta manera, definir qué tipo de receptor colinérgico es el que está presente en la neurona 1F. En la Figura 63 se muestra el efecto del antagonista nicotínico (d-tubocurarina) y del antagonista muscarínico (atropina) sobre la respuesta despolarizante producida por la aplicación del carbacol en la neurona 1F de *Helix aspersa*. Como puede observarse, al momento de aplicar el carbacol (indicado por las flechas) se produce una despolarización de la célula asociada a un tren de potenciales de acción; dicha despolarización inducida por el carbacol se presenta independientemente de la actividad eléctrica espontánea de la neurona. En condiciones control, cuando no se aplica ningún antagonista, o bien cuando se aplica la d-tubocurarina (antagonista selectivo de receptores colinérgicos nicotínicos), la despolarización de membrana producida por carbacol se presenta en forma similar a las condiciones control. Sin embargo, cuando la preparación es perfundida con d-tubocurarina (100 μM) + sulfato de atropina (200 μM) se puede observar que la atropina bloquea y disminuye la despolarización y los trenes de potenciales de acción inducidos por carbacol. Este efecto bloqueante de la atropina sobre la despolarización inducida por carbacol es reversible ya que, después de lavar la

atropina con Ringer normal, la despolarización y trenes de potenciales de acción producidos por el carbacol fueron similares a las condiciones control. Estos resultados sugieren que el receptor membranal colinérgico presente en la neurona 1F de *Helix aspersa* es del tipo colinérgico muscarínico, pues la atropina es un bloqueador típico y selectivo de este tipo de receptor colinérgico.

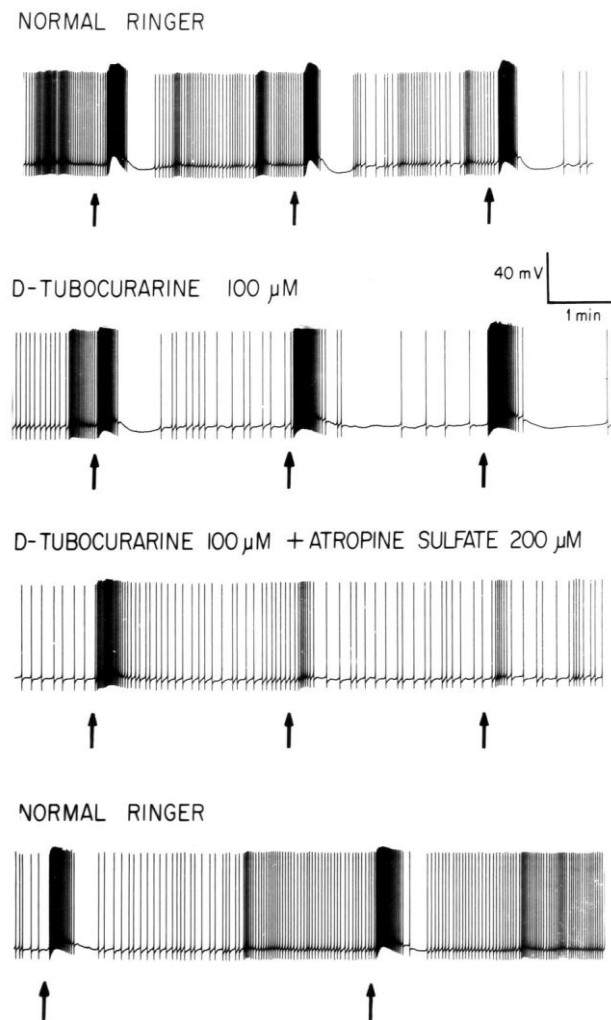


Figura 63. Efecto de agonista nicotínico y antagonista muscarínico sobre la respuesta despolarizante producida por carbacol en la neurona 1F de *Helix aspersa*. Las flechas indican el momento de la aplicación de carbacol, el cual fue aplicado a un volumen de 50 μL de carbacol a una concentración de 1 mM disuelto en solución Ringer normal.

Con el propósito de corroborar los resultados anteriores y demostrar que efectivamente el receptor colinérgico presente en la neurona 1F de *Helix aspersa* es de tipo muscarínico, evaluamos la acción de la oxotremorina (un agonista de receptor muscarínico tipo M1-M3). Como puede observarse en los registros superiores de la Figura 64, el carbacol, en condiciones control, produce una despolarización y un tren de

potenciales de acción. Después de perfundir las neuronas con oxotremorina a una concentración de 50 μM durante 2 minutos, se observó que la frecuencia de disparo de la célula 1F se incrementó. Dicho incremento de frecuencia de disparo se ve más manifiesto después de la aplicación del carbacol, pues se produce una despolarización y un tren continuo de potenciales de acción por tiempo más prolongado. También se observó que el efecto de la oxotremorina sobre la respuesta al carbacol es pasajero, ya que pasados 15 minutos de haber lavado la preparación con Ringer normal el carbacol produce una despolarización con características similares a las condiciones control. Estos experimentos fundamentan la hipótesis de que el receptor presente en la neurona 1F de *Helix aspersa* es un receptor colinérgico tipo muscarínico, el cual es bloqueado por un antagonista: la atropina, y es activado por un agonista: la oxotremorina. En otros experimentos, no reportados en este trabajo, se observó que la pirenzepina: un bloqueador selectivo del receptor muscarínico tipo M1, bloquea la respuesta despolarizante producida por el carbacol en la neurona 1F de forma similar a como lo hace la atropina. Lo anterior nos permite concluir que el tipo de receptor presente en la neurona 1F del caracol *Helix aspersa* es del tipo muscarínico M1.

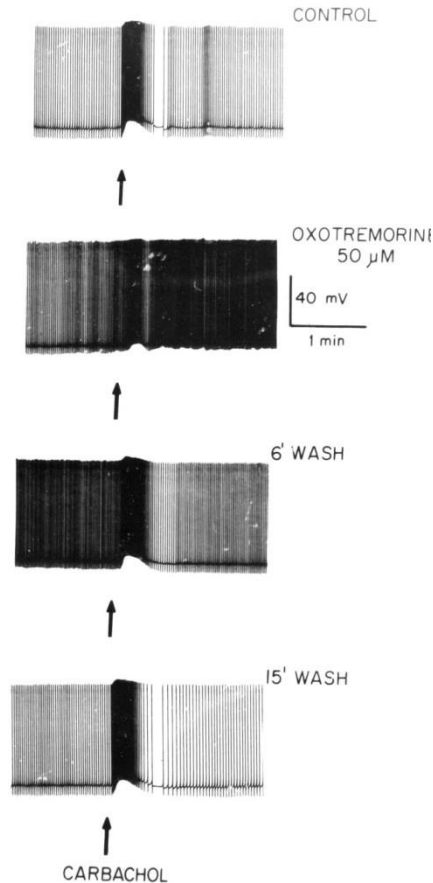


Figura 64. Efecto de la oxotremorina sobre la respuesta al carbacol en la neurona 1F de *Helix aspersa*. Las flechas indican el momento de la aplicación del carbacol (50 μ L a una concentración de 1 mM)

VII.6 Efecto de los NTCPM sobre la despolarización de membrana inducida por carbacol en la neurona 1F de *Helix aspersa*.

Existen reportes controversiales sobre la citotoxicidad y biocompatibilidad de los NTC sobre los canales iónicos membranales de neuronas. Algunos investigadores han planteado que los NTC pueden ser bloqueadores selectivos de canales iónicos membranales que dependen del voltaje de transmembrana [79-82]. Sin embargo, no se ha estudiado sistemáticamente el posible efecto de los NTCPM sobre las conductancias iónicas dependientes de la activación de receptores membranales en general, ni de los receptores colinérgicos muscarínicos en particular. Por lo tanto, uno de los objetivos de esta tesis es estudiar los efectos de los NTCPM sobre la despolarización de membrana activada por la aplicación del carbacol en neuronas 1F del caracol *Helix aspersa*. En estos experimentos se usaron NTCPM funcionalizados con tratamiento ácido y dispersados en solución acuosa usando PVP como dispersante (ver Material y métodos). De la solución madre de NTCPM-PVP (5 mg/mL) se tomaron alícuotas y se disolvieron en SRC. Estos NTCPM se aplicaron a las neuronas a concentraciones de 5, 50 y 100 μ g/mL, usando el método de perfusión continua extracelular (ver Material y métodos).

En la Figura 65 se presentan registros electrofisiológicos de la respuesta membranal de la neurona 1F a la aplicación del carbacol en condiciones control (A) y cuando la preparación es perfundida con NTCPM a una concentración de 5 μ g/mL de NTCPM (B). Como se aprecia en esa figura, la célula está siendo continuamente estimulada con pulsos hiperpolarizantes para evaluar cambios de conductancia de entrada. La aplicación del carbacol (50 μ L, 1mM), indicada por las flechas en la parte inferior de los registros, produce una despolarización de membrana lenta asociada a un aumento en la conductancia de entrada. Esta respuesta es similar en condiciones control (A) y en condiciones en que la preparación es perfundida con NTCPM a una concentración de 5 μ g/mL (B). Como se puede observar en B, la amplitud de la despolarización no disminuyó cuando la preparación fue perfundida con NTCPM; más

aún, se observa que la despolarización es más prologada y de mayor duración asociada al aumento de la conductancia de entrada. Estos experimentos sugieren que los NTCPM no bloquean la permeabilidad iónica del receptor colinérgico muscarínico de la célula 1F de *Helix aspersa*.

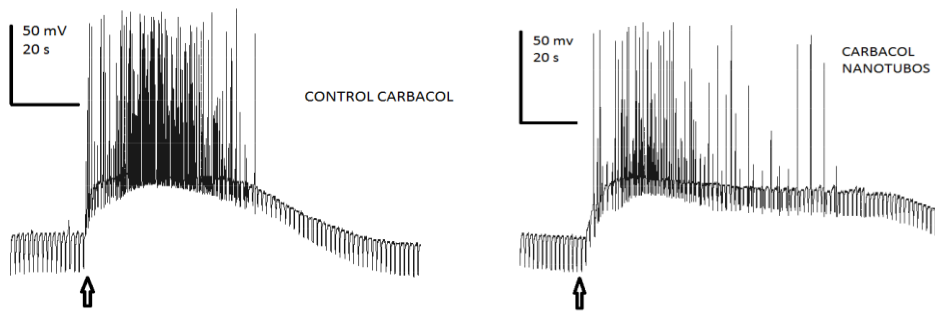


Figura 65. Efecto de NTCPM sobre la despolarización membranal activada por carbaccol en neurona 1F de *Helix aspersa*. La flecha indica el momento de la aplicación de carbaccol (50 μ L, 1 mM). La célula fue hiperpolarizada a -70 mV y estimulada con pulsos hiperpolarizantes para evaluar la conductancia de entrada. Los nanotubos se aplicaron a una concentración de 5 μ g/mL

También se evaluaron concentraciones mayores de NTCPM sobre la respuesta despolarizante inducida por carbaccol. En la Figura 66-A se observa la respuesta despolarizante producida por el carbaccol en condiciones control. En la Figura 66-B se muestra también la respuesta del carbaccol cuando la preparación fue perfundida durante 15 minutos con NTCPM (100 μ g/mL). En la Figura 66-C se muestran los registros de la despolarización inducida por carbaccol después de que la preparación fue lavada con SRC normal por 15 minutos. En esta figura 66 se puede observar una respuesta constante y sistemática del carbaccol sobre la neurona 1F, tanto en condiciones control y lavado (A y C), como cuando se aplican los NTCPM a altas concentraciones de hasta 100 μ g/mL. Los experimentos aquí presentados permiten concluir que los NTCPM, a concentraciones de hasta 100 μ g/mL, no bloquean la despolarización membranal activada por carbaccol; por lo tanto, los NTCPM no tienen efecto bloqueante sobre la permeabilidad iónica del receptor muscarínico tipo M1 presente en la neurona 1F de *Helix aspersa*.

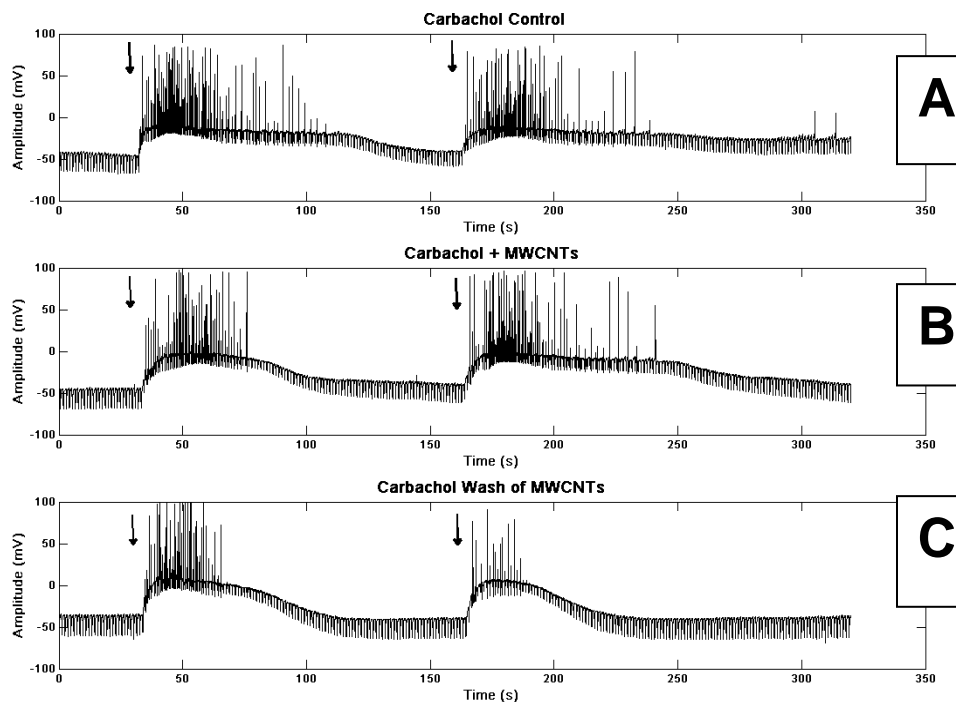


Figura 66. Efecto de NTCPM a concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ sobre la despolarización membranal activada por carbachol en neurona 1F de *Helix aspersa*. La flecha indica el momento de la aplicación de carbachol (50 μL , 1 mM). La célula fue hiperpolarizada a -68 mV y estimulada con pulsos hiperpolarizantes de 0.1 nA para evaluar la conductancia de entrada. A). Efecto del carbachol en condiciones control; B). Efecto del carbachol durante la acción de NTCPM; C). Efecto después del lavado de NTCPM.

VII.7 Efecto de los NTCPM sobre la despolarización de membrana inducida por L-glutamato en la neurona 1F de *Helix aspersa*.

L-glutamato (L-glut) es el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados, en donde interactúa con receptores específicos de membrana [140]. La estructura y la función de los canales iónicos activados por L- glut han sido elucidadas [141]. En los seres humanos, la acción de L- glut se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson [142]. L-glut tiene efectos controversiales en invertebrados, ya que puede hiperpolarizar (H-respuesta) [143, 144,] o despolarizar (D-respuesta) [145] a las células nerviosas. Los objetivos de esta serie de experimentos fueron: estudiar la despolarización de membrana inducida por L-glut en la neurona 1F de *Helix aspersa* y evaluar si los NTCPM pudieran modificar o bloquear dicha respuesta despolarizante.

Se realizaron experimentos electrofisiológicos de registro intracelular con microelectrodos en condiciones de fijación de corriente. Primeramente se encontró que el L-glut tiene un efecto excitatorio sobre la neurona 1-F de *Helix aspersa*. L-glut produce, en la neurona 1F, una despolarización membranal lenta que puede disparar trenes de potenciales de acción. Dicha despolarización está asociada a un incremento de la conductancia de entrada (ver Figuras 67 y 68). Se encontró que el efecto del L-glut sobre la neurona 1F es dependiente de la dosis suministrada: cuando se aplican distintos volúmenes de L-glut (2, 10 y 50 μ L) a la misma concentración (10 mM) (Figura 67-A) o bien, cuando se aplican diferentes concentraciones definidas de L-glut (10, 50 o 200 μ M) sobre la neurona 1F de *Helix aspersa*. (Figura 67-B).

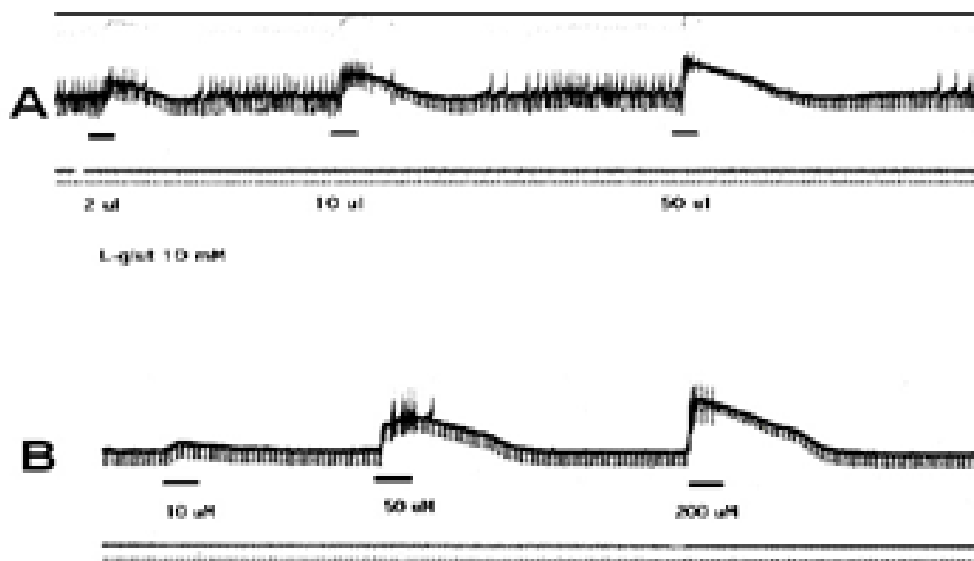


Figura 67. Efecto dosis-respuesta del L-glut sobre la neurona 1F de *Helix aspersa*. En A, se presenta la actividad eléctrica espontánea de la célula en condiciones control y cuando se aplican distintos volúmenes (2,10 y 50 μ L) de L-glutamato (10 mM). En B, se muestran los efectos del L-glut a distintas concentraciones definidas (10, 50 y 200 μ M). En ambas figuras, las barras debajo de los trazos indican el momento de la aplicación de L-glut. Los trazos superiores en A y B representan los registros del potencial de membrana y los trazos inferiores, tanto en A como en B, representan los registros de pulsos de corriente (0.2 nA) aplicados a la célula para evaluar cambios de conductancia de entrada.

La despolarización membranal inducida por L-glutamato en la neurona 1F está asociada a un incremento de conductancia de entrada de la célula. (ver Figura 68A). Se observó que la magnitud de dicha despolarización inducida por L-glut es dependiente del

potencial de membrana: a mayor nivel de hiperpolarización en que se mantenga la membrana será mayor la magnitud de la despolarización producida por L-glut (ver Figura 68-B).

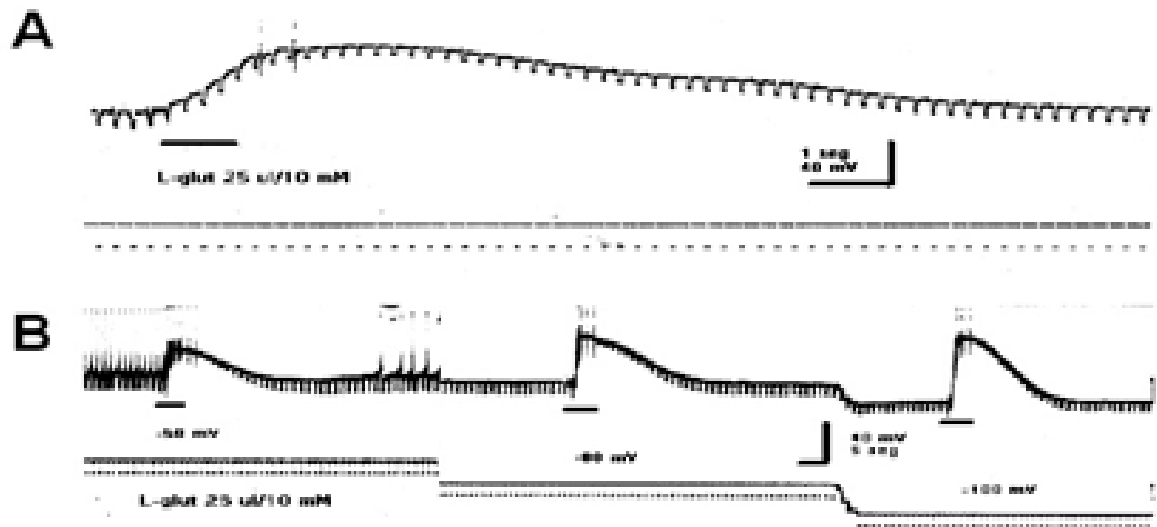


Figura 68. Efecto del L-glutamato sobre el potencial de membrana y la conductancia de entrada de la neurona 1F de *Helix aspersa*. A). Efecto del L-glut (25 μ L, 10 mM) sobre la conductancia de entrada de la célula 1F, B). Efecto de L-glut (25 μ L, 10 mM) cuando se modifica el potencial de membrana de -40, -60 y -80 mV. En A, la escala de tiempo es 1 segundo y en B la escala de tiempo son 5 segundos. En ambas figuras, las barras debajo de los trazos indican el momento de la aplicación de L-glut. Los trazos superiores en A y B representan los registros del potencial de membrana y los trazos inferiores, tanto en A como en B, representan los registros de los pulsos de corriente (0.2 nA) aplicados a la célula para evaluar cambios de conductancia de entrada.

Habiendo caracterizado la despolarización membranal producida por L-glut en la neurona 1F de *Helix aspersa* evaluamos el posible efecto citotóxico o bloqueante que pudieran tener los NTCPM sobre dicha despolarización. En la Figura 69 se muestran registros electrofisiológicos de la neurona 1F cuando se aplica L-glutamato (50 μ L /1mM) en condiciones control; cuando la preparación está siendo perfundida con solución Ringer de caracol normal (trazos de la izquierda), y cuando la preparación es perfundida con SRC normal a la cual se le añadieron NTCPM a una concentración de 5 μ g/mL (trazos de la derecha). En ambas figuras, 69-A y 69-B, se observa una despolarización

membranal inducida por L-glutamato; dicha despolarización esta asociada a un incremento de la conductancia de entrada. La despolarización producida por L-glutamato en presencia de NTCPM no se ve disminuida; más bien, dicha despolarización se ve ligeramente de mayor amplitud y de mayor duración, sin modificarse la conductancia de entrada.

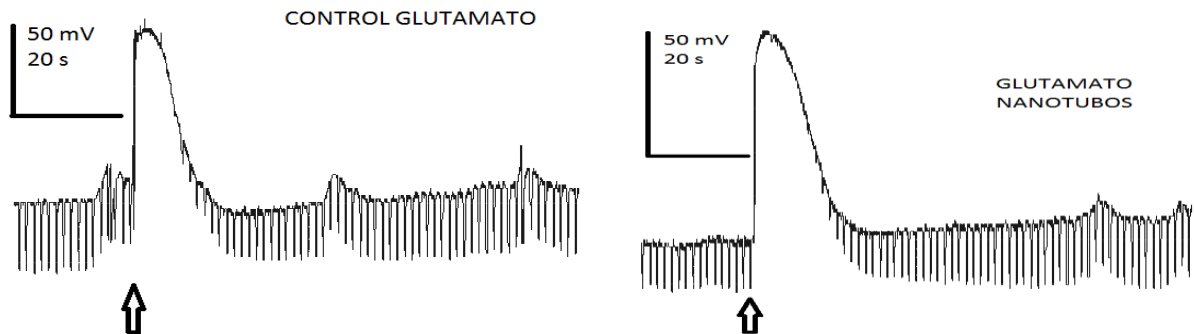


Figura 69. Efecto de los NTCPM sobre la despolarización membranal activada por L-glutamato en la neurona 1F de *Helix aspersa*. La flecha indica el momento de la aplicación de L-glut (50 μ L, 1 mM). En este experimento la célula fue hiperpolarizada con pulsos continuos de corriente para llevarla a un potencial de membrana fijo de -68 mV, y fue estimulada con pulsos hiperpolarizantes transitorios y repetitivos de 0.2 nA, con el propósito de evaluar la conductancia de entrada. Los nanotubos se aplicaron a una concentración de 5 μ g/mL.

En otras experimentos se usaron concentraciones mayores de NTCPM para evaluar si el efecto de dichos nanotubos sobre la despolarización inducida por L-glutamato es dependiente de la concentración de los NTCPM usados. En la Figura 70 se presentan los resultados del efecto de NTCPM a concentraciones de 100 μ g/mL sobre la despolarización inducida por L-glut. Se observó que los NTCPM a altas concentraciones, de hasta 100 μ g/mL, no bloquean la amplitud ni la duración de la despolarización inducida por L-glut en la neurona 1F de *Helix aspersa*.

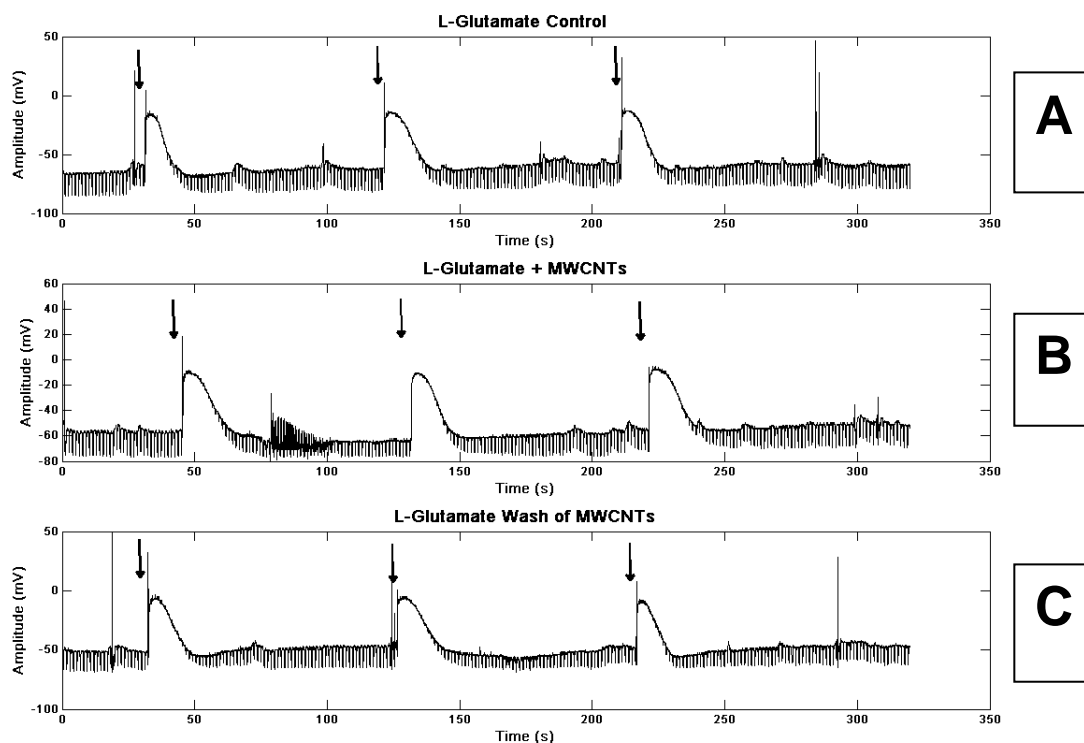


Figura 70. Efecto de NTCPM 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre la despolarización membranal activada por L-glut en neurona 1F de *Helix aspersa*. Las flechas indican el momento de la aplicación de carbacol (50 μL , 1 mM). La célula fue hiperpolarizada a -70 mV y estimulada con pulsos hiperpolarizantes transitorios y repetitivos de 0.2 nA para evaluar la conductancia de entrada. A). Efecto del L-glut en condiciones control, B). Efecto del L-glutamato durante la acción de NTCPM a concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y C). Efecto después del lavado de NTCPM.

VII.8 Efecto de los NTCPM sobre la hiperpolarización de membrana inducida por agonistas dopaminérgicos en neurona 1F de *Helix aspersa*.

El receptor a dopamina presente en neuronas de invertebrado ya ha sido estudiado a nivel electrofisiológico y farmacológico [146-149]. En esta serie de experimentos primeramente se caracterizó electrofisiológica y farmacológicamente la presencia del receptor a dopamina (DA) presente en la célula 1F de *Helix aspersa*.

En la Figura 71 se muestran los resultados de la aplicación de la DA sobre la neurona 1F. Estando la preparación en perfusión continua con solución Ringer, se aplicó una dosis de 30 μL de DA a una concentración de 10 mM. Como puede observarse en la Figura 71-a, la aplicación de DA (indicada con la flecha roja) produce un bloqueo de la actividad eléctrica espontánea de la neurona 1F, asociado a una hiperpolarización de

membrana. Dichos efectos resultan ser transitorios al paso del tiempo y la célula regresa a su actividad eléctrica espontánea y a su nivel de potencial de membrana previo a la aplicación de DA. En la Figura 71-b se presenta el efecto dosis respuesta de la DA sobre el potencial de membrana de la neurona 1F. La aplicación de DA indicada por flechas roja, verde y azul, que son volúmenes de 15, 30 y 45 μL de DA a una concentración de 10 mM, produce una hiperpolarización de membrana en cada pulso de DA; dicha hiperpolarización se hace más pronunciada conforme la concentración de DA es mayor (45 μL). Estos resultados nos indican que en la membrana celular de la neurona 1F está presente un receptor que, al activarse por su agonista DA, modifica el potencial de membrana produciendo una hiperpolarización y modifica su actividad eléctrica espontánea, aboliendo la frecuencia de disparo de potenciales de acción. Así mismo nos muestran que este efecto es dependiente de la dosis usada de DA.

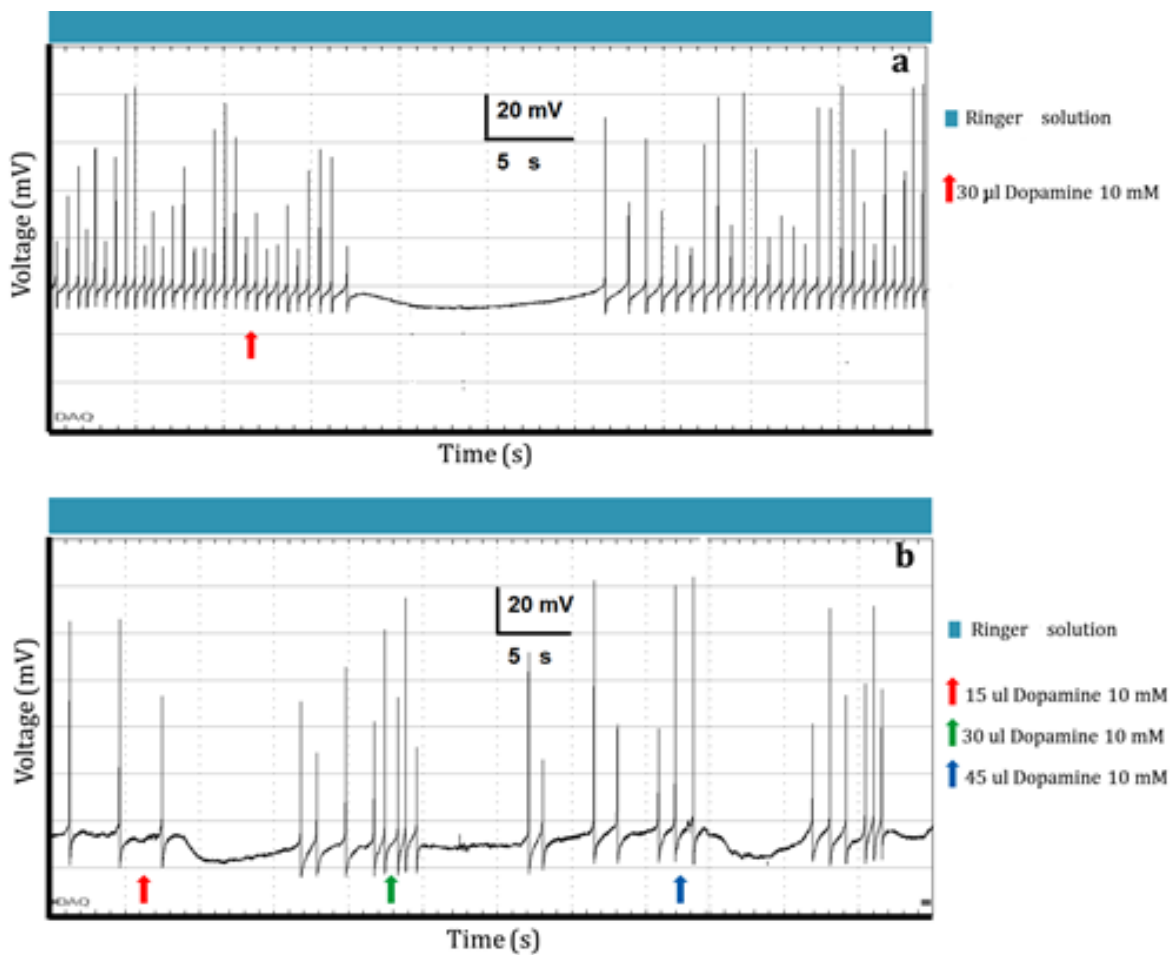


Figura 71. Actividad eléctrica espontánea de neurona 1F y respuesta a dopamina. a). Respuesta a una dosis de 30 μL de dopamina 10 mM, b). Curva dosis-respuesta: 15, 30 y 45 μL de dopamina 10 mM.

Con el propósito de corroborar estos resultados, el experimento se repitió más de 3 veces, en las cuales se aplicó DA sobre la neurona 1F mientras la célula era estimulada con pulsos hiperpolarizantes de 0.2 nA para evaluar cambios en la conductancia de entrada producidos por DA. En el panel superior de la Figura 72 se observa que después de la aplicación de DA a distintos volúmenes (15, 30 y 45 μL de DA a 10 mM) se presenta una hiperpolarización de membrana y ésta se hace más pronunciada cuando se aplican 45 μL de DA; pero sobre todo se observa que la aplicación de dopamina favorece una disminución de resistencia de entrada de la célula y consecuentemente un aumento en la conductancia de entrada. Esto último se puede apreciar en la ampliación del inserto de la Figura 72, donde se demuestra que la resistencia de entrada medida en presencia de DA (b) es menor comparada con las condiciones control (a).

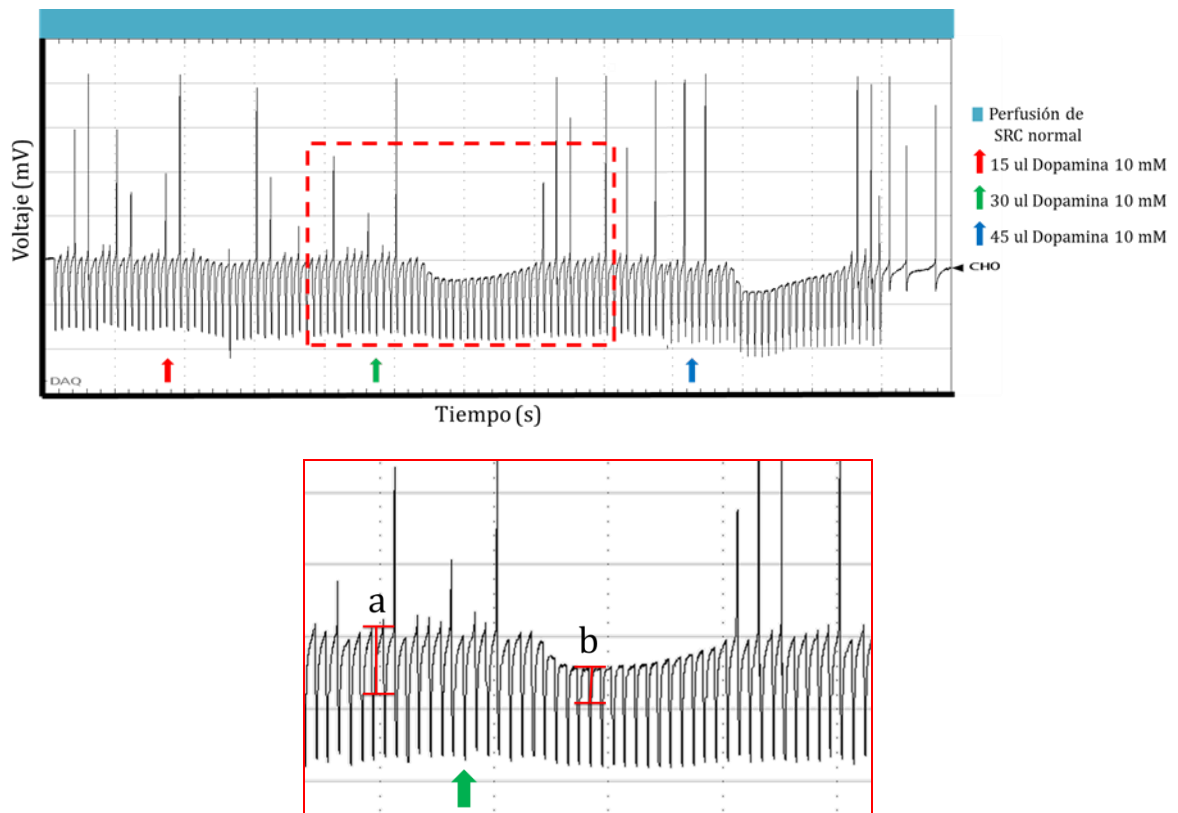


Figura 72. Curva dosis-respuesta de la dopamina en la neurona 1F y su efecto sobre la conductancia de entrada. Aplicación de DA a distintas dosis: 10, 20 y 50 μL de dopamina a concentración de 10 mM. La célula es estimulada con pulsos hiperpolarizantes de 300 ms de duración a una frecuencia de 1 Hz. En la parte inferior se muestra el inserto de la zona punteada en donde se presentan las mediciones de resistencia de entrada entre **a** (condiciones control) y **b** (después de la aplicación de DA).

Los trabajos clásicos de Berry y col. [149] demuestran que la ergometrina, la tubocurarina y el bromuro de hexametonio, entre otros compuestos, trabajan como antagonistas de la dopamina y la acetilcolina. En esos mismos estudios realizados con el caracol *Planorbis Corneus* se demostró que la dopamina produjo un cambio de potencial de membrana y resultó ser más potente que la noradrenalina en estas células. En la actualidad existen varios fármacos comerciales que son conocidos como antagonistas de los receptores dopaminérgicos, tales como: la domperidona, que actúa como antagonista del receptor D2 a nivel del SNP; la metoclopramida, que actúa como antagonista del receptor D2 a nivel del SNP y del SNC; el haloperidol, que actúa sobre el receptor D2 a nivel SNC, y la ergometrina, que actúa como antagonista de los receptores D1 y D2 en moluscos [147, 148 y 149]. Sin embargo, el efecto de la metoclopramida en receptores a DA en moluscos no ha sido estudiado. Por lo anterior, se diseñaron experimentos para evaluar las propiedades farmacológicas del receptor a DA presente en la neurona 1F de *Helix aspersa*.

