



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

Plantel Iztapalapa  
C.B.I. Departamento de Ingeniería Eléctrica  
Área de Ingeniería Biomédica

**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE INTERFAZ  
CÉLULAS NEURONALES-SUBSTRATO  
METÁLICO A TRAVÉS DE UNA PELÍCULA DE  
NANOTUBOS DE CARBONO**

Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias  
por

**Ing. Israel Morales Reyes**

Director de Tesis: Dr. Nikola Batina.

Co-asesor de Tesis: Dr. José Rafael Godínez Fernández.

México D.F., 2009



$AD^3 \dots$





---

# Índice general

---

<b>Índice general</b>	<b>I</b>
<b>Resumen</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract</b>	<b>XIII</b>
<b>1 Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Sistema nervioso . . . . .	1
1.2. Desórdenes neurológicos . . . . .	4
1.2.1. Degeneración neuronal . . . . .	5
1.2.2. Regeneración neuronal . . . . .	6
1.3. Interfaces neuronales . . . . .	7
1.4. Tipos de electrodos (invasivos) . . . . .	10
1.4.1. Electrodos extraneurales . . . . .	11
1.4.2. Electrodos intraneurales . . . . .	13
1.4.3. Electrodos regenerativos . . . . .	14
1.4.4. Electrodos de penetración . . . . .	15
<b>2 Antecedentes</b>	<b>17</b>
<b>3 Justificación</b>	<b>23</b>
3.1. Hipótesis . . . . .	25
3.2. Objetivos de proyecto . . . . .	25

<b>4 Material y métodos</b>	<b>27</b>
4.1. Diseño y construcción de electrodos . . . . .	31
4.1.1. Preparación de placas . . . . .	33
4.1.1.1. Procedimiento de corte . . . . .	36
4.1.1.2. Procedimiento de limpieza . . . . .	36
4.1.1.3. Adhesión del alambre de plata . . . . .	38
4.1.1.4. Recubrimiento de Sylgard . . . . .	39
4.1.1.5. Pruebas eléctricas . . . . .	40
4.1.2. Preparación de la suspensión de nanotubos . . . . .	42
4.1.2.1. Preparación de nanotubos de carbono en seco .	45
4.1.2.2. Pruebas de dispersión . . . . .	46
4.1.3. Preparación de electrodos . . . . .	49
4.1.3.1. Deposito de la suspensión de nanotubos . . . . .	50
4.1.3.2. Caracterización de la superficie del electrodo .	51
4.1.3.3. Medición de resistencia de los electrodos . . . .	52
4.1.3.4. Esterilización de electrodos . . . . .	54
4.2. Obtención de cultivo celular . . . . .	55
4.2.1. Obtención de cultivo primario . . . . .	57
4.2.1.1. Extracción celular de cerebelo . . . . .	58
4.2.1.2. Conteo celular . . . . .	59
4.2.2. Obtención de cultivo de línea celular . . . . .	61
4.2.2.1. Descongelación y proliferación de línea celular	62
4.2.2.2. Conteo celular . . . . .	63
4.3. Cultivo celular en controles y electrodos . . . . .	65
4.3.0.3. Cultivo primario en controles y electrodos . . . .	66
4.3.0.4. Cultivo de línea celular en controles y electrodos	67
4.4. Registro electrofisiológico . . . . .	69
4.4.1. Registro de células de cultivo primario . . . . .	70
4.4.2. Registro de células de línea celular . . . . .	72
4.4.2.1. Registro de corriente iónicas . . . . .	73

4.4.2.2. Registro de potenciales de acción con la técnica de fijación de corriente . . . . .	74
4.4.2.3. Registro extracelular de la respuesta eléctrica neuronal a través del electrodo de nanotubos . . . . .	74
4.5. Visualización de AFM y SEM del crecimiento neuronal . . . . .	76
<b>5 Resultados</b>	<b>79</b>
5.1. Diseño y construcción de electrodos . . . . .	79
5.1.1. Pruebas eléctricas en placas de oro . . . . .	79
5.1.2. Pruebas de dispersión . . . . .	81
5.1.3. Caracterización de la superficie del electrodo . . . . .	86
5.1.4. Pruebas eléctricas en electrodos . . . . .	96
5.2. Cultivos neuronales . . . . .	99
5.2.1. Cultivo Primario . . . . .	99
5.2.2. Cultivo de línea celular . . . . .	102
5.3. Registros electrofisiológicos . . . . .	106
5.3.1. Potencial de membrana en reposo de cultivo primario . . . . .	106
5.3.2. Potencial de membrana en reposo en línea celular . . . . .	106
5.3.3. Registro de corrientes iónicas en la línea celular . . . . .	107
5.3.4. Registro de potenciales por fijación de corriente . . . . .	109
5.3.5. Registro extracelular de la respuesta eléctrica neuronal a través del electrodo . . . . .	111
5.4. AFM y SEM del crecimiento celular en electrodos . . . . .	114
<b>6 Discusión</b>	<b>125</b>
6.1. Diseño y construcción de electrodos . . . . .	125
6.2. Cultivo celular . . . . .	129
6.3. Registro electrofisiológico . . . . .	132
6.4. Visualización AFM y SEM . . . . .	134
<b>7 Conclusiones</b>	<b>139</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>141</b>

<b>A</b>	<b>Diseño e instalación de cuarto de cultivos</b>	<b>149</b>
<b>B</b>	<b>Manuales de operación</b>	<b>155</b>
	B.1. Instrucciones de operación del esterilizador de vapor . . . . .	155
	B.2. Instrucciones de operación de la incubadora de $CO_2$ . . . . .	160
<b>C</b>	<b>Material y Equipo</b>	<b>163</b>
<b>D</b>	<b>Asepsia de cuarto y preparación de material</b>	<b>167</b>
	D.1. Asepsia de cuarto . . . . .	167
	D.2. Lavado de material . . . . .	168
	D.3. Esterilización de material . . . . .	169
	D.4. Siliconización de material . . . . .	169
<b>E</b>	<b>AFM</b>	<b>171</b>
	E.1. Modo de contacto . . . . .	173
	E.2. Modo oscilante . . . . .	174
<b>F</b>	<b>Equipo electrofisiológico</b>	<b>175</b>
	F.1. Construcción de micropipetas . . . . .	176
	F.2. Registro intracelular . . . . .	177
	F.3. Fijación de corriente . . . . .	177
	F.4. Fijación de voltaje . . . . .	177
	F.4.1. Patch clamp . . . . .	178
	F.5. Registro extracelular . . . . .	178
<b>G</b>	<b>Soluciones</b>	<b>181</b>
	G.1. HBSS Solución de Hank's con seroalbúmina bovina . . . . .	181
	G.2. Medio de cultivo DMEM enriquecido . . . . .	182
	G.3. Azul de tripano . . . . .	182
	G.4. Tripsina . . . . .	183
	G.5. Solución intracelular . . . . .	183
	G.6. Solución extracelular . . . . .	184
	G.7. Solución extracelular normal . . . . .	184

G.8.Medio de cultivo PC12 . . . . .	185
<b>Lista de Símbolos y Abreviaciones</b>	<b>187</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>188</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>192</b>



---

# Agradecimientos

---

A mis padres, por todo su apoyo, por haberme otorgado la vida, un hogar y la mejor de las herencias.

A mi hermana, por enseñarme el valor de la tolerancia, alegrar día con día mi vida y compartir sus dones conmigo.

A Jessica Gabriela, por su amor sincero, por estar ahí en todo momento, por mostrarme a mi mismo y a como ser mejor persona además su invaluable contribución en el diseño y los gráficos de esta tesis (NM).

Al Dr. Nikola Batina, por la dirección de esta tesis, por hacerme ver el valor de la ciencia y por creer en proyectos de esta naturaleza.

Al Dr. Rafael Godínez, por la dirección de esta tesis, por todo el apoyo y la confianza depositados en mí y por mostrarme que ciencia es paciencia.

A la MsC. Cristina Acosta, por su amistad, por la aportación de conocimientos en cultivos neuronales, microscopía AFM y por su ayuda durante las etapas difíciles del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, MsC. Andrés de Luna, MsC. Melina Tapia, MsC. Mario Ramírez, Lizeth, por su ayuda y conocimientos aportados, pero sobre todo por la amistad brindada en esta etapa de mi vida.

A mis compañeros de generación, Yandeling, Elías, Francisco, etc. por los momentos que pasamos juntos y haber hecho tan agradable mi estancia en esta Universidad.

Al Dr. Sepulveda, por su contribución de las imágenes SEM obtenidas.

A Victor Tapia, por los consejos y sugerencias sobre el manejo de la línea celular.

A mis sinodales, Dr. Ramón González Camarena y Dr. Roberto Ávila Pozos, por la disposición, revisión y corrección de este documento.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el soporte financiero otorgado durante el periodo de estudios.

Y finalmente pero no menos importante, a esos seres maravillosos que tocan solo por un instante tu vida (justo cuando lo necesitas) y la cambian de tal forma sin que tu o ellos lo perciban sino después de un tiempo.



---

# Resumen

---

Las interfaces neuronales tienen la misión de establecer comunicación bidireccional entre el tejido nervioso y un dispositivo externo con el fin de desarrollar sistemas que permitan utilizar las señales bioeléctricas para controlar funciones motoras, sensitivas o de estimulación. Este tipo de interfaces están constituidas generalmente por circuitos electrónicos y electrodos. Uno de los principales puntos que se debe tener en consideración dentro de la construcción de una interfaz neuronal es el electrodo empleado para el registro de estas señales. Las características del electrodo tienen que asegurar la biocompatibilidad y la adecuada transmisión de la señal bioeléctrica con la mejor relación señal-ruido posible.

Los nanotubos de carbono (NTC) es un material desarrollado por la nanotecnología que pretende ser empleado para la construcción de electrodos en las interfaces neuronales ya que cuenta con propiedades químicas, eléctricas y mecánicas adecuadas para este propósito. En este caso, en el proceso de adquirir y transmitir señales bioeléctricas en las interfaces neuronales, es muy importante la propiedad de conducción eléctrica de los NTC así como la manera en que el material celular se adhiere a ellos.

El proyecto que a continuación se presenta, tiene como principal objetivo: evaluar la transmisión de señales bioeléctricas a través de los NTC. Con este fin, se diseñó y construyó un electrodo con una superficie formada por una película de NTC sobre la cual se sembró y cultivo material celular neuronal.

Antes de colocar las células sobre el electrodo de NTC, se le hicieron pruebas de conductividad para comprobar que era capaz de transmitir señales eléctricas además de una caracterización de la superficie por medio de microscopía de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés) y microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés), ya que la textura y rugosidad de la superficie del material sobre la que se cultiva material celular es importante para el proceso de fijación de las células.

El material celular cultivado sobre los electrodos de NTC, fueron células neuronales de cerebelo de rata, obtenidas a partir de cultivo primario y células de feocromocitoma de rata, provenientes de la línea celular PC12. Para tener un punto de comparación en los experimentos, el mismo material celular fue cultivado en ausencia de los NTC (controles). Este cultivo se hizo por un periodo mínimo de dos semanas, donde se observó el crecimiento celular en presencia y ausencia de los NTC. Posteriormente, con equipo electrofisiológico se obtuvieron potenciales de membrana en reposo y empleando la técnica de fijación de corriente, se registró la actividad eléctrica celular usando un microelectrodo intracelular, mientras que para el registro de la actividad eléctrica extracelular se empleó el electrodo de NTC. Es decir, para la evaluación/comprobación de la transmisión de señales bioeléctricas a través de los NTC, se registró simultáneamente la actividad eléctrica con un microelectrodo intracelular y con el electrodo extracelular de NTC.

Finalmente, se volvieron a emplear las técnicas de microscopía antes mencionadas para observar el crecimiento y adhesión de las células sobre el electrodo de NTC para analizar si existía alguna relación entre la transmisión de las señales eléctricas y la forma en que las células crecieron sobre la película de NTC.

Los resultados muestran que los NTC, es un buen material para construir electrodos en interfaces neuronales ya que se logró observar crecimiento neuronal sobre la película de NTC de los electrodos, el cual fue similar al crecimiento celular en los controles. Respecto a la actividad eléctrica, y para el caso de las células pertenecientes al cultivo primario, se registraron los potenciales de membrana en reposo. Estos potenciales fueron similares tanto para las células cultivadas en los controles como para las cultivadas en el electrodo de NTC. Resultados análogos se obtuvieron cuando se empleó la línea celular PC12. Asimismo, con la técnica de fijación de voltaje, se midieron las corrientes iónicas transmembranales para el cultivo de la línea celular PC12 en el electrodo de NTC; las corrientes iónicas fueron similares a las obtenidas en ausencia de los NTC. Por otra parte, el curso temporal similar de las señales bioeléctricas obtenidas con el microelectrodo intracelular y el extracelular de NTC indicaron una adecuada transmisión de este tipo de señales a través ellos.

El crecimiento celular similar en presencia y ausencia de los NTC y la no alteración de las propiedades eléctricas de las neuronas por los mismos así como los exitosos registros simultáneos intra y extracelulares indican que además de poseer buenas propiedades conductoras, este material no presenta efectos neurotóxicos.

Existen aún elementos a mejorar en el diseño y construcción de electrodos basados en NTC; sin embargo, este estudio revela que es factible la utilización de este material ya que es biocompatible y transmitió de manera adecuada la señal bioeléctrica del material celular.



---

# Abstract

---

Neural interfaces have the purpose of establishing bidirectional communication between the nervous system and one external device in the interest of developing systems that use bioelectrical signals from the human body to control motion, sense or stimulation functions. This type of interfaces are mainly built by electronic circuits and electrodes. One of the key points to be taken into account in constructing a neural interface is the electrode used for recording these signals, such electrode has to satisfy two important characteristics: biocompatibility and the optimal bioelectrical signal transmission with the best signal to noise ratio .

Carbon nanotubes (CNT) is a material developed by nanotechnology science that can be used for the construction of electrodes in neural interfaces because it has suitable chemical, electrical and mechanical properties for this purpose. In this case, the bioelectrical signal transmitting/acquiring process in neural interfaces, the electrical conductivity properties of CNT in conjunction with the form in which cellular material adheres to them, are very important issues.

This project has as main objective to assess the transmission of bioelectric signals through the CNT. To achieve this objective, an electrode with a surface formed by a thin film of CNT was constructed and over this surface, neural cells were seeded and cultured.

For a point of comparison in the experiments, the same cellular material was grown in absence of CNT (controls). The culture was for a minimum of two weeks, during this time cell growth on both controls and electrodes was monitored visually. Afterwards, the electrical activity of the cells was recorded employing electrophysiology laboratory techniques. Intracellular electrical activity was recorded with an intracellular microelectrode while the extracellular electrical activity was recorded through the constructed electrode. This means that to evaluate/confirm the bioelectrical signal transmission through the CNT, a simultaneous record of the bioelectrical signal was made.

The results show that CNT is a good material for electrode construction in neural interfaces because a significant cell growth over the CNT film in the electrode was obtained, which was similar to cell growth in the controls. Concerning the electrical activity, membrane rest potentials were acquired for the cells coming from the primary culture. These potentials were similar for both the controls and the electrodes. For the PC12 cell line similar membrane rest potentials and ionic currents were acquired for both the controls and the electrodes. On the other hand, a satisfactory extracellular record of the bioelectrical signal through the electrode was achieved indicating that transmission of such signals through them is possible. The growth of cellular material on the film and the recordings of electrical activity of cells were indicators that the CNT did not have neurotoxic effects.

There are still some elements to improve in the design and construction of electrodes based on this material, however, the study reveals that it is feasible to use this material because its biocompatibility and it adequately conveyed bioelectrical signals of the cellular material.

## Capítulo 1

---

# Introducción

---

La forma en que el cuerpo humano transmite y recibe información a su alrededor y consigo mismo es un proceso complejo, donde esta información es procesada y, si es necesario, se origina una respuesta en alguna región del cuerpo [1]. La transmisión y recepción de la información es llevada a cabo por el sistema nervioso, el cual ha ido evolucionando para permitir el desarrollo de sistemas fisiológicos avanzados como la vista, el lenguaje, la representación abstracta de conceptos y la coordinación con otros órganos dentro del cuerpo.

### 1.1. Sistema nervioso

El sistema nervioso es una red especializada de células que se comunican entre sí para recibir o transmitir información de las distintas regiones del cuerpo y de los sentidos que lo comunican con el medio externo que lo rodea. Este sistema puede ser dividido en dos partes [2]:

- a Sistema nervioso central, que recibe y procesa la información de los órganos sensoriales y determina una instrucción que es enviada a los órganos efectores; además, es el sitio de aprendizaje, memoria, entre otros.
- b Sistema nervioso periférico, que es el encargado de establecer la comunicación entre el sistema nervioso central y los órganos del cuerpo humano.

En el sistema nervioso central, el cuerpo celular de las neuronas suele agruparse en los llamados núcleos (“nuclei”), mientras que los axones viajan juntos en los tractos. En el sistema nervioso periférico, el cuerpo celular de las neuronas se agrupa en los llamados ganglios nerviosos, mientras que los axones se agrupan en los comúnmente llamados nervios [2], [3], [4]. Su estructura se muestra en la figura 1.1.

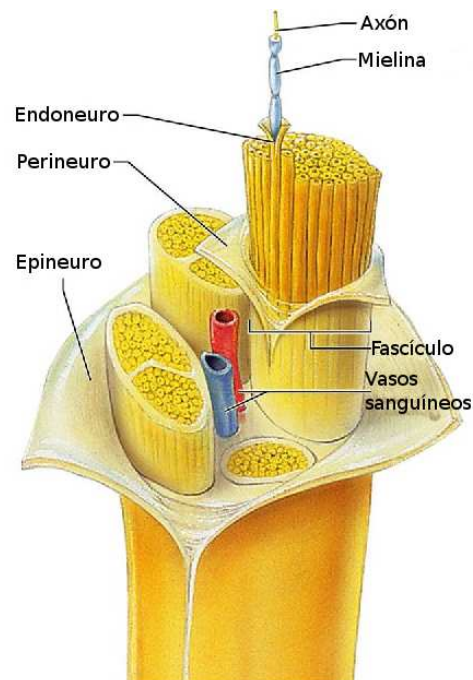


Figura 1.1: Estructura de un nervio. Imagen tomada de

[http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/AP1/nerve\\_structure.jpg](http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/AP1/nerve_structure.jpg)



El sistema nervioso se conforma básicamente de dos tipos celulares: las neuronas y las células gliales. Las neuronas son células excitables que se comunican mediante la producción y transmisión de señales eléctricas conocidas como potenciales de acción mientras que las células gliales proveen distintos tipos de soporte dentro de los que encontramos el soporte metabólico y estructural. Estas últimas constituyen cerca del 90 % de las células presentes en el sistema nervioso [2].

Las neuronas se componen de un cuerpo celular o soma, dendritas y un axón. El cuerpo celular contiene casi en su totalidad los organelos celulares incluyendo al núcleo y realiza la mayoría de los procesos celulares. Las dendritas son ramas que surgen del soma y reciben conexiones de otras neuronas en una unión llamada sinapsis. El axón es la rama mediante la que se envía la información (potenciales de acción) a otras neuronas (Figura 1.2). La neurona recubre los componentes antes mencionados con la membrana celular. La membrana celular o plasmática a su vez contiene proteínas específicas (canales iónicos) que permiten el paso de iones a través de ella [3].

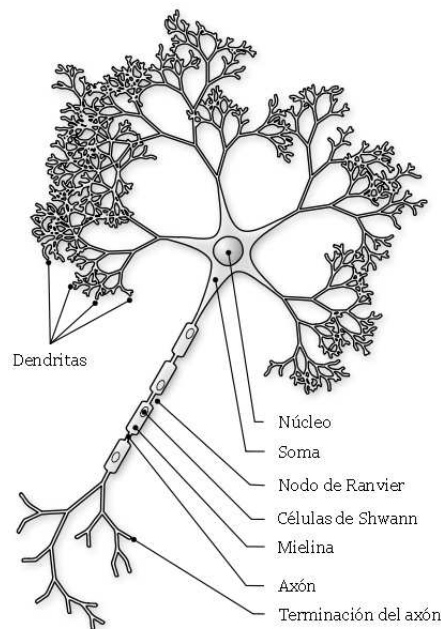


Figura 1.2: Partes de una neurona. Imagen tomada de <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neuron-figure.svg>

Es en estas células excitables, que mediante el movimiento o flujo de iones de  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  y  $Ca^{2+}$  principalmente, a través de los canales iónicos de la membrana celular, se originan cambios en el potencial eléctrico en la membrana, siendo estos cambios las señales que transportan los mensajes biológicos de una parte de la célula a otra [5].

La transmisión de esta información, sin embargo, puede verse seriamente afectada por desórdenes neuronales o lesiones del sistema nervioso que suelen presentarse en la vida de algunos individuos ocasionando problemas motrices, cognitivos, perceptivos, etc.

## 1.2. Desórdenes neurológicos

Los desórdenes neurológicos, son problemas generados por alteraciones en el funcionamiento del sistema nervioso que impiden la correcta transmisión/recepción de la información neural. Estos desórdenes pueden ser originados por accidentes, sustancias venenosas o enfermedades de diversas etiologías [6].

Son además una de las causas más comunes de discapacidad en el ser humano que pueden llegar a tener un alto impacto tanto emocional como económico en la vida de los individuos que lo sufren y de los que se encuentran en su entorno. Algunos de los desórdenes más frecuentes que suelen presentarse son: enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica, lesiones en la médula espinal, parálisis cerebral, amputaciones, sordera, etc. Las consecuencias son graves ya que pueden causar la pérdida motriz, parálisis musculares, deficiencias en la respuesta a los estímulos tanto externos como internos, hasta la muerte [6],[7].

Cuando en el sistema nervioso los desórdenes neurológicos son ocasionados por agentes mecánicos, es decir cortes físicos en los tractos o nervios,

se desencadena una serie de reacciones en el área de la lesión. Estas reacciones dan origen a una degeneración y regeneración neuronal las cuales se describen a continuación.

### **1.2.1. Degeneración neuronal**

En el sistema nervioso, las lesiones ocasionadas por agentes mecánicos (cortes), pueden llegar a destruir la barrera vascular existente entre este y el organismo, provocando que los vasos sanguíneos se rompan y la sangre entre en contacto con el área lesionada, iniciando así una reacción autoinmune que potencia los procesos degenerativos [8], [9]. Inicialmente, se forma un edema que resulta de la acumulación de fluido extracelular y de la inflamación de los astrocitos (tipo de célula glial) [8]. El metabolismo celular cambia hacia la síntesis de proteínas de membrana (tubulina, actina) en un intento de reconstruir el citoesqueleto axonal, disminuyendo la síntesis de neurotransmisores [9]. La glia por otra parte también disminuye su participación en la modulación y transmisión de las señales nerviosas para responder a las exigencias del traumatismo [10], [11]. La actividad electrofisiológica en los axones se ve alterada pues con todos estos cambios, se pierde la capacidad de generar y conducir potenciales de acción [12]. Pronto, la desorganización axonal, la necrosis y la degeneración de la mielina aparecen en los axones dañados. La eliminación de la mielina degenerada y de los detritus celulares es promovida por los macrófagos de origen sanguíneo (proceso conocido como fagocitosis). Finalmente, comienza la muerte celular en esta sección y la de algunos grupos de neuronas a su alrededor. En este tiempo, los astrocitos cercanos proliferan y sus prolongaciones fibrosas forman una superficie que separa la lesión del organismo. Los fibroblastos del tejido conjuntivo se dividen y se depositan sobre la capa de astrocitos depositando colágeno y contribuyendo a la formación de la cicatriz glial [13].

### 1.2.2. Regeneración neuronal

En el área de la lesión, se generan formaciones tubulares denominadas bandas de von Bungner que contienen macrófagos y células de Schwann [14]. Durante la fagocitosis de los detritus celulares en la lesión, los macrófagos sintetizan importantes citoquinas que estimulan la síntesis local de factores de crecimiento y favorecen la regeneración axonal [10]. Por lo que en estas bandas, se crea un microambiente promotor para la regeneración axonal, produciéndose aquí una regeneración de varios milímetros. Este primer brote axonal, es posteriormente sustituido por un brote axonal permanente que presenta su citoesqueleto conformado, creando así, una unidad regeneradora inicialmente constituida por fibras amielínicas que pueden llegar a ser mielínicas posteriormente. A nivel del extremo distal de cada brote axonal, se encuentra el cono de crecimiento, dicho cono, es una estructura móvil especializada que funge como aparato explorador en el intento de la regeneración axonal, el cual presenta una afinidad por la superficie interna de la lámina basal de las células de Schwann. El cono segrega proteasas que disuelven la matriz a su paso para facilitar el camino hacia su objetivo [9], [15]. El cono de crecimiento responde a cuatro clases de factores:

- a Neurotróficos. Los factores neurotróficos, son proteínas macromoleculares presentes en receptores motores y sensitivos denervados que ayudan en la supervivencia, extensión y maduración neuronal.
- b Promotores axonales. Los factores promotores axonales, son glicoproteínas (laminina, colágeno tipo IV, fibronectina, etc.) unidas a algún sustrato que promueven el crecimiento axonal.
- c Sintetizadores de matriz. El fibrógeno, es un factor sintetizador de matriz que forma una matriz de fibrina, que es un importante sustrato para la migración celular en la regeneración nerviosa.

d Metabólicos. Los factores metabólicos, son un conjunto de sustancias que facilitan la regeneración nerviosa. Entre ellos se incluyen factores de crecimiento fibroblásticos ácidos y básicos, insulina, estimulación eléctrica, entre otros.

En ocasiones, la regeneración neuronal es imposible o parcial, por lo que la continuidad en la transmisión de los potenciales de acción se ve afectada, de manera que esta no exista o que la velocidad de conducción se vea disminuida o que la reconexión no se origine de manera precisa.

Actualmente, este problema trata de ser resuelto de distintas formas. Las ciencias biológicas proponen algunas soluciones como los trasplantes de células madre, terapia genómica entre otras [16]. La ingeniería, por su parte, se auxilia de sus distintas ramas y de la fisiología para poder ofrecer un conjunto de soluciones que ayuden a mejorar la calidad de vida del individuo aportando elementos externos como sillas de ruedas automatizadas, implantes cocleares, dispositivos de rastreo ocular, prótesis automatizadas, etc. Algunas de esas posibilidades emplean el desarrollo de interfases neuronales para emular el funcionamiento del sistema nervioso [17].

### **1.3. Interfaces neuronales**

Las interfaces neuronales son una forma de establecer comunicación entre el sistema nervioso y un dispositivo externo donde algunos de los aspectos a considerar en una interfaz de este tipo, son el ancho de banda y el número de canales que se desean manejar [18]. Este tipo de interfaces puede actuar de manera bidireccional, permitiendo que los potenciales bioeléctricos sean traducidos a movimientos mecánicos, virtuales en un monitor o señales de estimulación y a su vez transmitiendo señales del mundo exterior enviadas por el dispositivo externo hacia partes específicas del sistema

nervioso, funcionando, si es el caso, como señal de retroalimentación estableciendo así un sistema de control de lazo cerrado, lo cual tendría como consecuencia una mejor respuesta en el sistema global [19]. Cabe señalar que una interfaz neuronal se compone básicamente de un electrodo o sistema de electrodos, medio de transmisión de la señal así como el procesamiento de la misma y si es necesario, un dispositivo externo que realice alguna operación como respuesta a la señal adquirida.

Una interfaz neuronal puede ser invasiva, parcialmente invasiva o no invasiva. Las interfaces no invasivas tienen la gran ventaja de que no exponen al paciente directamente a una cirugía; sin embargo, en algunas circunstancias las señales adquiridas pueden contener una gran cantidad de ruido o verse atenuadas por barreras fisiológicas. Un ejemplo de este tipo de interfaz es el electroencefalógrafo [20]. Por otra parte, una interfaz parcialmente o completamente invasiva, presenta un contacto directo entre el material celular y un elemento artificial, lo que supone una alta fidelidad de la señal adquirida y que tiene como principal ventaja la adquisición de la misma sobre una localización específica en el tejido celular. En adelante se comentará sólo a el tipo de interfaz invasiva sobre tejidos neuronales.

Actualmente, los avances en la tecnología han reducido el riesgo potencial de una interfaz invasiva, sin embargo la mayoría de ellas aún se encuentran en fase experimental y su mayor éxito se ha obtenido en pruebas con animales [21].

El adecuado procesamiento de la señal bioeléctrica en la interfaz, depende en gran medida del conocimiento de como la información es procesada por los grupos neuronales encargados de realizar determinadas funciones así como del tamaño de la población neuronal que se esté registrando [22], [23]. Como este conocimiento aún es limitado, la ingeniería ha desarrollado distintas formas de resolver este problema, los cuales se han clasificado en dos grupos, los métodos deductivos y los clasificadores. Los métodos

deductivos, son modelos basados en la comprensión de los mecanismos implicados en la generación de las señales bioeléctricas del cuerpo, por ejemplo la región neuronal que se activa en el cerebro cuando un determinado músculo o parte del cuerpo intenta moverse [24], [25]. Los métodos clasificadores, son algoritmos que no necesitan tener el conocimiento previo de como la actividad neuronal esta relacionada con la respuesta fisiológica sino que basan su funcionamiento en el reconocimiento de patrones de señales bioeléctricas previamente registradas [19], [26], . En ambos casos, la señal pasa por distintos algoritmos que extraen las características de interés en el procesamiento así como una transducción de la señal en otro tipo de señales u órdenes a ejecutar por el dispositivo externo. Finalmente, un objetivo actual en cuanto a la transmisión de la señal, es el desarrollo de sistemas de telemetría inalámbrica que puedan enviar la señal adquirida por el electrodo hacia alguna ubicación sin la necesidad de cables, esto con la finalidad de reducir hardware y principalmente riesgos de infección [21].

Sin embargo, para que se pueda adquirir o aplicar una señal adecuada de un cierto grupo de neuronas, es muy importante que el diseño y la construcción de electrodos permitan contactos estables y duraderos con el material celular, así como un número suficiente de ellos. También se deben considerar las impedancias que se puedan producir en la interfaz entre el electrodo y el material celular [27].

Entonces, el desarrollo de estos electrodos se convierte en todo un reto para la ingeniería, puesto que se debe crear un electrodo biocompatible que mecánicamente produzca el menor daño posible en la región donde se va a alojar, que sea capaz de captar o transmitir señales eléctricas desde o hacia el material celular y que puedan permanecer inmersos en el material celular por años [28].

Por lo tanto, la biocompatibilidad de los materiales que entren en contacto con el material celular es muy importante para evitar cualquier tipo de

reacción secundaria como hipertrofia, inflamación, fibrosis o alergias, entre otras. Es importante también que el material sea mecánicamente flexible y de las dimensiones adecuadas para no hacer demasiado daño tanto al material celular neuronal como al existente en su alrededor, pues esto puede generar traumas y provocar nuevamente reacciones indeseables como el encapsamiento del electrodo por tejido fibroso (fibroblastos). Estas reacciones son originadas principalmente por dos tipos de células gliales en el sistema nervioso central: los astrocitos y la microglia, y pueden afectar la comunicación entre neuronas o liberar sustancias neurotóxicas que perjudican definitivamente al material celular y al proceso de extracción/inyección de señales eléctricas provocando cambios significativos en la impedancia del electrodo [29].

Con el fin de mejorar la biocompatibilidad de los electrodos, se esta modificando su superficie con hidrogéles, polímeros conductivos etc., materiales que a su vez puedan ser tratados con recubrimientos bioactivos que favorezcan el crecimiento neuronal (factor de crecimiento neuronal, factores neurotróficos o laminina) así como de otros compuestos anti-inflamatorios (dexametazona) que ayuden a mitigar las reacciones [30]. A continuación se describen algunos de los tipo más comunes de electrodos invasivos que se utilizan en el sistema nervioso.

#### **1.4. Tipos de electrodos (invasivos)**

Existen distintos tipos de electrodos de estimulación o registro de actividad bioeléctrica, la mayoría de ellos se enfocan principalmente al sistema nervioso central, al sistema nervioso periférico y al sistema muscular. Inicialmente, en el registro/estimulación del sistema nervioso se han utilizado las micropipetas de vidrio en células neuronales; sin embargo, la necesidad de trabajar en regiones del cuerpo de difícil acceso o con una mayor población neuronal dio origen a distintos arreglos de electrodos. Los elec-



trodos para registro/estimulación del sistema nervioso se pueden clasificar de acuerdo a su propósito, la posición anatómica, la selectividad, etc [31]. A continuación se describen algunos tipos de electrodos del tipo invasivo que se utilizan actualmente en el sistema nervioso.

### 1.4.1. Electrodo extraneurales

Los electrodos extraneurales hacen contacto directo con la superficie del nervio, es decir, su sitio activo esta situado en el epineuro, lo que origina una interfaz simultánea con varios axones en el nervio [32]. Este tipo de electrodos son tiras longitudinales de material biocompatible que cuentan con dos o mas sitios de contacto, generalmente, son alambres contruidos de platino o una aleación platino-iridio [28]. El electrodo en brazalete (“Cuff”) y el de interfaz plana son dos de los electrodos más comunes dentro de este tipo de electrodos.

- Electrodo en brazalete (“Cuff”). Están compuestos de una hoja tubular aislada que envuelve el nervio completamente y tiene dos o más contactos expuestos al interior. Su diseño permite un posicionamiento adecuado lo que minimiza movimiento mecánico y la estimulación esta confinada al interior del electrodo (Figura 1.3). Son empleados para estimular el nervio y causar la activación de fibras eferentes motoras o fibras nerviosas autónomas.



Figura 1.3: Electrodo en brazalete (“Cuff”). Imagen tomada de [28].

- Electrodo de interfaz plana. Variación del electrodo anterior, diseñado para moldear la forma de los nervios periféricos a una geometría más adecuada para la estimulación selectiva (Figura 1.4).

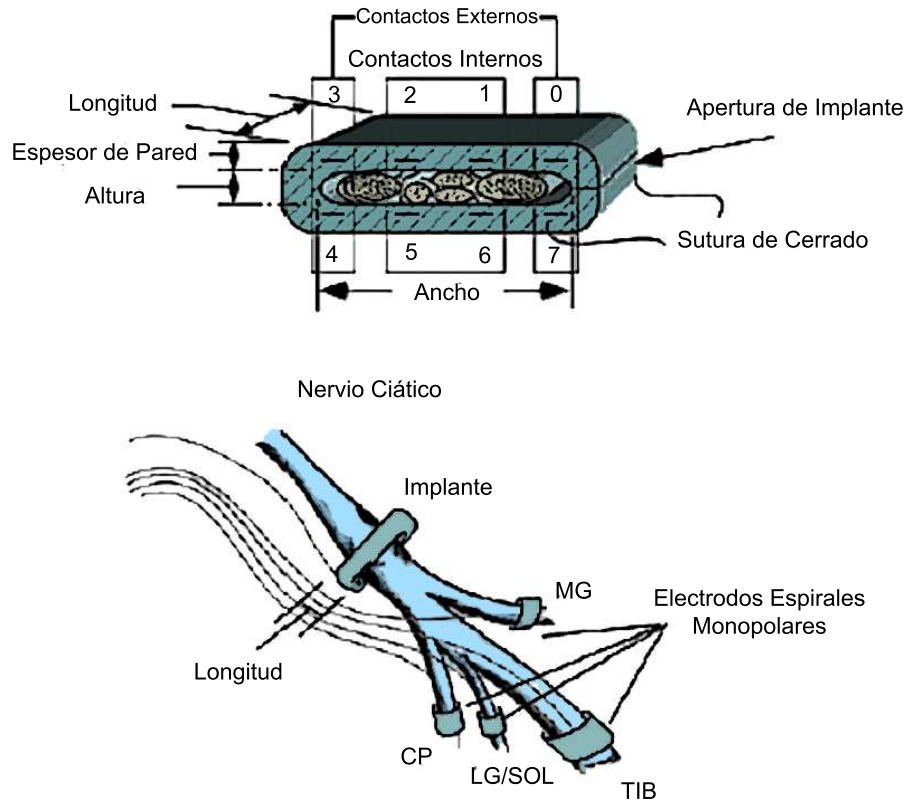


Figura 1.4: Electrodo planar. Imagen tomada de [28].

