



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA**
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

MAESTRÍA EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

**“ESTUDIO DEL EFECTO DE POLÍMEROS AMINADOS
SINTETIZADOS POR PLASMA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN
NEURONAL EN UN MODELO *IN VITRO*”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (ING. BIOMÉDICA)

IBQ. ESTEPHANNY JOCELYN ALVARADO MUÑOZ

DIRECTORES DE TESIS:

DR. JUAN MORALES CORONA

Dpto. de Física, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I)

DR. CARLOS ENRIQUE OROZCO BARRIOS

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Centro Médico
Nacional Siglo XXI (IMSS-CONACyT)

Ciudad de México
20 de diciembre 2018



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

MAESTRÍA EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

**“ESTUDIO DEL EFECTO DE POLÍMEROS AMINADOS SINTETIZADOS
POR PLASMA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN UN
MODELO *IN VITRO*”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS (ING. BIOMÉDICA)

IBQ. ESTEPHANNY JOCELYN ALVARADO MUÑOZ

DIRECTORES DE TESIS:

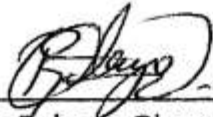


Dr. Juan Morales Corona



Dr. Carlos Enrique Orozco Barrios

SINODALES:



Dr. Roberto Olayo Valles
PRESIDENTE



Dr. J. C. Axayacatl Morales Guadarrama
SECRETARIO



Dr. Carlos Enrique Orozco Barrios
VOCAL



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00119

Matrícula: 2171801319

Estudio del efecto de polimeros aminados sintetizados por plasma sobre la diferenciación neuronal en un modelo In vitro.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 20 del mes de diciembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. ROBERTO OLAYO VALLES
DR. CARLOS ENRIQUE OROZCO BARRIOS
DR. JUAN CARLOS AXAYACATL MORALES GUADARRAMA

Portrait of Estephanny Jocelyn Alvarado Muñoz, Alumno. Includes name and title.

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

DE: ESTEPHANNY JOCELYN ALVARADO MUÑOZ

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

Aprobar

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

REVISÓ
DR. JOSE ANTONIO DE LAS REYES HEREDIA
SECRETARIO GENERAL

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBI
DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTE
DR. ROBERTO OLAYO VALLES

VOCAL
DR. CARLOS ENRIQUE OROZCO BARRIOS

SECRETARIO
DR. JUAN CARLOS AXAYACATL MORALES GUADARRAMA



AGRADECIMIENTOS

- A CONACyT por el apoyo económico otorgado para realizar mis estudios y proyecto de maestría.
- A mis asesores el Dr. Juan Morales Corona y Dr. Carlos Enrique Orozco Barrios.
Por todo su apoyo, consejos, guía y tiempo dedicado para que este proyecto fuera posible, pero sobre todo gracias por su invaluable amistad.
- A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I)
Laboratorio de Polímeros y Biofísica: Dr. Roberto Olayo González, Dr. Rafael Godínez Fernández, Dr. Humberto Vázquez Torres, M.C. Omar E. Uribe Juárez, Ing. Diana M. Osorio Londoño, M.C. Erika Fragoso Pérez y Fis. Emma Cortés Ortiz.
- Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados Unidad Zacateco (CINVESTAV)
Laboratorio de Neurofisiología: Dr. Daniel Martínez Fong, M.C. Ernesto López Salas, Dra. Lourdes Escobedo Sánchez, Dra. Monserrat Flores Martínez y Dr. José Ayala Dávila.
- Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ)
Laboratorio de Física de plasmas: Dr. Guillermo Jesús Cruz Cruz, Dra. Guadalupe Olayo González, Dra. Maribel González Torres, Dra. Lidia Gómez Jiménez, Ing. Erwin González Beltrán e Ing. Edgar O. Pérez Gómez.
- Instituto Mexicano del Seguro Social Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS)
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas: Dra. Hermelinda Salgado Ceballos, Dra. Angelica Coyoy, Erika Bueno González y M.C. Cristian González.



DEDICATORIA

Dedico este pasito más en mi vida a mis hermanos Eyleen, Edwyn y Emmanuel, siempre han sido mi motivación para seguir adelante y cumplir todas mis metas, esperando ser un buen ejemplo para ellos. Aun nos falta mucho camino por recorrer, pero juntos, como siempre, todo es mejor y más sencillo. Los amo con todo mi ser y más.

A mis padres Eduardo Alvarado Abrego y Esther Muñoz Suarez, quienes han estado en todo momento a mi lado apoyándome de todas las formas posibles, gracias por haberme educado de esta forma y por darme las herramientas para enfrentarme sola a la vida. Me dieron los mejores regalos que los padres le puede dar a un hijo: sentido de responsabilidad, disciplina, perseverancia y fortaleza. Gracias a ustedes son y serán cada uno de mis logros.

A mi familia y amigos que me han visto crecer y nunca me han dejado de lado, que creen en mi hasta cuando yo no lo hago y en cualquier situación siento su apoyo y amor, gracias Joel Fuentes, Claudia Baltazar, Ziomara de la Cruz, Omar Uribe, Diana Osorio, Daniel Ruiz, Carlos Jiménez, Engracia Muñoz, Feliciano Jiménez, Adelina Suárez y Juan Manuel Velasco.

“Cuando el objetivo te parezca difícil, no cambies de objetivo;
busca un nuevo camino para llegar a él”
- **Confusio**



TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN 1

1. INTRODUCCIÓN 2

2. ANTECEDENTES 5

 2.1 *Biomateriales* 5

 2.2 *Polimerización por plasma* 6

 2.3 *Polímeros aminados sintetizados por plasma* 7

 2.4 *Implantes de polímeros aminados sintetizados por plasma en lesiones medulares*..... 10

3. JUSTIFICACIÓN 14

4. HIPÓTESIS..... 16

5. OBJETIVOS..... 17

 5.1 *Objetivo general* 17

 5.2 *Objetivos específicos* 17

6. MÉTODOS Y DESARROLLO EXPERIMENTAL 18

 6.1 *Síntesis por plasma de películas poliméricas aminadas* 18

 6.2 *Análisis fisicoquímicos* 19

 6.2.1 *Microscopia Electrónica de Barrido*..... 19

 6.2.2 *Ángulo de Contacto* 20

 6.2.3 *Difracción de Rayos X* 21

 6.2.4 *Espectroscopia Infrarroja* 21

 6.2.5 *Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X* 23

 6.2.6 *Derivatización química para la determinación de grupos amina*..... 24

 6.3 *Caracterización fisicoquímica de los materiales poliméricos* 25

 6.4 *Cultivo celular* 25

 6.5 *Cultivo de la línea celular N1E-115*..... 27

 6.6 *Inmunofluorescencia* 27

 6.7 *Ensayo de diferenciación* 28

 6.7.1 *Inmunofluorescencia* 28

 6.7.2 *Conteo de neuritas* 29



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
7.1 Síntesis por plasma de PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I.....	30
7.2 Morfología superficial de los materiales poliméricos aminados.....	31
7.3 Hidrofilicidad mediante ángulo de contacto.....	33
7.4 Difracción de rayos X.....	36
7.5 Espectroscopía Infrarroja por Reflexión Total Atenuada.....	38
7.6 Análisis elemental.....	41
7.7 Derivación química con Trifluorometil benzaldehído.....	42
7.8 Diferenciación de la línea celular N1E-115 sobre los materiales poliméricos aminados.....	44
7.9 Efecto de los polímeros sobre la longitud de neuritas.....	48
8. CONCLUSIONES	52
9. PERSPECTIVAS	53
BIBLIOGRAFÍA	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Propiedades ideales de un biomaterial/soporte neural.	2
Figura 2. Métodos de modificación superficial de biomateriales	4
Figura 3. Estructura química de la alilamina y polialilamina con simple y doble enlaces.....	9
Figura 4. Estructuras moleculares del pirrol y polipirrol lineal y entrecruzado.	9
Figura 5. Micrografías de microscopia electrónica de barrido donde se muestra la morfología de películas de polipi-rrrol (PPy), polipirrol-polietilenglicol (PPy-PEG) y polipirrol dopado con yodo (PPy-I).	10
Figura 6. Valores promedio de la escala BBB de grupos de animales sometidos a una sección completa de médula espinal.	11
Figura 7. Fotografías y cortes histológicos con o sin implante en LSCME.....	12
Figura 8. Cortes histológicos de médula espinal a 2 meses de LTME con tratamiento de mesopartículas de PPy/I y rehabilitación física.....	13
Figura 9. Inmunofluorescencia de cortes medulares con lesión por contusión	15
Figura 10. Síntesis de polímeros por plasma.....	18
Figura 11. Principales señales emitidas como resultado de la interacción entre el haz de electrones y la muestra.....	20
Figura 12. Ángulo de contacto.	20
Figura 13. Espectro electromagnético	22
Figura 14. Esquema de reflectancia total atenuada.	23
Figura 15. Diagrama del espectrómetro de energía dispersiva.	24
Figura 16. Reacción de derivatización de aminas primarias con TFBA.	25
Figura 17. Resumen de ensayo de diferenciación.....	28
Figura 18. Películas poliméricas sobre portaobjetos	30
Figura 19. Morfología de la superficie de las películas de PPy-I: a) 20 W, b) 30 W y c) 40 W	32
Figura 20. Morfología de la superficie de las películas de PAI-I: a) 20 W, b) 30 W y c) 40 W	32
Figura 21. Morfología de la superficie de las películas de PPy/PAI-I: a) 20 W, b) 30 W y c) 40 W ...	33
Figura 22. Ángulo de contacto en agua de los polímeros sintetizados a 20 W.....	34
Figura 23. Ángulo de contacto en agua de los polímeros sintetizados a 20 W.....	35
Figura 24. Ángulo de contacto en agua de los polímeros sintetizados a 40 W.....	36
Figura 25. Difractograma de polímeros sintetizados a 20 W.....	37



Figura 26. Difractograma de polímeros sintetizados a 30 W.....	37
Figura 27. Difractograma de polímeros sintetizados a 40 W.....	38
Figura 28. Espectro infrarrojo por ATR de los polímeros PPy-I, PAI-I, PPy/PAI-I sintetizados a 20 W	39
Figura 29. Espectro infrarrojo por ATR de los polímeros PPy-I, PAI-I, PPy/PAI-I sintetizados a 30 W	40
Figura 30. Espectro infrarrojo por ATR de los polímeros PPy-I, PAI-I, PPy/PAI-I sintetizados a 40 W	40
Figura 31. Línea celular N1E-115 con estímulo de diferenciación sembrada sobre los materiales poliméricos sintetizados a 20 W durante 24, 48 y 72 horas y controles.	45
Figura 32. Línea celular N1E-115 con estímulo de diferenciación sembrada sobre los materiales poliméricos sintetizados a 30 W durante 24, 48 y 72 horas y controles.	46
Figura 33. Línea celular N1E-115 con estímulo de diferenciación sembrada sobre los materiales poliméricos sintetizados a 40 W durante 24, 48 y 72 horas y controles.	47
Figura 34. Imágenes representativas de cultivos N1E-115 sobre materiales sintetizados a 20 W...	48
Figura 35. Imágenes representativas de cultivos N1E-115 sobre materiales sintetizados a 30 W...	49
Figura 36. Imágenes representativas de cultivos N1E-115 sobre materiales sintetizados a 40 W...	50
Figura 37. Longitud promedio de neuritas de N1E-115 sembradas sobre diferentes materiales poliméricos.....	51



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características y aplicaciones de biomateriales	5
Tabla 2. Condiciones de síntesis de los polímeros	19
Tabla 3. Grosor promedio de película polimérica sobre portaobjetos	31
Tabla 4. Porcentaje atómico promedio de los elementos de los polímeros sintetizados a 20 W	41
Tabla 5. Relación atómica C/N y C/O en los polímeros sintetizados a 20 W.	41
Tabla 6. Porcentaje atómico promedio de los elementos de los polímeros sintetizados a 30 W. ...	41
Tabla 7. Relación atómica C/N y C/O en los polímeros sintetizados a 30 W.	42
Tabla 8. Porcentaje atómico promedio de los elementos de los polímeros sintetizados a 40 W. ...	42
Tabla 9. Relación atómica C/N y C/O en los polímeros sintetizados a 40 W.	42
Tabla 10. Porcentaje atómico promedio de los elementos presentes después de la derivatización química de los polímeros a diferentes potencias de síntesis.....	43
Tabla 11. Porcentaje de aminas primarias de los polímeros PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I a diferentes potencias de síntesis.	43



RESUMEN

Introducción: Los polímeros aminados son ampliamente utilizados como soporte para la colonización celular. Destacan por su alta hidrofiliidad, que permite una densa carga de componentes biológicos; y su alta reactividad, permitiendo la inmovilización de diferentes moléculas. La polimerización por plasma promueve la formación de una variedad amplia de grupos funcionales, que son capaces de modificar las características de los biomateriales; estos materiales pueden doparse con algún halógeno para incrementar su conductividad, lo cual es favorable en el cultivo de células excitables como neuronas. Los estudios de los materiales poliméricos sintetizados por plasma y dopados con iodo (PPy-I y PAI/I utilizados como implantes en lesiones crónicas de médula espinal en modelos *in vivo* muestran efectividad en la recuperación funcional en ratas de la cepa Long-Evans. Inmunofluorescencias contra el marcador neuronal β III tubulina en las médulas tratadas con dichos polímeros sugieren que la recuperación funcional es debida a un posible mecanismo de diferenciación celular. Por lo anterior, el presente proyecto propone estudiar el efecto de los polímeros aminados dopados con iodo y sintetizados por plasma en el proceso de diferenciación neuronal con el fin de determinar un posible mecanismo fisiológico de recuperación funcional.

Metodología: Se sintetizaron los polímeros aminados PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I sobre portaobjetos mediante polimerización por plasma variando la potencia de síntesis. Se caracterizaron los polímeros mediante SEM, ángulo de contacto, DRX, IR-ATR, EDS y se realizó una derivación química con TFBA para determinar la concentración de aminas de los materiales. Se sembró la línea celular N1E-115 sobre los polímeros y se estudió el efecto de estos sobre la diferenciación de la línea celular. Finalmente, se realizó una inmunofluorescencia para realizar conteo de la longitud de las neuritas.

Resultados: Las micrografías por SEM muestran películas lisas con algunos agregados. Los ángulos de contacto mostraron que los polímeros son parcialmente hidrofílicos. En DRX se observaron películas amorfas. Los espectros de IR-ATR muestran la presencia de grupos funcionales -N-H, C-H, $C\equiv C$, $C\equiv N$, C=C y C=N en diferentes porcentajes de transmisión. Se obtuvieron mayores porcentajes de aminas primarias en los polímeros de PAI-I. Finalmente se observó diferenciación neuronal en todos los materiales y mayor longitud de neuritas en PAI-I sintetizado a 30 W.

Conclusiones: Los materiales poliméricos aminados sintetizados por plasma PPy-I, PAI-I, PPy/PAI-I contribuyen a la diferenciación neuronal, en diferente medida dependiendo de la potencia de síntesis, tomando como referencia la longitud de las prolongaciones neurales

Capítulo 1

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas los biomateriales han sido utilizados como una alternativa en tratamientos de remplazo y funcionalización de tejidos u órganos; para que estos sean considerados en aplicaciones clínicas deben cumplir con ciertos criterios de biocompatibilidad, propiedades mecánicas y de biodegradabilidad.

En su mayoría, los biomateriales utilizados como soportes celulares con aplicaciones en ingeniería de tejidos neuronales deben cumplir con propiedades específicas topográficas, mecánicas, bioquímicas, eléctricas, biodegradables y biocompatibles como las que se muestran en la figura 1.

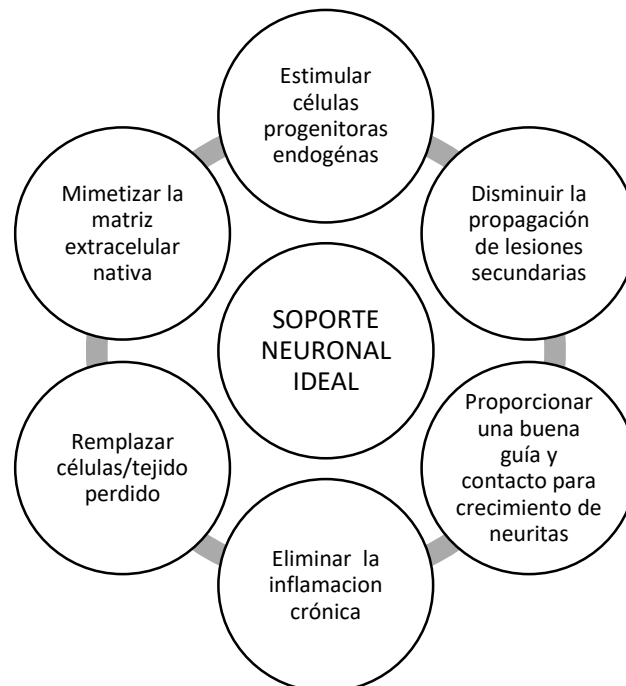


Figura 1. Propiedades ideales de un biomaterial/soporte neural.
Adaptada de [1]



Estos biomateriales pueden ser de diferentes orígenes, de acuerdo con su composición:

- Naturales: Son obtenidos de productos provenientes de algún organismo, por ejemplo: azúcares, proteínas, péptidos. Tienen ventaja sobre algunos biomateriales por su degradación y biocompatibilidad.
- Sintéticos: Tienen estructura y organización específica por la unión de monómeros conocidos. Sus propiedades mecánicas pueden ser superiores a la de los biomateriales naturales; sin embargo, los productos de su degradación pueden desencadenar una reacción inflamatoria.
- Compuestos: Están conformados por dos o más biomateriales, los cuales al combinarlos pueden tener efectos sinérgicos [2].

Los biomateriales más adecuados para el uso como soportes neuronales son los polímeros, ya que cumplen con muchas de las características antes mencionadas. Los polímeros más utilizados para ingeniería de tejidos neurales son los siguientes:

- Biodegradables: poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), y sus copolímeros, poli[(ácido láctico)-co-(ácido glicólico)] (PLGA). Los hidrogeles de poli(hidroxietilmetacrilato-co-metilmetacrilato) tiene propiedades mecánicas similares a la médula espinal de los mamíferos (módulo elástico de 200 a 600 kPa). Otros polímeros biodegradables son la metil-celulosa, el alginato, el polihidroxietilmetacrilato (PHEMA), y el polihidroxibutirato (PHB). La fusión rápida de los axones mielinizados cortados se puede lograr mediante la aplicación de polietilenglicol (PEG) [3].
- No biodegradables: La mayoría de estos materiales se usa para reparación de daños del SNP (Sistema nervioso periférico). El PHEMA ha demostrado tener un efecto de regeneración de los axones lesionados de ratas. Materiales como el polipirrol muestran interacción y crecimiento neuronal, además de ser conductores eléctricos. Los nanotubos de carbono (CNTs) son otro tipo de materiales conductores que se utilizan para promover o transmitir la señal neuronal, además de ayudar a la elongación de las dendritas y la adhesión neuronal.