Primeramente se estudiaron los posibles efectos de la metoclopramida sobre la hiperpolarización producida por DA. Como se muestra en la Figura 73-a, al ganglio se le perfundió con SRC normal y se le aplicó una dosis de 30 μ L de DA (indicado por la flecha roja). Como resultado de esta aplicación se observó un bloqueo de la actividad eléctrica espontánea asociado a una hiperpolarización de membrana muy pronunciada. El efecto de la DA fue transitorio: después que la DA fue lavada la célula recuperó tanto su potencial de membrana como su actividad eléctrica espontánea. En la Figura 73-b se presentan los resultados de la aplicación de DA sobre la misma célula cuando es perfundida con metoclopramida a una concentración de 0.13 mM. Se puede apreciar que la metoclopramida bloquea los efectos de la aplicación de DA (flecha roja), al no presentarse la hiperpolarización membranal.

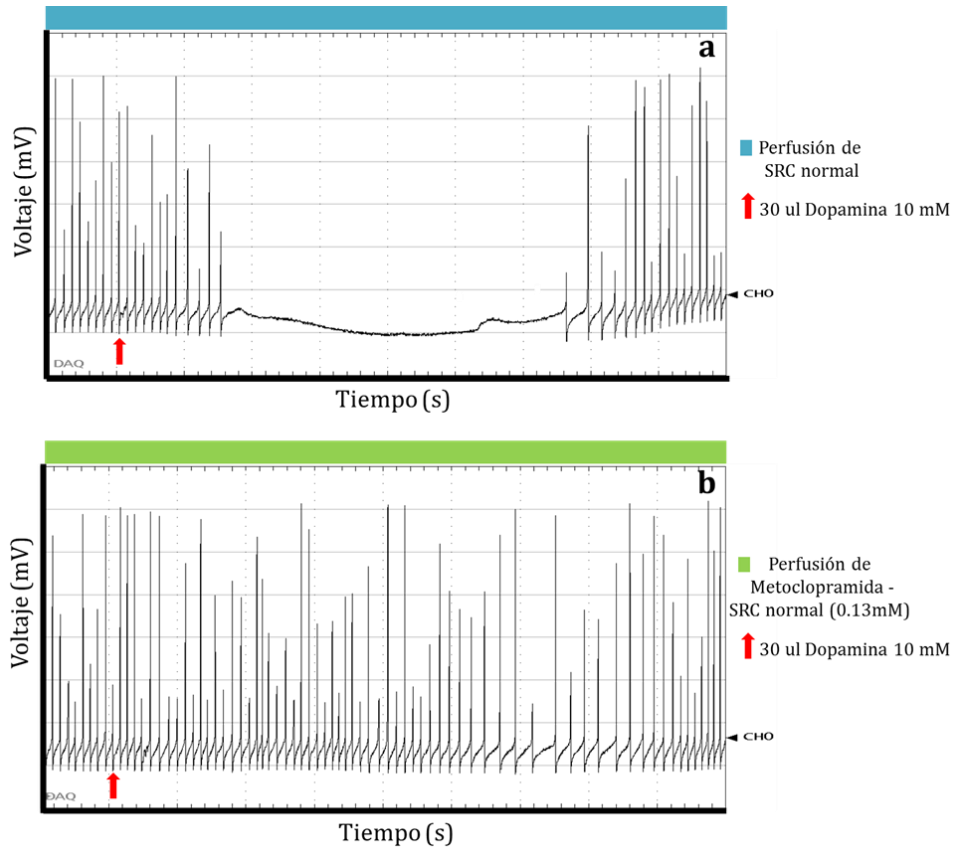


Figura 73. Efecto de la metoclopramida sobre la hiperpolarización producida por dopamina. a). Control: 30 µL de dopamina 10 mM, b). Aplicación de 30 µL de dopamina 10 mM durante perfusión de metoclopramida.

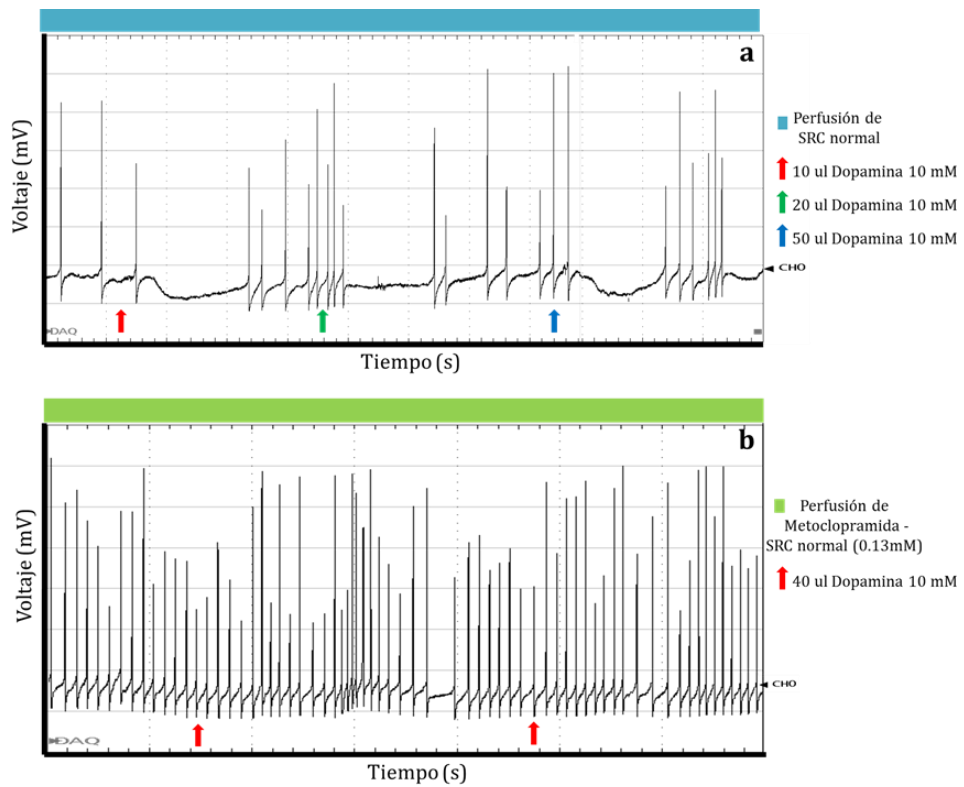


Figura 74. Curva dosis-respuesta de la dopamina en la neurona 1F y efecto de DA en presencia de metoclopramida. a). Curva dosis-respuesta: 10, 20 y 50 μ l de dopamina 10 mM., b). Aplicaciones de 40 μ l de dopamina 10 mM después de 10 minutos de perfusión de metoclopramida.

La Figura 74-a muestra un experimento de una curva dosis–respuesta de DA, en donde a la preparación se le administraron 10, 20 y 50 μ L de DA 10 mM, utilizando este primer ensayo como control antes de la aplicación de metoclopramida. La Figura 74-b ilustra los efectos de DA 40 μ L cuando esta misma preparación se perfundió con SRC que contenía metoclopramida (0.13 mM). En la Figura 74-b se muestra que a pesar de que se aplicaron dosis relativamente más altas de DA (40 μ L), no se observó ninguna respuesta de hiperpolarización, lo cual indica que los receptores dopaminérgicos ya se encontraban ocupados por este fármaco y evitaron la unión de DA a su receptor. Estos experimentos aquí presentados demuestran que la metoclopramida actúa como antagonista de los receptores dopaminérgicos presentes en la neurona 1F de *Helix aspersa*, ya que la metoclopramida bloquea la hiperpolarización membranal típica inducida por DA. Estos experimentos son de gran relevancia y originalidad, ya que representan un aporte científico para el área de las neurociencias. Hasta la fecha no se había caracterizado el efecto de la metoclopramida en los receptores dopaminérgicos dependientes de ligando en las neuronas de invertebrado. Al caracterizar a la metoclopramida como un antagonista dopaminérgico a nivel neuronal, se pueden realizar diversos estudios relacionados a la utilización de este fármaco para el tratamiento de distintas enfermedades asociadas a receptores membranales dopaminérgicos.

Con base en trabajos previos, en donde se demostró que la ergometrina actuaba como posible antagonista de los receptores dopaminérgicos [149] se llevaron a cabo experimentos muy similares a los de la metoclopramida, pero utilizando el fármaco ergometrina. Para estas pruebas se utilizó ergometrina en su presentación de fármaco comercial usado clínicamente. La figura 75 muestra el efecto de DA en condiciones control (a) y en presencia de ergometrina (b). En ambas pruebas (control y experimental) se aplicaron 2 dosis de DA (20 μ l, 10 mM). Una vez más, entre el control y el experimento se llevó a cabo un lavado de la preparación de 10 min con la mezcla del fármaco ergometrina en SRC. La concentración utilizada fue de 1 μ g/mL. Como se aprecia en la Figura 75a, la aplicación de DA (20 μ L, 10 mM) produjo una

hiperpolarización muy pronunciada; sin embargo, cuando la preparación fue perfundida con ergometrina, la aplicación de la DA no produjo ninguna hiperpolarización (ver Figura 75b). Lo anterior sugiere que la ergometrina actúa como un antagonista del receptor dopaminérgico presente en la neurona 1F de *Helix aspersa*. Más aún, en el experimento presentado en la Figura 76 se muestra el efecto irreversible de la ergometrina sobre los receptores a DA, ya que después del lavado de la preparación durante 20 minutos con SRC se siguió observando el efecto bloqueador de la ergometrina sobre la respuesta a DA.

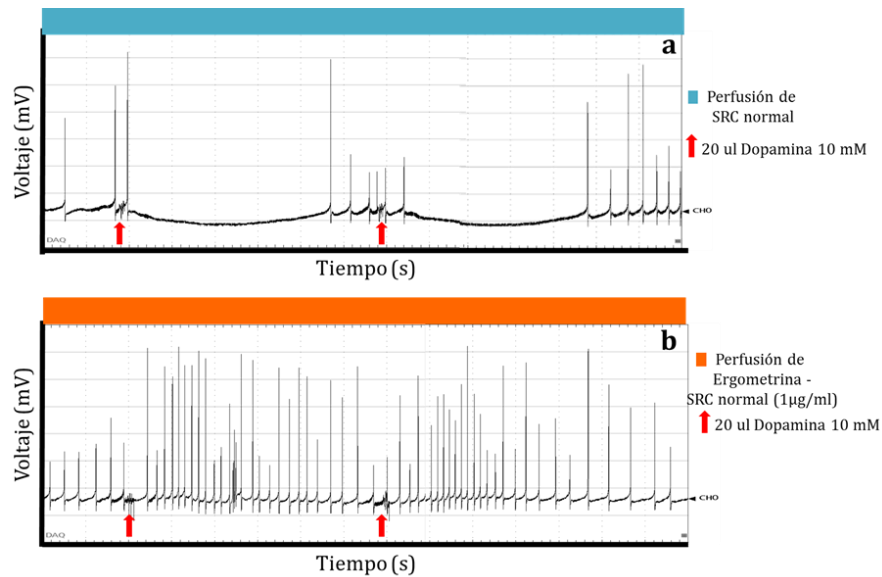


Figura 75. Control y efecto de dopamina en presencia de ergometrina. a). Control: dos aplicaciones de 20 µl de dopamina 10 mM. b). Dos aplicaciones de 20 µl de dopamina 10 mM después de perfundir por 10 minutos de ergometrina en SRC.

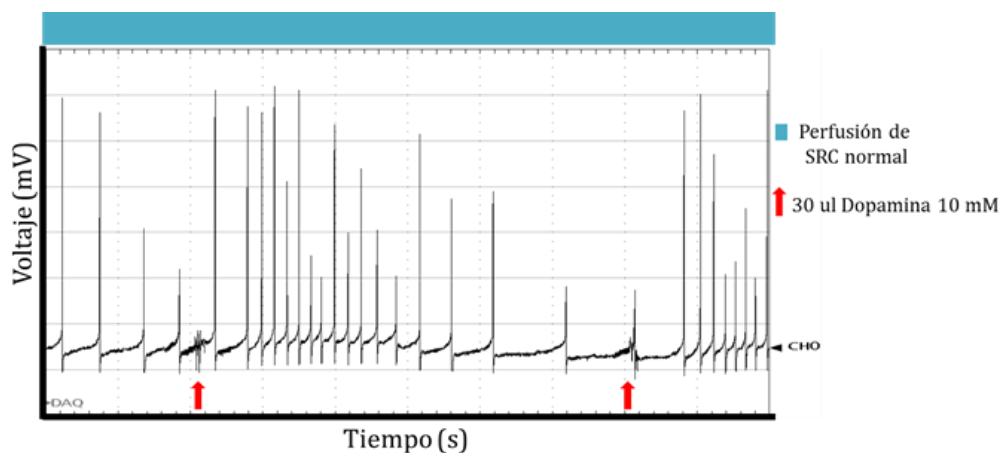


Figura 76. Efecto irreversible de ergometrina en receptores dopaminérgicos sobre la respuesta activada por dopamina. Aplicación de 2 dosis de 30 µL de dopamina 10 mM.

Habiendo estudiado la electrofisiología y la farmacología del receptor dopaminérgico presente en la neurona 1F de *Helix aspersa* nos propusimos estudiar si los NTCPM pudieran modificar la hiperpolarización membranal producida normalmente por DA. Estos experimentos se realizaron debido a que en trabajos científicos previos se reporta que los NTC pueden bloquear canales iónicos presentes en neuronas y en tejidos excitables [79-82].

En la Figura 77-a se muestra la aplicación de 2 dosis de 40 μ l de DA 10 mM, como experimento control. Se aprecia una pronunciada hiperpolarización y bloqueo de la actividad eléctrica espontánea posterior a la aplicación de DA. Después de haber perfundido por 10 min la preparación conteniendo NTCPM a una concentración de 0.005 mg/mL se aplicó DA a la célula 1F. En la Figura 77-b se observa la aplicación de 2 dosis de DA (40 μ l, 10 mM) en perfusión continua de NTCPM en SRC normal. Se aprecia que a pesar de la presencia de NTCPM a una concentración de 0.005 mg/ml la respuesta a DA sigue presente, e inclusive la hiperpolarización se hace más pronunciada.

Con el propósito de evaluar si el efecto de los NTCPM es dependiente de la dosis, en la Figura 77-c se muestra la aplicación de 2 dosis de 40 μ L de dopamina 10 mM después de 10 min de perfusión de NTCPM a una concentración de 0.05 mg/mL. Como puede apreciarse en los paneles b y c, los NTCPM no sólo no bloquean la señal producida por la aplicación de DA, sino que la potencializan; es decir, se observa que la respuesta hiperpolarizante inducida por DA es más prolongada que la respuesta en el control, lo que significa que la permeabilidad iónica activada por DA aumentó. En la Figura 77-c se observan también las respuestas hiperpolarizantes a la dopamina, pero en menor amplitud y duración; esta respuesta pudiera ser debido a que los nanotubos de carbono en mayor concentración pudieran tener un efecto deletéreo sobre la membrana celular o pudieran bloquear parcialmente la respuesta a DA.

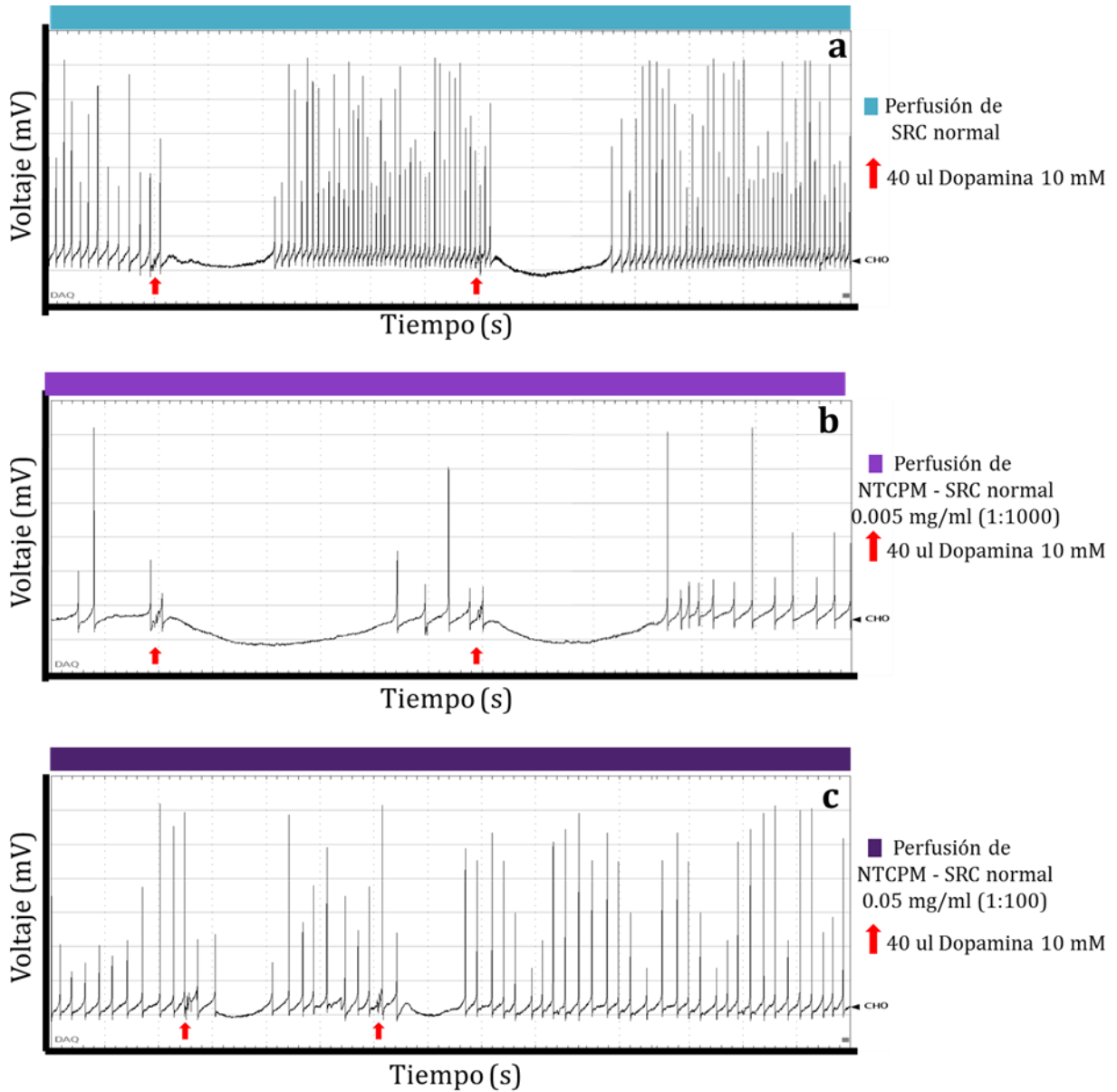


Figura 77. Efecto de NTCPM a distintas concentraciones sobre la hiperpolarización producida por dopamina. a). Control: aplicación de 2 dosis de 40 µl de dopamina 10 mM. b). Aplicación de 2 dosis de 40 µl de dopamina 10 mM en perfusión de NTCPM (0.005 mg/mL). c). Aplicación de 2 dosis de 40 µl de dopamina 10 mM en perfusión de NTCPM (0.05 mg/mL).

VII.9 Medición de la resistencia eléctrica de los NTCPM y otros materiales electroconductores.

Como fue mencionado en la sección de Introducción, Los NTCPS y NTCPM han sido caracterizados como conductores eléctricos y acarreadores de carga y de corrientes

eléctricas [69-74]. Sin embargo, a los NTCPM utilizados en este trabajo de tesis no se les han estudiado sus propiedades eléctricas ni su capacidad electroconductora. Por lo tanto, en esta sección experimental nos propusimos estudiar las propiedades eléctricas de los NTCPM y comparar dichas propiedades con las que poseen otros materiales electroconductores.

Con el propósito de estandarizar el método de medición de resistencia eléctrica de los nanomateriales electroconductores, primeramente se realizaron mediciones de resistencia eléctrica de materiales conductores conocidos como cobre y estaño. Estos resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Mediciones de resistencia eléctrica en ohms (Ω) de materiales de cobre (Cu) y estaño (Sn).

Tiempo	Lámina de cobre (Cu)	Cubierta de estaño (Sn)
0	0.188783	1.198389
10	0.188783	1.198784
20	0.188783	1.198126
30	0.188783	1.199179
40	0.188783	1.198126
50	0.188783	1.198257
60	0.188783	1.198652
70	0.188783	1.198389
80	0.188783	1.198521
90	0.188783	1.198521
100	0.188783	1.198652
110	0.188783	1.19931
120	0.188783	1.19931
130	0.188783	1.199442

Como se pueden observar en la Tabla 5 y en la Figura 78, los valores de resistencia medidos cada 10 segundos en la lámina de cobre y en la película de estaño se mantuvieron constantes a través del tiempo, encontrándose valores promedio de 1.888Ω para la lámina de cobre y de 1.985Ω para la película de estaño.

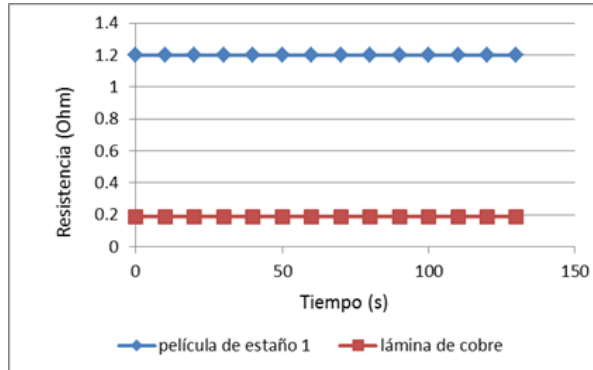


Figura 78. Mediciones de resistencia de lámina de cobre y película de estaño.

Aunado a las mediciones de resistencia eléctrica de los nanomateriales a estudiar, también evaluamos el peso de estos materiales electroconductores al ser depositados en papel bond y en filtros de PVDF. Como se puede observar en la Tabla 6, la resistencia eléctrica y el peso de los nanomateriales depositados en distintas superficies varía de acuerdo al material aplicado.

Se observó que los electrodos que contenían la pintura conductora de plata y el grafeno fueron más pesados que los que fueron hechos con NTCPM. La razón por la que el filtro de PVDF que contiene NTCPM es más pesado que el que fue hecho con papel bond es probablemente porque la cantidad de nanotubos de carbono usada con los filtros PVDF fue 5 veces mayor (ver detalles experimentales). Se puede deducir que la alta concentración de NTCPM en filtros de PVDF puede ser la razón por la que la resistencia de tales electrodos sea menor.

Tabla 6: Valores de resistencia eléctrica y peso de los distintos materiales electroconductores depositados en distintos materiales

TIPO DE ELECTRODO	PESO PROMEDIO (mg) n=5 +/- S.D.	RESISTENCIA PROMEDIO (ohms) n= 75 +/- S.D.
PINTURA DE PLATA EN PAPEL BOND	116	0.241 +/- 0.0038
PINTURA DE GRAFENO EN PAPEL BOND	104	87.79 +/- 0.3954
NTCPM EN PAPEL BOND	13.4	1552 +/- 0.7992
NTCPM EN FILTROS DE PVDF	16.6	38.6 +/- 0-0515

En otra serie de experimentos se midió la resistencia eléctrica de los NTCPM depositados sobre filtros PVDF a distintas concentraciones. Como puede observarse en la Tabla 7, la resistencia de los NTCPM de la solución madre (5mg/ml) fue de 37.39 Ω . Las diluciones 1:10 y 1:100 de esta solución 5 mg/mL dieron valores de 466 Ω y de 39040 Ω respectivamente. Estos resultados indican que la resistencia de los NTCPM depende de la concentración de dichos nanotubos: a mayor concentración de NTCPM menor resistencia.

Tabla 7: Valores de resistencia eléctrica de NTCPM a distintas concentraciones depositados en filtros de PVDF

DILUCIONES DE NTCPM	Resistencia (ohms) PROMEDIO +/- S.D. n= 30
1	37.39 +/- 0.70
1:10	466.78 +/-0.74
1:100	39040.94 +/- 18.19

Después de haber hecho pruebas de estandarización de mediciones de resistencia y variaciones del peso de distintos materiales, se procedió a medir sistemáticamente los valores de resistencia de materiales electroconductores. En la Figura 79 se muestra el arreglo experimental usado para la medición de resistencia de electrodos hechos a base de NTCPM (A), y de pintura de plata (B).

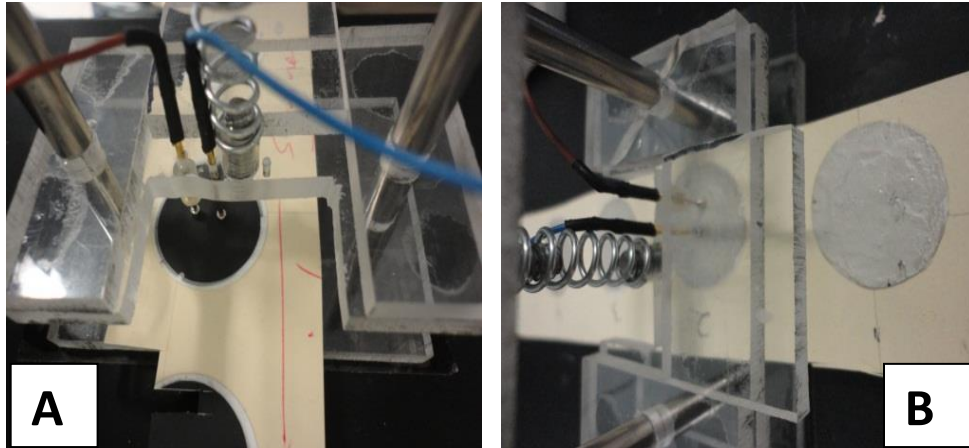


Figura 79. Arreglo experimental para medición de resistencia eléctrica de distintos materiales electroconductores. En A se muestra el electrodo hecho a base de NTCPM depositados en filtros de PVDF. En B se muestra el electrodo hecho a base de pintura de plata depositada en papel bond.

En la gráfica de la Figura 80 se muestran las mediciones de la resistencia eléctrica de electrodos hechos a base de pintura de plata. Como puede observarse, la resistencia de estos electrodos presenta un comportamiento lineal y sin variaciones a través del tiempo. Estos valores de resistencia se pudieron corroborar en 5 diferentes experimentos.

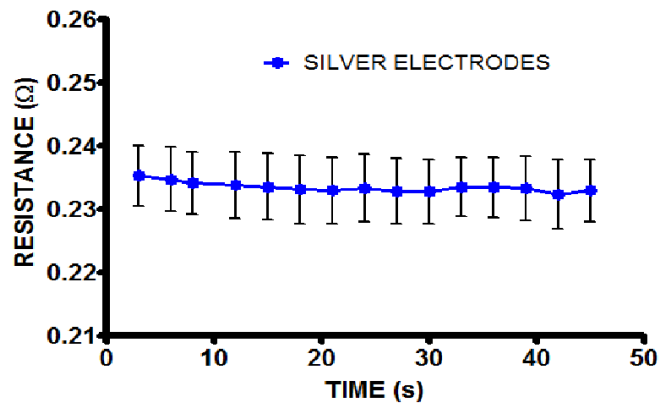


Figura 80. Medición de resistencia de electrodos hechos a base de pintura de plata depositada en papel bond. Los puntos cuadrados son el promedio de 5 diferentes experimentos y las barras representan la desviación estándar.

La misma metodología experimental de medición de resistencia eléctrica de materiales electroconductores indicada en la Figura 80 se usó para medir la resistencia eléctrica de la plata, del grafeno y de los NTCPM depositados en papel así como la de los NTCPM depositados en filtros de PVDF. Como se puede apreciar en la Figura 81, la resistencia eléctrica de estos materiales electroconductores se mantuvo lineal y constante en todos los materiales estudiados.

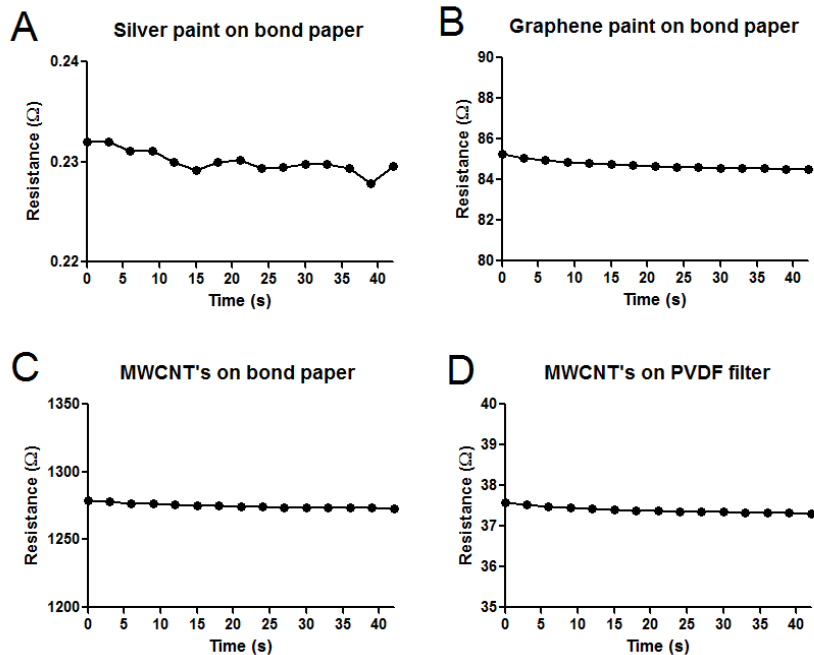


Figura 81. Comportamiento de la resistencia eléctrica de diferentes materiales electroconductores: A). Pintura de plata sobre papel bond. B). Pintura de grafeno sobre papel bond. C). NTCPM sobre papel bond y D). NTCPM sobre filtro de PVDF.

VII.10 Uso de electrodos hechos a base de NTCPM depositados en filtros de PVDF para registro de electrocardiograma en humanos.

Una vez que se demostró que los electrodos hechos a base de NTCPM depositados en filtros de PVDF presentan una baja resistencia específica, decidimos utilizar estos electrodos para detectar y registrar las señales eléctricas de un electrocardiograma (ECG) en un paciente.

En la Figura 82 se presentan los registros típicos de un electrocardiograma en humanos, monitoreado con electrodos convencionales de plata. En esa figura se resaltan las derivaciones I, II, III, aVR, aVL y aVF. Teniendo como antecedente estos parámetros bioeléctricos de un electrocardiograma normal, nos propusimos usar electrodos hechos a base de NTCPM depositados en filtros de PVDF para registrar trazos bioeléctricos similares o iguales a los que se pueden obtener con electrodos de plata.

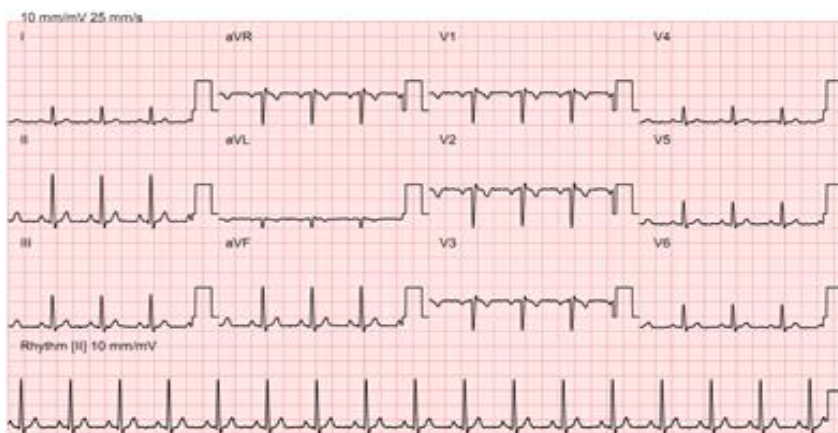


Figura 82. Trazos electrocardiográficos típicos obtenidos de un paciente utilizando electrodos de plata. Se presentan las distintas derivaciones y en la parte inferior se muestra el registro del ritmo cardíaco.

Los electrodos para registro de ECG se prepararon con NTCPM depositados sobre filtros de PVDF de acuerdo con los métodos descritos en la sección de Material y métodos. Electrodos de NTCPM-PVDF fueron colocados en el cuerpo del paciente (brazos, piernas y pecho) usando gel conductor, y fueron unidos a cables tipo caimán y conectados a un dispositivo de ECG convencional, (ver Figura 83)

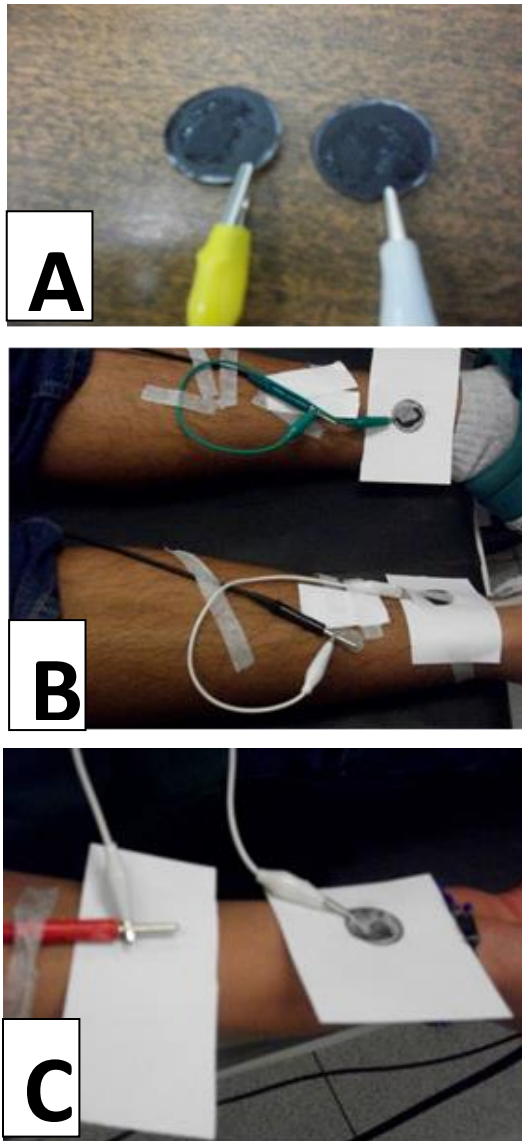


Figura 83. Colocación de electrodos hechos de NTCPM para registro de electrocardiograma en humanos. En la parte A de esta figura se muestran dos electrodos hechos a base de los NTCPM que son depositados en filtros de PVDF, los cuales están conectados con cables tipo caimán. En la parte B se muestra la colocación de los electrodos de NTCPM colocados en las piernas del paciente. La parte C muestra la colocación de los electrodos de NTCPM en la mano derecha del paciente.

Primeramente registramos el ECG regular con los electrodos tradicionales de cloruro de plata (ver cuadrantes superiores de la Figura 84) registrando las señales electrocardiográficas típicas. Entonces, decidimos conectar los cables del dispositivo de ECG a los electrodos hechos con NTCPM en filtros de PVDF, tal como se muestra en la

Figura 83. Como se puede apreciar en la Figura 84, cuadrantes interiores, se obtuvieron registros similares a los registrados con los electrodos normales de plata, en términos de la forma y el tamaño de las señales de ECG, en particular de las derivaciones I, II y III así como AVR, AVL y AVF. La línea de base del ECG obtenida con los electrodos de NTCPM fue ligeramente más ruidosa en comparación con el control (véase parte inferior izquierda de la Figura 84). Esto puede ser debido a la baja adhesividad y unión de los electrodos hechos con NTCPM-PVDF sobre la piel del paciente.

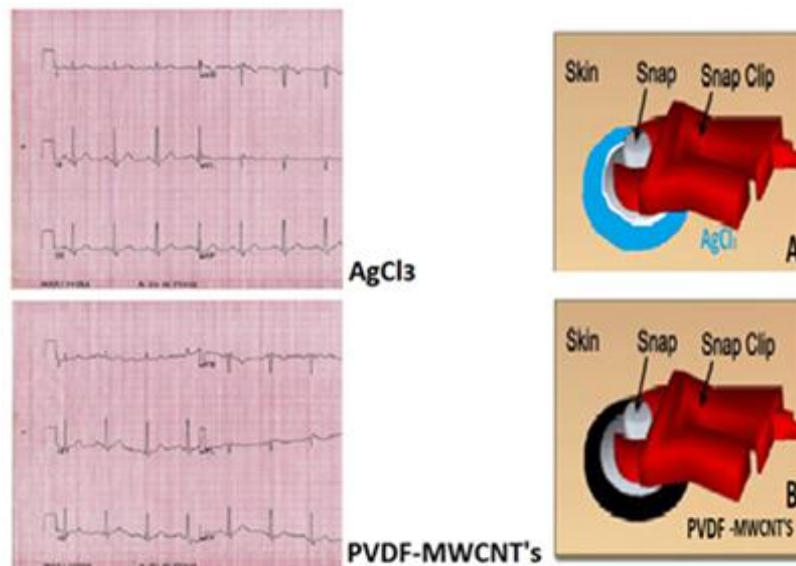


Figura 84. Los NTCPM depositados en filtros de PVDF pueden registrar las señales de ECG en los seres humanos. En la parte superior se presentan las señales de ECG (I,II,III, AVR, AVL, AVF) registradas con electrodos regulares de plata, los cuales son representados en A. En la parte inferior de la izquierda se presentan las señales de ECG registradas con NTCPM incorporados en filtros de PVDF, y los electrodos son representados en B.

Diversos autores han diseñado electrodos fabricados a base de NTCPM para registrar y detectar señales bioeléctricas. Aetre y col. [150] informaron de la síntesis de NTC alineados verticalmente y del desarrollo de sustratos de nanotubos magnéticos para aplicaciones biológicas. Recientemente, Rai y col. [151] reportaron la preparación de electrodos secos basados en textiles nanoestructurados para la medición de señales bioeléctricas por tiempo prolongado, como son señales de electrocardiografía (ECG), electroencefalografía (EEG), electro-oculografía (EOG) y electromiografía (EMG) con ruido basal muy bajo. Estos autores mejoraron la sensibilidad de los electrodos y la integración perfecta en prendas de vestir [151]. Los resultados obtenidos por otros autores referidos en el párrafo anterior, así como los resultados presentados en esta

tesis apoyan la hipótesis de que los electrodos fabricados a partir de NTCPM y depositados sobre filtros de PVDF, son buenos materiales electroconductores para registrar el ECG y pueden monitorear otras señales biológicas, tales como registros de EMG, EEG o potenciales evocados.

VII.11 La resistencia eléctrica de los NTCPM es modulada por la irradiación láser cercano al infrarrojo (nIR-láser).

En esta sección de la tesis se proporciona evidencia experimental para demostrar que los NTCPM son sensibles a la estimulación láser y este estímulo reduce sistemáticamente su resistencia eléctrica intrínseca. Los NTCPM usados en estos experimentos se obtuvieron por pirólisis de aspersión; fueron funcionalizados por tratamiento ácido y dispersados en solución acuosa de PVP (ver Material y métodos y Sección 1 de Resultados). Los nanotubos dispersados se depositaron en diferentes materiales como son: i). Filtros de fluoruro de polivinilideno (PVDF), ii). Papel bond y iii). Cubreobjetos de vidrio. Se realizaron estudios de SEM para evaluar la dispersión y la distribución topográfica de dichos nanotubos. Con respecto a los NTCPM depositados a distintas concentraciones en filtros de PVDF se encontró que presentan una distribución aleatoria y desordenada (ver Figura 30). Sin embargo, la resistencia eléctrica de dichos nanomateriales depositados en filtros de PVDF fue lineal y proporcional a la cantidad de nanotubos aplicados.