Los electrodos extraneurales tienen la ventaja de ser los menos invasivos porque su diseño se adapta a la forma del nervio y el daño al tejido no es severo, además son estables, durables y de fácil implementación; sin embargo, la selectividad no es muy buena ya que es difícil de transmitir/registrar señales de los fascículos que se encuentran en medio del nervio, sin activar los axones localizados en la periferia [31],[32].

### 1.4.2. Electrodo intraneurales

Los electrodos intraneurales están directamente en contacto con el interior del nervio, su sitio activo esta situado en la periferia del endoneuro, este tipo de electrodos proveen una interfaz con pequeños grupos de axones dentro del fascículo nervioso [28]. Con esto, se logra un contacto más cercano y se obtiene una mejor selectividad, además de requerir una menor intensidad en la potencia del estímulo con respecto a los electrodos extraneurales, también incrementa la relación señal a ruido comparado con los electrodos extraneurales [31]. El electrodo intrafascicular es uno de los electrodos pertenecientes a esta familia.

- **Electrodos Intrafasciculares.** Se posicionan dentro del nervio y están en contacto directo con el tejido que tratan de estimular/registrar. La estimulación a través de este electrodo actúa específicamente sobre el paquete de nervios sobre el que está ubicado sin afectar a los paquetes vecinos. Son fabricados con silicio y otros sustratos metálicos [28]. La zona activa de este electrodo es de 250-1500  $\mu\text{m}$  (Figura 1.5).

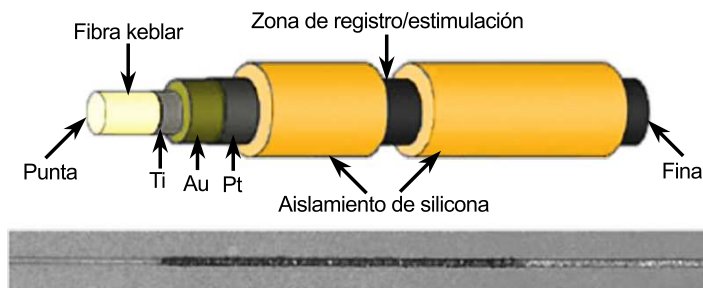


Figura 1.5: Electrodo intrafascicular. Imagen tomada de [28].

Los electrodos intraneurales por otra parte, tienen una excelente selectividad además de contar con una alta estabilidad en los registros, biocompatibilidad y robustez, pero pueden causar un daño significativo el tejido nervioso porque son insertados directamente dentro este a través del per-

ineuro y en ocasiones el movimiento del electrodo en la corteza puede ocasionar la pérdida de la calidad en la señal [31],[33].

### 1.4.3. Electrodo regenerativo

Los electrodos regenerativos están diseñados para interconectar fibras nerviosas a través de pequeños arreglos de agujeros con electrodos a su alrededor (Figura 1.6). Se emplean con el fin de restablecer la comunicación entre un paquete de nervios que ha sido cortado.

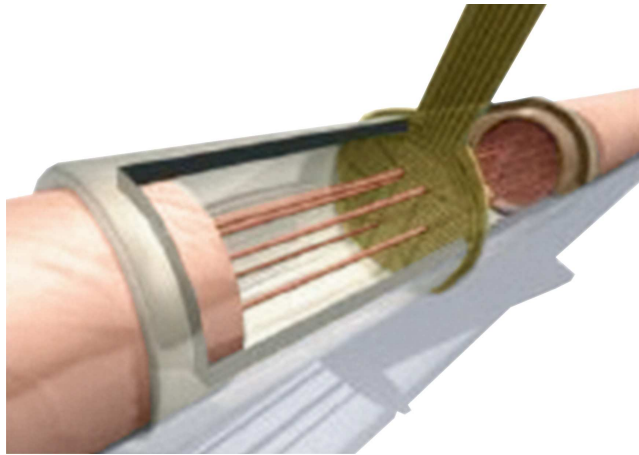


Figura 1.6: Electrodo regenerativo. Imagen tomada de <http://www.suframa.gov.br/minapim/news/visArtigo.cfm>

Los electrodos regenerativos, a diferencia de los dos anteriores, no han sido implatados en humanos. Su funcionalidad, depende de que la regeneración axonal a través de los orificios sea exitosa y de que el nervio dañado soporte la carga mecánica que el electrodo significa sobre él. Solo pueden ser utilizados en nervios seccionados y es necesario esperar un tiempo la restauración de los axones para registrar/estimular señales en el área dañada [28].

#### 1.4.4. Electrodo de penetración

Los electrodos de penetración, como su nombre lo sugiere, son electrodos que se incrustan en el sistema nervioso. Pueden estar contruidos a base de un arreglo de microalambres de un metal conductor como platino, oro, tungsteno o acero inoxidable [19]. También se construyen electrodos a base de silicio ya sea en forma de arreglo tri-dimensional o planar (Figura 1.7). Su principal uso es la estimulación/registro del sistema nervioso central, específicamente, el cerebro.

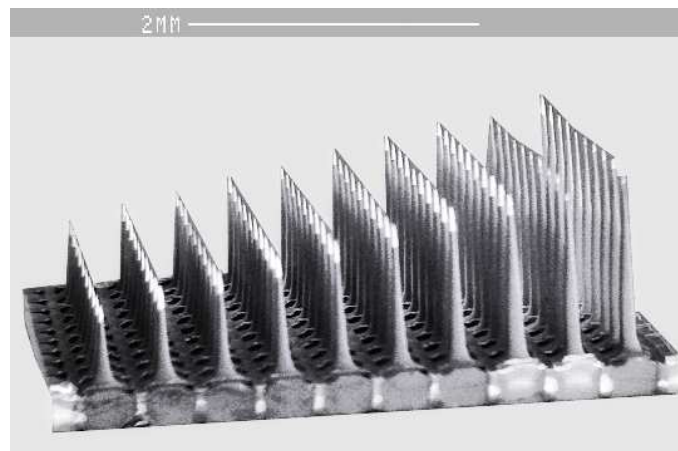


Figura 1.7: Electrodo de penetración. Imagen tomada de <http://www.sci.utah.edu/~gk/abstracts/bisti03/>

Los electrodos de penetración, tampoco han sido implantados en humanos. En los experimentos hasta ahora realizados con este tipo de electrodos, se han obtenido registros estables por periodos relativamente largos de tiempo aun cuando en ocasiones la selectividad no es tan buena y todavía están en pruebas de biocompatibilidad a largo plazo. El implantar este tipo de electrodos, lleva consigo un daño potencial al tejido nervioso especialmente si el material es muy rígido y existe movimiento del tejido nervioso ocasionado por respiración o cambios de presión sanguínea (y encogimiento del cerebro si es el lugar donde se implanta), por ello, se está tratando de reducir las dimensiones y emplear materiales más flexibles [19], [28], [34].

Los electrodos listados anteriormente son sólo algunos de los que se han construido hasta la fecha, y el éxito de todos ellos depende en gran medida de la biocompatibilidad de la superficie como de la biocompatibilidad estructural, es decir, diseño, tamaño, flexibilidad y superficie de contacto total del electrodo con la región donde se va a instalar.

Las dimensiones, los materiales y otras características fisicoquímicas que tienen los electrodos actuales, de alguna forma no han logrado cubrir en su totalidad los requerimientos en aplicaciones donde es necesario hacer el estímulo/registro de señales con alta selectividad a nivel axonal, un número elevado de canales de adquisición para cubrir una mayor población neuronal sin aumentar lo invasivo del electrodo, así como una mejor flexibilidad y capacidad del material a adaptarse a los cambios físicos del tejido nervioso a fin de provocar menos lesiones al tejido nervioso.

Por estas razones, el desarrollo de la siguiente generación de electrodos ha buscado nuevos caminos basados en sistemas biológicos micromecánicos (BIOMEMS) y en nuevos materiales bio-compatibles. Es así que surge un novedoso e interesante enfoque que pretende emplear los materiales desarrollados por la nanotecnología, específicamente los nanotubos de carbono para ser empleados en los electrodos de las interfaces neuronales.

## Capítulo 2

---

# Antecedentes

---

La “nanotecnología”, es la ciencia e ingeniería que involucra materiales o componentes que tienen una organización funcional en la escala nanométrica, al menos en una de sus dimensiones. Esto implica que las propiedades a nivel macro pueden ser modificadas cuando se tiene un mayor control de construcción a nivel atómico o molecular [35].

Uno de los productos más importantes de esta ciencia son los “nanotubos de carbono”. Este material fue descubierto por Sumio Iijima de NEC Corporation en Japón [36]. Los nanotubos de carbono pueden ser considerados como una hoja de grafito que se enrolla formando un cilindro y sus bordes son unidos (sin costura), además de tener los extremos cerrados. De esta forma, solo la tangente de los planos del grafito tienen contacto [37]. Los nanotubos tienen diámetros que pueden variar desde 1 hasta aproximadamente 300 nm y longitudes que van desde algunos nm hasta varios  $\mu\text{m}$ . Existen fundamentalmente dos tipos de nanotubos de carbono: nanotubos de carbono de una sola pared y nanotubos de carbono multi-pared (SWCNT y MWCNT por sus siglas en inglés) [38]. La diferencia se encuentra en que el nanotubo multi-pared puede verse como varios nanotubos de una sola pared contenidos (aproximadamente 50) (Figura 2.1).

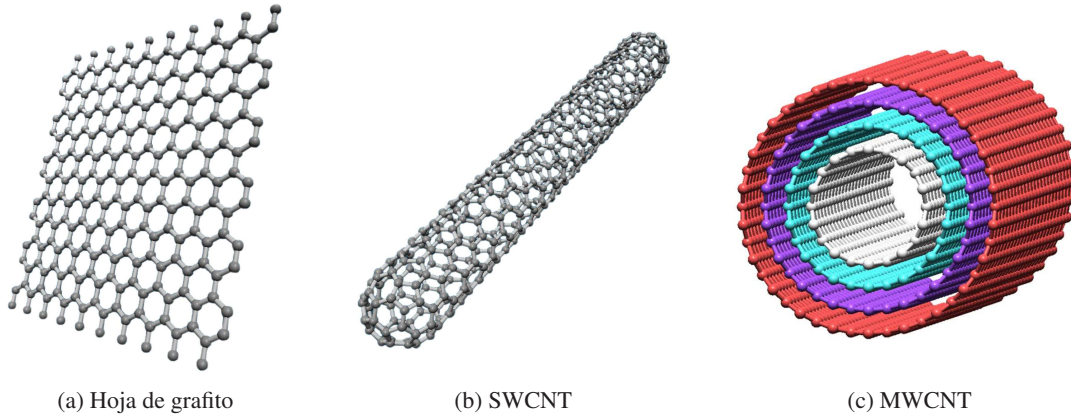


Figura 2.1: Modelo de los diferentes tipos de nanotubos de carbono.

Algunas de sus propiedades importantes son la habilidad que tienen de mantener cargas considerables para amplios ángulos de deflexión (mecánicas); su comportamiento como materiales conductores o semiconductores, dependiendo del arreglo de los átomos de carbono en la estructura y; de su diámetro (eléctricas) (Figura 2.2), además de ser ultra ligeros [39] (Tabla 2.1). La sección inicio-final del nanotubo, es la adecuada para trabajar como electrodo ya que su comportamiento es similar al del plano del borde de una hoja de grafito mientras las paredes del nanotubo son inertes como el plano basal del grafito. La diferencia en la tasa de transferencia electrónica entre el inicio-final del tubo y la paredes en un nanotubo de una sola pared difiere en 5 ó 6 órdenes de magnitud [40]. Es por ello que cuando los nanotubos son conductores, la forma de transporte de los electrones es generalmente balística (sin dispersión) o por difusión. En ambos casos, la resistencia es muy baja, logrando con ello, portar corrientes altas con calentamiento despreciable [41].

Tabla 2.1: Características eléctricas y mecánicas de diferentes materiales y de los NTC.

Material	Módulo de Young (GPa)	Densidad ( $\frac{g}{cm^3}$ )	Resistividad ( $\Omega cm$ )	Densidad de corriente ( $\frac{A}{m^2}$ )
SWCNT	1054	0.6	1E-4	10E13
MWCNT	1200	2.6	1E-4	10E13
Silicio	150	2.33	6.4	—
Oro	78	19.3	22.14E-7	—
Acero	208	7.8	—	—



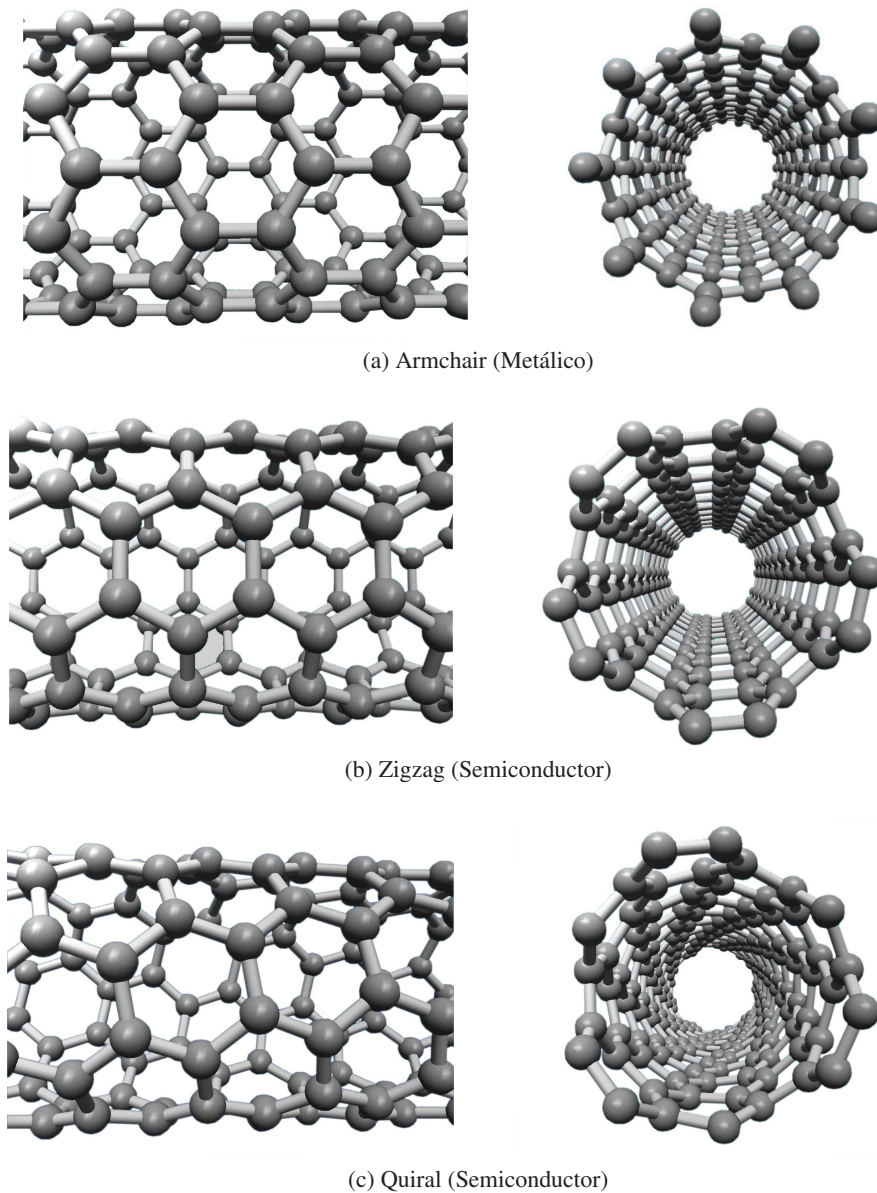


Figura 2.2: Conductividad eléctrica en relación con las diferentes estructuras de los nanotubos de carbono (NTC).

Los nanotubos de carbono presentan las propiedades ideales para la fabricación de nanoelectrodos y sus dimensiones se aproximan a las dimensiones en las que se trabaja a nivel biomolecular dentro del cuerpo humano como las dendritas o la laminina, que es un componente extracelular clave en el tejido nervioso con dimensiones de aproximadamente  $75 \mu\text{m}$  [42].

El manipular este material de manera individual y de una forma simple con los métodos actuales presenta un reto que aún se está resolviendo. La manipulación de dichos elemento como red se presenta como una solución factible sin ser por ello menos compleja. Dentro de una red de nanotubos puede existir una combinación de tubos metálicos como semiconductores, donde el contacto que existe entre cada nanotubo presenta una contribución a la resistencia total del sistema y la transmisión de electrones entre tubos existe por efecto túnel [43]. La ruta que siguen los electrones en esta red es definida por la o las vías de nanotubos que presenten una menor resistencia a su paso [44]. Mientras más gruesa es la película de nanotubos, la rugosidad de la superficie se incrementa y la conductividad se incrementa también rápidamente hasta que se alcanza un límite en la misma, independientemente de su grosor [45].

Por otra parte, las células neuronales cultivadas en superficies con características físicas de rugosidad de entre 20-70 nm se adhieren y crecen mejor que neuronas cultivadas en superficies con rugosidades menores a 10 nm o mayores que 70 nm [46]. Es por ello que una superficie de nanotubos ha despertado interés para emplearlo en los electrodos de interfaces neuronales, pues existen nuevas posibilidades en la forma de interactuar a nivel celular.

A continuación, se presentan las primeras etapas en el trabajo de investigación sobre el uso de nanofibras de carbono y células neuronales, las cuales se han realizado *in vitro*.

En 2003, Thomas J. Webster et al. [47], construyeron una película de nanotubos sin funcionalizar (sin agregar grupos funcionales, moléculas u otras nanopartículas a su superficie [48], [49]), en una matriz de carbotano (polímero no conductivo) sobre vidrio, donde sembraron la línea celular neuronal PC12, astrocitos y fibroblastos. En este estudio, se encontró que las células PC12 se adherían y desarrollaban neuritas sobre la superficie de

la película mientras que la adhesión de astrocitos y fibroblastos se reducía cuando la concentración de los nanotubos se incrementaba.

En 2005, Viviana Lovat et al. [50], fabricaron una película de MWC-NT sin funcionalizar sobre vidrio y sembraron neuronas de hipocampo. En su investigación, las neuronas mostraron crecimiento dendrítico sobre la película, y se registraron corrientes post-sinápticas espontáneas y potenciales de acción espontáneos. Sus resultados muestran que la actividad eléctrica de las neuronas se ve incrementada en frecuencia debido a la interacción específica (número de contactos) entre las células y la red de nanotubos sobre las que fueron sembradas. En el mismo año, Duong Barbara Nguyen-Vu et al. [51], construyeron un electrodo a base de nanofibras de carbono arregladas de manera vertical y recubiertas con óxido de silicio. Sobre esta superficie depositaron una delgada capa de colágeno y sembraron la línea celular PC12. Las células formaron una monocapa sobre la superficie y el colágeno facilitó la adhesión del material celular.

En 2006 Jining Xie et al. [52], prepararon una película gruesa de MWC-NT funcionalizados sobre la que sembraron células provenientes de cultivo primario de ganglio de raíz dorsal. En esta investigación se demuestra que el crecimiento de las dendritas, así como su adhesión al material se ve mejorado por la funcionalización del material. Ke Wang et al. [53], desarrollaron un microelectrodo con MWCNT en posición vertical funcionalizados y recubiertos con poly-D-lisina, nuevamente, para mejorar la adhesión de las células de hipocampo de cerebro de rata que se sembraron en su superficie. Posteriormente, iniciaron un protocolo de estimulación eléctrica a través de los electrodos y los potenciales de acción fueron detectados de manera visual observando el cambio intracelular de calcio; este cambio fue detectado gracias a un indicador de calcio, el cual exhibe una alta intensidad de fluorescencia cuando se enlaza con el calcio liberado por la célula. Sus resultados muestran que las células responden favorablemente al estímulo aplicado, lo que indica un adecuado crecimiento así como desarrollo completo de

sus funciones. Muhammed K. Gheith et al. [54], construyeron un electrodo de SWCNT con el método línea por línea (LBL por sus siglas en inglés) y cultivaron la línea celular neuronal NG108-15. La estimulación celular la realizaron inyectando una corriente eléctrica que atraviesa el electrodo y ésta activa la respuesta eléctrica de la célula que fue registrada mediante la técnica de patch clamp.

Durante el transcurso de este proyecto, se publicaron los siguientes artículos descritos a continuación. Tamir Gabay et al. [55], desarrollaron un electrodo a base de MWCNT y sobre él cultivan neuronas corticales. Estos autores mostraron que su electrodo tiene alta capacitancia específica en corriente directa, así como impedancia en corriente alterna con baja dependencia de la frecuencia. La actividad eléctrica espontánea de la neuronas fue registrada sobre el electrodo y obtuvieron un alta relación señal a ruido. Finalmente, Andrea Mazzatenta et al. [56], construyeron una película de SWCNT sobre vidrio y cultivaron sobre ella células de hipocampo que excitaron eléctricamente a través de la película de nanotubos. Con los resultados obtenidos, proponen el primer modelo eléctrico que intenta mejorar el entendimiento de la interacción nanotubo-célula.

## Capítulo 3

---

# Justificación

---

Los desórdenes neuronales como las lesiones degenerativas y traumáticas, representan un tema importante en cuanto a salud pública en México y en el mundo. Ambas pueden presentarse tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. Por ejemplo, dentro del sistema nervioso central, en específico la lesión medular, se calcula que la incidencia anual en México es de 18.1 por millón de habitantes y ocurre con más frecuencia en hombres en edad productiva (16 a 35 años de edad) y, es probable que dichos datos estén subestimados, ya que no se registran los casos en los cuales la víctima muere inmediatamente después de la lesión o en los que existen otras anomalías neurológicas [57]. Para el sistema nervioso periférico, por ejemplo, durante el primer semestre del año 2000 en el Instituto Mexicano del Seguro Social Guadalajara, se evaluaron 976 pacientes, 75.4 % del género masculino, donde se trataron 57 lesiones traumáticas de nervios periféricos en mano, la prevalencia fue de 5.8 y 98 % ocurrió en el centro de trabajo, el rango de edad osciló entre 15 y 59 años. Las lesiones por agentes cortantes sucedieron en 44 %, aplastamiento 35 %, amputaciones 21 %, la mayoría se asoció con fracturas y lesiones tendinosas. Aunque los nervios digitales fueron los más afectados, los nervios mediano, cubital y radial fueron afectados en 37 % [58].

Los problemas derivados de estas lesiones dependen del área donde se originen, y en caso de que exista una regeneración neuronal, es poco probable que las terminales nerviosas recuperen su trayectoria original por lo que la persona que sufre la lesión, adquiere cierto grado de discapacidad [17]. Por esta razón, es necesario buscar la forma de disminuir las consecuencias de estas lesiones intentando restaurar las funciones del sistema nervioso lo más preciso posible. Actualmente, este problema trata de ser resuelto de distintas formas, la ingeniería emplea el desarrollo de interfases neuronales para emular el funcionamiento del sistema nervioso [17]. En una interfaz neuronal, el electrodo es el elemento que se encuentra en contacto directo con el material celular y es el encargado de establecer la comunicación con el sistema nervioso para posteriormente transducir estas señales bioeléctricas a movimientos mecánicos u otro tipo de información.

El diseño de los electrodos actuales emplea materiales que no satisfacen propiedades como biocompatibilidad a largo plazo, especificidad de adquisición/estimulación, dimensiones físicas, entre otras. Es por ello necesario buscar nuevas alternativas como los materiales desarrollados por la nanotecnología y obtener electrodos confiables para las interfaces neuronales.

El estudio de los nanotubos de carbono y su interacción con el material celular neuronal corresponde a esta necesidad, pues las características de este material son las idóneas para construir la nueva generación de electrodos.

Los resultados obtenidos en estos primeros años, muestran que los nanotubos de carbono permiten el crecimiento de material celular neuronal [59], [60]. También, se han obtenido algunos resultados sobre la conectividad eléctrica entre los nanotubos y las células [50], [56], donde se muestra que la transmisión de señales bioeléctricas es posible aún cuando este mecanismo no ha sido completamente entendido. Estos resultados sin duda demuestran el potencial que tiene este material en las nuevas interfaces

neuronales del futuro, es por ello importante entender tanto el mecanismo de acoplamiento físico como el eléctrico entre las células neuronales y los nanotubos de carbono.

Aunque existen datos preliminares que indican que los NTC son una adecuada interfase para la comunicación eléctrica entre células neuronales y el exterior, es indispensable, realizar estudios mas detallados que confirmen tales resultados. Por lo anterior, en este trabajo se plantea mostrar fehacientemente que los NTC es un buen material conductor de señales eléctricas neuronales para lo cual se emplearon técnicas de registro intra y extracelular. Los resultados obtenidos en esta investigación aportarán un conjunto de conocimientos relevantes en el campo de la bionanotecnología que permitan un eventual desarrollo de aplicaciones en el área de la ingeniería biomédica. En este caso, es de especial interés estudiar a los nanotubos de carbono como interfaz de acople eléctrico para desarrollar sistemas biomédicos avanzados.

### **3.1. Hipótesis**

En base a las características eléctricas y mecánicas de los nanotubos de carbono, es posible diseñar una interfaz biocompatible (electrodo) que permita y facilite la transmisión de señales bioeléctricas de células neuronales.

### **3.2. Objetivos de proyecto**

#### **Objetivo central.**

- a) Mostrar que los NTC constituyen una interfaz apropiada para la trasmisión de señales bioeléctricas neuronales.

**Objetivos particulares.**

- I. Diseñar y construir un electrodo a base de nanotubos de carbono multi-pared.
- II. Estudiar las propiedades eléctricas y morfológicas de la superficie de NTC.
- III. Confirmar la ausencia de neurotoxicidad de los NTC.
- IV. Estudiar la conducción de las señales bioeléctricas por los nanotubos de carbono mediante el registro simultaneo de las señales intra y extracelulares.
- V. Caracterizar la adhesión de las células neuronales a la película de nanotubos de carbono.



## Capítulo 4

---

# Material y métodos

---

Los siguientes capítulos describen los experimentos realizados para cubrir los objetivos propuestos. Es importante que el material o equipo que esté en contacto con las células neuronales se encuentre completamente limpio, además de que el grado de reactivos que debe ser utilizado sea de alta pureza.

Primero se hizo el diseño y la construcción de los electrodos a base de nanotubos de carbono. Estos electrodos se construyeron con la intención de obtener señales bioeléctricas de células neuronales. Se describe la preparación de las placas de oro; los procedimientos de corte, limpieza, adecuación, conectividad y pruebas eléctricas realizadas a las placas de oro que se utilizaron. También se describe el proceso para manejar los nanotubos de carbono explicando cómo se llevó a cabo la preparación de la suspensión de nanotubos y cómo se hicieron las pruebas de dispersión de los nanotubos para seleccionar la mejor suspensión a emplear en la construcción. A continuación, se explican los detalles finales en la construcción de los electrodos, donde se utilizó la mejor suspensión de nanotubos para formar una película sobre las placas de oro. Se caracterizó la superficie de la pelícu-

la de nanotubos por AFM y SEM, y se desarrollaron pruebas eléctricas al electrodo.

De manera paralela, se desarrollo la obtención del cultivo celular para poder sembrar sobre el electrodo construido las células neuronales y utilizar su actividad eléctrica. En este capítulo, se describirán los pasos necesarios para llevar a cabo la obtención de neuronas de cerebelo a partir de cultivo primario, su extracción del cerebelo de rata y el conteo celular realizado. En este mismo paso, se obtuvo otro cultivo celular, el de la línea celular PC12, lo cual involucro descongelar la línea, aumentar el número de células (proliferación celular) y el realizar el conteo celular. El crecimiento del material celular fue observado mediante microscopía óptica.

Un vez que se obtuvo el cultivo celular, el siguiente paso fue sembrarlos sobre los electrodos construidos previamente y sus respectivos controles (ausencia de nanotubos de carbono) con el fin de hacer crecer este material sobre la superficie del electrodo y posteriormente obtener su actividad eléctrica a través de él. El crecimiento del cultivo primario fue observado por microscopía óptica por 2, 7 y 14 días. De igual forma, el cultivo de la línea celular fue observado por 2, 4 y 6 días.

Después de haber cultivado el material celular sobre los electrodos se hizo el registro electrofisiológico de los cultivos celulares. Este registro se hizo para obtener las señales bioeléctricas de las células a través del electrodo. En este paso, se detallarán las técnicas empleadas para registrar actividad eléctrica de las células neuronales que hayan crecido sobre la película de nanotubos en los electrodos. Para cultivo primario, se describe el registro de los potenciales de reposo mientras que para el cultivo de la línea celular se desarrolló el registro de corrientes iónicas y potenciales de acción evocados. Se describe además el registro extracelular a través de los electrodos efectuado sobre la línea celular neuronal.

Finalmente, para observar como se adhirieron las células de la línea PC12 a la superficie del electrodo (película de nanotubos), y observar si existió alguna relación entre esta y la transmisión de la señal, se hizo la visualización del crecimiento celular neuronal por AFM y SEM.

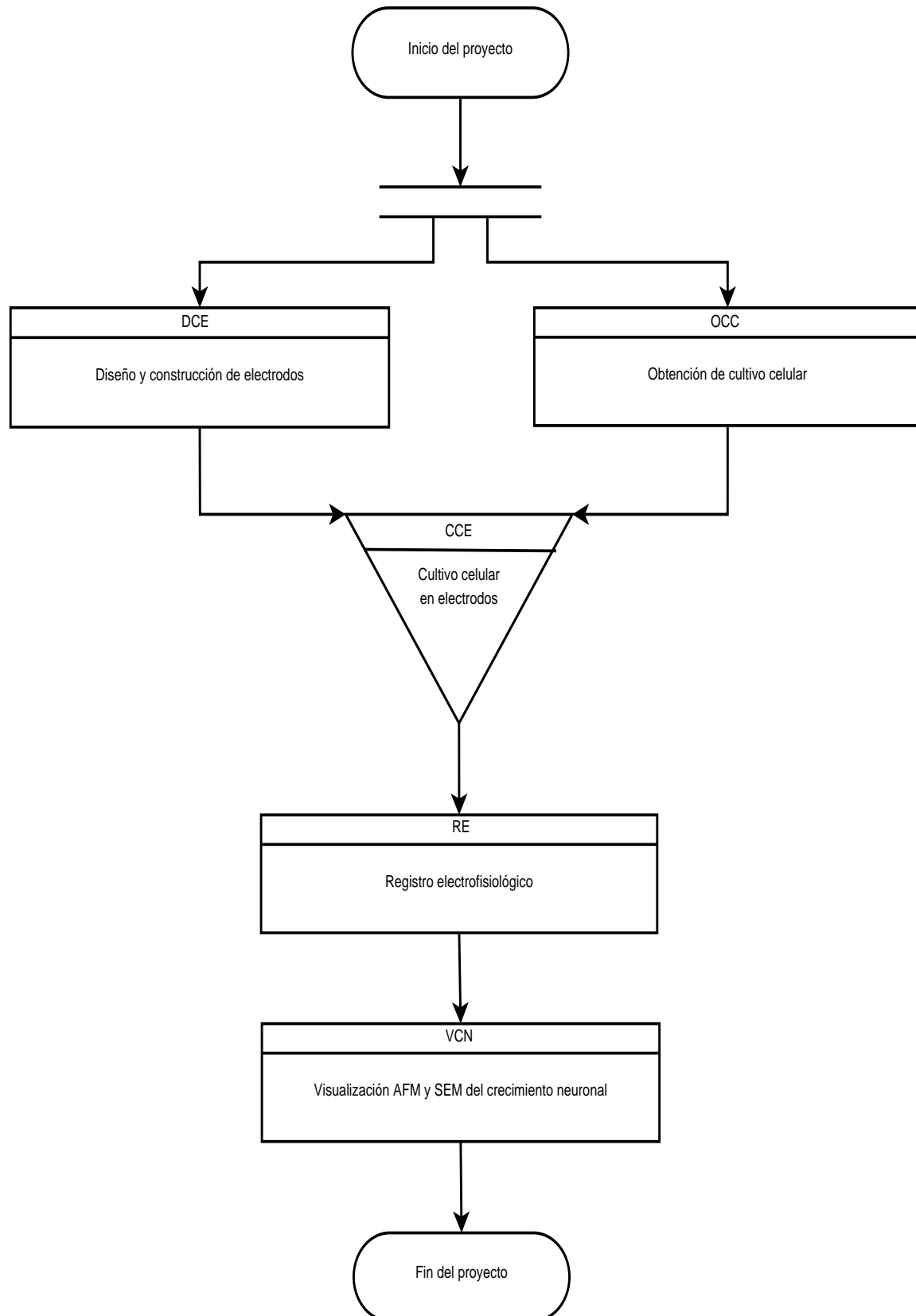


Figura 4.1: Diagrama de flujo del proyecto "Diseño y caracterización de interfaz células neuronales-sustrato metálico a través de una película de nanotubos de carbono".

## 4.1. Diseño y construcción de electrodos

El diseño y la construcción de electrodos fue el primer paso en el desarrollo de la interfaz, el electrodo contuvo material celular en su superficie, por lo tanto, se tuvo especial cuidado en que los materiales empleados para su construcción fueran no tóxicos. El proceso de fabricación se llevo a cabo en un lugar limpio y aislado del exterior. También los materiales y el instrumental estuvieron libres de partículas de polvo, grasas o algún otro contaminante que pudiera llegar a perjudicar el material celular al quedar atrapado en la superficie del electrodo.

En el diseño de los electrodos fue importante tener en cuenta que las características mecánicas y ópticas permitieran una correcta evaluación topográfica con y sin el material celular sobre la superficie, evaluación que fue realizada mediante microscopía óptica, AFM y SEM. Respecto a las propiedades eléctricas, se debió asegurar la transmisión eléctrica desde el alambre de conexión hasta la superficie de nanotubos.

La construcción de los electrodos implicó tres etapas que fueron: preparación de las placas, preparación de la suspensión de nanotubos y finalmente la unión de ambos elementos.