Además del tipo de material son necesarios otros procedimientos para mejorar la integración del biomaterial con el tejido neuronal u otros tejidos. Con el fin de incrementar la integración de tejidos, los biomateriales pueden ser modificados con motivos de reconocimiento cortos que imitan a la

matriz extracelular para promover la unión celular (por ejemplo, proteínas, péptidos). Existen 4 principales maneras de caracterizar, decorar, modular o modificar la superficie de los biomateriales, las cuales son: deposición superficial, mezcla, fijación por cargas electrostáticas y fijación covalente, (figura 2) [4].

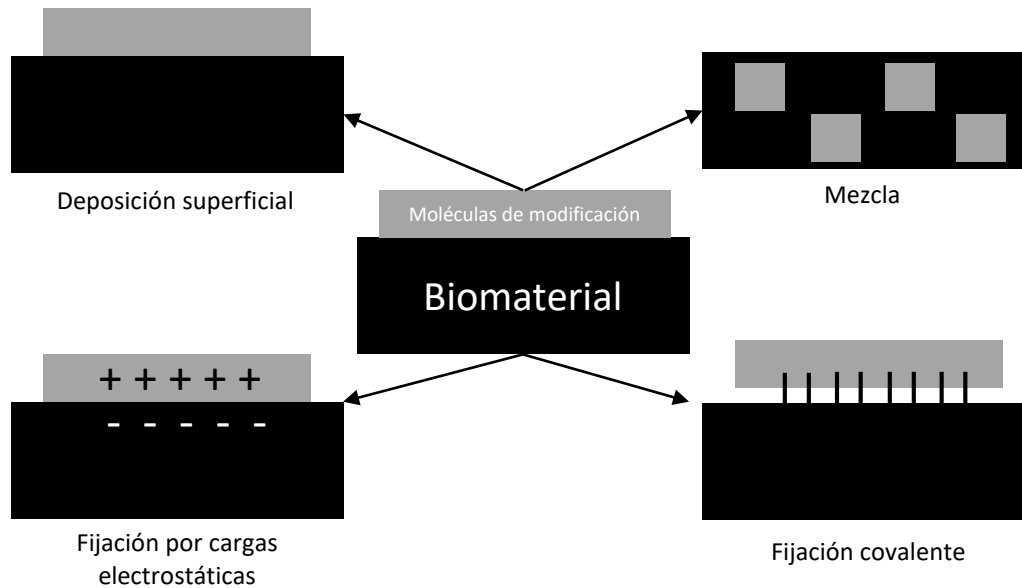


Figura 2. Métodos de modificación superficial de biomateriales
Adaptado de [5]

Una de las técnicas de modificación de biomateriales es la técnica de modificación por plasma. Un plasma es un ambiente químico altamente reactivo en el cual pueden ocurrir muchas reacciones químicas. La alta densidad de especies excitadas e ionizadas en el plasma pueden cambiar las propiedades superficiales de materiales tradicionalmente inertes como los cerámicos. Las técnicas basadas en el plasma se están convirtiendo en un método efectivo para modificar las propiedades superficiales de implantes biomédicos con formas complejas [6].

Con la técnica de polimerización por plasma, se pueden agregar películas delgadas con una gran cantidad de grupos amina ($-NH_2$) a casi cualquier superficie. El grupo amina en sistemas biológicos tiene una carga neta positiva, la cual puede ayudar a la inmovilización de enzimas y proteínas a través de la interacción electrostática de cargas [7]



Capítulo 2

2. ANTECEDENTES

2.1 Biomateriales

Los biomateriales se pueden definir como “cualquier sustancia (diferente de un medicamento) o combinación de sustancias sintéticas o de origen natural, que pueden ser usados por un periodo de tiempo, como un todo o parte de un sistema que se trata, mejora o reemplaza cualquier tejido, órgano o función del cuerpo” (Helmus and Tweden, 1995).

Los biomateriales se clasifican según su origen en polímeros, metales, cerámicos y compositos los cuales pueden ser naturales o sintéticos según su fuente de obtención. Cada tipo de biomaterial tiene características específicas que le otorgan ciertas propiedades para ser utilizados en diferentes aplicaciones en el cuerpo como se especifica en la tabla 1.

MATERIAL	VENTAJAS	DESCRIPCIÓN
POLÍMEROS Nailon Poliéster Silicona	Dúctiles Ligeros Fácil fabricación	Estos materiales se utilizan en dispositivos donde se requiere resistencia mecánica y flexibilidad. Sus productos de degradación se eliminan principalmente a través del metabolismo celular. De forma general, se pueden clasificar como polímeros lineales, geles o resinas macro reticuladas.
METALES Ti (Titanio) y sus aleaciones Acero Inoxidable	Dúctiles Fuertes Alta dureza	Uso casi exclusivo para implantes sometidos a esfuerzos mecánicos y corrosión, como prótesis para rodilla y cadera, clavos, tornillos y placas para fijación de fracturas.
CERÁMICOS Oxido de aluminio Hidroxiapatita	Biocompatibles Bioactivos Rígidos	De composiciones inorgánicas y no metálicas, biocompatibles, no sufren los efectos de corrosión y, aunque algunos pueden llegar a degradarse, los productos de tal degradación pueden ser reabsorbidos.
COMPOSITOS Metal-PMMA (Polimetilmetacrilato) HA-HDPE (Hidroxiapatita- Polietileno de alta densidad)	Resistentes Rígidos Propiedades distintivas	Constan al menos de dos fases distintas, separadas por una interfaz definida. El constituyente continuo que, por lo general, aunque no siempre, es el más abundante, se denomina matriz, dependiendo de ella se pueden clasificar en compuestos de matriz cerámica, metálica o polimérica.

Tabla 1. Características y aplicaciones de biomateriales
Adaptado de [8]

Los biomateriales, en especial los polímeros, que contienen superficies funcionalizadas con aminos son de gran interés en aplicaciones como membranas para tratamiento de aguas residuales,



funcionalización de nanotubos o microesferas de carbono, en dispositivos biomédicos para mejorar la biocompatibilidad, microfluidos y en fabricación de sensores y los polímeros catiónicos que tienen múltiples grupos amina, se han utilizado para administrar ácidos nucleicos terapéuticos, ya que forman complejos electrostáticos de nanopartículas con ácidos nucleicos a pH fisiológico [9].

Los métodos convencionales para preparar superficies aminadas involucran reacciones complejas que requieren utilizar diferentes solventes y usualmente son reacciones muy lentas, éstas incluyen la oxidación, amidación, glucosaminación, reacción de acoplamiento y platinación/iodación [10].

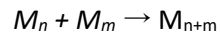
2.2. Polimerización por plasma

Existen diversas técnicas de polimerización dependiendo de qué tipo de energía actúe, entre las cuales destacan, la polimerización química, electroquímica, térmica, fotoquímica y por plasma.

La polimerización por plasma es una técnica que se lleva a cabo en fase gaseosa. Los materiales obtenidos están libres de impurezas asociadas a iniciadores o catalizadores de las reacciones químicas debido a que no son necesarios para que se lleve a cabo la polimerización [11]. Los polímeros por plasma no se constituyen por una estructura repetitiva consecutiva como lo son los polímeros lineales convencionales. Sin embargo, a lo largo de la cadena se pueden encontrar unidades estructurales repetitivas. Por lo tanto, los polímeros sintetizados por plasma tienen composición y propiedades fisicoquímicas diferentes a los sintetizados por mecanismos de polimerización convencionales [12]. Con esta técnica, los polímeros se obtienen en película o partículas, dependiendo de las condiciones de polimerización.

Los mecanismos de polimerización por plasma más estudiados son por radicales libres, conocido como polimerización por adición, donde los electrones π de los dobles enlaces de las moléculas se unen en diferentes arreglos. En la primera etapa, mediante adición de energía, se convierte al monómero en radical libre. Justo después de formarse los radicales se producen las primeras fijaciones de una molécula de monómero con otra. Donde el monómero se representa con la letra M y el radical libre generado debido al impacto de partículas por M^* .





En la etapa de propagación, el crecimiento de las moléculas se efectúa por fijación sucesiva del monómero sobre los centros activos.



La reacción de terminación se produce por la eliminación de radicales, por ejemplo, cuando electrones dispares de dos radicales forman un enlace covalente.

Puede darse también el caso en que un radical pueda regresar a su estado basal, pero que, al contrario de la reacción de terminación, de origen a otro radical diferente capaz de reaccionar con el monómero, lo que se conoce como reacción de transferencia, similar a la propagación [13] [14].



La polimerización por plasma es comúnmente utilizada para promover la formación de una variedad amplia de grupos funcionales, los cuales, dependiendo de su naturaleza, son capaces de modificar las características de los biomateriales como la mojabilidad, características de adhesión y biocompatibilidad, debido a la diversificación y cantidad de grupos funcionales en la superficie del material; así pues, en conjunto, estas variaciones tienen la capacidad de mejorar la adhesión y proliferación celular [15].

El tipo de grupo funcional, así como su porcentaje presente en los materiales sintetizados por plasma puede ser controlada variando los monómeros, condiciones de síntesis como lo son potencia, tiempo, presión, velocidad de flujo de los precursores. [16].

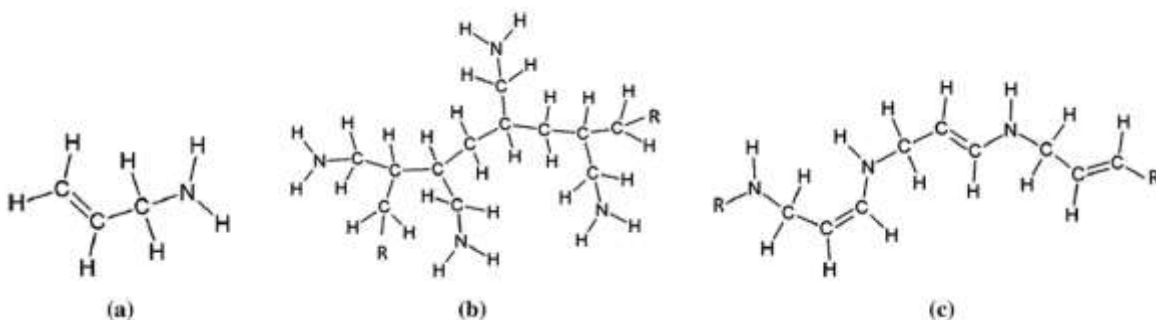
2.3 Polímeros aminados sintetizados por plasma

Los polímeros aminados son ampliamente utilizados como soporte para la colonización celular, aunque en su gran mayoría son utilizados como plataformas químicamente reactivas para la

inmovilización covalente de moléculas biológicas activas. Algunos ejemplos de moléculas bioactivas que han sido inmovilizadas exitosamente sobre grupos amina generado por plasma son ADN (Ácido desoxirribonucleico), proteína A, ácido hialurónico, heparina, inmunoglobulina G, algunas enzimas como glucoxidasa y glucoisomeraza, lisozima y polisacáridos como dextrano y carboximetil-dextranos [17].

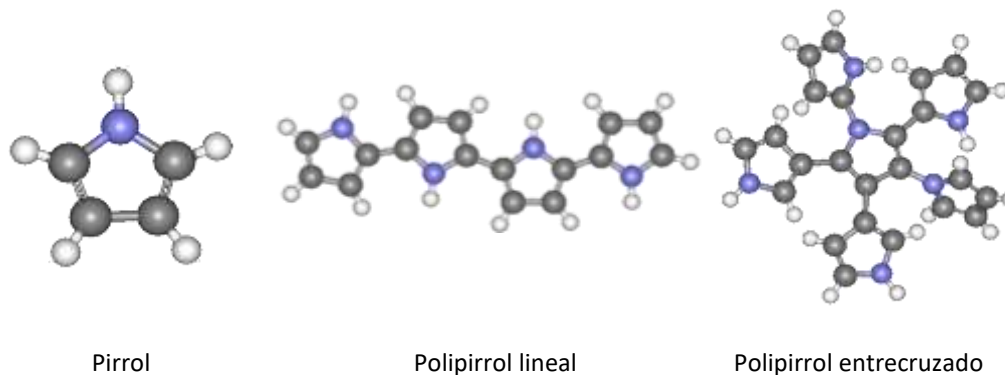
Entre las características de los polímeros aminados destacan dos; su alta hidrofiliidad que permite una densa carga de componentes biológicos sobre las superficies modificadas con estos polímeros y su alta reactividad, permitiendo la inmovilización covalente, electrostática y por puentes de hidrogeno de diferentes moléculas. Algunos de los precursores más utilizados para integrar en biomateriales aminas funcionales mediante polimerización por plasma son etilendiamina, butilamina, heptilamina, anilina, diaminociclohexano, acetonitrilo y alilamina. La polialilamina (PAI) sintetizada por plasma es un polímero muy popular el cual es utilizado para proveer superficies con grupos funcionales amino y gracias a su alta biocompatibilidad es ampliamente utilizada en aplicaciones biomédica [16].

Alilamina ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$) es probablemente el monómero más común para producir poliaminas (Figura 3a). En la polialilamina lineal tradicional, los monómeros se unen transformando el doble enlace en un enlace sencillo que da una estructura similar a la que se muestra en figura 3b, en la que los monómeros se unen con un esqueleto central de carbono y segmentos laterales $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$. En las reacciones por plasma, la polimerización se promueve principalmente por deshidrogenación, en donde generalmente el monómero preserva los dobles enlaces y crea nuevos enlaces; una posible representación de PAI sintetizado por plasma donde se preserva el doble enlace se muestra en la figura 3c, en la que no hay ramas, solo el esqueleto central con simple enlace y configuraciones de doble enlace $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{NH}$, en este caso, las aminas primarias se vuelven aminas secundarias [18].



*Figura 3. Estructura química de la alilamina y polialilamina con simple y doble enlaces.
a) Alilamina b) Polialilamina lineal con enlaces simples c) Polialilamina lineal con dobles enlaces.
Tomado de [18]*

Otro polímero que contiene grupos amina es el polipirrol (PPy). El pirrol está formado por un anillo heteroaromático de 5 miembros, 4 carbonos y 1 nitrógeno rodeado por hidrógenos (-CH=CH-CH=CH-NH-). Desde un punto de vista espacial, el anillo de pirrol forma un plano con enlaces dobles y sencillos interrumpidos por el átomo de nitrógeno de la amina. Al formar el polímero por polimerización por plasma, los anillos pierden hidrógenos y se unen en los puntos reactivos dejados por su ausencia (figura 4). Dependiendo del punto de unión, se pueden formar grandes secuencias de anillos con enlaces conjugados, dobles y sencillos y construir así polímeros semiconductores [19]. Existen reportes de que el polipirrol sintetizado por plasma crea una capa superficial rica en grupos amina, siendo un material semiconductor utilizado como sustrato para el sembrado de células excitables [20] [21] [22] [23] .



*Figura 4. Estructuras moleculares del pirrol y polipirrol lineal y entrecruzado.
Tomado de [24]*

Sin embargo, una consecuencia de estas condiciones de síntesis es que las propiedades eléctricas de los polímeros por plasma pueden resultar reducidas comparadas con los mismos polímeros sintetizados por otros métodos. Para aumentar la conductividad, estos polímeros se combinan con otros compuestos para crear sitios polares que ayuden en el transporte de cargas eléctricas. A este proceso se le conoce como dopaje. Al igual que con la polimerización por plasma, el dopaje por plasma se promueve por la ionización y las colisiones de las partículas aceleradas en el plasma y, dependiendo de la energía aplicada al sistema, se pueden producir enlaces químicos entre el dopante y las cadenas del polímero. Al final de este proceso simultáneo polimerización-dopaje por

plasma, los polímeros dopados presentan mayor conductividad eléctrica que sus similares sin dopar [24].

2.4 Implantes de polímeros aminados sintetizados por plasma en lesiones medulares

Algunos polímeros aminados sintetizados por plasma han sido utilizados como implantes para el tratamiento de lesiones medulares mostrando resultados favorables en la recuperación funcional de ratas de la cepa Long-Evans.

En uno de estos estudios se sintetizaron por plasma películas de biopolímeros de polipirrol sintetizados en combinación con Polietilenglicol (PPy-PEG) o yodo (PPy-I) (figura 5). La finalidad de este estudio fue combinar las aminas generadas en la polimerización de PPy con los grupos oxigenados de los glicoles para con ello incrementar su biocompatibilidad; en cuanto al PPy con el dopaje con yodo (PPy/I), se buscó generar un biomaterial que, al estar en contacto con soluciones ricas en electrolitos, fuera capaz de incrementar en varios ordenes de magnitud su conductividad eléctrica [11]. Estos polímeros fueron probados en animales de laboratorio a los cuales se les implantó el biomaterial en forma de pastilla posterior a la realización de una lesión en la médula espinal por sección completa de la misma (LSCME). En estos estudios, se encontró que el material PPy no genera una respuesta inmune en el huésped; al evaluar la recuperación motriz de acuerdo con la escala BBB, los animales con el implante de polipirrol dopado con yodo (PPy-I) mostraron una mejoría considerable de alrededor de 5 puntos en la escala BBB (Basso, Beattie, and Bresnahan), en comparación con los grupos control, que obtuvieron como máximo 3 puntos BBB como se muestra en la figura 6.

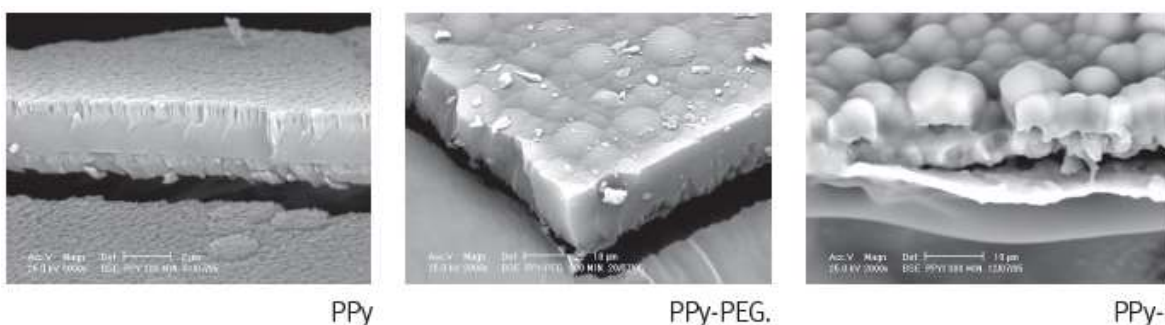


Figura 5. Micrografías de microscopía electrónica de barrido donde se muestra la morfología de películas de polipirrol (PPy), polipirrol-polietilenglicol (PPy-PEG) y polipirrol dopado con yodo (PPy-I).