La resistencia de los NTCPM aplicados sobre los filtros de PVDF se midió en función del tiempo. En todos los experimentos realizados no hubo cambios significativos en los valores de la resistencia durante un período de aproximadamente 100 segundos antes de la aplicación del nIR-láser. En tales condiciones de control, el promedio de la resistencia fue de: 23.78, 307.55 y 22 750 Ω ($n = 30$) a diluciones de 1, 1:10 y 1: 100 NTCPM respectivamente, partiendo de una solución madre que contenía 5 mg/mL de nanotubos (ver Figura 85). En esta serie de experimentos, la resistencia de los NTCPM a diluciones de 1: 1000 no pudo ser medida, probablemente porque era demasiado alta y eso saturó el sistema de registro. El valor de la resistencia de los NTCPM disminuyó inmediatamente después de que el nIR-láser se aplicó sobre los mismos (ver Figuras 85-A, 85-B y 85-C). El porcentaje de reducción de la resistencia durante la exposición al láser fue de: -15.7%, - 10.8% y -8.6% en los NTCPM a diluciones de 1, 1:10 y 1: 100

respectivamente (ver Figuras 84-A, 84-B y 84-C). Se observó que cuando los NTCPM estaban más concentrados, la reducción de la resistencia era mayor. También se observó que la reducción de la resistencia de los NTCPM por irradiación láser fue transitoria y reversible. Después de apagar el láser, el valor de la resistencia se recuperó a casi el 100%. Así, el porcentaje de la recuperación de la resistencia después de la exposición al láser fue del 93%, 96,7% y 97,7% en las diluciones con NTCPM de 1, 1:10 y 1: 100, respectivamente (ver Figura 85-A, 85-B y 85-C).

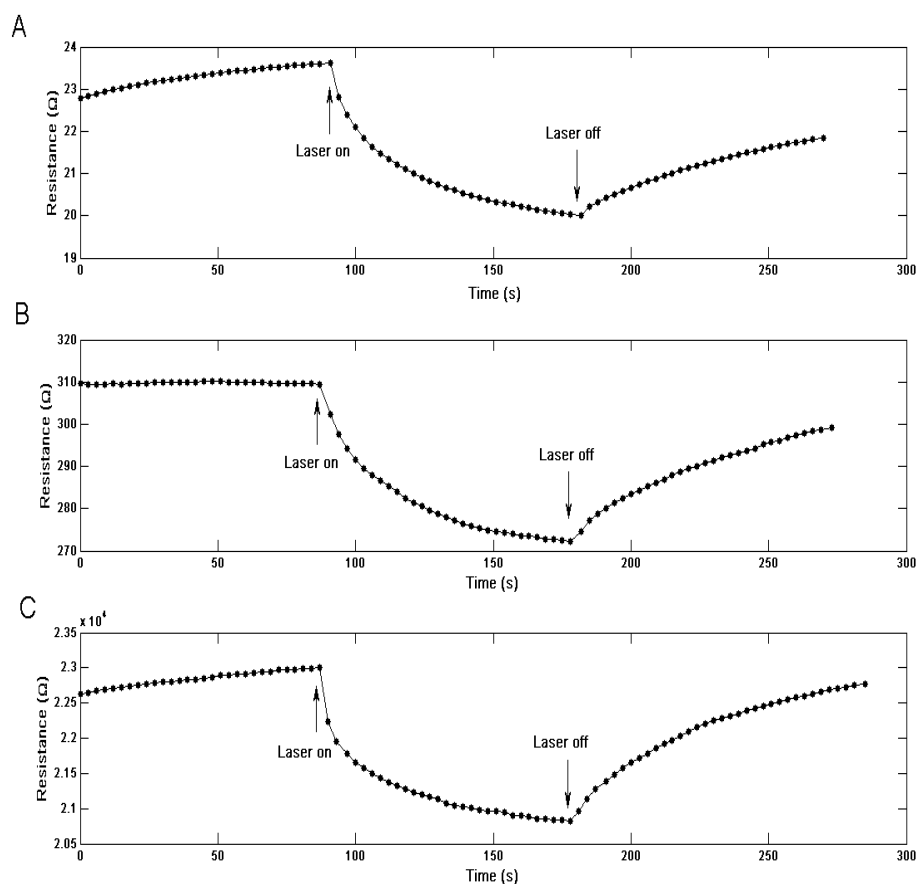


Figura 85. Efecto de nIR-láser sobre la resistencia eléctrica de los NTCPM depositados sobre filtros de PVDF. Aquí se presentan los valores de resistencia en ohmios (Ω) con respecto al tiempo(s), en condiciones de control, durante y después de la aplicación del láser. La concentración de NTCPM es de: A). 5 mg /mL, B). 0,5 mg /mL, y C). 0,05 mg /mL.

En otra serie de experimentos se midió la resistencia eléctrica tanto de los NTCPM depositados sobre cubreobjetos de vidrio como la de los depositados en papel

bond, antes y después de la irradiación con nIR-láser. En condiciones control, sin la aplicación del nIR-láser, la resistencia promedio de los NTCPM depositados sobre papel bond fue aproximadamente de 712 Ω . En el caso de los NTCPM depositados en vidrio, la resistencia promedio antes de la aplicación del m-IR-láser fue de 43 200 Ω (ver Figura 86). Cuando se aplicó el nIR-láser sobre los NTCPM depositados sobre papel o sobre vidrio se observó indistintamente que la resistencia disminuyó inmediatamente después de aplicar el láser. La reducción de la resistencia de los NTCPM después de la aplicación del láser fue aproximadamente de 28-45%. Sin embargo, la recuperación del efecto del láser sobre los nanotubos fue menor y más lenta en los NTCPM depositados en filtros de PVDF (ver Figura 85). Dicha recuperación de resistencia fue inferior al 30% del control. Resultados similares fueron reproducibles en tres experimentos diferentes cuando los NTCPM se depositaron sobre la superficie de papel bond y sobre cubreobjetos de vidrio.

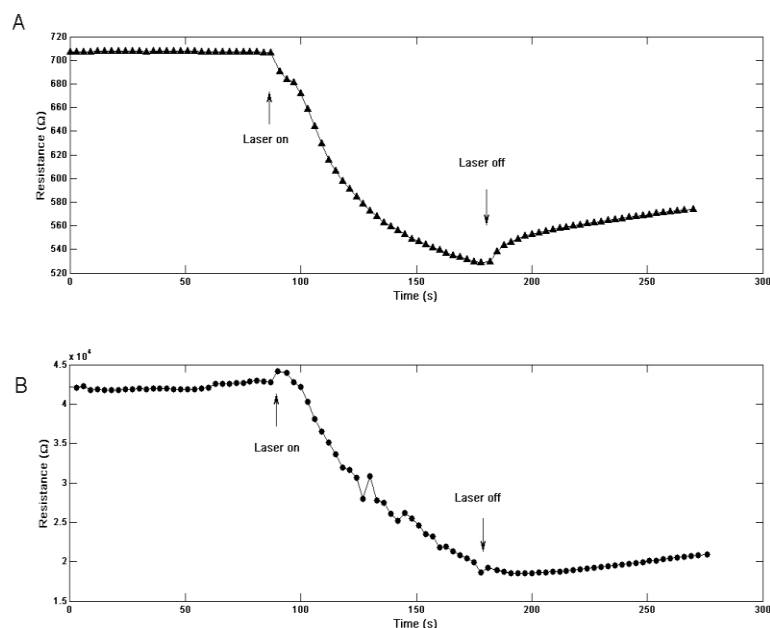


Figura 86. Efecto del láser sobre la resistencia de los NTCPM depositados sobre papel y vidrio. (A) representa los efectos del láser en los NTCPM depositados en papel y (B) los efectos del láser en los NTCPM que fueron depositados sobre cubreobjetos de vidrio.

En otros experimentos se estudió el posible efecto de la irradiación láser sobre la temperatura de los NTCPM depositados en filtros de PVDF, en papel o en vidrio. Se observó un aumento sistemático de la temperatura de los NTCPM depositados en diferentes materiales en el rango de 0,2 a 3°C. Tal aumento de temperatura en los

NTCPM fue dependiente de la concentración de NTCPM. En la Figura 87 se observa que después de 3 minutos de estimulación láser, el aumento de la temperatura en los NTCPM obtenidos de la solución madre (5 mg /mL) fue mayor en comparación con las otras muestras preparadas con NTCPM diluidos. Los resultados aquí presentados apoyan la hipótesis de que la irradiación con nIR-láser sobre los NTCPM modula, con alta sensibilidad, las propiedades eléctricas y térmicas intrínsecas de los NTCPM; por lo tanto, la irradiación láser sobre los NTCPM podría aplicarse sinérgicamente en el campo biomédico como una alternativa terapéutica para el tratamiento del cáncer, usando hipertermia inducida por láser.

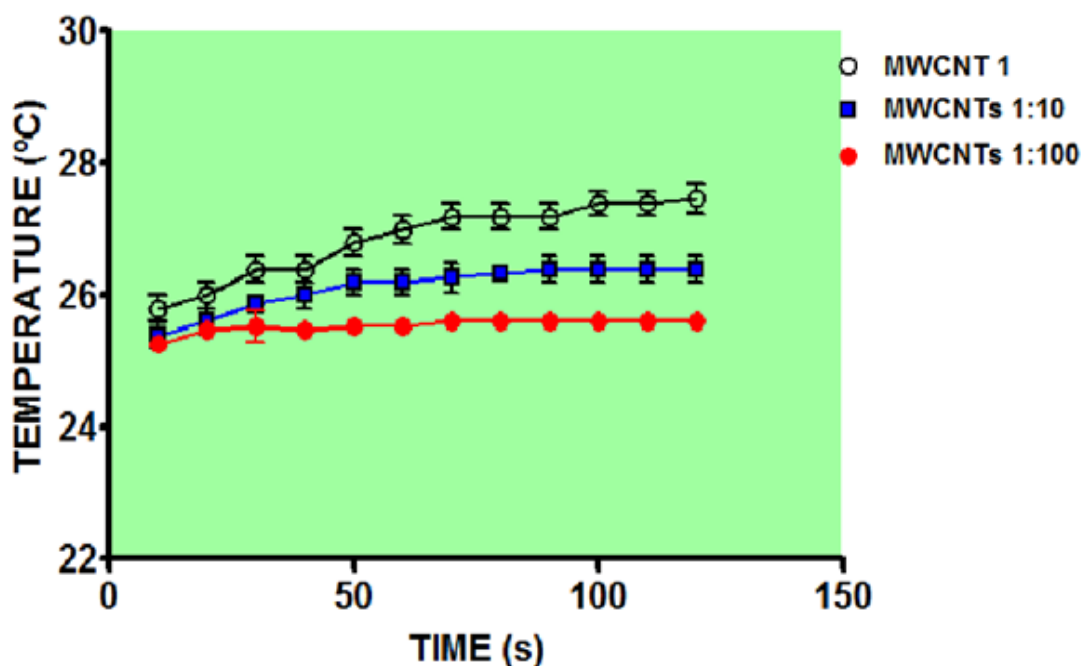


Figura 87. Efecto del nIR-láser sobre la temperatura de los NTCPM depositados sobre filtros de PVDF. Los NTCPM a concentraciones de 5, 0,5 y 0,05 mg/mL fueron depositados sobre los filtros de PVDF. Los símbolos representan el promedio de 3 experimentos y las barras son las desviaciones estándar.

VIII. Conclusiones y perspectivas.

En este trabajo de tesis doctoral se cumplieron los objetivos planteados al inicio del proyecto:

i). Se estudiaron las propiedades ultraestructurales de los nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) dispersos en soluciones acuosas y depositados en las neuronas del ganglio del caracol de jardín *Helix aspersa*.

ii). Se estudiaron las propiedades eléctricas de los NTCPM depositados sobre distintos materiales.

iii). Se estudiaron los posibles efectos citotóxicos de los NTCPM sobre las señales eléctricas de las neuronas del caracol de jardín *Helix aspersa*.

En esta tesis se demostró que los NTCPM no tienen un efecto deletéreo o citotóxico sobre las propiedades eléctricas de las neuronas de *Helix aspersa*. Los NTCPM al ser perfectamente dispersados en soluciones acuosas y unirse con gran afinidad a la membrana celular de las neuronas, no modifican las señales eléctricas que subyacen a los canales iónicos que dependen del voltaje, ni tampoco afectan las señales eléctricas de los canales iónicos que dependen de agonistas químicos. Esto puede ser explicado por la morfología intrínseca de los NTCPM usados, los cuales son relativamente grandes: 70-90 nm de diámetro y de varias micras de longitud. Estas dimensiones geométricas de los NTCPM no afectan la permeabilidad de los canales iónicos cuya compuerta o centro de permeabilidad está en el rango de 10-50 angstroms.

Además del cumplimiento de los objetivos originales de esta tesis, se obtuvieron resultados experimentales en donde se demostró que los NTCPM son capaces de registrar señales bioeléctricas tales como el electrocardiograma en humanos. Estos experimentos abren la posibilidad de usar NTCPM para monitorear y registrar otro tipo de señales bioeléctricas: electroencefalogramas, miogramas, potenciales evocados e inclusive potenciales de acción de neuronas aisladas, tanto a nivel extracelular como a nivel intracelular.

Se pudo comprobar que los NTCPM son materiales electroconductores ya que presentan una resistencia intrínseca muy baja en el rango de 30-200 Ω . Además se demostró experimentalmente que los NTCPM son altamente sensibles a la estimulación del nIR-láser. Esta estimulación con nIR-láser disminuye marcadamente la resistencia

eléctrica de los NTCPM e incrementa su temperatura. Estos resultados tienen varias aplicaciones inmediatas:

i). Se pueden fabricar electrodos con NTCPM que al ser éstos estimulados por el láser, se puedan obtener materiales con mejor electroconductividad, ya que el láser por sí mismo reduce la resistencia eléctrica de los NTCPM.

ii). Habiendo demostrado que los NTCPM no bloquean señales bioeléctricas ni conductancias iónicas en neuronas, estos NCTPM podrían usarse como electrodos de registro para sensar la actividad eléctrica de neuronas y podrían usarse como material electroconductor para unir entre sí a dos o más neuronas.

iii). Otra posible aplicación de los resultados obtenidos en esta tesis es el uso de NTCPM durante el proceso de hipertermia inducida por láser para atacar y destruir procesos tumorales y células cancerosas.

IX. Bibliografía.

1. Germann W.J., Stanfield C.L. Principles of human physiology. Benjamin Cummings, 2nd Edit. 2004.
2. Eckert R, Randall D.J. and Augustine G . Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations (Third Edition),. Published in 1988 by W. H. Freeman, Fifth Edition. Capítulos 5-8, pgs. 65-265
3. Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. Principles of neural science. Third edition, 1998, Capítulos 5-16, pags. 66-243
4. Hille B. Ion Channels of Excitable Membranes, , University of Washington. Second Edition, 1992, Sinauer Asos. Inc. Publisher. Cap. 1-8, pags. 1-235
5. Guyton, A.C. and J.E. Hall, Tratado de Fisiología Médica. 11va ed. Vol. 1. 2008: Elsevier Imprint.
6. The Axon Guide for Electrophysiology & Biophysics, Laboratory Techniques, Part Number 2500-102-Rev A. Axon Instruments.
7. Scanziani M, Häusser M. Electrophysiology in the age of light. Nature, vol 461, 2009 15 October. doi:10.1038/nature08540
8. http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/parkinson_disease_spanish.htm
9. http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/accidente_cerebrovascular.htm
10. http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/lesion_de_la_medula_espinal.htm
11. Estrada-Mondaca S, Carreón-Rodríguez A, Parra-Cid MC, Ibarra-Ponce de León C, Velasquillo Martínez C, Vacanti CA, Belkind-Gerson J. Lesión de medula espinal y medicina regenerativa. Salud Pública Mex 2007;49:437-444.
12. Neural interface, engineering and analysis. <http://www.uic.edu/labs/AMReL/projpr08.pdf>
13. García-Quiroz F., Villa-Moreno A. , Castaño- Jaramillo P. Interfaces neuronales y sistemas máquina-cerebro: fundamentos y aplicaciones. Revista Ingeniería Biomédica, No.1, 14-22, 2007,
14. Cortés J. Interfaces cerebro-máquina, un gran paso hacia la Inteligencia Artificial www.cienciacognitiva.org, 16 marzo, 2009
15. J.R.Wolpaw, N. Birbaumer, D.J. McFarland. Braincomputer interfaces for communication and control. Clinical Neurophysiology 113 (2002) 767–791
16. Sepúlveda-Cervantes G, Montañó-Martínez N.H., Román-Pérez M.A. Interfaz Cerebro Computadora para el Posicionamiento de Un Robot Virtual itzamna.izt.uam.mx/mexcas2011/G_Sepulveda_etal.pdf
17. García Cossio E., Fernandez C., Gaviria M.E., Oalacio C., Alvaran y Torres-Villa R.A. Interfaz cerebro computador basada en P300 para la comunicación alternativa: estudio de caso en dos adolescentes en situación de discapacidad motora. Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia N.º 60 pp. 9-19. Septiembre, 2011
18. Morales Reyes I. Diseño y caracterización de interfaz células neuronales-substrato metalico a través de una película de nanotubos de carbono. Tesis para obtener el grado de Maestria en Ciencias, UAM Iztapalapa, 148.206.53.231/UAMI14795.pdf (2009)
19. Paek SH, Lee JY, Kim HJ, Kang D, Lim YH, Kim MR, Kim C, Jeon BS, Kim DG. Electrode position and the clinical outcome after bilateral subthalamic nucleus stimulation. J Korean Med Sci. 2011 Oct;26(10):1344-55.
20. Benito-León J. and Louis E.D. Clinical update: diagnosis and treatment of essential tremor . The Lancet, Volume 369, Issue 9568, Pages 1152 - 1154, 7 April 2007.
21. Avendaño Coy J. y Basco López, J.A., Electroestimulación funcional en el lesionado medular (revisión científica). <http://www.doyma.es> el 19/09/2007.
22. Schiff ND, Giacino JT, Kalmar K, Victor JD, Baker K, Gerber M, Fritz B, Eisenberg B, O'Connor J, Kobylarz EJ, Farris S, Machado A, McCagg C, Plum F, Fins JJ, Rezaei AR. Behavioral Improvements with Thalamic Stimulation after Severe Traumatic Brain Injury. Nature 2007;448(7153): 600-603.
23. Mejias-Sánchez Y, Cabrera-Cruz N, Toledo-Fernández AM, Duany- Machado OJ.. La nanotecnología y sus posibilidades de aplicación en el campo científico-tecnológico. Rev Cubana Salud Pública v.35 n.3 2009.
24. http://www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologia/historia_nanotecnologia.htm
25. Bekyarova E, Ni Y, Malarkey E.B, Montana V, McWilliams JL, Haddon R.C, and Parpura V Applications of Carbon Nanotubes in Biotechnology and Biomedicine. J Biomed Nanotechnol. 2005 March 1; 1(1): 3–17.

26. Rivas Martínez MJ, Ganzer JR., Cosme Huertas ML., www.madrimasd.org . Aplicaciones actuales y futuras de los nanotubos de carbono. http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt11_nanotubos.pdf
27. Clasificación de nanomateriales. <http://boletin-noticias-nanotecnologia.euroresidentes.com/2007/03/clasificacin-de-nanomateriales>.
28. Kroto H W, Heath J R, O'Brien S C, Curl R F & Smalley R E. C : Buckminsterfullerene. *Nature* 318:162-3, 1985.
29. S. Iijima. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354, 56 - 58 (07 November 1991); doi:10.1038/354056a0
- 29a. Lamberti M, Pedata P, Sannolo N, Porto S, De Rosa A, Caraglia M. Carbon nanotubes: Properties, biomedical applications, advantages and risks in patients and occupationally-exposed workers. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2015 Mar;28(1):4-13. doi: 10.1177/0394632015572559.
30. Dresselhaus, MS.; Dresselhaus, G.; Eklund, PC. *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes.* Academic Press Inc. New York 1996.
- 30a. Iijima S, Ichihashi T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature* 1993;363:603.
- 30b. Ebbesen TW, Ajayan PM. Large scale synthesis of carbon nanotubes. *Nature* 1992;358:220.
- 30c. Rao CNR, Govindaraj A. Carbon nanotubes from organometallic precursors. *Acc Chem Res* 2002;35:998. [
31. de Jong K.P. et al. Carbon-Nanofibers: Catalytic Synthesis and Applications. *Catal. Review Sci. Eng.* 42, 481 (2000).
32. Gadiou R., Saadallah S-E., Piquero T., David P., Parmentier J., Vix-Guterl C. The Influence of textural properties on the adsorption of hydrogen on ordered nanostructured carbons. *Microporous and Mesoporous Materials* 79, 121-128 (2005)
33. Endo M. American Chemical Society, CHEMTECH, September, No. 18, pp.568-576, 1988.
34. Kidena K, Yuma K, Masakatsu N. A Possibility of the Production of Carbon Nanotubes from Heavy Hydrocarbons. *Fuel Process. Technol.* 89, 449-454, 2008.
35. Dupuis, Ann-Claire. The Catalyst in the CCVD of Carbon Nanotubes - A Review. *Prog. Mat. Sci.* 50 (8), 929-961, 2005.
36. Kong J., Soh, H.T., Cassell, A.M., Quate, C.F., Dai, H.J. Synthesis of individual single-walled carbon nanotubes on patterned silicon wafers. *Nature* 395, 878-881, 1998
37. Zhen, Yu., Shendong Li., and Peter J. Burke. Synthesis of aligned arrays of millimeter long, straight single-walled carbon nanotubes. *Chemical Materials*, 2004.
38. Aguilar-Elguezabal A., Antunez W., Alonso G., Delgado F.P., Espinosa F. and Miki-Yoshida, M. Study of carbon nanotubes synthesis by spray pyrolysis and model of growth. *Diamond & Related Materials* 15 (2006) 1329 – 1335.
39. Kamalakaran R., Terrones M., Seeger T., Kohler-Redlich P., Ruhle M, Kim Y.A, Hayashi T, Endo M. Synthesis of thick and crystalline nanotube arrays by spray pyrolysis. *Appl. Phys. Lett.* 77 (21) (2000) 338.
- 40a. Bianco, A., M. Kostarelos K Fau - Prato, and M. Prato, Making carbon nanotubes biocompatible and biodegradable. *Chemical Communications*, 2011. 47(1364-548X (Electronic)).
- 40b. Ali-Boucetta, H. and Kostarelos K., Pharmacology of carbon nanotubes: Toxicokinetics, excretion and tissue accumulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013. 65(15): p. 2111-2119.
- 40c. Hu, H., et al., Chemically Functionalized Carbon Nanotubes as Substrates for Neuronal Growth. *Nano Letters*, 2004. 4: p. 507–511.
- 40d. Jin, G.Z., et al., Neurite outgrowth of dorsal root ganglia neurons is enhanced on aligned nanofibrous biopolymer scaffold with carbon nanotube coating. *Neuroscience Letters*, 2011. 501(1): p. 10-14.
- 40e. Kumar, S., et al., Controlling the density and site of attachment of gold nanoparticles onto the surface of carbon nanotubes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012. 369(1): p. 23-27.
- 40f. Bardi, G., et al., Functionalized Carbon Nanotubes in the Brain: Cellular Internalization and Neuroinflammatory Responses. *PLoS ONE* 2013. 8(11).
- 40g. Zhang, Z., L. Pfefferle, and G.L. Haller, Characterization of functional groups on oxidized multi-wall carbon nanotubes by potentiometric titration. *Catalysis Today*, 2015. 249: p. 23-29.
- 40h. Método de Funcionalización de Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple, Aguilar-Elguezabal A., comunicación personal.
- 40i. Ramanathan T, Fisher FT, Ruoff RS, Brinson LS. Amino-Functionalized Carbon Nanotubes for Binding to Polymers and Biological Systems. *Chem. Mater.* 2005, 17, 1290-1295
41. Lee W, Parpura V. Dissociated cell culture for testing effects of carbon nanotubes on neuronal growth. *Methods Mol Biol.* 2012;846:261-76.

42. Fabbro A, Villari A, Laishram J, Scaini D, Toma FM, Turco A, Prato M, Ballerini L. Spinal Cord Explants Use Carbon Nanotube Interfaces To Enhance Neurite Outgrowth and To Fortify Synaptic Inputs. *ACS Nano*. 2012 Feb 27.
43. Cellot G, Toma FM, Varley ZK, Laishram J, Villari A, Quintana M, Cipollone S, Prato M, Ballerini L. Carbon nanotube scaffolds tune synaptic strength in cultured neural circuits: novel frontiers in nanomaterial-tissue interactions. *J Neurosci*. 2011 Sep 7;31(36):12945-53.
44. Seidlits SK, Lee JY, Schmidt CE. Nanostructured scaffolds for neural applications. *Nanomedicine*, 2008;3(2):183–99. [PubMed: 18373425]
45. Aoki N, Akasaka T, Watari F, Yokoyama A. Carbon nanotubes as scaffolds for cell culture and effect on cellular functions. *Dent Mater J*. 2007 Mar;26(2):178-85.
46. Ni Y, Hu H, Malarkey EB, Zhao B, Montana V, Haddon RC, et al. Chemically Functionalized Water Soluble Single-Walled Carbon Nanotubes Modulate Neurite Outgrowth. *J. Nanoscience and Nanotechnology* 2005;5:1707–12
47. Hu H, Ni Y, Montana V, Haddon RC, Parpura V. Chemically Functionalized Carbon Nanotubes as Substrates for Neuronal Growth. *Nano Letters* 2004;4(3):507–11.
48. Mattson MP, Haddon RC, Rao AM. Molecular Functionalization of Carbon Nanotubes and Use as Substrates for Neuronal Growth. *Journal of Molecular Neuroscience* 2000;14:175–82.
49. Chen CS, Soni S, Le C, Biasca M, Farr E, Chen EY, Chin WC. Human stem cell neuronal differentiation on silk-carbon nanotube composite. *Nanoscale Res Lett*. 2012 Feb 14;7(1):126.
50. Shin SR, Bae H, Cha JM, Mun JY, Chen YC, Tekin H, Shin H, Farshchi S, Dokmeci MR, Tang S, Khademhosseini A. Carbon nanotube reinforced hybrid microgels as scaffold materials for cell encapsulation. *ACS Nano*. 2012 Jan 24;6(1):362-72.
51. Vittorio O, Duce SL, Pietrabissa A, Cuschieri A. Multiwall carbon nanotubes as MRI contrast agents for tracking stem cells. *Nanotechnology*. 2011 Mar 4;22(9):095706. Epub 2011 Jan 27.
52. Vittorio O, Quaranta P, Raffa V, Funel N, Campani D, Pelliccioni S, Longoni B, Mosca F, Pietrabissa A, Cuschieri A. Magnetic carbon nanotubes: a new tool for shepherding mesenchymal stem cells by magnetic fields. *Nanomedicine (Lond)*. 2011 Jan;6(1):43-54.
53. Namgung S, Baik KY, Park J, Hong S. Controlling the growth and differentiation of human mesenchymal stem cells by the arrangement of individual carbon nanotubes. *ACS Nano*. 2011 Sep 27;5(9):7383-90.
54. Holy J, Perkins E, Yu X. Adhesion, proliferation and differentiation of pluripotent stem cells on multi-walled carbon nanotubes. *IET Nanobiotechnol*. 2011 Jun;5(2):41-6.
55. Nho Y, Kim JY, Khang D, Webster TJ, Lee JE. Adsorption of mesenchymal stem cells and cortical neural stem cells on carbon nanotube/polycarbonate urethane. *Nanomedicine (Lond)*. 2010 Apr;5(3):409-17.
56. McCullen SD, Stevens DR, Roberts WA, Clarke LI, Bernacki SH, Gorga RE, Lobo EG. Characterization of electrospun nanocomposite scaffolds and biocompatibility with adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(2):253-63.
57. Fuchsberger K, Le Goff A, Gambazzi L, Toma FM, Goldoni A, Giugliano M, Stelzle M, Prato M. Multiwalled carbon-nanotube-functionalized microelectrode arrays fabricated by microcontact printing: platform for studying chemical and electrical neuronal signaling. *Small*. 2011 Feb 18;7(4):524-30.
58. Cellot G, Toma FM, Varley ZK, Laishram J, Villari A, Quintana M, Cipollone S, Prato M, Ballerini L. Carbon nanotube scaffolds tune synaptic strength in cultured neural circuits: novel frontiers in nanomaterial-tissue interactions. *J Neurosci*. 2011 Sep 7;31(36):12945-53.
59. Fabbro A, Cellot G, Prato M, Ballerini L. Interfacing neurons with carbon nanotubes: (re)engineering neuronal signaling. *Prog Brain Res*. 2011;194:241-52.
60. Cellot G, Cilia E, Cipollone S, Rancic V, Sucapane A, Giordani S, Gambazzi L, Markram H, Grandolfo M, Scaini D, Gelain F, Casalis L, Prato M, Giugliano M, Ballerini L. Carbon nanotubes might improve neuronal performance by favouring electrical shortcuts. *Nat Nanotechnol*. 2009 Feb;4(2):126-33.
61. Sucapane A, Cellot G, Prato M, Giugliano M, Parpura V, Ballerini L. Interactions Between Cultured Neurons and Carbon Nanotubes: A Nanoneuroscience Vignette. *J Nanoneurosci*. 2009 Jun 1;1(1):10-16.
62. Mazzatenta A, Giugliano M, Campidelli S, Gambazzi L, Businaro L, Markram H, Prato M, Ballerini L. Interfacing neurons with carbon nanotubes: electrical signal transfer and synaptic stimulation in cultured brain circuits. *J Neurosci*. 2007 Jun 27;27(26):6931-6.

63. Lovat V, Pantarotto D, Lagostena L, Cacciari B, Grandolfo M, Righi M, Spalluto G, Prato M, Ballerini L. Carbon nanotube substrates boost neuronal electrical signaling. *Nano Lett.* 2005 Jun;5(6):1107-10.
64. Keefer EW, Botterman BR, Romero MI, Rossi AF, Gross GW. Carbon nanotube coating improves neuronal recordings. *Nat Nanotechnol.* 2008 Jul;3(7):434-9
65. McLamore ES, Mohanty S, Shi J, Claussen J, Jedlicka SS, Rickus JL, Porterfield DM A self-referencing glutamate biosensor for measuring real time neuronal glutamate flux. *J Neurosci Methods.* 2010 May 30;189(1):14-22
66. Schrlau MG, Falls EM, Ziober BL, Bau HH. Carbon nanopipettes for cell probes and intracellular injection. *Nanotechnology* 2008;19(015101):1-4.
67. Raffa V, Gherardini L, Vittorio O, Bardi G, Ziaei A, Pizzorusso T, Riggio C, Nitodas S, Karachalios T, Al-Jamal KT, Kostarelos K, Costa M, Cuschieri A. Carbon nanotube-mediated wireless cell permeabilization: drug and gene uptake. *Nanomedicine (Lond).* 2011 Dec;6(10):1709-18.
68. Wang Y, Liu L, Li M, Xu S, Gao F. Multifunctional carbon nanotubes for direct electrochemistry of glucose oxidase and glucose bioassay. *Biosens Bioelectron.* 2011 Dec 15;30(1):107-11.
69. Zhang Y, Ronning F, Gofryk K, Mara NA, Haberkorn N, Zou G, Wang H, Lee JH, Bauer E, McCleskey TM, Burell AK, Civale L, Zhu YT, Jia Q. Aligned carbon nanotubes sandwiched in epitaxial NbC film for enhanced superconductivity. *Nanoscale.* 2012 Feb 27. [Epub ahead of print]
70. Pang P, He J, Park JH, Krstić PS, Lindsay S. Origin of giant ionic currents in carbon nanotube channels. *ACS Nano.* 2011 Sep 27;5(9):7277-83.
71. Murata N, Haruyama J, Reppert J, Rao AM, Koretsune T, Saito S, Matsudaira M, Yagi Y. Superconductivity in thin films of boron-doped carbon nanotubes. *Phys Rev Lett.* 2008 Jul 11;101(2):027002.
72. Berger C, Poncharal P, Yi Y, de Heer W. Ballistic conduction in multiwalled carbon nanotubes. *J Nanosci Nanotechnol.* 2003 Feb-Apr;3(1-2):171-7.
73. Wei B.Q., Vajtai R. and Ajayan P.M. Reliability and current carrying capacity of carbon nanotubes *Appl. Phys. Lett.* 79, 1172 (2001)
74. Kasumov AY, Deblock R, Kociak M, Reulet B, Bouchiat H, Khodos II, Gorbatov YB, Volkov VT, Journet C, Burghard M. Supercurrents through single-walled carbon nanotubes. *Science.* 1999 May 28;284(5419):1508-11.
75. Siwy Z.S. Davenport M. Biosensors: Making nanopores from nanotubes. *Nature Nanotechnology* 5, 174 - 175 (2010)
76. Huang Y, Palkar PV, Li LJ, Zhang H, Chen P. Integrating carbon nanotubes and lipid bilayer for biosensing. *Biosens Bioelectron.* 2010 Mar 15;25(7):1834-7
77. Lacerda SH, Semberova J, Holada K, Simakova O, Hudson SD, Simak J. Carbon nanotubes activate store-operated calcium entry in human blood platelets. *ACS Nano.* 2011 Jul 26;5(7):5808-13. .
78. Semberova J, De Paoli Lacerda SH, Simakova O, Holada K, Gelderman MP, Simak J. Carbon nanotubes activate blood platelets by inducing extracellular Ca²⁺ influx sensitive to calcium entry inhibitors. *Nano Lett.* 2009 Sep;9(9):3312-7.
79. Jakubek LM, Marangoudakis S, Raingo J, Liu X, Lipscombe D, Hurt RH. The inhibition of neuronal calcium ion channels by trace levels of yttrium released from carbon nanotubes. *Biomaterials.* 2009 Oct;30(31):6351-7.
80. Xu H, Bai J, Meng J, Hao W, Xu H, Cao JM. Multi-walled carbon nanotubes suppress potassium channel activities in PC12 cells. *Nanotechnology.* 2009 Jul 15;20(28):285102. .
81. Park KH, Chhowalla M, Iqbal Z, Sesti F. Single-walled carbon nanotubes are a new class of ion channel blockers. *J Biol Chem.* 2003 Dec 12;278(50):50212-6
82. Gavello D, Vandael DH, Cesa R, Premoselli F, Marcantoni A, Cesano F, Scarano D, Fubini B, Carbone E, Fenoglio I, Carabelli V. Altered excitability of cultured chromaffin cells following exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology.* 2012 Feb;6(1):47-60.
83. Voge CM, Johns J, Raghavan M, Morris MD, Stegemann JP. Wrapping and dispersion of multiwalled carbon nanotubes improves electrical conductivity of protein-nanotube composite biomaterials. *J Biomed Mater Res A.* 2013 Jan;101(1):231-8.
84. Ciofani G, Raffa V, Vittorio O, Cuschieri A, Pizzorusso T, Costa M, Bardi G. In Vitro and In Vivo Biocompatibility Testing of Functionalized Carbon Nanotubes *Methods Mol Biol.* 2010;625:67-83.
85. Bardi G, Vittorio O, Maffei M, Pizzorusso T, Costa M. Adipocytes differentiation in the presence of Pluronic F127-coated carbon nanotubes. *Nanomedicine.* 2009 Dec;5(4):378-81.
86. Pensabene V, Vittorio O, Raffa V, Ziaei A, Menciasci A, Dario P. Neuroblastoma cells displacement by magnetic carbon nanotubes. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2008 Jun;7(2):105-10.

87. Miao J, Miyauchi M, Dordick JS, Linhardt RJ. Preparation and characterization of electrospun core sheath nanofibers from multi-walled carbon nanotubes and poly(vinyl pyrrolidone). *J Nanosci Nanotechnol.* 2012 Mar;12(3):2387-93.
88. Zhang K, Choi HJ, Kim JH. Preparation and characteristics of electrospun multiwalled carbon nanotube/polyvinylpyrrolidone nanocomposite nanofiber. *J Nanosci Nanotechnol.* 2011 Jun;11(6):5446-9.
89. Ntim SA, Sae-Khow O, Witzmann FA, Mitra S. Effects of polymer wrapping and covalent functionalization on the stability of MWCNT in aqueous dispersions. *J Colloid Interface Sci.* 2011 Mar 15;355(2):383-8.
90. Quintana M, Grzelczak M, Spyrou K, Calvaresi M, Bals S, Kooi B, Van Tendeloo G, Rudolf P, Zerbetto F, Prato M. A simple road for the transformation of few-layer graphene into MWNTs. *J Am Chem Soc.* 2012 Aug 15;134(32):13310-5.
91. Nguyen T.T., Nguyen S.U., Phuong D.T., Nguyen D.C and Mai A.T. Dispersion of denatured carbon nanotubes by using a dimethylformamide solution. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* 2 (2011) 035015 (4pp).
92. Melendi S., Bonyadi S., Castell P., Martinez M.T. and Mackley M.R. The functionalization of carbon nanotubes using a batch oscillatory flow reactor. *Chemical Engineering Science*84(2012)544–551.
93. Jagadish K., Srikantaswamy S., Byrappa K., Shruthi L. and Abhilash M.R. Dispersion of Multiwall Carbon Nanotubes in Organic Solvents through Hydrothermal Supercritical Condition. *Journal of Nanomaterials* (2015). Volume 2015, Article ID 381275, 6 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/381275>
94. Aguilar-Elguezabal, A. Dispersion de nanotubos de carbon de pared multiple, Comunicación personal.
95. Zaragoza-Contreras EA, Lozano-Rodríguez ED, Román-Aguirre M, Antunez-Flores W, Hernández-Escobar CA, Flores-Gallardo SG, Aguilar-Elguezabal A. Evidence of multi-walled carbon nanotube fragmentation induced by sonication during nanotube encapsulation via bulk-suspension polymerization. *Micron.* 2009 Jul-Aug;40(5-6):621-7.
96. Hirsch A. Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, No. 11
97. Achaby ME, Arrakhiz FE, Vaudreuil S., Essassi M., Qaiss M. and Bousmina M. Nanocomposite Films of Poly(Vinylidene Fluoride) Filled with Polyvinylpyrrolidone-Coated Multiwalled Carbon Nanotubes: Enhancement of b-Polymorph Formation and Tensile Properties. *Polymer Engineering and Science* 53(1):34-43. 2013
98. Achaby ME, Essassi EM and Qaiss A. Coated multi-walled carbon nanotubes for the preparation of nanocomposite films. *Society of plastics engineers. Plastics research on line.* 10.1002/spepro.004342. www.4spepro.org/pdf/004342/004342.
99. Yu, T. Surfactant Assisted Dispersion of Single-Walled Carbon Nanotubes in Polyvinylpyrrolidone Solutions (2014). *Electronic Thesis and Dissertation Repository. Paper 2362. The University of Western, Ontario.*
100. Nasouri, K., Shoushtari, A. M. and Mojtahedi, M. R. M. (2016), Synthesis and characterization of highly dispersed multi-walled carbon nanotubes/polyvinylpyrrolidone composite nanofibers for EMI shielding application. *Polym. Compos.* doi:10.1002/pc.23774
101. O'Connell, M.J.; Boul, P.B.; Ericson, L.M.; Huffman, C.; Wang, Y.; Haroz, E.; Kuper, C.; Tour, J.; Ausman, K.D.; Smalley, R.E.; Reversible water-solubilization of single-walled carbon nanotubes by polymer wrapping. *Chem. Phys. Lett.* 2001, 342, 265-271.
102. Hasan, T.; Scardaci, V.; Tan, P.H.; Rozhin, A.G.; Milne, W.I.; Ferrari, A.C. Stabilization and "debundling" of single-wall carbon nanotube dispersions in N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) by polyvinylpyrrolidone (PVP). *J. Phys. Chem. C* 2007, 111, 12594-12602.
103. Kerkut, G. A., Lambert, J. D. C., Gayton, R. J., Loker, J. E., and Walker, R. J. (1975). Mapping of nerve cells in the subesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 50-A, 1-28.
104. Burton, R. F. (1975) *Ringer solutions and physiological salines.* Edit. by John Wright and sons. LTD., Bristol, London. Cap. XV: Specific Formulas.