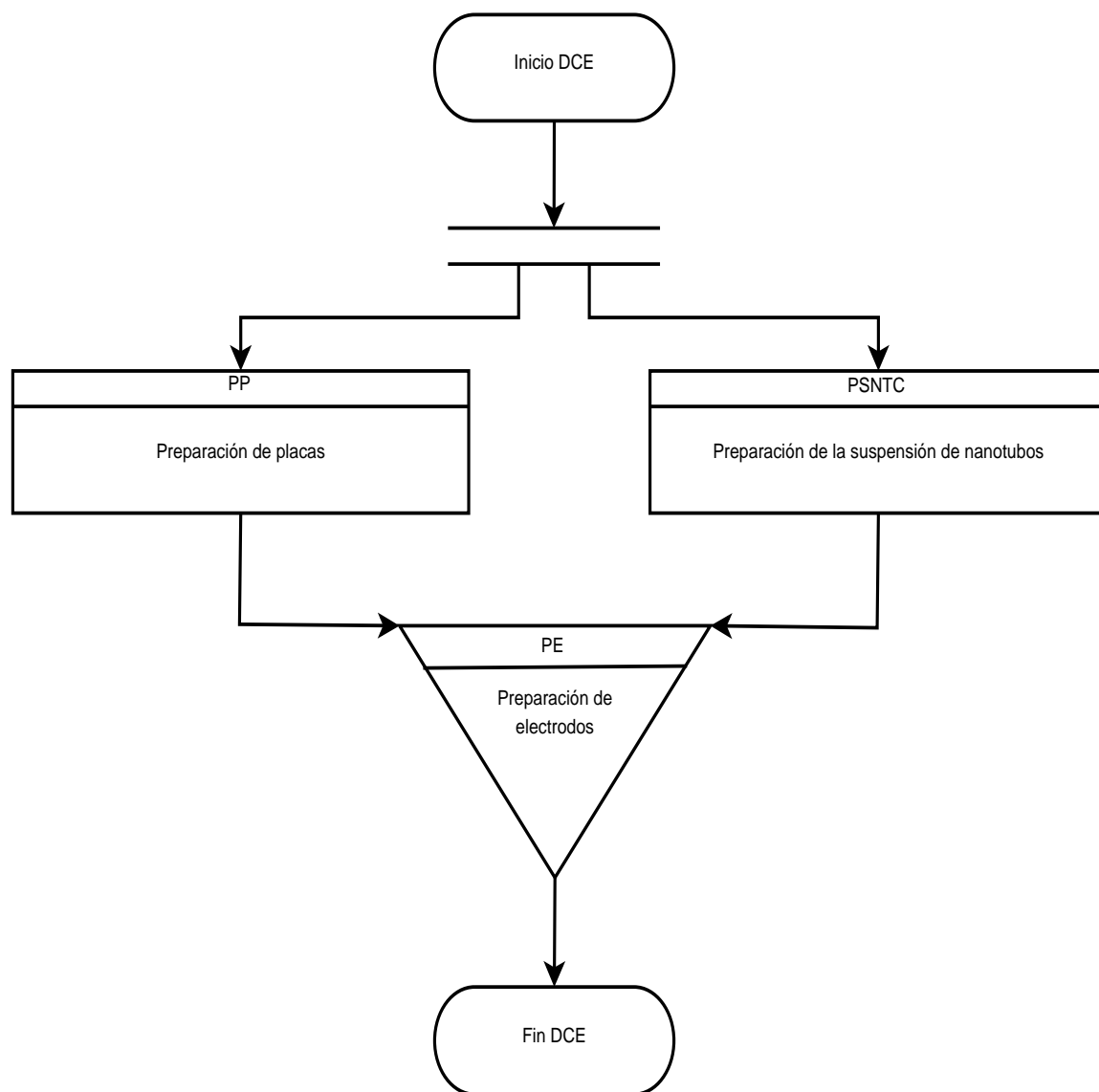


Figura 4.2: Diagrama de flujo de diseño y construcción de electrodos.

### 4.1.1. Preparación de placas

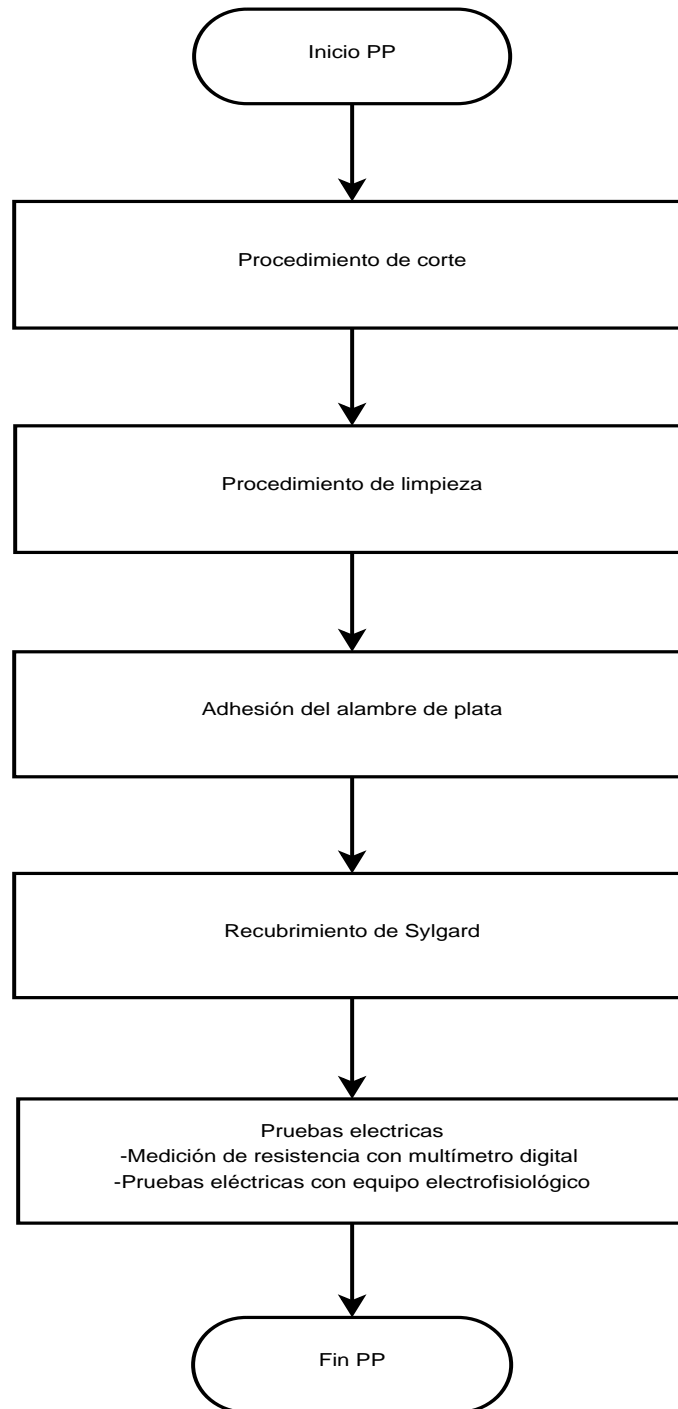


Figura 4.3: Diagrama de flujo de preparación de placas.

A continuación se describirán los pasos que se siguieron en la preparación de las placas. Las placas que fueron utilizadas para construir el electrodo tienen un sustrato metálico de oro (Au (111) que es atómicamente plano de acuerdo con los índices de Miller [61]) sobre una base de vidrio [62].

En la construcción de estas placas, existen distintas técnicas empleadas para depositar el oro sobre el vidrio: “sputtering”, evaporación y “gold plating”. Para que el oro se adhiera correctamente a un sustrato y evitar que éste se desprenda cuando es sometido a algún tipo de tratamiento físico o químico (en este caso el de limpieza), es necesario aplicar una capa delgada de otro material que le ayude a anclar. Los materiales empleados comúnmente son el cromo o el titanio [63]. Las placas utilizadas en este proyecto, tienen el esquema mostrado en la figura 4.4, donde la base de vidrio tiene un milímetro de espesor, la película de cromo es de 20 nm y la película de oro es de 200 nm.

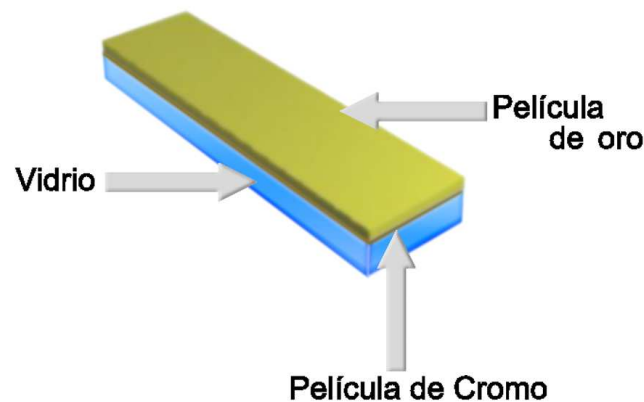


Figura 4.4: Construcción de placa de oro Au (111).

Ninguno de los elementos de los que está construida la placa afecta de manera significativa al material celular, a excepción del cromo [64]; sin embargo, al estar alejado una distancia de 200 nm de la superficie de la película de oro, su contacto con el material celular es nulo. Por lo que no presenta efecto neurotóxico alguno que pueda inhibir la proliferación o el crecimiento dendrítico.



En el corte de las placas, se tuvo especial cuidado de no dañar la superficie del sustrato metálico respetando las dimensiones especificadas para obtener un tamaño de superficie adecuado donde se aplicó la suspensión de nanotubos y se sembró el material celular. Además, las dimensiones externas debieron facilitar su colocación en el microscopio AFM donde se realizó la caracterización de la superficie.

Como segundo paso, se describe el proceso de limpieza de las placas cortadas. De manera natural, la superficie de la placa pudiera contener partículas de polvo, grasa o algún otro contaminante que posteriormente afecten los resultados del experimento.

El tercer paso fue establecer contactos eléctricos la placa. Los materiales empleados para establecer el contacto eléctrico con el sustrato metálico fueron: alambre de plata y pintura conductiva de carbón. El alambre de plata es lo suficientemente delgado y flexible por lo que se considera que no provoca daños mecánicos al sustrato de oro. La pintura conductiva contiene grafito coloidal en isopropanol.

Como cuarto paso, se aplicó el recubrimiento de Sylgard que tuvo como fin, eliminar cualquier efecto tóxico que el alambre de plata o la pintura conductiva pudieran tener, aislar eléctricamente al alambre de plata y delimitar el área donde se aplicó la suspensión de nanotubos. El Sylgard es un elastómero de silicona hidrofóbico que resiste la degradación química y la acción de contaminantes, es empleado como aislante eléctrico y no tiene efectos neurotóxicos sobre material celular pues ha sido empleado como recubrimiento base de cajas Petri en la disección de caracol durante la obtención de células neuronales o en disección muscular de ranas. Es un material empleado en experimentos electrofisiológicos [65], [66].

Finalmente, se hicieron las pruebas de continuidad eléctricas correspondientes para comprobar que existía una adecuada comunicación entre el alambre de plata y la película de oro.

#### **4.1.1.1. Procedimiento de corte**

Se cortaron dos tipos de placas: el primer tipo tiene su superficie completamente cubierta por la película o sustrato de oro, el segundo tipo tiene sólo la mitad de la superficie cubierta con oro, la otra mitad es de vidrio sin recubrimiento alguno (Figura 4.5).

Así, se marcaron dimensiones externas de 1 cm por 1 cm por la parte inferior de la placa (vidrio), recargando la parte superior de la placa (película de oro) en una superficie blanda que no dañe la película de oro (pañó, fieltro, etc.) sobre otra superficie rígida (aluminio, madera, etc.). Con una prensa, se evitó en lo posible el movimiento de la placa. En el caso del segundo tipo de placa (oro/vidrio), se tomó como base la zona límite entre la película de oro y el vidrio, se marcó tomando 0.5 cm de la película de oro y 0.5 cm de la parte de vidrio.

Ejerciendo una presión moderada, se pasó un cortador de vidrio con punta de diamante sobre las marcas. Se apoyó la placa sobre un palillo de madera sobre la línea que dejó el cortador y se ejerció una presión hacia abajo. Con esto, se logró hacer un corte fino del material y sin dañar demasiado la superficie. Para obtener las placas pequeñas, se comenzó a cortar por los tramos de mayor dimensión hasta llegar a los más chicos.

#### **4.1.1.2. Procedimiento de limpieza**

El procedimiento de limpieza ayudó a que la superficie de las placas estuviera libre de algún agente que pudiera combinarse con los materiales

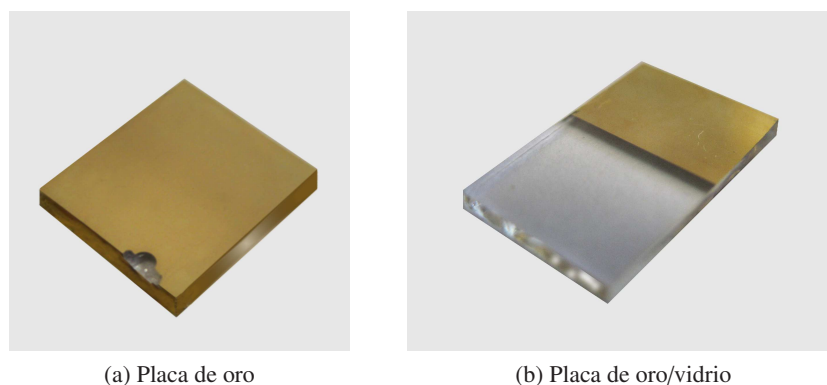


Figura 4.5: Placas de vidrio-oro cortadas.

que se utilizaron posteriormente y se provocará algún efecto indeseable en el comportamiento del dispositivo. Con este procedimiento se removió tanto contaminantes químicos como físicos. Para esto se emplearon pinzas de disección limpias y guantes de polietileno o latex en su manejo.

Las placas se dejaron sumergidas en agua desionizada por una noche con el fin de remover sales que pudieran estar presentes en la superficie. Para eliminar grasas o algún otro contaminante, las placas fueron sumergidas en mezcla crómica durante 15 minutos. Al finalizar el tiempo, se lavó con abundante agua desionizada; el agua removió residuos del ácido y a diferencia del agua normal, esta no deja rastro de sales, partículas o iones sobre el sustrato (Figura 4.6). Enseguida, las placas fueron sumergidas en alcohol etílico absoluto y sometidas a un tratamiento de ultrasonido por 5 minutos, con ello se removieron físicamente los contaminantes de la superficie de oro.

Una vez hecho esto, las placas se depositaron inmediatamente sobre una superficie limpia, se cubrieron con una caja de Petri y se dejaron secar. Ya secas, se almacenaron en cajas de Petri y se sellaron los bordes con “parafilm” para evitar en lo posible el contacto con el medio ambiente.

En este punto es importante aclarar que la posibilidad de obtener una superficie de oro completamente limpia es muy difícil, pues al ser expuesto al

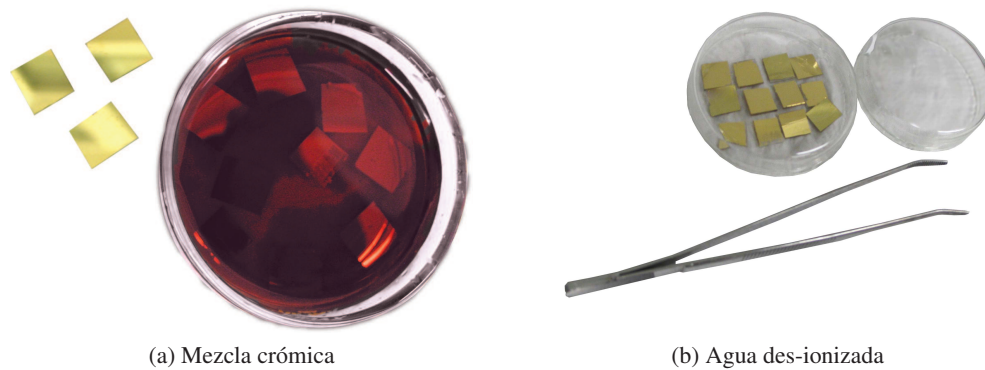


Figura 4.6: Limpieza de placas.

aire, éste se cubrirá inmediatamente con una capa de hidrocarburos adventicios. Estudios realizados por los fabricantes de las placas, muestran que una superficie de oro contiene 50 % de carbono, 40 % de oro y 10 % de oxígeno [63]. Ello, sin embargo, no afecta el objetivo final, puesto que ninguno de estos elementos es dañino para el material celular.

#### 4.1.1.3. Adhesión del alambre de plata

La adhesión del alambre responde al requerimiento de enviar/recibir señales eléctricas en el electrodo. Se eligió alambre de plata porque es buen conductor, es flexible y no somete, cuando sea adherido, a grandes esfuerzos mecánicos a la película de oro durante su manejo.

En la adhesión del alambre con el sustrato, se utilizó pintura conductiva de carbono, lo cual ayudó a establecer un contacto eléctrico adecuado, reduciendo en lo posible las capacitancias y resistencias parásitas. Se usó pintura en lugar de soldadura electrónica normal, primero porque tiene una menor concentración de elementos contaminantes que la soldadura y segundo, porque en un proceso de soldadura electrónica normal se pueden alcanzar temperaturas altas que pueden provocar que la película de oro que recubre la superficie de vidrio se desprenda.

Se cortaron alambres de 20 mm de longitud y se montaron sobre la película de oro dentro de los 3 primeros milímetros a partir del borde de la placa. Bajo microscopio estereoscópico y tratando de hacer un depósito lo más controlado posible se aplicó la pintura conductiva a lo largo de la unión de estos dos elementos (Figura 4.7). Se cubrió la placa con una caja de Petri y se dejó secar la pintura conductiva por un periodo de tiempo no menor a 20 minutos.

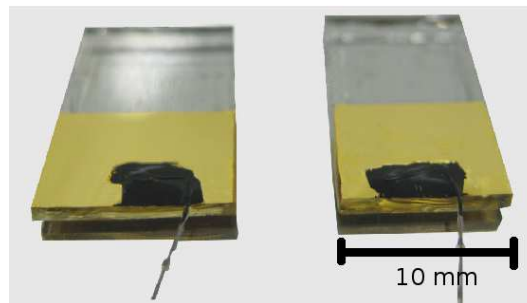


Figura 4.7: Pintura de carbón conductivo.

#### 4.1.1.4. Recubrimiento de Sylgard

La unión entre el alambre de plata y la película de oro con la pintura conductiva es frágil y se desprende si el esfuerzo mecánico es muy grande; además, es necesario aislar eléctricamente estos materiales del medio externo. Para proveer un mejor soporte mecánico y aislarlos, la unión y parte del alambre de plata fueron recubiertos con Sylgard. Las orillas de la placa también fueron recubiertas con el fin de limitar el área donde se vertió la suspensión de nanotubos de carbono.

El Sylgard se compone de una base y un catalizador que se mezclaron en una proporción de peso de 10:1 teniendo cuidado de que al agitar no se generaran burbujas de aire pues esto podría provocar que la reacción no se lleve a cabo de manera adecuada. La mezcla se dejó reposar por 30 minutos y se aplicó cuidadosamente una capa fina con un pincel de abanico sobre la región de la unión y en los tres bordes restantes de la placa, de

manera que se limite un rectángulo en la superficie de la placa (simulando una pequeña piscina). De igual forma se aplicó una capa sobre el alambre de plata dejando libre los últimos 5 mm que sirvieron para conectarlo al equipo electrofisiológico. El Sylgard, como ya se mencionó, funciona como un aislante eléctrico y la idea de recubrir el alambre con este material fue para evitar fugas de corriente eléctrica durante los experimentos finales.

Para acelerar el proceso de catalización, las placas fueron colocadas sobre una parrilla eléctrica forrada con papel aluminio a una temperatura de 60 a 80 °C durante aproximadamente 10 minutos. Se cubrieron con una caja de Petri y se dejó que el proceso de catalización continuara por lo menos por un día (Figura 4.8). Finalmente, las placas se limpiaron y almacenaron como en el procedimiento de limpieza previo (ver sección 4.1.1.2) omitiendo los pasos de sumergirlas en agua por una noche y en mezcla crómica.

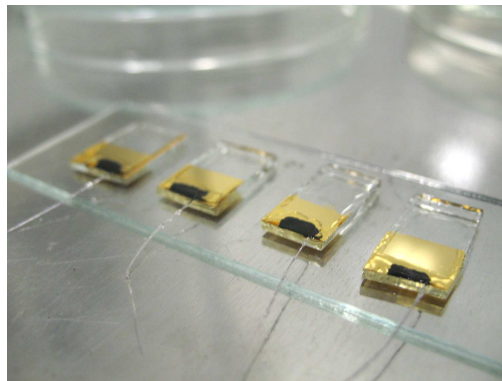


Figura 4.8: Placas recubiertas con sylgard.

#### 4.1.1.5. Pruebas eléctricas

El paso final en esta preparación, fue comprobar si existía conductividad eléctrica o no entre el alambre y la película de oro. Para ello se siguieron dos tipos de pruebas.

En la primera prueba, se midió la resistencia eléctrica con un multímetro digital, conectando una terminal de este en el extremo del alambre de plata y la otra en un extremo de la superficie de oro.

En la segunda prueba se utilizó el equipo de electrofisiología en el modo de fijación de voltaje (ver apéndice F.4), conectando la placa en serie con el modelo de resistencia del equipo (Figura 4.9).

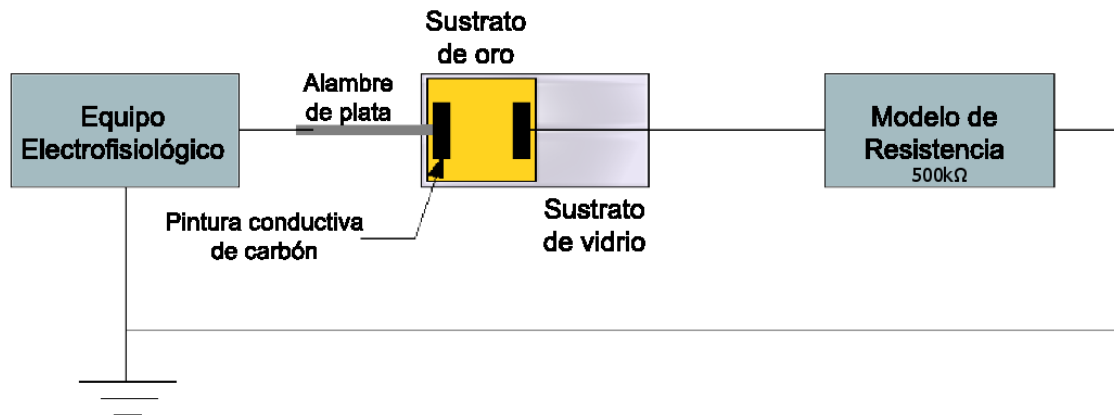


Figura 4.9: Esquema de la prueba eléctrica realizada a las placas.

Se enviaron pulsos de voltaje al sistema con el modelo de resistencia de 500 k $\Omega$  sin la placa. A continuación, se envió el mismo tren de pulsos pero ahora con la placa conectada. Se aplicaron 9 pulsos con una duración de 50 mS, comenzando en -8 mV e incrementando 2 mV entre cada uno de ellos. El equipo registró las señales de corriente con respecto al tiempo, posteriormente, con el software Clampfit, se realizó un procesamiento de las señales que consistió en ajustar la línea basal y efectuar un filtrado para eliminar ruido. Se obtuvo además un gráfico corriente-voltaje que sirvió para comparar y obtener la resistencia que presentó la placa de oro con sus conexiones al sistema.

De esta forma, se concluyó la etapa de preparación de las placas teniendo en cuenta que los materiales empleados fueron los adecuados para estar en contacto con el material celular y además, la comunicación eléctrica fue establecida. A continuación se describirá el proceso que se siguió en la preparación de la suspensión de nanotubos.

### 4.1.2. Preparación de la suspensión de nanotubos

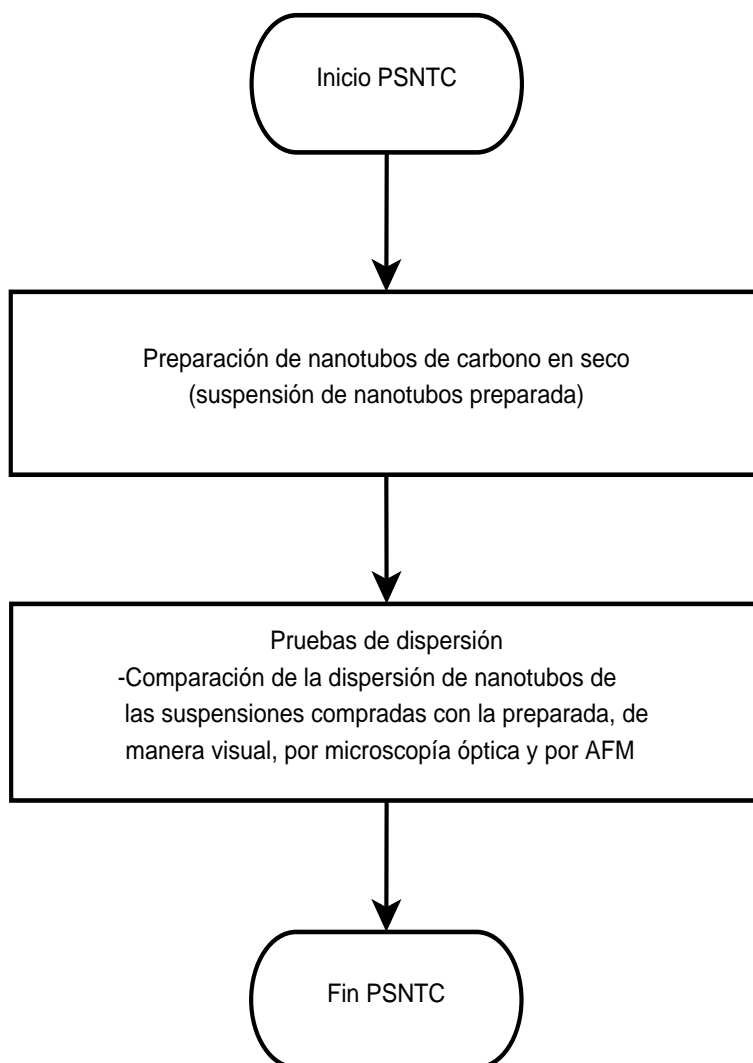


Figura 4.10: Diagrama de flujo de la preparación de la suspensión de nanotubos.



En este procedimiento, los nanotubos de carbono fueron dispersados en una matriz solvente, ya que por naturaleza, los nanotubos vienen aglomerados o unidos entre ellos por las fuerzas de Van der Waals, las cuales son fuertes debido a su tamaño y, fue entonces necesario separarlos para obtener una película más uniforme. Los nanotubos de carbono que se emplearon son los llamados de multipared. Las características de los nanotubos de carbono que se compraron son:

Diámetro externo: 20-40 nm

Diámetro interno: 5 -10 nm

Longitud: 10-30  $\mu\text{m}$

Tabla 4.1: Composición química de NTC usados en experimentos.

Componentes	Contenido
C	98.39 %
Cl	0.45 %
Fe	0.23 %
Ni	0.93 %

En este caso, la presencia de níquel como metal pesado, pudo haber sido un riesgo, aun cuando la concentración es baja. Por lo tanto debe tenerse en cuenta como un posible factor que afecte el crecimiento del material celular en el electrodo. El resto de los materiales, ya sea por concentración o tipo de elemento, no son dañinos para el material celular.

Con base en esas características, se adquirieron tres diferentes preparaciones: nanotubos en seco, suspensión de nanotubos en polivinil pirrolidona (PVP) y suspensión de nanotubos en agua. La concentración de los nanotubos comprados tanto en PVP como en agua fue de  $100 \frac{\text{mg}}{\text{lt}}$ .

Inicialmente, se trabajó con los nanotubos en seco. Estos nanotubos tienen la apariencia de ser un polvo muy fino, sin embargo, lo que en realidad sucede es que por las características propias de los nanotubos en cuanto a dimensión y composición atómica, vienen enlazados unos con otros por

fuerzas de Van der Waals formando pequeños cúmulos o aglomerados de nanotubos (Figura 4.11). Esto afecta en primera instancia la manipulación de dichos elementos ya que no es posible trabajarlos de manera independiente, es por ello necesario tratar de separarlos mediante la ruptura de estas fuerzas empleando sustancias que de alguna manera debiliten las fuerzas y los aíslen entre ellos.



Figura 4.11: Nanotubos de carbono secos.

Diversas sustancias han sido empleadas para tratar de dispersar los nanotubos: sodio dodecyl sulfato (SDS), hidróxido de sodio (NaOH), polímeros, solventes orgánicos, etc. Idealmente la sustancia adecuada debe tener una baja viscosidad ( $< 10$  centipoise [67]) y no dañar la integridad de los elementos. En este caso la aproximación para resolver este problema fue una mezcla de una compuestos orgánicos: acetona y alcohol etílico absoluto. Para ayudar a romper estas fuerzas también se aplica ultrasonido como fuerza mecánica externa.

Así, se comparó la forma en que las soluciones de agua y PVP dispersan los nanotubos respecto a la suspensión elaborada en el laboratorio con los nanotubos en seco. Las pruebas de dispersión se hicieron de manera visual y por medio de AFM.

#### 4.1.2.1. Preparación de nanotubos de carbono en seco

Se preparó una solución orgánica con 6.6 ml de acetona (34 %) y 13.3 ml de alcohol etílico (66 %). Se pesaron 2 mg de nanotubos de carbono dentro de un tubo de ensaye en la báscula digital, y se agregaron 5 ml de la solución preparada. Se agitó el tubo hasta que los nanotubos se incorporaran a la solución. Se vertió el contenido en un vaso de precipitado con el restante de la solución preparada. Así, se obtuvo una concentración final igual a la de los nanotubos en agua y PVP de  $100 \frac{mg}{l}$ .

Se cubrió el vaso de precipitado con plástico cristal y se introdujo al equipo de ultrasonido (el cual contenía agua desionizada). La suspensión permaneció en el equipo por 15 minutos (Figura 4.12). Dependiendo de la concentración de nanotubos, agresividad de las soluciones y tiempo en el ultrasonido, es posible que los nanotubos comiencen a fragmentarse.

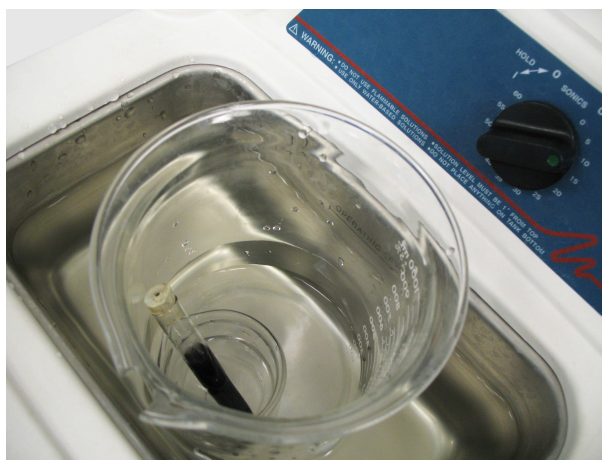


Figura 4.12: NTC tratados con ultrasonido.

Se retiró la suspensión del equipo y se almacenó en un lugar libre de polvo para su uso posterior (Figura 4.13). Las suspensiones que se utilizaron fueron preparadas el mismo día de la aplicación.



Figura 4.13: NTC dispersos en acetona-alcohol.

#### 4.1.2.2. Pruebas de dispersión

Se probó la suspensión de nanotubos en PVP, la suspensión de nanotubos en agua y la suspensión preparada con los nanotubos en seco con la intención de decidir cual de ellas era la óptima para la preparación del electrodo, pues mientras mejor sea su dispersión, la película de nanotubos será más estable, más uniforme y se cubrirá mejor el área donde van a ser depositados.

Se tomaron 5 ml de cada preparación y se vertieron en tubos de ensayo distintos, después se agitaron por ultrasonido durante 10 minutos (Figura 4.14).

En una placa de oro se depositó 1  $\mu$ l de la suspensión elaborada en laboratorio después de ser expuesta a ultrasonido. Se repitió la misma operación con las otras dos preparaciones en sus respectivas placas (Figura 4.15). Una vez que las soluciones se evaporaron de la superficie de las placas, fue posible observar las muestras en AFM.

Los tubos de ensayo fueron sellados con parafilm y almacenados. Después de 5 días, se inspecciono visualmente qué sustancia mantuvo por más tiempo los nanotubos dispersos.

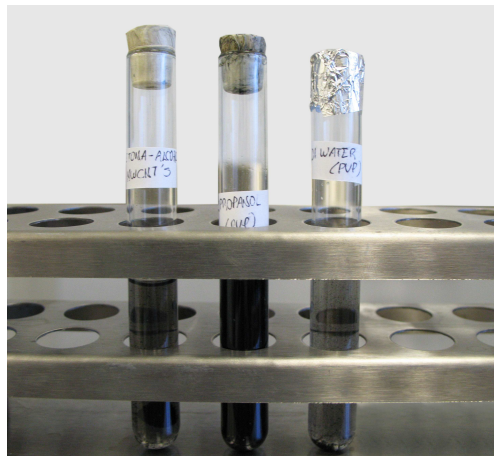


Figura 4.14: NTC dispersos en las sustancias.

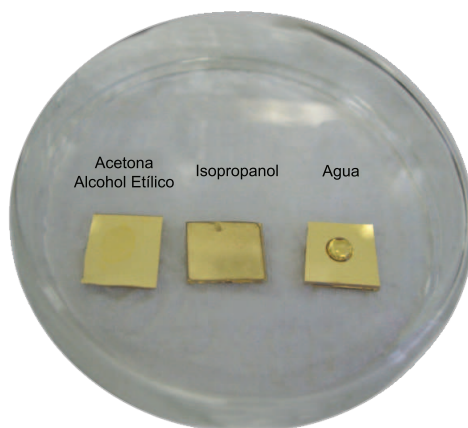


Figura 4.15: Placas de oro con NTC.

Como siguiente paso, se descubrieron las muestras una a una conforme fueron analizadas en AFM para evitar en lo posible que se absorbieran partículas de polvo en la superficie. Es importante recalcar que las placas se cortaron de 1cm por 1 cm con el fin de que al montarse en el microscopio, se tuviera un espacio de trabajo adecuado. La visualización de las muestras por AFM se hizo en modo oscilante (ver apéndice E.2), a temperatura ambiente y condiciones normales de cuarto (Figura 4.16).

La suspensión de nanotubos formada en la solución de PVP fue la empleada para la construcción de los electrodos.



Figura 4.16: Montaje de placas en AFM.