Tomado de [24]

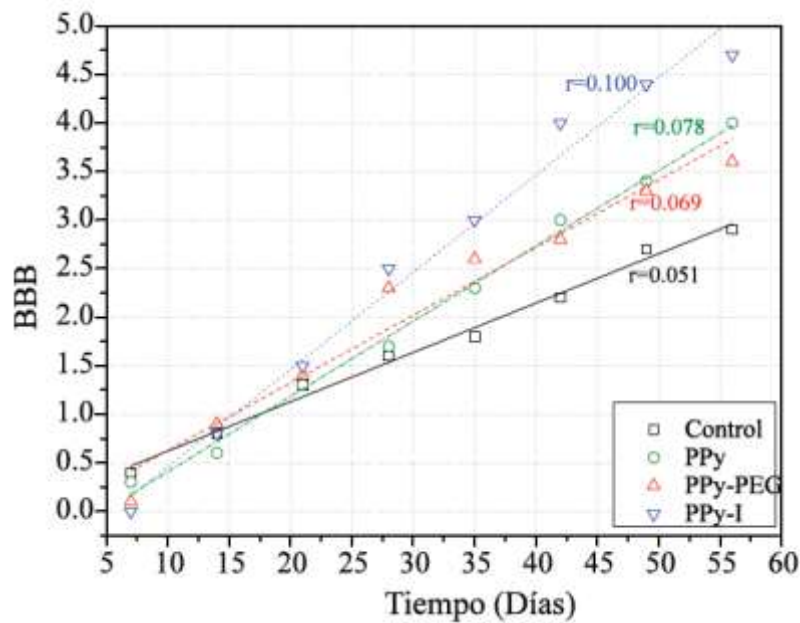


Figura 6. Valores promedio de la escala BBB de grupos de animales sometidos a una sección completa de médula espinal. Sin implante (Control), o con implantes de PPy, PPy-PEG o PPy-I. La recuperación motora fue evaluada durante los 56 días posteriores a la lesión.

Tomada de [24]

Por otra parte, en un análisis histológico de implantes de PPy-I y PPy-PEG en LSCME pudo observarse que, en el grupo control, se generan quistes en el tejido los cuales limitan los procesos de regeneración y reconexión celular en el tejido nervioso, persistiendo así la parálisis. En contraste con el tratamiento PPy-I y PPy-PEG en los cuales se observó una menor zona quística alrededor del implante (figura 7) [11].

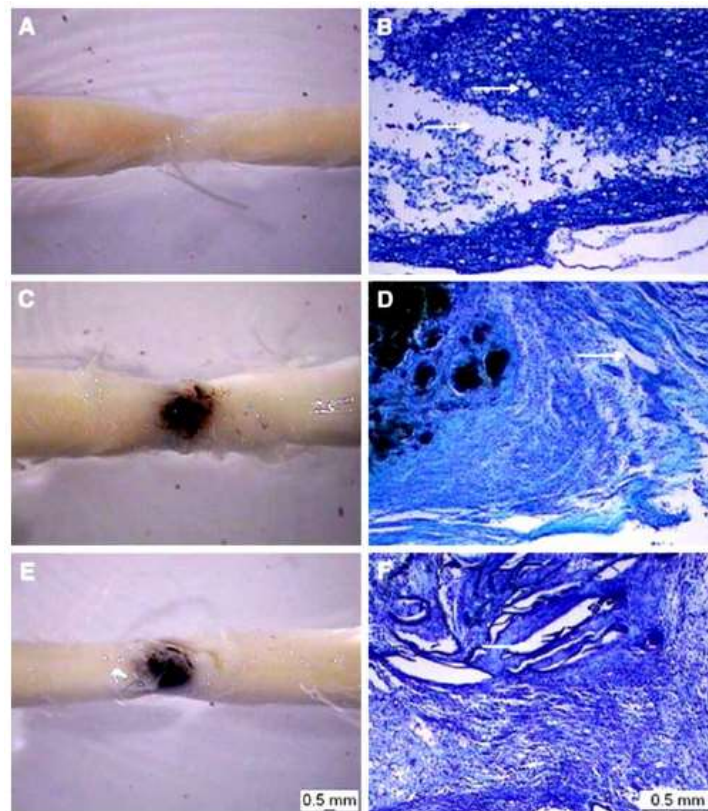


Figura 7. Fotografías y cortes histológicos con o sin implante en LSCME.

Paneles izquierda: (A) Zona del corte transversal en animales control. Animal implantado con (C) Polipirrol dopado con Yodo o (E) Polipirrol copolimerizado con polietilenglicol. Paneles derecha: Cortes histológico con tinción de Luxol Fast Blue correspondientes al área de LSCME en animales control (B), animales implantados con (D) Polipirrol dopado con Yodo o (F) Polipirrol copolimerizado con polietilenglicol. Las flechas indican las zonas de quistes.

Tomado de [11]

En otro estudio se colocaron implantes de PPy-I en un modelo de lesión traumática por contusión moderada de la médula espinal (LTME) en forma de mesopartículas (MPs) sintetizadas por polimerización por plasma y en combinación con rehabilitación en banda rotatoria (RBR). En este estudio se reportó que el implante de MPs presenta buena integración con el tejido huésped sin presentar un aparente rechazo inmunitario al ser implantados por microinyección 48 horas después de realizar la LTME en ratas cepa Long – Evans (figura 8). Aun cuando no se observó recuperación en el tejido nervioso, se observó que el implementar una terapia física, esta contribuyó a recuperar parte de la función motora perdida [25].

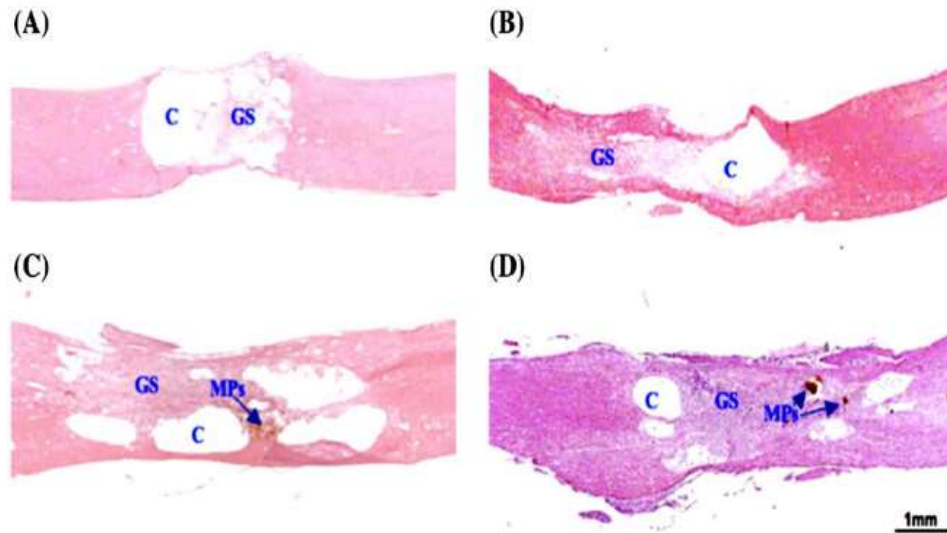


Figura 8. Cortes histológicos de médula espinal a 2 meses de LTME con tratamiento de mesopartículas de PPy/I y rehabilitación física.

Secciones longitudinales de médula espinal de ratas que muestran el epicentro de la zona lesionada, el tejido conservado y las cavidades quísticas formados 2 meses después de una LTME. (A) Vehículo: solución salina; (B) Vehículo - RBR: solución fisiológica con rehabilitación en banda rotatoria; (C) los MPs: implante de mesopartículas; (D) MPs - RBR: implante de mesopartículas más rehabilitación en banda rotatoria. Ampliación 29. Tinción de hematoxilina / eosina.

Implante de mesopartículas de PPy/I (MPs), (GS) Cicatriz glial; (C) Quiste.

Tomada de [25]

Capítulo 3

3. JUSTIFICACIÓN

En el grupo de investigación polímeros/médula de Proyecto Camina del cual forma parte la Universidad Autónoma Metropolitana, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Centro Médico Nacional Siglo XXI, se implantan polímeros sintetizados por plasma en modelos de ratas Long-Evans a las cuales se les realizan diferentes tipos de lesiones medulares para estudiar el efecto de recuperación funcional. Los procesos que se llevan a cabo durante la evolución de las lesiones y la influencia de los polímeros en ellas son muy complejos y no se conocen lo suficiente, es por ello por lo que se estudia el resultado de los procesos de recuperación motora y funcional en las ratas.

En estudios previos, se realizaron lesiones medulares crónicas por contusión en ratas Long-Evans con 1 mes de evolución, en donde se estudió el efecto del implante de mesopartículas de PPy/PAI-I por microinyección en el sitio de lesión, después de 8 semanas post implante se sacrificaron las ratas para estudiar el efecto del polímero en la lesión medular por técnicas histológicas. Para evidenciar la regeneración neuronal se realizaron inmunofluorescencias contra un marcador específico de citoesqueleto neuronal, la proteína β III-tubulina (Figura 9). Estos ensayos mostraron fibras inmunoreactivas contra β III-tubulina y que esta se encuentra en mayor proporción alrededor del polímero PPy/PAI-I. Esta observación, sugiere que el polímero de PPy/PAI-I podría estar activando su expresión, ya que se encuentra la marca alrededor del polímero.

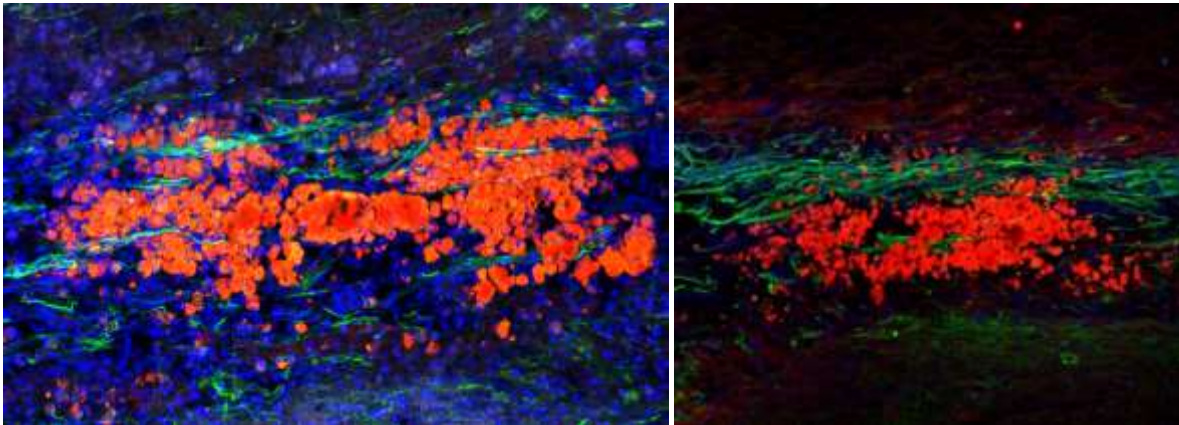


Figura 9. Inmunofluorescencia de cortes medulares con lesión por contusión
 β III-tubulina (verde), Hoescht (azul), PPy/PAI-I (rojo)

Con base en lo anterior, se ha demostrado que los implantes de polímeros aminados favorecen la recuperación funcional al contrarrestar algunos procesos fisiopatológicos como el estrés oxidativo y la apoptosis, así como aumentar la cantidad de tejido preservado. Sin embargo, estos procesos no explican la recuperación funcional y el incremento en la expresión de β III-tubulina, y hasta el momento no se han descrito algún mecanismo que explique dichos efectos.

Es por ello por lo que el presente proyecto propone estudiar en un modelo *in vitro* el efecto de los polímeros aminados PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I en el proceso de diferenciación celular en un cultivo de línea celular con el fin de determinar un posible mecanismo fisiológico de recuperación funcional



Capítulo 4

4. HIPÓTESIS

Los materiales poliméricos con grupos amina dopados con iodo sintetizados por plasma PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I, contribuyen a la diferenciación celular neuronal.



Capítulo 5

5. OBJETIVOS

5.1 *Objetivo general*

Evaluar el efecto de diferenciación celular de los polímeros aminados PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I sintetizados por plasma en la línea celular N1E-115.

5.2 *Objetivos específicos*

- Sintetizar mediante la técnica de polimerización por plasma los materiales aminados dopados con iodo PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I.
- Caracterizar fisicoquímicamente los polímeros y realizar una comparación de la química superficial de acuerdo con los parámetros de síntesis de cada uno.
- Evaluar el efecto de diferenciación neuronal de los polímeros sobre la línea celular N1E-115.

Capítulo 6

6. MÉTODOS Y DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1. Síntesis por plasma de películas poliméricas aminadas

Se depositaron sobre portaobjetos de 1X1 cm películas poliméricas aminadas sintetizadas por plasma variando la potencia en cada síntesis. Las polimerizaciones se llevaron a cabo en un reactor cilíndrico de vidrio que cuenta con una capacidad de 1500 cm³ en el cual, se introdujeron electrodos de acero inoxidable acoplados a bridas igualmente de acero inoxidable, las cuales cuentan con dos accesos cada una, en los cuales se conectaron los recipientes cilíndricos acoplados a válvulas de alto vacío J. Young (Sigma Aldrich) con una salida de 6 mm, los cuales contenían a los monómeros, pirrol al 98% y alilamina al 98%, y el dopante (yodo en hojuelas $\geq 99\%$ Sigma Aldrich) por un lado y por otro se conectó un medidor de presión tipo Pirani 945 MKS Instruments HPSTM Products y el sistema de vacío que consta de una bomba para vacío Alcatel Pascal 2015 C1 y un condensador Alcatel LNTS. La inducción a la reacción por plasma se llevó a cabo conectando al reactor una terminal de radiofrecuencia RF Dressler CESAR- 1500 la cual genera un campo electromagnético de 13.56 MHz (figura 10).

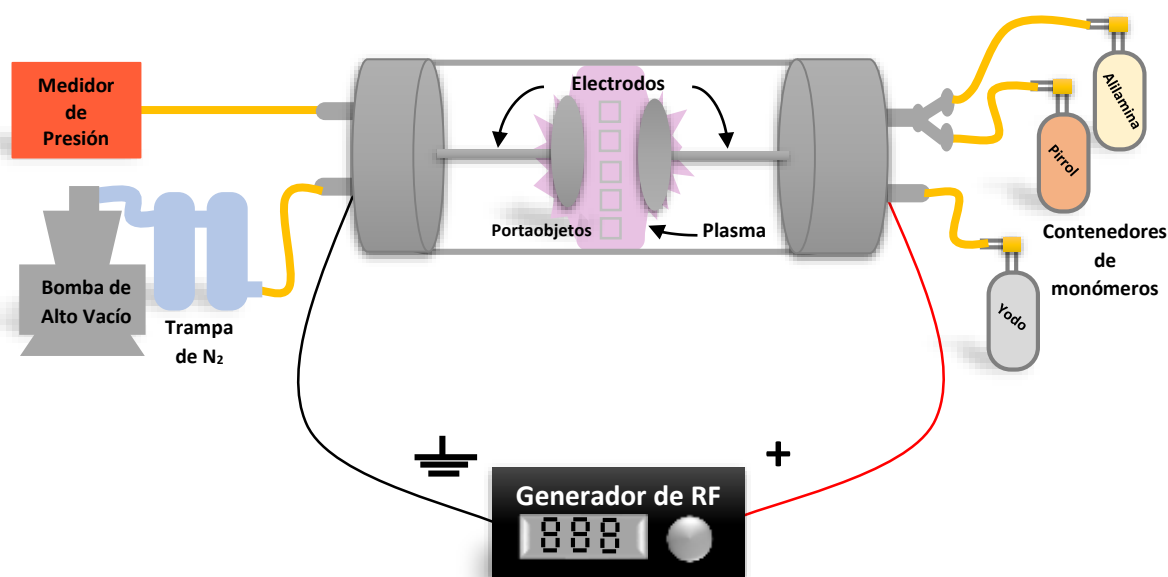


Figura 10. Síntesis de polímeros por plasma

POLÍMERO	TIEMPO DE REACCIÓN (MINUTOS)	POTENCIA (W)	PRESIÓN (TORR)
PPy-I	15	20, 30 y 40	$5.5 \times 10^{-1} - 1.1$
PAI-I	25	20, 30 y 40	$6.5 \times 10^{-1} - 1.4$
PPy/PAI-I	15	20, 30 y 40	$8.5 \times 10^{-1} - 1.4$

Tabla 2. Condiciones de síntesis de los polímeros

Se realizaron nueve síntesis distintas en las cuales se colocaron 50 portaobjetos LAUKA de 1X1 cm y espesor de (1 ± 0.2) mm y 3 portaobjetos de 7.6 X 2.6 cm con el mismo espesor en cada síntesis. Previo a la polimerización se lavaron los portaobjetos con acetona al 99.6 % y se les realizó una abrasión con plasma de aire durante 30 minutos con una potencia de 150 W para aumentar la rugosidad de la superficie y en consecuencia la adhesión de las películas poliméricas a los portaobjetos y se realizaron las síntesis a las condiciones mencionadas en la tabla 2.

6.2. Análisis fisicoquímicos

Los análisis fisicoquímicos en los materiales poliméricos se llevan a cabo para conocer sus características y propiedades físicas y químicas, de esta forma se puede establecer y controlar las condiciones específicas que producen un cambio en su aplicación específica.

6.2.1 Microscopia Electrónica de Barrido

El Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) o SEM por sus siglas en inglés (Scanning Electron Microscopy) es utilizado para observar y modificar la superficie de las muestras a analizar. Se utiliza para capturar e interpretar algunas señales emitidas durante la interacción del haz de electrones con la muestra. Entre estas señales se encuentran electrones, rayos X, luz (ultravioleta, visible e infrarroja), calor, electrones conducidos a través de la muestra y electrones absorbidos por la muestra (figura 11).

Consiste principalmente de dos partes, columna y el gabinete. La columna es la extensión que los electrones atraviesan desde su emisión hasta que llegan a la muestra, donde los detectores capturan las señales dispersas resultantes de la interacción entre los electrones y la muestra. Los detectores son transductores de energía que transforman un tipo de señal en señal eléctrica, la cual es enviada al gabinete. El gabinete de control tiene sistemas electrónicos capaces de cuantificar las señales eléctricas enviadas por los detectores y convertirlas en información analizable, como imágenes y gráficos [26].

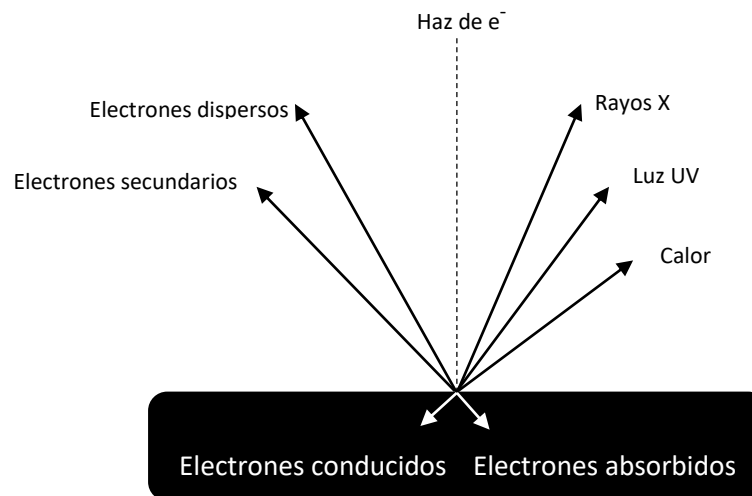


Figura 11. Principales señales emitidas como resultado de la interacción entre el haz de electrones y la muestra. Adaptada de [27]

6.2.2 Ángulo de Contacto

El ángulo de contacto se refiere al ángulo que se forma entre una superficie sólida horizontal y la gota de algún líquido puesta sobre ella (figura 12). El ángulo de contacto es un indicio de la afinidad de la superficie por la solución con la que tiene contacto [28].