105. Alvarez-Leefmans, F. J., and Gamiño, S. M. (1982). Intracellular free potassium concentration in snail neurones measured with ion selective microelectrodes. *Soc. Neurosci. abst.* 8(2): 684.
106. Alvarez-Leefmans, F. J., Gamiño, S. M. and Rink, T. J. (1984). Intracellular free magnesium in neurones of *Helix aspersa* measured with ion-selective microelectrodes. *J. Physiol.* 354: 303-317.
107. Alvarez-Leefmans, F. J., Rink, T. J. and Tsien, R. Y. (1981) Free calcium ions in neurones of *Helix aspersa* measured with ion-selective micro-electrodes. *J. Physiol.* 315: 531-548, .
108. Kerkut, G. A., and Gardner, D. R. (1965). The role of calcium ion in the action potential of *Helix aspersa* neurons. *Comp. Biochem.* 20: 147-162.
109. Standen, N. B. (1975a). Calcium and sodium ions as charge carriers in the action potential in identified snails neurons. *J. Physiol.* 249, 241-252.
110. Standen, N. B. (1975b). Voltage clamp studies of the calcium inward current in an identified snails neurons. Comparison with the sodium inward current. *J. Physiol.* 249, 253-268.
111. Standen, N. B. (1981). Ca channel inactivation by intracellular Ca injection into *Helix* neurones. *Nature* Vol. 293, pp. 253-368.
112. Meech, R. W. and Standen, N. B. (1975). Potassium activation in *Helix aspersa* neurons under voltage clamp: A component mediated by calcium influx *J. Physiol.* 249, pp. 211-239.
113. Eckert, R. and Lux, H. D. (1976). A voltage-sensitive persistent calcium conductance in neural somata of *Helix*. *J. Physiol. Lond.* 254: 129-151.
114. Adams, D. J., Smith, S. J. and Thompson, S. H. (1980). Ionic currents in molluscan soma. *Ann. Rev. Neurosci.* 3: 141-167.
115. Omura, Y. Ozaki, S and Meano, T. (1961). Electrical activity of a giant nerve cell under abnormal conditions. *Nature* 191, 1265-1267.
116. Akaike, N., Lee, K. S. and Brown, A. M. (1978). The calcium current of *Helix* neuron. *J. Gen. Physiol.* 71: 509-531.
117. Chad, J. E. and Eckert, R. (1986). An enzymatic mechanism for calcium current inactivation in dialyzed *Helix aspersa* neurons. *J. Physiol.* 378: 413-418.
118. Marom S. and Dagan D. Calcium current in growth balls from isolated *Helix aspersa* neuronal growth cones *Pflügers Arch* (1987) 409 : 578 – 581
119. Hodgkin, A. L. y A. F. Huxley. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol.* 1952 Apr;116(4):449-72. PMID 14946713
120. Hodgkin, A. L. y A. F. Huxley. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol.* 1952 Apr;116(4):473-96. PMID 14946714
121. Hodgkin, A. L. y A. F. Huxley. «The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*.» *J Physiol.* 1952 Apr;116(4):497-506. PMID 14946715
122. Hodgkin, A. L. y A. F. Huxley. «A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.» *J Physiol.* 1952 Aug;117(4):500-44. PMID 12991237
123. Bellver, E. Agonista | Antagonista. 2015 [cited 2015 November 1st]; Available from: <http://demedicina.com/agonista-antagonista/>.
124. Sakmann B, Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol.* 1984;46:455-72.
125. Shityakov, S., Salvador, E., Pastorin, G. and Forster, C. (2015) Blood-Brain Barrier Transport, Aggregation, and Molecular Dynamics Simulation of Multiwalled Carbon Nanotube Functionalized with Fluorescein Isothiocyanate. *International Journal of Nanomedicine* , 10, 1703-1713.
126. Iancu, C., Mocan, L., Bele, C., Orza, A.I., Tabaran, F.A., Catoi, C., Stiuftuc, R., Stir, A., Matea, C., Iancu, D., Agoston-Coldea, L., Zaharie, F. and Mocan, T. (2011) Enhanced Laser Thermal Ablation for the in Vitro Treatment of Liver Cancer by Specific Delivery of Multiwalled Carbon Nanotubes Functionalized with Human Serum Albumin. *International Journal of Nanomedicine* , 6, 129-141.
127. Hao, Y., Yang, X., Shi, Y., Xing, J., Marowitch, J., Chen, J. and Chen, J. (2012) FITC Delivery into Plant Cells Using Magnetic Single-Walled Carbon Nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* , 12, 6287-6293.
128. Chen, M.T., Gomez, L.M., Ishikawa, F.N., Vernier, P.T., Zhou, C. and Gundersen, M.A. (2009) PH-Sensitive Intracellular Photoluminescence of Carbon Nanotube-Fluorescein Conjugates in Human Ovarian Cancer Cells. *Nanotechnology*, 20, Article ID: 295101.
129. Bosi, S., Rauti, R., Laishram, J., Turco, A., Lonardonì, D., Prato, M., Scaini, D. and Ballerini, L. (2015) From 2D to 3D: Novel Nanostructured Scaffolds to Investigate Signalling in Reconstructed Neuronal Networks. *Scientific Reports* , 5, 9562.
130. Gerschenfeld HM, Paupardin-Tritsch D, Yakel JL. Muscarinic enhancement of the voltage-dependent calcium current in an identified snail neuron. *J Physiol.* 1991 Mar;434:85-105.

131. Golowasch J, Paupardin-Tritsch D, Gerschenfeld HM. Enhancement by muscarinic agonists of a high voltage-activated Ca²⁺ current via phosphorylation in a snail neuron. *J Physiol*. 1995 May 15;485 (Pt 1):21-8.
132. Bokisch AJ, Walker RJ. The ionic mechanism associated with the action of putative transmitters on identified neurons of the snail, *Helix aspersa*. *Comp Biochem Physiol C*. 1986;84(2):231-41.
133. Czerwiec E, de Backer JP, de Potter W, Vauquelin G. Selective masking of M1-receptors in calf retina membranes by the venom of the marine snail *Conus tessulatus*. *Neurochem Int*. 1993 Jul;23(1):79-85
134. Bai D, Sattelle DB. Muscarinic acetylcholine receptors on an identified motor neurone in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Neurosci Lett*. 1994 Jul 4;175(1-2):161-5
135. Bal T., Nagy F., Moulins M. Muscarinic modulation of a pattern-generating network: control of neuronal properties. . *J Neurosci*. 1994 May;14(5 Pt 2):3019-35.
136. Blake AD, Anthony NM, Chen HH, Harrison JB, Nathanson NM, Sattelle DB. .*Drosophila* nervous system muscarinic acetylcholine receptor: transient functional expression and localization by immunocytochemistry. *Mol Pharmacol*. 1993 Oct;44(4):716-24.
137. Trimmer BA, Weeks JC. Muscarinic acetylcholine receptors modulate the excitability of an identified insect motoneuron. *J Neurophysiol*. 1993 Jun;69(6):1821-36.
138. Cano Lozano V, Gauthier M. Effects of the muscarinic antagonists atropine and pirenzepine on olfactory conditioning in the honeybee. *Pharmacol Biochem Behav*. 1998 Apr;59(4):903-7.
139. Honda H, Tomizawa M, Casida JE. Insect muscarinic acetylcholine receptor: pharmacological and toxicological profiles of antagonists and agonists. *J Agric Food Chem*. 2007 Mar 21;55(6):2276-81.
140. Collingridge. G.L. and Lester. R.A. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev*. 1989, 41 (2). 143-210.
141. Madden DR. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Feb;3(2):91-101.
142. Ulas J, Weihmuller FB, Brunner LC, Joyce JN, Marshall JF, Cotman CW. Selective increase of NMDA-sensitive glutamate binding in the striatum of Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and mixed Parkinson's disease/Alzheimer's disease patients: an autoradiographic study. *J Neurosci* 1994;14:6317–24.
143. Hassoni AA, Chen ML, Sharma R, Walker RJ. The action of a series of glutamic acid analogues on *Helix* neuronal glutamate receptors. *Comp Biochem Physiol*. 1992, Vol101C(2):409-414
144. Walker RJ. The action of kainic acid and quisqualic acid on the glutamate receptors of three identifiable neurons from the brain of the snail *Helix aspersa*. *Comp Biochem Physiol* 1976,Vol 55-C(1):61-67
145. Moroz LL, Gyori J, Salanki J. NMDA-like receptors in the CNS of molluscs. *Neuroreport*. 1993, 4(2):201-4.
146. Kerkut, G.A., N. Horn, and R.J. Walker, Long-lasting synaptic inhibition and its transmitter in the snail *Helix aspersa*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1969. 30: p. 1061-1074.
147. Kerkut, G.A., C.B. Sedden, and R.J. Walker, The effect of dopa, α -methyldopa and reserpine on the dopamine content of the brain of the snail, *Helix aspersa* *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1966. 18: p. 921-930.
148. Walker, R.J., et al., The pharmacology of *Helix* dopamine receptor of specific neurons in the snail, *Helix aspersa*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1968. 24: p. 455-469.
149. Berry, M.S. and G.A. Cottrell, Excitatory, inhibitory and biphasic synaptic potentials mediated by an identified dopamine containing neuron. *Journal of Physiology*, 1975. 244: p. 589-612.
150. Aatre K., Xie J., Chen L.F., Abraham J.K, Varadan V.K. Synthesis of vertically aligned carbon nanotubes, magnetic nanotubes, and magnetic CNTs for cellular growth and detection, *Proc. SPIE* 6931, *Nanosensors and Microsensors for Bio-Systems* 2008, p. 69310F.
151. Rai P., Oh S., Shyamkumar P., Ramasamy M., Harbaugh R.E., Varadan V.K., Nano-biotextile sensors with mobile wireless platform for wearable health monitoring of neurological and cardiovascular disorders, *J. Electrochem. Soc.* 161 (2) (2014) B3116–B3150.

X. Anexos

X.1. Trabajos publicados como producto de esta tesis.

TRABAJOS PUBLICADOS “IN EXTENSO” EN REVISTAS REFERIADAS.

Juan Bernal-Martínez, Rafael Godínez-Fernández, Manuel Roman-Aguirre, Alfredo Aguilar-Elguezabal (2016). The electrical resistance of electrodes made of multi walled carbon nanotubes is modulated by nIR-laser. **Microelectronic Engineering 166 (2016) 45–49.**

Juan Bernal-Martínez, Alberto Seseña-Rubfiaro, Rafael Godínez-Fernández, Alfredo Aguilar-Elguezabal (2016). Electrodes made of multi-wall carbon nanotubes on PVDF-filters have low electrical resistance and are able to record electrocardiograms in humans. **Microelectronic Engineering 166 (2016) 10–14.**

Bernal-Martinez, J., Godínez-Fernández, R. and Aguilar-Elguezabal, A. (2017) Suitability of the Composite Made of Multi Wall Carbon Nanotubes-Polyvinylpyrrolidone for Culturing Invertebrate Helix aspersa Neurons. **Journal of Materials Science and Chemical Engineering, (2017) 5, 41-50.** <https://doi.org/10.4236/msce.2017.52005>

TRABAJOS PUBLICADOS EN CONGRESOS:

Juan Bernal-Martínez, Rafael Godínez-Fernández, Alfredo Aguilar-Elguezabal. Ultrastructural properties of multiwalled carbon nanotubes dispersed in ringer solution and their interaction with Helix aspersa neurons. International congress on applications and nanotechnology, **Icanano 2014, Mexico City, S40-018**

Juan Bernal-Martínez, Rafael Godínez-Fernández, Alfredo Aguilar-Elguezabal. Electrical and ultrastructural properties of electrodes made by multiwalled carbon nanotubes for recording bioelectrical signals. International congress on applications and nanotechnology, **Icanano 2014, Mexico City, S30-003**

J. Bernal-Martinez, R. Godinez-Fernandez and A. Aguilar Elguezabal. Multiwalled carbon nanotubes are incorporated into Paramecium by endocytosis and did not affect the survival of cells. **Amexcarb-Nov. 10-13, IPICYT, Mexico 2015, M-10.**

J. Bernal-Martinez, A. Seseña-Rubfiaro, R. Godinez-Fernandez and A. Aguilar Elguezabal. Electrodes made by Multiwalled carbon nanotubes on PVDF-filters have low resistance and are able to record electrocardiograms in humans. **Amexcarb-Nov.10-13, IPICYT, Mexico 2015, J-9.**

J. Bernal-Martinez, I.N. Serratos-Alvarez, R.Godinez-Fernandez and A. Aguilar Elguezabal. Multiwalled Carbon nanotubes bind to the cell membrane of neurons and did not block voltage-dependent calcium channels. **Amexcarb-Nov. 10-13, IPICYT, Mexico 2015, V-5.**

Juan Bernal-Martínez, Rafael Godínez-Fernández, Alfredo Aguilar-Elguezabal. Multi-walled carbon nanotubes bind to the cell membrane and did not affect muscarinic and I-glutamate receptors of 1F helix aspersa neuron", **NT-14; II Taller latinoamericano de materiales de carbono, TLMC2, November 2016, Chile.**

Juan Bernal-Martínez, Rafael Godínez-Fernández, Alfredo Aguilar-Elguezabal. Galvanotaxis in paramecium is modulated by functionalized and water-dispersable multi walled carbon nanotubes, **NT-13, II Taller Latinoamericano de Materiales de Carbono, TLMC-2, November 2016, Chile.**

Juan Bernal-Martínez, Rafael Godínez-Fernández, Alfredo Aguilar-Elguezabal. near-infrared laser

modulates the electrical resistance of electrodes made from multi walled carbon nanotubes. **NT-12; II Taller Latinoamericano de Materiales de Carbono, TLMC-2, November 2016, Chile.**

Juan Bernal-Martinez, Rafael Godinez-Fernandez and Alfredo Aguilar-Elguezabal. Suitability of the composite made of Multi wall carbon nanotubes + Polyvinylpyrrolidone for culturing invertebrate *Helix aspersa* neurons. Pacific Rim-biobased composite symposium. **Biocomp 2016: November 2016, Chile.**



Accelerated publication

The electrical resistance of electrodes made of multi walled carbon nanotubes is modulated by nIR-laser



Juan Bernal-Martínez^{a,*}, Rafael Godínez-Fernández^a, Manuel Roman-Aguirre^b, Alfredo Aguilar-Elguezabal^b

^a Biophysical Laboratory, Electrical Engineering Department, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, C.P.09340 D.F. México, Mexico

^b Department of Engineering and Chemistry of Materials, Centro de Investigación y Materiales Avanzados S.C. CIMAV, C.P. 31109 Chihuahua, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 May 2016

Received in revised form 24 September 2016

Accepted 27 September 2016

Available online 28 September 2016

Keywords:

Electrical resistance

Near infrared laser

Multi walled carbon nanotubes

Hyperthermia cancer treatment

ABSTRACT

In this paper we provide experimental evidence to demonstrate that multi walled carbon nanotubes (MWCNTs) are sensitive to laser irradiation and this stimulus reduces systematically their intrinsic electrical resistance. MWCNTs were obtained by spray pyrolysis, functionalized by acidic treatment, dispersed in water solution and deposited on different surface materials such as polyvinylidene fluoride (PVDF) filters, bond papers and glass-coverslips. Scanning electron microscopy studies were done to evaluate the dispersion and topographic distribution of MWCNTs deposited on PVDF filters. In addition, we measured the electrical resistance of MWCNTs in control conditions and when a continuous near infrared (nIR) laser beam at 650 nm, was applied. MWCNTs showed a consistent value of electrical resistance depending on the amount of nanotubes applied. The average resistance of the MWCNTs on PVDF filters was as follows (in ohms): 23.78, 307.55 and 22,750 at 1, 1:10 and 1:100 dilutions of stock solution (5 mg/mL), respectively. After the application of nIR-laser, the electrode resistance was transiently reduced by approximately 10% to 45%. In addition, a small increase of temperature (from 0.20 to 3.20 °C) was observed during laser irradiation. Our results presented here, support the hypothesis that nIR-Laser irradiation of MWCNTs modulates with high sensitivity the intrinsic electrical and thermal properties of MWCNTs. Therefore, the laser irradiation on MWCNTs could be synergistically applied in the biomedical field as a therapeutic alternative for hyperthermia cancer treatment.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

After carbon nanotubes (CNTs) were discovered in 1991 [1], there has been producing an exponential growth of research on these nano-materials, resulting in many applications, including electronics, biosensors and mostly for the biomedical field [2,3,4]. CNTs are hollow cylinders made of one single-walled CNT (SWCNT) or several, multi-walled CNT (MWCNTs) layers of graphene. They can be obtained by different methods such as: chemical vapour deposition (CVD), spray-pyrolysis, laser ablation and arc-discharge. Recent advances in the application of CNTs for hyperthermia ablation of tumors have been reported [2,3,29–33]. CNT scaffolds promote growth, differentiation, and survival of neurons and they modify their electrophysiological properties and have the potential for the development of innovative nanomaterials for neurological implants [4]. CNTs have been identified as good electrical conductive materials. Films made of CNTs show good conductivity. In some experimental conditions they show superconductivity and a ballistic conduction could be expected [5–9]. Dispersed CNTs have been applied on several materials such as paper, glass and cellulose or have

been associated with other polymeric materials for specific composites in order to use them as electro-conductive materials [10–21]. Synthesis and characterization of MWCNTs/PVDF nanocomposite and its electrical studies has been reported [10]. Carbon nanotubes deposited on papers to prepare “buckypapers” for different applications, have been reported for several authors [11–14]. Another type of nano-composite made of carbon nanotubes with polydimethylsiloxane (PDMS), have been reported for micropatterning, microfabrication of MEMS or microfluidics applications [15–20] and for 3D scaffolds for neuronal tissue as well [21].

Laser stimulation in the range of near infrared (nIR) region (from 650 to 1064 nm) has been used to stimulate samples or composites that contain CNTs [45–47]. Baldor et al., performed temperature measurements of CNTs using infrared thermography in controlled conditions and when CNTs were irradiated with nIR-laser of 1064 nm. They observed an increase of temperature after laser irradiation [45]. Aliev et al., demonstrated that MWCNTs sheets exhibit thermal conductivity after laser irradiation [45]. Stokes et al., reported a photo response in a large area of MWCNTs/polymer nanocomposite film [46]. Ichkitidze et al., suggested that laser stimulation increased the electroconductivity of composite layers with MWCNTs [47]. However, the electrical resistance of the MWCNTs deposited on different materials or composites,

* Corresponding author.

E-mail address: djuanbernal@hotmail.com (J. Bernal-Martínez).

has not been systematically measured when the nIR-laser stimulation is applied.

In this paper we report a consistent decreased of the electrical resistance of MWCNTs during the time the nIR-laser irradiation was applied. This reduction of the electrode resistance was transient, because after the end of the laser exposure, the electrode resistance was recovered close to the original values. We obtained similar results irrespective of the type of electrode surface used (PVDF-filters, bond-papers and glass coverslips) or the quantity of MWCNTs applied. A small increase of temperature of the MWCNTs electrodes, from 0.2 to 3.2 °C, was also observed during the nIR-laser exposure.

2. Experimental details

MWCNTs were synthesized and prepared by spray pyrolysis, according with the method described by Aguilar et al. [49]. MWCNTs were functionalized by acidic treatment (4 M HNO₃ and 4 M H₂SO₄, 3:1 volume ratio). Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) from Sigma-Aldrich, was utilized as a dispersant for MWCNTs. 1 g of PVP-40 was added in a vial containing 20 mL of deionised water. It was magnetically stirred for 30 min, and then 100 mg of dried and functionalized MWCNTs were applied and mixed by magnetic stirring for another 30 min. The vial containing the MWCNTs dispersed on PVP-40 was sonicated for 30 min (VWR-International, ultrasonic cleaner model 50 T). All these experiments were conducted at room temperature.

The preparation of MWCNTs electrodes was done as follows: MWCNTs stock solution (5 mg/mL) was diluted in deionised water at different dilutions (1:10, 1:100 and 1:1000). Then, the final concentration of MWCNTs deposited was 0.5, 0.05 and 0.005 mg/mL, respectively. 2 mL of MWCNTs at different dilutions, were delivered to a Millipore Swinnex filter holder (25 mm diameter) containing Polyvinylidene fluoride (PVDF) filters (0.45 µm pore size). MWCNTs collected in the PVDF filters, were dried at 60 °C for 30 min. In preparing MWCNT electrodes on bond paper, 200 µL of MWCNTs stock solution was applied to the surface of a Xerox bond paper disc of 25 mm diameter. Then, they were dried in a convection oven at 60 °C for 30 min. To prepare MWCNTs electrodes on a circular glass coverslip, 50 µL of the stock and diluted MWCNTs solutions (1:10, 1:100) were applied to a glass coverslip disc of 12 mm diameter and were dried in a convection oven at 60 °C for 30 min.

To study the topographic distribution of MWCNTs deposited on PVDF filters, we used high resolution field emission scanning electron microscope (FESEM), Model JSM 5800 with accelerating voltage (ACCV) of 15 kV and magnifications between 1000× and 40 000×. In order to avoid electric charge produced by electron discharge over the MWCNTs-PVDF electrodes, they were coated with gold using a Denton Vacuum Desk II sputtering device.

The measurements of electrical properties of MWCNTs deposited in different materials were done by using two metal gold electrodes, with intrinsic resistance of 0.0001 Ω. The electrodes were mounted in a plexiglass holder, with pressure controlled springs to maintain the permanent contact with the electro-conductive materials. The electrodes were located 5 mm of distance between each other. The resistance was measured every 3 s over a 4.5 min by using an Agilent 34970A multimeter. This instrument features a 6 1/2 digit multimeter which is capable of making accurate and stable measurements.

A near infrared laser (nIR-laser) (Lazerpoint, SKU 5074621 Model Laser 900) with 650 nm wavelength and 500 mW nominal power, was used to stimulate the MWCNTs electrodes. The device was set at an angle of 47° and the distance between the MWCNTs sample and the laser device was 170 mm. The spot of the laser beam was 3 mm in diameter. The measurements of resistance were done at room temperature (21.5 °C).

The temperature measurements of MWCNTs applied on the surface of different materials were done by using a Fluka-61 Infrared-thermometer, which provides quick non-contact temperature measurements

and an easy targeting with bright laser beam. This device has a spot diameter of 1–2 mm and 0.2 °C temperature resolution. The red light spot of the infrared thermometer was allocated in the same point of the nIR-Laser-650 nm spot. For these experiments, the laser device was set at an angle of 47° and the distance between the MWCNTs samples and laser was 170 mm. The infrared thermometer was positioned at 90° and 200 mm from the MWCNTs samples.

3. Results and discussion

Fig. 1 shows the distribution of MWCNTs at different dilutions: 1, 1:10, 1:100 and 1:1000 applied on PVDF filters, observed with FESEM microscope. As it can be seen in all panels of this Fig. 1, the MWCNTs were all randomly dispersed with no particular alignment on the filters. The density of MWCNTs trapped in the PVDF filters decreased with MWCNTs concentration.

The resistance of MWCNTs applied on PVDF filters was measured as a function of time. In all experiments performed, there was no significant change in resistance over a period before the laser was applied, defined as control conditions. In such control conditions, an average resistance of 23.78, 307.55 and 22,750 Ω ($n = 30$) was measured at 1, 1:10 and 1:100 MWCNTs dilution, respectively (see Fig. 2A, B and C). The resistance of the MWCNTs at 1:1000 dilutions was not possible to be read, because it was probably too high and the recording system was saturated. Immediately after nIR-laser was applied on the MWCNTs samples, the resistance value of MWCNTs decreased (Fig. 2A, B and C). The percentage of resistance reduction during the laser exposure was –15.7%, –10.8% and –8.6% at MWCNTs at 1, 1:10 and 1:100 dilutions, respectively (see Fig. 2A,B and C). It was observed that while the MWCNTs were more concentrated, the reduction of the resistance upon the laser application was higher. The resistance reduction was observed to be transient and reversible. After the laser was turned off, the resistance value was recovered to almost 100%. Thus, the percentage of resistance recovery after laser exposure was of 93%, 96.7% and 97.7% at MWCNTs 1, 1:10 and 1:100 dilutions, respectively. (see Fig. 2A,B and C).

The electrical resistance of MWCNTs on glass coverslip and bond-paper, before and after nIR-laser irradiation, was also studied. nIR-laser was applied on MWCNTs deposited over the surface of bond-paper and glass coverslip. It was observed that the resistance decreased immediately after the laser was applied. The reduction of the resistance value upon laser application, was approximately 25–40% of the control conditions without laser stimulation. However, the recovery of the

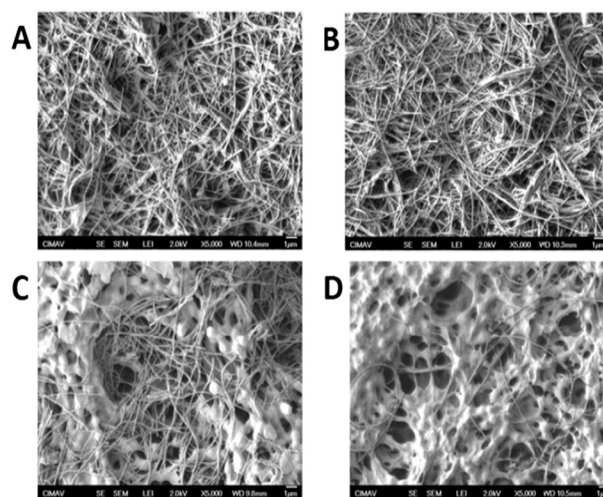


Fig. 1. Scanning Electron Microscopy studies to identify at different dilutions, the topographic distribution of MWCNTs applied on PVDF filters: A, 1; B, 1:10; C, 1:100 and D, 1:1000 dilutions from the 5 mg/mL MWCNTs stock solution. The magnification in four pictures is 5000× and scale bar is 1 µm.

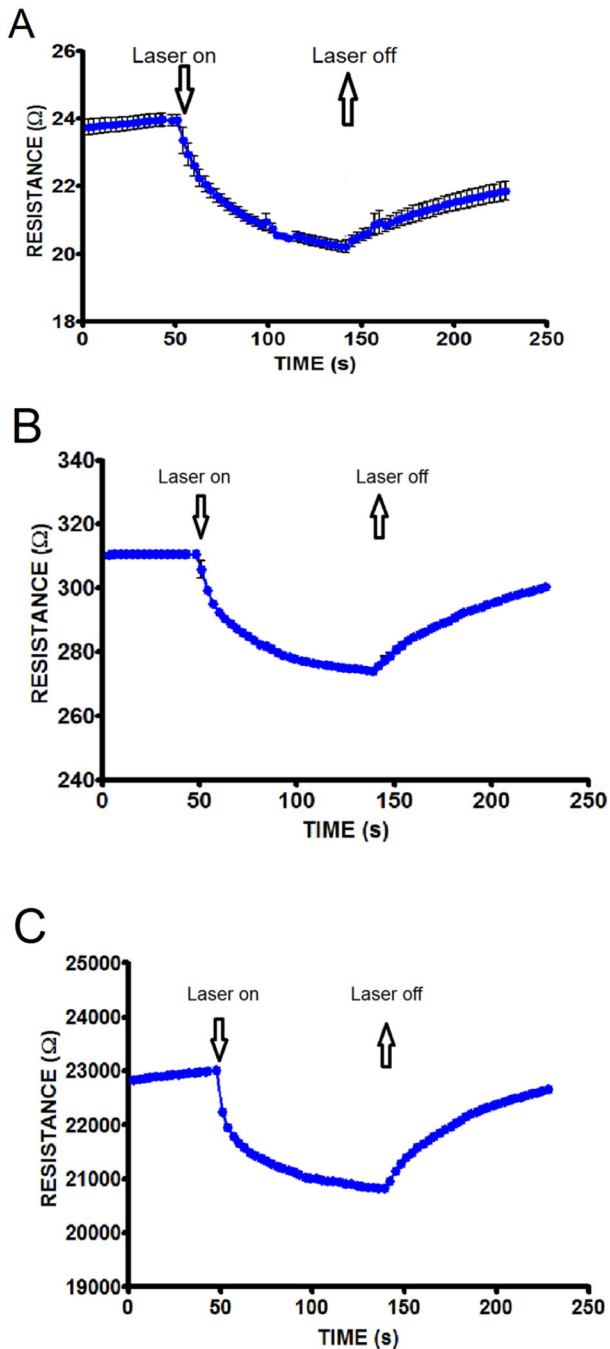


Fig. 2. Effect of nIR-laser irradiation on the electrical resistance of MWCNTs deposited on the surface of PVDF filters. Here are plotted the resistance values (in ohms) versus the time (s), in control conditions, during and after laser application. MWCNTs concentration is 5 mg/mL (A), 0.5 mg/mL (B) and 0.05 mg/mL (C). Points are the average of 3 experiments. Bars are the standard deviation.

laser effect was lower and slower compared with the MWCNTs deposited on PVDF filters (see Fig. 2).

Such recovery of resistance was below 30% of the control (see Fig. 3). Similar results were reproducible in three different experiments when MWCNTs were deposited over the surface of bond-paper and glass coverslip.

The nIR-laser-650 nm irradiation increased the temperature of MWCNTs deposited on different surface-electrodes. Temperature measurements of MWCNTs deposited on PVDF-filters, bond-paper and glass coverslip were done during nIR-laser application. It was observed a

systematic increase of temperature of the MWCNTs deposited on different materials in the range from 0.2 to 3 °C. Such increase of temperature of MWCNTs exposed to nIR-laser, was dependent on the MWCNTs concentration. The temperature of MWCNTs from the stock solution (5 mg/mL) was higher compared with the samples prepared with diluted MWCNTs (see Fig. 4).

As it has been demonstrated in the experimental results presented here, the nIR-laser irradiation on MWCNTs reduced systematically the electrical resistance and consequently improves the conductivity of MWCNTs, no matter which material is used as surface electrode (PVDF-filter, bond-paper or glass coverslip). The amount of MWCNTs deposited on the PVDF-filters and on glass coverslip is a critical parameter that affects the reduction of the electrical resistance produced by laser stimulation. At higher MWCNTs concentration, a higher reduction of electrical resistance is observed (Fig. 2). This reduction of electrical resistance could be expected because the MWCNTs have a highly connected structure and probably they are reoriented along the electric field during laser application.

The fact that nIR-laser irradiation applied on MWCNTs reduces systematically their electrical resistance and increases the temperature of these MWCNTs, it can be explained in two different ways. First, because a bolometer is a device that can detect infrared radiation through a change in their electrical resistance [34,35], the data reported here allowed us to speculate that MWCNTs-electrodes are absorbing the infrared radiation and are acting as bolometers. Second, the bolometric effect is defined as the change of resistance, due to the heating of a specific material-network when electromagnetic radiation, such as nIR-laser irradiation, is applied [39,40,41,42]. The argument that the effect of nIR-laser irradiation on MWCNTs can be explained as bolometric effect is reasonable considering the following facts: i) Carbon nanotubes have extremely high absorption coefficient (104 to 105 cm^{-1}) over a wide spectrum extending from ultraviolet to far-infrared region [36,37]. ii) Carbon nanotubes exhibit strong thermal response to electromagnetic laser radiation as evidenced by the increase of temperature [36,39,40,41,42,45–48]. iii) The results reported here show a reduction of the electrical resistance of MWCNTs-electrodes (Figs. 2 and 3) along with the increment of their temperature (Fig. 4), when a nIR-laser irradiation was applied. Therefore, we could explain these results as bolometric effect.

The MWCNTs treated with the nIR-laser-650 nm irradiation showed a modest but systematic increase of temperature between 0.2 and 3.6 °C. These results presented here, are in accordance with previous reports, in the sense that nIR-laser increases the temperature of carbon nanomaterials [45,46,47,48]. The small increase of temperature reported here, can be explained because we only used one single nIR-laser device, with low potency (0.5 W), compared with other researches that used four laser devices with 650 nm at the same time and high potency up to 3 W [45] and because the area of MWCNTs irradiated with nIR-laser in the experiments reported here was relatively small (< 3 mm), compared with larger area (> 10 cm) reported by others [47].

Hyperthermia, also called thermal therapy or thermotherapy, is a type of cancer treatment in the oncology field, in which the body tissue is exposed to high temperature. Hyperthermia can be applied by the administration of heat in various ways and from different sources and is generally applied as a complement of conventional therapies such as radiotherapy and chemotherapy [22,23]. The reason for the use of hyperthermia in the treatment of cancer disease is that cancer-tumor cells are very sensitive to heat and they die at temperatures in the range of 42–45 °C, with minimal injury to normal tissues [23]. The thermal therapies have employed a variety of heat sources including: laser light [24,25,26]; magnetic hyperthermia [27]; radiofrequency [28] and others. The hyperthermia induced by laser light is defined as “laser hyperthermia”. Carbon nanotubes applied inside the tumors and coupled with near infrared laser irradiation have been used to induce “laser hyperthermia” as a treatment for cancer disease [29–33].

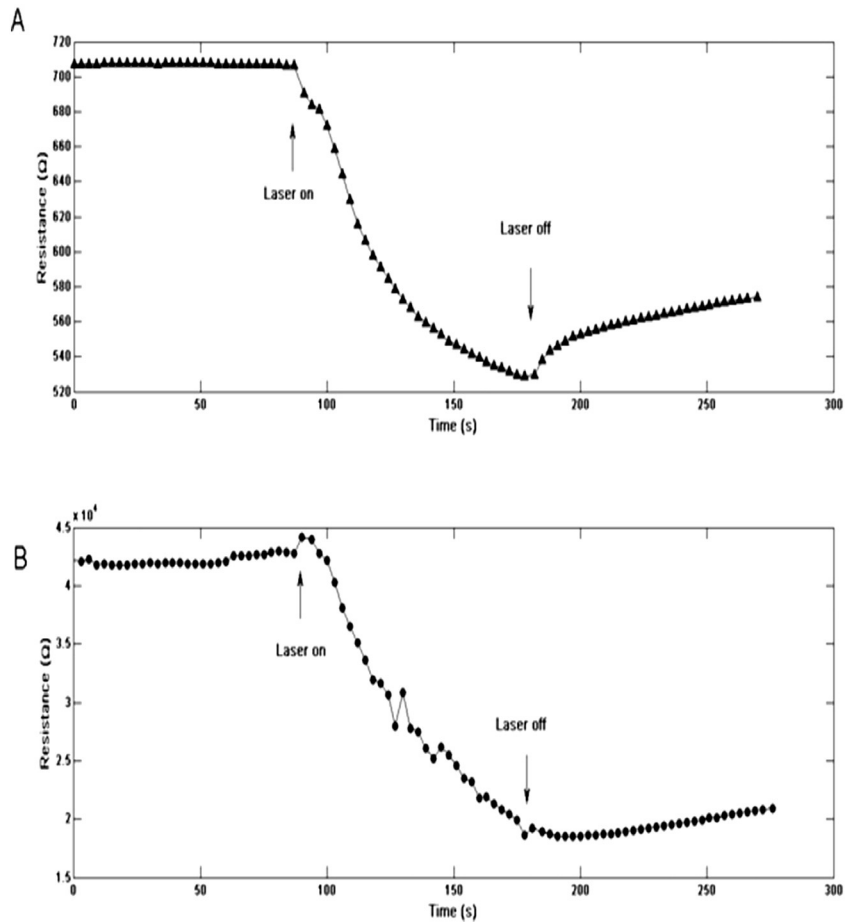


Fig. 3. Effect of nIR-laser irradiation on the electrical resistance of MWCNTs deposited on bond paper (A) and on glass coverslip (B).

Considering that carbon nanotubes have very high laser absorbance in the near infrared (nIR) spectrum [37,38], while biological tissues do not have [43], it has been suggested that nIR-laser irradiation is passing the different skin layers to reach the subdermal area, without damage the tissue [44]. The results presented in this work support the hypothesis that functionalized MWCNTs, obtained by spray pyrolysis and dispersed in aqueous solution, are high sensitive to nIR-laser stimulation and eventually these nanotubes could be used for hyperthermia treatment in the sub-dermal tumors, such as melanoma. To improve and to optimize this hyperthermia treatment in future experiments, MWCNTs should be stimulated with larger wave length lasers (from 850 to

1064 nm) and with more potency (from 0.5 to 4 W), as it has been done by other researches [45–48].

4. Conclusion

In this paper we report an easy method to characterize the high sensitivity of MWCNTs to respond to near infrared (nIR) laser irradiation. The MWCNTs used in this work were obtained by spray pyrolysis, functionalized with acidic treatment and efficiently dispersed in aqueous media by using a non-ionic polymer such as Polyvinylpyrrolidone. Scanning electron microscopy studies were done to evaluate the dispersion and topographic distribution of MWCNTs deposited on PVDF filters. In addition, we measured the electrical resistance of the MWCNTs deposited on PVDF filters at different dilutions of the stock solution (5 mg/mL). Thus, the resistance of MWCNTs on PVDF filters was as follows (in ohms): 23,78, 307,55 and 22,750 at 1, 1:10 and 1:100 dilutions, respectively. When a continuous nIR-laser beam at 650 nm was applied to MWCNTs-electrode, the electrode resistance was transiently reduced by approximately 10% to 40%. Above all, a small increase of temperature (up to 3.20 °C) was observed during laser irradiation. In conclusion, in this paper we provide experimental evidence to demonstrate that MWCNTs are highly sensitive to nIR-laser irradiation because this nIR-laser stimulus reduces systematically their intrinsic electrical resistance of the MWCNTs, no matter the amount of MWCNTs that is used, neither the surfaces on which the MWCNTs were deposited. This high sensitivity of MWCNTs to nIR-laser irradiation expressed by the reduction of the electrical resistance should be evaluated for other researchers before they pretend to use the MWCNTs for biomedical applications, such as nIR-laser hyperthermia for cancer treatment.

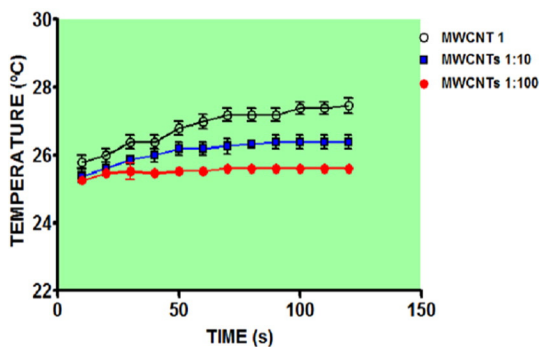


Fig. 4. Effect of nIR-Laser irradiation on the temperature of MWCNTs deposited on PVDF-filters at concentrations of 5, 0.5 and 0.05 µg/mL. The symbols represent the average of 3 experiments and the bars are standard deviations.