### 4.1.3. Preparación de electrodos

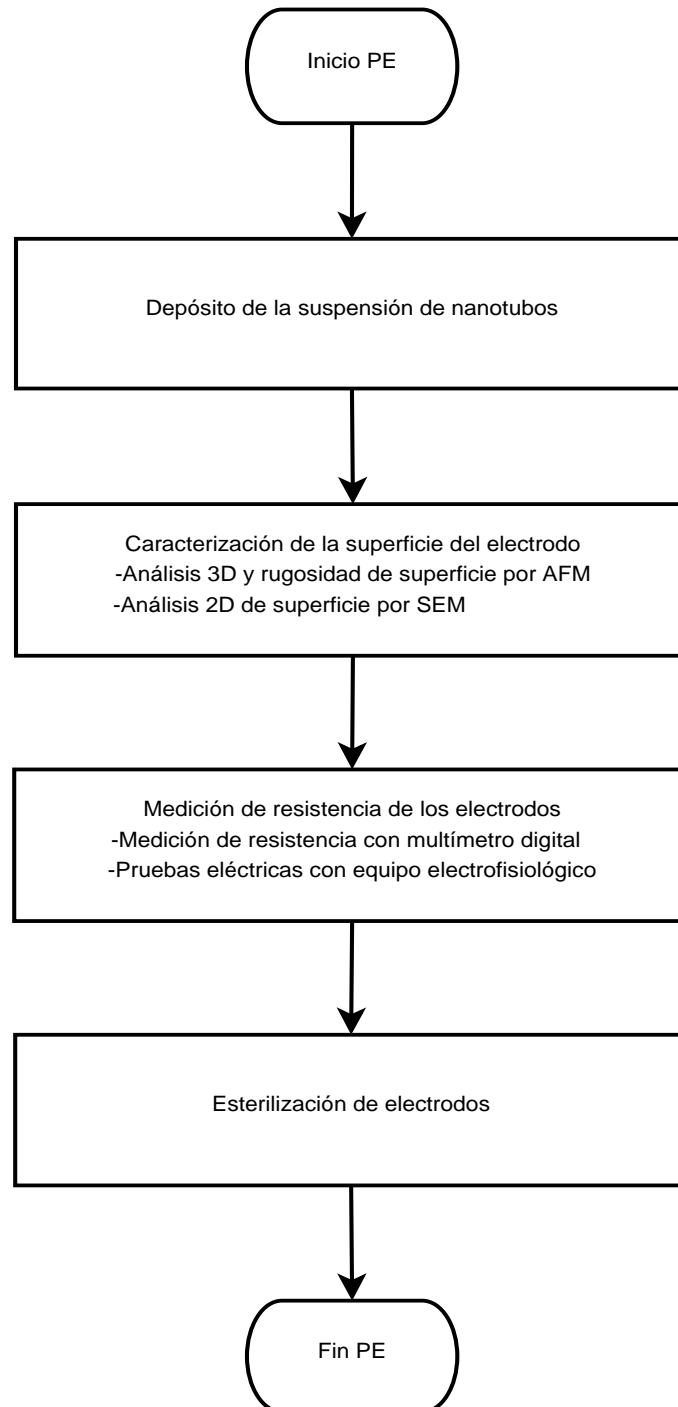


Figura 4.17: Diagrama de flujo de la preparación de electrodos.

En esta preparación, se emplearon las placas y la suspensión de nanotubos para formar el electrodo. La suspensión de nanotubos se preparó el mismo día para evitar que los nanotubos formaran conglomerados.

En un ambiente limpio, se depositó la suspensión que mejor dispersó los nanotubos sobre las placas y se caracterizó la superficie de la película por AFM. Un parámetro importante en esta caracterización, fue la rugosidad de la superficie de la película de nanotubos de carbono. La rugosidad es una medida de la textura (conjunto de irregularidades) de la superficie, que indica el mecanismo físico de interacción entre la película de nanotubos y la célula cultivada. Se eligió como parámetro de medición la rugosidad media, que es un promedio aritmético de los valores absolutos de las variaciones de las alturas en un perfil o sección de la imagen obtenida.

Finalmente, se desarrollaron pruebas eléctricas con las técnicas empleadas anteriormente al electrodo completo.

#### **4.1.3.1. Deposito de la suspensión de nanotubos**

Previo a el depósito de la suspensión, las placas se sumergieron por un día en la solución base de la suspensión de nanotubos. Este proceso recubre con moléculas de la solución la superficie de las placas y sirvió para evitar que se produjera una reacción cuando la suspensión entrara en contacto con la superficie de la placa.

La suspensión se depositó en la superficie de las placas por medio de una micropipeta con micro-puntas perfectamente limpias. Se aplicaron descargas de 15  $\mu$ l, de tal manera que la suspensión no superará la altura de los bordes fabricados con Sylgard.

Estas descargas se aplicaron en un ambiente lo más aislado posible para evitar que las partículas del ambiente pudieran depositarse en la superficie



de los electrodos y modificarla. Entre cada aplicación se aplicó aire caliente para evaporizar la solución empleada con mayor rapidez.

Recordando que se usaron dos tipos de placas (ver sección 4.1.1.1), el número total de descargas para las placas sólo con la película de oro fue de 130, lo suficiente para obtener una superficie relativamente gruesa y asegurar que no existía ningún contacto entre la célula y la superficie de oro de la placa.

Para las placas con la mitad de película de oro y mitad de vidrio, el número de descargas fue de 50. En este caso la película de nanotubos no fue demasiado gruesa para que se pudieran visualizar mejor las células cuando se efectuará el registro con el equipo electrofisiológico. Para asegurar que el material celular estuviera en contacto sólo con la película de nanotubos, la unión entre ésta y la de oro se recubrió con Sylgard (Figura 4.18).

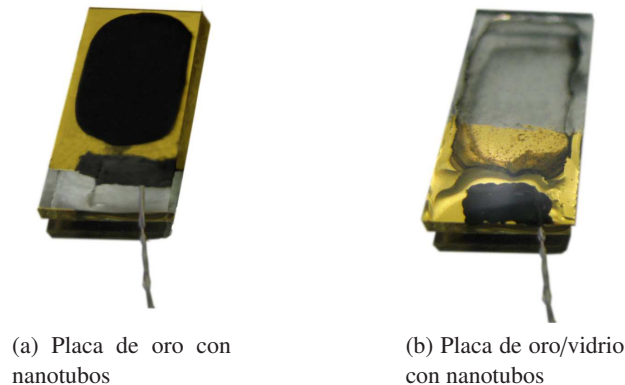


Figura 4.18: Depósito de NTC en placas de oro.

#### 4.1.3.2. Caracterización de la superficie del electrodo

Una vez terminados los electrodos, se caracterizó la superficie por AFM en modo oscilante para conocer cómo era el lugar donde se cultivo el material celular, y observar la forma en la que hicieron contacto los nanotubos entre ellos (Figura 4.19). Estas imágenes dieron una perspectiva tridimen-

sional de la película de nanotubos. Se realizó el estudio para los dos tipos de electrodos construidos y para una placa de oro sin la película de nanotubos con la finalidad de comprobar el cambio físico de la superficie del electrodo.

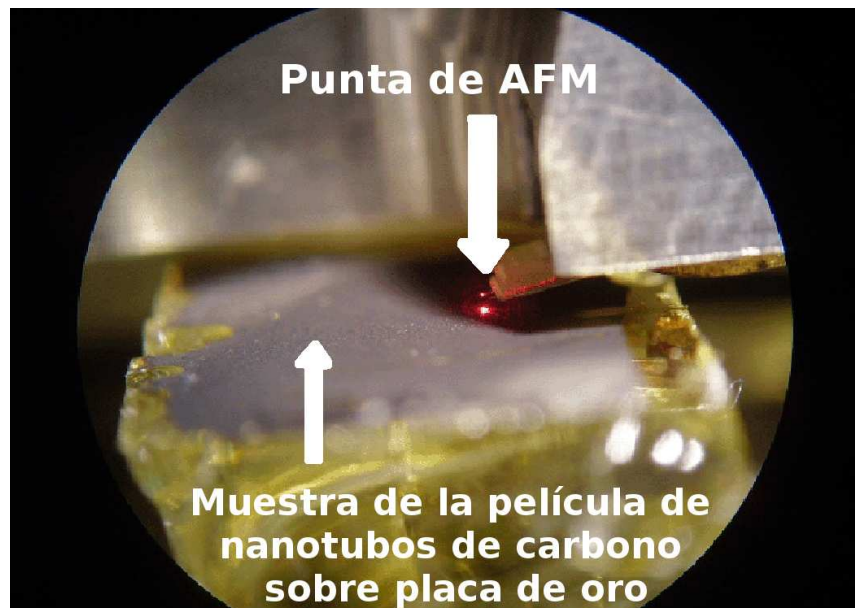


Figura 4.19: Caracterización de la superficie de la película de NTC sobre oro por AFM.

Por otra parte, se estudio también la superficie por SEM. En este tipo de microscopía se producen imágenes con alta resolución y profundidad de campo, lo que ofrece una perspectiva visual importante, además, no se ve afectado por la irregularidad de la superficie como la microscopía AFM; sin embargo, la información que se obtiene es bidimensional.

#### 4.1.3.3. Medición de resistencia de los electrodos

A continuación, se midió la resistencia eléctrica de los electrodos. Para esto fue necesario adherir alambre de plata con pintura conductiva como se hizo anteriormente (ver sección 4.1.1.3), pero ahora sobre la superficie de la película de nanotubos (Figura 4.20). La película de nanotubos es muy frágil, por lo tanto fue necesario tener extremo cuidado en su manejo.

Las pruebas eléctricas se realizaron de la misma forma en que se hicieron para las placas de oro (ver sección 4.1.1.5).

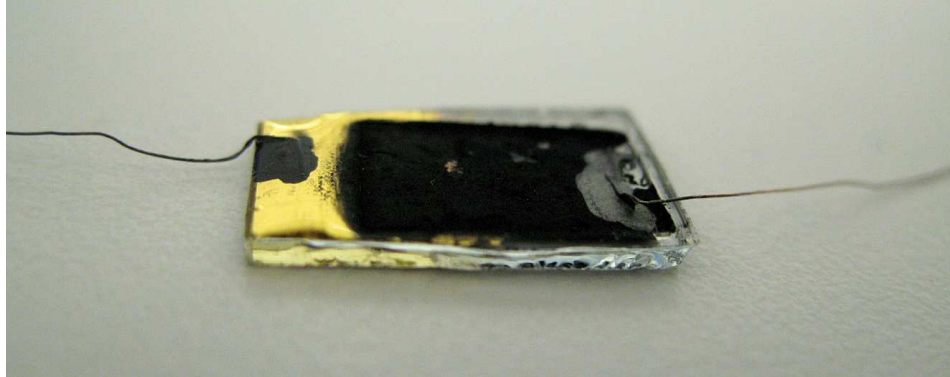


Figura 4.20: Adhesión de alambre de plata sobre película de NTC para pruebas eléctricas.

En la primer prueba, se midió la resistencia eléctrica con el multímetro digital, conectando una terminal de este en el extremo del alambre adherido al sustrato de oro y la otra en el extremo del alambre adherido a la película de nanotubos.

En la segunda prueba, se conectó el electrodo al equipo electrofisiológico conforme al siguiente diagrama de conexión y se aplicó el mismo protocolo de estimulación empleado con anterioridad (Figura 4.21).

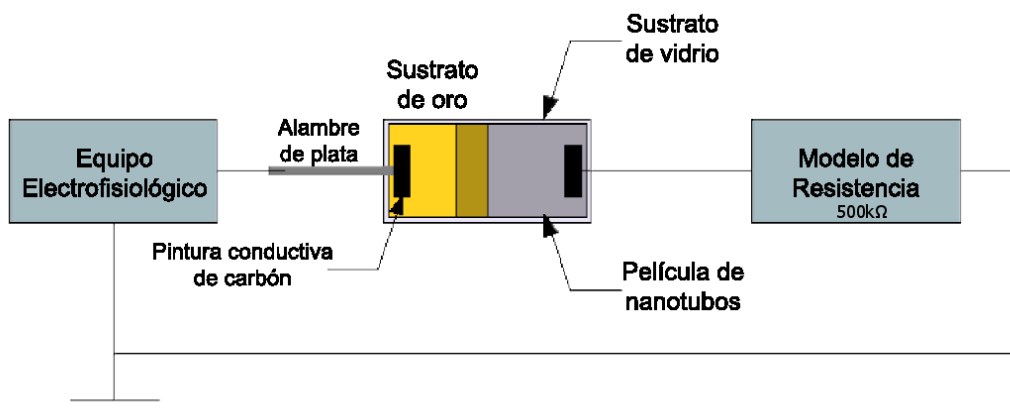


Figura 4.21: Esquema de la prueba de conductividad eléctrica en electrodos con la película de NTC.

#### **4.1.3.4. Esterilización de electrodos**

Como paso final en la construcción de los electrodos, fue necesario esterilizarlos para evitar contaminar el material celular cuando ambos elementos entraran en contacto. La esterilización por vapor, mata microorganismos mediante la destrucción de sus componentes metabólicos y estructurales esenciales para su reproducción, donde la coagulación de enzimas y el desbaratamiento de proteínas y lípidos son los eventos letales principales [68]. Siguiendo el mismo procedimiento para la esterilización del material (ver apéndice B.1), se esterilizan los electrodos.

Finalmente los electrodos se almacenaron en el área de material esterilizado dentro del cuarto de cultivos para su uso posterior.

## 4.2. Obtención de cultivo celular

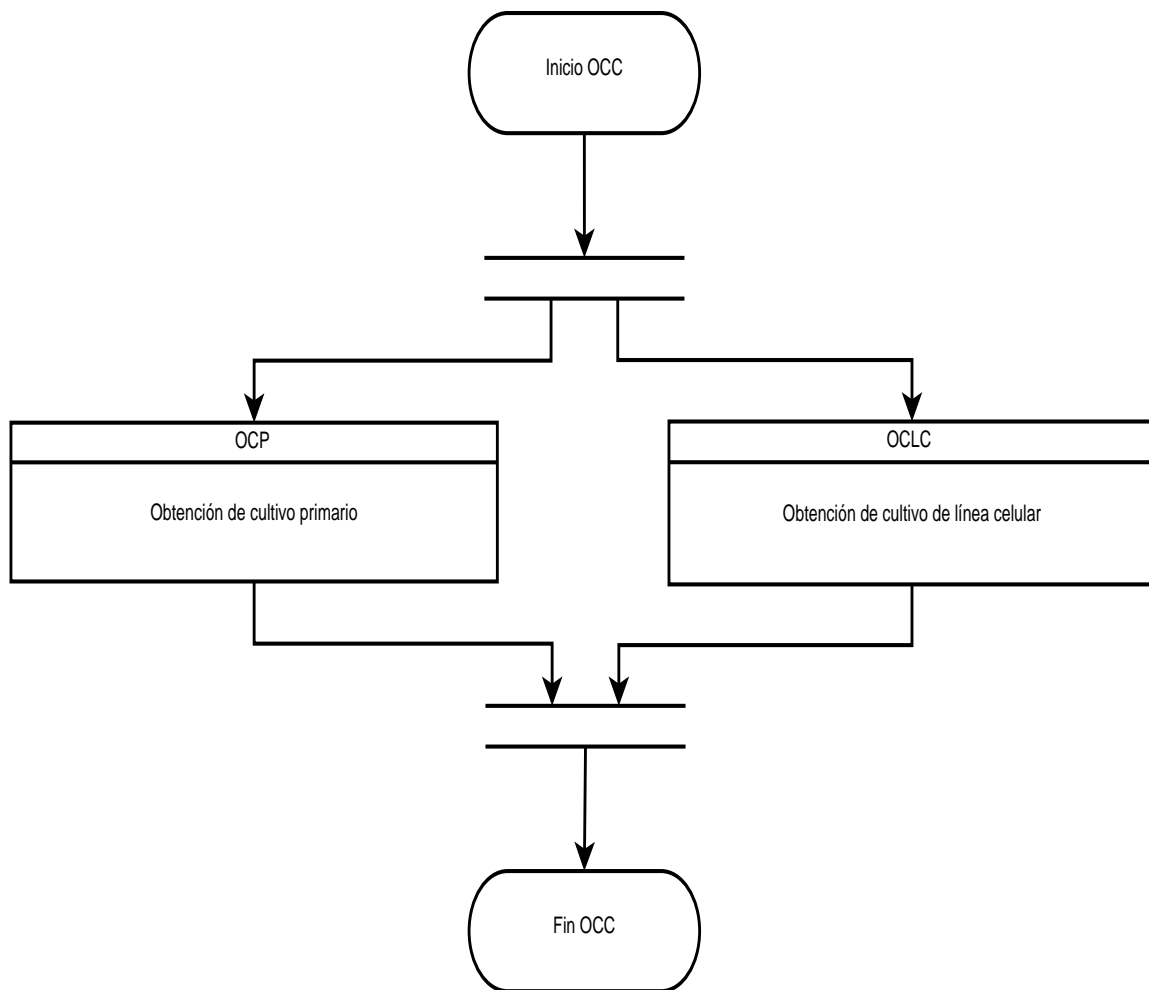


Figura 4.22: Diagrama de flujo de la obtención de cultivo celular.

La sección de cultivo celular describe el proceso desarrollado para la obtención de las células neuronales y su crecimiento sobre el electrodo construido.

Las células neuronales son complicadas de cultivar ya que requieren un ambiente propicio donde crecer, esto es, que cuenten con los nutrientes necesarios, sustratos óptimos donde adherirse y mantenerse libres de contaminación [64].

Se trabajó con células neuronales ya que el principal interés es la interacción tanto física como eléctrica de células del sistema nervioso en contacto con los nanotubos de carbono.

Previamente se debió haber realizado la asepsia del cuarto de cultivos (ver apéndice D.1) y comprobado que todo el material que se va a emplear en este experimento este esterilizado (ver apéndice D.3) para evitar contaminación en los cultivos.

Para este paso, se utilizaron dos tipos de células neuronales: células de cerebelo de rata provenientes de cultivo primario y células de feocromocitoma (glándula adrenal) de rata provenientes de la línea celular PC12. El cultivo de las células neuronales se realizó en los electrodos y en sus respectivos controles, esto ayudo para comparar los efectos de la película de nanotubos de carbón sobre el material celular en cuanto a la adhesión, proliferación, el desarrollo de procesos dendríticos y los registros electrofisiológicos.

Como paso final de esta etapa se observó mediante microscopía AFM y SEM la forma en la que las células neuronales de la línea celular PC12 crecieron sobre la superficie de la película de nanotubos de carbono en el electrodo.

### 4.2.1. Obtención de cultivo primario

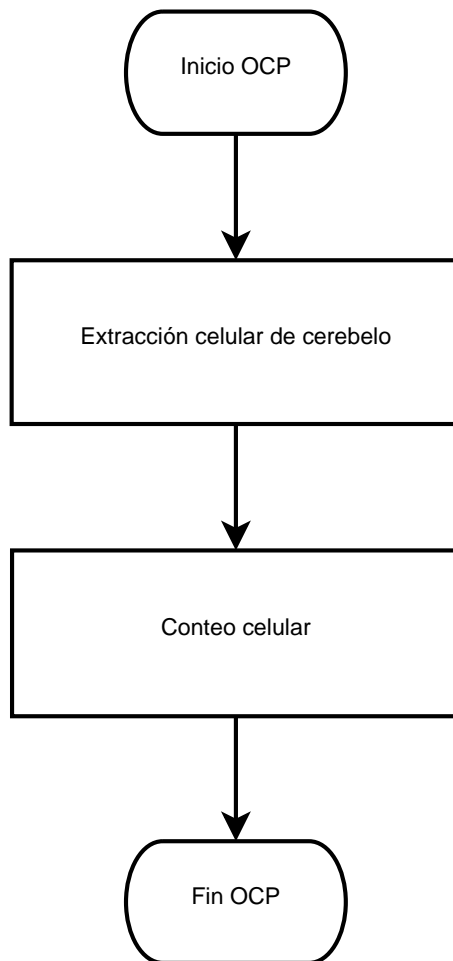


Figura 4.23: Diagrama de flujo de la obtención del cultivo primario.

El cultivo primario es donde el material celular se obtiene directamente de un tejido [69]. En este caso el material celular se obtuvo de Ratas Wistar de 7 a 8 días de nacidas. Es importante que las ratas tengan esta edad porque las neuronas se encuentran en fase de desarrollo y es más probable que la proliferación al cultivarlas sea mayor, también, su sistema óseo no es demasiado rígido y la disección menos problemática.

Las células que se utilizaron en este experimento, fueron células neuronales de cerebelo y, no se clasificó el tipo neuronal. Se trabajó sin antibióticos o antimicóticos para comprobar que la película de nanotubos o los materiales empleados así como su manejo no introducían contaminación al sistema.

El material de vidrio empleado en esta parte fue previamente siliconizado (ver apéndice D.4) para evitar que el material celular se quedara adherido al vidrio y tener un mayor número de células en el cultivo.

#### **4.2.1.1. Extracción celular de cerebelo**

En la extracción celular del cerebelo, se decapitó la rata, se removió la piel de la cabeza y se cortó la parte superior del cráneo. A continuación, se extrajo el cerebro junto con el cerebelo teniendo cuidado de cortar las terminaciones que los unan con otras partes internas. Enseguida, se separó el cerebelo del cerebro y se colocó en una caja de Petri con solución de Hank's con seroalbúmina bovina (HBSS) (ver apéndice G.1).

Dentro de la caja, se cortó finamente el tejido y se hicieron 3 cambios/lavados de HBSS. El tejido seccionado se transfirió a un matraz Erlenmayer (25 ml) y se agregó 10 ml de tripsina al 0.025 % en HBSS (ver apéndice G.4). Esta mezcla se colocó en un agitador magnético con calentamiento por 15 minutos a una temperatura de  $\approx 37$  °C con el fin de tener una mejor separación del material celular en el tejido. La solución HBSS



además de limpiar el tejido, es un medio que contiene los nutrientes adecuados para que el material celular se mantenga vivo por hasta 4 horas [69] mientras que la tripsina es una enzima que ayuda a disgregar el material celular.

La suspensión obtenida se filtró en un embudo con tela de organza vertiendo su contenido en un tubo para centrífuga y adicionando 5 ml de medio de cultivo (ver apéndice G.2) para detener el efecto de la tripsina. Se centrifugó por 5 minutos a 200 g (medida de aceleración).

Al finalizar el centrifugado, en la parte inferior del tubo se formó una capa de material blanca que es el botón celular. A continuación, se removió el líquido que quedó sobre ella (sobrenadante), se agregaron 2 ml del medio de cultivo y se resuspendieron las células.

Con el proceso descrito, se consiguió la suspensión de material celular neuronal para depositarlo tanto en los electrodos como en sus controles respectivos.

#### **4.2.1.2. Conteo celular**

Antes de hacer el depósito del material celular sobre los controles y los electrodos, se realizó el conteo celular para conocer la concentración celular. Para realizar el conteo, fue necesario extraer 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de material celular y verterla en un tubo Eppendorf que tuviera 900  $\mu\text{l}$  de azul de tripano (dilución 1:10) (ver apéndice G.3).

Para hacer el conteo, se utilizó una cámara de Neubauer o hemocitómetro. Esta cámara es un instrumento que se encuentra grabado con un cuadrícu- lado en su superficie. Ubicados en las esquinas, se tienen unos cuadrantes como se observa en la figura siguiente (Figura 4.24).

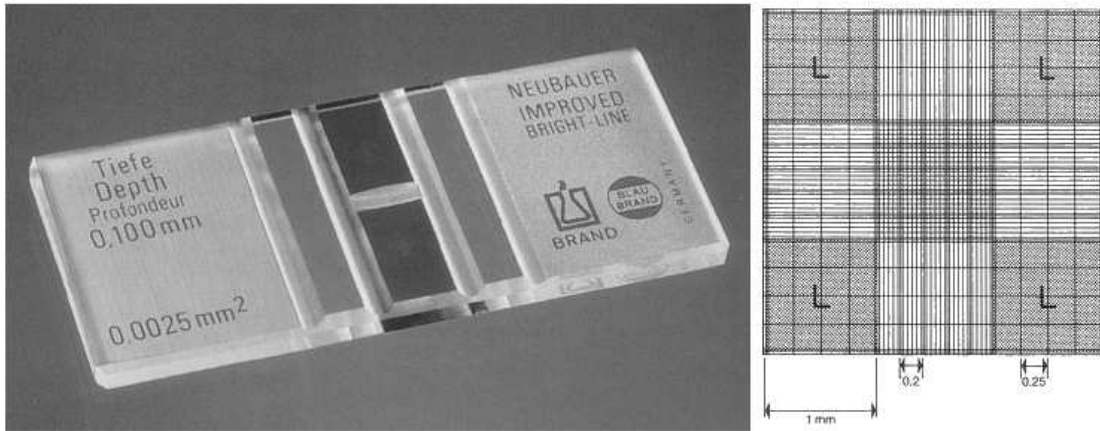


Figura 4.24: Cámara de Neubauer.

Se tomó un volumen suficiente de la suspensión para cubrir los cuadrantes y se dejó reposar por 1 minuto para hacer el conteo. En estos cuadrantes se contó el número total de células dentro en ellos con ayuda del microscopio óptico invertido. Las células que se observaron azules y como explotadas, se consideraron como células muertas; generalmente se ven más grandes que las células vivas. Las células vivas contadas fueron aquellas que se observaron como una pequeña esfera blanca. Al finalizar el conteo, se efectuó la siguiente operación para determinar la concentración celular:

$$C = N \times 1E4 \times \text{Factor de dilución} \quad (4.1)$$

**C** concentración de células (cel/ml)

**N** número de células contadas

El conteo por hemocitómetro es un método sencillo y común de conteo que da la oportunidad de observar lo que se esta contando. Sin embargo, es relativamente lento y susceptible a errores. La ecuación utilizada, toma en cuenta las características geométricas de la cámara para calcular la concentración celular [69].

### 4.2.2. Obtención de cultivo de línea celular

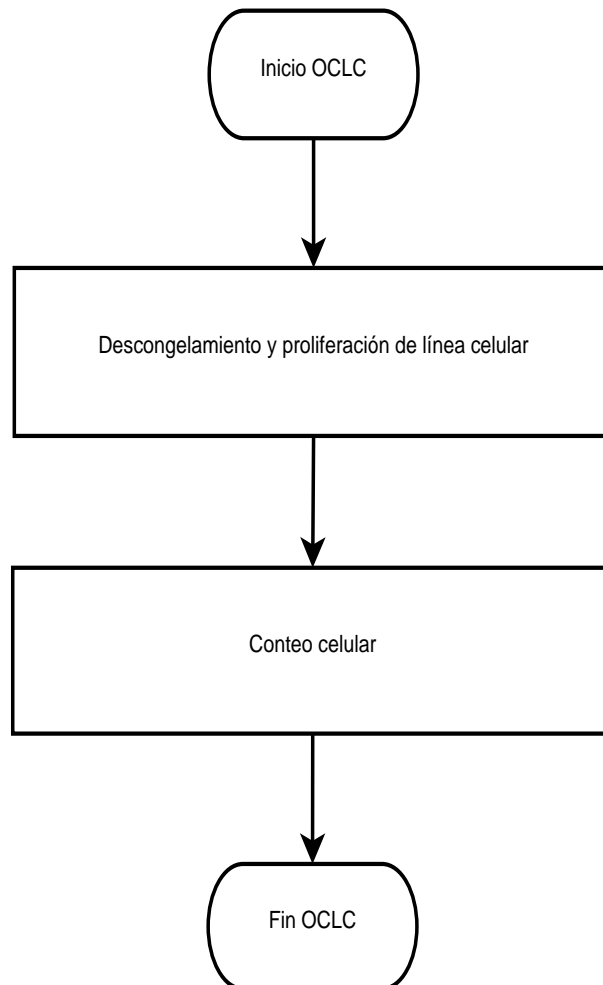


Figura 4.25: Diagrama de flujo de la obtención de cultivo de línea celular.

La línea celular tiene la ventaja de ser homogénea, esto es, que no existe ningún otro tipo celular en la población, puede ser propagada una mayor cantidad de veces y en general es más resistente que las células obtenidas por cultivo primario [69].

Para este experimento se empleó la línea celular PC12 que es derivada del feocromocitoma (glándula adrenal) de rata y es empleada con éxito como modelo para estudiar las propiedades de células neuronales. Sin embargo, para lograr este efecto es necesario agregar “factor de crecimiento neuronal”. Las células PC12, inhiben su división en presencia del factor de crecimiento y desarrollan procesos dendríticos [70].

Antes de utilizar esta línea, se debe dejar que prolifere hasta tener una población neuronal suficiente. Después de sembrarlas sobre los electrodos y los controles, es necesario hacer que éstas se diferencien a neuronas mediante la aplicación del factor de crecimiento neuronal.

Nuevamente, el material empleado fue esterilizado para evitar posibles contaminaciones por microorganismos. Esta línea se trabajó con antibióticos.

#### **4.2.2.1. Descongelación y proliferación de línea celular**

Las células adquiridas fueron almacenadas en nitrógeno líquido para mantenerlas congeladas mientras eran utilizadas. Previo a su descongelamiento es necesario preparar el medio de cultivo específico para esta línea (ver apéndice G.8).

Se extrajo un vial que contiene el material celular del recipiente de nitrógeno y se dejó descongelar a temperatura ambiente. En un tubo para centrífuga se agregaron 5 ml de medio de cultivo y posteriormente el material celular descongelado.

A continuación, se centrifugo la suspensión a 300 g (medida de aceleración) por 3 minutos. Al finalizar, se observó el botón celular en el fondo del tubo. Se removió el sobrenadante y se agregaron 5 ml de medio de cultivo fresco resuspendiendo nuevamente el material celular. Este procedimiento sirvió para remover las sustancias con las se congelaron las células. Finalmente el material celular se transfirió a una caja Petri agregando 3 ml más de medio de cultivo y se introdujo a la incubadora a una temperatura de 37 °C y 5 % de  $CO_2$ .

A un día de estar en la incubadora se cambió el medio de cultivo por medio fresco, después el cambio se hizo cada dos días y se monitoreo su crecimiento por aproximadamente 2 semanas.

Esperando que en ese periodo de tiempo se alcanzará la confluencia celular de 1 caja, se despegó el material celular que creció y se traspasó una parte de esta población a otra caja de cultivo agregando 5 ml de medio de cultivo fresco. Este paso se repitió hasta tener una población celular suficiente para trabajar.

#### 4.2.2.2. Conteo celular

En esta ocasión, se dejó proliferar el material celular hasta la caja 8 y 9, es decir, los pases 8 y 9. Se despegaron las células de estas cajas y se vertieron en un tubo de ensaye para su uso posterior.

El conteo celular se realizó de la misma forma que en la sección 4.2.1.2 antes de sembrarlas tanto en los controles como en los electrodos (Figura 4.26).

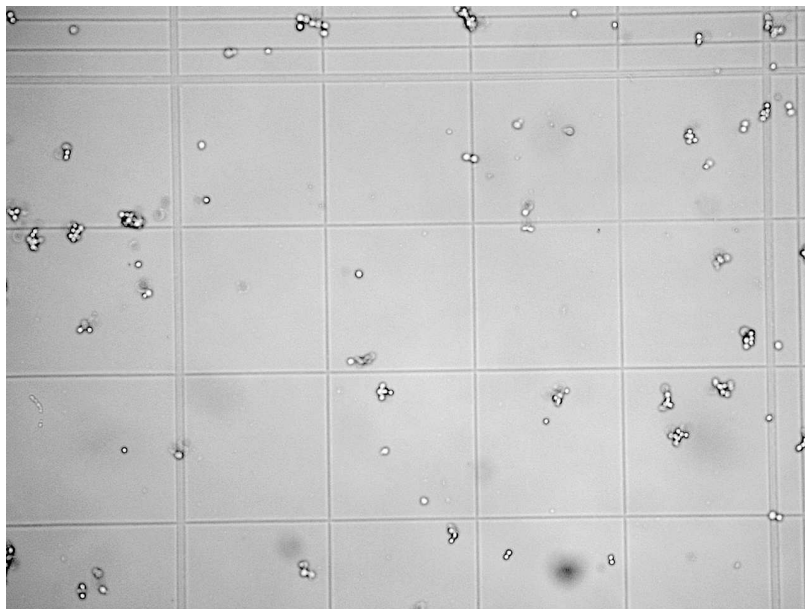


Figura 4.26: Conteo de células PC12 en cámara de Neubauer.

### 4.3. Cultivo celular en controles y electrodos

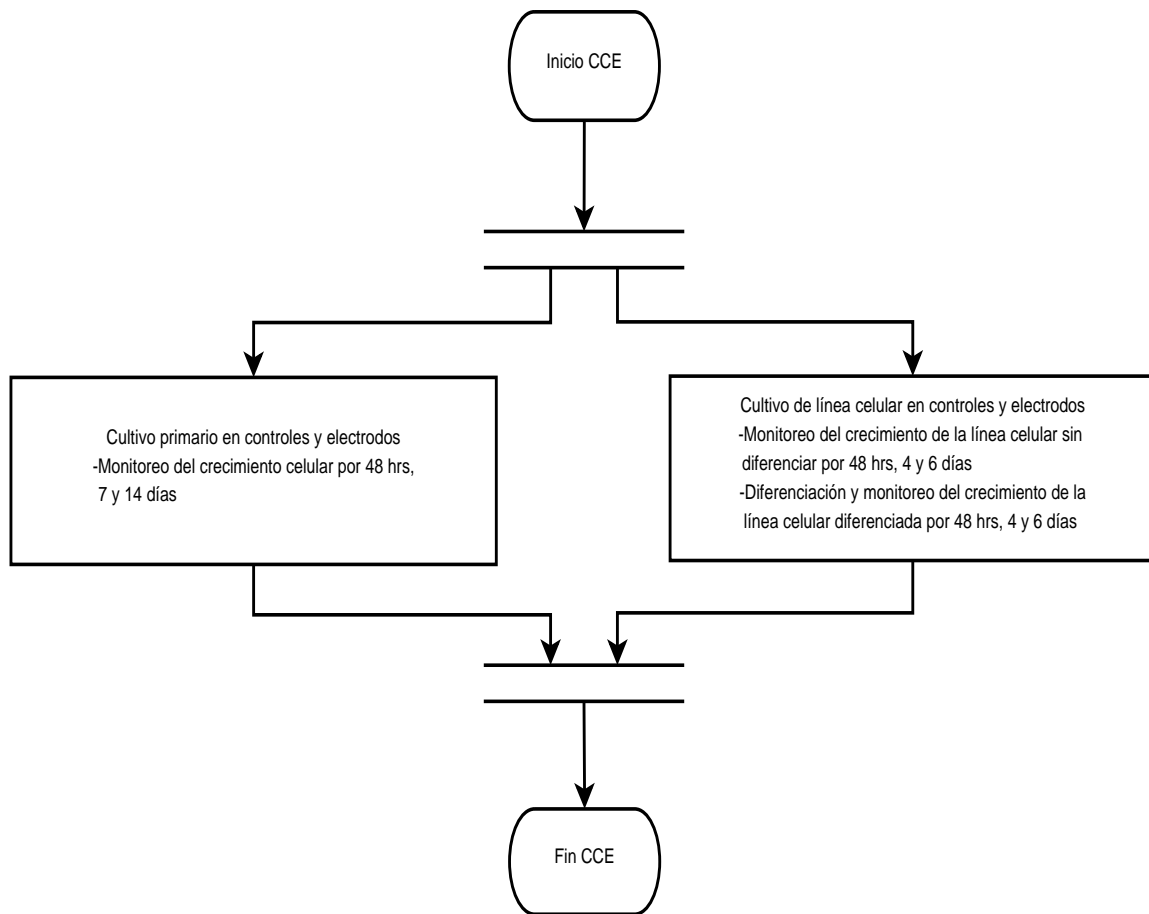


Figura 4.27: Diagrama de flujo del cultivo celular en controles y electrodos.