Cuando la gota es de agua, se puede definir la hidrofiliicidad/hidrofobicidad del material según los siguientes criterios:

- Cuando el valor del ángulo de contacto es 0 se tiene una superficie completamente hidrofílica.
- Si el valor del ángulo de contacto es menor a 90° la superficie es parcialmente hidrofílica.
- Si el valor del ángulo de contacto es mayor a 90° la superficie es hidrofóbica.

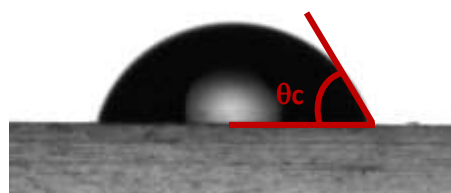


Figura 12. Ángulo de contacto.

Cuando el ángulo de contacto formado en la superficie es menor a 90° actúan las fuerzas cohesivas que es la atracción de moléculas de un mismo cuerpo y mayor a 90° influyen las fuerzas adhesivas que corresponde a la atracción entre moléculas de cuerpos diferentes [29]. Las fuerzas



intermoleculares de atracción entre moléculas de agua se deben a los enlaces de hidrógeno que tienen una alta energía relativa. Esto repercute en tensiones superficiales mayores que las de muchos líquidos [30].

6.2.3 Difracción de Rayos X

Los experimentos de difracción de rayos X requieren una fuente de rayos X, la muestra que se investiga y un detector para recoger los r-x difractados. Dentro de este marco de trabajo general las variables que caracterizan las diferentes técnicas de RX son:

- a) radiación, monocromática o de λ (longitud de onda) variable
- b) muestra: monocristal, polvo o pieza sólida
- c) detector: contador o película fotográfica

La interacción de los rayos X con la materia esencialmente ocurre mediante dos procesos:

- a) Algunos fotones del haz incidente son desviados sin pérdida de energía, constituyen la radiación dispersada exactamente con la misma λ que la radiación incidente (es la que origina el fenómeno de la difracción).
- b) Los fotones pueden sufrir una serie de choques inelásticos al incidir sobre un blanco y su energía incrementa la T de la muestra o da lugar al fenómeno de fluorescencia.

Los rayos dispersados estarán completamente en fase si esa diferencia de fase es igual a un número entero n de longitudes de onda:

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

Esta relación se conoce como Ley de Bragg y establece la condición esencial que debe cumplirse para que ocurra la difracción; n se denomina orden de difracción y debe ser un número entero consistente con $\sin\theta$ menor o igual que 1.

6.2.4 Espectroscopia Infrarroja

La región infrarroja del espectro electromagnético comprende radiaciones con número de onda entre 12,800 y 10 cm^{-1} y para aplicaciones analíticas se utilizan radiaciones del infrarrojo medio con números de onda entre 4000 a 400 cm^{-1} (figura 13) [31].

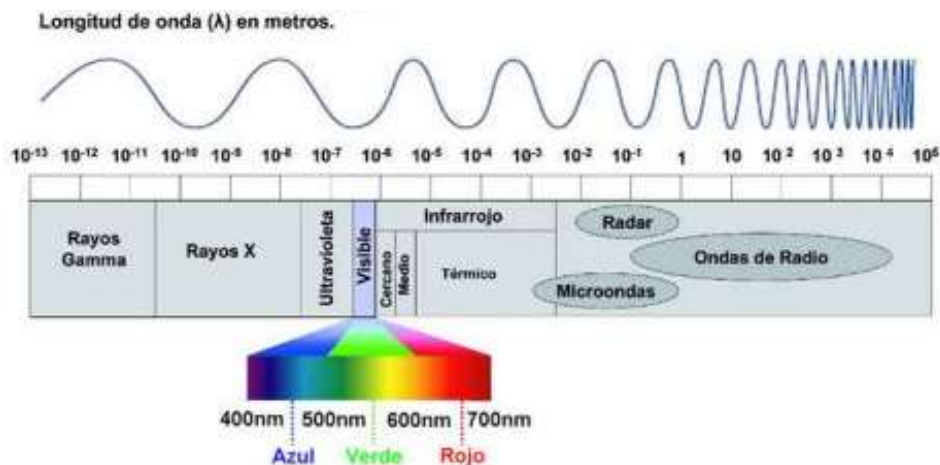


Figura 13. Espectro electromagnético
Tomada de [32]

La espectroscopía infrarroja se basa en la excitación, de modos de vibración y rotación de los enlaces atómicos al ser irradiados con un haz de luz infrarroja. Cada especie de enlace absorbe radiación de una o varias longitudes de onda lo cual permite identificarlas. La energía asociada con la radiación electromagnética en la región infrarroja media provoca la excitación de enlaces químicos de los compuestos orgánicos [32].

Las características más relevantes de esta espectroscopía son las siguientes:

1. Si dos moléculas están constituidas por átomos distintos, o tienen distinta distribución isotópica, o configuración, o se encuentran en ambientes distintos, los espectros infrarrojos serán distintos.
2. Una sustancia definida puede identificarse por su espectro infrarrojo. Estos espectros pueden ser considerados como las huellas digitales de dicha sustancia.
3. Los espectros muestran bandas que son típicas de grupos funcionales particulares y que tienen localizaciones e intensidades específicas dentro de los espectros infrarrojos.
4. A partir de los espectros se pueden inferir las estructuras moleculares. Para ello se requiere un modelo en el cual basar los cálculos.
5. Las intensidades en las bandas del espectro de una mezcla son generalmente proporcionales a las concentraciones de las componentes individuales. Por lo tanto, es posible determinar la concentración de una sustancia y realizar análisis de muestras con varias componentes.

6. Es posible, mediante el uso de dispositivos experimentales adecuados, obtener espectros infrarrojos sin alteración de la muestra, lo que constituye a esta espectroscopía como una herramienta de análisis no destructiva.
7. El tiempo necesario para obtener y almacenar un espectro infrarrojo es del orden de minutos.

La técnica de IR por reflectancia total atenuada (ATR) es una técnica que consiste en colocar la muestra sobre un cristal y se hace incidir el haz a un determinado ángulo, el haz penetra unos cuantos micrómetros en la muestra antes de reflejarse de nuevamente en el cristal. El haz se refleja varias veces dentro del cristal antes de dirigirse al detector (figura 14). Esta técnica es utilizada para obtener espectros infrarrojos de muestras opacas que no pueden ser atravesadas por el haz de luz infrarroja y aquellas que presentan dificultad para ser analizadas por transmisión.

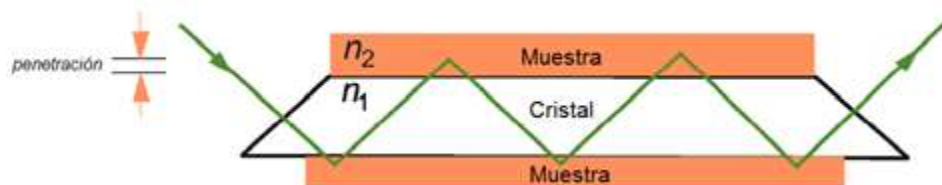


Figura 14. Esquema de reflectancia total atenuada.
Tomada de [32]

6.2.5 Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X

La espectrometría de energía dispersiva (EDS) tiene como principio básico el hecho de que átomos de elementos químicos diferentes emiten rayos X de energía característica diferente. Al incidir un haz de electrones de alta energía sobre la muestra se puede propiciar una emisión de rayos X de energía que depende de los átomos de la muestra. La evaluación del espectro de energía recogido por un detector de rayos X permite la determinación cualitativa y cuantitativa de la composición química de la muestra. La Figura 15 muestra el esquema del espectrómetro de energía dispersiva.

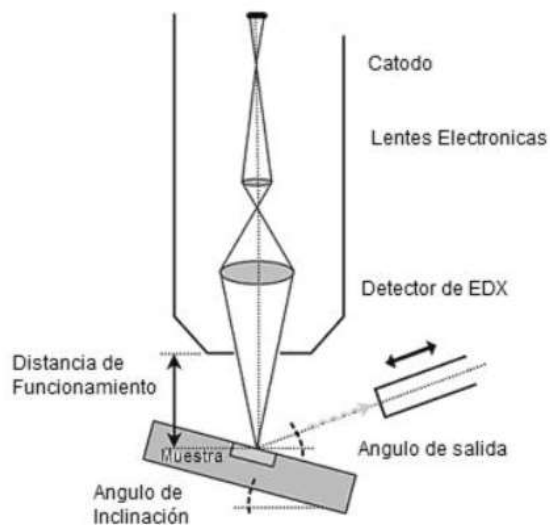


Figura 15. Diagrama del espectrómetro de energía dispersiva.
Tomada de [33]

La resolución de esta técnica está determinada por la penetración y propagación del haz de electrones, la resolución nominal de esta técnica es de aproximadamente $2\ \mu\text{m}$ en condiciones normales. Por eso, se llama también microanálisis de rayos X. Todos los elementos de número atómico mayor a 4 (Berilio) y hasta el 95 (Americio) que estén contenidos en una muestra pueden ser detectados y analizados simultáneamente por esta técnica [34].

6.2.6 Derivatización química para la determinación de grupos amina

La derivatización química es un proceso que consiste en modificar químicamente un compuesto para producir un derivado con algunas propiedades nuevas que faciliten o permitan su análisis. Las reacciones de derivatización útiles requieren una afinidad selectiva del grupo funcional de interés con un elemento o especie molecular no originalmente presente en la superficie [35].

Las reacciones de derivatización fundamentales de los benzaldehídos fluorados fueron investigadas por Favia et al. sobre superficies de polietileno plasmadas [36]. Se encontró que el 4-Trifluorometil benzaldehído (TFBA) forma enlaces específicos con aminas primarias (figura 16) los cuales se pueden identificar posteriormente por diversas técnicas de caracterización debido a que el flúor es un elemento que no se encuentra presente en los grupos amina [37].

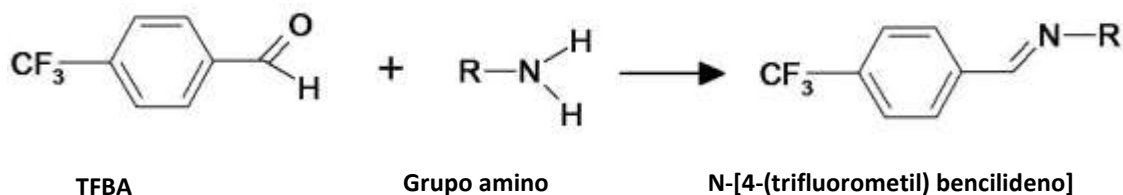


Figura 16. Reacción de derivatización de aminas primarias con TFBA.

6.3. Caracterización fisicoquímica de los materiales poliméricos

Las películas poliméricas depositadas sobre los cubreobjetos fueron recubierta con oro y analizadas mediante microscopía electrónica de barrido para analizar su morfología superficial, ángulo de contacto se obtuvo mediante un Goniómetro ramé-hart 250 para determinar su grado de hidrofiliicidad en contacto con agua, difracción de rayos X (DRX) para determinar su grado de cristalinidad, espectroscopia infrarroja por reflexión total atenuada (IR-ATR) para identificar los grupos funciones presentes en los polímeros, espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) para identificar el porcentaje de cada elemento químico presente y cuantificar el porcentaje de aminas primarias presentes en los polímeros mediante derivatización química con TFBA.

6.4. Cultivo celular

Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Se distinguen cuatro tipos de cultivo celular:

- Cultivo de órganos
- Explantes primarios
- Cultivo celular primario
- Cultivos histotípicos y organotípicos

Al establecer un cultivo celular se seleccionan las células que van a crecer en función de numerosos criterios: sólo formarán parte del cultivo aquellas células que sean capaces de superar el proceso de disgregación, de adherirse al sustrato y de proliferar (bien en forma de monocapa, bien en suspensión).

Al alcanzar la confluencia es cuando muchas líneas celulares expresan sus aspectos más característicos. Es en este estado cuando su morfología y fisiología son más parecidas a su estado



original. Es también el momento en el que se detiene el crecimiento y se hace necesario dividir, replaquear o propagar las células [38].

Las células del cultivo primario en monocapa se dispersan por métodos enzimáticos y se pasan a un nuevo frasco de cultivo. En el caso de células en suspensión, sencillamente se diluyen en medio fresco. Los sucesivos cultivos así formados se denominan una línea celular. La formación de una línea celular a partir de un cultivo primario implica que:

- Aumenta el número de células obtenidas.
- Acaban predominando uno o dos tipos celulares: los que tienen mayor tasa de crecimiento
- La población celular se hace uniforme y homogénea.
- Sus características se conservan durante las sucesivas generaciones y se conservan en nitrógeno líquido de forma indefinida.

Normalmente, las líneas celulares tienen una vida finita que, según el tipo de célula, se puede prolongar entre 20 y 100 generaciones. Superado ese límite, las células entran en una etapa que se denomina senescencia en la que pierden su capacidad de proliferar (supuestamente por el acortamiento de los telómeros) y mueren. Sin embargo, algunas células (como las de roedores y las tumorales) evitan la senescencia y dan lugar a líneas celulares continuas, que crecen indefinidamente. Estas células pueden surgir de forma espontánea (exposición a radiaciones ionizantes o a carcinógenos químicos) o inducida (infección vírica o transfección de ADN) y son el resultado de un cambio genotípico denominado transformación [39].

Las células transformadas se caracterizan por lo siguiente:

- Son inmortales: crecen indefinidamente
- Su crecimiento es aberrante: se pierde la inhibición por contacto, la limitación de la densidad celular durante la proliferación y la dependencia del anclaje
- Son malignas: invaden tejidos y dan lugar al crecimiento de tumores
- Son genéticamente inestables: son heteroploides (varía el número de cromosomas) y presentan aberraciones cromosómicas.



6.5. Cultivo de la línea celular N1E-115

La línea celular N1E-115 (neuroblastoma de ratón) se prolifera durante 10 días en cajas de cultivo de 75 cm² en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), 1% de Glutamax, y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina), cambiando este medio de cultivo cada 48 horas durante 4 días y cada 24 horas los días restantes.

6.6. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia o técnica de inmunodetección con anticuerpos fluorescentes es un procedimiento especializado que consiste en una reacción antígeno-anticuerpo hecha visible por la incorporación de un fluoróforo al anticuerpo, y una vez hecha la reacción, se expone a la longitud de onda de excitación emitida por un láser, para ser evidenciado por el fenómeno de fluorescencia a la longitud de onda de emisión.

La inmunofluorescencia se puede realizar de forma directa o indirecta. En la inmunofluorescencia directa el anticuerpo primario que reconoce el antígeno se encuentra marcado directamente con el fluoróforo, para lo cual se emplean anticuerpos de gran especificidad contra el determinante antigénico que se va a estudiar, en cambio la inmunofluorescencia indirecta hace uso de dos anticuerpos en donde el anticuerpo primario reconoce el antígeno, y un anticuerpo secundario marcado con el fluoróforo reconoce al anticuerpo primario [40].

Para el desarrollo de la inmunofluorescencia es necesario un microscopio provisto de un condensador de campo oscuro, de una fuente luminosa especial con un bombillo de mercurio que produzca luz ultravioleta de varios filtros específicos. Cada sistema está constituido por un filtro que suministra luz a una cierta longitud de onda para excitar al fluorocromo y un segundo filtro barrera para excluir la luz excitante, que permite la transmisión de iluminación fluorescente, de mayor longitud de onda. La fluorescencia en el canal verde alcanza la máxima excitación a 490 nm y emite luz fluorescente alrededor de 520 nm. Las lámparas más utilizadas para lograr una buena estimulación son las de tungsteno o de mercurio de alta presión [41].

6.7. Ensayo de diferenciación

Los cubreobjetos recubiertos con las películas poliméricas se esterilizaron mediante luz ultravioleta y se colocaron en cajas de 24 pozos. En cada caja se colocaron 3 portaobjetos sin recubrimiento polimérico como control y 4 cubreobjetos con recubrimiento de cada polímero (PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I) sintetizados a la misma potencia. En seguida se despegaron las células sembradas en las cajas de cultivo con solución PUK's y se realizó un conteo en la cámara de Neubauer tiñéndolas con azul de tripano. Posteriormente se sembraron 15'000 células en cada pozo con 400 μ l de medio de cultivo.

Pasadas 24 horas de la siembra sobre los materiales, se retiró el medio de cultivo para colocar el medio diferenciador, el cual se conformó por DMEM, 1.25% de DMSO, 2% de SFB y 1% de antibiótico y se mantuvieron en ese medio durante 72 horas haciendo un cambio de medio a las 48 horas. Durante este ensayo se tomaron 5 fotos por pozo cada 24 horas. Al finalizar las 72 horas en medio de diferenciación las células se fijan con paraformaldehído al 4% y se dejaron sumergidas en PBS (Phosphate Buffered Saline) para posteriormente realizar las inmunofluorescencias a cada cubreobjetos. Se realizaron tres experimentos independientes de este ensayo (figura 17).

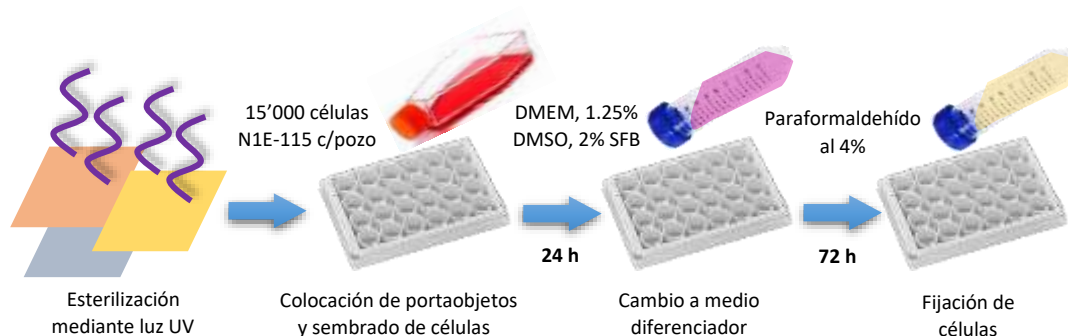


Figura 17. Resumen de ensayo de diferenciación.

6.7.1 Inmunofluorescencia

Para realizar la inmunofluorescencia de las células fijadas en los materiales poliméricos, se retiró el PBS de cada pozo en el cual quedaron incluidas y se permeabilizaron agregando 400 μ l en cada pozo de una solución de Tritón al 0.01% durante 30 minutos. En seguida se realizó un lavado en cada pozo con PBS durante 5 minutos. Pasado ese tiempo los portaobjetos se trasladaron a una cámara



de humedad en donde se les agregó 40 μ l a cada uno de suero normal de cabra (SNC) al 5% durante 30 minutos para posteriormente realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS. En seguida se colocó el anticuerpo primario β III-Tubulina en una concentración 1:1000 durante 12 horas a temperatura ambiente, en seguida se realizaron lavados con PBS para agregar el anticuerpo secundario (Alexa 488 anti-mouse) en una concentración 1:300, el cual duró en incubación 2 horas, pasado ese tiempo se contratiñeron los núcleos con DAPI 300nM en PBS (4',6-diamino-2-fenilindol), se realizaron lavados con PBS y finalmente se fijaron incluyéndose en Vectashield.