Acknowledgement

Juan Bernal-Martínez received a fellowship from The National Council of Science and Technology of Mexico (Conacyt-Mexico) to support this study. The authors are thankful to Alberto Seseña-Rubfiaro, for the technical assistance in elaborating the figures and to Wilber Antunez for the technical assistance in the electron microscopy studies. Authors are also thankful to Teresa Villalobos and Emmanuel Bernal for the critical review of the manuscript.

References

- [1] S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature* 354 (1991) 56–58.
- [2] J. Verma, S. Lal, C.J. Van Noorden, Nanoparticles for hyperthermic therapy: synthesis strategies and applications in glioblastoma, *Int. J. Nanomedicine* 10 (9) (2014) 2863–2877.
- [3] A.M. Elhissi, W. Ahmed, I.U. Hassan, V.R. Dhanak, A. D'Emanuele, Carbon nanotubes in cancer therapy and drug delivery, *J. Drug Deliv.* 2012 (2012) 837327.
- [4] A. Fabbro, G. Cellot, M. Prato, L. Ballerini, Interfacing neurons with carbon nanotubes: (re)engineering neuronal signaling, *Prog. Brain Res.* 194 (2011) 241–252.
- [5] Y. Zhang, F. Ronning, K. Gofryk, N.A. Mara, N. Haberkorn, G. Zou, H. Wang, J.H. Lee, E. Bauer, T.M. McCleskey, A.K. Burell, L. Civalo, Y.T. Zhu, Q. Jia, Aligned carbon nanotubes sandwiched in epitaxial NbC film for enhanced superconductivity, *Nanoscale* 7 (4(7)) (2012) 2268–2271.
- [6] N. Murata, J. Haruyama, J. Reppert, A.M. Rao, T. Koretsune, S. Saito, M. Matsudaira, Y. Yagi, Superconductivity in thin films of boron-doped carbon nanotubes, *Phys. Rev. Lett.* 11 (101(2)) (2008) 027002.
- [7] C. Berger, P. Poncharal, Y. Yi, W. de Heer, Ballistic conduction in multiwalled carbon nanotubes, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 3 (1–2) (2003) 171–177.
- [8] B.Q. Wei, R. Vajtai, P.M. Ajayan, Reliability and current carrying capacity of carbon nanotubes, *Appl. Phys. Lett.* 79 (2001) 1172.
- [9] A.Y. Kasimov, R. Deblock, M. Kociak, B. Reulet, H. Bouchiat, I.I. Khodos II, Y.B. Gorbatov, V.T. Volkov, C. Journet, M. Burghard, Supercurrents through single-walled carbon nanotubes, *Science* 284 (5419) (1999) 1508–1511.
- [10] F.M. Anjalín, Synthesis and characterization of MWCNTs/PVDF nanocomposite and its electrical studies, *Der Pharm. Chem.* 6 (1) (2014) 354–359.
- [11] A.M. Díez-Pascual, D. Gascón, Carbon nanotube buckypaper reinforced acrylonitrile-butadiene-styrene composites for electronic applications, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5 (22) (2013) 12107–12119.
- [12] D. Wang, P. Song, C. Liu, W. W. S. Fan, Highly oriented carbon nanotube papers made of aligned carbon nanotubes, *Nanotechnology* 19 (2008) 075609 6pp.
- [13] H. L., C. J.W., Y. Y., J. S., L.M. F., C. L.F. C. Y., Highly conductive paper for energy-storage devices, *PNAS* 106 (51) (2009) 21490–21494.
- [14] J. Kim, S. Yun, S.K. Mahadeva, K. Yun, S.Y. Yang, M. Maniruzzaman, Paper actuators made with cellulose and hybrid materials, *Sensors* 10 (2010) 1473–1485.
- [15] A. Khosla, B.L. Gray, Preparation, characterization and micromolding of multi-walled carbon nanotube polydimethylsiloxane conducting nanocomposite polymer, *Mater. Lett.* 63 (13) (2009) 1203–1206.
- [16] A. Khosla, B.L. Gray, Preparation, micro-patterning and electrical characterization of functionalized carbon-nanotube polydimethylsiloxane nanocomposite polymer, *Macromolecular Symposia*, Vol. 297. 1, WILEY-VCH Verlag, 2010.
- [17] A. Khosla, Micropatternable Multifunctional Nanocomposite Polymers for Flexible Soft MEMS Applications, Diss. Applied Science, School of Engineering Science, 2011 <http://summit.sfu.ca/item/12017>.
- [18] A. Khosla, Nanoparticle-doped electrically-conducting polymers for flexible nano-micro systems, *Electrochem. Soc. Inter.* 21 (3–4) (2012) 67–70.
- [19] A. Khosla, D. Hilbich, C. Drewbrook, D. Chung, B.L. Gray, Large scale micropatterning of multi-walled carbon nanotube/polydimethylsiloxane nanocomposite polymer on highly flexible 12 × 24 in. substrates, In *SPIE MOEMS-MEMS* (pp. 79260L–79260L), International Society for Optics and Photonics, 2011, February.
- [20] A. Khosla, B.L. Gray, Fabrication of multiwalled carbon nanotube polydimethylsiloxane nanocomposite polymer flexible microelectrodes for microfluidics and MEMS, *SPIE Smart Structures and Materials + Nondestructive Evaluation and Health Monitoring* (pp. 76421V–76421V), International Society for Optics and Photonics, 2010, March.
- [21] S. Bosi, R. Rauti, J. Laishram, A. Turco, D. Lonardoní, T. Nieuw, M. Prato, D. Scaini, L. Ballerini, From 2D to 3D: novel nanostructured scaffolds to investigate signalling in reconstructed neuronal networks, *Sci. Report.* 5 (2015 Apr 24) 9562, <http://dx.doi.org/10.1038/srep09562>.
- [22] B. Hildebrandt, P. Wust, O. Ahlers, A. Dieing, G. Sreenivasa, T. Kerner, R. Felix, H. Riess, The cellular and molecular basis of hyperthermia, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 43 (1) (2002 Jul) 33–56.
- [23] J. van der Zee, Heating the patient: a promising approach? *Ann. Oncol.* 13 (8) (2002 Aug) 1173–1184.
- [24] S.J. Fahrenholtz, T.Y. Moon, M. Franco, D. Medina, S. Danish, A. Gowda, A. Shetty, F. Maier, J.D. Hazle, R.J. Stafford, T. Warburton, D. Fuentes, A model evaluation study for treatment planning of laser-induced thermal therapy, *Int. J. Hyperther.* 31 (7) (2015) 705–714.
- [25] M.I. Tribelsky, Y. Fukumoto, Laser heating of dielectric particles for medical and biological applications, *Biomed. Opt. Express.* 7 (7) (2016 Jun 23) 2781–2788.
- [26] E.C. Leuthardt, C. Duan, M.J. Kim, J.L. Campian, A.H. Kim, M.M. Miller-Thomas, J.S. Shimony, D.D. Tran, Hyperthermic laser ablation of recurrent glioblastoma leads to temporary disruption of the peritumoral blood brain barrier, *PLoS One* 11 (2) (2016 Feb 24) e0148613.
- [27] R.V. Stigliano, F. Shubitidze, A.A. Petryk, J.A. Tate, P.J. Hoopes, Magnetic nanoparticle hyperthermia: predictive model for temperature distribution, *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* 8584 (2013 Feb 26) 858410.
- [28] T. Vanagas, A. Gulbinas, J. Pundzius, G. Barauskas, Radiofrequency ablation of liver tumors (II): clinical application and outcomes, *Med. (Kaunas)*. 46 (2) (2010) 81–88 Review. PubMed PMID: 20440080.
- [29] T. Mocan, C.T. Matea, I. Cojocaru, I. Ilie, F.A. Tabaran, F. Zaharie, C. Iancu, D. Bartos, L. Mocan, Photothermal treatment of human pancreatic cancer using PEGylated multi-walled carbon nanotubes induces apoptosis by triggering mitochondrial membrane depolarization mechanism, *J. Cancer* 5 (8) (2014 Sep 5) 679–688.
- [30] C. Iancu, L. Mocan, Advances in cancer therapy through the use of carbon nanotube-mediated targeted hyperthermia, *Int. J. Nanomedicine* 6 (2011) 1675–1684.
- [31] R. Singh, S.V. Torti, Carbon nanotubes in hyperthermia therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (15) (2013) 2045–2060.
- [32] S. Ghosh, S. Dutta, E. Gomes, D. Carroll, R. D'Agostino Jr., J. Olson, M. Guthold, W.H. Gmeiner, Increased heating efficiency and selective thermal ablation of malignant tissue with DNA-encased multiwalled carbon nanotubes, *ACS Nano* 3 (9) (2009 Sep 22) 2667–2673.
- [33] A. Burke, X. Ding, R. Singh, R.A. Kraft, N. Levi-Polyachenko, M.N. Rylander, C. Szot, C. Buchanan, J. Whitney, J. Fisher, H.C. Hatcher, R. D'Agostino Jr., N.D. Kock, P.M. Ajayan, D.L. Carroll, S. Akman, F.M. Torti, S.V. Torti, Long-term survival following a single treatment of kidney tumors with multiwalled carbon nanotubes and near-infrared radiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (31) (2009 Aug 4) 12897–12902.
- [34] S.P. Langley, The bolometer, *Nature* 25 (627) (1981) 14–16.
- [35] P.L. Richards, Bolometers for infrared and millimeter waves, *J. Appl. Phys.* 76 (1994) 1.
- [36] A.M. Schrand, B.M. Stacy, S. Payne, L. Dosser, S.M. Hussain, Fundamental examination of nanoparticle heating kinetics upon near infrared (NIR) irradiation, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 3 (10) (2011 Oct) 3971–3980.
- [37] V.J. Gokhale, O.A. Shenderova, G.E. McGuire, M. Rais-Zadeh, Infrared absorption properties of carbon nanotube/nanodiamond based thin film coatings, *J. Microelectromech. Syst.* 23 (1) (2014) 191–197.
- [38] M.E. Itkis, S. Niyogi, M.E. Meng, M.A. Hamon, H. Hu, R.C. Haddon, Spectroscopic study of the Fermi level electronic structure of single-walled carbon nanotubes, *Nano Lett.* 2 (2) (2002) 155–159.
- [39] A. Gohier, A. Dhar, L. Gorintin, P. Bondavalli, Y. Bonnassieux, C.S. Cojocaru, All-printed infrared sensor based on multiwalled carbon nanotubes, *Appl. Phys. Lett.* 98 (2011) 063103.
- [40] S. Zhang, L. Cai, T. Wang, R. Shi, J. Miao, L. Wei, Y. Chen, N. Sepúlveda, C. Wang, Bolometric-effect-based wavelength-selective photodetectors using sorted single chirality carbon nanotubes, *Sci. Report.* 5 (2015 Dec 8) 17883.
- [41] M.E. Itkis, F. Borondics, A. Yu, R.C. Haddon, Bolometric infrared photoresponse of suspended single-walled carbon nanotube films, *Science* 312 (2006) 413–416.
- [42] T.J. Simmons, G. Vera-Reveles, G. Gonzalez, J.M. Gutierrez-Hernandez, R.J. Linhardt, H. Navarro-Contreras, GonzalezFJ, Bolometric properties of semiconducting and metallic single-walled carbon nanotube composite films, *ACS Photonics* Jan 2015, pp. 334–340.
- [43] L. Picou, C. McMann, P.H. Elzer, F.M. Enright, A.S. Biris, D. Boldor, Spatio-temporal thermal kinetics of in situ MWCNT heating in biological tissues under NIR laser irradiation, *Nanotechnology* 21 (43) (2010 Oct 29) 435101.
- [44] Z. Chen, W. Sun, H.J. Butt, S. Wu, Upconverting-nanoparticle-assisted photochemistry induced by low-intensity near-infrared light: how low can we go? *Chemistry* 21 (25) (2015 Jun 15) 9165–9170.
- [45] D. Boldor, G. N.M., M. W.T., P. J.H., L. Z. B. A.S., Temperature measurement of carbon nanotubes using infrared thermography, *Chem. Mater.* 20 (12) (2008) 4011–4016.
- [46] A.E. Aliev, M.H. Lima, E.M. Silverman, R.H. Baughman, Thermal conductivity of multi-walled carbon nanotube sheets: radiation losses and quenching of phonon modes, *Nanotechnology* 21 (2010) 035709 11 pp.
- [47] P. Stokes, L. Liu, J. Zou, L. Zhai, Q. Huo, S.I. Khondaker, Photoresponse in large area multiwalled carbon nanotube/polymer nanocomposite films, *Appl. Phys. Lett.* 94 (2009) 042110.
- [48] L.P. Ichkitidze, V.M. Podgaetskyl, S. S.V., B. E.V., G. V.A., S. Y.P., Laser stimulation the electroconductivity of composite layers with multiwalled carbon nanotubes, *Proceedings of the International Conference Nanomaterials: Applications and Properties*, Vol. 2 No 3, 03NCNN552pp.
- [49] E.A. Aguilar, W. Antunez, G. Alonso, D.F. Paraguay, F. Espinosa, Y.M. Miki, Study of carbon nanotubes synthesis by spray pyrolysis and model of growth, *Diam. Relat. Mater.* 15 (9) (2006) 1329.

Suitability of the Composite Made of Multi Wall Carbon Nanotubes-Polyvinylpyrrolidone for Culturing Invertebrate *Helix aspersa* Neurons

Juan Bernal-Martinez^{1*}, Rafael Godínez-Fernández¹, Alfredo Aguilar-Elguezabal²

¹Biophysical Laboratory, Electrical Engineering Department, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México City, México

²Department of Engineering and Chemistry of Materials, Centro de Investigación y Materiales Avanzados S.C., Chihuahua, México

Email: *drjuanbernal@hotmail.com

How to cite this paper: Bernal-Martinez, J., Godínez-Fernández, R. and Aguilar-Elguezabal, A. (2017) Suitability of the Composite Made of Multi Wall Carbon Nanotubes-Polyvinylpyrrolidone for Culturing Invertebrate *Helix aspersa* Neurons. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, 5, 41-50.

<https://doi.org/10.4236/msce.2017.52005>

Received: January 7, 2017

Accepted: February 14, 2017

Published: February 17, 2017

Copyright © 2017 by authors and Scientific Research Publishing Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Carbon nanotubes have been used as scaffolds for tissue engineering. However, the identification of these nanomaterials disperses in biological solutions and their direct interaction with nerve cells is still controversial. The aim of this work is to characterize the topographic and ultra-structural distribution of the composite made of multi wall carbon nanotubes-polyvinylpyrrolidone (MWCNTs-PVP) deposited on the *Helix aspersa* neurons and over glass coverslip. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Confocal Microscopy (CM) studies were done to analyze the properties of such MWCNTs-PVP composite. The cerebral ganglion of *Helix aspersa* was treated and incubated with MWCNTs-PVP, fixing it in paraformaldehyde at 4% and was observed with SEM and CM. Although the nanotubes were not labeled or stained with fluorescent compounds, the MWCNTs-PVP deposited on glass and on nerve cells, was observed by the confocal microscope in the reflection mode. In SEM studies, it was observed that MWCNTs-PVP was attached to the surface on neurons. Moreover, in CM studies, it was possible to observe that MWCNTs-PVP was attached to the neuronal membrane, crossing the cell membrane and getting into the cytoplasm. These results support the hypothesis that carbon nanotubes interact with the neuronal cell membrane and can be useful for neuronal tissue engineering. In addition, these results open new alternatives for toxicological studies, in order to elucidate the cytotoxicity of MWCNTs-PVP composite in neurons and other excitable cells.

Keywords

Multi Wall Carbon Nanotubes, Functional Scaffolds, Neurons, *Helix aspersa*, Tissue Engineering, Brain Repair

1. Introduction

It has been proposed that carbon nanotubes are good scaffolds for cell culture, tissue engineering and tissue repair [1] [2] [3]. However, there are controversial reports about the toxicity of carbon nanotubes and the suitability of such nanomaterials as functional scaffolds [4]-[10]. Kim *et al.* [4] reported that multi wall carbon nanotubes induced DNA damage and cytotoxicity in male's human peripheral blood lymphocytes. Montes-Fonseca *et al.* [5] found cytotoxicity of functionalized carbon nanotubes in J774A macrophages. Sachar *et al.* [6] reported a cytotoxic effect of single wall carbon nanotubes (SWCNTs) on erythrocytes *in vitro* and *in vivo*. On the other hand, Professor Ballerini and her group made an elegant work in which they reported that MWCNTs were bio-compatible scaffolds for growing neuronal and myocardial mammalian cells [7] [8] [9] [10]. Fabbro *et al.* [7] [8] found that the adhesion to carbon nanotube conductive scaffolds forced the action-potential appearance in immature rat's spinal neurons; these findings allowed them to propose that carbon nanotubes could be used for neuroregeneration and repair. Recently, Bosi *et al.* [10] reported the elaboration of 3D nanostructured scaffolds to investigate signaling in reconstructed neuronal networks. Moreover, Martinelli *et al.* [9] reported that cardiac myocytes were cultured in carbon nanotubes' platforms and these nanotubes improved the cardiac myocytes' performance.

Pristine carbon nanotubes have hydrophobic properties and are difficult to disperse in biological aqueous solutions [11]. Polyvinylpyrrolidone (PVP) at different molecular weights, has been used as a dispersant for SWCNTs as well as MWCNTs, based on its non-toxicity and high compatibility with carbon nanomaterials [12] [13] [14] [15]. MWCNTs as well as SWCNTs have been labeled with fluorescent compounds in order to identify them in isolated cells and tissue [16] [17] [18] [19]. Shityakov *et al.* [16] reported that multi-walled carbon nanotubes functionalized with fluorescein isothiocyanate, were used to study the blood-brain barrier's transport and molecular dynamics. Iancu *et al.* [17] used multi-walled carbon nanotubes functionalized with human serum albumin and labeled with fluorescein to enhance the laser's thermal ablation for the *in vitro* treatment of liver cancer. Hao *et al.* [18] reported the fluorescein delivery into plant cells using magnetic single-walled carbon nanotubes. Chen *et al.* [19] reported the incorporation of carbon nanotube-fluorescein conjugates in human ovarian cancer cells. However, Bosi *et al.* [10] reported that MWCNTs without fluorescent staining were visualized in white-gray color by confocal microscopy under reflection mode acquisition, allowing the visualization of 3D-PDMS-MWCNT scaffold structure. Due to the size and morphology of carbon nanotubes and their intrinsic hydrophobicity, it has been difficult to identify their direct interaction in aqueous biological media and with neuronal cell membrane.

In this work, we report an innovative experimental approach to identify MWCNTs deposited on the cerebral ganglia of the invertebrate *Helix aspersa* and over glass coverslip, without fluorescent staining. Based on the large size of spherical neurons (100 - 150 μm) and the big size of MWCNTs (50 nm outside

diameter and 10 - 50 μm long), we were able to characterize the topographic and ultra-structural distribution of the MWCNTs deposited on the *Helix aspersa* neurons and over glass coverslip, by using Scanning Electron Microscopy (SEM) and Confocal Microscopy (CM) studies.

2. Material and Methods

2.1. Synthesis, Functionalization and Dispersion of MWCNTs

MWCNTs were prepared by spray pyrolysis technique developed by Aguilar-El-guezabal *et al.* [20]. MWCNTs were grown inside of quartz tubing furnace (Thermo Scientific) working at 800°C, by spray pyrolysis of ferrocene/benzene under argon flow. Benzene acts as the carbon source (carbon precursor) and ferrocene as the catalyst. At the final stage of the synthesis, the thermocouple was turned off, leaving only the argon flow to prevent CNTs from rusting. Once the quartz tube was cooled down, CNTs were removed by scraping the inner tube with a spatula. MWCNTs were obtained with an average diameter of 70 nm and length of 70 - 120 μm . They were functionalized by acidic treatment (nitric acid-sulfuric acid at a concentration of 4 M and at 3:1 proportion). Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) from Sigma-Aldrich was used in this work as a dispersant for MWCNTs in water solution. It was prepared according to the following formulation: 1 g PVP-40/100 mg of MWCNTs/20 ml of deionized water. With the aim to improve dispersion and to reduce the size of MWCNTs [21], MWCNTs-PVP stock solution (5 mg/ml) was sonicated for 60 minutes by using a bath sonicator, Model VWR-50T. MWCNTs-PVP were re-suspended in snail ringer solution (SRS) prepared as follows: (in mM) NaCl, 75; KCl, 5; CaCl₂, 10; MgCl₂, 5; Glucose, 5; HEPES, 5; pH 7.5. The final concentration of MWCNTs-PVP was 0.005, 0.05, and 0.5 mg/mL.

2.2. Biological Preparation

The biological preparation used in this work was the cerebral ganglia of the garden snail *Helix aspersa* [22]. The *Helix* neurons have a spherical shape, size of 50 to 200 μm and more than 90% of *Helix* neurons have spontaneous electrical activity; they do not need oxygenation, neither temperature control to keep them alive. The specimen was anesthetized with ethanol at 1% in SRS and the snail cerebral ganglia were obtained by microsurgery. The connective tissue that covers the ganglia was removed by micro-dissection. The ganglia were exposed to protease type XIV (Sigma-Aldrich) at 1 mg/mL in SRS for 15 min in order to facilitate the removal of the membrane attached to the nerve cells. The action of the enzyme was stopped by washing the ganglia three times with SRS. The fine membrane attached to the neurons was removed with microforceps to expose the nerve cells (see **Figure 1(b)**).

2.3. Ultra-Structural Characterization of MWCNTs

Scanning Electron Microscopy (SEM) and Confocal microscopy (CM) studies were done to study the morphology and topographic distribution of MWCNTs-PVP composite deposited over a glass coverslip and on the cerebral ganglia of *Helix*



Figure 1. Biological preparation used in this work. (a) is the alive specimen and (b) is the isolated and dissected cerebral ganglia obtained from the specimen. D, E and F in red are the identified ganglia of *Helix aspersa*. 1F and 2F are the identified neurons in the inserted box. Scale bar represented by the arrow is 200 μm .

aspersa. For the SEM studies, we used a SEM microscope, Model JSM 5800, LV, with tungsten filament, at a maximum resolution of 3.5 nm, with an accelerating voltage of 30 kV and with a magnification from 45 \times to 300,000 \times . All the samples studied with SEM (MWCNTs-PVP composite deposited over glass coverslip and on neurons) were previously treated with gold or silver by the sputtering method, using a Denton Vacuum Des II device. Samples of MWCNTs deposited on glass coverslip and over *Helix* neurons were studied and observed with a confocal microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Several images were acquired at 23 \times and 63 \times of magnification and serial confocal planes (z-stack) were acquired every 10 - 100 nm across the entire 2D configuration. Reconstructions of the images were performed offline using the image-processing package Fiji [23]. MWCNTs were visualized by using the reflection mode property of the microscope, during the confocal acquisition. To prepare the MWCNTs-PVP composite deposited on glass coverslip, we deposited 20 μL of MWCNTs-PVP at different dilutions (1, 1:10 and 1:100) on a rectangular glass coverslip (7 by 12 mm). The composite was dried at room temperature for 12 h and then, it was heated for 12 h at 220 $^{\circ}\text{C}$ in a convection oven.

2.4. *Helix aspersa* Neurons Treated with MWCNTs-PVP

MWCNTs were applied to the cerebral ganglia of *Helix aspersa* at final concentrations of 0.1 mg/mL in SRS and incubated for 12 hrs. To remove the non-attached nanotubes, the ganglia were washed two times with SRS. The ganglia were incubated and fixed in Paraphormaldehyde at 4% in SRS for 12 h at room temperature. For SEM studies, after the ganglia were fixed, they were washed two times with SRS, and then they were deposited on brass porta samples and dried at room temperature for 12 h. After that, samples were treated with silver by the sputtering method. In the confocal microscopy studies, cells were stained and treated as follows: first, cells were permeabilized with 1% Triton X-100 for 30 min; second, for blocking the unspecific binding, the neurons were treated with 5% fetal bovine serum (FBS) in PBS blocking buffer for 30 min at room temperature; third,

the ganglia were incubated for 30 min with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) for staining the nucleus and WGA-A594 (wheat germ agglutinin Alexa Fluor 594) for staining the cell membrane. DAPI is a green or blue-fluorescent DNA stain and it is excited by 405 nm laser line and is commonly used as a nuclear counter stain in fluorescence microscopy and confocal studies. The wheat germ agglutinin (WGA) is one of the most widely used in cellular biology lectins. The conjugated wheat germ agglutinin (WGA) Alexa Fluor 594 (WGA-A594) presents bright red dye (excitation/emission maximum of approx. 590/617 nm). Finally, ganglia samples were mounted on glass slide, treated with Vectashield (Vector Laboratories) and covered and sealed with coverslips of 1 mm thickness. Upon immunofluorescence staining, *Helix aspersa* neurons were studied and observed with confocal microscope.

3. Results and Discussion

Figure 2 shows the topographic distribution of MWCNTs-PVP at dilutions of 1:100 in SRS. It is observed that carbon nanotubes are well dispersed in this aqueous media and they are not agglomerated at all. This good dispersion of MWCNTs-PVP was corroborated when this composite was deposited on a glass coverslip and analyzed with confocal microscopy in the reflection mode. Independent nanotubes can be identified and are not aligned and distributed randomly (see **Figure 3**).

After the *Helix aspersa* neurons were treated with MWCNTs-PVP composite for 12 h, in SEM studies, it was observed that the nanotubes were deposited on the surface of the neurons (**Figure 4**). Similar topographic distribution of MWCNTs-PVP composite was observed in neuronal cells when they were studied with the confocal microscope (**Figure 5**). In the micrograph presented in **Figure 5**, it was possible to observe that MWCNTs (in white-gray color) are attached to the neuronal membrane (stained in red), crossing the cell membrane and getting into the cytoplasm.

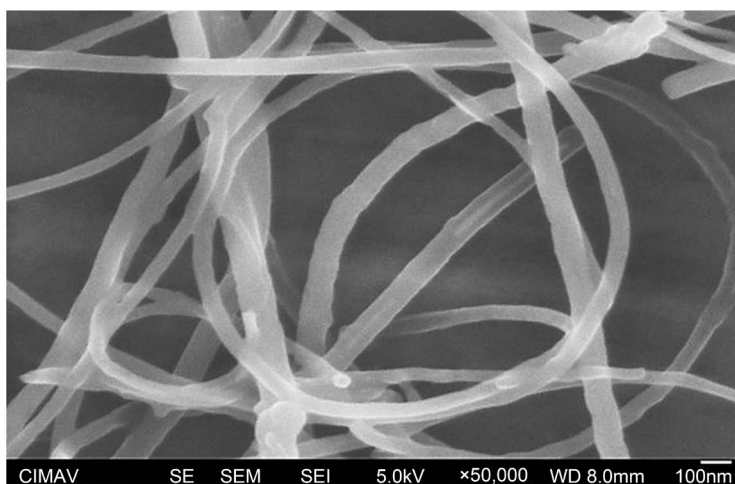


Figure 2. High resolution Scanning Electron Microscopy (SEM) micrograph to identify the topographic distribution of MWCNTs (0.05 mg/dl in SRS) applied on a glass coverslip. Magnification $\times 50,000$, scale bar 100 nm.

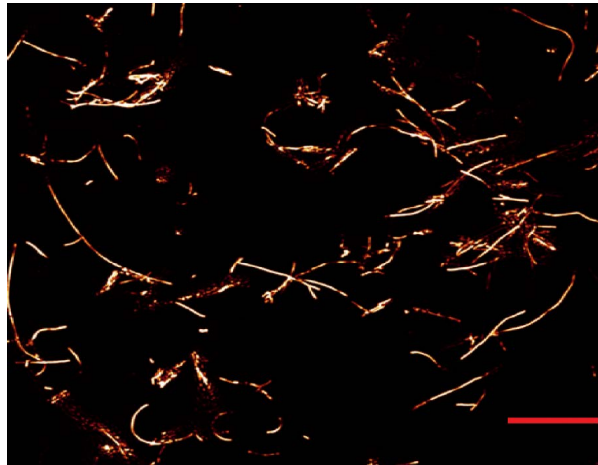


Figure 3. MWCNTs at 0.05 mg/dl in snail ringer solution deposited on glass coverslip and observed with the confocal microscope in the reflection mode at 460 nm. Scale bar 10 μ m.

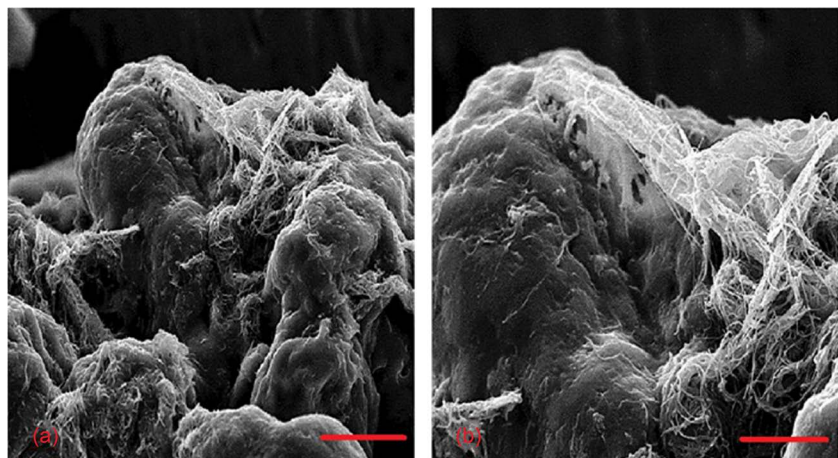


Figure 4. Low resolution Scanning Electron Microscopy micrograph to identify the topographic distribution of MWCNTs (0.5 mg/dl in SRS) on the surface of *Helix aspersa* neurons. Scale bar 20 μ m. (a) is at 1000 \times magnification and (b) is 3000 \times magnification.

Our results are in concordance with previous reports, in the sense that functionalized multi wall carbon nanotubes can be dispersible in aqueous solution by using specific dispersants [11] [12] [13] [14] [15]. Moreover, the results presented here corroborate the results reported by others [7] [8] [10], because in these experiments MWCNTs interact with living cells and act as functional scaffolds for neuronal tissue. An interesting finding reported here, is that it was not necessary to label the MWCNTs with fluorescent compounds, as it has been done and has been reported by others [5] [16] [17] [18] [19]. These MWCNTs were well identified with confocal microscopy studies (see **Figure 3** and **Figure 5**) when the microscope was used in the reflection mode. This clear identification of MWCNTs deposited on glass coverslips and over snail neurons, can be explained by two facts. First, the MWCNTs used in this work were obtained with an average diameter of 50 - 70 nm and length of 50 to 120 μ m [20]. Second, the *Helix aspersa* ganglia have

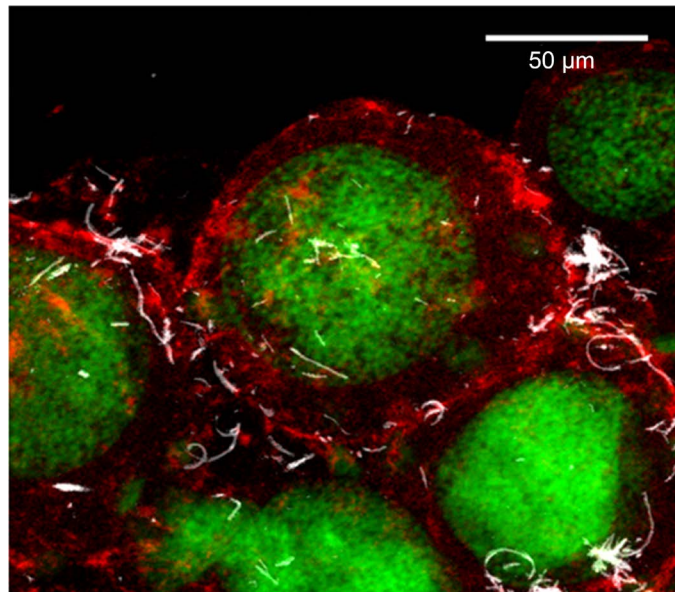


Figure 5. MWCNTs-PVP on *Helix aspersa* neurons. Neurons stained with WGA-A594 in red for cell membrane and DAPI in green, for nucleus. Gray-white color for MWCNTs in the reflection mode. 40× magnification, with zoom. Scale bar 50 μm.

spherical big neurons with a diameter between 50 - 200 μm [22].

It has been reported that MWCNTs interact with the cellular membrane and have a blocking effect of membrane ion channels in cardiac cells [24] and neuronal cells as well [25] [26]. However, preliminary experiments reported by our group indicate that the MWCNTs, synthesized by spray pyrolysis, functionalized with acidic treatment and dispersed by PVP, have low electrical resistance and are good electro-conductive materials [14] [15]. Therefore, this MWCNT-PVP composite tested in this work may not block ion currents in neurons. Although in this work we found that carbon nanotubes have direct interaction with the neuronal cell membrane and can be useful for neuronal tissue engineering, we consider that more experimental work is needed in order to elucidate if these MWCNTs may modify specific ion channels immersed in the cellular membrane such as calcium, potassium and sodium channels, which are responsible for the electrical properties of neurons and other excitable cells.

4. Conclusion

In this work, we report that MWCNTs can be synthesized by spray pyrolysis, functionalized with acidic treatment and dispersed by PVP. We have demonstrated that the composite made of multi wall carbon nanotubes-polyvinylpyrrolidone (MWCNTs-PVP) has good dispersion properties in aqueous biological media, such as the snail ringer solution (SRS). Independent carbon nanotubes were clearly observed in SEM and CM studies, when they were applied on a glass coverslip. In addition, here we demonstrate that carbon nanotubes interact and get attached to the neuronal cell membrane. Therefore, this MWCNTs-PVP composite can act as a good scaffold for neurons in tissue culture.

Acknowledgements

Authors are very grateful to Professor Laura Ballerini and her collaborators at International School for Advanced Studies (SISSA), Trieste, Italy, for the academic support in the performance of confocal microscopy studies. Juan Bernal-Martinez received a Scholar Fellowship by Conacyt-Mexico to support the present experimental work. Authors are also thankful to Ms. Teresa Villalobos, for the critical review of the manuscript.

References

- [1] Harrison, B.S. and Atala, A. (2007) Carbon Nanotube Applications for Tissue Engineering. *Biomaterials*, **28**, 344-353. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.07.044>
- [2] Abarrategia, A., Gutiérrez, M.C., Moreno-Vicente, C., Hortigüel, M.J., Ramos, V., López-Lacomba, J.L., Ferrer, M.L. and del Monte, F. (2008) Multiwall Carbon Nanotube Scaffolds for Tissue Engineering Purposes. *Biomaterials*, **29**, 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.09.021>
- [3] Haniu, H., *et al.* (2012) Basic Potential of Carbon Nanotubes in Tissue Engineering Applications. *Journal of Nanomaterials*, **2012**, Article ID: 343747. <https://doi.org/10.1155/2012/343747>
- [4] Kim, J.S., Song, K.S. and Yu, I.J. (2016) Multiwall Carbon Nanotube-Induced DNA Damage and Cytotoxicity in Male Human Peripheral Blood Lymphocytes. *International Journal of Toxicology*, **35**, 27-37. <https://doi.org/10.1177/1091581815598749>
- [5] Montes-Fonseca, S.L., Orrantia-Borunda, E., Aguilar-Elguezabal, A., González Horta, C., Talamás-Rohana, P. and Sánchez-Ramírez, B. (2012) Cytotoxicity of Functionalized Carbonnanotubes in J774A Macrophages. *Nanomedicine*, **8**, 853-859.
- [6] Sachar, S. and Saxena, R.K. (2011) Cytotoxic Effect of Poly-Dispersed Single Walled Carbon Nanotubes on Erythrocytes *in Vitro* and *in Vivo*. *PLoS ONE*, **6**, e22032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022032>
- [7] Fabbro, A., Prato, M. and Ballerini, L. (2013) Carbon Nanotubes in Neuroregeneration and Repair. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **65**, 2034-2044. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.002>
- [8] Fabbro, A., Sucapane, A., Toma, F.M., Calura, E., Rizzetto, L., Carrieri, C., Roncaglia, P., Martinelli, V., Scaini, D., Masten, L., Turco, A., Gustincich, S., Prato, M. and Ballerini, L. (2013) Adhesion to Carbon Nanotube Conductive Scaffolds Forces Action-Potential Appearance in Immature Rat Spinal Neurons. *PLoS ONE*, **8**, e73621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073621>
- [9] Martinelli, V., Cellot, G., Fabbro, A., Bosi, S., Mestroni, L. and Ballerini, L. (2013) Improving Cardiac Myocytes Performance by Carbon Nanotubes Platforms. *Frontiers in Physiology*, **4**, 239. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00239>
- [10] Bosi, S., Rauti, R., Laishram, J., Turco, A., Lonardoni, D., Prato, M., Scaini, D. and Ballerini, L. (2015) From 2D to 3D: Novel Nanostructured Scaffolds to Investigate Signalling in Reconstructed Neuronal Networks. *Scientific Reports*, **5**, 9562. <https://doi.org/10.1038/srep09562>
- [11] Hirsch, A. (2002) Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition*, **41**, 1853-1859. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020603\)41:11<1853::AID-ANIE1853>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020603)41:11<1853::AID-ANIE1853>3.0.CO;2-N)
- [12] Achaby, M.E., Arrakhiz, F.E., Vaudreuil, S., Essassi, M., Qaiss, M. and Bousmina,

- M. (2013) Nanocomposite Films of Poly(Vinylidene Fluoride) Filled with Polyvinylpyrrolidone-Coated Multiwalled Carbon Nanotubes: Enhancement of *b*-Polymorph Formation and Tensile Properties. *Polymer Engineering and Science*, **53**, 34-43. <https://doi.org/10.1002/pen.23236>
- [13] Nasouri, K., Shoushtari, A.M. and Mojtahedi, M.R.M. (2016) Synthesis and Characterization of Highly Dispersed Multi-Walled Carbon Nanotubes/Polyvinyl-Pyrrolidone Composite Nanofibers for EMI Shielding Application. *Polymer Composites*. <https://doi.org/10.1002/pc.23774>
- [14] Bernal-Martínez, J., Seseña-Rubfiaro, A., Godínez-Fernández, R. and Aguilar-Elguezabal, A. (2016) Electrodes Made of Multi-Wall Carbon Nanotubes on PVDF-Filters Have Low Electrical Resistance and Are Able to Record Electrocardiograms in Humans. *Microelectronic Engineering*, **166**, 10-14. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2016.09.006>
- [15] Bernal-Martínez, J., Godínez-Fernández, R., Roman-Aguirre, M. and Aguilar-Elguezabal, A. (2016) The Electrical Resistance of Electrodes Made of Multi Walled Carbon Nanotubes Is Modulated by nIR-Laser. *Microelectronic Engineering*, **166**, 45-49. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2016.09.013>
- [16] Shityakov, S., Salvador, E., Pastorin, G. and Förster, C. (2015) Blood-Brain Barrier Transport, Aggregation, and Molecular Dynamics Simulation of Multiwalled Carbon Nanotube Functionalized with Fluorescein Isothiocyanate. *International Journal of Nanomedicine*, **10**, 1703-1713. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68429>
- [17] Iancu, C., Mocan, L., Bele, C., Orza, A.I., Tabaran, F.A., Catoi, C., Stiufiuc, R., Stir, A., Matea, C., Iancu, D., Agoston-Coldea, L., Zaharie, F. and Mocan, T. (2011) Enhanced Laser Thermal Ablation for the *in Vitro* Treatment of Liver Cancer by Specific Delivery of Multiwalled Carbon Nanotubes Functionalized with Human Serum Albumin. *International Journal of Nanomedicine*, **6**, 129-141. <https://doi.org/10.2147/IJN.S15841>
- [18] Hao, Y., Yang, X., Shi, Y., Xing, J., Marowitch, J., Chen, J. and Chen, J. (2012) FITC Delivery into Plant Cells Using Magnetic Single-Walled Carbon Nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **12**, 6287-6293. <https://doi.org/10.1166/jnn.2012.6449>
- [19] Chen, M.T., Gomez, L.M., Ishikawa, F.N., Vernier, P.T., Zhou, C. and Gundersen, M.A. (2009) PH-Sensitive Intracellular Photoluminescence of Carbon Nanotube-Fluorescein Conjugates in Human Ovarian Cancer Cells. *Nanotechnology*, **20**, Article ID: 295101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/29/295101>
- [20] Aguilar-Elguezabal, A., Antunez, W., Alonso, G., Delgado, F.P., Espinosa, F. and Miki-Yoshida, M. (2006) Study of Carbon Nanotubes Synthesis by Spray Pyrolysis and Model of Growth. *Diamond & Related Materials*, **15**, 1329-1335. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2005.10.011>
- [21] Zaragoza-Contreras, E.A., Lozano-Rodríguez, E.D., Román-Aguirre, M., Antunez-Flores, W., Hernández-Escobar, C.A., Flores-Gallardo, S.G. and Aguilar-Elguezabal, A. (2009) Evidence of Multi-Walled Carbon Nanotube Fragmentation Induced by Sonication during Nanotube Encapsulation via Bulk-Suspension Polymerization. *Micron*, **40**, 621-627. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.02.007>
- [22] Kerkut, G.A., et al. (1973) Mapping of Nerve Cells in the Suboesophageal Ganglia of Helix Aspersa. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **50**, 1-25.
- [23] Schindelin, J., et al. (2012) Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nature Methods*, **9**, 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- [24] Tan, X.Q., Cheng, X.L., Zhang, L., Wu, B.W., Liu, Q.H., Meng, J., Xu, H.Y. and Cao, J.M. (2014) Multi-Walled Carbon Nanotubes Impair Kv4.2/4.3 Channel Activities,

Delay Membrane Repolarization and Induce Bradyarrhythmias in the Rat. *PLoS ONE*, **9**, e101545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101545>

- [25] Chen, T., Yang, J., Ren, G., Yang, Z. and Zhang, T. (2013) Multi-Walled Carbon Nanotube Increases the Excitability of Hippocampal CA1 Neurons through Inhibition of Potassium Channels in Rat's Brain Slices. *Toxicology Letters*, **217**, 121-128. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.12.013>
- [26] Xu, H., Bai, J., Meng, J., Hao, W., Xu, H. and Cao, J.M. (2009) Multi-Walled Carbon Nanotubes Suppress Potassium Channel Activities in PC12 Cells. *Nanotechnology*, **20**, Article ID: 285102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/28/285102>



Scientific Research Publishing

Submit or recommend next manuscript to SCIRP and we will provide best service for you:

Accepting pre-submission inquiries through Email, Facebook, LinkedIn, Twitter, etc.