#### 4.3.0.3. Cultivo primario en controles y electrodos

En este paso, se sembró el material celular sobre los electrodos contru-  
idos así como en sus respectivos controles. Los electrodos que se emplearon  
en este paso fueron los que se construyeron con la película de nanotubos de  
carbono sobre el sustrato de oro.

Antes de extraer el material celular y sembrarlo sobre los electrodos,  
estos fueron introducidos en cajas Petri con medio de cultivo cubriendo  
por completo la superficie electrodo, enseguida se metieron a la incubadora  
a una temperatura de 37 °C y a una concentración del 5 % de  $CO_2$  (ver  
apéndice B.2) por 24 horas.

Así, se ajusto la temperatura del sistema y el medio de cultivo entró en  
contacto con la película de nanotubos en el electrodo. Algunas moléculas  
del medio se depositaron sobre la superficie de la película haciéndola más  
hidrofílica, esto ayuda a que el material celular tenga mayores posibilidades  
de anclarse sobre la superficie [53].

Una vez que se obtuvo el material celular, se extrajeron los electrodos de  
la incubadora y se les cambió el medio de cultivo por medio fresco (cuya  
temperatura fue previamente ajustada a 37 °C). Se extrajeron 10  $\mu$ l de sus-  
pensión celular y se depositaron sobre el electrodo, después se tomó otra  
cantidad igual y se depositó en el control. Se repitió esta operación hasta  
haber sembrado el material celular sobre todos los electrodos y controles  
preparados.

Los electrodos y los controles se incubaron a 37 °C y 5 % de  $CO_2$ . A  
los 2 días se les cambió el medio de cultivo por medio fresco, adicionando  
10  $\mu$ l de citosina-arabinósido para detener el crecimiento de células no neu-  
ronales. Se dejó incubar por 24 horas y se les cambió nuevamente el medio  
de cultivo. Así, las preparaciones se incubaron cambiando el medio de cul-



tivo 3 veces por semana por aproximadamente 2 ó 3 semanas dependiendo del crecimiento que se iba observando (Figura 4.28).

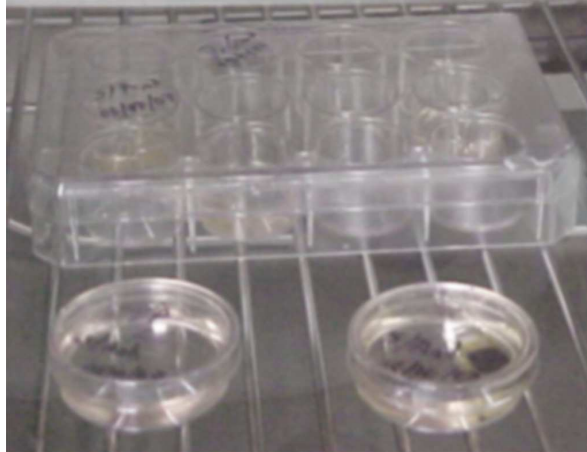


Figura 4.28: Control y electrodo en incubadora.

Se fué monitoreando el crecimiento de las células neuronales cada que se les cambiaba el medio de cultivo en el sistema de adquisición de imágenes instalado (Figura 4.29).



Figura 4.29: Monitoreo de crecimiento celular en controles y electrodos con microscopio óptico.

#### 4.3.0.4. Cultivo de línea celular en controles y electrodos

En este paso, se sembró el material celular sobre los electrodos construidos así como en sus respectivos controles. Los electrodos que se emplearon

en este paso, son los que se construyeron con la película de nanotubos de carbono sobre el sustrato de oro/vidrio; estos electrodos permiten observar mejor el material celular sobre la película durante el monitoreo del crecimiento y el registro electrofisiológico.

El cultivo se realizó de la misma forma que para las células de cultivo primario (ver sección 4.3.0.3), pero en este caso, se hizo un paso extra de diferenciación.

El material celular se sembró en controles y en electrodos. Se seleccionaron algunos sobre los que se hizo la diferenciación mientras que el resto continuó sin diferenciar. La diferenciación es el proceso mediante el cual se hace que las células PC12, comiencen a desarrollar procesos dendríticos, es decir, que exista un crecimiento tanto de dendritas como de axones. Para esto fue necesario aplicar el factor de crecimiento neuronal.

Se sembraron las células en las cajas (controles y electrodos) elegidas para la diferenciación y se mantuvieron en ellas por dos días para favorecer el anclaje de las células al sustrato. Para iniciar la diferenciación, en los siguientes cambios de medio se agregaron  $50 \frac{ng}{ml}$  de factor de crecimiento neuronal durante dos semanas.

## 4.4. Registro electrofisiológico

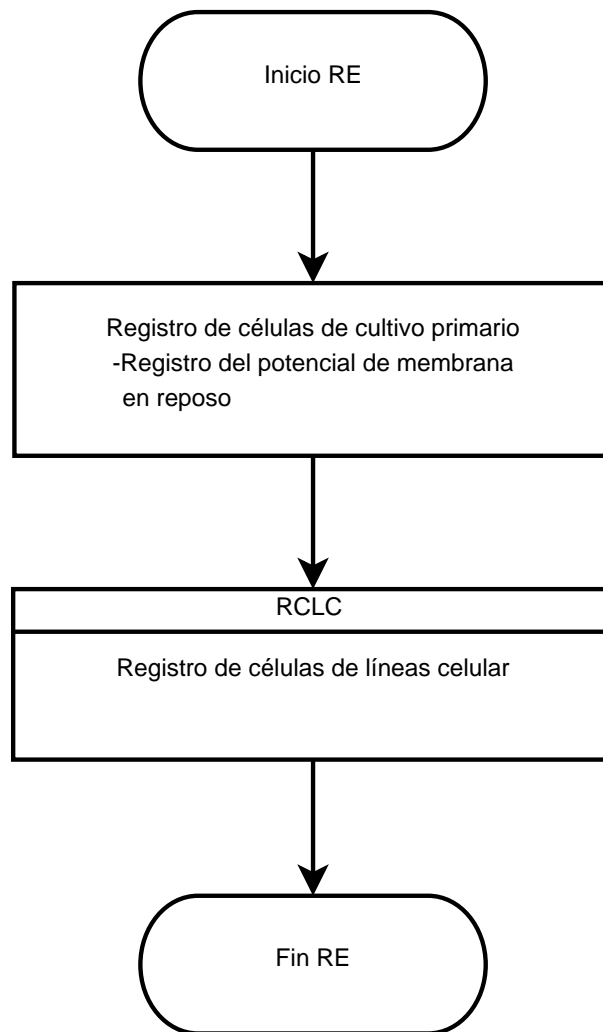


Figura 4.30: Diagrama de flujo del registro electrofisiológico.

Esta etapa del proyecto fue el registro electrofisiológico del material celular sembrado en los electrodos y sus controles correspondientes empleando las técnicas de registro intracelular y extracelular. La primera técnica, sirve para registrar la actividad eléctrica celular a través de la membrana, es decir, en el interior de la célula [71], mientras que la segunda técnica registra la actividad eléctrica de la misma en el espacio extracelular en lugar de a través de la membrana [5].

Antes de iniciar el experimento, se prepararon soluciones intracelulares, extracelulares y micropipetas que se utilizan junto con el equipo de electrofisiología para hacer los registros. Las micropipetas rellenas con solución intracelular, ofrecen una vez introducidas en la solución extracelular una cierta magnitud de resistencia. Esa resistencia para los siguientes experimentos estuvo en el intervalo de 2 a 4 M $\Omega$ .

Previamente, se programaron los protocolos de registro que fueron aplicados al material celular así como las conexiones eléctricas necesarias para la obtención de la señal eléctrica a través del electrodo construido. En adelante, no fue necesario conservar la esterilidad de los materiales pues una vez extraídas las cajas Petri de la incubadora, estas no se volvieron a guardar.

Se hicieron los registros electrofisiológicos de las células neuronales de cerebelo (cultivo primario), de las células PC12 (la línea celular) y finalmente, el registro extracelular de este último tipo de células mediante el electrodo construido para ese fin. Una vez adquiridos los registros, se procesaron mediante el software “Clampfit” para su posterior análisis.

#### **4.4.1. Registro de células de cultivo primario**

En el caso del registro electrofisiológico de las células de cultivo primario, se obtuvieron los potenciales de reposo de membrana de las células que se encontraban en los controles, creciendo alrededor y algunas visi-

bles sobre los electrodos preparados para este cultivo. Este registro, también ayudó a comprobar que las células se encontraban vivas sobre el sustrato.

Se extrajo de la incubadora un electrodo o su control y se removió el medio de cultivo. A continuación, se vertió con cuidado y sobre las paredes de la caja Petri la solución extracelular (ver apéndice G.6) que ha sido previamente calentada en baño térmico a 37°C, la homogeneización de temperaturas fue para evitar que el choque térmico ocasionara la muerte celular inmediata. Posteriormente, se trasladaron las muestras al equipo electrofisiología para efectuar los registros (Figura 4.31).

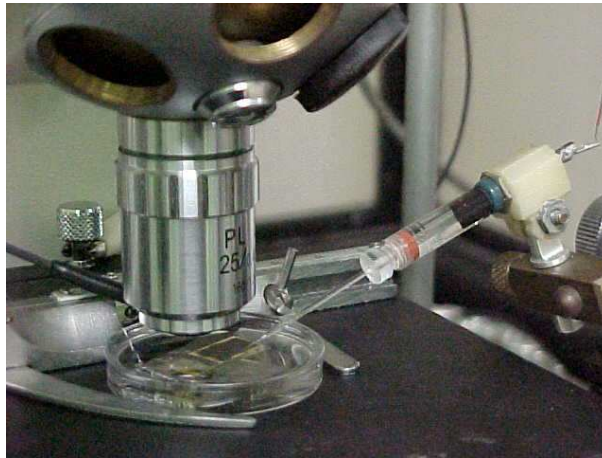


Figura 4.31: Registro electrofisiológico de cultivo primario con la técnica de “Patch Clamp”.

En el equipo, se ajustó el campo visual con el microscopio y la iluminación externa de manera que se pudieran observar las células que estuvieran en la superficie de la película de nanotubos. Con la micropipeta rellena de solución intracelular (ver apéndice G.5), se pinchó una célula. Para obtener registros adecuados de esta técnica, es necesario que entre la pipeta y la membrana celular, se forme un buen sello para evitar corrientes de fuga y el exceso de ruido en las mediciones [71]. Enseguida, se obtuvo el potencial de membrana y se aplicaron los protocolos de registro. A las señales adquiridas, se les aplicó un filtrado y se midió el potencial de reposo de membrana para posteriormente hacer un análisis estadístico descriptivo (media, desviación estándar, mediana) de los datos obtenidos de las células registradas.

#### 4.4.2. Registro de células de línea celular

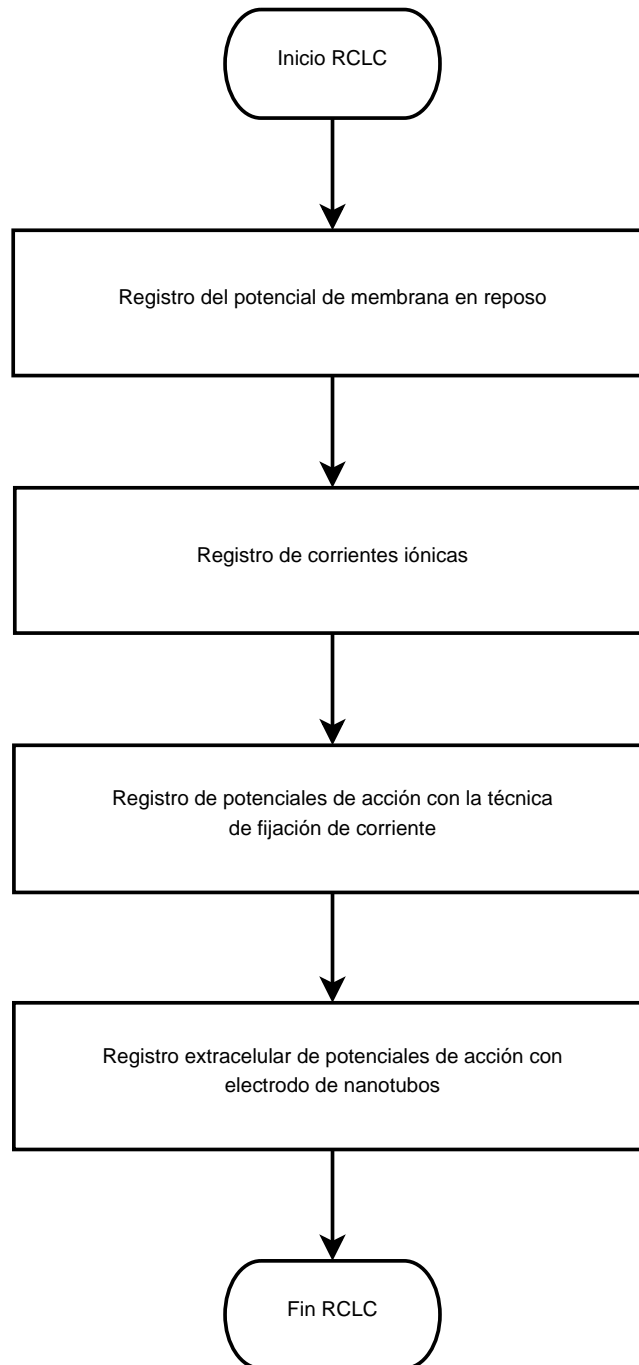


Figura 4.32: Diagrama de flujo del registro de células de línea celular.

El caso de registro de la línea celular, fue similar al desarrollado para el cultivo primario, la diferencia fue que el electrodo construido para este experimento permitió visualizar de mejor forma las células que crecieron sobre la película de nanotubos. También, la solución extracelular que se empleó en este caso fue un poco diferente (ver apéndice G.7), esto para cumplir con los protocolos de registro encontrados en la literatura [70], [72].

En este estudio, se registraron las células diferenciadas tanto en los controles como sobre los electrodos. Además del potencial de reposo de membrana se adquirieron corrientes iónicas y potenciales de acción evocados.

En este caso, se pinchó la célula y se registró el potencial de membrana en reposo. Los registros fueron filtrados, se midió el potencial de membrana en reposo y posteriormente se hizo un análisis estadístico descriptivo (media, desviación estándar, mediana) de los datos.

#### **4.4.2.1. Registro de corriente iónicas**

A continuación, con la célula pinchada se empleó la técnica de registro intracelular en el modo de fijación de voltaje (ver apéndice F.4) para observar el comportamiento de las corriente iónicas de la membrana celular sobre el electrodo. Se aplicó el siguiente protocolo de estimulación:

- Voltaje de fijación -70 mV.
- Inyección de 10 pulsos de voltaje con una duración de 10 ms, y una amplitud inicial de 10 mV con incrementos de esta misma magnitud.
- Inyección de 10 pulsos de voltaje con una duración de 50 ms, y una amplitud inicial de 10 mV con incrementos de esta misma magnitud.

A las señales adquiridas (con el uso del software “Clampfit”), se les realizó un procesamiento que consistió en un filtrado, remoción de la línea basal y de las corrientes capacitivas. Del estado estable de dichas señales, se obtuvo la curva de corriente-voltaje que fue empleada para construir la curva de conductancia de la membrana celular.

#### **4.4.2.2. Registro de potenciales de acción con la técnica de fijación de corriente**

En el siguiente experimento se estimuló al material celular para obtener como respuesta un potencial de acción evocado. Empleando micropipetas de la misma resistencia que en los experimentos anteriores (2 a 4 M $\Omega$ ) y la técnica de fijación de corriente (ver apéndice F.3), se inyectó un pulso de corriente para observar el comportamiento eléctrico del potencial de la membrana celular. El protocolo de estimulación fue:

- Inyección de 1 pulso de corriente con una duración de 200  $\mu$ s, y una amplitud de 7 nA.

A las señales adquiridas (con el uso del software “Clampfit”), se les aplicó un filtrado y se hizo un análisis del curso temporal de la respuesta obtenida de las células registradas.

#### **4.4.2.3. Registro extracelular de la respuesta eléctrica neuronal a través del electrodo de nanotubos**

Para el registro extracelular mediante el electrodo, fue necesario agregar un amplificador de a.c. de acuerdo al siguiente al esquema (Figura 4.33), que permitiera observar la respuesta de la célula a la señal que se le aplicó ya que la amplitud del potencial extracelular es muy pequeña.



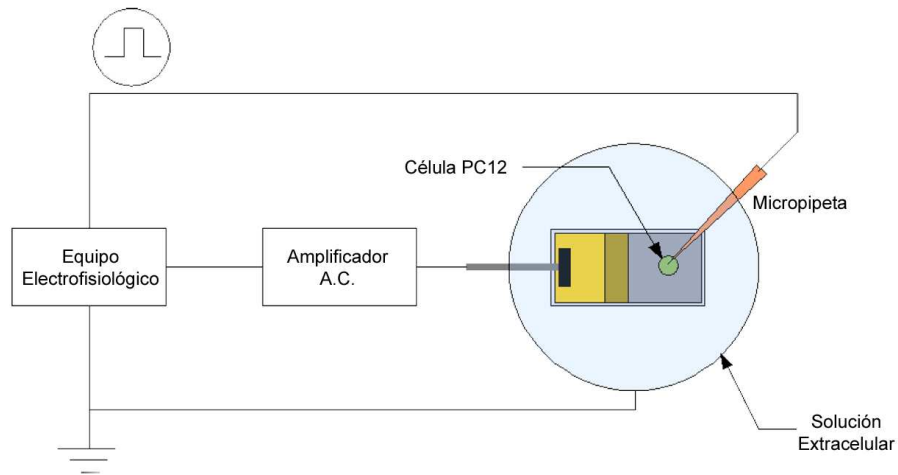


Figura 4.33: Esquema del registro extracelular de las células PC12 mediante el electrodo.

El amplificador se ajustó con una ganancia de 1000 y una frecuencia de corte de 20 kHz. En este caso, se aplicó el mismo protocolo de estimulación que en la sección anterior (ver sección 4.4.2.2) con la micropipeta directamente sobre el material celular y, se registró la respuesta por el alambre de plata conectado a un segundo canal de adquisición en el equipo electrofisiológico (Figura 4.34). Los pulsos tuvieron una duración de 200 y 1000 ms.

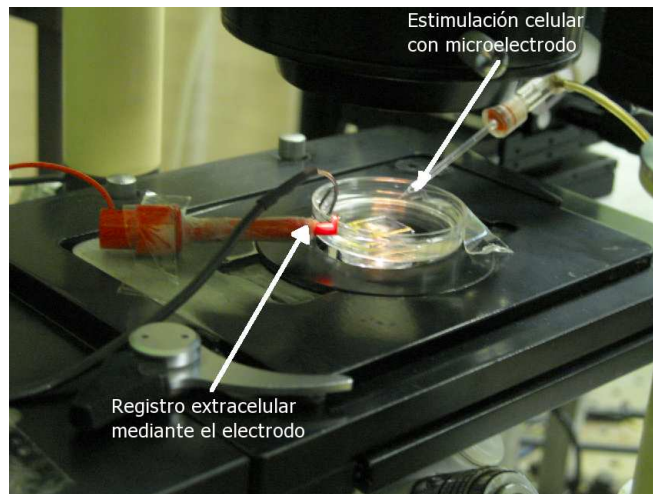


Figura 4.34: Registro extracelular de las células PC12 mediante el electrodo.

De igual forma, las señales adquiridas se procesaron aplicándoles un filtrado y se hizo un análisis del curso temporal de la respuesta obtenida.

## 4.5. Visualización de AFM y SEM del crecimiento neuronal

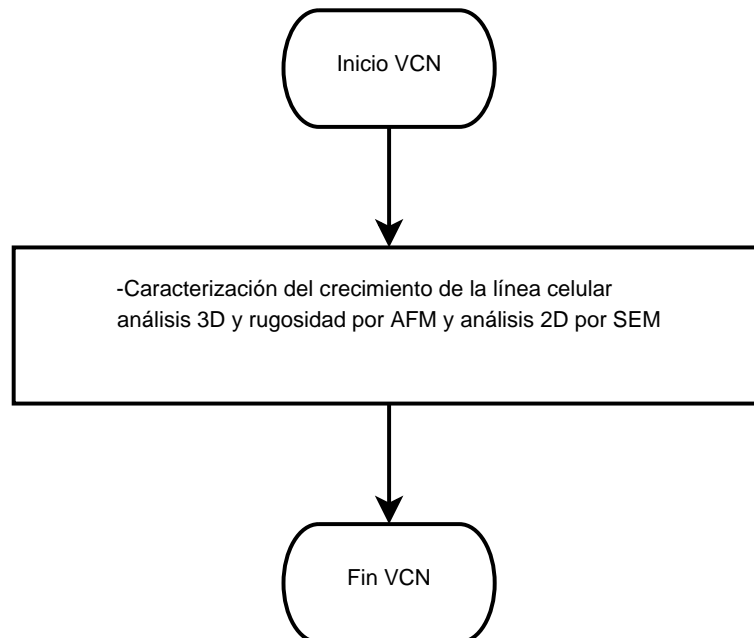


Figura 4.35: Diagrama de flujo de visualización de AFM y SEM del crecimiento neuronal.

Una vez diferenciadas las células PC12 por aproximadamente dos semanas, se tomaron imágenes del material celular crecido en los controles y en los electrodos para visualizar la forma en que las células se adhirieron a la película de nanotubos de carbono en el electrodo. Las imágenes se adquirieron mediante AFM y SEM. La microscopía AFM revela el crecimiento tridimensional del material celular sobre la película de nanotubos de carbono, mientras que la microscopía SEM muestra una imagen bidimensional pero con mayor campo visual del crecimiento celular sobre la superficie.

Para poder observar el material celular bajo este tipo de microscopios, fue necesario fijar el material celular sobre el sustrato. En la fijación celular, se detienen los procesos vitales de las células y se conservan en un estado lo mas parecido posible en morfología y composición química al estado vivo [73].

Inicialmente, se removió con cuidado el medio de cultivo de las cajas donde se sembró el material celular (en el control y el electrodo). A continuación, se llenó la caja nuevamente con una solución de alcohol al 30 % y se mantuvo la solución por 3 minutos, después, se extrajo nuevamente el contenido para reemplazarlo por una solución de alcohol al 40 % y se mantuvo por otros 3 minutos en la caja. Se repitió la misma operación con soluciones al 50, 60, 70, 80, 90 y 99 %. Al llegar al 99 %, se tapó la caja y se selló con parafilm, dejándola así por 12 horas. Transcurrido este tiempo, se removió la solución restante y se dejó secar completamente. Este proceso permite fijar el material celular al sustrato.

Ya seco, se tomó el control o el electrodo y se montó en el microscopio AFM. Las imágenes de la superficie de la célula en contacto con la película de nanotubos se obtienen en modo oscilante (ver apéndice E.2).

Finalmente para obtener las imágenes por SEM, fue necesario hacer que la muestra fuera conductiva, por lo que la superficie se recubrió con una finísima capa de oro (aproximadamente 10 Å), en este caso, se recubrió tanto al material celular como a la película de nanotubos. Una vez hecho esto, fue posible montar las muestras en el microscopio SEM.

## Capítulo 5

---

# Resultados

---

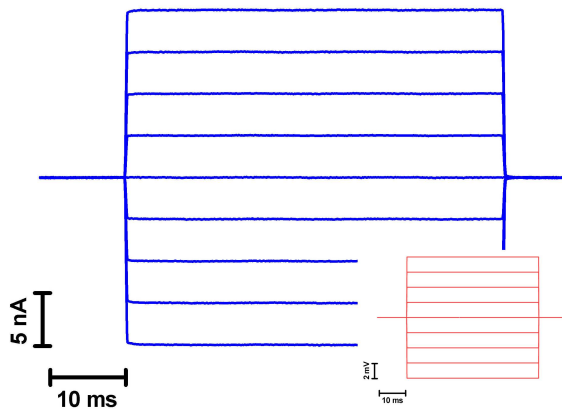
A continuación se presentan los resultados obtenidos en cada etapa del proyecto comenzando por el diseño y la construcción de los electrodos, la etapa de cultivo celular y finalmente los resultados obtenidos de los registros electrofisiológicos.

### 5.1. Diseño y construcción de electrodos

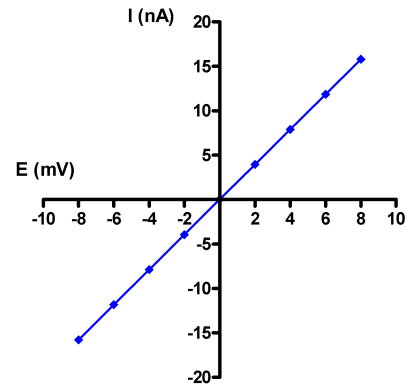
#### 5.1.1. Pruebas eléctricas en placas de oro

La medición de la resistencia eléctrica realizada con el multímetro digital a las placas de oro preparadas sin la película de nanotubos de carbón, fue de  $1.1 \Omega$ .

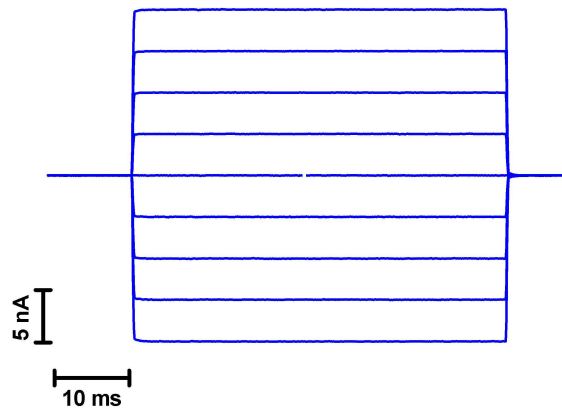
Por otra parte, las señales de respuesta de este sistema a los estímulos de voltaje aplicados, adquiridas mediante el equipo electrofisiológico, así como sus respectivas gráficas de corriente-voltaje obtenidas a partir del estímulo y la respuesta son mostrados a continuación (Figura 5.1):



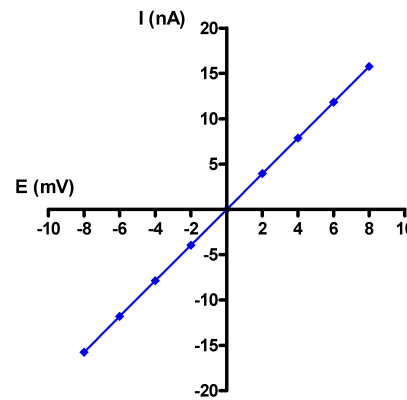
(a) Señal de corriente adquirida del modelo de resistencia de  $500\text{ k}\Omega$  (pulsos de voltaje aplicados en rojo)



(b) Gráfico corriente-voltaje del modelo de resistencia



(c) Señal de corriente adquirida del modelo de resistencia de  $500\text{ k}\Omega$  con la placa de oro conectada



(d) Gráfico corriente-voltaje del modelo de resistencia más la placa de oro

Figura 5.1: Gráficas de la señales adquiridas de las pruebas eléctricas en las placas de oro con el equipo de electrofisiología Axopatch 200A, empleando la técnica de fijación de fijación de voltaje. En (5.1b), (5.1d), se observa que se esta agregando únicamente un componente resistivo al sistema ya que la linealidad de la gráfica corriente-voltaje del modelo de resistencia con la placa conectada respecto al del modelo de resistencia solo, no se ve modificada. La pendiente, no cambia porque el valor resistivo que aporta el electrodo es muy bajo comparado con el del modelo de resistencia.

En las gráficas de la figura 5.1 se observa que al conectar la placa de oro, se esta agregando únicamente un componente resistivo al sistema ya que la linealidad de la gráfica corriente-voltaje del modelo de resistencia con la placa conectada respecto al del modelo de resistencia solo, no se ve modificada. La pendiente, es decir, la resistencia no cambia porque el valor resistivo que aporta el electrodo es muy baja comparada con la del modelo de resistencia.

Los resultados de los análisis elaborados a las curvas de corriente-voltaje anteriores para obtener el valor de la resistencia exacta del modelo de resistencia y el de la conexión entre este y la placa de oro construida, se muestran en la tabla 5.1.

Tabla 5.1: Valores de resistencia calculados a partir de las curvas corriente-voltaje.

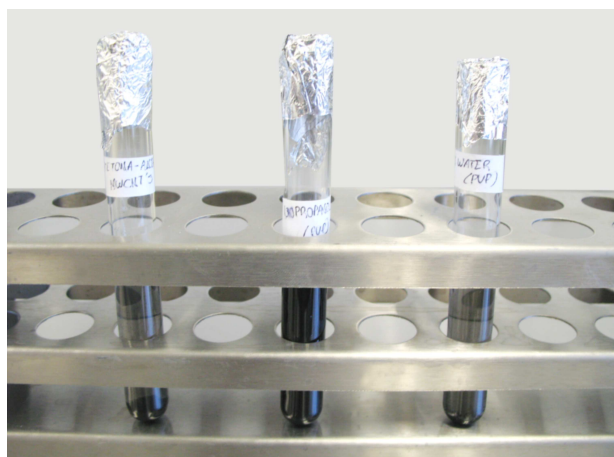
Experimento	Resistencia
Modelo de resistencia	506.56 k $\Omega$
Modelo de resistencia conectado a la placa de oro	507.75 k $\Omega$

Así, con este protocolo de experimentación, la resistencia que presentó la placa de oro preparada con sus conexiones eléctricas se obtuvo de la diferencia entre el modelo de resistencia conectada a la placa de oro y el modelo de resistencia solo, siendo esta de 1.19 k $\Omega$ .

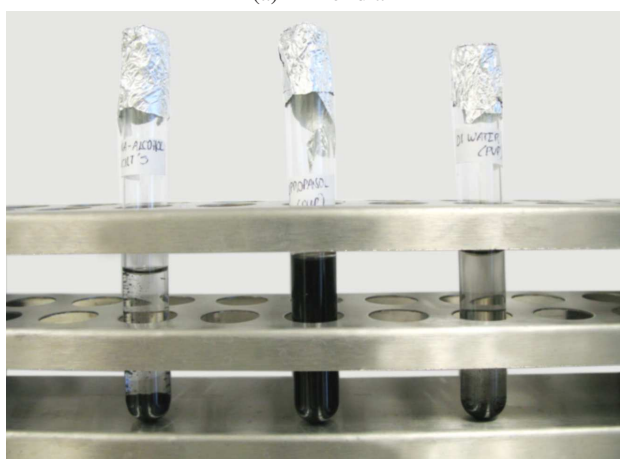
### 5.1.2. Pruebas de dispersión

A cinco días de su preparación, se pudo comprobar visualmente cual de las suspensiones mantuvo por mas tiempo los nanotubos dispersos. De izquierda a derecha, se muestran la suspensiones formadas a base de: acetona-alcohol etílico, PVP y  $H_2O$  (Figura 5.2).

En la suspensión elaborada a base de acetona-alcohol etílico se pudieron ver pequeños conglomerados de nanotubos flotando en ella, además de una mayor sedimentación de los nanotubos de carbono respecto al resto de las suspensiones. Por otra parte, la suspensión elaborada con PVP se mantuvo uniforme y no se observó sedimentación o conglomerados de nanotubos. Finalmente, en la suspensión elaborada a base de  $H_2O$  se encontraron pequeños conglomerados de nanotubos dentro del volumen del líquido así como una sedimentación menor que en la suspensión preparada con acetona-alcohol etílico. La solución PVP mantuvo dispersos por mas tiempo los nanotubos de carbono. Las suspensiones tienen la misma concentración de NTC.



(a) Primer día

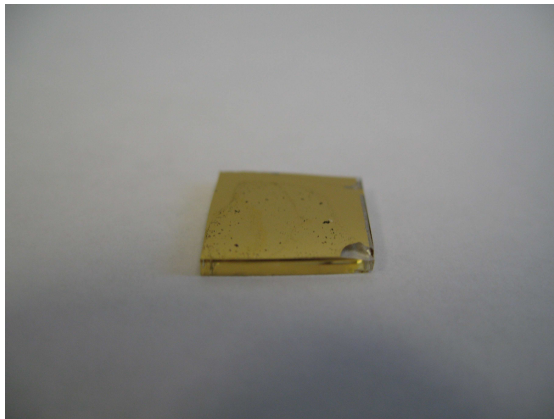


(b) Quinto día

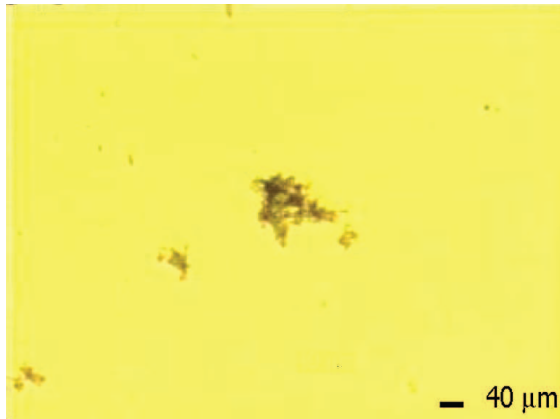
Figura 5.2: Dispersión de los NTC en soluciones; de izquierda a derecha, acetona-alcohol etílico, PVP y  $H_2O$ , por un periodo de 5 días. En (5.2b), se observa la sedimentación y pequeños conglomerados de los NTC, en dos de las soluciones trabajadas, la solución de PVP los mantuvo dispersos por mas tiempo. Las suspensiones tienen la misma concentración de NTC.

En la siguiente prueba, al depositar  $1 \mu\text{l}$  de las distintas suspensiones sobre las placas de oro, fue posible observar también de manera visual su comportamiento sobre la superficie y como se distribuyeron los nanotubos de carbono sobre el sustrato de metálico (Figura 5.3).