6.7.2 *Conteo de neuritas*

Para realizar la medición de la prolongación de neuritas se observaron los portaobjetos mediante un microscopio confocal Nikon y las imágenes se capturaron por medio del software NIS-elements (Nikon), posteriormente se analizaron las micrografías con el plugin NeuronJ del programa ImageJ. Se analizaron 15 imágenes por material polimérico, se midieron 30 prolongaciones dendríticas por imagen, se graficó la longitud promedio en μ m y se calculó la desviación estándar.

Capítulo 7

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Síntesis por plasma de PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I

Se sintetizaron polímeros de PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I a 20, 30 y 40 W cada uno, obteniendo nueve polímeros con características distintas con el fin de estudiar su efecto sobre la diferenciación neuronal sobre la línea celular N1E-115.

Los polímeros se obtuvieron en forma de películas de diferentes tonalidades dependiendo del monómero utilizado, la potencia de síntesis y el grosor de película. En la figura 18 se observa que las películas de PPy-I son de un color ámbar oscuro en 20 W y claro en el caso de la síntesis de 30 W. Las películas de PAI-I resultaron de un color ámbar claro y translucido en el caso de 20 W y 30 W mientras que en PPy/PAI-I las películas son color ámbar/amarillo, teniendo un color más intenso en la película sintetizada a 30 W.

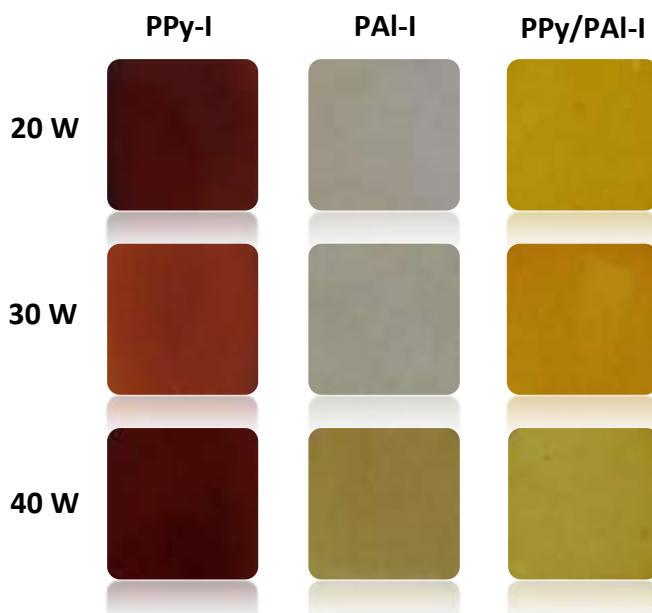


Figura 18. Películas poliméricas sobre portaobjetos

Las películas tuvieron grosores entre 1.3-9.2 μm los cuales variaron dependiendo de las diferentes condiciones de síntesis, como presión y potencia, así como del monómero de origen. En el caso de PPy-I la película de mayor grosor fue la sintetizada a 40 W teniendo 6.1 μm , en seguida por la de 20 W con 4.1 μm y finalmente la más delgada resultó la de 30 W de 1.8 μm . En PAI-I la película de mayor grosor, al igual que en PPy-I, resultó a 40 W con 4 μm , seguida de la sintetizada a 30 W con 1.6 μm la cual resultó casi a la par de la sintetizada a 20 W con 1.3 μm . En el caso del copolímero PPy/PAI-I la película de mayor grosor fue la sintetizada a 30 W con 9.2 μm , en 20 W el grosor fue de 5.4 μm y finalmente la sintetizada a 40 W resultó de 2 μm (tabla 3).

Grosor promedio de película ± 0.1 (μm)

Potencia (W)	PPy-I	PAI-I	PPy/PAI-I
20	4.1	1.3	5.4
30	1.8	1.6	9.2
40	6.1	4.0	2.0

Tabla 3. Grosor promedio de película polimérica sobre portaobjetos

El grosor de los materiales depende de las condiciones de síntesis, en especial de la potencia y la presión en el reactor, debido a que son estas condiciones las que definen la fuerza y frecuencia de las interacciones moleculares que se encuentran en el plasma, a su vez, el color de las películas poliméricas depende del grosor, a mayor grosor las películas se tornan de un color más oscuro debido a la acumulación del material. [33]

7.2 Morfología superficial de los materiales poliméricos aminados

Se estudió la morfología superficial de las películas mediante la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), obteniendo micrografías de superficies lisas, particuladas y porosas.

En la figura 19 se observa la morfología superficial de PPy-I a sus diferentes potencias de síntesis. En la micrografía 19 a) se puede observar que PPy-I a 20 W tiene una superficie en su mayoría lisa y solo con algunos agregados amorfos de película en espacios aislados como se aprecia en el aumento. En el caso de PPy-I sintetizado a 30 W (figura 19 b) se puede notar una mayor cantidad de agregados sobre toda la superficie de aproximadamente 1 μm de diámetro. La superficie de PPy-I 40 W (19 c) muestra una superficie con varios agregados de películas de aproximadamente 10 μm .

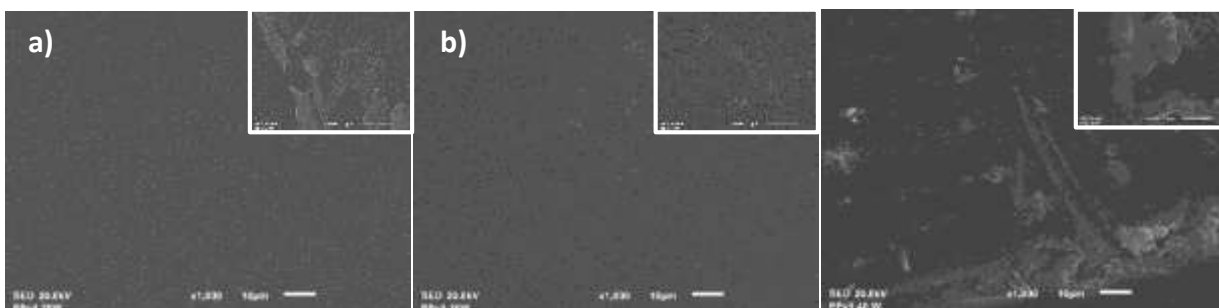


Figura 19. Morfología de la superficie de las películas de PPy-I: a) 20 W, b) 30 W y c) 40 W
Barra de escala 10 μm y en el recuadro la barra de escala 5 μm

Las micrografías de la figura 20 muestran la morfología superficial de las películas de PAI-I. En la micrografía de la figura 20 a) se observa la superficie de PAI-I 20 W con varios agregados y/o partículas los cuales en su mayoría son amorfos, pero también se encuentran varias partículas esféricas de aproximadamente 1.5 μm como se puede observar en el aumento. En la micrografía 20 b) que corresponde a PAI-I 30 W se observa la superficie lisa con algunos agregados amorfos de películas mayores a 5 μm . En la micrografía 20 c) se muestra la superficie de la película de PAI-I 40 W en donde se además de partículas amorfas se observan varios poros de aproximadamente 3 μm .

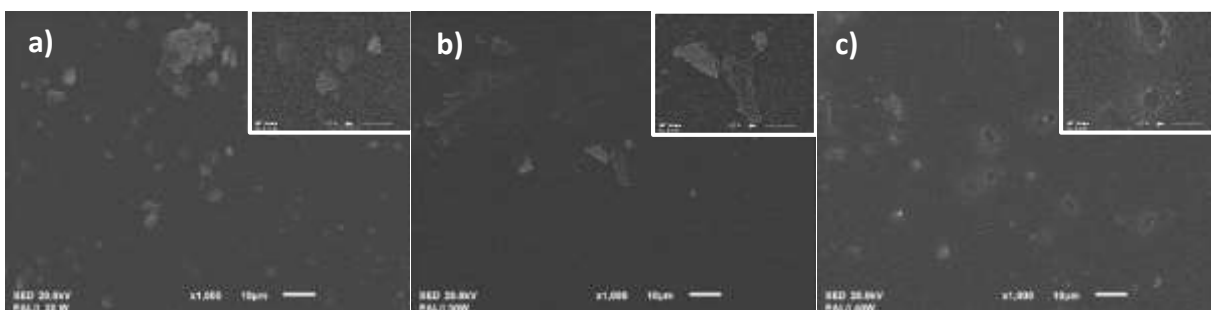


Figura 20. Morfología de la superficie de las películas de PAI-I: a) 20 W, b) 30 W y c) 40 W
Barra de escala 10 μm y en el recuadro la barra de escala 5 μm

En la figura 21 se muestra la morfología de las superficies de las películas del copolímero PPy/PAI-I a las diferentes potencias de síntesis. La película de PPy/PAI-I 20 W (figura 21 a) muestra una superficie en su mayoría lisa con algunas partículas esféricas aisladas de 2 a 4 μm . En la micrografía 21 b) se muestra la superficie de PPy/PAI-I 30 W en donde se observan varios agregados amorfos de película y algunas partículas esféricas de entre 5 μm y 7 μm . Por último, se muestra en la figura 21 c) la morfología de la superficie de PPy/PAI-I 40 W en donde se observan algunas partículas que van de 1 a 8 μm .

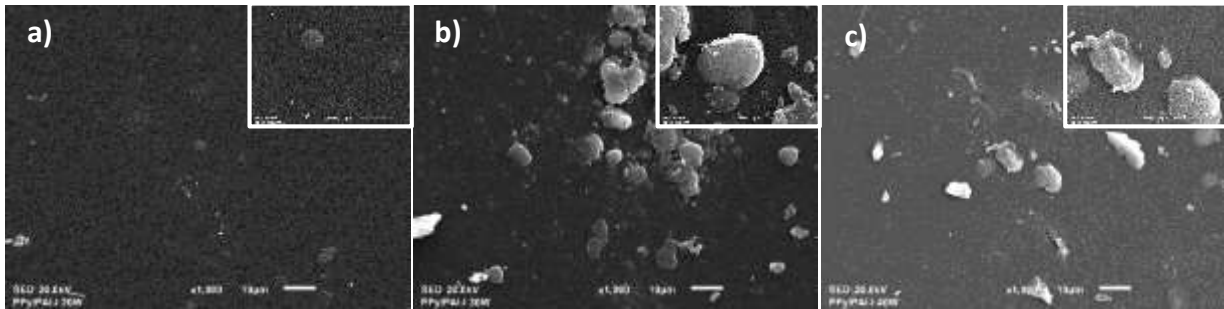


Figura 21. Morfología de la superficie de las películas de PPy/PAI-I: a) 20 W, b) 30 W y c) 40 W
Barra de escala 10 μm y en el recuadro la barra de escala 5 μm

La morfología superficial de los materiales es importante dado que las películas que poseen superficies rugosas o con cierto grado de porosidad son más adecuadas para el crecimiento axonal, motilidad, morfología y adhesión celular [42] [43] [44].

7.3 Hidrofilicidad mediante ángulo de contacto

Todas las películas se encuentran dentro de la clasificación de materiales parcialmente hidrofílicos e hidrofílicos debido a que poseen ángulos de contacto menores a 90° y en las tres potencias de síntesis (20, 30 y 40 W) las películas de PAI-I resultaron las más hidrofílicas. En las figuras 22-24 se presenta el ángulo de contacto en función del volumen de H_2O a diferentes potencias de cada polímero.

El ángulo de contacto de las películas sintetizadas a 20 W se muestra en la figura 22. La película de PPy-I tiene ángulos de contacto que van de 82° a 87.5° siendo la menos hidrofílica de los tres polímeros sintetizados a esta potencia. El polímero de PPy/PAI-I a 20 W tiene ángulo de contacto de entre 79° - 82.5° y el polímero de PAI-I a 20 W resultó ser ligeramente más hidrofílico que los anteriores con ángulos de contacto de entre 77° a 81° .

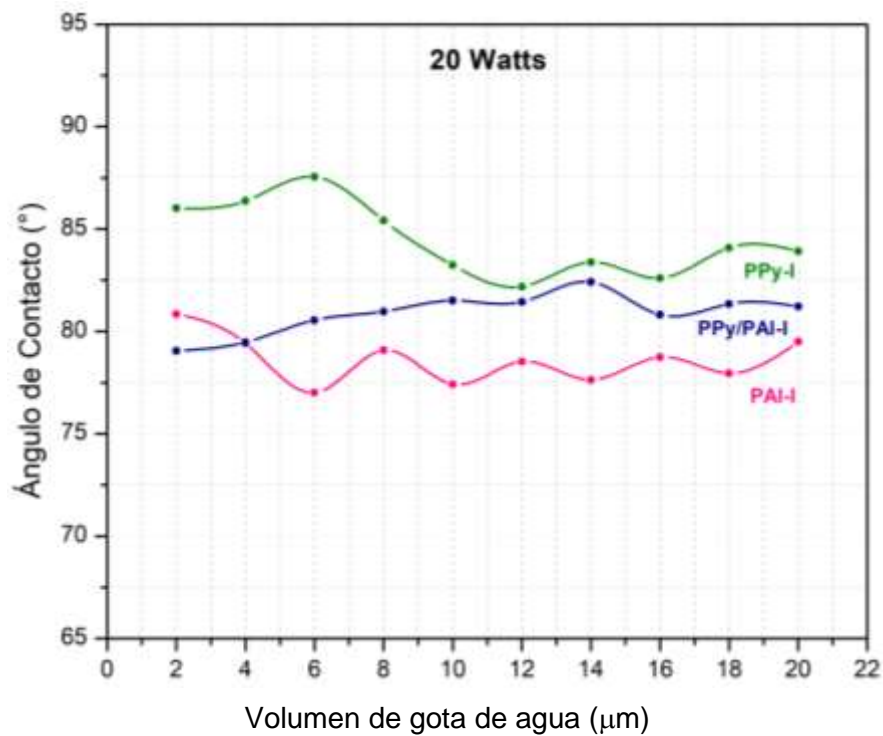


Figura 22. Ángulo de contacto en agua de los polímeros sintetizados a 20 W

El ángulo de contacto de los polímeros sintetizados a 30 W se muestra en la figura 23. Las películas de PPy/PAI-I y PPy-I a 30 W resultaron con ángulos de contacto similares de 82° a 84° y 81° a 83° respectivamente. En el caso de PAI-I a 30 W tuvo ángulos de contacto de entre 47° y 60° , entrando en la categoría de materiales hidrofílicos y siendo ésta la más hidrofílica de las 9 películas sintetizadas.

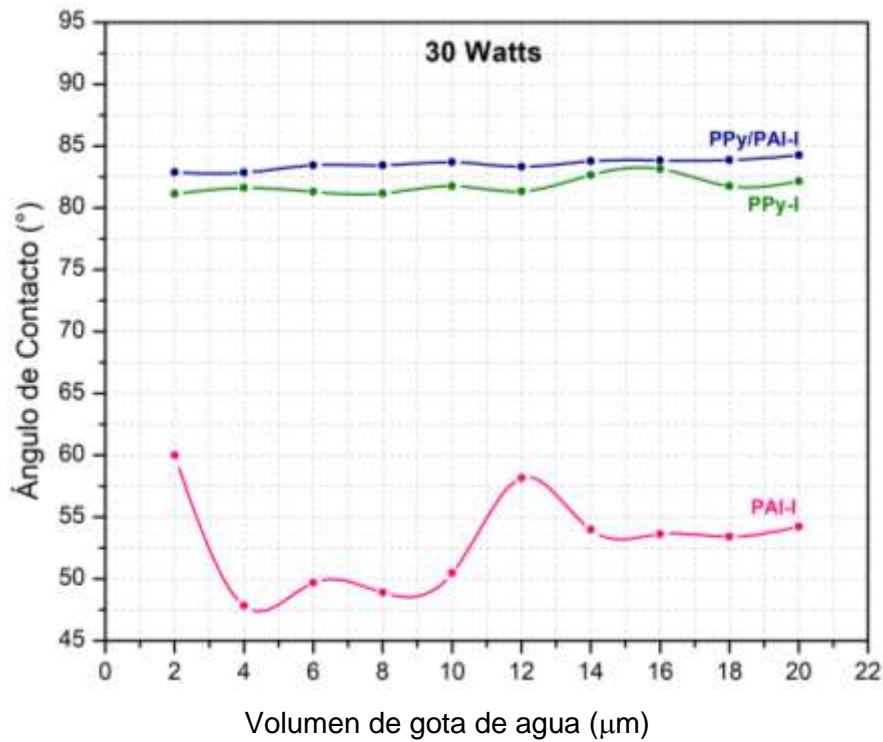


Figura 23. Ángulo de contacto en agua de los polímeros sintetizados a 20 W.

En la figura 24 se presentan los ángulos de contacto de las películas poliméricas sintetizadas a 40 W. La película de PPy/PA-I a 40 W obtuvo un ángulo de contacto casi invariable de 87°-88° siendo ligeramente menos hidrofílico que las otras dos películas sintetizadas a 40 W. La película de PPy-I a 40 W obtuvo un ángulo de contacto de 84° con ligeras variaciones y el polímero de PAI-I a 40 W obtuvo ángulos de 81° a 83° siendo ésta ligeramente más hidrofílica que las anteriores.

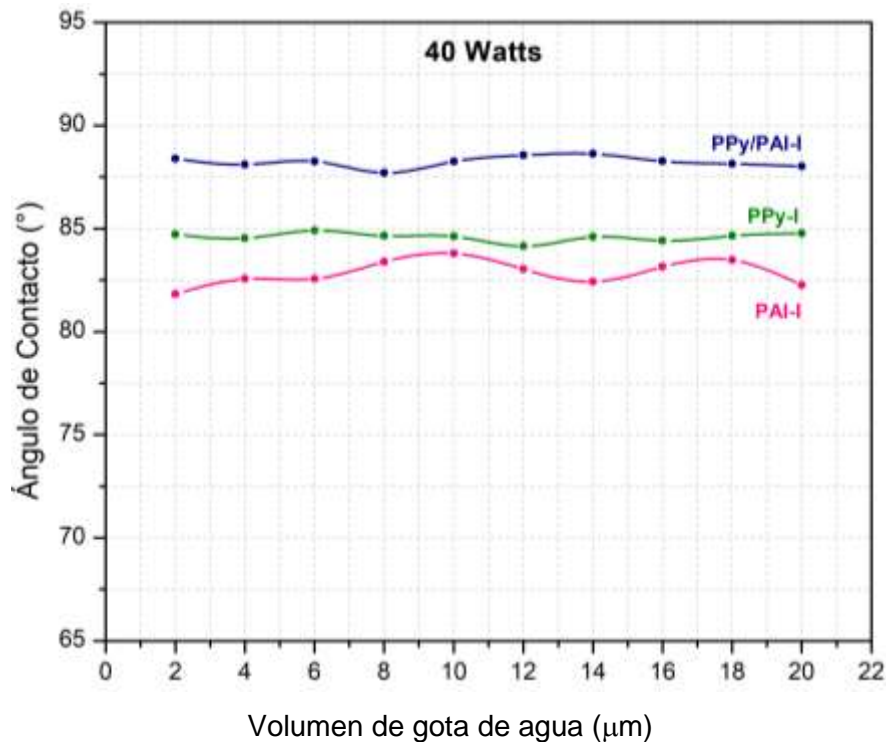


Figura 24. Ángulo de contacto en agua de los polímeros sintetizados a 40 W.