A wide selection of journals (inclusive of 9 subjects, more than 200 journals)

Providing 24-hour high-quality service

User-friendly online submission system

Fair and swift peer-review system

Efficient typesetting and proofreading procedure

Display of the result of downloads and visits, as well as the number of cited articles

Maximum dissemination of your research work

Submit your manuscript at: <http://papersubmission.scirp.org/>

Or contact msce@scirp.org





Accelerated publication

Electrodes made of multi-wall carbon nanotubes on PVDF-filters have low electrical resistance and are able to record electrocardiograms in humans



Juan Bernal-Martínez^{a,*}, Alberto Seseña-Rubfiaro^a, Rafael Godínez-Fernández^a, Alfredo Aguilar-Elguezabal^b

^a Biophysical Laboratory, Electrical Engineering Department, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, C.P.09340, D.F., México, Mexico

^b Department of Engineering and Chemistry of Materials, Centro de Investigación y Materiales Avanzados S.C. CIMAV, C.P. 31109 Chihuahua, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2016

Received in revised form 29 August 2016

Accepted 10 September 2016

Available online 12 September 2016

Keywords:

Electrocardiogram

Bioelectrical signals

Multi wall carbon nanotubes

Electrode resistance

ABSTRACT

In this paper we report that electrodes made of multi wall carbon nanotubes (MWCNTs) incorporated on Polyvinylidene fluoride (PVDF) filters can be used for recording and sensing bio-electrical signals. We measured the electrical properties of MWCNTs incorporated on membranes made of cellulose (bond-paper) and PVDF filters. In addition, we performed Atomic Force Microscopy (AFM) and Scanning Electron Microscopy (SEM) studies with the purpose to characterize the ultra-structural properties and distribution of MWCNTs on PVDF filters. We found that the electrodes made of MWCNTs on PVDF filters, have lower resistance and consequently better conductivity compared with other typical electro-conductive materials. We also found that the topographic distribution of the MWCNTs on the PVDF filter is chaotic and non-aligned; nevertheless, MWCNTs on PVDF filters showed a linear electrical resistance without rectification. Electrodes made of MWCNTs on PVDF filters were able to record electrocardiograms in humans with similar resolution than the ones recorded with silver electrodes. The relevance and application of these findings are discussed.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Carbon nanotubes (CNTs) were discovered by Iijima in 1991 [1] and they present different structures; they can be single wall carbon nanotubes (SWCNTs) or multi wall carbon nanotubes (MWCNTs). The MWCNTs consist of different coaxial cylinders made of a single layer of graphene around the cylindrical hole. The external diameter of MWCNTs is between 2 and 100 nm and the internal diameter is 1–3 nm. Their length can be up to several micro-meters [2]. CNTs have been identified as current and charge carriers as well as highly conductive materials [3–6]. MWCNTs can be combined and applied on several materials such as: Polyvinylidene fluoride (PVDF) [7–13], bond paper [14,15] or associated with other polymer materials for specific composites [16–20]. Specifically, Anjalin [7] synthesized and characterized MWCNTs/PVDF nano-composites and studied their electrical properties. For the formation of nanocomposite film, MWCNTs were dispersed in *N,N* dimethyl formamide (DMF) with PVDF (Merck) by constant stirring and high power sonication. Once it dissolved thoroughly in DMF (Merck), transfer the solution on to the Petri-dish and dry it at 60 °C for 10 h in vacuotherm. The electrical properties were studied using four probe method. The material exhibits a decrease in resistivity with

increasing temperature. The I/V current-voltage relationship of the MWCNT-PVDF composite show linearity without rectification. Wang et al. [14] prepared papers made with aligned carbon nanotubes. Hu et al. [15] prepared a highly conductive paper for energy storage devices. Ichkitidze et al. [16] worked with electrically-conductive composite nanomaterial and MWCNTs. Fujitsuka et al. [17] fabricated an aligned-carbon-nanotube-composite paper with high and anisotropic conductivity. By using the MWCNTs in a defined composite, Moon et al. [18] prepared a transparent conductive film based on carbon nanotubes and the electro-conductive material named PEDOT. Coleman et al. [19] have made electrical measurements on a system using carbon nanotubes as the dopant material. A semiconjugated organic polymer PMPV (poly-p-phenylenevinylene-co-2,5-dioctoxy-m-phenylenevinylene) was mixed with carbon nanotubes to form a wholly organic composite. Composite formation from low to high nanotube concentration increases the conductivity dramatically by ten orders of magnitude. Khosla et al. [20] prepared a conducting nanocomposite polymer by using multi-walled carbon nanotube and polydimethylsiloxane (PDMS).

MWCNTs have been incorporated on bond paper to prepare “Bucky papers”. These buckypapers have been studied with several approaches for biological applications [21–24]. Martinelli et al. [21] produced a buckypaper from oxidized MWCNTs and tested its wet adhesion on soft animal tissue. Yang et al. [22] tuned the electrical and thermal connectivity of buckypaper made by MWCNTs. Bellucci et al. [23] studied

* Corresponding author.

E-mail address: drjuanbernal@hotmail.com (J. Bernal-Martínez).

the toxicology and biological effects in vitro and in vivo of MWCNTs buckypaper. Leng et al., used carbon nanotube bucky paper as an artificial support membrane for retinal cell transplantation. On the other hand, Professor Ballerini and her group, have made an elegant work by using MWCNTs as scaffolds for growing neuronal and myocardial mammalian cells and human dendritic cells [25–27]. These applications of MWCNTs as scaffolds for tissue engineering are based on their hydrophobic and cellular membrane affinity and also based in their good electrical conductivity. However, in several experimental reports, where carbon nanotubes were used as scaffolds with neuronal and other cell types, the researchers assumed that carbon nanotubes are good electro-conductive materials, but it has not been studied and characterized the electrical resistance and the electrical conductivity of such materials used as electrode-scaffolds.

In this paper we report the electrical properties of electro-conductive materials such as: silver conductive paint, graphene conductive paint and MWCNTs incorporated on membranes made of cellulose (bond-paper) and PVDF. Atomic Force Microscopy (AFM) and Scanning Electron Microscopy (SEM) studies were performed to characterize the ultra-structural properties and distribution of MWCNTs on PVDF filters. We found that the electrodes made with MWCNTs on PVDF filters, have lower resistance and consequently better conductivity compared with other typical electro-conductive materials. Due to these electrical properties, MWCNTs on PVDF filters were able to record electrocardiogram signals (ECG) from humans.

2. Experimental details

MWCNT were prepared by spray pyrolysis [28]. Briefly, MWCNTs were grown inside of a quartz tubing by spray pyrolysis of ferrocene/benzene under argon flow. MWCNTs were obtained with an average diameter of 70 nm and length of 120 μm . They were functionalized by nitric acid-sulfuric acid treatment at a concentration of 4 M and at 3:1 proportion. The nonionic surfactant polyvinylpyrrolidone (PVP), at different molecular weight, has been used as dispersant for SWCNTs as well as MWCNTs, based on its non-toxicity and high compatibility with carbon nanomaterials [29–35]. Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) from Sigma-Aldrich, was used in this work as a dispersant for MWCNTs in water solution, according with the following formulation: 1 g PVP-40/100 mg of MWCNTs/20 mL of deionized water. With the aim to facilitate the good dispersion and to diminishing the size of nanotubes [36], MWCNTs stock solution (5 mg/mL) was sonicated for 60 min by using a bath sonicator, model VWR-50T.

Electro-conductive electrodes were prepared as follows: Silver conductive paint (EMS, cat # 12686), Graphene conductive paint and MWCNTs were applied in the amount of 200 μL on the surface of circular Xerox bond-paper, with a diameter of 2.5 cm and dried at room temperature. To prepare MWCNTs electrodes on PVDF filters we used a 0.45 μm , Durapore membrane filters, Cat. No. HVLPO2500, Millipore. We applied 2 mL of MWCNTs of the stock solution at different dilutions (1, 1:10, 1:100 and 1:1000) passing through the filter and dried in a convection oven at 60 $^{\circ}\text{C}$ during 30 min.

Scanning Electron Microscopy (SEM) and Atomic force microscopy (AFM) studies were done to study the morphology of functionalized and dispersed MWCNTs on PVDF filters. In this work we used an Atomic force microscope, model IVa, Veeco Instruments, Inc. The head microscope was in the Multimode SPM. Noise > 0.3 \AA RMS in the Z axis, with vibrations isolation. The size of sample is ≤ 12 mm in diameter; ≤ 0.10 mm of thickness. The probe (cantilever) was used in the tapping mode. The microscope was allocated on a hydraulic table to avoid mechanical vibrations and in a Faraday cage to avoid electrical and thermo-acoustic noise. Lateral scanning range (X-Y) was 10 μm by 10 μm ; vertical scanning range was 2.5 μm . For the experiments described in this work, MWCNTs on PVDF filters were studied with a high resolution field emission scanning electron microscope, Model JSM 5800, with ACCV of 15 kV and magnifications between 1000-X and 40,000-X. All

samples studied in the scanning electron microscope (SEM) were previously treated with gold by the sputtering method using a Denton Vacuum Des II device.

We measured the electrical resistance of electroconductive materials by a two wire probe (anode and cathode) placed on the surface of the materials at 5 mm distance between each other and connected to an Agilent 34,970 A device and a Data Acquisition System Agilent 34,901 A.

3. Results and discussion

3.1. Morphological and topographic distribution of MWCNTs applied on PVDF filters

In this work we found that MWCNTs bind and attach efficiently on Xerox-bond-paper and on PVDF filters. By using Atomic Force Microscopy (AFM), we demonstrated that MWCNTs were distributed with non-linearity and a chaotic manner on the surface of the PVDF filter, in a bi-dimensional and three-dimensional configuration. (see Fig. 1A and Fig. 1B, respectively).

In order to confirm these findings, high resolution scanning electron microscopy (SEM) studies were done to identify at different dilutions (1:1 and 1:100, v/v in deionized water), the topographic distribution of MWCNTs applied on PVDF filters. In Fig. 2A independent carbon nanotubes are observed agglomerated and covering the surface of the PVDF filter. In Fig. 2B, more independent carbon nanotubes that partially cover the surface of the filter are observed. These two micrographs demonstrate that the MWCNTs were well dispersed and efficiently attached to the PVDF filters.

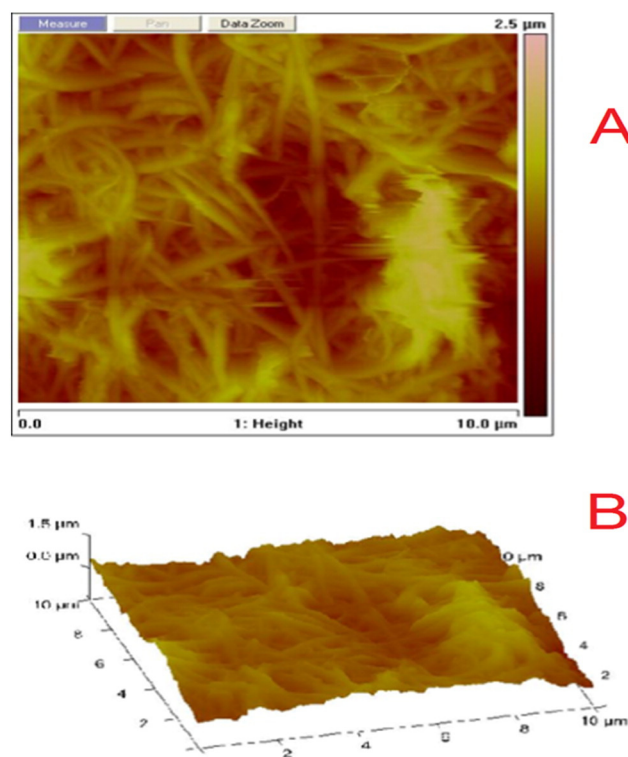


Fig. 1. Atomic force microscopy studies to identify the topographic distribution of MWCNTs dissolved in PVP-40 water solution and applied on PVDF filter. "A" represents the bi-dimensional scanning, in a horizontal plane. Total gain of scanning is 10 μm . "B" is a tridimensional representation of MWCNTs on the PVDF filter. The total gain in the vertical dimension is 1.5 μm .

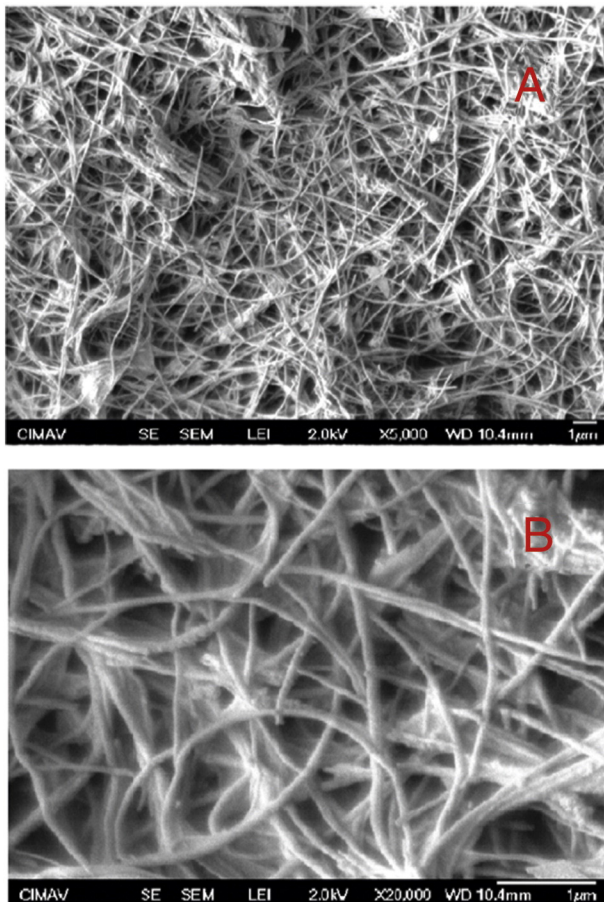


Fig. 2. High resolution Scanning Electron Microscopy (SEM) studies to identify the topographic distribution of MWCNTs (5 mg/mL) applied on PVDF filters and observed at $\times 5000$ (A) and $\times 20000$ (B) magnifications. Scale bar is 1 μm .

3.2. Electrical properties of electro-conductive materials

We performed the measurements of the point resistance of these electro-conductive materials by using an Agilent 34,970 A device and a Data Acquisition System Agilent 34901A. Along with the electrical measurements, in these experiments we also evaluated the weight of these electro-conductive materials incorporated on a circular Xerox bond paper and PVDF filters. These results are presented in Fig. 3. We observed that the point resistance for these conductive materials was as follows (in $\Omega \pm \text{SD}$, $n = 75$): Silver conductive paint on paper 0.23 ± 0.003 ; MWCNTs on PVDF filter 37.6 ± 0.051 ; Graphene conductive paint on paper 84.7 ± 0.395 and MWCNTs on paper 1275 ± 0.799 . Whereas the weight of these electrodes was as follows (in $\text{mg} \pm \text{SD}$, $n = 5$): Silver conductive paint on paper 116 ± 0.56 ; MWCNTs on PVDF filter 16.6 ± 0.18 ; Graphene conductive paint on paper 104 ± 1.70 and MWCNTs on paper 16.6 ± 0.18 . This data indicates that silver and graphene conductive paints are heavier than MWCNTs. The reason why the MWCNTs on PVDF filters is heavier than the one deposited on bond paper, is probably because the amount of carbon nanotubes was 5 times higher (see [Experimental details](#)). This high concentration of MWCNTs on PVDF filters may be the reason why their electrode-resistance was smaller.

3.3. MWCNTs incorporated on PVDF filters are able to record the electrocardiogram signals

Once it was demonstrated the electrode specific low resistance of the MWCNTs on PVDF filters, we decided to use these electrodes for

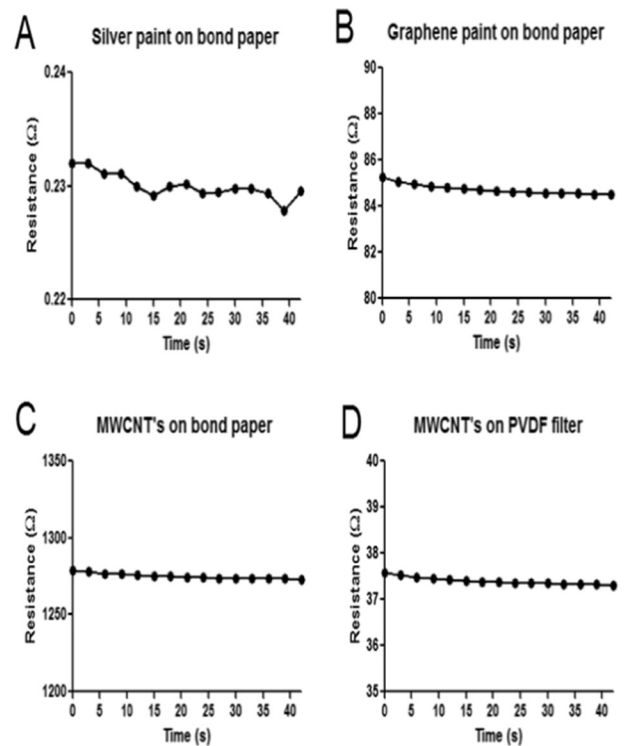


Fig. 3. Electrical resistance (in ohms, Ω) versus the time (s) are presented from different electro-conductive materials: A) Silver paint on bond paper. B) Graphene paint on bond paper. C) MWCNTs on bond paper and D) MWCNTs on PVDF filter.

sensing and recording the electrical signals of an electrocardiogram (ECG) in a patient. PVDF membrane filters loaded with 2 mL of MWCNTs (5 mg/mL), were prepared according with the methods described above. Four of these MWCNTs electrodes were attached to the cables of a regular ECG device. First, we recorded a regular ECG with the traditional silver chloride electrodes. Then, we decided to connect the cables of the ECG device to the electrodes made by MWCNTs on PVDF electrodes.

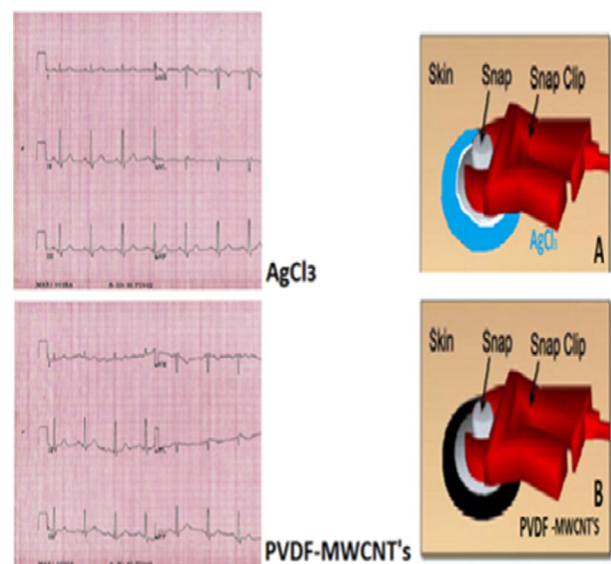


Fig. 4. MWCNTs on PVDF filters sense ECG signals in humans. On the top is presented the ECG signals recorded with silver regular electrodes, represented in A. In the bottom on the left is presented the ECG signals registered with MWCNTs incorporated on PVDF filters, represented in B.

We obtained similar records from the two different approaches, in terms of the shape and size of the ECG signals from the derivations I, II and III and AVR, AVL and AVF. The base line of the ECG obtained from de MWCNTs electrodes was slightly noisier compared with the control (see Fig. 4). This can be explained because of the low adhesivity and attachment of MWCNTs-PVDF electrodes to the patient's skin.

The nonionic surfactant polyvinylpyrrolidone (PVP) was used in this work as a dispersant for MWCNTs in water solution. PVP at different molecular weights has been used as dispersant for SWCNTs as well as MWCNTs, based on its non-toxicity and high compatibility with carbon nanomaterials [29–35]. It has been reported that PVP tend to wrap or twist around the CNT center through their flexible or semi-flexible backbones [32,34,35]. There are currently two main theories on the mechanism of nanotube dispersion by polymers: wrapping and non-wrapping. Wrapping occurs when a strong monolayer of polymer helically wraps a nanotube. In the non-wrapping theory, the polymers are weakly interacting with the nanotube through Van der Waals interactions. Wrapping was considered the only mechanism by which polymers interact with nanotubes [32,34]. O'Connell et al. [34] used atomic force microscopy (AFM) images to show that any aqueous monolayer of polymer (polyvinylpyrrolidone, polystyrene, etc.) would be wrapping the surface of the nanotube. They deduced this by observing changes in the length and height distributions of the AFM images and remarking that there was also a decreased presence of bundled ropes as well. Although in the present work we performed AFM and SEM studies of the MWCNTs deposited on PVDF filters, we were not able to identified and distinguish a specific wrapping of PVP on the MWCNTs. Therefore, based on the preliminary studies made by others, we can speculate that the PVP-40 used as dispersant for MWCNTs may coat and wrap the independent carbon nanotubes.

Poly-vinylidene fluoride (PVDF) is a semi-crystalline thermoplastic polymer that is of interest for: filters, sensors, actuators and biomedical applications because of its piezoelectric, pyroelectric, mechanical and chemical properties [8–13]. Several experimental approaches have been made in the preparation of PVDF membranes doped with carbon nanotubes. Mago et al. [10] reported the preparation of microporous PVDF-MWCNTs nanocomposite membranes, via an isothermal immersion precipitation method, using two different solvents (ethanol and water). The morphology and the crystallinity of the PVDF membranes were affected by the incorporation of MWCNTs. Anjalin et al. [7] reported the formation of nanocomposite film, where MWCNTs were dispersed in N,N dimethyl formamide (DMF) with PVDF. The solution was transferred to the Petri-dish and it was dried at 60 °C for 10 h. The electrical properties were studied by using the four probe method. They found that the material exhibits a decrement in resistivity when the temperature is incremented. The I/V current-voltage relationship of the MWCNTs-PVDF composite show linearity without rectification. More recently, Ram et al. [12] reported the electrical properties of PVDF/MWCNTs semi-transparent composites. The AC-conductivity and the constant dielectric are increasing with filler concentration. Alpatova et al. [13] reported the preparation of a composite made of PVDF membrane impregnated with Fe₂O₃ nanoparticles and MWCNTs for catalytic degradation of organic contaminants. Although these preliminary reports suggest that MWCNTs improve the electrical conductivity of the PVDF-MWCNTs nanocomposite, in this work we did not mix or prepare a PVDF-MWCNTs nanocomposite membrane. Instead of it, we decided to use the commercial PVDF filter with porosity of 0.45 μm as a mechanical support for MWCNTs (see [Experimental details](#), Section 2 of the paper). The accumulation of MWCNTs on the surface of the PVDF filters was due to the percolation process by itself rather than for the chemical or mechanical mixing of these nanomaterials. At the end of this filtration process, we obtained high concentration of MWCNTs on the surface of the PVDF filters as it can be observed in AFM and SEM micrographs (see [Figs. 1 and 2](#), respectively). Therefore we can argue that the electrical resistance obtained on those electrodes made with MWCNTs on PVDF filters, should be

attributed to the electrical resistance of the MWCNTs and not to the PVDF filters. In the results reported here, the probe (anode and cathode) was disposed on the surface of the MWCNTs film. The electrical resistance of independent PVDF filters without MWCNTs was apparently too high, because the recording device (Agilent 34970A) was saturated and was out of the range of sensitivity (giga-ohms).

Carbon nanotubes electrodes have been fabricated for recording and sensing bioelectrical signals. Aetre et al. [37] reported the synthesis of vertically aligned CNTs and the development of magnetic nanotube substrates for biological applications. The vertical alignment of the CNTs on a silicon substrate for the use in biological sensor systems has been explored. In addition, preliminary experiments were done to determine the potential to use CNTs as electrode for electrical stimulation. More recently, nanostructured-textile-based dry electrodes have been prepared for long-term measurement of electrocardiography (ECG), electroencephalography (EEG), electrooculography (EOG), and electromyography (EMG) with very low baseline noise. These authors improved the electrodes sensitivity and seamless integration into garments [38]. These results obtained by others, support the hypothesis that electrodes made by MWCNTs incorporated on the surface of PVDF are good electro-conductive materials to record ECG and they could record and monitoring other biological signals.

4. Conclusion

In this paper we present experimental data that demonstrates that MWCNTs deposited on PVDF filters, despite the non-linearity and chaotic topographic distribution on the filters, are good electro-conductive materials and have low electrical resistance. We also demonstrate that these electrodes made of MWCNTs are able to record and sensing biological electrical signals such as ECG. The MWCNTs incorporated on PVDF filters are able to record the electrocardiogram signals from a patient, with high sensibility and similar resolution compared with the records obtained with silver electrodes. These results support the hypothesis that electrodes made of MWCNTs could record other biological signals such as electroencephalogram (EEG), evoked potentials (EP) and action potentials (AP) from neurons and excitable cells.

Acknowledgement

This work was supported by a CONACYT-Mexico Fellowship to Juan Bernal-Martínez and Alberto Seseña-Rubfiaro. The authors are thankful to: Wilber Antunez, for the technical assistance in the electron microscopy studies; Oscar Canto, for the technical assistance in the Atomic force microscopy studies and to Manuel Roman, for the technical assistance in the measurements of electrical properties of electro-conductive materials. Authors are also grateful to Ms. Teresa Villalobos for reviewing and correcting the manuscript.

References

- [1] S. Iijima, *Nature* 354 (1991) 5628.
- [2] H. He, L.A. Pham-Huy, P. Dramou, D. Xiao, P. Zuo, C. Pham-Huy, Carbon nanotubes: applications in pharmacy and medicine, *Biomed. Res. Int.* 2013 (2013) 578290.
- [3] Y. Zhang, F. Ronning, K. Gofryk, N.A. Mara, N. Haberkorn, G. Zou, H. Wang, J.H. Lee, E. Bauer, T.M. McCleskey, A.K. Burell, L. Civalo, Y.T. Zhu, Q. Jia, Aligned carbon nanotubes sandwiched in epitaxial NbC film for enhanced superconductivity, *Nanoscale* 4 (7) (2012, Apr 7) 2268–2271.
- [4] N. Murata, J. Haruyama, J. Reppert, A.M. Rao, T. Koretsune, S. Saito, M. Matsudaira, Y. Yagi, Superconductivity in thin films of boron-doped carbon nanotubes, *Phys. Rev. Lett.* 101 (2) (2008, Jul 11) 027002.
- [5] C. Berger, P. Poncharal, Y. Yi, W. de Heer, Ballistic conduction in multiwalled carbon nanotubes, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 3 (1–2) (2003, Feb-Apr) 171–177.
- [6] B.Q. Wei, R. Vajtai, P.M. Ajayan, Reliability and current carrying capacity of carbon nanotubes *Appl. Phys. Lett.* 79 (2001) 1172.
- [7] F.M. Anjalin, Synthesis and characterization of MWCNTs/PVDF nanocomposite and its electrical studies, *Der Pharma Chemica* 6 (1) (2014) 354–359.
- [8] X. He, K. Yao, G. B.K., Phase transition and properties of a ferroelectric poly(vinylidene fluoride-hexafluoropropylene) copolymer, *J. Appl. Phys.* 97 (8) (2005), Article ID 084101.

- [9] A. Ambrosyand, K. Holdik, Piezoelectric PVDF films as ultrasonic transducers, *J. Phys. E* 17 (10) (1984) 856–859.
- [10] G. Mago, D.M. Kalyon, F. FT, Membranes of polyvinylidene fluoride and PVDF nanocomposites with carbon nanotubes via immersion precipitation, *J. Nanomater.* (2008), Article ID 759825.
- [11] Q. Zhang, X. Lu, L. Zhao, Preparation of polyvinylidene fluoride (PVDF) hollow fiber hemodialysis membranes, *Membranes (Basel, Switz.)* 4 (1) (2014, Feb 27) 81–95.
- [12] R. Ram, M. Rahamanb, D. Khashtgira, Electrical properties of polyvinylidene fluoride (PVDF)/multi-walled carbon nanotube (MWCNT) semi-transparent composites: modelling of DC conductivity, *Compos. A: Appl. Sci. Manuf.* 69 (2015) 30–39.
- [13] A. Alpatova, M. Meshref, K.N. McPhedran, M.G. El-Din, Composite polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane impregnated with Fe₂O₃ nanoparticles and multiwalled carbon nanotubes for catalytic degradation of organic contaminants, *J. Membr. Sci.* 490 (2015) 227–235.
- [14] D. Wang, P. Song, C. Liu, W. W. S. Fan, Highly oriented carbon nanotube papers made of aligned carbon nanotubes, *Nanotechnology* 19 (2008) 075609 6pp.
- [15] H. L. C. J.W., Y. Y., J. S., L.M. F., C. L.F, C. Y., Highly Conductive Paper for Energy Storage Devices PNAS, vol. 106, no. 51, 2009 21490–21494.
- [16] L. Ichkitidze, V. Podgaetsky, S. Selishchev, E. Blagov, V. Galperin, Y. Shaman, A. Pavlov, E. Kitsyuk, Electrically-conductive composite nanomaterial with multi-walled carbon nanotubes, *Mater. Sci. Appl.* 4 (2013) 1–7.
- [17] Y. Fujitsuka, O. T., Fabrication of aligned-carbon-nanotube-composite paper with high and anisotropic conductivity, *J. Nanotechnol.* 2012 (2012), Article ID 819281 (5 pages).
- [18] J.S. Moon, J.H. Park, T.Y. Lee, Y.W. Kim, J.B. Yoo, C.Y. Park, J.M. Kim, K.W. Jin, Transparent conductive film based on carbon nanotubes and PEDOT composites, *Diam. Relat. Mater.* 14 (2005) 1882–1887.
- [19] J.N. Coleman, S. Curran, D. A.B, D. A.P., M.C. B., B. W., B. R.C., Percolation-dominated conductivity in a conjugated-polymer-carbon-nanotube composite, *Phys. Rev. B* 58 (1998) 7492.
- [20] A. Khosla, B.L. Gray, Preparation, characterization and micromolding of multi-walled carbon nanotube polydimethylsiloxane conducting nanocomposite polymer, *Mater. Lett.* 63 (13) (2009) 1203–1206.
- [21] A. Martinelli, G.A. Carru, L. D'Ilario, F. Caprioli, M. Chiaretti, F. Crisante, I. Francolini, A. Piozzi, Wet adhesion of buckypaper produced from oxidized multiwalled carbon nanotubes on soft animal tissue, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5 (10) (2013 May 22) 4340–4349.
- [22] K. Yang, J. He, P. Puneet, Z. Su, M.J. Skove, J. Gaillard, T.M. Tritt, A.M. Rao, Tuning electrical and thermal connectivity in multiwalled carbon nanotube buckypaper, *J. Phys. Condens. Matter* 22 (33) (2010 Aug 25) 334215.
- [23] S. Bellucci, M. Chiaretti, A. Cucina, G.A. Carru, A.I. Chiaretti, Multiwalled carbon nanotube buckypaper: toxicology and biological effects in vitro and in vivo, *Nanomedicine (London)* 4 (5) (2009 Jul) 531–540.
- [24] T. Leng, H.A. Fishman, Carbon nanotube bucky paper as an artificial support membrane for retinal cell transplantation, *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina.* 44 (1) (2013 Jan–Feb) 73–76.
- [25] A. Fabbro, M. Prato, L. Ballerini, Carbon nanotubes in neuroregeneration and repair, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (15) (2013 Dec) 2034–2044.
- [26] A. Fabbro, A. Supapane, F.M. Toma, E. Calura, L. Rizzetto, C. Carrieri, P. Roncaglia, V. Martinelli, D. Scaini, L. Masten, A. Turco, S. Gustincich, M. Prato, L. Ballerini, Adhesion to carbon nanotube conductive scaffolds forces action-potential appearance in immature rat spinal neurons, *PLoS One* 8 (8) (2013 Aug 12), e73621.
- [27] V. Martinelli, G. Cellot, A. Fabbro, S. Bosi, L. Mestroni, L. Ballerini, Improving cardiac myocytes performance by carbon nanotubes platforms, *Front. Physiol.* 4 (2013 Sep 3) 239.
- [28] A. Aguilar-Elguezabal, W. Antunez, G. Alonso, F.P. Delgado, F. Espinosa, M. Miki-Yoshida, Study of carbon nanotubes synthesis by spray pyrolysis and model of growth, *Diam. Relat. Mater.* 15 (2006) 1329–1335.
- [29] H. A., Functionalization of single-walled carbon nanotubes, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (11) (2002).
- [30] M.E. Achaby, F.E. Arrakhiz, S. Vaudreuil, M. Essassi, M. Qaiss, M. Bousmina, Nano-composite films of poly(vinylidene fluoride) filled with polyvinylpyrrolidone-coated multiwalled carbon nanotubes: enhancement of b-polymorph formation and tensile properties, *Polym. Eng. Sci.* 53 (1) (2013) 34–43.
- [31] Achaby ME, Essassi EM and Qaiss A. Coated Multi-walled Carbon Nanotubes for the Preparation of Nanocomposite Films. Society of Plastics Engineers. (Plastics research on line. 10.1002/spepro.004342). www.4spepro.org/pdf/004342/004342.
- [32] T. Yu, Surfactant assisted dispersion of single-walled carbon nanotubes in polyvinylpyrrolidone solutions, Electronic Thesis and Dissertation Repository. Paper 2362, The University of Western, Ontario, 2014.
- [33] K. Nasouri, A.M. Shoushtari, M.R.M. Mojtahedi, Synthesis and characterization of highly dispersed multi-walled carbon nanotubes/polyvinylpyrrolidone composite nanofibers for EMI shielding application, *Polym. Compos.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1002/pc.23774>.
- [34] M.J. O'Connell, P.B. Boul, L.M. Ericson, C. Huffman, Y. Wang, E. Haroz, C. Kuper, J. Tour, K.D. Ausman, R.E. Smalley, Reversible water-solubilization of single-walled carbon nanotubes by polymer wrapping, *Chem. Phys. Lett.* 342 (2001) 265–271.
- [35] T. Hasan, V. Scardaci, P.H. Tan, A.G. Rozhin, W.I. Milne, A.C. Ferrari, Stabilization and “debundling” of single-wall carbon nanotube dispersions in *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP) by polyvinylpyrrolidone (PVP), *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 12594–12602.
- [36] E.A. Zaragoza-Contreras, E.D. Lozano-Rodríguez, M. Román-Aguirre, W. Antunez-Flores, C.A. Hernández-Escobar, S.G. Flores-Gallardo, A. Aguilar-Elguezabal, Evidence of multi-walled carbon nanotube fragmentation induced by sonication during nanotube encapsulation via bulk-suspension polymerization, *Micron* 40 (5–6) (2009 Jul–Aug) 621–627.
- [37] K. Aatre, J. Xie, L.F. Chen, J.K. Abraham, V.K. Varadan, Synthesis of vertically aligned carbon nanotubes, magnetic nanotubes, and magnetic CNTs for cellular growth and detection, *Proc. SPIE* 6931, Nanosensors and Microsensors for Bio-Systems 2008, p. 69310F.
- [38] P. Rai, S. Oh, P. Shyamkumar, M. Ramasamy, R.E. Harbaugh, V.K. Varadan, Nano-bio-textile sensors with mobile wireless platform for wearable health monitoring of neurological and cardiovascular disorders, *J. Electrochem. Soc.* 161 (2) (2014) B3116–B3150.

Multi walled carbon nanotubes modulate galvanotaxis in *Paramecium*

Juan Bernal-Martínez¹*, Rafael Godínez-Fernández¹ and Alfredo Aguilar-Elguezabal²

¹ Biophysical Laboratory. Electrical Engineering Department, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, C.P.09340, D.F., México. E-Mail: rgodinezfer@gmail.com (R.G-F)

² Department of Engineering and Chemistry of Materials, Centro de Investigación y Materiales Avanzados S.C. CIMAV, C.P. 31109, Chihuahua, México; E-Mail: alfredo.aguilar@cimav.edu.mx (A.A-E)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: drjuanbernal@hotmail.com (J.B-M); Tel.: +52 449-9718083

Abstract: Carbon nanomaterials, such as multi walled carbon nanotubes (MWCNT) have been proposed to possess high electrical conductivity, good cell membrane attachment and excellent properties as scaffold for cell growing. However, such nanomaterials may have low biocompatibility and toxic effect on living organisms. In this work we tested the effects of MWCNT on the cell survival and on the galvanotaxis response of the living unicellular organism *Paramecium tetraurelia*. First, we functionalized the MWCNT by acidic treatment and then we dispersed in aqueous media by using a non-ionic surfactant polyvinylpyrrolidone. Second, we found that after extracellular application of MWCNT to *Paramecium* (from 0.01 to 0.5 mg/mL and from 3 min to 72 h) the normal swimming behavior of the ciliates was not affected and such treatment did not kill de cells. Third, we found that MWCNT are incorporated into the *Paramecium* in an identified food vacuoles by a endocytosis-based phenomena. Four, we studied the possible toxic effect of MWCNT on a more specific functional membrane phenomena of *Paramecium* such as galvanotaxis. Galvanotaxis is the directed movement of cells induced by an applied voltage. We found that the galvanotaxis response in *Paramecium* was inhibited in a time and a dose-dependent manner by MWCNT. Our results suggest that *Paramecium* is a useful biological preparation for testing cytotoxicity of nanomaterials on physiological membrane process of living organisms.