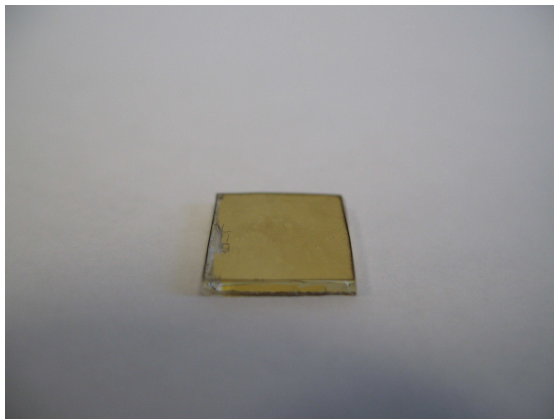




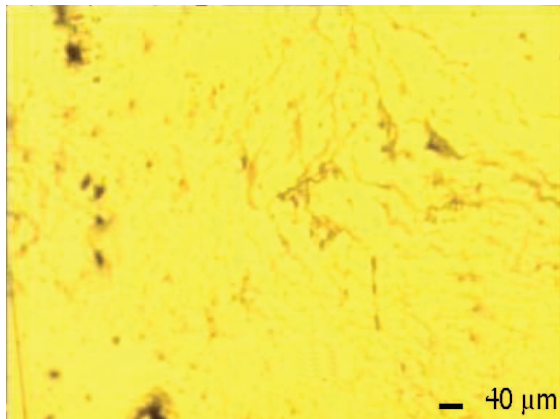
(a) Suspensión de NTC acetona-alcohol etílico



(b) Distribución de los NTC en la suspensión acetona-alcohol sobre la placa de oro



(c) Suspensión de NTC PVP



(d) Distribución de los NTC en la suspensión PVP sobre la placa de oro

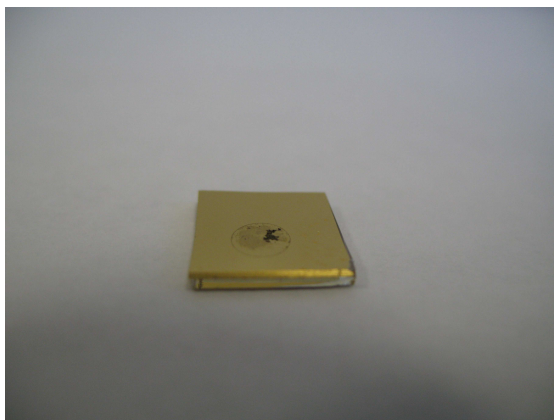
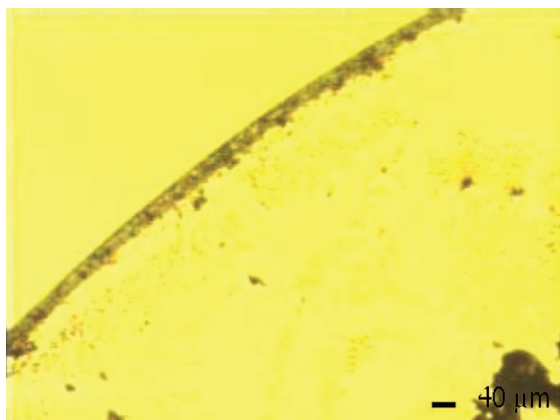
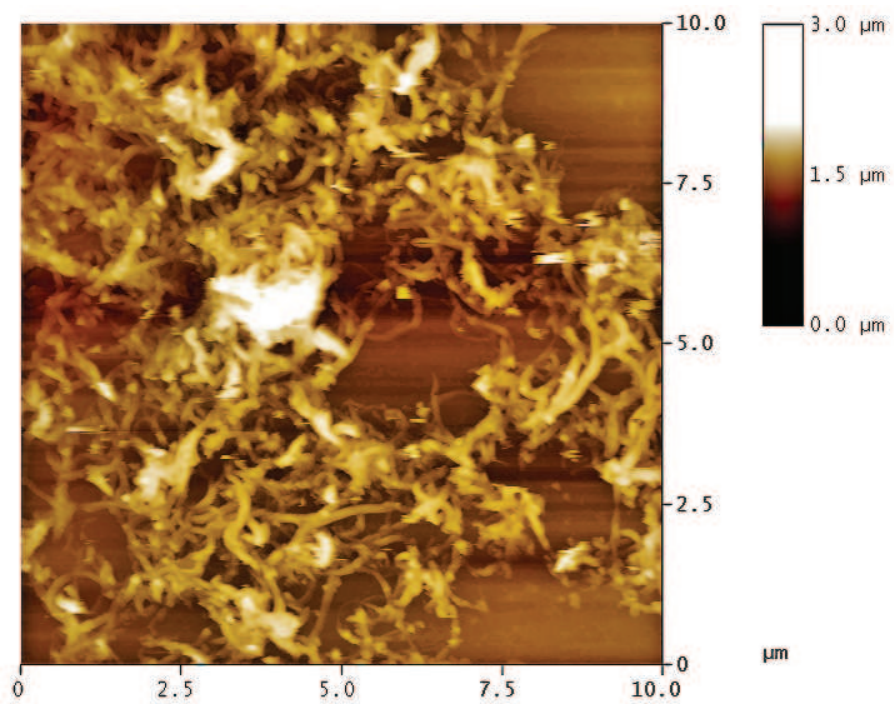
(e) Suspensión de NTC  $H_2O$ (f) Distribución de los NTC en la suspensión  $H_2O$  sobre la placa de oro

Figura 5.3: Deposito de  $1 \mu\text{l}$  de las distintas suspensiones de NTC sobre placas de oro. En un acercamiento es posible observar la distribución de los NTC. En (5.3a), (5.3b), se distribuyó sobre casi el total de la superficie de la placa formando conglomerados de gran tamaño. En (5.3c), (5.3d), se tuvo una mejor distribución del material sobre el total de la superficie, formando conglomerados de mucho menor tamaño. En (5.3e), (5.3f), la distribución de los NTC sobre el sustrato ocurrió sólo dentro de la región donde la gota fue aplicada y con los conglomerados más grandes.

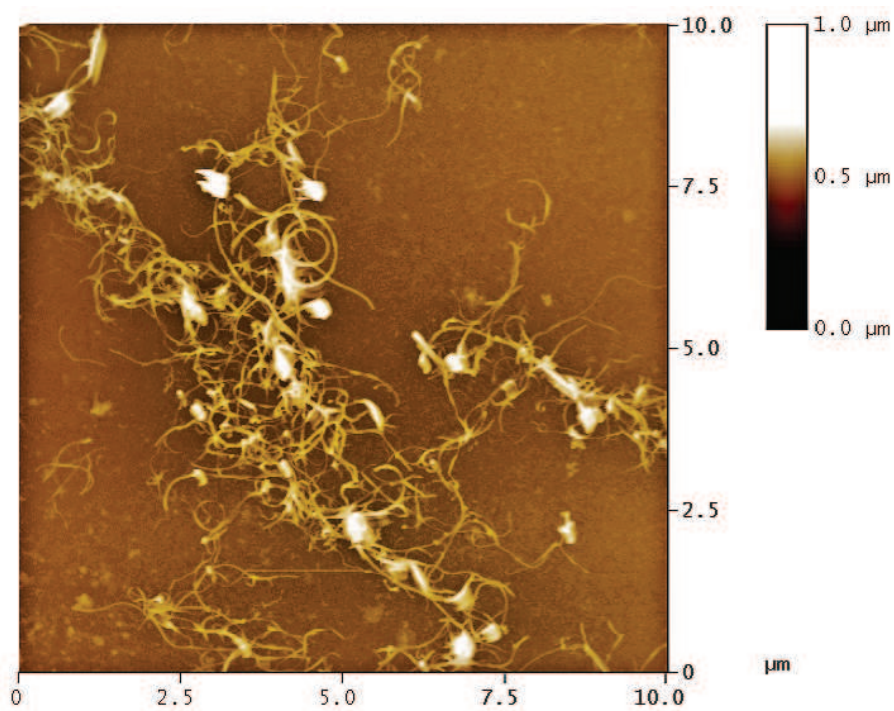
La suspensión de nanotubos en acetona-alcohol etílico, se distribuyó sobre casi el total de la superficie de la placa formando conglomerados de gran tamaño en diversas partes del sustrato (Figuras 5.3a, 5.3b). Para la suspensión de nanotubos en PVP, se tuvo una mejor distribución del material sobre el total de la superficie, en ocasiones formando conglomerados de mucho menor tamaño que en la placa anterior (Figuras 5.3c, 5.3d). La última suspensión, al tener agua como uno de sus constituyentes, reacciona de manera hidrofóbica con la superficie de oro y no se obtuvo una distribución adecuada del material, en este caso, la distribución de los nanotubos sobre el sustrato ocurrió solo dentro de la región donde la gota fue aplicada y con conglomerados de mucho mayor tamaño (Figuras 5.3e, 5.3f).

Finalmente, empleando microscopía AFM en modo oscilante, se hizo una inspección más detallada (a nivel nanométrico) del acomodo de los nanotubos de carbono sobre las placas de oro. En las figuras, se puede observar el área de barrido, la altura relativa que alcanza el material en el depósito pero principalmente la forma y distribución que adoptan los nanotubos de carbono sobre el sustrato de oro en aplicaciones de  $1 \mu\text{l}$  (Figura 5.4).

En la placa donde se depositaron los nanotubos que se encontraban en la suspensión de acetona-alcohol etílico, se tuvieron conglomerados distribuidos sobre toda el área de barrido, donde no fue posible observar con claridad nanotubos definidos, en lugar de esto, se observaron paquetes de nanotubos que no estaban bien dispersos y que además se encontraban fragmentados (Figura 5.4a). En la suspensión de nanotubos de PVP, los nanotubos formaron conglomerados de mucho menor tamaño donde fue posible observar los nanotubos individuales distribuidos sobre el área de barrido formando una red donde estos no mantuvieron una orientación definida ni una estructura rígida, en general presentaron un cierto grado de flexibilidad (Figura 5.4b). Para el material de la suspensión de agua depositado, no se mostraron conglomerados en esta área, ya que estos son demasiado grandes y la superficie no se puede visualizar de manera correcta con el equipo, así que se

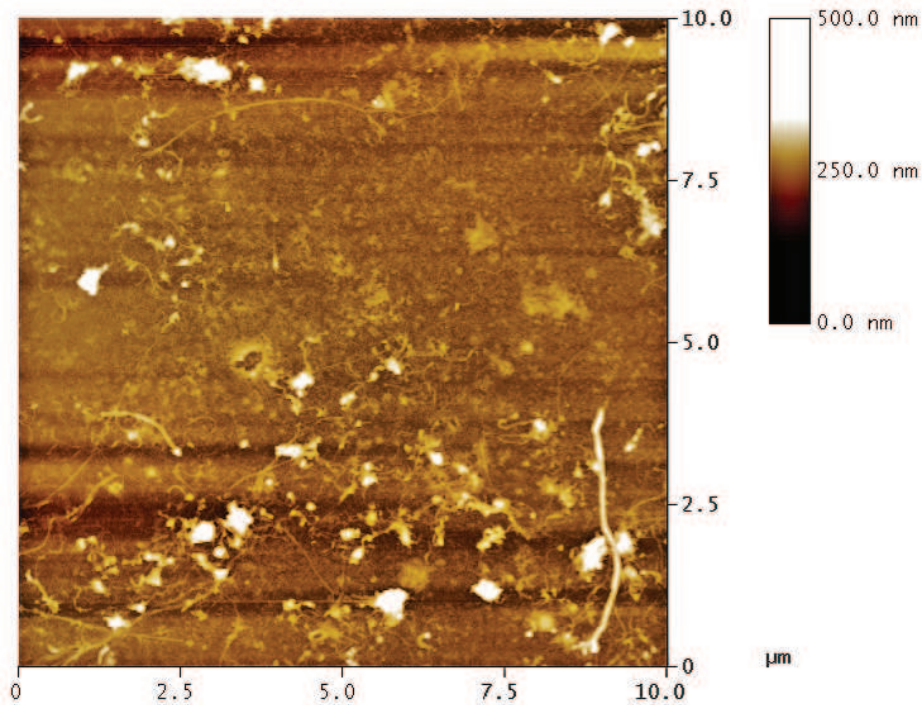


(a) NTC contenidos en la solución de acetona-alcohol etílico sobre oro, a escala nanométrica con AFM



(b) NTC contenidos en la solución de PVP, se identifican NTC individuales





(c) NTC contenidos en la solución de  $H_2O$

Figura 5.4: Imágenes AFM obtenidas con el microscopio Nanoscope III Multimode en modo oscilante de la distribución de NTC sobre placas de oro una vez evaporada la suspensión. Área de barrido  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ . En (5.4a), se tuvieron conglomerados distribuidos sobre toda el área de barrido y no fue posible observar con claridad NTC definidos. En (5.4b), los NTC formaron conglomerados de mucho menor tamaño y fue posible observarlos de forma individual distribuidos sobre el área de barrido formando una red. Para (5.4c), no se mostraron conglomerados en esta área, ya que son demasiado grandes y la superficie no se puede visualizar de manera correcta con el equipo.

tomó una zona lo más libre de la acumulación del material. En este caso, se tuvieron nanotubos individuales que; sin embargo, no se distribuyeron uniformemente sobre toda el área (Figura 5.4c).

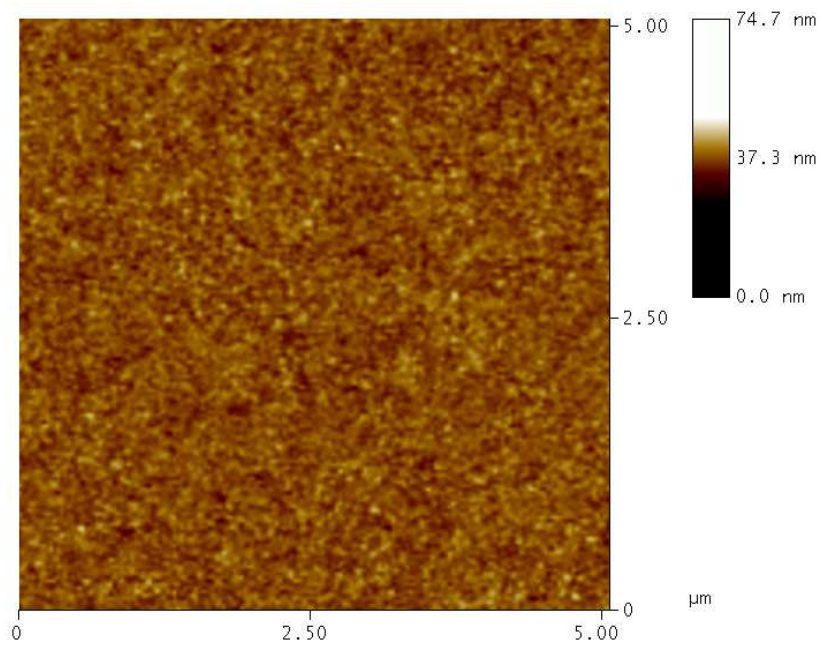
### 5.1.3. Caracterización de la superficie del electrodo

El estudio de la superficie del electrodo por medio de AFM da una perspectiva tridimensional de cómo se formó la película de nanotubos sobre la superficie de la placa, mostrando a nivel nanométrico el lugar donde se ad-

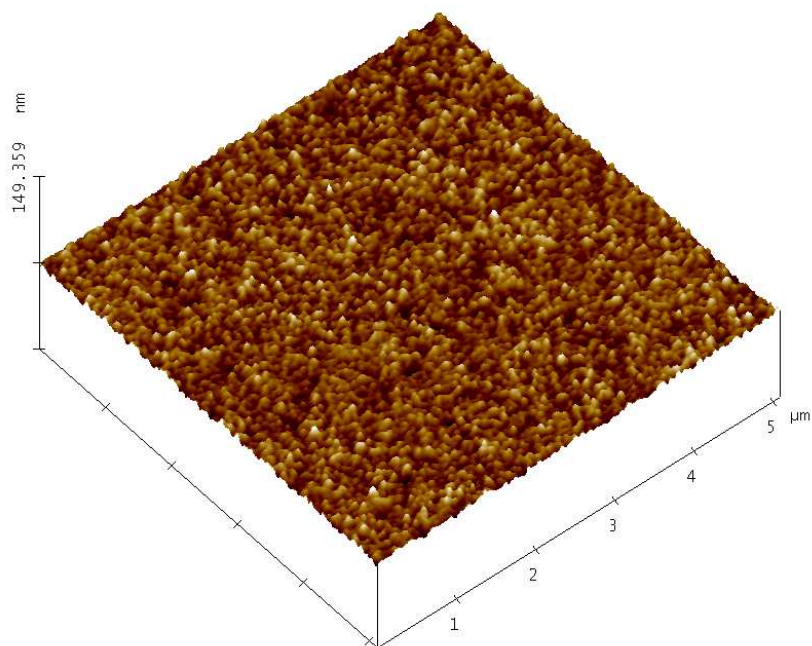
hirió la célula neuronal. Mediante esta técnica es posible observar en el área de barrido: la altura relativa que alcanza el material en la película, un perfil tridimensional del área que muestra la forma y distribución que adoptan los nanotubos de carbono, un análisis de sección transversal de la película sobre el sustrato y un análisis de rugosidad de superficie. Se observa la formación de la película sobre la placa de oro y sobre la placa de oro/vidrio, recordando que esta última, cuenta con una menor cantidad de aplicaciones de la suspensión. Además, se muestra la superficie de la placa de oro sin la película de nanotubos en un área de  $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ . Se muestra a continuación, la forma en la que los nanotubos se fueron depositando sobre el electrodo construido en la placa de oro, en este caso se observó un área de  $4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$  debido a que la irregularidad de la superficie y las limitaciones del instrumento no permitían barrer un área mayor. La siguiente superficie se barre un área de  $8 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$  en el electrodo construido sobre la placa de oro/vidrio (Figura 5.5).

Las imágenes de la placa muestran que el oro se encuentra sobre la superficie a manera de pequeños granos (Figura 5.5a), donde aún cuando su tamaño no es muy grande, se observa que existe irregularidad a nivel nanométrico en la distribución de estos sobre la superficie de la placa (Figura 5.5b). Tal irregularidad, se visualiza y cuantifica con el análisis de sección y rugosidad del área en cuestión (Figura 5.5c). Se tienen granos con alturas de 2 nm a 4 nm y una rugosidad media de 1.3 nm.

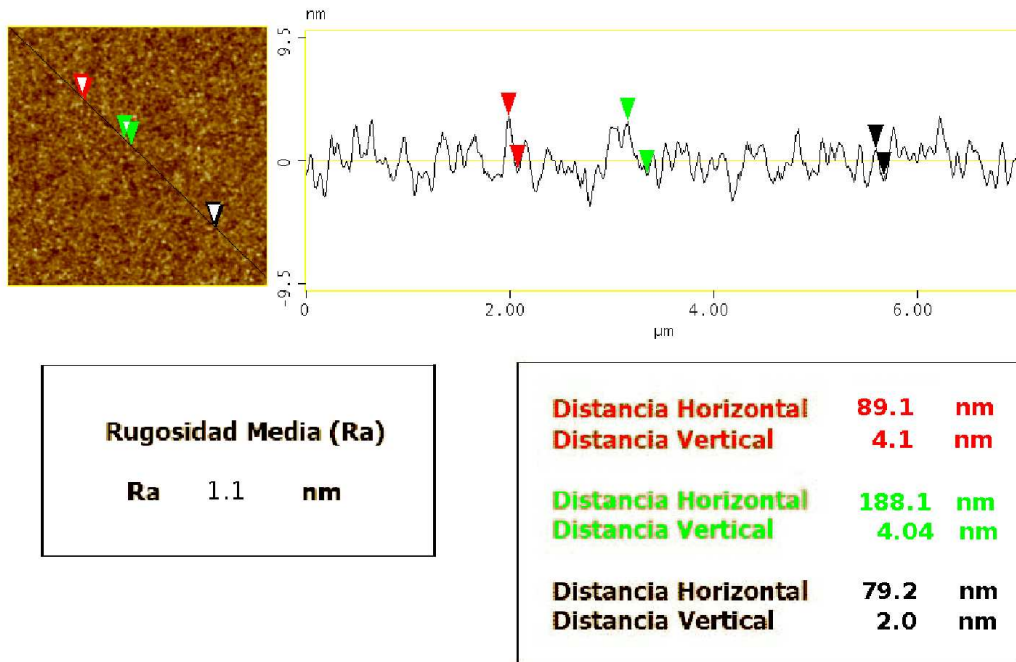
En la película construida sobre la placa de oro, los nanotubos se entrelazaron formando una red bastante compleja sin una orientación definida (Figura 5.5d). La película de nanotubos construida, está en contacto directo con el sustrato metálico y como puede verse en la figura 5.5e, los nanotubos están acomodados unos sobre otros, lo cual asegura el contacto entre ellos, en esta pequeña área se obtuvo una superficie rugosa con diferencia de altura entre el punto más bajo hasta el más alto de hasta  $1 \mu\text{m}$ . Al hacer el análisis de sección, fue posible observar una gran variación de alturas,



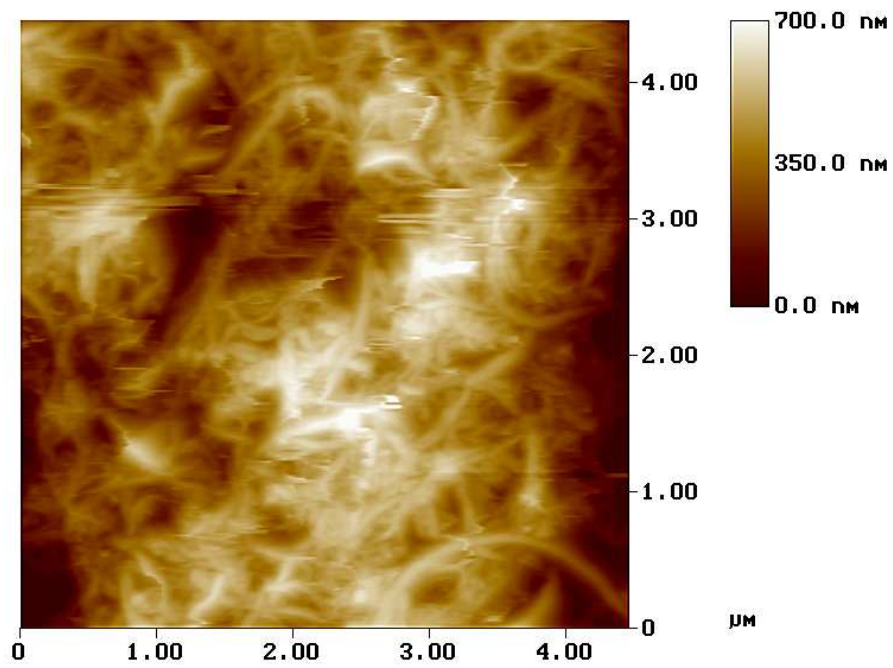
(a) Placa de oro Au(111) con AFM



(b) Superficie 3D de la placa de oro Au(111)

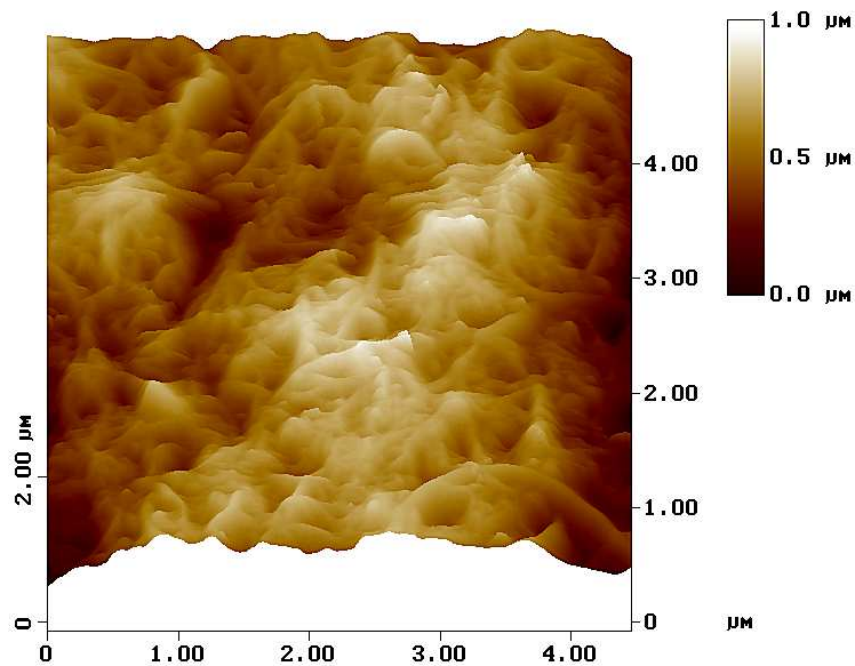


(c) Análisis de sección y rugosidad de la placa de oro Au(111)

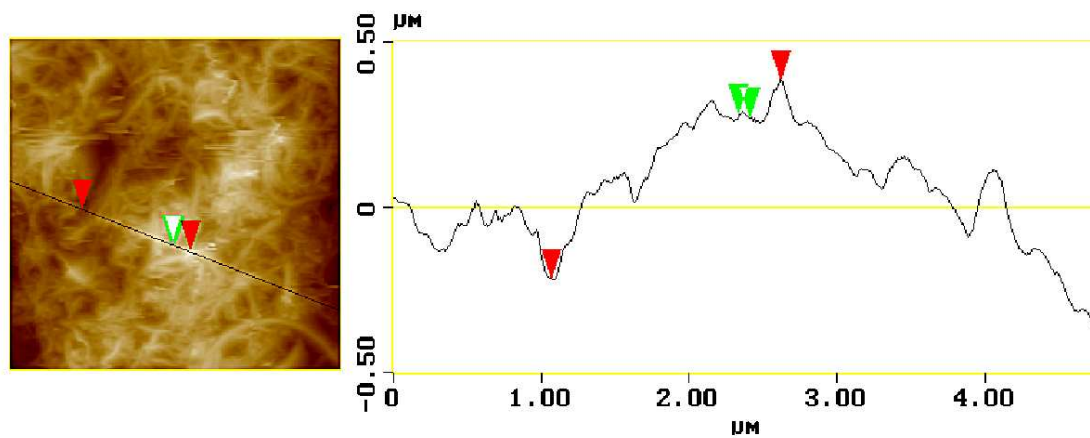


(d) Película de NTC sobre placa de oro en alta resolución con AFM





(e) Superficie 3D de la película de NTC sobre la placa de oro

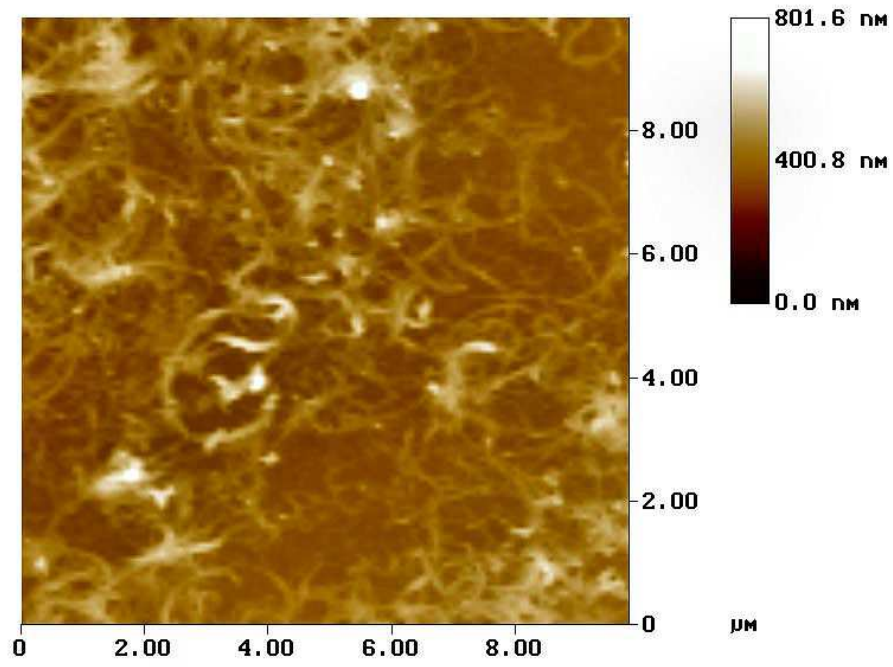


<b>Rugosidad Media (Ra)</b>	
<b>Ra</b>	<b>119.8 nm</b>

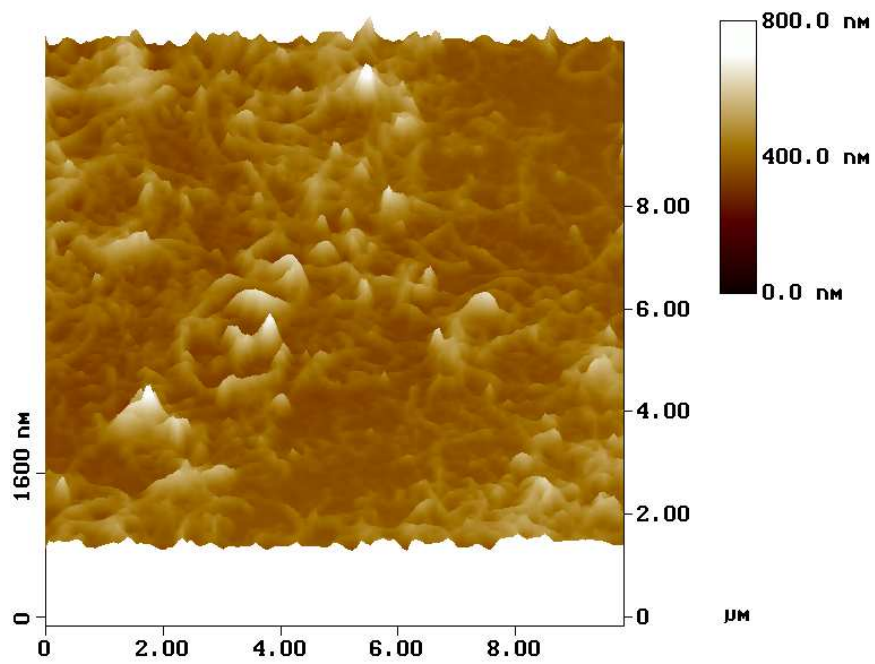
<b>Distancia Horizontal</b>	<b>1.55 μm</b>
<b>Distancia Vertical</b>	<b>601.7 nm</b>
<b>Distancia Horizontal</b>	<b>78.4 nm</b>
<b>Distancia Vertical</b>	<b>9.5 nm</b>

(f) Análisis de sección y rugosidad de la película de NTC sobre la placa de oro

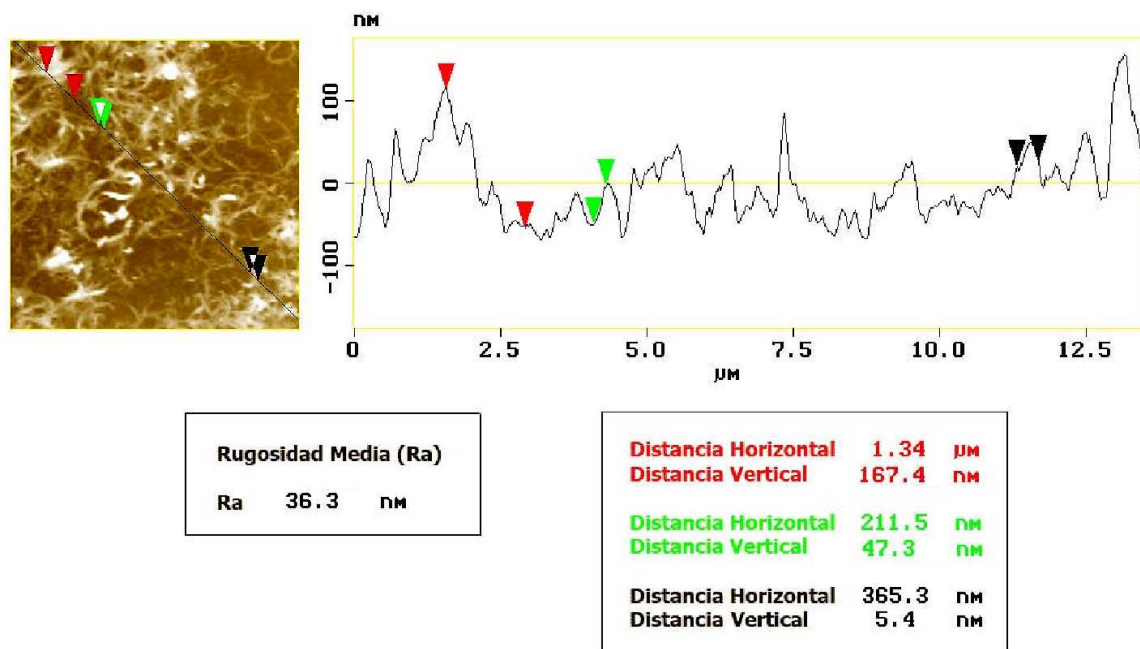




(g) Película de NTC sobre placa de oro/vidrio



(h) Superficie 3D de la película de NTC sobre la placa de oro/vidrio



(i) Análisis de sección y rugosidad de la película de NTC sobre la placa de oro/vidrio

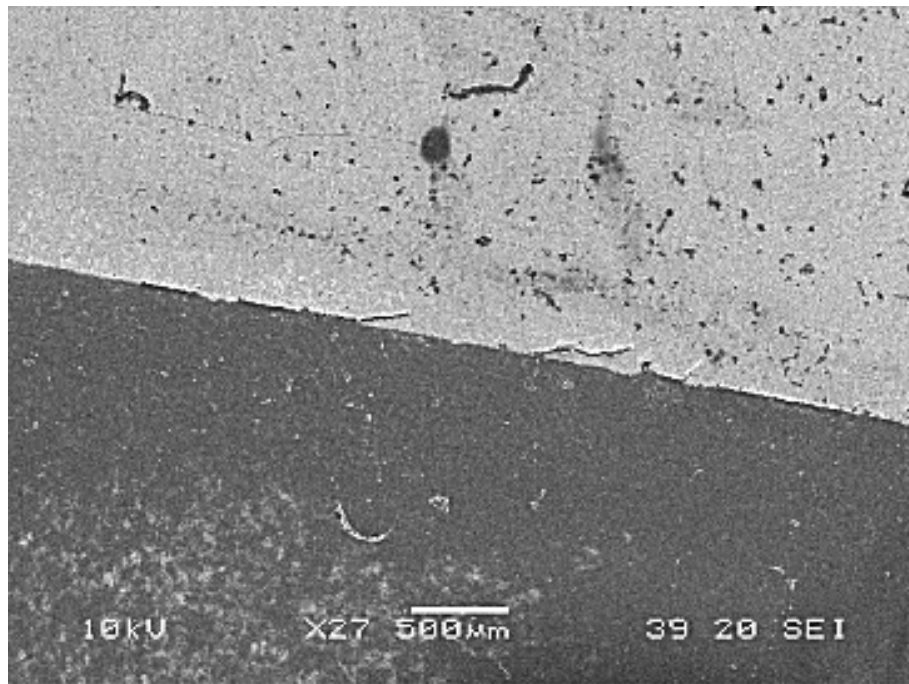
Figura 5.5: Conjunto de imágenes AFM obtenidas con el microscopio Nanoscope III Multimode en modo oscilante de la superficie de la película de NTC en los electrodos construidos. En las figuras (5.5a), (5.5b), se observa que la placa de oro está conformada por pequeños granos con alturas de 2-4 nm. En (5.5c) el perfil de rugosidad muestra una superficie regular con rugosidad media de 1.3 nm. La película de NTC construida sobre la placa de oro (5.5d), (5.5e) muestra que los NTC se entrelazaron formando una red. En (5.5f), se tiene un perfil de rugosidad que muestra una superficie bastante más irregular con una diferencia de altura entre el punto más bajo al más alto de hasta 1 µm y una rugosidad media de 119.8 nm. La película construida sobre la placa de oro/vidrio (5.5g), (5.5h), tuvo una menor densidad de NTC. Aquí, se forma una red donde su superficie es más regular que la anterior. Se tuvieron variaciones de altura de 167.4-47.3 nm y una rugosidad media de 36.3 nm (5.5i).

encontrando una superficie completamente irregular a lo largo de ésta; en la sección analizada, se tiene por ejemplo una elevación con una altura de 601.7 nm respecto al punto más bajo. Al realizar el análisis de estas irregularidades o rugosidad en el área en cuestión, se encontró que la rugosidad media fue de 119.8 nm (Figura 5.5f).