Entre las propiedades fisicoquímicas de las superficies que se ha determinado que afectan la respuesta celular se encuentra la mojabilidad (hidrofilicidad o hidrofobocidad). Las superficies más hidrofílicas (con ángulos menores a los 60°) soportan mejor el crecimiento celular ya que permite una mejor interacción con el material y adhesión a él [45].

7.4 Difracción de rayos X

Los polímeros sintetizados por plasma tienden a formar estructuras amorfas, debido a que se producen cadenas muy largas y entrecruzadas de monómeros. En las figuras 25-27 se muestran los difractogramas de los materiales poliméricos a diferentes potencias de síntesis en donde no se observan picos definidos lo cual indica que los materiales son completamente amorfos, sin embargo, se observa un pico poco definido presente en todos los materiales en un rango de 23° a 25° .

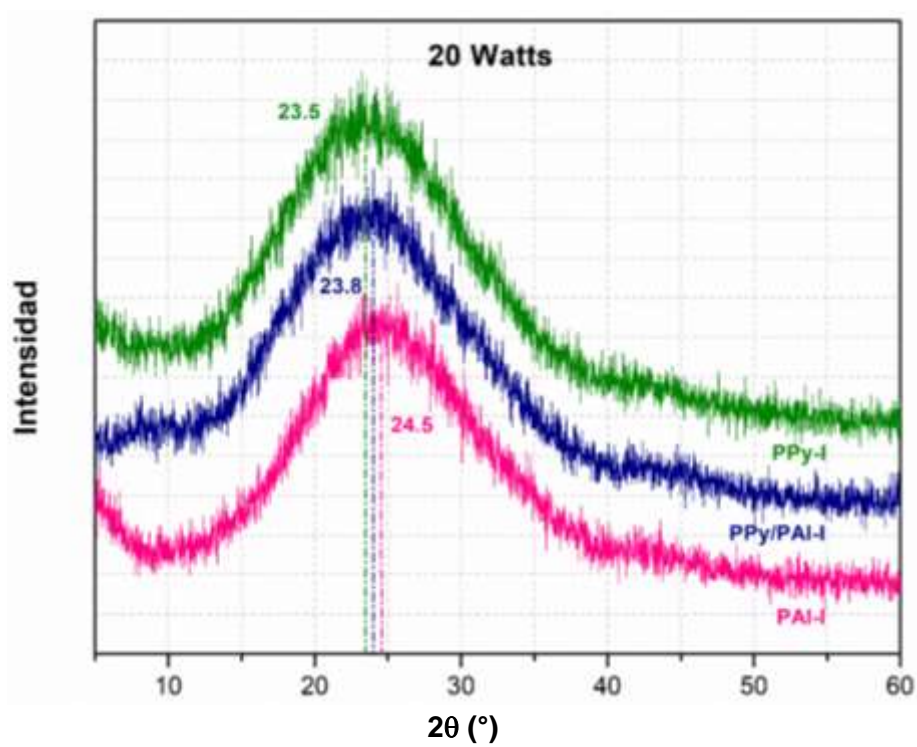


Figura 25. Difractograma de polímeros sintetizados a 20 W.

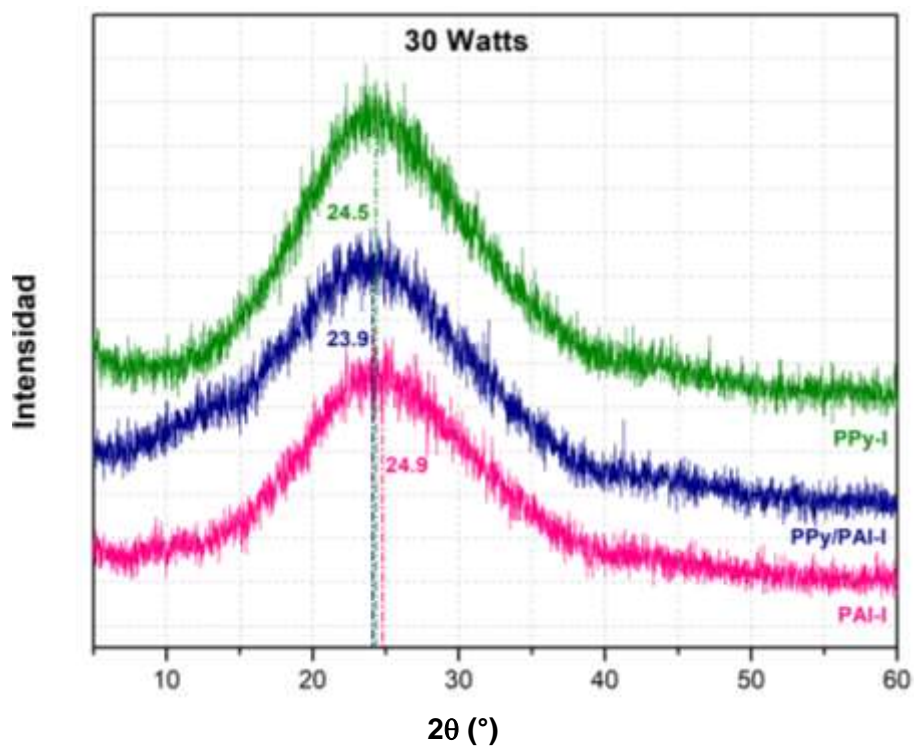


Figura 26. Difractograma de polímeros sintetizados a 30 W.

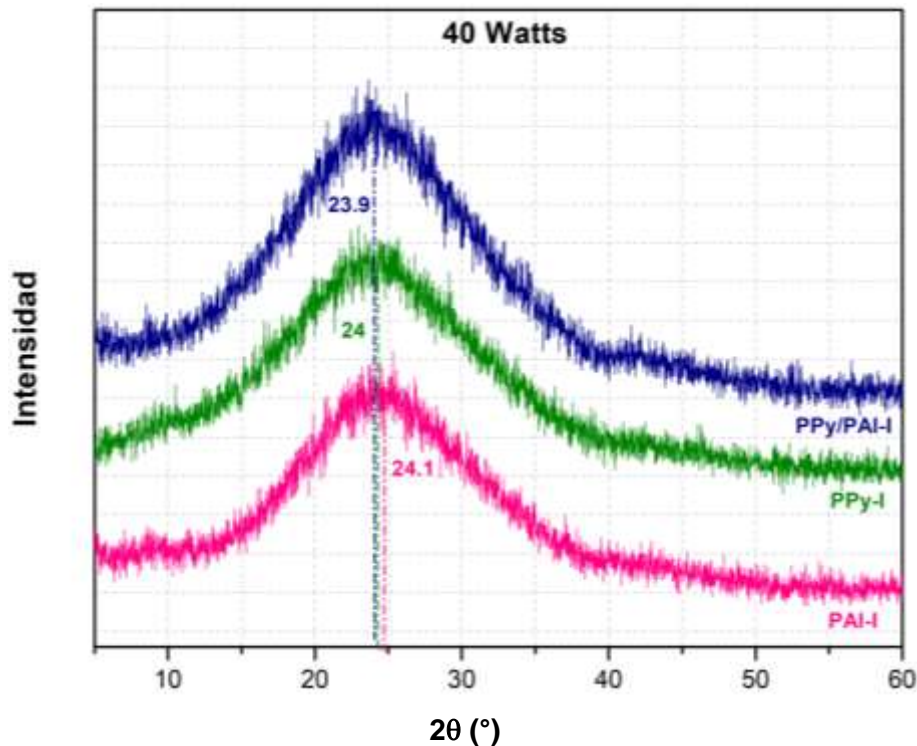


Figura 27. Difractograma de polímeros sintetizados a 40 W.

7.5 Espectroscopía Infrarroja por Reflexión Total Atenuada

Se estudiaron los principales grupos funcionales presentes en las películas poliméricas sintetizadas por plasma, formados a las diferentes potencias de síntesis mediante Espectroscopía infrarroja por reflexión total atenuada (IR-ATR) en un intervalo de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} . En las figuras 28-30 se muestran los espectros de PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I a las diferentes potencias de síntesis.

Las bandas debidas a los enlaces N-H se muestra en 3365 cm^{-1} en el caso de las películas sintetizadas a 20 W (figura 28), mientras que en los polímeros sintetizados a 30 y 40 W (figuras 29 y 30 respectivamente) se recorre la señal a 3345 cm^{-1} . Esta señal indica la presencia de aminas. Se puede observar que el pico es más definido en la película de PPy-I en el caso de 20 W, en 30 W esta banda se destaca más en el copolímero (PPy/PAI-I) y en 40 W se muestra el pico definido en PPy-I y PPy/PAI-I, en el caso de PAI-I a 40 W esta señal es débil. En el rango de $3000\text{-}2830\text{ cm}^{-1}$ se encuentran los enlaces =C-H y -C-H pertenecientes a estructuras alifáticas. Se puede observar la presencia de estos enlaces en todos los materiales, siendo más notoria en el copolímero sintetizado a 30 W. En $2215\text{-}2217\text{ cm}^{-1}$ se observan bandas correspondientes a los grupos $\text{C}\equiv\text{C}$ y $\text{N}\equiv\text{C}$ los cuales en general se

pueden observar en todas las potencias con mayor transmitancia en el copolímero, mientras que en los materiales de PAI-I esta señal es notoria únicamente en la síntesis a 30 W. En $1600-1622\text{ cm}^{-1}$ se observan bandas correspondientes a dobles enlaces C=C, C=N, C=O. Estos enlaces se encuentran en mayor porcentaje en las síntesis de 30 W para el caso de PPy/PAI-I y PAI-I, mientras que en PPy-I se observa mayor presencia en la síntesis a 40 W. En $880-900\text{ cm}^{-1}$ se encuentran los enlaces C-H los cuales en general aumentan su porcentaje conforme aumenta la potencia de síntesis [18] [46].

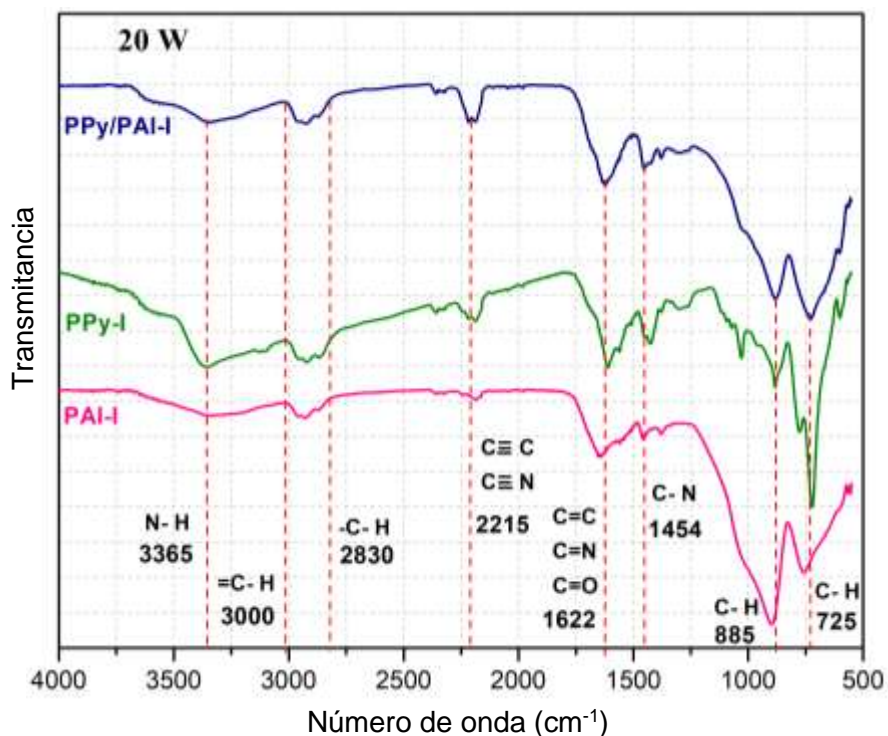


Figura 28. Espectro infrarrojo por ATR de los polímeros PPy-I, PAI-I, PPy/PAI-I sintetizados a 20 W

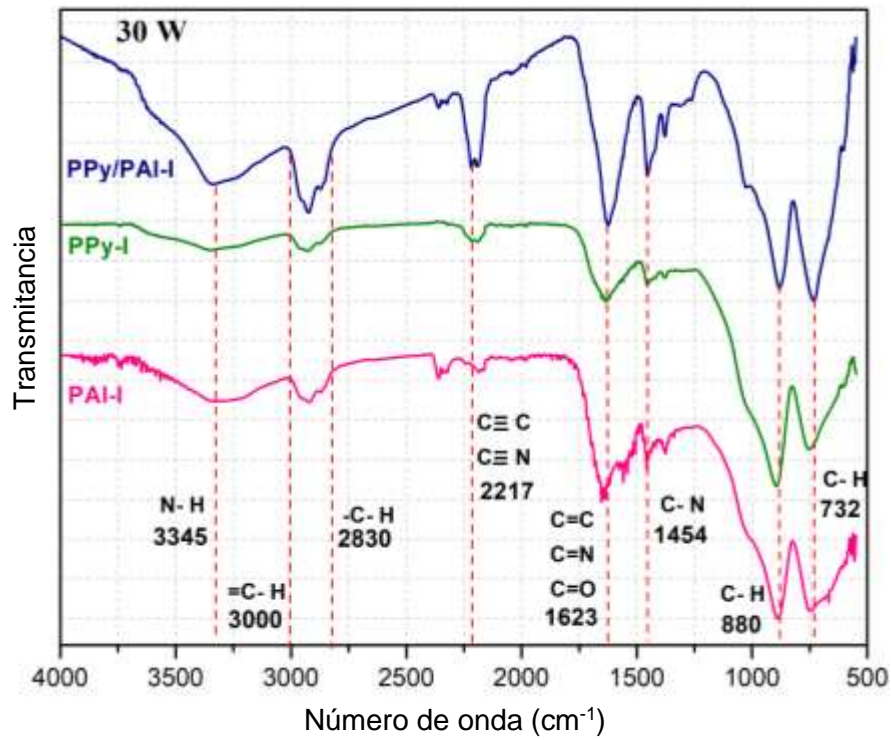


Figura 29. Espectro infrarrojo por ATR de los polímeros PPy-I, PAI-I, PPy/PAI-I sintetizados a 30 W

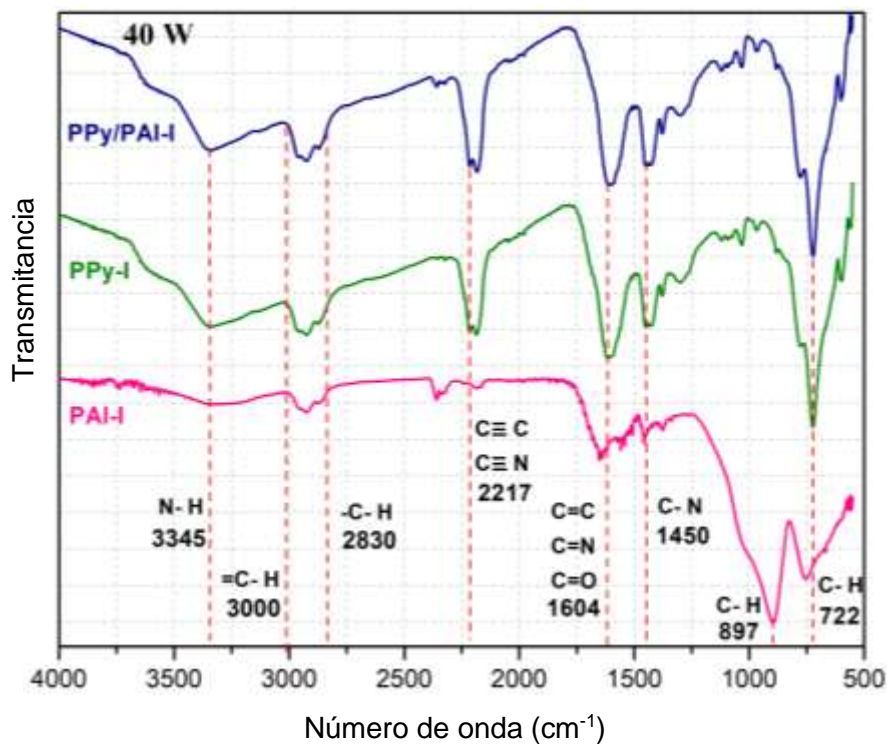


Figura 30. Espectro infrarrojo por ATR de los polímeros PPy-I, PAI-I, PPy/PAI-I sintetizados a 40 W

7.6 Análisis elemental

El análisis elemental de las películas poliméricas a las diferentes potencias se realizó mediante espectroscopia de dispersión de energía. La relación C/N del pirrol es 4/1 y de alilamina es 3/1, en condiciones ideales, los polímeros PPy y PAI tendrían la misma. En las tablas 4, 6 y 8 se muestran los porcentajes atómicos promedio de C, N, O y I a 20 W, 30 W y 40 W de los polímeros PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I y en las tablas 5, 7 y 9 muestran las relaciones atómicas de C/N y C/O para cada uno.

ELEMENTO	PPy-I	PAI-I	PPy/PAI-I
C	86.58	65.38	86.42
N	4.68	4.64	3.79
O	8.58	29.92	9.77
I	0.15	0.06	0.03

Tabla 4. Porcentaje atómico promedio de los elementos de los polímeros sintetizados a 20 W

RELACIÓN ATÓMICA	PPy-I	PAI-I	PPy/PAI-I
C/N	18.5	14	22.8
C/O	10	2.2	8.8

Tabla 5. Relación atómica C/N y C/O en los polímeros sintetizados a 20 W.

ELEMENTO	PPy-I	PAI-I	PPy/PAI-I
C	78.54	64.89	87.26
N	4.76	4.50	4.20
O	16.6	30.53	8.51
I	0.10	0.09	0.03

Tabla 6. Porcentaje atómico promedio de los elementos de los polímeros sintetizados a 30 W.



RELACIÓN ATÓMICA	PPy-I	PAI-I	PPy/PAI-I
C/N	16.5	14.4	21.6
C/O	4.7	2.1	10.1

Tabla 7. Relación atómica C/N y C/O en los polímeros sintetizados a 30 W.

ELEMENTO	PPy-I	PAI-I	PPy/PAI-I
C	79.58	70.10	92.36
N	4.12	4.35	3.76
O	16.45	25.04	3.87
I	0.05	0.12	0.07

Tabla 8. Porcentaje atómico promedio de los elementos de los polímeros sintetizados a 40 W.