Keywords: Protozoa; cell movement, nanomaterials, cytotoxicity; carbon nanotubes

1. Introduction

Carbon nanomaterial, such as multi walled carbon nanotubes (MWCNT) have been proposed to possess high electrical conductivity, good cell membrane attachment and excellent properties as scaffold for cell growing. However, such nanomaterials may have low biocompatibility and toxic effects on living organisms due to toxicity factors such as size, shape, purity, water solubility and functionalization [1-3]. The toxicity of carbon nanomaterials on lower organisms such as protozoan is still controversial [4-9]. Ghafari et al [4] working with *Tetrahymena thermophile*, showed that single-walled carbon nanotubes are internalized in this ciliated, possibly allowing the nanotubes to move up the food chain. Haga and Haneda [5] used *Paramecium* as a bioassay system for elucidation of cytotoxicity and biocompatibility of nanoparticles. They demonstrated that carbon nanofibers (CNF) are ingested and concentrated as nutritive bacteria. Clear cytotoxicity of CNF was detected in survival tests by extracellular application at extremely high concentration (up to 50 mg/mL). Haga [6] performed real-time observation of carbon nanotubes uptake in unicellular organism, *Paramecium*.

Zhu et al [7] studied the interaction of MWCNTs with living unicellular protozoan *Stylonychia mytilus*. They found that exposure of this protozoan to the MWCNTs with a concentration higher than 1.0 µg/mL induced a dose-dependent growth inhibition to the cells and damage the macronucleus and external membrane of the cells. Zhu et al [8] examined the influence of MWNT on the growth of the unicellular protozoan *Tetrahymena pyriformis*. Contrary to the findings from most other investigations, they found that MWNTs stimulated growth of the cells cultured in proteose peptone yeast extract medium.

Paramecium is the classic protozoan for the study of behavior in unicellular organisms [9-10]. The swimming behavior of *Paramecium* is controlled by the direction, frequency and three-dimensional features of the beating of cilia that cover the whole surface of the cell. The direction and frequency of the ciliary beat are correlated with changes in electrical potential across the cell membrane [10-12]. Galvanotaxis is the directed movement of cells induced by an applied voltage. This galvanotaxis response has been studied in many cell types from protozoan and invertebrate cells [18-25] to mammalian cells [13-17]. *Paramecium* exhibits galvanotaxis and swim toward the cathode [9, 10, 21, 22, 23,26].

It has been suggested that MWCNT interfere with the movement and cell migration of mammalian cells [39-41]. MWCNT produced an inhibition of cancer cell migration [39], affect the migration of microglia cells [40] and inhibit the migration fibroblast that participate in the wound healing process [41]. In this paper the ciliated protozoan *Paramecium tetraurelia* was used to examine the impact of MWCNT at the unicellular level. Here we reported that after exposure of *Paramecium* to MWCNT, the ciliate incorporate MWCNT inside the cells in a well identified food vacuoles and cells survived after 72 hours of MWCNT treatment. The intake of MWCNT by *Paramecium* was indeed modulated by an endocytosis based phenmena. In order to evaluate the effects of MWCNT on a more specific cellular process, galvanotaxis experiments were performed in control conditions and when *Paramecium* was exposed to different stimulus. Here we report that the galvanotaxis response in *Paramecium* is a calcium-dependent and a voltage-dependent phenomena. In addition we found that MWCNT applied at concentration from 10 fo 200 ug/mL inhibited the galvanotaxis response in *Paramecium* in a time-dependent and a dose-dependent manner. The possible mechanism of this inhibition of galvanotaxis produced by MWCNT in *Paramecium* is discussed.

2. Material and methods

2.1. Biological preparation

Paramecium tetraurelia (Carolina Biological, Catalogue # 131560) was used as biological preparation. It was cultured in artificial fresh water media made as follows: Stigmasterol 5 mg/mL of ethanol; Caseaminoacids 0.3 g/L.; KCl 4mM; CaCl₂ 1mM; MgCl₂ 100µM and MOPS 1mM; pH 7.3. Culture media was inoculated with *Enterobacter-sp* and kept at room temperature (22-23 °C) for 24 hours, before feeding the *Paramecium*. Cells were cultured in the inoculated culture media for 24 hours, then, cells were concentrated by centrifugation at 3500 rpm for 5 min. The pellet of cells was re-suspended in 4.1.1 *Paramecium* solution prepared as follows: KCl, 4 mM; CaCl₂, 1mM and Trizma, 1mM; pH 7.3. The final experimental solution contained about 1000 cells per 0.5 mL. The low calcium solution was prepared as follows (in mM): KCl, 4; MgCl₂. 1; Trizma, 1; total osmolarity of 12 mosmols; pH 7.3. This low calcium-solution was supplemented with a NiCl₂ solution at final concentration of 100 µM with the aim to block the voltage-dependent calcium channels present in the *Paramecium*

2.2. Preparation, functionalization and dispersion of MWCNT.

MWCNT were prepared by spray pyrolysis [24]. Briefly, MWCNT were grown inside of quartz tubing by spray pyrolysis of ferrocene/benzene under argon flow. MWCNT were obtained with an average diameter of 70 nm and length from 10-20 µm. MWCNT were functionalized by nitric acid-sulfuric acid treatment at a concentration of 4M and at 3:1 proportion. Polyvinylpyrrolidone (PVP-40)

from Sigma-Aldrich, was used as a dispersant for MWCNT in water solution, according with the following formulation: 1g PVP-40/100 mg of MWCNT/20 mL of deionized water. With the aim to facilitate the good dispersion and to diminishing the size of nanotubes [25], MWCNT stock solution (5 mg/mL) was sonicated for 30 min by using a sonicator model VWR-50T.

2.3. Scanning electron microscopy studies to demonstrate the dispersion of MWCNT.

Field emission scanning electron microscope (FESEM), Model JSM 5800, was used to evaluate the appropriate dispersion of MWCNT in 4.1.1 solution. A sample of 50 μ L of MWCNT (at 50 μ g/mL) was deposited on glass coverslip, dried at 60 °C in a convection oven for 30 min and covered with gold by the sputtering method before the observation of sample in the FESEM.

2.4. Evaluation of survival of *Paramecium* after MWCNT treatment.

Survival of *Paramecium* after MWCNT treatment was evaluated in two different approaches. First, cells were observed through an inverted microscope after treatment with MWCNT, at concentrations from 10 to 500 μ g/mL and after different time exposure from 3 minutes to 72 hours. The *Paramecium* swimming behavior and the survival of cells were observed with the microscope and these parameters were recorded for periods of approximately 60 seconds by using a digital USB microscope camera. Second, we used the Live-Dead cell viability assay kit, from Molecular Probes (Life Technologies) and the confocal microscopy technique to evaluate if MWCNT are incorporated into the *Paramecium* and to evaluate if MWCNT kill the cells. We used the Carl Zeiss confocal microscope, model LSM 710-ConfoCor 3 and used the program Zen 2012 for the analysis of results.

2.5. Study the mechanism of how MWCNT get into the *Paramecium*.

It has been suggested that nanoparticles can enter into living cells by endocytosis [33-36]. In order to evaluate the mechanism of how MWCNTs enter into *Paramecium*, we treated cells with a beta-adrenergic compound, propranolol, that specifically modulates and inhibits endocytosis in *Paramecium* [35, 36]. We treated cells with propranolol at 100 μ M concentration for 5 min before cells were treated with f-MWCNTs 100 μ g/mL. Then we observed the cells under inverted microscope and recorded their swimming behaviour by a digital USB-microscope camera to see if f-MWCNTs were incorporated inside the *Paramecium*.

2.5. Galvanotaxis experiments in *Paramecium*.

In this work we were interested to study the possible effects of MWCNT on the functional behavior of galvanotaxis of *Paramecium*. The experimental chamber used in the galvanotaxis experiments reported here was made by Plexiglas, mounted and cemented on a glass slide (55 x 22 mm). This chamber consist of 4 compartments. Compartments C1 and C2 were connected through a channel where the paramecia can swim and cross it. Capillary glass agar bridges filled with KCl 1M, were used to interconnect compartments A with C1 and B with C2. Silver-silver chloride electrodes (In Vivometric, Healdsburg, Cal. USA, cat # IVM-E207) allocated in compartments A and B where connected to the anode and cathode of a commercial DC battery. (see Figure 1a). All four compartments of the experimental chamber were filled out with normal 411 solution with a total osmolarity of 12 mosmols. Galvanotaxis stimulus protocol was performed as follows: we add 50 μ l of concentrated paramecia and distributed uniformly in both C1 and C2 chambers. This volume contained approximately 300-400 cells. Cells were exposed to electric fields at different voltages (1.5, 3, 6 and 9 volts) for 60 seconds. Immediately after the voltage testing stimulus initiates, cells start swimming from chamber C1 (+, anode) and tend to migrate to chamber C2 (-, cathode), see Figure 1b. Cells were observed through a stereoscopic microscope (Meiji EMZ-TR). Only cells that swam and cross the barrier between C1 and C2 chambers, were considered to have a galvanotaxis response and

were counted by a hand tally counter type H102-4. The time of stimulus was monitored by a timer stopwatch (Fischer Scientific).

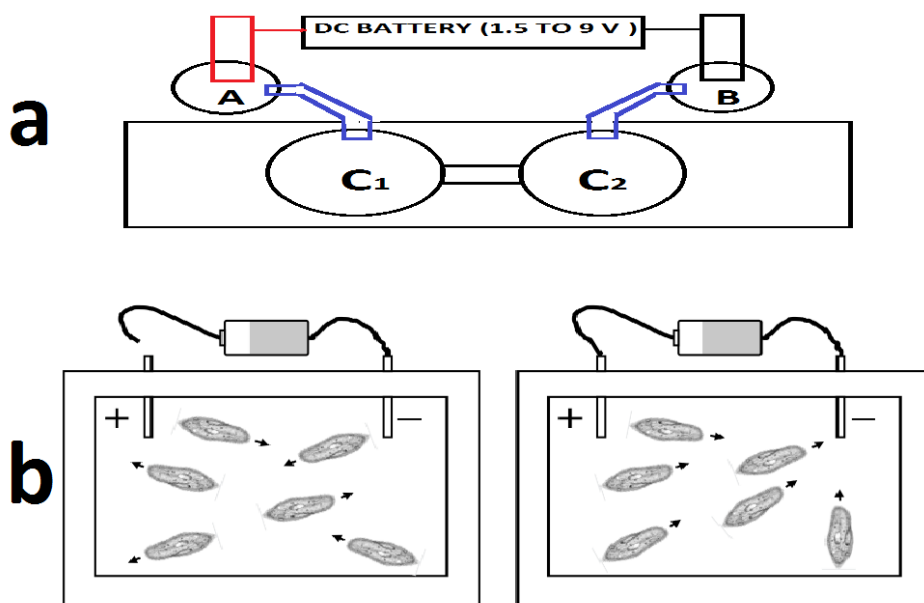


Figure 1. Experimental set-up of galvanotaxis experiments *in Paramecium*. in a) is represented the chamber used in the experiments reported here. In b) is represented a cartoon that shows the directed movement of cells to the cathode induced by an applied voltage. This happened only while the battery is connected.

3. Results

3.1. Water solubility of MWCNT

Figure 2 displays scanning electron microscopy micrographs to demonstrate the topographic distribution of MWCNT treated with PVP-40 and dissolved in 4.1.1 *Paramecium*. In these experiments the final concentration of MWCNT was 50 $\mu\text{g/mL}$. Although most of carbon nanomaterials are not dispersible in water, in this work we found that the mechanical treatment of sonication, along with the addition of PVP-40 as a dispersant, facilitates the dispersion of functionalized MWCNT. As it can be observed in Figure 2, MWCNT are not aggregated and are totally dispersed in 4.1.1 solution. Moreover, it was possible to identify isolated carbon nanotubes and to measure their diameters (Fig. 2-B).

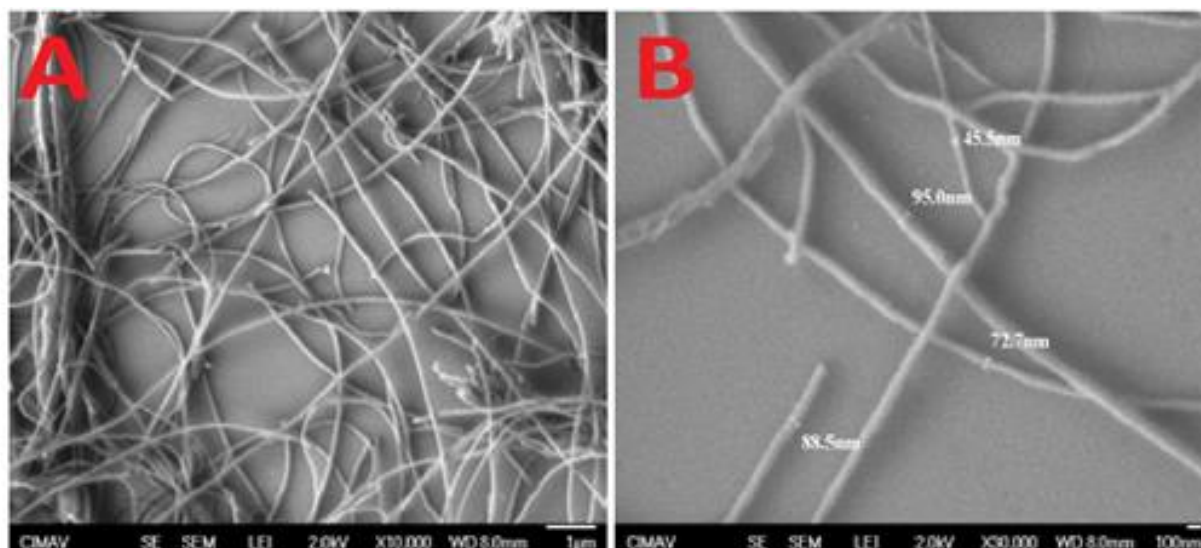
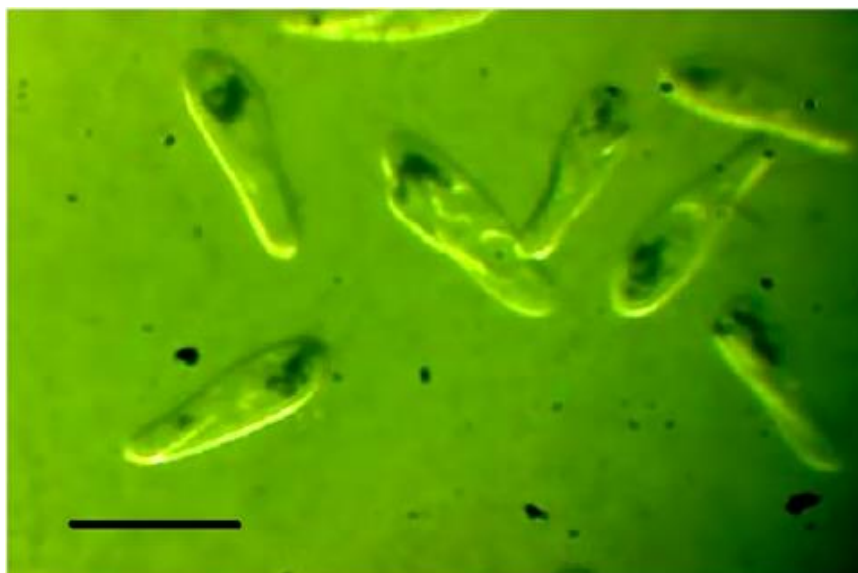


Figure 2. Scanning Electron Microscopy studies to demonstrate the topographic distribution of MWCNT at 1:100 dilution dispersed in 4.1.1 *Paramecium* solution. A) at 10,000X and B) at 30000X magnifications respectively. Scale bar in A is 1 μ m. Scale bar in B is 100nm.

3.2. Effect of f-MWCNT on *Paramecium*

We treated *Paramecium* with MWCNT according with the following procedure: we took a drop of 30 μ L of solution which contained concentrated *Paramecium* (about 1000 cells per 0.5 mL) and deposited it on a glass slide. Then, we added 10 μ L of MWCNT solution (at different concentration from 10 to 500 μ g/mL). Also, we added 10 μ L of Protoslo (methylcellulose, Caroline Biological) in order to slowdown the swimming of ciliates. Then, the final volume of the drop was 50 μ L. In some experiments, besides the MWCNT solution, we added 10 μ L of propranolol at different concentrations (from 10 to 100 μ M). We recorded the swimming behaviour of cells by using an USB digital camera incorporated in the microscope. After *Paramecium* was treated with MWCNT, we observed that MWCNT were ingested by the *Paramecium* in well identified food vacuoles immediately nanotubes were applied. *Paramecium* treated with MWCNT at different concentrations (from 10 to 500 μ g/mL) and for different periods of time (from 3 minutes to 72 hours) they incorporated inside the cells the MWCNT and the ciliates remained alive and swam normally. The amount of MWCNT incorporated inside the *Paramecium* was dependent on the time exposure and the concentration used. In Figure 3 we present a picture of *Paramecium* treated with f-MWCNT at 100 μ g/mL and after 15 minutes of f-MWCNT exposure. The insert in Fig. 3 is the complete video of the experiment.



Video 1-avi-15 min After MWCNTs treatment on *Paramecium*.avi

Figure 3. Intra-cellular incorporation of MWCNT by *Paramecium*. The picture represents an image of *Paramecium* after 15 min treated with MWCNT at 100 $\mu\text{g/mL}$. This image was taken at 11 seconds of video). Scale bar 100 μm . In the insert is shown the complete video of the *Paramecium* swimming behaviour after 15 min of treatment with MWCNT.

Although the results presented above, indicate that *Paramecium* treated with MWCNT is did not modified their swimming behaviour and the survival of cells, we performed experiments to demonstrate that effectively MWCNT did not kill the *Paramecium*. We used the Live-Dead cell viability assay kit (Molecular Probes, Life Technologies) for the staining of cells treated with MWCNT. This Live-Dead cell viability assay fluorescent kit is based in fluoro chromes that indicate live (in green) or dead (in red) cells. We used a confocal microscope (Carl Zeiss, model LSM 710-ConfoCor 3) to evaluate if MWCNTs are incorporated into the *Paramecium* and to evaluate if MWCNT kill the cells. Figure 3 displays confocal micrographs of the survival of cells and the topographic distribution of MWCNT inside *Paramecium* after 30 minutes of incubation with MWCNT at high concentration (100 $\mu\text{g/mL}$). The nanotubes were identified as black spots inside the identified green living cells, Figure 4a and Figure 4c. Only green cells were observed, which means that cells survived after treatment of MWCNT. As it can be observed, no red cells (dead cells) were observed in Figure 4b. Based in these results, we concluded that -MWCNTs did not kill the cells.

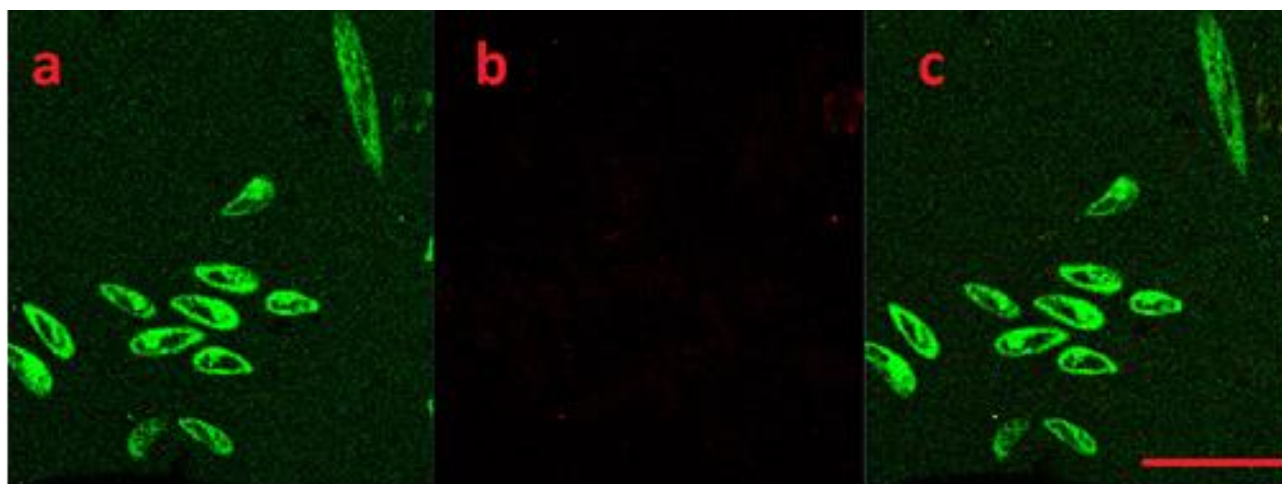
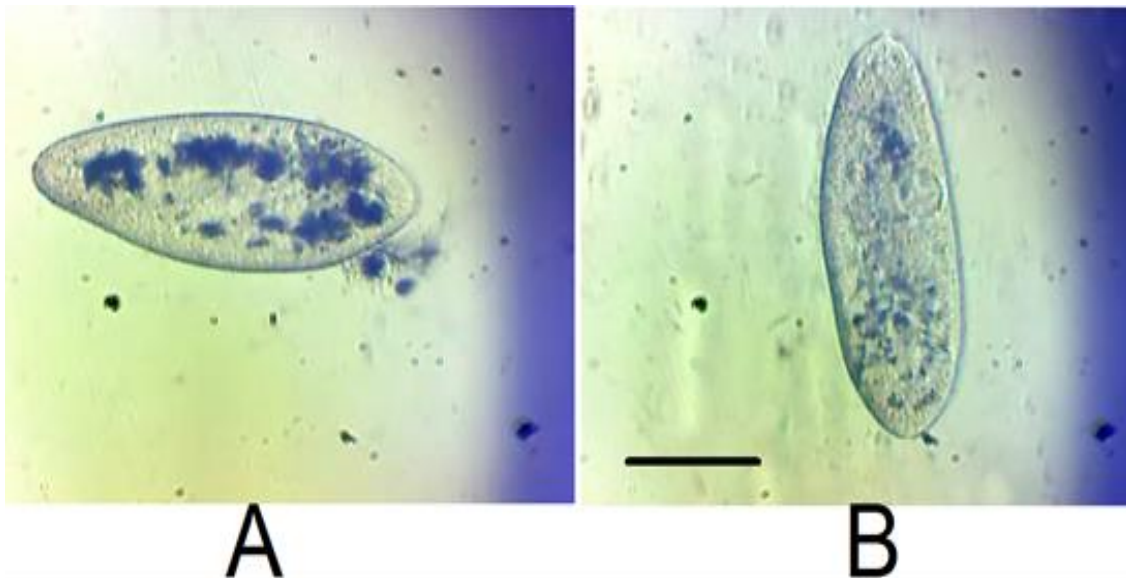


Figure 4. Effect of f-MWCNT on the survival of *Paramecium*. Confocal microscopy micrographs demonstrate the survival of cells and the distribution of f-MWCNT inside the *Paramecium*. a) living cells (in green). b) dead cells (in red). c) is the combination of a+b. Scale bar 200 μm .

3.3. MWCNT are incorporated into *Paramecium* by an endocytosis base-phenomena.

It has been suggested that nanoparticles can enter into living cells by endocytosis [33, 34, 35 and 36]. In order to evaluate the mechanism of how MWCNT get into *Paramecium*, cells were treated with propranolol. Propranolol is a beta-adrenergic compound that specifically modulates endocytosis in *Paramecium* [35, 36]. We studied the possible effect of propranolol on the incorporation of MWCNT by *Paramecium*. Figure 5 displays the topographic distribution of MWCNT inside *Paramecium* in control conditions (Fig. 5-A) and when cells were treated with propranolol (Fig. 5-B). In Figure 5A it shows the accumulation of carbon nanotubes in black spots inside the *Paramecium* after 15 minutes of MWCNT treatment (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). In Figure 5B, it is shown the *Paramecium* treated with MWCNT (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 100 μM of propranolol, after 15 min of incubation. It is observed that propranolol (a specific inhibitor of endocytosis of *Paramecium*), inhibits the incorporation of MWCNT inside the *Paramecium*. The results presented here indicate that MWCNT enter into the cells, not only for their intrinsic hydrophobic properties or by simple diffusion through the membrane. It's more likely that these nanotubes enter into the cells by a cellular process named endocytosis.



VIDEO 2A- avi-Effect of MWCNTs 100 ug-mL x 15 min on PARAMECIUM.avi

VIDEO 2B-avi- Effect of MWCNTS 100 ug-mL + PROPRANOLOL 100 uM x15 min on PARAMECIUM.avi

Figure 5. Topographic distribution of f-MWCNT inside the Paramecium after propranolol treatment. In A, the accumulation of carbon nanotubes is observed in black spots after 15 min of treatment with f-MWCNTs at 100 µg/mL. In B, same treatment with f-MWCNTs (100 µg/mL) + Propranolol, 100 µM, here the f-MWCNTs are not observed inside the cell. Scale bar 50 µm. In the bottom of A and B the complete video of Paramecium behavior is presented in control conditions and after propranolol treatment.

3.4. Galvanotaxis in Paramecium is a voltage-dependent and calcium-dependent process.

We tested the effect of different voltages on the galvanotactic movement of *Paramecium tetraurelia*. Cells were exposed to dc electric fields at different voltages (1.5, 3, 6 and 9 volts) for 60 seconds by using commercial batteries. After the testing stimulus initiates, cells started swimming from anode (+) and tend to migrate to cathode (-). Cells that crossed the barrier between chambers C1 and C2 (see Figure 1) were counted as cells moved to cathode. No migration of cells was observed with 0 V applications. However, a significant increase of cells moved to the cathode was observed with 1.5 V. A much greater amount of the cells moved to cathode was observed with 3, 6 and 9 V stimulus application, see Fig. 6.

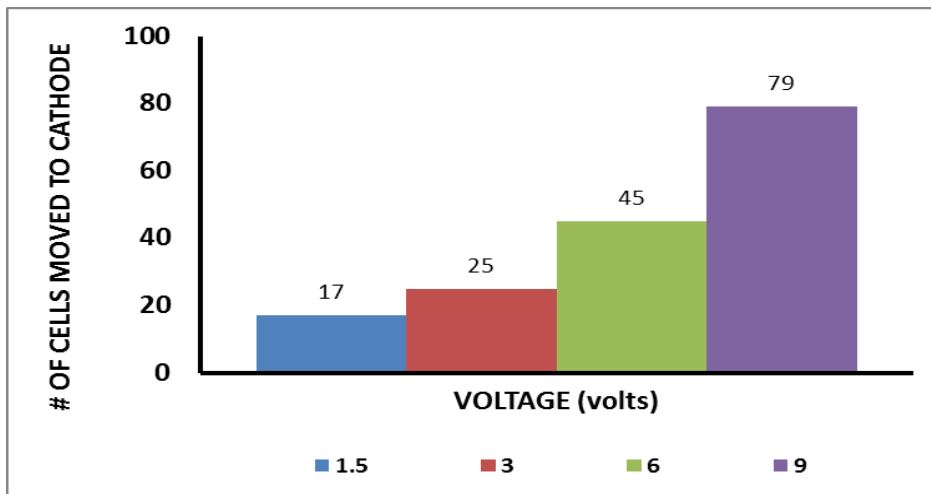


Figure 6. Galvanotaxis response of *Paramecium tetraurelia* elicited at different voltage stimulus.

In another series of experiments, the galvanotaxis response of *Paramecium tetraurelia* was tested in control conditions (4.1.1 solution) and in low-calcium solution, when cells were stimulated with 6 V for 60 seconds. It was observed that the amount of cells moved to the anode was diminished after cells were exposed and treated with low calcium solution. (See figure 7). Because paramecia cells applied to the experimental chambers are obtained from the normal culture media, there is the possibility that the extracellular media in these experiments was contaminated by an indeterminate amount of calcium. Therefore, in another series of experiments the low-calcium extracellular media was supplemented with a conventional calcium channel blocker, NiCl₂, at concentrations 100 μM. In both experimental conditions, it was observed that the galvanotaxis response was inhibited for approximately 90%.

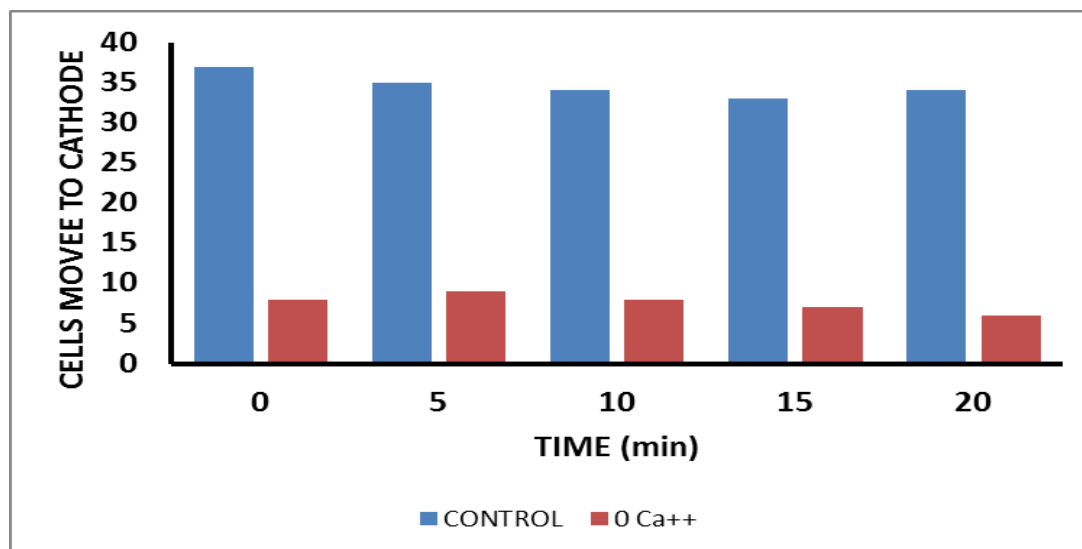


Figure 7. Galvanotaxis response of *Paramecium* in control 4.1.1 solution, in blue; and in low-calcium solution, in red, when cells were stimulated with 6 V for 60 seconds

3.5. Galvanotaxis in *Paramecium* is modulated by MWCNT in a time and dose-dependent manner.

After we have demonstrated that MWCNT have a direct interaction with the ciliated *Paramecium* and that these MWCNT are indeed incorporated inside the cell, we decide to evaluate the possible cytotoxic effect of MWCNT on the galvanotaxis behavior of the protozoa. We performed galvanotaxis experiments in control conditions and when cells were exposed to MWCNT at different concentrations (10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$). Experiments were performed according with the protocol described previously (see Material and methods, section 2.5). Chambers C1 and C2 were filled with 400 μl of 411 solution and then we add 50 μl of 411 solution containing concentrated *Paramecium*. We add 50 μl of 411 solution for control experiments and 50 μl of solution containing MWCNT for testing experiments. Stimulus of 6 volts during 60 seconds were applied from 6 volts battery every 3 minutes. Experiments were repeated four times at different MWCNT concentration. As it can be observed in Figure 8, the galvanotaxis response of *Paramecium* was inhibited in a dose-dependent manner by MWCNT. These nanomaterials reduce dramatically the amount of cells moved to the cathode (from 20 to 90% of inhibition comparing with the control) depending on the amount of MWCNT applied.

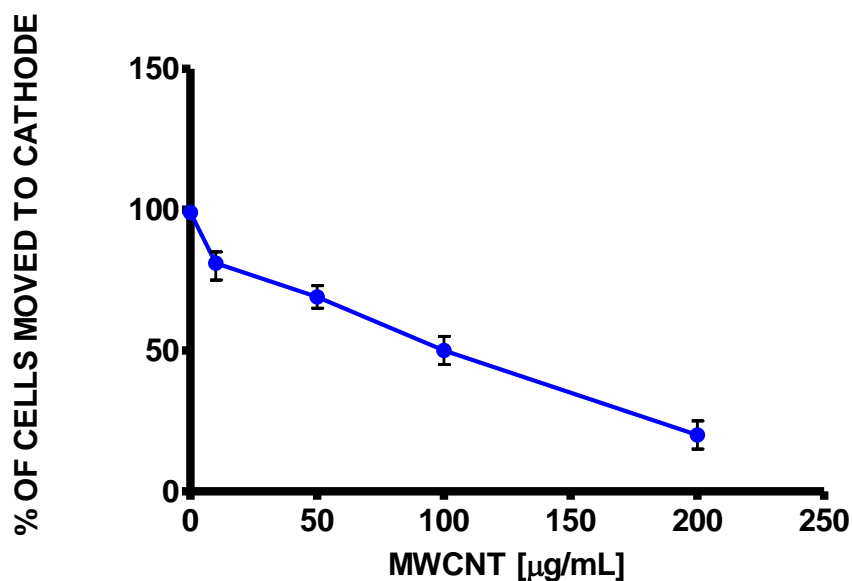


Figure 8. Effect of MWCNT at different concentrations on the galvanotaxis response of *Paramecium*. Galvantaxis response was produced by dc stimulus at 6 volts for 60 s in control conditions and when cells were treated with f-MWCNT at different concentrations from 20 to 200 µg/mL. Symbols are the average of 4 different experiments and bars are SD.

With the aim to confirm the inhibitory effect of MWCNT on the galvanotaxis response of *Paramecium*, we applied dc stimulus at different voltages (1.5, 3 and 6 volts) for 60 seconds each, in control conditions and when cells were treated with MWCNT at higher concentration (100 µg/mL). As it can be observed in Figure 9, in control conditions the amount of cells moved to cathode is dependent of the intensity of DC stimulus. It means that while the voltage stimulus increased, the amount of cells moved to cathode increased. However, in experimental condition, when cells were treated with MWCNT the amount of cells moved to cathode is reduced after 15 min or 30 min of MWCNT treatment.

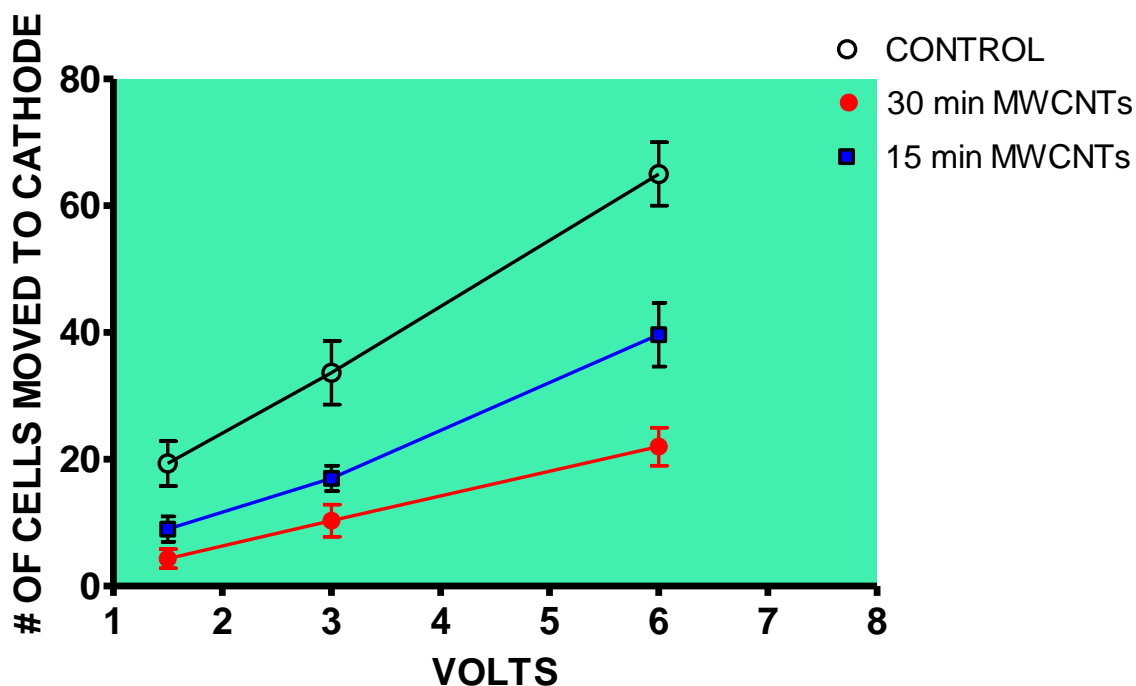


Figure 9. Effect of MWCNT on the galvanotaxis response of *Paramecium* tested at different dc stimulus and different time exposure. Galvanotaxis response was produced by dc stimulus at different voltages (1.5, 3 and 6 volts) for 60 s, in control conditions and when cells were treated with MWCNT at 100 $\mu\text{g/mL}$. Symbols are the average of 5 different experiments and bars are SD.

4. Discussion

Synthesized pristine MWCNT have hydrophobic surface and poor dispersion stability. MWCNT tend to agglomerate hindering their dispersion in solvents or aqueous media and it makes difficult to use them in biological systems [1]. MWCNT can be surface engineered and functionalized in order to enhance their dispersion in the aqueous phase or to provide the appropriate functional groups that can bind specific therapeutic drugs and molecules [1-3, 42]. The overall objective of functionalizing CNTs for biomedical applications is to increase their solubility or dispersion in biocompatible (aqueous) media, thereby reducing their toxic effects. [42, 43, 44]. In this work we were able to functionalize MWCNT by acidic treatment (see Material and methods). However, this acidic treatment was not enough to have stable dispersion of MWCNT. We tested different solutions such as dimethylformamide (DMF), absolut alcohol, Pluronic F-127 in dionized water, Alcohol-Acetone 70/30 % and PVP-40 in dionized water in order to improve dispersion of nanotubes. We observed that only DMF and PVP-40 make good dispersion of MWCNT because after 7 days of setting the vials, these solutions were well dispersed without any precipitation. (data not shown). When we applied these dispersed solution to the *Paramecium* we found that DMF-MWCNT solution was very toxic to the ciliate and kill them immediately; contrary to de PVP-40/MWCNT, which did not affect the cells survival after 72 hrs of exposure even so at relatively high concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$ of MWCNT. Therefore, in all experiments reported here the MWCNTs dispersed in PVP-40 solutions were used. Because it has been suggested that mechanical ultrasound treatment of MWCNT improves their dispersion [38, 41, 42 y 43], the MWCNT dispersed in PVP-40 water solution were sonicated for 30 min before their application to the cells. In order to demonstrate the good dispersion of MWCNT, scanning electro-microscopy studies were performed. As it can be observed in Figure 2, MWCNT were not agglomerated. Moreover, we were able to identify the well dispersed and isolated individual MWCNT and measure their diameters (see Figure 2-B).