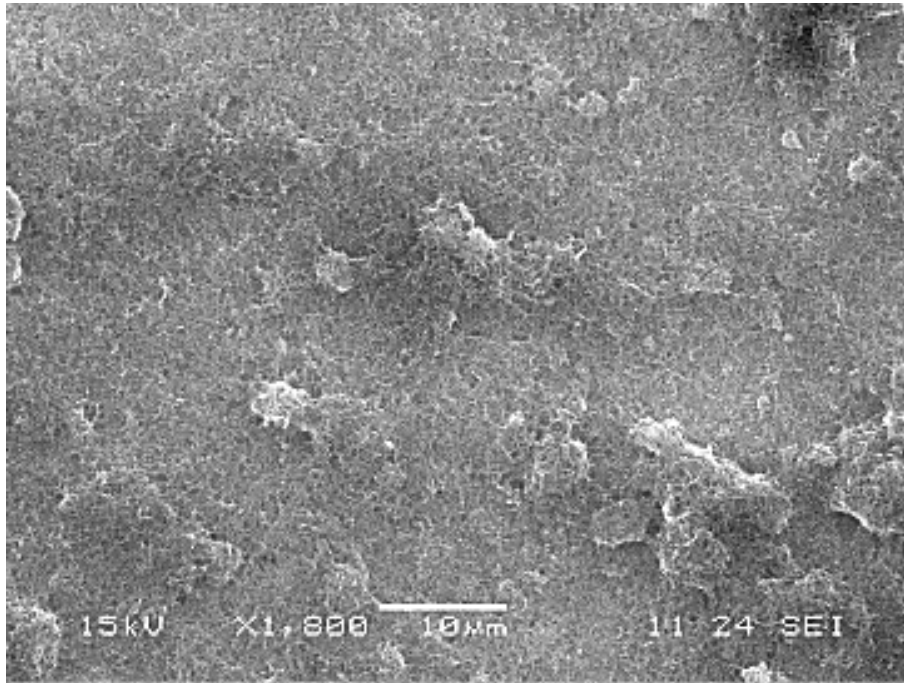
Para la película construida sobre la placa de oro/vidrio, se tuvo una menor densidad de nanotubos de carbono (Figura 5.5g) donde aún se observó el contacto físico entre ellos, pero con una mayor regularidad de su-

perficie (Figura 5.5h). En esta superficie se tuvieron variaciones de altura de entre 167.4 nm a 47.3 nm, donde en la medida horizontal de una pequeña irregularidad fue de 365.3 nm. La rugosidad media para esta superficie fue de 36.3 nm (Figura 5.5i).

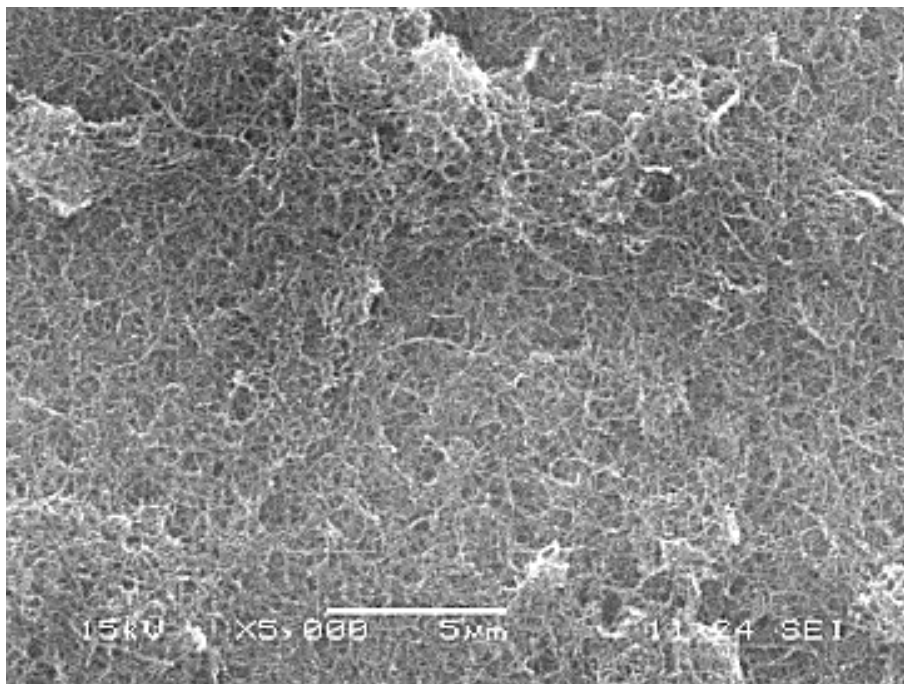
Para complementar la información sobre la superficie del electrodo, se realizó el estudio de ésta por SEM. Este tipo de microscopía permite observar áreas más grandes del electrodo. Se puede observar a distintos aumentos, desde un panorama general de la película hasta la compleja red de nanotubos de carbono que se formó sobre el sustrato metálico (Figura 5.6).



(a) Zona límite entre el sustrato de oro y la película de NTC por SEM.

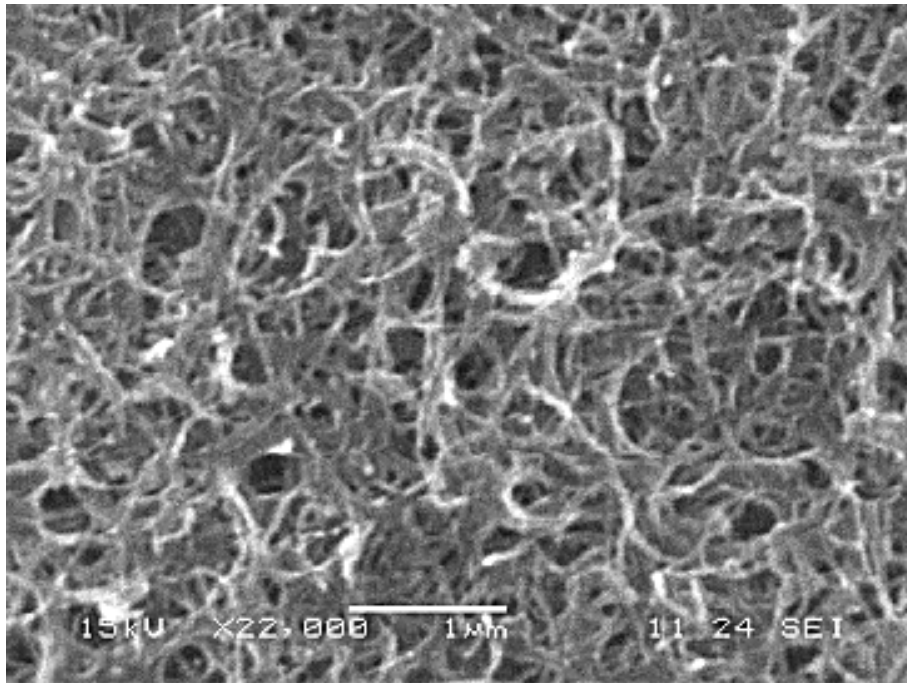


(b) Acercamiento a la superficie de la película de NTC por SEM.



(c) Película formada por una red de NTC





(d) Detalle de la compleja red multinivel de NTC

Figura 5.6: Imágenes SEM de la superficie de la película de NTC en los electrodos construidos a diferentes acercamientos. En la figura (5.6a), se muestra la separación entre la película de nanotubos y el sustrato de oro. En (5.6b), (5.6c), la superficie esta cubierta completamente por NTC y por la forma en que se fue depositando el material, la película fue creciendo de manera irregular (a manera de niveles) y con defectos. En un acercamiento mayor, se pudo ver la red donde se comprobó que los NTC hacen contacto entre ellos (5.6d).

A 27X, fue claro visualizar la separación entre la película de nanotubos y el sustrato de oro (Figura 5.6a). A 1800X, en un área de  $70 \mu\text{m} \times 55 \mu\text{m}$  y 5000X, en un área de  $25 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ , se tuvo una perspectiva de cómo es el lugar donde se sembró el material celular. En este caso, la superficie está cubierta completamente por nanotubos de carbono que por la forma en que se fue depositando el material, la película fue creciendo de manera irregular (a manera de niveles) y con defectos (Figuras 5.6b, 5.6c). Finalmente, en un acercamiento mayor, se pudo ver una red de nanotubos que como ya se había observado, no son completamente rígidos ni tienen una orientación definida. En esta imagen de la red, se comprobó una vez más que los nanotubos hacen contacto entre ellos (Figura 5.6d).

#### 5.1.4. Pruebas eléctricas en electrodos

Al igual que en la medición de la resistencia eléctrica desarrollada anteriormente para las placas de oro conectadas con el alambre de plata por medio de pintura conductiva, se desarrolló lo propio para el electrodo terminado. Así, la medición de la resistencia realizada con el multímetro digital a los electrodos con la película de nanotubos fue de (Tabla 5.2):

Tabla 5.2: Resistencia eléctrica de ambos tipos de electrodos medida con el multímetro digital.

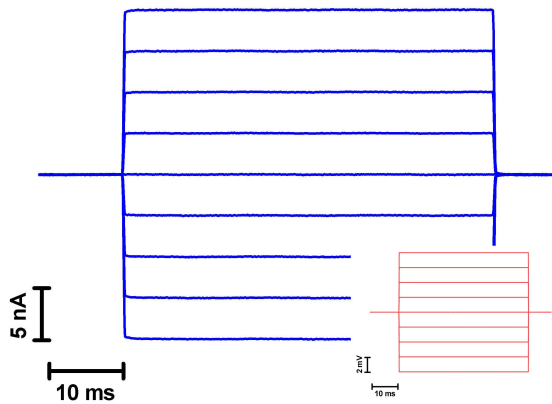
Electrodo	Resistencia
Construido sobre placa de oro	143.3 $\Omega$
Construido sobre placa de oro/vidrio	192.5 $\Omega$

Mediante el equipo electrofisiológico, se adquirieron las señales de respuesta del electrodo terminado a los estímulos de voltaje aplicados, también se obtuvieron las respectivas gráficas de corriente-voltaje obtenidas a partir del estímulo y la respuesta (Figura 5.7).

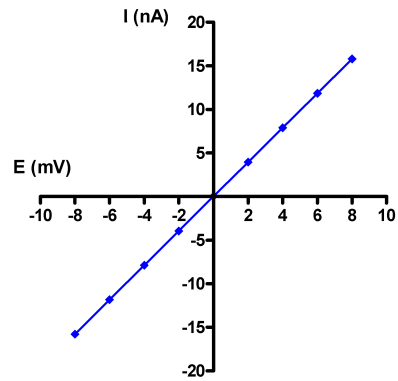
En las gráficas de la figura 5.7 se observa que al conectar los electrodos, se esta agregando únicamente un componente resistivo al sistema ya que la linealidad de la gráfica corriente-voltaje del modelo de resistencia con el electrodo conectado con respecto a la del modelo de resistencia solo, no se ve modificada.

Los resultados de los análisis elaborados a las curvas de corriente-voltaje anteriores para obtener el valor de la resistencia exacta del modelo de resistencia, el de la conexión entre éste y el electrodo construido sobre la placa de oro y el construido sobre oro/vidrio, se muestran en la siguiente tabla (Tabla 5.3):

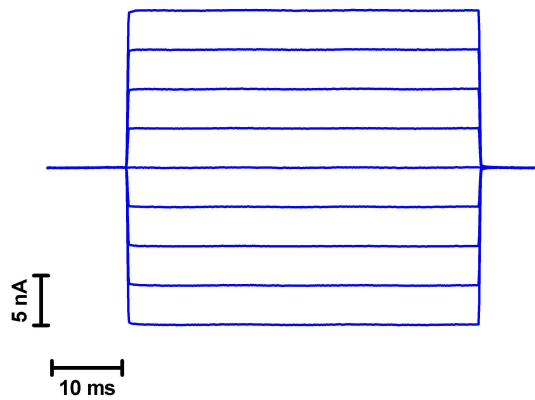
La resistencia eléctrica del electrodo construido sobre la placa de oro y del construido sobre la placa de oro/vidrio de acuerdo con este protocolo de experimentación, se obtuvo de la diferencia entre el valor de la resistencia



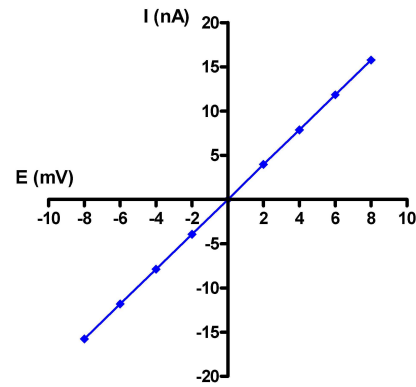
(a) Señal de corriente adquirida del modelo de resistencia de 500 kΩ (pulsos de voltaje aplicados en rojo)



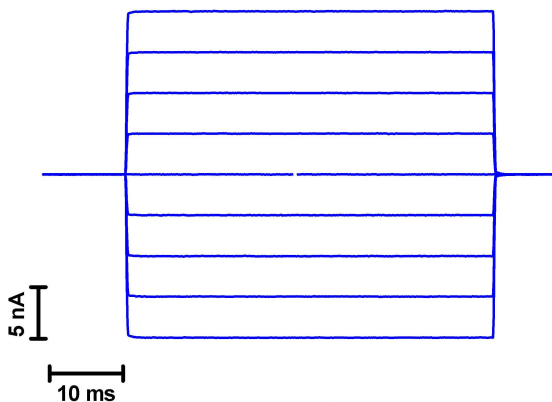
(b) Gráfico corriente-voltaje del modelo de resistencia



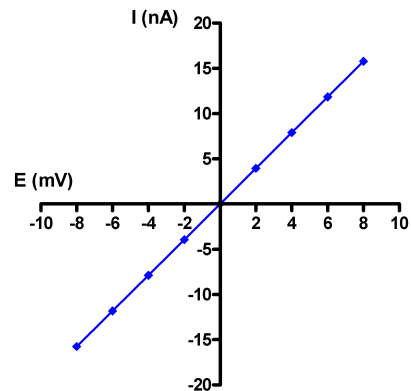
(c) Señal de corriente adquirida del modelo de resistencia de 500 kΩ conectado con el electrodo construido sobre la placa de oro



(d) Gráfico corriente-voltaje del electrodo construido sobre la placa de oro



(e) Señal de corriente adquirida del modelo de resistencia de 500 kΩ conectado con el electrodo construido sobre la placa de oro/vidrio



(f) Gráfico corriente-voltaje del electrodo construido sobre la placa de oro/vidrio

Figura 5.7: Gráficas de las pruebas eléctricas sobre ambos tipos de electrodos con el equipo de electrofisiología Axopatch 200A, empleando la técnica de fijación de voltaje. En (5.7b), (5.7d), (5.7f), se observa que se está agregando un componente resistivo al sistema ya que la linealidad de la gráfica corriente-voltaje del modelo de resistencia con los electrodos conectados respecto al del modelo de resistencia solo no se ve modificada. Nuevamente, la pendiente, no cambia porque el valor resistivo del electrodo es muy bajo comparado con la del modelo de resistencia.

Tabla 5.3: Valores de resistencia calculados a partir de las curvas corriente-voltaje.

Electrodo	Resistencia
Modelo de resistencia	506.56 k $\Omega$
Construido sobre placa de oro + modelo	507.40 k $\Omega$
Construido sobre placa de oro/vidrio + modelo	507.62 k $\Omega$

del modelo y el valor de resistencia obtenido para cada uno de los electrodos. El electrodo construido sobre la placa de oro presenta una resistencia de 842  $\Omega$ , mientras que el electrodo construido sobre la placa de oro/vidrio tiene una resistencia de 1.05 k $\Omega$ .



## 5.2. Cultivos neuronales

### 5.2.1. Cultivo Primario

De acuerdo con el conteo realizado en la cámara de Neubauer, se obtuvo una concentración celular de  $1.8 \times 10^6 \frac{\text{celulas}}{\text{ml}}$  de cultivo primario. A continuación se muestran los resultados obtenidos del crecimiento celular durante las primeras 48 horas de cultivo, después a los 7 y 14 siguientes días en los controles y a un lado de los electrodos correspondientes. Inicialmente, se observan las imágenes tomadas 48 horas después de sembrado el material celular (Figura 5.8).

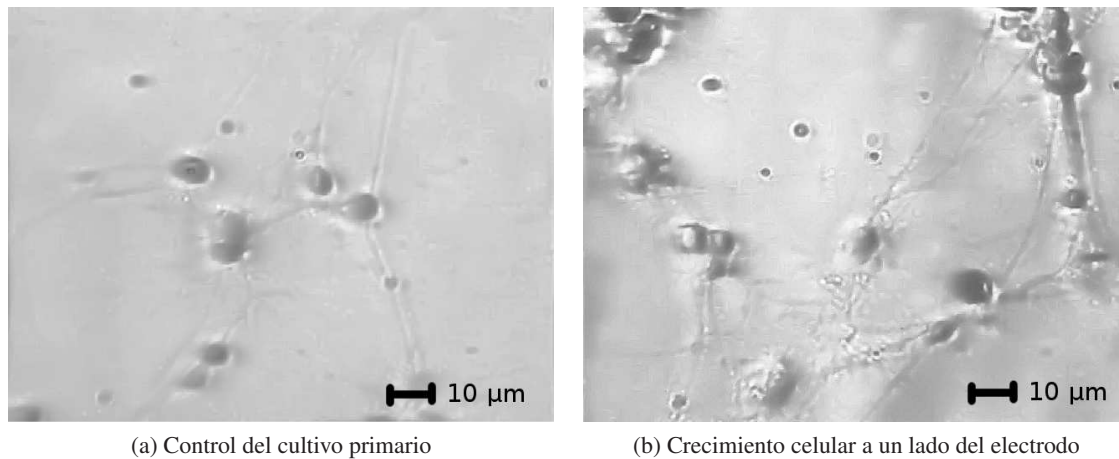


Figura 5.8: Células del cerebelo de rata a 48 horas de sembradas, observadas con microscopio óptico invertido en los controles y en los electrodos contruidos sobre la placa de oro. Las células se adherieron y comenzaron a desarrollar procesos dendríticos.

A 48 horas de haber sembrado el material, se observó que las células se encontraban vivas y que habían comenzado a desarrollar procesos dendríticos tanto en los controles, como a un lado de los electrodos (Figuras 5.8a, 5.8b).

Crecimiento celular a los 7 días siguientes de sembrado el material celular (Figura 5.9).

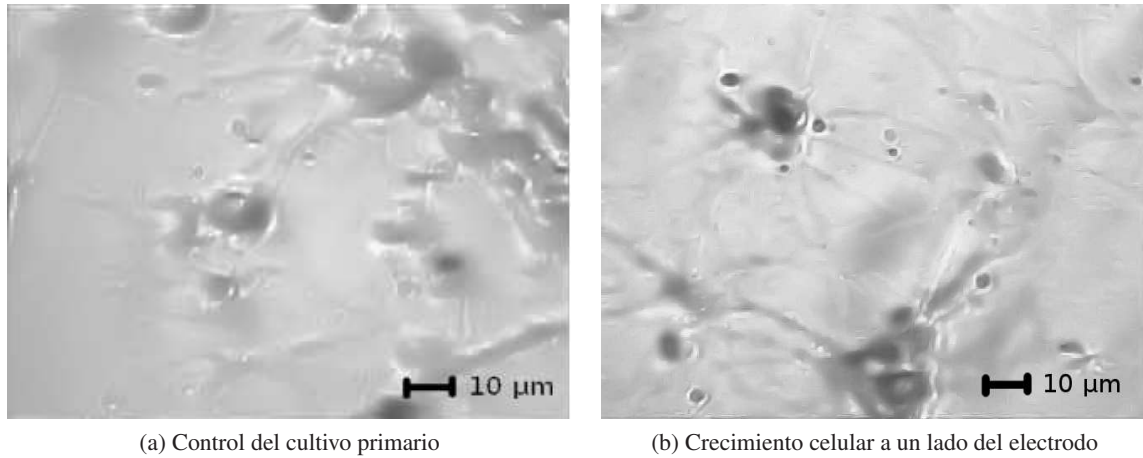


Figura 5.9: Células del cerebelo de rata a 7 días de sembradas, observadas con microscopio óptico invertido en los controles y en los electrodos contruidos sobre la placa de oro. El tamaño y número de los procesos dendríticos aumenta.

A 7 días de iniciado el cultivo, fue posible ver que los procesos dendríticos aumentaron su tamaño y su número (Figuras 5.9a, 5.9b).

Imágenes a 14 días de sembrado el material celular (Figura 5.10).

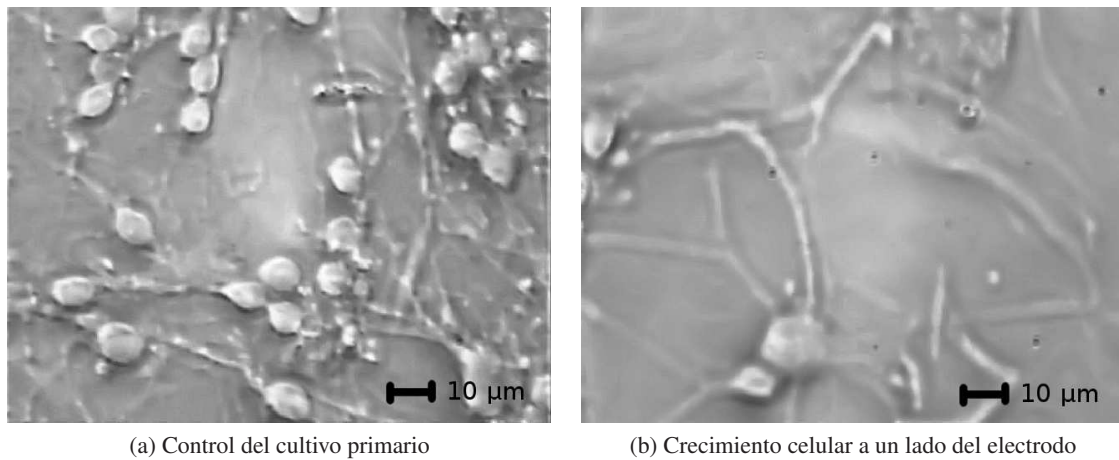
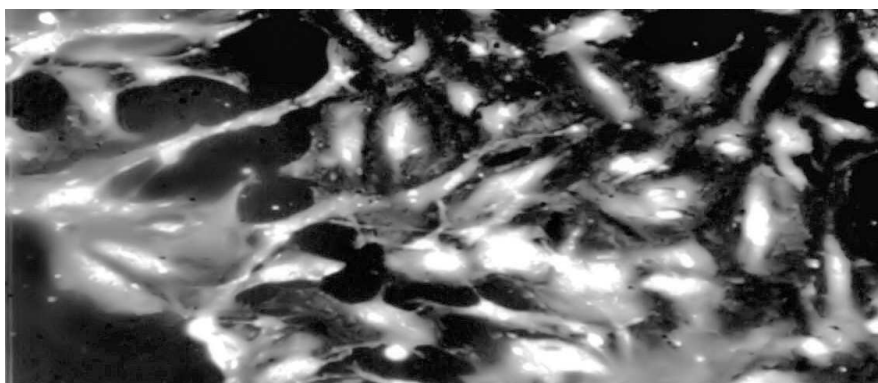


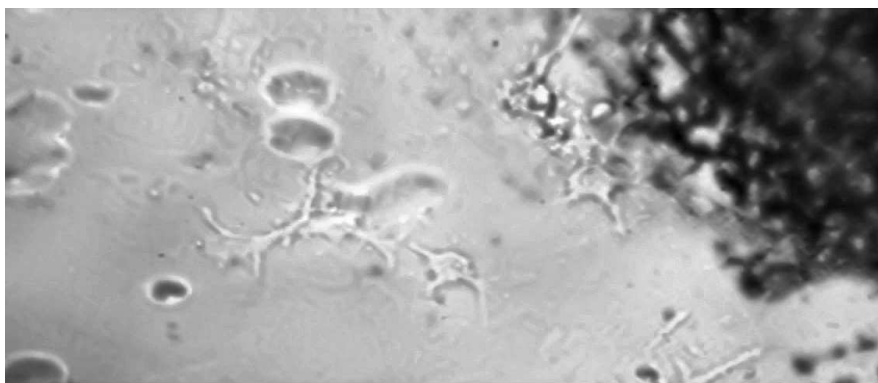
Figura 5.10: Células del cerebelo de rata a 14 días de sembradas, observadas con microscopio óptico invertido en los controles y en los electrodos contruidos sobre la placa de oro. Imágenes adquiridas en contraste de fases, donde las células han desarrollado ya una red neuronal sobre la superficie.

Con el microscopio óptico en modo de contraste de fases, a 14 días de cultivo, se comprobó el crecimiento y la maduración neuronal en el control y a un lado del electrodo (Figuras 5.10a, 5.10b).

Finalmente, se comprobó el crecimiento celular sobre la película de nanotubos en el electrodo con la ayuda de una fuente de iluminación externa. También se observó el crecimiento celular en la zona límite entre la película de nanotubos y el sustrato de oro (Figura 5.11).



(a) Células del cerebelo de rata sobre la película de NTC en el electrodo



(b) Células del cerebelo de rata sobre el Sylgard a un lado de la película de NTC en el electrodo

Figura 5.11: Micrografía óptica de las células del cerebelo de rata sobre la película de NTC del electrodo. Red neuronal donde se distingue la proliferación del material celular sobre la superficie del electrodo y a un lado de la película de NTC.

Con este tipo de iluminación fue posible distinguir a las células creciendo sobre la película de nanotubos, aunque no fue identificable de manera clara ni el soma ni los procesos dendríticos (Figura 5.11a). En la frontera entre la película de nanotubos y el sustrato de oro creciendo sobre el recubrimiento de Sylgard se encontró también material celular, en este caso si fue posible identificar completamente las partes que conforman la neurona (Figura 5.11b).

### 5.2.2. Cultivo de línea celular

En esta sección se van a mostrar los resultados del crecimiento de la línea celular PC12 a diferentes tiempos sobre los electrodos oro/vidrio. Se muestran tanto las células sin diferenciar como las células diferenciadas en sus controles y sus respectivos electrodos durante las primeras 48 horas de cultivo, después a los 4 y 6 días siguientes a su siembra. En esta ocasión, gracias a que la luz del microscopio atravesaba la película de nanotubos, y al mejoramiento del sistema de adquisición de imágenes, se tuvo visibilidad a través de la película de nanotubos y ya no fue necesario comprobar el crecimiento a un lado del electrodo como en el cultivo primario, por lo que se tomaron las imágenes directamente de los controles y del crecimiento celular sobre la película en el electrodo.

De acuerdo con el conteo realizado en la cámara de Neubauer, se obtuvo una concentración celular de  $1.65 \times 10^6 \frac{\text{celulas}}{\text{ml}}$ . A continuación se muestran los resultados del cultivo celular sin diferenciar durante las primeras 48 horas (Figura 5.12).

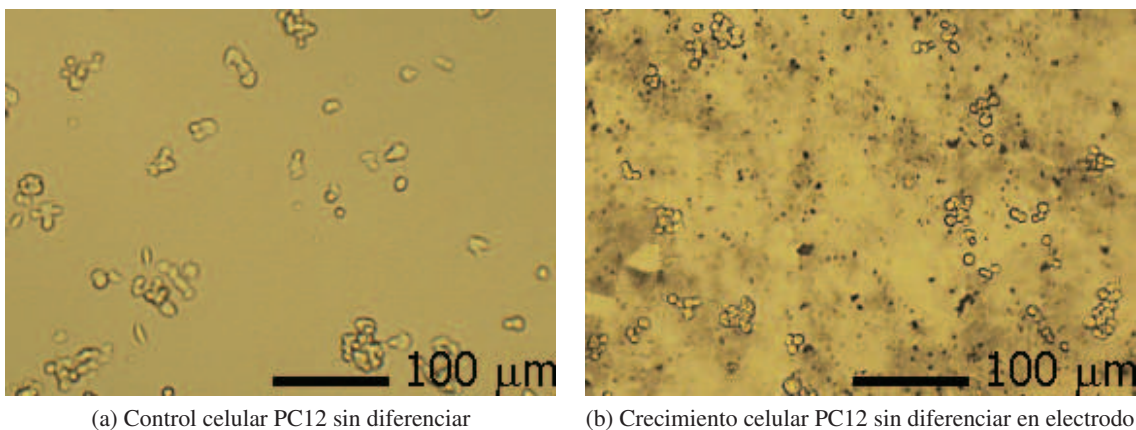


Figura 5.12: Línea celular PC12 sin diferenciar a 48 horas de haber sido sembradas en los controles y sobre los electrodos construidos en la placa de oro/vidrio. Las células se han adherido sobre la superficie formando pequeños conglomerados y algunas células aisladas.

La línea celular a 48 horas de haber sido sembrada sobre los controles y los electrodos muestra material celular vivo sobre la superficie de ambos,

las células tienden a agruparse aunque también hubieron algunas células aisladas (Figuras 5.12a, 5.12b).

Crecimiento celular de la línea PC12 sin diferenciar con imágenes a 4 días (Figura 5.13).

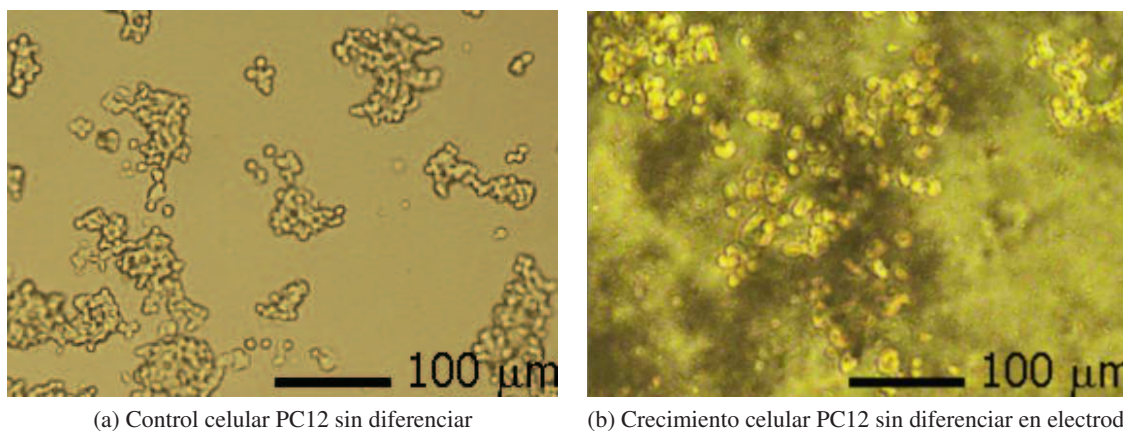


Figura 5.13: Línea celular PC12 sin diferenciar a 4 días de haber sido sembradas en los controles y sobre los electrodos construidos en la placa de oro/vidrio. Las células han proliferado de manera satisfactoria sobre la superficie.

A 4 días de cultivo, se consiguió la proliferación celular, es decir, que el número de células tanto en el control como en el electrodo aumentó, además, el crecimiento continuó siendo en grupo (Figuras 5.13a, 5.13b).

Crecimiento celular de la línea PC12 sin diferenciar a 6 días (Figura 5.14).

En 6 días de cultivo las células proliferaron de manera satisfactoria cubriendo la superficie de ambos en un 80 % (Figuras 5.14a, 5.14b).

Antes de comenzar la diferenciación celular de la línea PC12, se mantuvieron las células sin diferenciar por 48 hrs sobre el electrodo. Una vez que se cumplió este periodo, se agregó el factor de crecimiento neuronal. Enseguida se presentan los resultados del crecimiento celular diferenciado sobre la película de nanotubos de carbono durante las primeras 48 horas posteriores a la aplicación del factor de crecimiento neuronal (Figura 5.15).



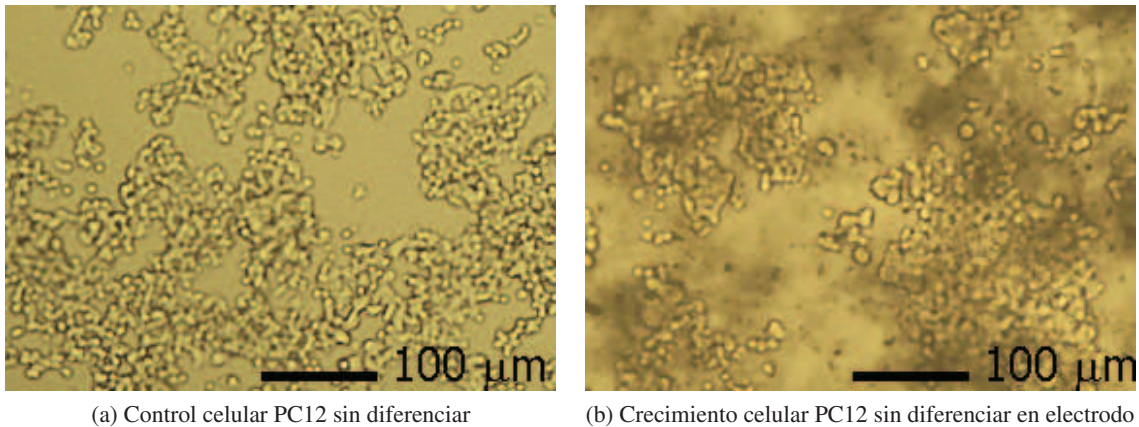


Figura 5.14: Línea celular PC12 sin diferenciar a 6 días de haber sido sembradas en los controles y sobre los electrodos construidos en la placa de oro/vidrio. Las células continúan proliferando hasta casi alcanzar la máxima confluencia.

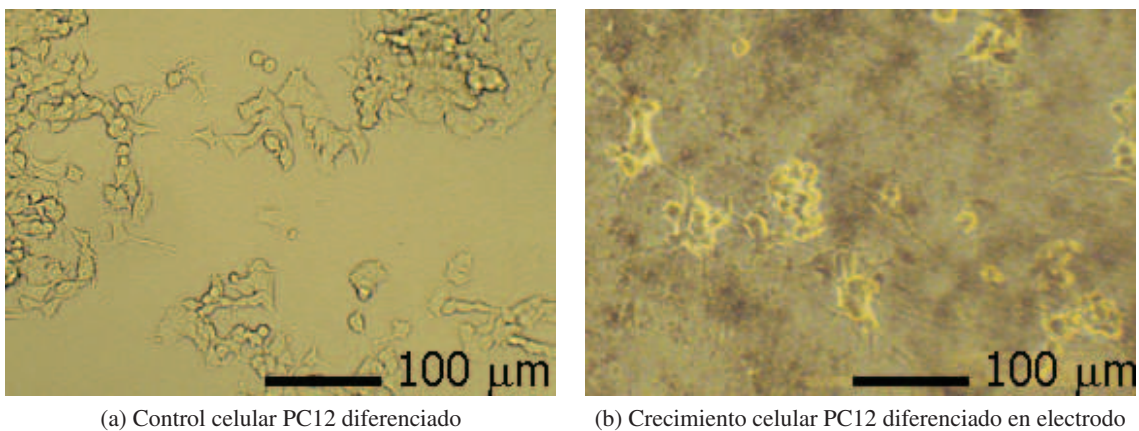


Figura 5.15: Línea celular PC12 diferenciada a 48 horas de haber sido sembradas en los controles y sobre los electrodos construidos en la placa de oro/vidrio. Las células comenzaron a desarrollar procesos dendríticos y a cambiar de forma haciéndose mas anchas.