RELACIÓN ATÓMICA	PPy-I	PAI-I	PPy/PAI-I
C/N	19.31	16.1	24.6
C/O	4.81	2.8	23.9

Tabla 9. Relación atómica C/N y C/O en los polímeros sintetizados a 40 W.

7.7 Derivación química con Trifluorometil benzaldehído

Para determinar el porcentaje de nitrógeno que se encuentra en forma de aminas primarias, se realizó una derivación química con 4-Trifluorometil benzaldehído (TFBA), el cual es específico para aminas primarias. Se puede observar en la tabla 10 los porcentajes atómicos de cada elemento presente en los materiales después de la derivación.



ELEMENTO	%A	%A	%A	%A	%A	%A	%A	%A	%A
	PPy-I	PPy-I	PPy-I	PAI-I	PAI-I	PAI-I	PPy/PAI-I	PPy/PAI-I	PPy/PAI-I
	TFBA	TFBA	TFBA	TFBA	TFBA	TFBA	TFBA	I TFBA	I TFBA
	20 W	30 W	40 W	20 W	30 W	40 W	20 W	30 W	40 W
C	79.73	71.65	89.05	31.16	37.52	35.45	74.14	64.44	45.51
N	4.16	4.4	3.43	2.12	2.24	3.88	3.16	4.18	3.5
O	15.21	23.85	7.00	65.87	58.05	59.36	22.31	30.96	50.53
I	0.07	0.04	0.02	0.06	0.12	0.14	0.04	0.03	0.04
F	0.83	0.28	0.51	0.81	2.11	1.15	0.79	0.40	0.33

Tabla 10. Porcentaje atómico promedio de los elementos presentes después de la derivatización química de los polímeros a diferentes potencias de síntesis.

Se calculó el porcentaje de nitrógeno en forma de aminas presentes mediante la fórmula:

$$\frac{[NH_2]u}{[N]u} = \frac{[F]d}{3[N]d} \times 100$$

En la tabla 11 se muestran los resultados. En general los polímeros de PAI-I mostraron mayor porcentaje de aminas primarias a las tres diferentes potencias de síntesis, mientras que los materiales de PPy-I resultaron los de menor porcentaje de aminas primarias presentes.

POLÍMERO	PORCENTAJE DE $[NH_2]/[N]$ A DIFERENTES POTENCIAS DE SÍNTESIS		
	20 W	30 W	40 W
PPy-I	6.7	2.1	4.96
PAI-I	12.7	31.4	9.9
PPy/PAI-I	8.33	3.19	3.14

Tabla 11. Porcentaje de aminas primarias de los polímeros PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I a diferentes potencias de síntesis.



7.8 Diferenciación de la línea celular N1E-115 sobre los materiales poliméricos aminados

El ensayo de diferenciación se documentó mediante fotografías cada 24 horas. En las figuras 31-33 se observa el crecimiento neurítico post estímulo de diferenciación a través del tiempo dependiendo del material y potencia de síntesis. Es notable que desde las primeras 24 horas hay mayor número de células presentes en el control. A las 48 horas se observa una mayor longitud neurítica en los polímeros sintetizados a 30 W (figura 32). En los controles se observa crecimiento de las prolongaciones neuríticas a la par de la proliferación celular. A las 72 horas post estímulo de diferenciación se observa que la mayoría de las células se encuentran diferenciadas en especial en el polímero de PPy-I a 20 W (figura 31), con algunos cúmulos celulares. La muestra control en este tiempo se encuentra completamente cubierto de células, se formó una monocapa celular y no es posible observar la longitud de las dendritas debido a la alta densidad de células. En la figura 33 que corresponde a las células N1E-115 sembradas sobre los materiales a 40 W es notorio que las prolongaciones neuríticas son de menor longitud que en los polímeros sintetizados a 20 W y 30 W, y de igual forma hay una menor cantidad de células sobre ellos.

Las células en estado indiferenciado tienen la capacidad de proliferarse y diferenciarse en varios tipos celulares, a esto se le conoce como potencialidad. Entre más diferenciada/específica sea una célula esta pierde potencialidad y proliferará en menor cantidad. Otro indicio de diferenciación celular es el cambio de morfología, mientras que una célula de origen neuronal indiferenciado tiene una morfología redondeada, una neurona diferenciada posee una morfología con prolongaciones en forma de fibras alargadas [47] [48] [49] [47] [50].

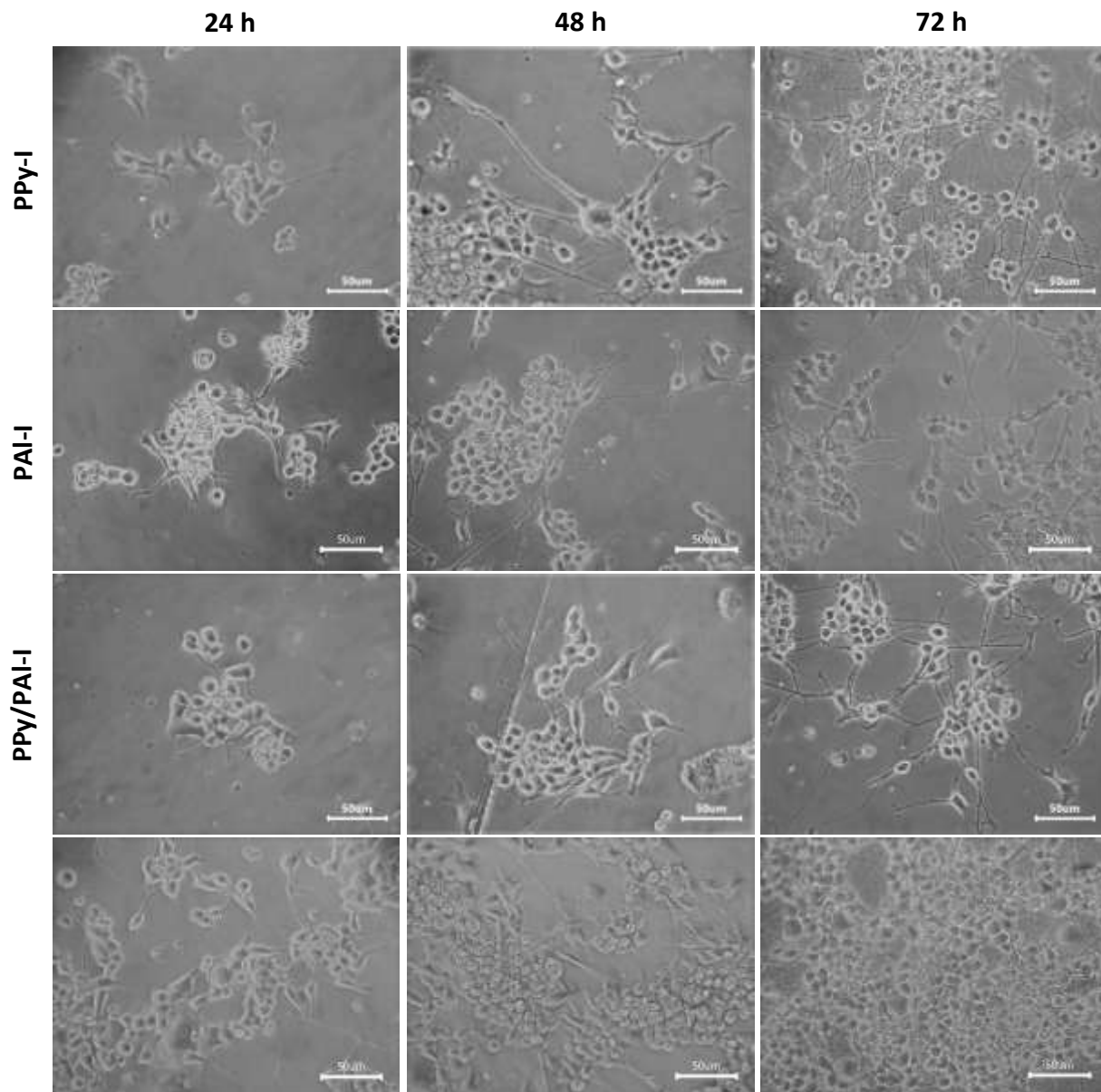


Figura 31. Línea celular N1E-115 con estímulo de diferenciación sembrada sobre los materiales poliméricos sintetizados a 20 W durante 24, 48 y 72 horas y controles.

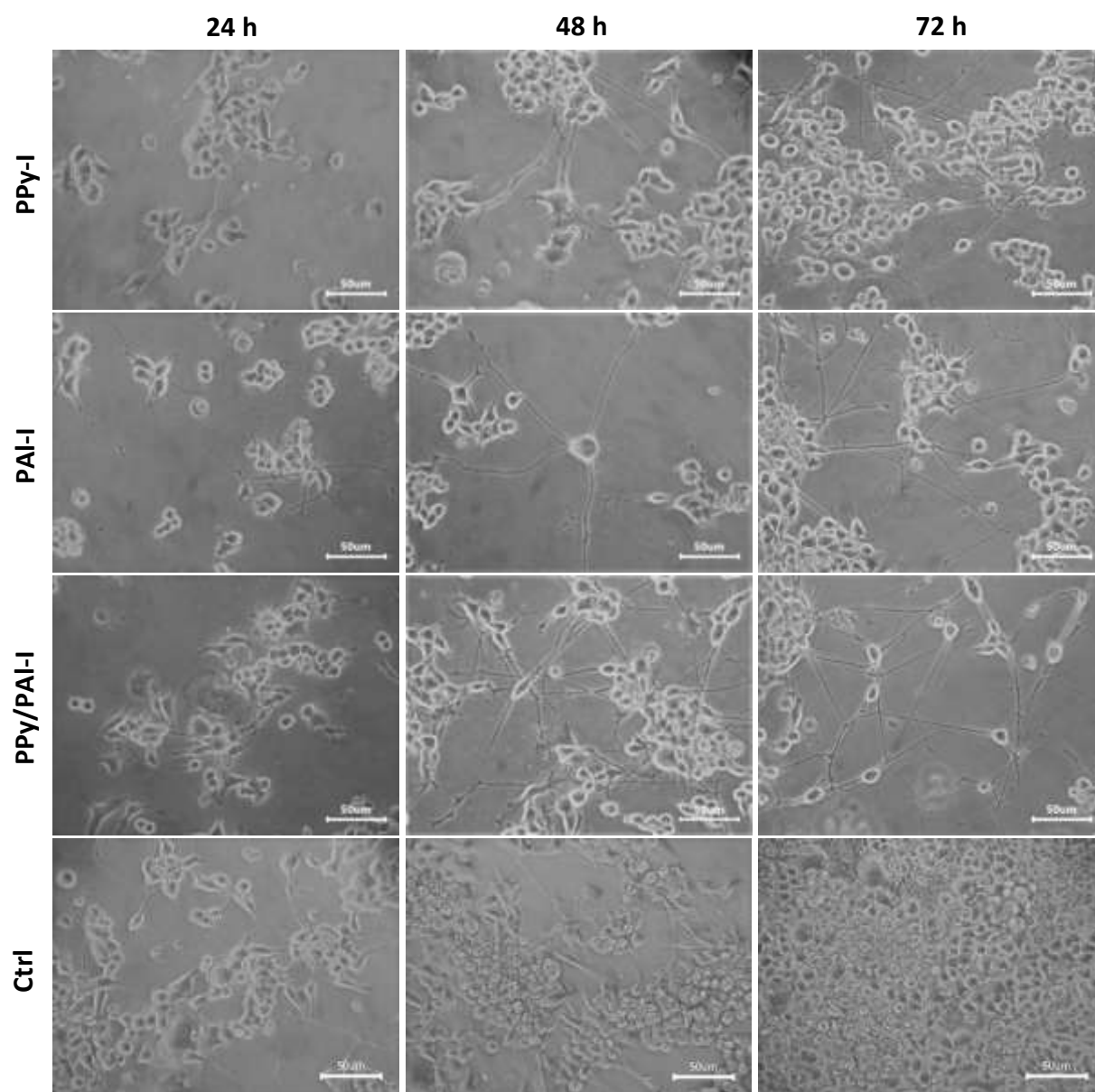


Figura 32. Línea celular N1E-115 con estímulo de diferenciación sembrada sobre los materiales poliméricos sintetizados a 30 W durante 24, 48 y 72 horas y controles.

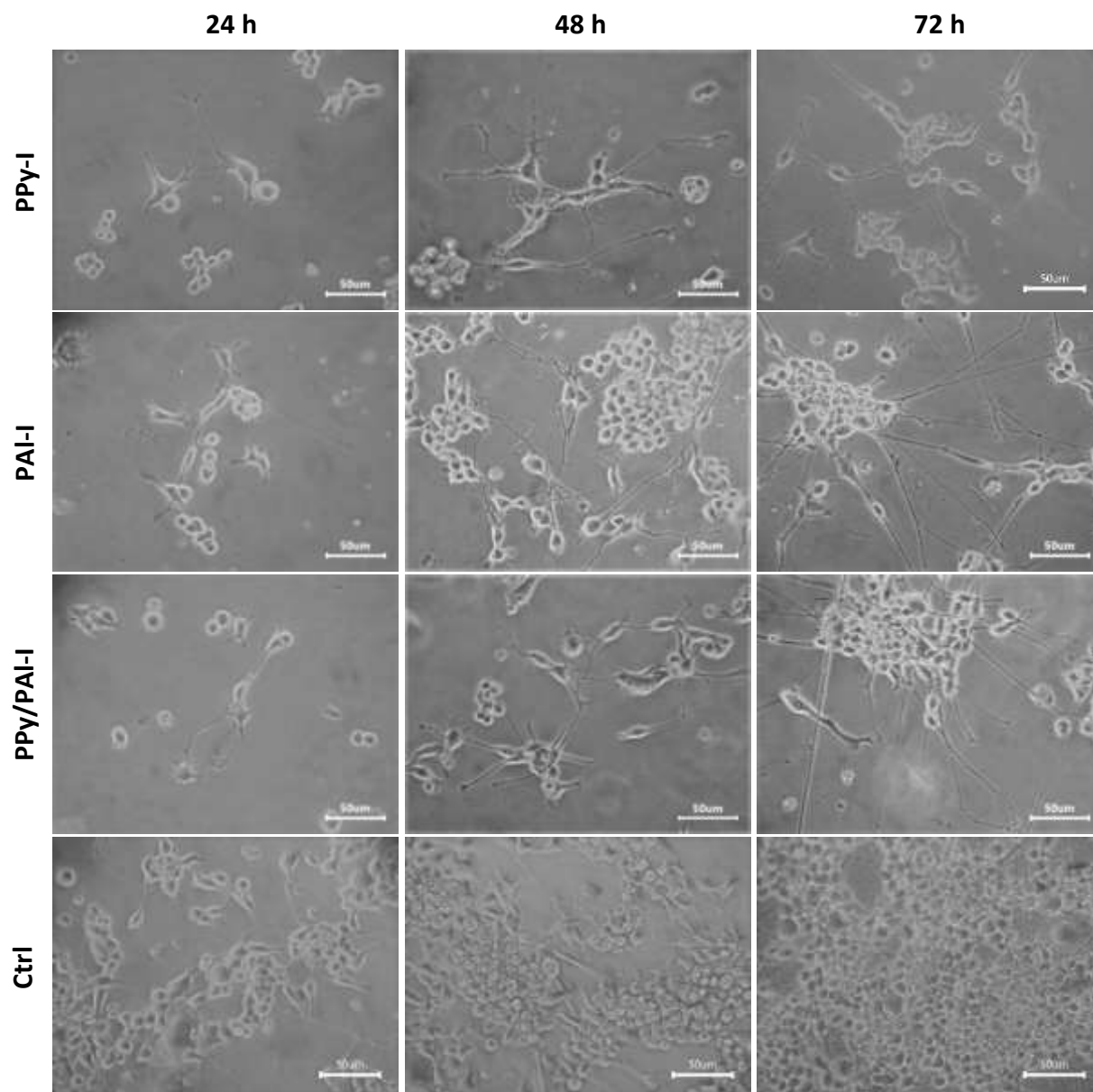


Figura 33. Línea celular N1E-115 con estímulo de diferenciación sembrada sobre los materiales poliméricos sintetizados a 40 W durante 24, 48 y 72 horas y controles.

7.9 Efecto de los polímeros sobre la longitud de neuritas

En la figura 37 se muestra la longitud promedio de las prolongaciones neurales de los diferentes materiales.

A 20 W sobre el polímero PPy-I las prolongaciones neurales de N1E-115 obtuvieron una longitud promedio de 287 μm mostrando una diferencia significativa con el control, que mostró una longitud promedio de 158 μm . Los polímeros de PAI-I y PPy/PAI-I tuvieron un promedio de longitud neural de 164 μm y 171 μm respectivamente, los cuales no fueron significativamente diferentes a la del control (figura 34).

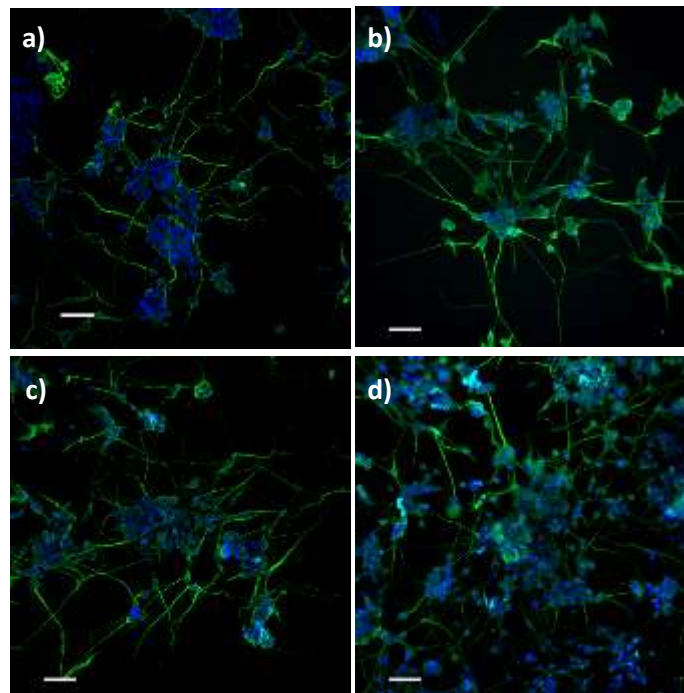


Figura 34. Imágenes representativas de cultivos N1E-115 sobre materiales sintetizados a 20 W. N1E-115 sobre a) PPy-I, b) PAI-I, c) PPy/PAI-I y d) control. DAPI (azul) y $\beta\text{III-Tubulina}$ (verde). Barra 80 μm .

Las células sembradas sobre PAI-I a 30 W mostraron una longitud promedio de 407 μm , siendo este el cultivo con mayor longitud promedio de neuritas. Los polímeros PPy-I y PAI-I obtuvieron longitudes promedio de 167 μm y 213 μm respectivamente no muy alejados del control con 158 μm (figura 35).