Application of MWCNT to the *Paramecium* at concentration from 5 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ did not modified the normal swimming behavior of the ciliate, neither kill the cells as it can be observed in Figures 3 and Figure 4. MWCNT can be observed as nano-micro-spots dispersed in the extracellular media and black spots accumulated inside the cells in a well identified phagosome and food vacuoles (See Figure 3, video 1; Figure 4 and Figure 5, video 2A). The nanotubes remain inside the cells for long period of time and it was observed that the content of the phagosome is released in the posterior part of the cell as fecal pellets. In this work we demonstrate that functionalized carbon nanotubes are indeed incorporated inside the cells without killing the cells This intake of MWCNT was not due to the intrinsic hydrophobic properties of the nanotubes, but rather due to a physiological membrane phenomena defined as endocytosis (See Figure 5B and video 2B). The results reported here are similar with previous results reported by others working with *Paramecium* and other ciliates [4,6,7 and 8] and other type of nanoparticles [5, 45, 46] in terms of uptake, localization and clearance of nanoparticles. The novelty of these findings presented here underlie in the low toxicity of nanomaterials such as MWCNT, which were efficiently dispersed and functionalized; contrary to the uses of same nanomaterials reported by others [4-8, 46].

Galvanotaxis experiments were performed in *Paramecium tetraurelia*. Cells were exposed to dc electric fields at different voltages (1.5, 3, 6 and 9 volts) for 60 seconds in an experimental configuration described in the section 2.5 of material and methods, which is accordance with the experimental approach described and done by others [16-24]. No migration of cells was observed with 0 V applications. However, a significant increase of cells moved to the cathode was observed with 1.5 V. Moreover, much greater amount of the cells moved to cathode was observed with 3, 6 and 9 V stimulus application, which demonstrates that galvanotaxis response in *Paramecium* is a voltage-dependent process (see Fig. 6).

In other experiments, the galvanotaxis response of *Paramecium* was tested in control conditions (4.1.1 normal solution) and in low-calcium solution, when cells were stimulated with 6 V for 60 seconds. It was observed that the amount of cells moved to the cathode was diminished after cells were exposed and treated with low calcium solution (see Fig. 7). When the low-calcium extracellular media was supplemented with a conventional calcium channel blocker, NiCl_2 , at concentrations of 100 μM , the galvanotaxis response was inhibited almost 100% (data not shown), which demonstrate that the galvanotaxis response in *Paramecium* is a calcium dependent process phenomena and these results are in accordance with similar results reported by others [26-28].

After we have demonstrated that MWCNT interact with the ciliated *Paramecium* and that these MWCNT are indeed incorporated inside the cell (see Figs. 3, 4 and 5), we evaluated the effect of MWCNT on the galvanotaxis behavior of the protozoa. Galvanotaxis experiments in control conditions and when cells were exposed to MWCNT at different concentrations (10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were performed. The galvanotaxis response of *Paramecium* was inhibited in a dose-dependent manner by MWCNT. These nanomaterials reduce dramatically the amount of cells moved to the cathode (from 20 to 90% of inhibition comparing with the control) depending on the amount of MWCNT applied (see Fig. 8). To confirm the inhibitory effect of f-MWCNT on the galvanotaxis response of *Paramecium*, the galvanotaxis response was elicited by the application of different voltages (1.5, 3 and 6 volts) for 60 seconds each, in control conditions and when cells were treated with MWCNT at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 15 min and 30 min. MWCNT reduced the amount of cells moved to cathode after 15 min or 30 min exposure in all voltage tested (see Fig. 9). Because the galvanotaxis response in *Paramecium* is a calcium dependent process phenomena reported here and by others [26-28], the inhibitory effect of f-MWCNT on the galvanotaxis response of *Paramecium* could be explained by blocking the calcium influx of the *Paramecium* during the galvanotaxis. However, more direct experiments have to be performed in order to test if MWCNT block the voltage-dependent calcium channels of *Paramecium*.

5. Conclusions

In conclusion, here we provide experimental evidence that demonstrate that f-MWCNT are well dispersed in biological aqueous solution such as *Paramecium* 4.1.1 solution. Although we have demonstrated that f-MWCNTs get inside the cells, not due to the intrinsic hydrophobic properties of the nanotubes, but rather due to a physiological membrane phenomena defined as endocytosis, we conclude that f-MWCNTs do not have a major toxic effect on *Paramecium* because they did not kill the cells. However when we look at a more specific cellular phenomena rather than just the normal swimming behavior of *Paramecium*, we found that f-MWCNT do have a specific toxic effect on *Paramecium* because they inhibited its physiological galvanotaxis response in a time and dose-dependent manner.

Acknowledgments

Juan Bernal-Martinez received a Scholar Fellowship from The National Council of Science and Technology (CONACYT-México) to support this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Madani SY, Mandel A, Seifalian AM. A concise review of carbon nanotube's toxicology. *Nano Rev.* **2013**, 3;4.
2. Ong LC, Chung FF, Tan YF, Leong CO. Toxicity of single-walled carbon nanotubes. *Arch Toxicol.* **2014** Oct 2.
3. Jackson P, Jacobsen NR, Baun A, Birkedal R, Kühnel D, Jensen KA, Vogel U, Wallin H. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. *Chem Cent J.* **2013**, 13;7(1):154.
4. Ghafari P., St-Denis C., Power M.E. , Jin X., Tsou V., Mandal H.S., Bols N.C. and Tang X. Impact of carbon nanotubes on the ingestion and digestion of bacteria by ciliated protozoa *Nanotechnology* **2008**, 3, pp. 347-351
5. Haga N. and Haneda K. *Paramecium* as a bioassay system for elucidation of cytotoxicity and biocompatibility of nanoparticles: effects of carbon nanofibers on proliferation and survival *Jpn. J. Protozool.* **2007**, 40, No. 2.
6. Haga N. Effect of micro/nanosizing of materials on cell and tissue reaction Real-time observation of carbon nanotubes uptake in unicellular organism, *Paramecium*. *Journal Bio Material*, **2006**, 24; 5;319-323.
7. Zhu Y, Zhao Q, Li Y, Cai X, Li W. The Interaction and Toxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes with *Stylonychia Mytilus*. *J. Nanosci. Nanotech*, **2006**, 6, 5, pp. 1357-64.
8. Zhu Y, Ran T, Li Y, Guo J, Li W. Dependence of the cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes on the culture medium. *Nanotechnology.* **2006** 28;17(18):4668-74.
9. Jennings H. S., **1906**, Behavior of the Lower Organisms. Indiana University Press, Bloomington, Indiana.
10. Hinrichsen RD, Schultz JE. *Paramecium*: a model system for the study of excitable cells. *Trends Neurosci.* **1988**;11(1):27-32.
11. Eckert R, Naito Y. Bioelectric control of locomotion in the ciliates. *J Protozool.* **1972**;19(2):237-43.
12. Bernal J, Kelsey AM, Ehrlich BE. GTP-gamma-S increases the duration of backward swimming behavior and the calcium action potential in marine *Paramecium*. *J Exp Biol.* **1991**;155:505-18.
13. Thompson DM, Koppes AN, Hardy JG, Schmidt CE. Electrical stimuli in the central nervous system microenvironment. *Annu Rev Biomed Eng.* **2014** ;16:397-430.

14. Polak A, Franek A, Taradaj J. High-Voltage Pulsed Current Electrical Stimulation in Wound Treatment. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. **2014**;3(2):104-117.
15. Stock C, Ludwig FT, Hanley PJ, Schwab A. Roles of ion transport in control of cell motility. *Compr Physiol*. **2013**;3(1):59-119.
16. Mycielska ME, Djamgoz MB. Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease. *J Cell Sci*. **2004**;117(Pt 9):1631-9.
17. Tai G, Reid B, Cao L, Zhao M. Electrotaxis and wound healing: experimental methods to study electric fields as a directional signal for cell migration. *Methods Mol Biol*. **2009**;571:77-97.
18. Miller J.A. and Goldston L.S. Galvanotaxis of Paramecia: a study through the use of balances square waves of frequency thresholds in relation to current densities. *Ohio Journal of Science*, **1947**, 47; 3, 127-129; https://kb.osu.edu/dspace/bitstream/handle/1811/.../V48N06_230.pdf
19. Van Hoek AH, Sprakel VS, Van Alen TA, Theuvenet AP, Vogels GD, Hackstein JH. Voltage-dependent reversal of anodic galvanotaxis in *Nyctotherus ovalis*. *J Eukaryot Microbiol*. **1999**, 46(4):427-33.
20. Korohoda W, Mycielska M, Janda E, Madeja Z. Immediate and long-term galvanotactic responses of *Amoeba proteus* to dc electric fields. *Cell Motil Cytoskeleton*. **2000** 45(1):10-26.
21. Armus, H.L. and Montgomery A.R. Aversive and attractive properties of electrical stimulation for *Paramecium caudatum*. *Psychological Reports*. **2001**, 89, 342-344
22. Aonuma M, Kadono T, Kawano T. Inhibition of anodic galvanotaxis of green paramecia by T-type calcium channel inhibitors. *Z Naturforsch C*. **2007** 62(1-2):93-102.
23. Furukawa S, Karaki C, Kawano T. Micro-particle transporting system using galvanotactically stimulated apo-symbiotic cells of *Paramecium bursaria*. *Z Naturforsch C*. **2009**; 64(5-6):421-33.
24. Kisidayová S, Váradyová Z, Mihaliková K. Highly efficient galvanotaxis apparatus for cleaning and concentrating rumen ciliates. *Folia Microbiol (Praha)*. **2007**;52(6):637-40.
25. Sato MJ, Ueda M, Takagi H, Watanabe TM, Yanagida T, Ueda M. Input-output relationship in galvanotactic response of *Dictyostelium* cells. *Biosystems*. **2007**; 88(3):261-72.
26. Ogawa N, Oku H, Hashimoto K, Ishikawa M. A physical model for galvanotaxis of *Paramecium* cell. *J Theor Biol*. **2006**; 242(2):314-28.
27. Stock C, Ludwig FT, Hanley PJ, Schwab A. Roles of ion transport in control of cell motility. *Compr Physiol*. **2013**; 3(1):59-119
28. Borys P. The role of passive calcium influx through the cell membrane in galvanotaxis. *Cell Mol Biol Lett*. **2013**; 18(2):187-99.
29. Kucerova R, Walczysko P, Reid B, Ou J, Leiper LJ, Rajnicek AM, McCaig CD, Zhao M, Collinson JM. The role of electrical signals in murine corneal wound re-epithelialization. *J Cell Physiol*. **2011**; 226(6):1544-53.
30. Zhang J, Calafiore M, Zeng Q, Zhang X, Huang Y, Li RA, Deng W, Zhao M. Electrically guiding migration of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev*. **2011**; 7(4):987-96.
31. Tai G, Reid B, Cao L, Zhao M. Electrotaxis and wound healing: experimental methods to study electric fields as a directional signal for cell migration. *Methods Mol Biol*. **2009**;571:77-97.
32. Trollinger DR, Isseroff RR, Nuccitelli R. Calcium channel blockers inhibit galvanotaxis in human keratinocytes. *J Cell Physiol*. **2002**;193(1):1-9.
33. Oh N, Park JH. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine*. **2014**, 6;9 Suppl 1:51-63
34. Maruyama K. et al. Endocytosis of Multiwalled Carbon Nanotubes in Bronchial Epithelial and Mesothelial Cells. *Biomed Res Int*. **2015**;2015:793186.
35. Wiekaj J, Surmacz L, Wyroba E. Pharmacological attenuation of *Paramecium* fluid-phase endocytosis. *Folia Biol (Krakow)*. **2007**,55(3-4):95-100.
36. Wyroba E. Beta-adrenergic stimulation of phagocytosis in the unicellular eukaryote *Paramecium aurelia*. *Cell Biol Int Rep*. **1989** 13(8):667-78.

37. Aguilar-Elguezabal A., Antunez W., Alonso G., Delgado F.P., Espinosa F. and Miki-Yoshida, M. Study of carbon nanotubes synthesis by spray pyrolysis and model of growth. *Diam Relat Mater* . **2006** 15; 1329 – 1335.
38. Zaragoza-Contreras EA, Lozano-Rodríguez ED, Román-Aguirre M, Antunez-Flores W, Hernández-Escobar CA, Flores-Gallardo SG, Aguilar-Elguezabal A. Evidence of multi-walled carbon nanotube fragmentation induced by sonication during nanotube encapsulation via bulk-suspension polymerization. *Micron*. **2009** 40(5-6):621-7.
39. García-Hevia L, Valiente R, Fernández-Luna JL, Flahaut E, Rodríguez-Fernández L, Villegas JC, González J, Fanarraga ML. Inhibition of Cancer Cell Migration by Multiwalled Carbon Nanotubes. *Adv Healthc Mater*. **2015** 4(11):1640-4.
40. Villegas JC, Álvarez-Montes L, Rodríguez-Fernández L, González J, Valiente R, Fanarraga ML. Multiwalled carbon nanotubes hinder microglia function interfering with cell migration and phagocytosis. *Adv Healthc Mater*. **2014** 3(3):424-32.
41. Zhang Y, Wang B, Meng X, Sun G, Gao C. Influences of acid-treated multiwalled carbon nanotubes on fibroblasts: proliferation, adhesion, migration, and wound healing. *Ann Biomed Eng*. **2011** 39(1):414-26.
42. Sadegh H. and Shahryari-ghoshekandi R. Functionalization of carbon nanotubes and its application in nanomedicine: A review. *Nanomed. J*. 2015, 2(4): 231-248
43. Zhang Y, Bai Y, Yan B. Functionalized carbon nanotubes for potential medicinal applications. *Drug Discov Today*. 2010;15:428–435.
44. Vardharajula S, Ali SZ, Tiwari PM, et al. Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;7:5361-5374.
45. Mortimer M, Kahru A, Slaveykova VI. Uptake, localization and clearance of quantum dots in ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Environ Pollut*. 2014 Jul;190:58-64.
46. Mortimer M, Kasemets K, Vodovnik M, Marinsek-Logar R, Kahru A. Exposure to CuO nanoparticles changes the fatty acid composition of protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Environ Sci Technol*. 2011 Aug 1;45(15):6617-24.
47. Zhang S., Gao H and Bao G. Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. *ACS Nano*. **2015** Sep 22;9(9):8655-71.

ELECTRICAL RECORDINGS AND IMMUNOSTAINING OF ISOLATED HIPPOCAMPAL NEURONAL CELLS CULTURED ON MULTI WALLED CARBON NANOTUBE SCAFFOLD.

Juan Bernal-Martinez^{*,1}, Laura Ballerini^{*}, Nicolo Pampaloni^{***}, Jummi Laishram^{***}
Rafael Godínez-Fernández^{*} and Alfredo Aguilar-Elguezabal^{**}.**

^{*} Laboratorio de Biofísica, Departamento de Ingeniería Eléctrica, UAM-I México D.F.

^{**}CIMAV, Centro de Investigación y Materiales Avanzados, Chihuahua, México.

^{***}SISSA, Centro de investigación y de estudios avanzados, Trieste, Italia

¹ e-mail: drjuanbernal@hotmail.com

Key words: Hippocampal neurons, Confocal microscopy, Intracellular recording, Multi walled carbon nanotubes, neuro-nanotoxicity.

Introduction:

Carbon nanotubes have been proposed to be good scaffolds for cell culture, tissue engineering and tissue repair [1] [2] [3]. However, there are controversial reports about the toxicity of carbon nanotubes and the suitability of such nanomaterials as functional scaffolds [4]-[10]. It seems to be that the toxicity of carbon nanotubes on living organisms is probably related with the size of nanomaterials, the methodology of synthesis, the functionality and the dispersion capacity in aqueous solutions. Kim et al. [4] reported that multi wall carbon nanotubes induced DNA damage and cytotoxicity in male's human peripheral blood lymphocytes. Montes-Fonseca et al. [5] found cytotoxicity of functionalized carbon nanotubes in J774A macrophages. Sachar et al. [6] reported a cytotoxic effect of single wall carbon nanotubes (SWCNTs) on erythrocytes in vitro and in vivo. However, Professor Ballerini and her group made an elegant work in which they reported that MWCNT were bio-compatible scaffolds for growing neuronal and myocardial mammalian cells [7] [8] [9] [10]. Fabbro et al. [7] [8] found that the adhesion to carbon nanotube conductive scaffolds forced the action-potential appearance in immature rat's spinal neurons; these findings allowed them to propose that carbon nanotubes could be used for neuroregeneration and repair. The objective of this paper is to evaluate the dispersion of MWCNT synthesized by spray pyrolysis and to evaluate the cytotoxic effects of these MWCNT on hippocampal neurons cultured on an MWCNT scaffold.

Material and methods:

Preparation of MWCNT.

MWCNT were prepared by spray pyrolysis (8). They were functionalized by nitric acid-sulfuric acid treatment 4M each at 3:1. Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) was used as a dispersant for MWCNT (1g PVP/100ug of MWCNT/20 ml of deionized water). Dispersed MWCNT were sonicated for 30 min by using a VWR-T-50 sonicator.

Preparation of the glass slide covered with MWCNT scaffolds.

On the surface of the slide (1.2 by 3 cm), we applied 20 ul of MWCNT (50 ug/mL) and let it dry at room temperature for 12 hr. The slide was cooked for 1 hr at 120 degrees in a convection oven. Later on we sterilized the MWCNT scaffold by uv exposure for 30 min.

Primary cultures and cell treatment

Hippocampal neurons were obtained from neonatal rats as previously reported. Dissociated hippocampal cells were seeded and plated (on poly-Lornithine-coated (Sigma Aldrich) or on MWCNT-coated glass coverslips and incubated at 37 °C, 5% CO₂ in culture medium. Cultured cells were used for experiments at 8 to 10 days in vitro,

Intracellular recording experiments.

Patch-clamp, whole cell recordings were obtained with glass micropipettes with a resistance of 4 to 8 M Ω . The intracellular pipette solution was the following (mM): 120 K gluconate, 20 KCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 2 MgCl₂, 2 Na₂ATP, pH 7.3. The external standard saline solution contained (mM): 150 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucose, pH 7.4. All recordings were performed at room temperature. Data was collected using a Multiclamp 700A Amplifier (Molecular Devices, USA), and analyzed using either Clampfit 10.3 (Molecular Devices) or Axograph (Axograph Scientific).

Ultrastructural characterization of MWCNT scaffolds.

Scanning Electron Microscopy (SEM) and Confocal microscopy (CM) studies were done to study the morphology and topographic distribution of MWCNT deposited over a glass coverslip. For the SEM studies, we used a SEM microscope, Model JSM 5800, LV, with tungsten filament, at a maximum resolution of 3.5 nm, with an accelerating voltage of 30 kV and with a magnification from 45 \times to 300,000 \times . All the samples studied with SEM were previously treated with gold by the sputtering method by using a Denton Vacuum Des II device.

Samples of MWCNTs deposited on glass coverslip and co-cultured hippocampal nerve cells were observed with a confocal microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Several images were acquired at 23 \times and 63 \times of magnification and serial confocal planes (zstack) were acquired every 10 - 100 nm across the entire 2D configuration. MWCNTs were visualized by using the reflection mode property of the microscope, during the confocal acquisition.

Immunostaining of Hippocampal neuronal cells cultured on MWCNT substrate.

Cultures were fixed in 4% formaldehyde (prepared from fresh paraformaldehyde) in PBS for 20 min, permeabilized with 0.3% Triton-X-100 and subsequently incubated with primary antibodies for 30 min at RT and after washing in PBS incubated with secondary antibodies for 45 min. Cultures were then mounted with the Vectashield (Vector Laboratories) on 1 mm thick microscope glass slides. To visualize hippocampal neuronal cells, they were immunostained with DAPP neuronal Tubulin on red, GFAP A-488 for glial cells on green, DAPI in Cyan Blue for nucleous (of neurons and glial cells). White-gray color for carbon nanotubes were observed without stain in the the reflection mode of the confocal microscope. All images were acquired using an inverted confocal Microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany; 40 \times oil immersion objective, 1.25 NA). Fluorescence signals were quantified using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Results and discussion.

Figure 1 displays scanning electron microscopy micrograph to demonstrate the topographic distribution of MWCNT dissolved in dionized water at different dilutions. Although most carbon nanomaterials are not dispersible in water, in this work we found that the mechanical treatment of sonication with the addition of PVP-40 as a dispersant, facilitates the dispersion of functionalized MWCNT. As it can be observed in Figure 1, MWCNT are not aggregated and are totally dispersed in dionized water.

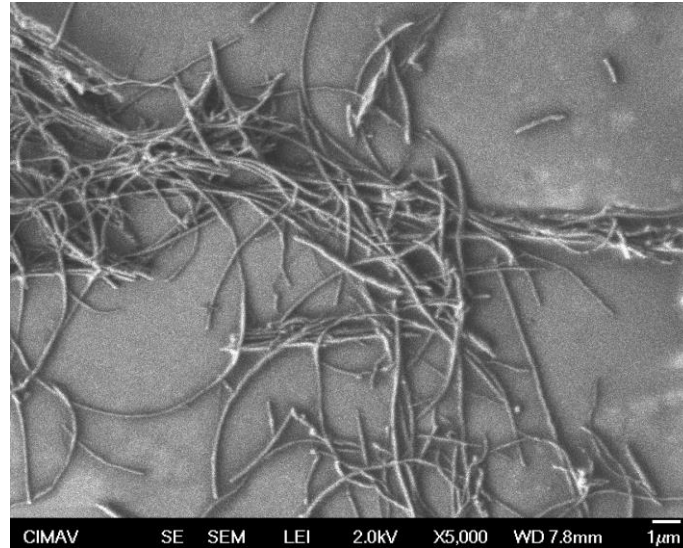


Figure 1. Scanning Electron Microscopy studies to demonstrate the topographic distribution of MWCNT dissolved in 4.1.1 solution at 1:100 dilutions. Scale bar 1 μ m.

This good dispersion of MWCNT was corroborated when they were deposited on a glass coverslip and analyzed with confocal microscopy in the reflection mode, see Figure 2. Independent nanotubes can be identified. They are not aligned and are distributed randomly.

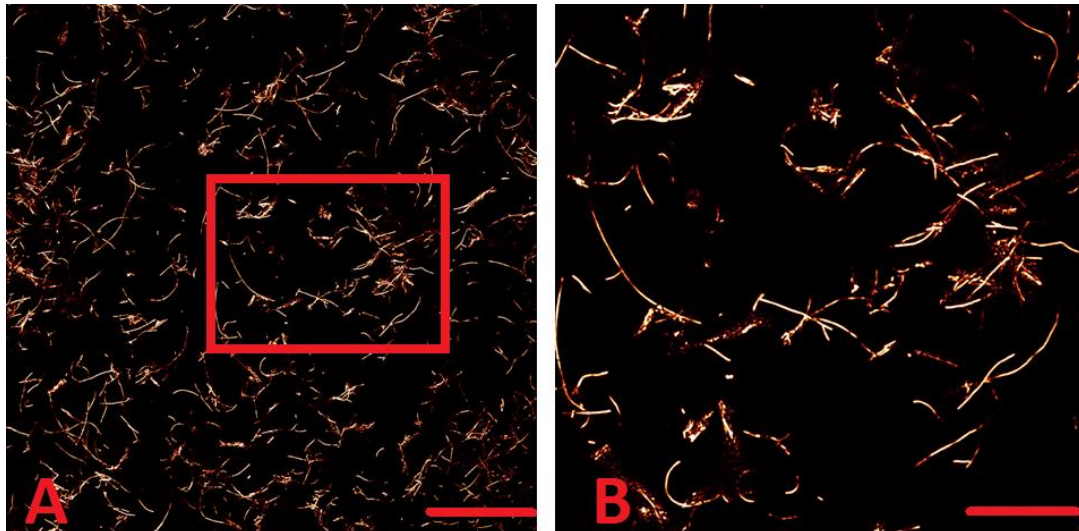
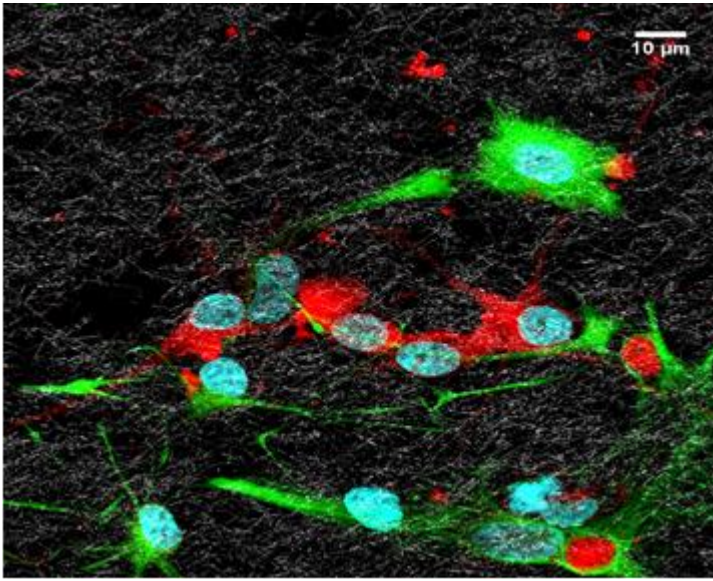


Figure 2. MWCNTs (0.05 mg/dL) in aqueous media were deposited on glass coverslip and observed with the confocal microscope in the reflection mode at 460 nm. B is the zoom amplification from insert of A. Scale bar 10 μ m.

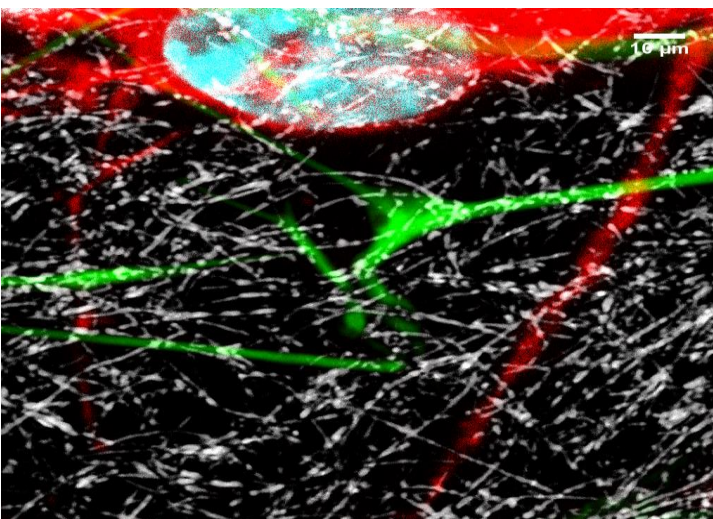
Immunostaining of hippocampal neuronal cells cultured on MWCNT substrate was done. As it can be observed in Figures 3 and Figure 4, hippocampal cultured neuronal cells (nerve cells and glial cells) were clearly visualized. Neuron and their dendritic ramifications were observed in red when they were immunostained with DAPP for neuronal Tubulin. GFAP A-488 staining in green the glial cells. DAPI in Cyan Blue staining the nucleus (from neurons and glial cells). White-gray

color for carbon nanotubes were observed without stain in the reflection mode of the confocal microscope. All images were acquired using an inverted confocal Microscope.



PP20-5 img 3 movie.avi

Figure 3. Confocal micrograph of hippocampal neurons cultured on MWCNT substrate. DAPP neuronal Tubulin on red for neuronal cells, GFAP A-488 for glial cells on green. DAPI in Cyan Blue for nucleus (both neurons and glia). White-gray color for carbon nanotubes in the reflection mode. (PP-20-5- May 30-2014) Scale bar 10 μm. On the right, there is a movie containing different micrographs taken at different depth levels from the top to the bottom of culture.



PP20-5 img 3 zoom movie.avi

Figure 4. On the left, Hippocampal neurons cultured on MWCNT substrate. Zoom magnification. DAPP neuronal Tubulin on red, GFAP A-488 for glial cells on green. DAPI in Cyan Blue for nucleus. White-gray color for carbon nanotubes in the reflection mode. (PP-20-5- Niccolo's samples May 30-2014). Scale bar 10 μm. On the right, there is a movie containing different micrographs taken at different depth levels from the top to the bottom of culture.

Intracellular recording experiments in patch-clamp and whole cell recordings configuration were done to evaluate the electrical and synaptic activity of a single isolated hippocampal neuron on a pair of hippocampal neurons. Figure 5 shows an hippocampal neuron patch-clamped in current clamp modality, stimulated through 1nA train pulses at 20 Hz, followed by the single recovery pulse. Note the ability of this cell to respond at current pulses with very wide action potentials.

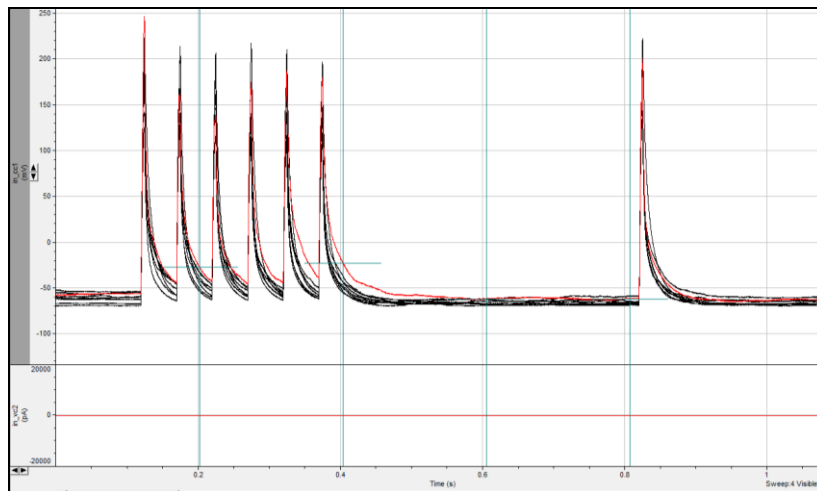


Figure 5. Action potentials of a single hippocampal neurons elicited by a 20 Hz stimulus followed by a recovery pulse after 400 ms.

Intracellular recording experiments in a pair of hippocampal neurons were recorded. As it can be observed in Figure 6, by stimulating the presynaptic cell with a pair of 1nA pulses evoked two spikes (top traces, figure 6) and such presynaptic spikes evoke GABA-mediated currents into the postsynaptic neuron (bottom traces, figure 6). The delay between the presynaptic spike and the postsynaptic inward current (around 3 ms) indicates a monosynaptic connection.

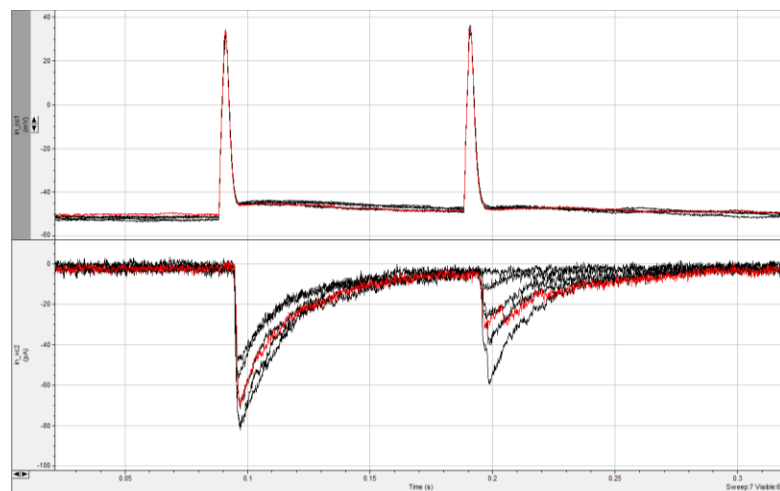


Figure 6. Intracellular recording experiments in a pair of hippocampal neurons. Top traces are the action potentials of the presynaptic cell stimulated with a repetitive pair of 1nA pulses. Bottom traces are the evoked GABA-mediated currents into the postsynaptic neuron.

In Figure 7 is showed the intracellular recordings of a pair of hippocampal neurons. The membrane potential of the presynaptic cell was held at around -30 mV. Top traces of figure 7A show the presynaptic action potential elicited by a double current stimulus. The bottom traces in Figure 7A show a pair of evoked Glutamate-mediated Postsynaptic currents activated by the presynaptic stimulation. Here, the delay between the presynaptic action potential and the postsynaptic currents is around 5 msec, indicating a synaptic connection. Figure 7B presents records from the same pair of hippocampal cells in which a 20 Hz presynaptic cell stimulation and

a «recovery pulse» after 400 ms evoked synchronized postsynaptic glutamate currents in the postsynaptic neuron.

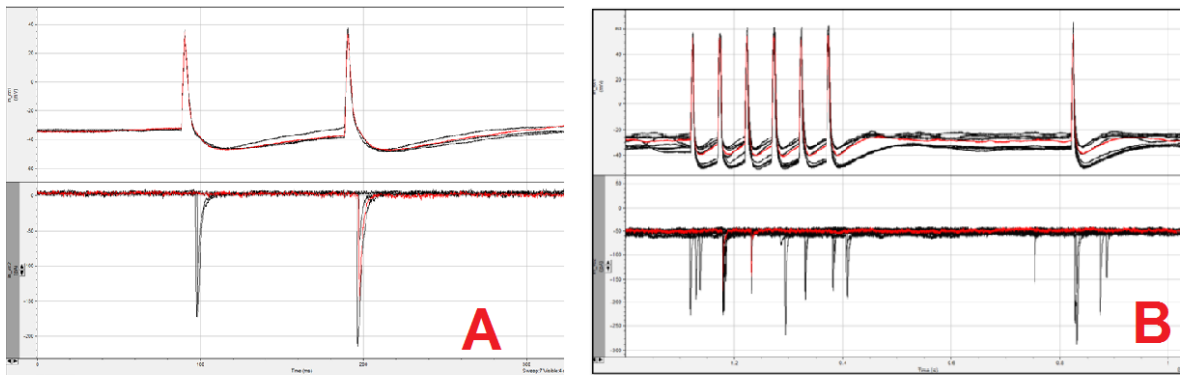


Figure 7. Presynaptic stimulation elicited the Glutamate-mediated Postsynaptic currents in a pair of hippocampal neurons.

In Figure 8 is presented a hippocampal neuron patch-clamped. We can appreciate the presence of both GABA- and Glutamate-mediated postsynaptic currents even in absence of presynaptic firing, which indicates the presence of other inputs to the cell. In the insert presented in B, both Gaba and Glutamate postsynaptic currents can be identified by the size of the current (Gaba-currents, around 30-40 pA and Glutamate currents around 100-120 pA).

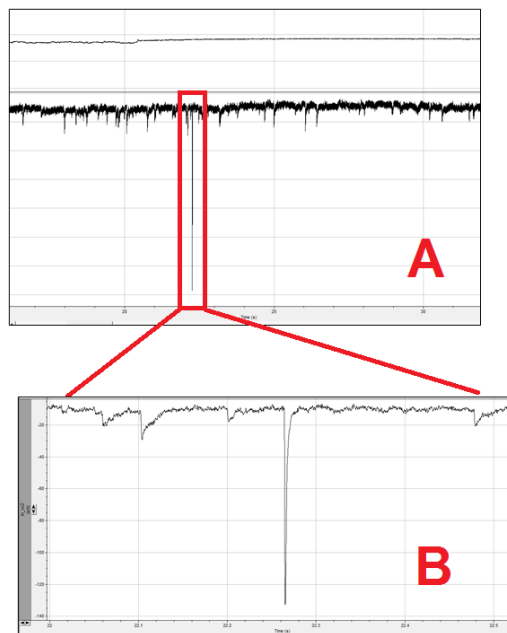


Figure 8. Spontaneous GABA- and Glutamate-mediated postsynaptic currents in a postsynaptic hippocampal neuron. In A, the top traces are the membrane potential of the presynaptic cell. The bottom traces are the Gaba and Glutamate postsynaptic currents, which are identified by the size of the current (Gaba-currents, around 40 pA and Glutamate currents around 120 pA.). B is the amplification of the insert from A.

Conclusions

Here we report that MWCNT synthesized by spray pyrolysis, functionalized with acidic treatment and dispersed by PVP have good dispersion properties in aqueous biological media and can be

suitable for preparing non-toxic scaffold for culturing hippocampal neuronal rat cells. Well dispersed independent MWCNT were clearly observed in SEM and CM studies, when they were applied on a glass coverslip. In addition, here we demonstrate that MWCNT allowed the functional and non-toxic culture of hippocampal neurons and glial cells. The viability and functionality of hippocampal neurons were demonstrated by confocal microscopy studies and by intracellular recording experiments. These hippocampal neurons cultured on MWCNT scaffolds have electrical and synaptic properties similar to the neurons cultured in a regular glass coverslip. Moreover, the synaptic connectivity between neurons cultured on MWCNT scaffold was observed to be better, compared with the neurons cultured on regular glass. Therefore, the MWCNT can act as good scaffolds for neurons in tissue culture.

References

- [1] Harrison, B.S. and Atala, A. (2007) Carbon Nanotube Applications for Tissue Engineering. *Biomaterials*, 28, 344-353.
- [2] Abarrategia, A., Gutierrez, M.C., Moreno-Vicente, C., Hortiguel, M.J., Ramos, V., Lopez-Lacomba, J.L., Ferrer, M.L. and del Monte, F. (2008) Multiwall Carbon Nanotube Scaffolds for Tissue Engineering Purposes. *Biomaterials*, 29, 94-102.
- [3] Haniu, H., et al. (2012) Basic Potential of Carbon Nanotubes in Tissue Engineering Applications. *Journal of Nanomaterials* , 2012, Article ID: 343747.
- [4] Kim, J.S., Song, K.S. and Yu, I.J. (2016) Multiwall Carbon Nanotube-Induced DNA Damage and Cytotoxicity in Male Human Peripheral Blood Lymphocytes. *International Journal of Toxicology*, 35, 27-37.
- [5] Montes-Fonseca, S.L., Orrantia-Borunda, E., Aguilar-Elguezabal, A., GonzalezHorta, C., Talamas-Rohana, P. and Sanchez-Ramirez, B. (2012) Cytotoxicity of Functionalized Carbon nanotubes in J774A Macrophages. *Nanomedicine* , 8, 853-859.
- [6] Sachar, S. and Saxena, R.K. (2011) Cytotoxic Effect of Poly-Dispersed Single Walled Carbon Nanotubes on Erythrocytes in Vitro and in Vivo . *PLoS ONE*, 6, e22032.
- [7] Fabbro, A., Prato, M. and Ballerini, L. (2013) Carbon Nanotubes in Neuroregeneration and Repair. *Advanced Drug Delivery Reviews* , 65, 2034-2044.
- [8] Fabbro, A., Sucapane, A., Toma, F.M., Calura, E., Rizzetto, L., Carrieri, C., Roncaglia, P., Martinelli, V., Scaini, D., Masten, L., Turco, A., Gustincich, S., Prato, M. and Ballerini, L. (2013) Adhesion to Carbon Nanotube Conductive Scaffolds Forces Action-Potential Appearance in Immature Rat Spinal Neurons. *PLoS ONE*, 8, e73621.
- [9] Martinelli, V., Cellot, G., Fabbro, A., Bosi, S., Mestroni, L. and Ballerini, L. (2013) Improving Cardiac Myocytes Performance by Carbon Nanotubes Platforms. *Frontiers in Physiology*, 4, 239.
- [10] Bosi, S., Rauti, R., Laishram, J., Turco, A., Lonardoni, D., Prato, M., Scaini, D. and Ballerini, L. (2015) From 2D to 3D: Novel Nanostructured Scaffolds to Investigate Signalling in Reconstructed Neuronal Networks. *Scientific Reports* , 5, 9562.