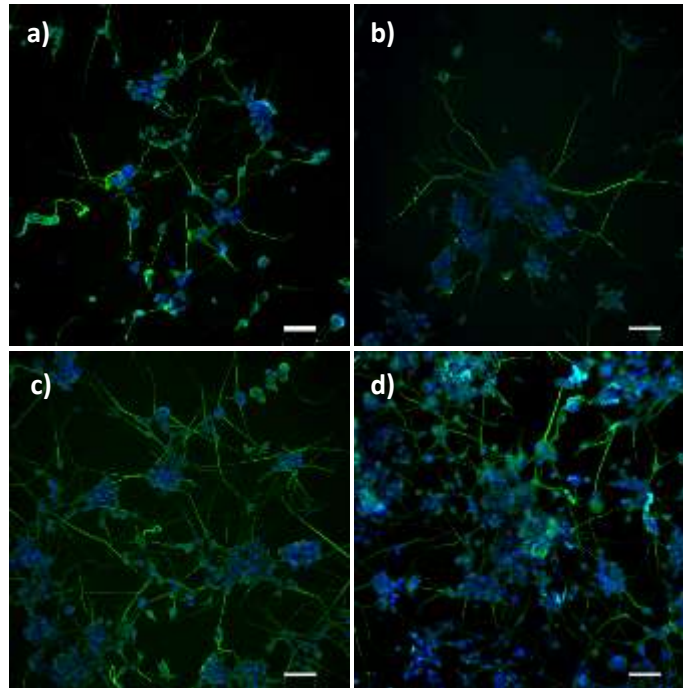


Figura 35. Imágenes representativas de cultivos N1E-115 sobre materiales sintetizados a 30 W. N1E-115 sobre a) PPy-I, b) PAI-I, c) PPy/PAI-I y d) control. DAPI (azul) y $\beta\text{III-Tubulina}$ (verde). Barra 80 μm .

Los polímeros sintetizados a 40 W obtuvieron los siguientes promedios de longitudes neurales: PPy-I 254 μm , PAI-I 202 μm y PPy/PAI-I 127 μm , solo un poco arriba del control que obtuvo una longitud promedio de 158 μm (figura 36).

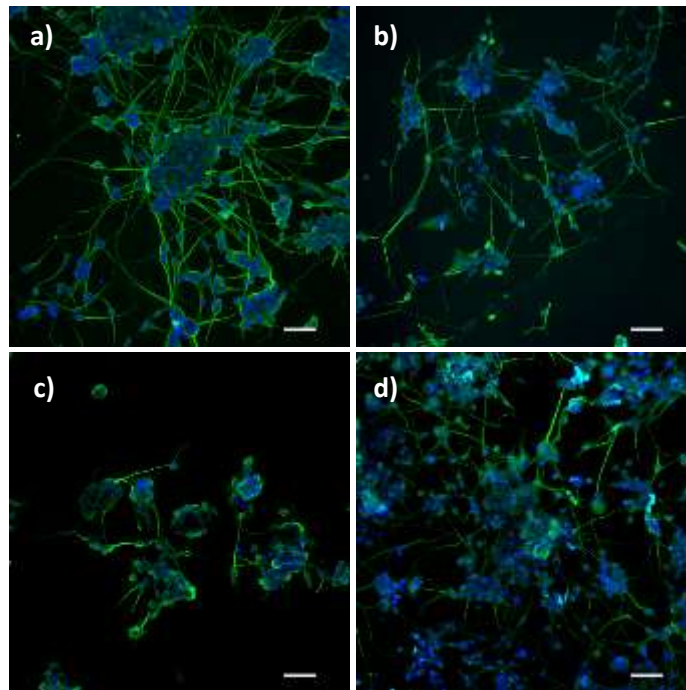


Figura 36. Imágenes representativas de cultivos N1E-115 sobre materiales sintetizados a 40 W. N1E-115 sobre a) PPy-I, b) PAI-I, c) PPy/PAI-I y d) control. DAPI (azul) y β III-Tubulina (verde). Barra 80

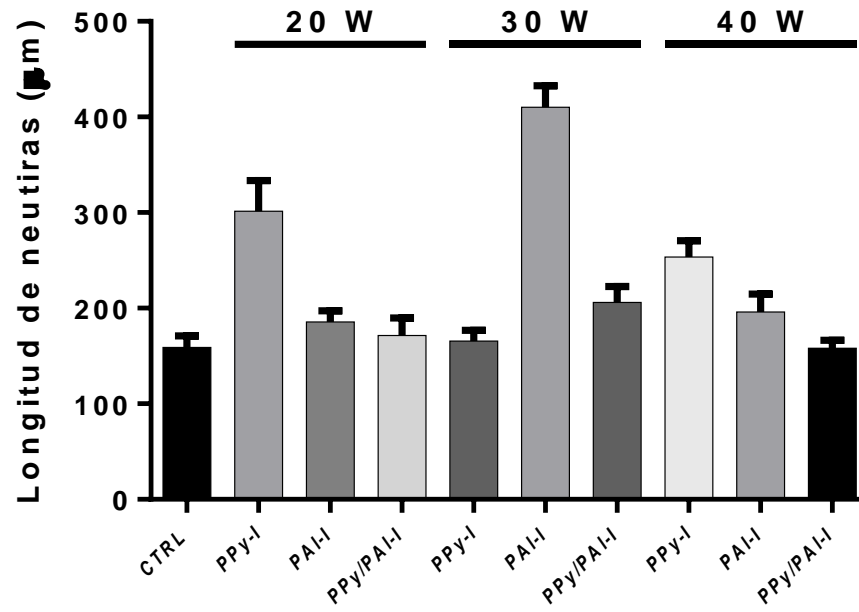


Figura 37. Longitud promedio de neuritas de N1E-115 sembradas sobre diferentes materiales poliméricos



Capítulo 8

8. CONCLUSIONES

Los polímeros aminados sintetizados por plasma PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I contribuyen a la diferenciación neuronal. La potencia de síntesis es importante debido a la variación de ésta puede cambiar las propiedades fisicoquímicas de los materiales poliméricos y por lo tanto el efecto en la diferenciación neuronal. Sobre el polímero PAI-I sintetizado a 30 W se produjo la mayor diferenciación neuronal con base en la longitud promedio de neuritas de la línea celular N1E-115. De los materiales que se probaron, este material mostró alta cantidad de nitrógeno (C/N=14.4) el cual coincide con el mayor porcentaje de aminas primarias (31%) y el menor ángulo de contacto (45°-65°) lo cual sugiere que estas características fisicoquímicas influyen en el efecto de diferenciación neuronal.

Capítulo 9

9. PERSPECTIVAS

Con el fin de determinar un mecanismo de recuperación fisiológica de médula espinal a base de polímeros aminados sintetizados por plasma es necesario continuar con el estudio de diferenciación a profundidad, establecer más marcadores de diferenciación mediante técnicas diferentes como lo es el Western Blot o PCR (Reacción de la cadena de polimerasa).

Con base en los resultados de Álvarez Mejía y col., [25] es necesario estudiar los mecanismos de neuroprotección debido a que éstos nos pueden dar otro indicio de cuál es la vía de recuperación en las lesiones de médula espinal, dado los resultados de tejido preservado.

Es necesario probar los materiales con mejores resultados en diferenciación neuronal *in vitro* presentados en este trabajo ahora en un modelo *in vivo* buscando una técnica de marcaje *in vivo*, para poder entender que pasa dentro de la médula en relación con la neuroregeneración.

Por último, de ser posible es necesario establecer una posible vía de señalización ocasionada por los polímeros sintetizados por plasma sobre la diferenciación neuronal.

TRABAJOS DE CONGRESO

XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México, A.C | 14-18 octubre de 2018, Puebla, Puebla.

“Estudio del efecto de polímeros aminados sintetizados por plasma sobre la diferenciación neuronal en un modelo *in vitro*”

5° congreso internacional RedBioT | 24-26 octubre, Mérida, Yucatán.

“Estudio del efecto de polímeros aminados sintetizados por plasma sobre la diferenciación neuronal”

XXVIII Congreso Técnico Científico ININ-SUTIN | 26-30 noviembre, Ocoyoacac, Edo. México.

“Estudio sobre la diferenciación neuronal *in vitro* sobre polialilamina sintetizada por plasma”

**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] A. Subramanian, U. M. Krishnan, and S. Sethuraman, "Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering : Biomaterial mediated neural regeneration," vol. 11, pp. 1–11, 2009.
- [2] C. Parra-cid, A. Tiscareño-pérez, and R. Gómez-garcía, "Biomateriales : Pieza clave en la reparación de las lesiones medulares," *Investig. en Discapac.*, vol. 3, no. 1, pp. 25–32, 2014.
- [3] R. Bellamkonda and P. Aebischer, "Review: Tissue engineering in the nervous system," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 43, no. 7, pp. 543–554, 1994.
- [4] W. M. Peniche Covas, Carlos, and Argüelles-Monal, "Ingeniería de tejidos aplicada a la sustitución y regeneración de piel. Cuba:," *Editor. Univ.*, no. December, 2009.
- [5] S. Rao, "Adhesion molecule-modified biomaterials for neural tissue engineering," *Front. Neuroeng.*, vol. 2, no. June, pp. 1–14, 2009.
- [6] P. K. Chu, J. Y. Chen, L. P. Wang, and N. Huang, "Chu-Plasma-surface modification of biomaterials.pdf," vol. 36, pp. 143–206, 2002.
- [7] Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, "10 modificación superficial por plasma aplicada a biomateriales," pp. 241–257.
- [8] M. Martinelli, P. Froimowicz, M. Calderon, and Y. M. Strumia, "Revista Iberoamericana de Polímeros MATERIALES POLIMÉRICOS FUNCIONALIZADOS. PARTE I: SÍNTESIS Y POLIMERIZACIÓN DE MONÓMEROS FUNC IONALIZADOS," vol. 4, no. 4, pp. 30–47, 2003.
- [9] M. I. Simão Carlosl, Zheng K, Garrett N, Arifin N, Workman DG, Kubajewska I, Halwani AA, Moger J, Zhang Q, Schätzlein AG, Uchegbu IF, "Limiting the level of tertiary amines on polyamines leads to biocompatible nucleic acid vectors," *Int. J. Pharm.*, vol. 526, no. 1–2, pp. 106–124, 2017.
- [10] D. Mangindaan, W. H. Kuo, C. C. Chang, S. L. Wang, H. C. Liu, and M. J. Wang, "Plasma polymerization of amine-containing thin films and the studies on the deposition kinetics," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 206, no. 6, pp. 1299–1306, 2011.
- [11] R. Olayo, Rios C, Salgado-Ceballos H, Cruz GJ, Morales J, Olayo MG, Alcaraz-Zubeldia M, Alvarez AL, Mondrafon R, Morales A, Diaz- Ruiz A. "Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 2, pp. 817–826, 2008.
- [12] Inagaki N, "Plasma surface modification and plasma polymerization". Technomic Publishing. p. 36, 101 , 125-126. 1996
- [13] Frederick J. Michel, Gordon Bruggeman, Volker Weiss, "Innovation in Materials Processing." Springer US.
- [14] O. Auciello, A. Gras-Martí, J. A. Valles-Abarca, and D. L. Flamm, "Plasma-Surface Interactions and Processing of Materials." p. 558, 1990.



- [15] S. Yoshida, K. Hagiwara, T. Hasebe, and A. Hotta, "Surface modification of polymers by plasma treatments for the enhancement of biocompatibility and controlled drug release," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 233, pp. 99–107, 2013.
- [16] M. Ardhaoui, S. Bhatt, M. Zheng, D. Dowling, C. Jolivalt, and F. A. Khonsari, "Biosensor based on laccase immobilized on plasma polymerized allylamine/carbon electrode," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 6, pp. 3197–3205, 2013.
- [17] K. S. Siow, L. Britcher, S. Kumar, and H. J. Griesser, "Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization - A review," *Plasma Process. Polym.*, vol. 3, no. 6–7, pp. 392–418, 2006.
- [18] G. J. Cruz, L.M Gómez, M. Gonzalez-Torres, F. Gonzalez-Salgado, R. Basurto, E. Colín, J.C. Palacios, M.G Olayo. "Polymerization mechanisms in plasma polyallylamine," *J. Mater. Sci.*, vol. 52, no. 2, pp. 1005–1013, 2017.
- [19] J. C. Palacios y G.J. Cruz, "Estudio sobre las propiedades eléctricas de películas delgadas de polianilina y politiofeno sintetizadas por plasma." p. 152, 2005.
- [20] J. Morales, C. Osorio, R. Montiel, H. Vázquez, R. Olayo "Autoensamble de capas de polímeros iónicos sobre polietileno funcionalizado por plasma de pirrol," *Superf. y vacío*, vol. 21, no. 3, pp. 1–5, 2008.
- [21] E. S. Zuñiga-Aguilar, J. O. Ramirez-Fernandez, J. Morales, R. Olayo, and J. R. Godínez, "Growth aligned in primary skeletal muscle cells on poly pyrrole coated surfaces by plasma polymerization," *IFMBE Proc.*, vol. 49, pp. 211–214, 2015.
- [22] E. Zuñiga-Aguilar, R. Olayo, O. Ramírez-Fernández, J. Morales, and R. Godínez, "Nerve cells culture from lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 25, no. 7, pp. 729–747, 2014.
- [23] E. Zuñiga-Aguilar, R. Godínez, O. Ramírez-Fernández, J. Morales, and R. Olayo, "Development of a neuromuscular junction model on surfaces modified by plasma polymerization," *Rev. Mex. Ing. Biomed.*, vol. 34, no. 3, pp. 217–226, 2013.
- [24] Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, "De Polímeros Sintetizados Por Plasma," 2010.
- [25] L. Alvarez-Mejia *et al.*, "Functional recovery in spinal cord injured rats using polypyrrole/iodine implants and treadmill training," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 7, p. 209, 2015.
- [26] M. de Assumpção Pereira-da-Silva and F. A. Ferri, *1 - Scanning Electron Microscopy*. Elsevier Inc., 2017.
- [27] J. I. Goldstein, D. E. Newbury, J. R. Michael, N. W. M. Ritchie, J. H. J. Scott, and D. C. Joy, "Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis," *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. pp. 1–550, 2017.
- [28] P. Roach, D. Eglin, K. Rohde, and C. C. Perry, "Modern biomaterials: A review - Bulk properties and implications of surface modifications," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 18, no. 7, pp. 1263–1277, 2007.



- [29] J. B. Park and Y. C. Fung, "Biomaterials, an Introduction," *Journal of Biomechanical Engineering*, vol. 102, no. 2. p. 161, 1980.
- [30] S. Sevimli, Frances C. Knight, Pavlo Gilchik, Sebastian Joyce, John T. Wilson "Biomaterials Science." pp. 323–335, 2015.
- [31] Gerardo Cabañas Moreno. "Curso de cristalografía de policristales por difracción de rayos X". Sociedad Mexicana de Cristalografía. 1997
- [32] Theophanides Theophile "Reflectance IR Spectroscopy, en Infrared Spectroscopy: Materials Science, Engineering and Technology." National Technical University of Athens, Chemical Engineering Department. 2012 .
- [33] Maribel González Torres. "Estudio de polímeros porosos sintetizados por plasma". Toluca Edo. Mexico. 2012.
- [34] David B. William, C. Barry Carter. "Transmission Electron Microscopy Plenum Publishing Corporation." Springer. 1996.
- [35] J. Ryssy, E. Prioste-Amaral, D.F. Assuncao, N. Rogers, G.T.S. Kirby, L. E. Smith, A. Michelmore. "Chemical and physical processes in the retention of functional groups in plasma polymers studied by plasma phase mass spectroscopy," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 18, no. 6, pp. 4496–4504, 2016.
- [36] P. Favia, M. V. Stendardo, and R. D'Agostino, "Selective grafting of amine groups on polyethylene by means of NH₃-H₂RF glow discharges," *Plasmas Polym.*, vol. 1, no. 2, pp. 91–112, 1996.
- [37] E. Yegen, A. Lippitz, D. Treu, and W. E. S. Unger, "Derivatization of amino groups by pentafluorobenzaldehyde (PFB) as observed by XPS and NEXAFS spectroscopy on spin coated 4,4-methylenebis(2,6- diethylaniline) films," *Surf. Interface Anal.*, vol. 40, no. 3–4, pp. 176–179, 2008.
- [38] W. Roux, "Introducción Al Cultivo Celular," 1940.
- [39] N. E. Beltran Vargas and C. H. Gonzáles de la Rosa, *Técnicas de Cultivos Celulares e Ingeniería de Tejidos*. 2016.
- [40] S. F. Gómez, N. S. Rueda, and M. F. Gutiérrez, "La inmunología en el diagnóstico clínico," *Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovinas*. p. 164, 1994.
- [41] Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case. "Introducción a la microbiología." Editorial Médica Panamerica. 12° Ed. 2017.
- [42] F. Brandl, F. Sommer, and A. Goepferich, "Rational design of hydrogels for tissue engineering: Impact of physical factors on cell behavior," *Biomaterials*, vol. 28, no. 2, pp. 134–146, 2007.
- [43] J. Lott, P. H. de Carvalho, D. Assis, and A. M. de Goes, "Innovative Strategies for Tissue Engineering," *Adv. Biomater. Sci. Biomed. Appl.*, 2013.
- [44] X. Wang, "Overview on Biocompatibilities of Implantable Biomaterials," *Adv. Biomater. Sci. Biomed. Appl.*, 2013.



- [45] S. E. Rodil, "Modificación Superficial De Biomateriales Metálicos," *Materiales*, vol. 29, no. 2, pp. 67–83, 2009.
- [46] L. M. Gómez, M.G. Olayo, M. Gonzalez-Torres, J. Morales, R. Olayo, M. Mejía-Cuero, G.J. Cruz. "Synthesis of Hybrid Aminated Polymers with Ag Sensitive to Electromagnetic Pulses, as Potential Inhibitors or Stimulators of Cell Growth in the Central Nervous System," *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, 2018.
- [47] J. M. Lee, J. Y. Moon, T. H. Kim, S. W. Lee, C. D. Ahrberg, B. G. Chung, "Conductive hydrogel/nanowire micropattern-based sensor for neural stem cell differentiation," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 258, pp. 1042–1050, 2018.
- [48] A. Solanki, S. T. D. Chueng, P. T. Yin, R. Kappera, M. Chhowalla, K. B. Lee, "Axonal alignment and enhanced neuronal differentiation of neural stem cells on graphene-nanoparticle hybrid structures," *Adv. Mater.*, vol. 25, no. 38, pp. 5477–5482, 2013.
- [49] T. Hishiki, Y. Nimura, E. Isogai, K. Kondo, S. Ichimiya, Y. Nakamura, T. Ozaki, S. Sakiyama, M. Hirose, N. Seki, H. Takahashi, N. Ohnuma, M. Tanabe, A. Nakagawara. "Glial cell line-derived neurotrophic factor/neurturin-induced differentiation and its enhancement by retinoic acid in primary human neuroblastomas expressing c-Ret, GFR α -1, and GFR α -2," *Cancer Res.*, vol. 58, no. 10, pp. 2158–2165, 1998.
- [50] C. Hawk, J. Hyland, R. Rupert, M. Colonvega, S. Hall. "Assessment of balance and risk for falls in a sample of community-dwelling adults aged 65 and older ". vol. 14, no. 1. 2006.