En la primeras 48 horas después de la aplicación del factor de crecimiento neuronal la células cambiaron su forma redonda que tenían previo a la diferenciación, aumentando de tamaño y comenzando a desarrollar procesos dendríticos (Figuras 5.15a, 5.15b).

Crecimiento celular de la línea PC12 diferenciada con imágenes a 4 días (Figura 5.16).

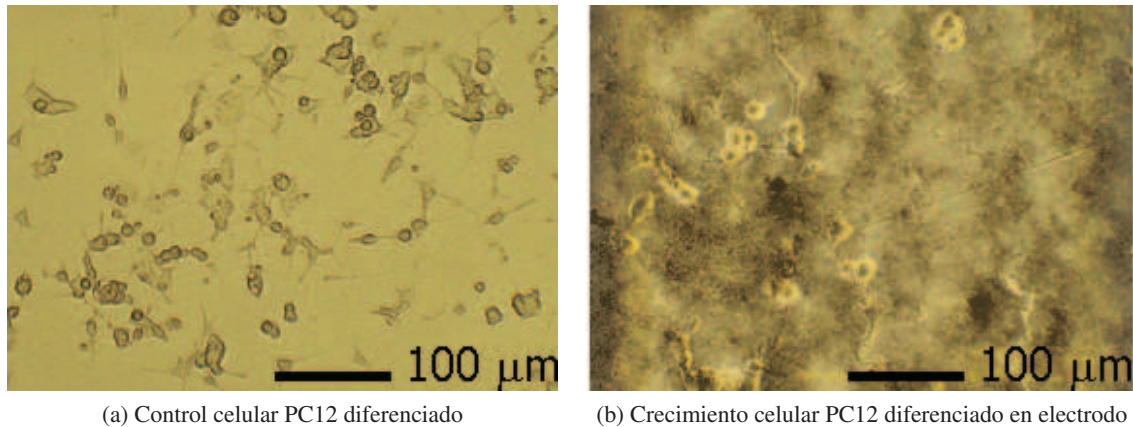


Figura 5.16: Línea celular PC12 diferenciada a 4 días de haber sido sembradas en los controles y sobre los electrodos construidos en la placa de oro/vidrio. Los procesos dendríticos continúan alargándose y las células ya han alcanzado una forma estable.

En los siguientes 4 días, se continuó con la aplicación del factor de crecimiento neuronal, observando que los procesos dendríticos desarrollaban favorablemente su crecimiento (Figuras 5.16a, 5.16b).

Crecimiento celular de la línea PC12 diferenciada a 6 días (Figura 5.17).

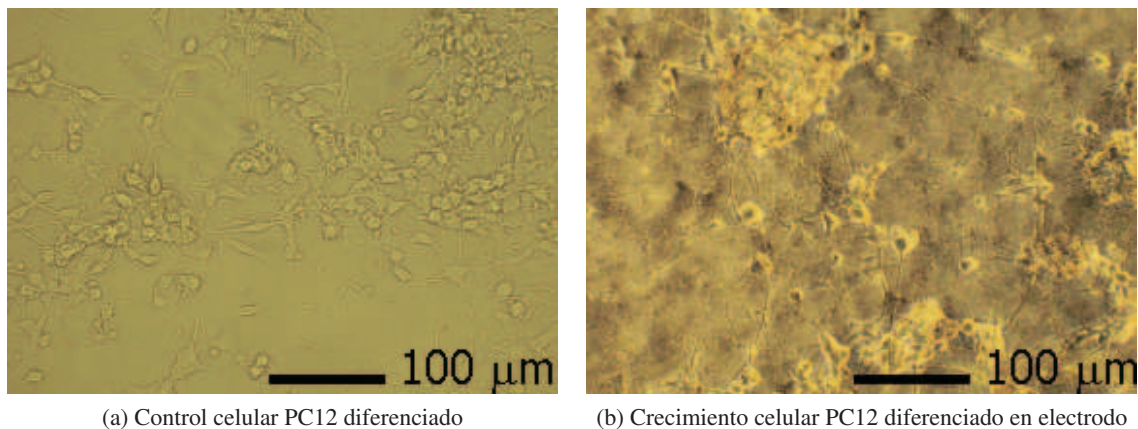


Figura 5.17: Línea celular PC-12 diferenciada a 6 días de haber sido sembradas en los controles y sobre los electrodos construidos en la placa de oro/vidrio. Las células han desarrollado una red donde los procesos dendríticos se interconectan.

Finalmente a los 6 días de iniciada la diferenciación se formó ya una compleja red celular tanto en los controles como en los electrodos (Figuras 5.17a, 5.17b).

### 5.3. Registros electrofisiológicos

Los resultados de los registros electrofisiológicos realizados en los diferentes tipo de cultivos celulares son mostrados a continuación, recordando que para el cultivo primario se obtuvieron únicamente potenciales de reposo de las células, mientras que para la línea celular, se registraron potenciales de reposo, corrientes iónicas y registro extracelular mediante el electrodo de nanotubos de carbono construidos.

#### 5.3.1. Potencial de membrana en reposo de cultivo primario

Se inicia con los resultados de los experimentos electrofisiológicos obtenidos para las células de cultivo primario. La tabla muestra la estadística de los potenciales de membrana en reposo para una n total de 15 (Tabla 5.4):

Tabla 5.4: Estadística de potenciales de membrana en reposo del cultivo primario.

n total	15
media	-58.1 mV
desviación estándar	7.7 mV
suma	-872.5 mV
mínimo	-70.0 mV
mediana	-59.5 mV
máximo	-46.0 mV

#### 5.3.2. Potencial de membrana en reposo en línea celular

La tabla muestra la estadística de los potenciales de la membrana en reposo para las células diferenciadas en los controles de la línea celular PC12 para una n total de 27 (Tabla 5.5):



Tabla 5.5: Estadística de potenciales de membrana en reposo de la línea celular PC12 diferenciada.

n total	27
media	-57.5 mV
desviación estándar	11.2 mV
suma	-1554.4 mV
mínimo	-73.0 mV
mediana	-61.0 mV
máximo	-23.5 mV

A continuación se observan los resultados electrofisiológicos para las células diferenciadas sobre el electrodo de la línea celular PC12. La tabla muestra la estadística de los potenciales de la membrana en reposo para una n total de 35 (Tabla 5.6):

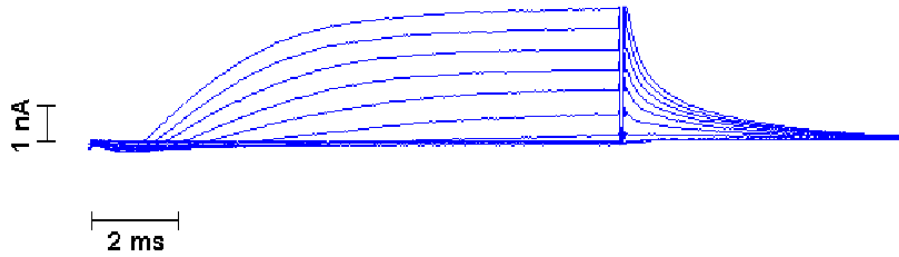
Tabla 5.6: Estadística de potenciales de membrana en reposo de la línea celular PC12 diferenciada.

n total	35
media	-55.3 mV
desviación estándar	13.1 mV
suma	-1936.5 mV
mínimo	-76.0 mV
mediana	-58.0 mV
máximo	-24.5 mV

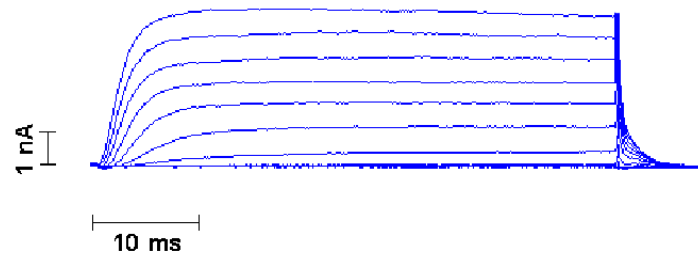
### 5.3.3. Registro de corrientes iónicas en la línea celular

Las gráficas siguientes son representativas de los resultados obtenidos en el estudio de las corrientes iónicas para la línea celular diferenciada ya sea en los controles o sobre los electrodos (Figura 5.18).

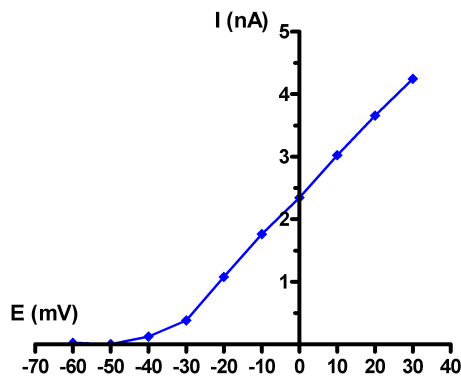
Las curvas mostradas son representativas de la respuesta obtenida a la estimulación en un total de 62 células. Esta respuesta se origina debido a que el pulso de voltaje inyectado despolariza la membrana, es decir, que el voltaje de la membrana en reposo varía, haciendo que los canales iónicos presentes en la membrana celular modifiquen su comportamiento y permi-



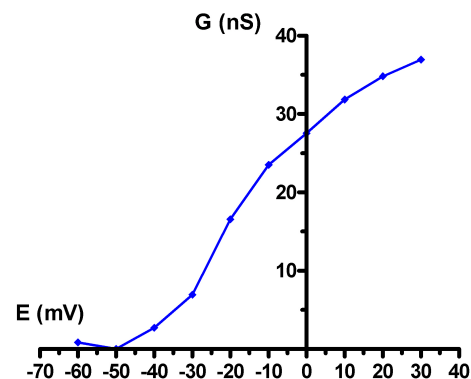
(a) Corrientes iónicas de respuesta a pulsos de excitación de voltaje de 10 ms



(b) Corrientes iónicas de respuesta a pulsos de excitación de voltaje de 50 ms



(c) Curva corriente-voltaje de la membrana celular



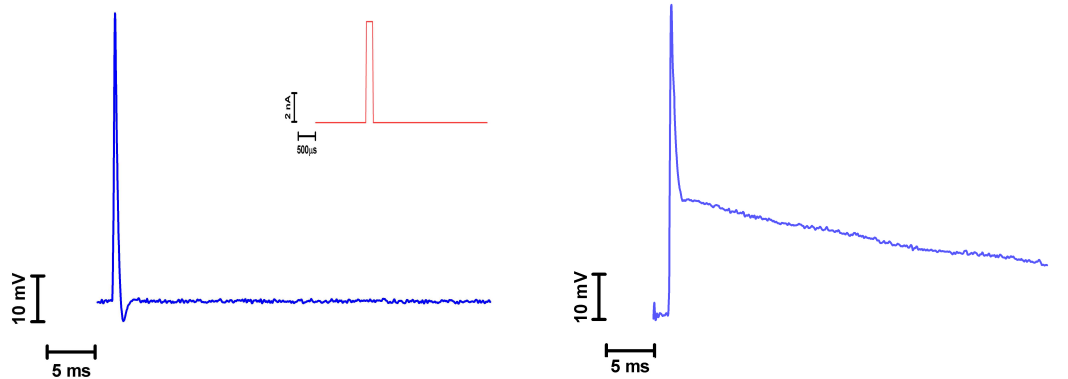
(d) Curva de conductancia de la membrana celular

Figura 5.18: Gráficos representativos del registro electrofisiológico de corrientes iónicas y curvas de conductancia de las células PC12 diferenciadas obtenidos con el equipo de electrofisiología Axopatch 200A, empleando la técnica de fijación de voltaje. En (5.18a), (5.18b) se tiene la respuesta celular a impulsos de voltaje de 10 y 50 ms de duración. La curva corriente-voltaje de la respuesta a 50 ms en el estado estable (5.18c), muestra que conforme se despolariza la membrana a potenciales más positivos que el potencial de reposo, las corrientes de potasio aumentan, lo que implica una mayor apertura de canales iónicos para este ion. La conductancia de la membrana celular (5.18d), tiene límites inferior y superior, esto es, al incrementar el voltaje de polarización o de despolarización, la conductancia de la membrana alcanzará un límite.

tan un flujo de iones a través de ellos. De esta forma se generan pequeñas corrientes, esas corrientes en la células de estudio se ven representadas en la figuras 5.18a, 5.18b. La primer gráfica muestra la respuesta a impulsos de voltaje de 10 ms de duración, donde en la primer parte del gráfico se observa que no existen corrientes de sodio, la segunda parte representa las corrientes de potasio (que es una corriente saliente pues los iones de potasio abandonan el interior celular). La segunda gráfica es la respuesta a impulsos de voltaje de 50 ms de duración. El tercer gráfico corresponde a la curva corriente contra voltaje de la respuesta a 50 ms en el estado estable (los últimos ms), este gráfico muestra que conforme se despolariza la membrana a potenciales más positivos que el potencial de reposo, las corrientes originadas por el flujo de iones, en este caso de potasio, van en aumento (Figura 5.18c), lo que físicamente implica una mayor apertura de canales iónicos de potasio. El cuarto gráfico muestra la conductancia de la membrana celular, en este es posible ver que la conductancia tiene límites tanto inferior como superior, es decir, que aunque se incremente cada vez más el voltaje de polarización o de despolarización, la conductancia de la membrana alcanzará un límite, pues físicamente los canales iónicos no responderían a la polarización y en la despolarización, por más que se aumente el voltaje, se tiene un número límite de canales iónicos que pueden abrirse en determinado potencial (Figura 5.18d).

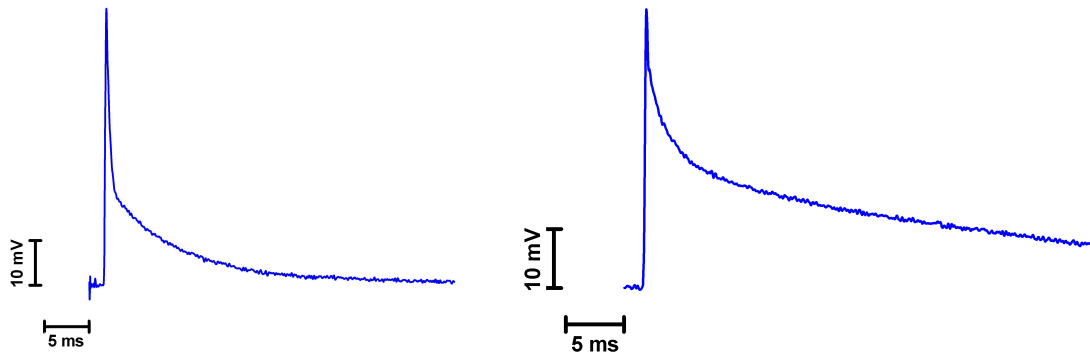
#### **5.3.4. Registro de potenciales por fijación de corriente**

Estos son los potenciales de acción intracelulares evocados con un pulso de corriente de  $200 \mu\text{s}$  de duración y de 7 nA de magnitud (protocolo estándar de estimulación), se observan 4 distintos tipos de respuesta presentes en un total de 30 células registradas. Dichos registros, son representativos de los resultados obtenidos en las células sembradas y diferenciadas en los controles y también sobre los electrodos (Figura 5.19).



(a) Potencial de acción evocado obtenido en 3 células PC12. Potencial de reposo -54 mV (en rojo, pulso de corriente de estimulación para todos los casos)

(b) Potencial de acción evocado obtenido en 15 células PC12. Potencial de reposo -67 mV



(c) Potencial de acción evocado obtenido en 7 células PC12. Potencial de reposo -68 mV

(d) Potencial de acción evocado obtenido en 5 células PC12. Potencial de reposo -67 mV

Figura 5.19: Gráficos de registro electrofisiológico potenciales de acción evocados en un total de 30 células PC12 obtenidos con el equipo de electrofisiología Axopatch 200A, empleando la técnica de fijación de corriente. Se muestran los cuatro tipos de respuesta encontrados. El primer tipo de respuesta es un potencial de acción (5.19a). Las siguientes imágenes muestran una respuesta donde en la repolarización se tiene un postpotencial positivo con un curso temporal exponencial (5.19b, 5.19c, 5.19d).

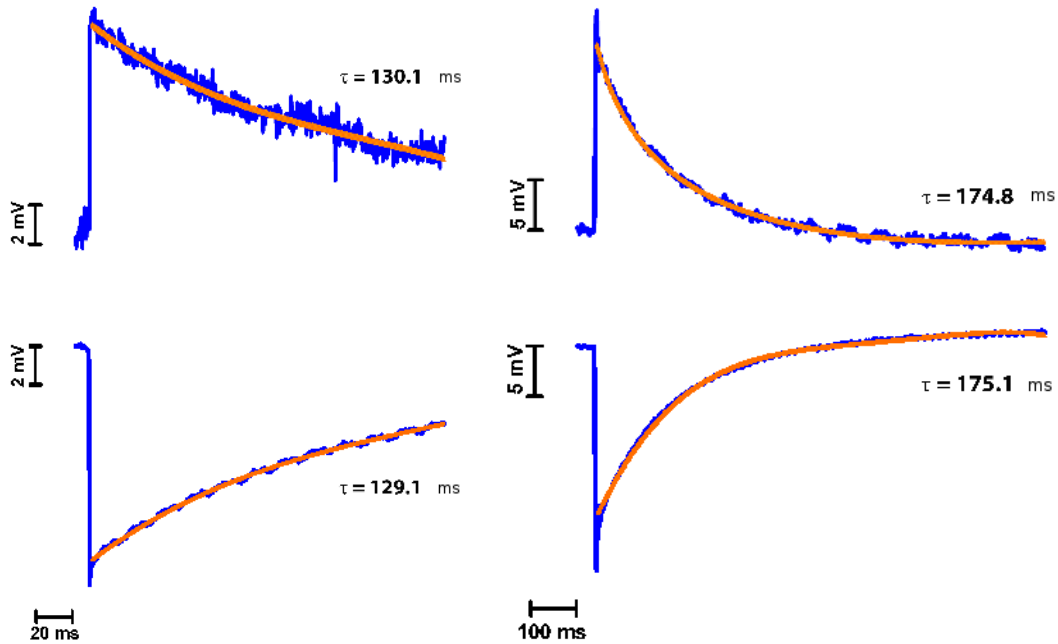
Se muestran los cuatro tipos de respuesta encontrados en diferentes células cultivadas sobre los electrodos. El primer tipo de respuesta se obtuvo en 3 células y es prácticamente un potencial de acción donde ahora al inyectar un pulso de corriente, el potencial de membrana se despolariza súbitamente. El proceso de repolarización, se debe a la apertura de canales de potasio que permiten el flujo de iones hacia el exterior de la célula creando una corriente saliente de potasio que lleva el potencial de membrana actual hacia el

potencial de membrana en reposo con el típico pospotencial negativo originado al no cerrarse inmediatamente los canales iónicos de potasio cuando se alcanza el potencial de membrana en reposo (Figura 5.19a). Las siguientes imágenes muestran una despolarización de magnitud variable, en ocasiones similar a la anterior; sin embargo, en la repolarización se observa un postpotencial positivo con un curso temporal exponencial (Figuras 5.19b, 5.19c, 5.19d). Respuestas obtenidas para 15, 7 y 5 células respectivamente.

### **5.3.5. Registro extracelular de la respuesta eléctrica neuronal a través del electrodo**

Finalmente, se observan los resultados de los registros de la respuesta eléctrica neuronal evocada con el pulso de corriente empleado anteriormente. Se muestran dos gráficos diferentes, donde la señal de arriba es el potencial adquirido de manera intracelular con un microelectrodo mientras que la señal de abajo, es el potencial adquirido de manera extracelular a través del electrodo construido (Figura 5.20).

Los registros muestran la parte del decaimiento exponencial de la señal, el cual es similar a uno de los tipos de registro intracelulares hechos con anterioridad. Cada registro fue hecho a una neurona distinta y registrados en intervalos distintos. En la figura 5.20a, la señal superior, es el registro intracelular adquirido con un microelectrodo. La señal bajo esta, es la señal registrada de manera extracelular por medio del electrodo de nanotubos, como se puede ver, esta ha invertido su polaridad. Esto se debe a que las corrientes extracelulares fluyen de manera inversa respecto a las corrientes en el interior celular, así que cuando de manera intracelular se observa que el potencial de membrana se despolariza, de manera extracelular se registra este cambio con la polaridad invertida hasta que se alcanza nuevamente el potencial de membrana en reposo.



(a) Potencial de acción evocado registrado en un intervalo de 200 ms. Potencial de reposo de la señal intracelular -63 mV

(b) Potencial de acción evocado registrado en un intervalo 1000 ms. Potencial de reposo de la señal intracelular -54 mV

Figura 5.20: Gráficos de registro electrofisiológico simultáneo de los potenciales de acción evocados en 2 diferentes células PC12 obtenidos con el equipo de electrofisiología Axopatch 200A, empleando la técnica de fijación de corriente. Los trazos superiores indican el potencial registrado intracelularmente con un microelectrodo. Los potenciales registrados extracelularmente (trazos inferiores), se obtuvieron mediante el electrodo de nanotubos. Se muestra el ajuste de una curva exponencial (línea naranja) efectuado para obtener la constante de tiempo  $\tau$ . Los registros muestran únicamente la parte del decaimiento exponencial de la señal.

En este registro, la amplitud máxima de la señal del registro extracelular, corresponde a la amplitud donde inicia la repolarización en su fase lenta o exponencial del registro intracelular. En la siguiente imagen (Figura 5.20b), se observa un registro similar a una escala de tiempo mayor donde el registro extracelular tiene el mismo decaimiento exponencial que el registro intracelular. Esto se observó gracias al ajuste de una curva exponencial donde las constantes de tiempo para la primer y segunda figura son de:

$$\text{I. } \tau_{intra} = 130.1 \text{ ms} ; \tau_{extra} = 129.1 \text{ ms}$$

$$\text{II. } \tau_{intra} = 174.8 \text{ ms} ; \tau_{extra} = 175.1 \text{ ms}$$

El registro de la actividad eléctrica extracelular de manera individual fue realizada gracias a que la células no presentaron actividad eléctrica espontánea. Por lo tanto, el estímulo de corriente solo afectó a la célula sobre la que se aplicó y el registro extracelular fue exclusivo de la respuesta de esta célula.

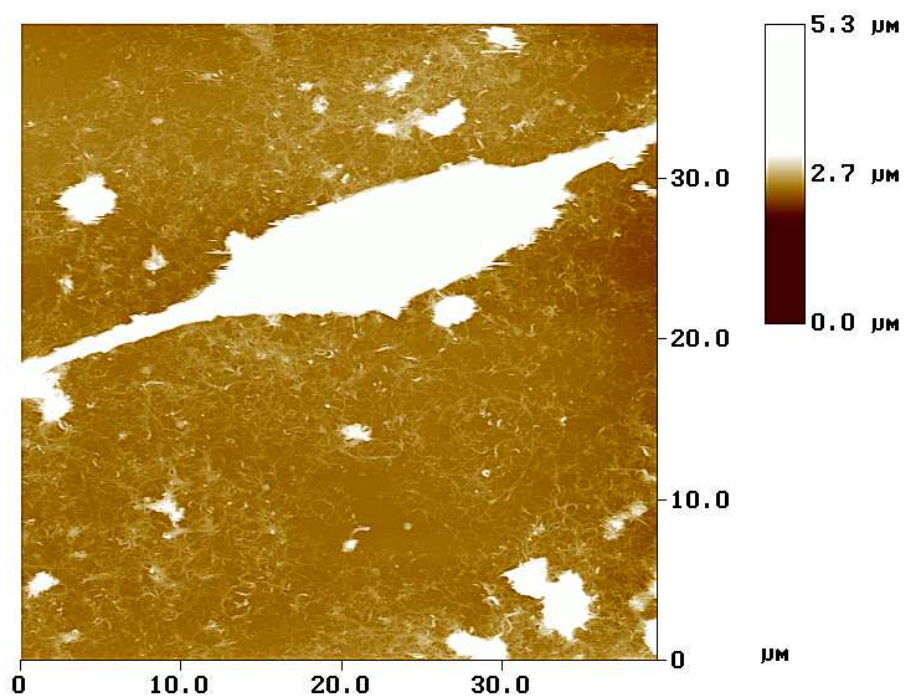
## 5.4. AFM y SEM del crecimiento celular en electrodos

Las imágenes obtenidas con estos tipos de microscopía se realizaron únicamente para las células provenientes de la línea celular PC12. Primeramente se muestran las imágenes AFM de una célula PC12 diferenciada que ha tomado la forma de una neurona bipolar donde por limitaciones mecánicas del instrumento no fue posible tener un nivel más detallado de la superficie de la neurona. En la siguiente serie se hizo un acercamiento en la zona donde una ramificación sale del soma de la célula para conectarse sobre la película de nanotubos (Figura 5.21).

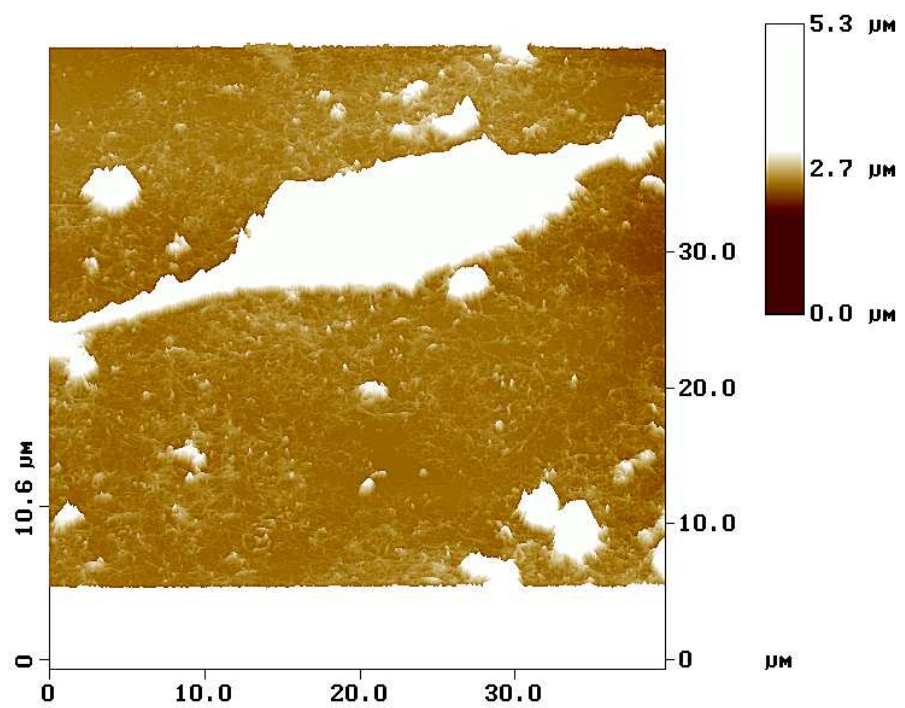
En la primer serie de imágenes, la célula se observa en color blanco indicando la altura máxima en la imagen, esta sin embargo no es la altura máxima real de la célula en cuestión (Figura 5.21a), en el perfil tridimensional es posible observar que la célula sobresale de la película de nanotubos pero no se observa ningún detalle de la superficie celular (Figura 5.21b). Con el análisis de sección, se puede ver, que la altura medida de la célula es de  $2.9 \mu\text{m}$  y su ancho es de  $6.6 \mu\text{m}$  (Figura 5.21c). Se hizo también un análisis de rugosidad en una región cercana a la célula, en este caso, la rugosidad media fue de  $33.2 \text{ nm}$  en un área de  $14 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$  (Figura 5.21d).

La siguiente serie de imágenes muestran un acercamiento a una ramificación de aproximadamente  $1 \mu\text{m}$  de altura por  $1 \mu\text{m}$  de ancho que sale del soma para extenderse sobre la película de nanotubos (Figura 5.21e), en el perfil tridimensional, se muestra una superficie irregular de la película donde creció el material celular (Figura 5.21f). De igual forma se hizo un análisis de sección donde se puede notar que la altura entre el inicio de la ramificación y la película es de  $904 \text{ nm}$  (Figura 5.21g). El análisis de rugosidad en esta pequeña área libre de material celular indica que se tiene una rugosidad media de  $42.6 \text{ nm}$  en un área de  $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$  (Figura 5.21h).

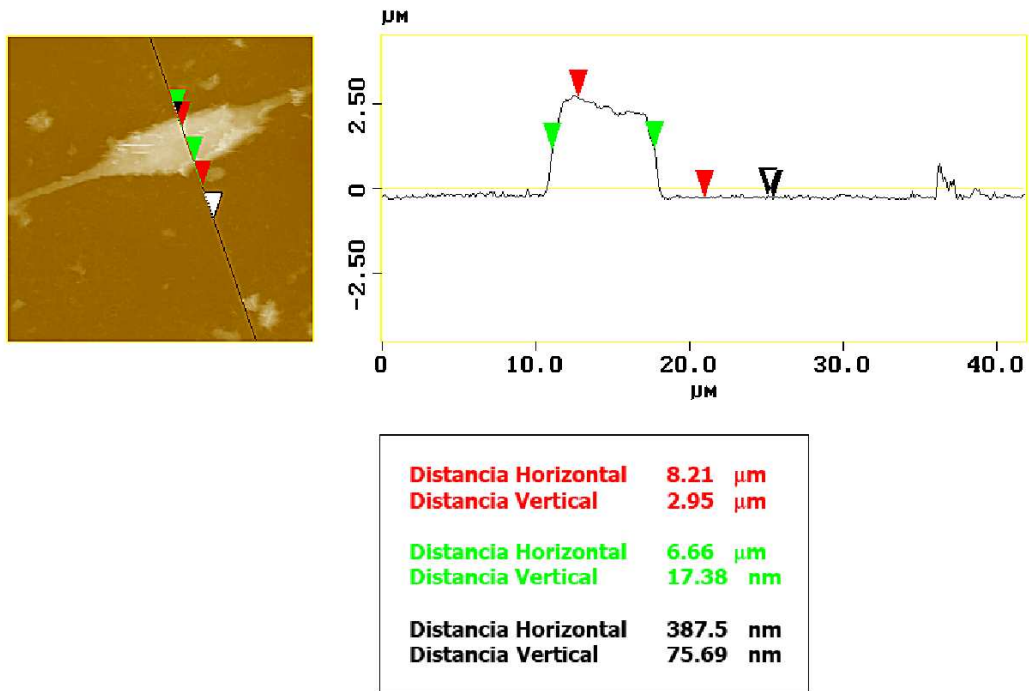




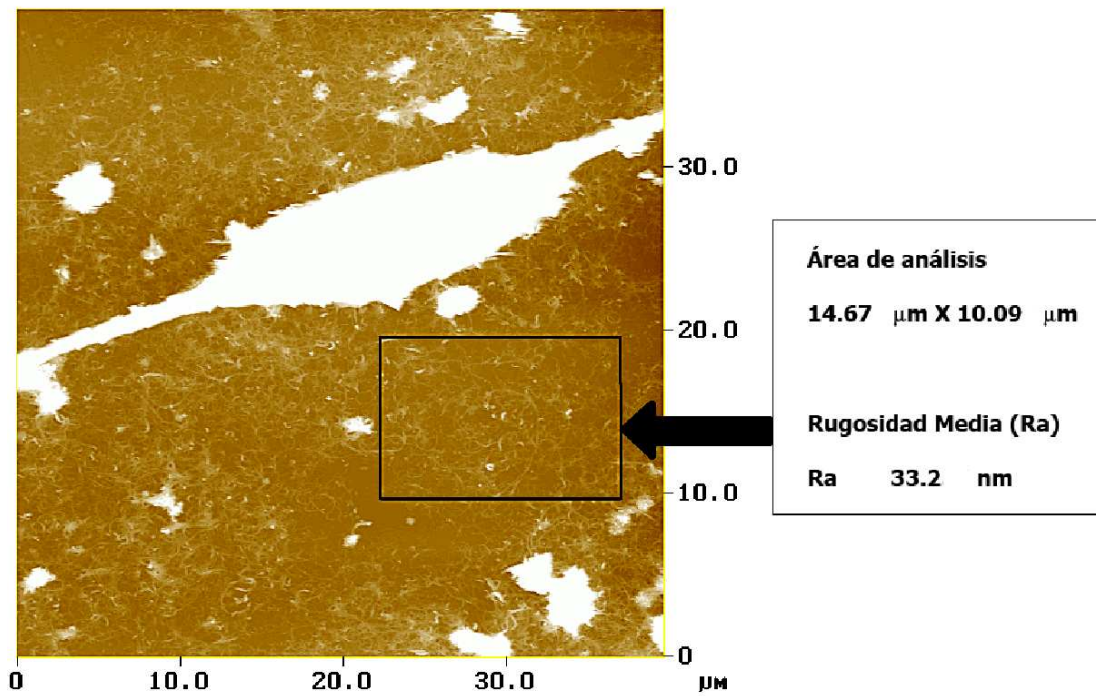
(a) Imagen AFM de célula PC12 sobre película de NTC



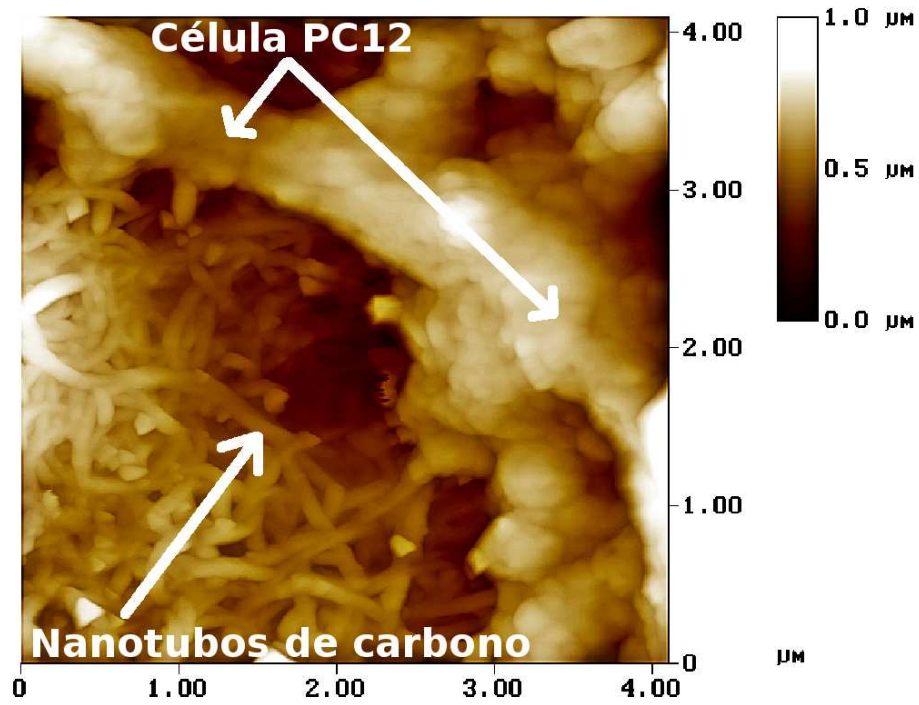
(b) Perfil 3D de célula PC12 sobre película de NTC



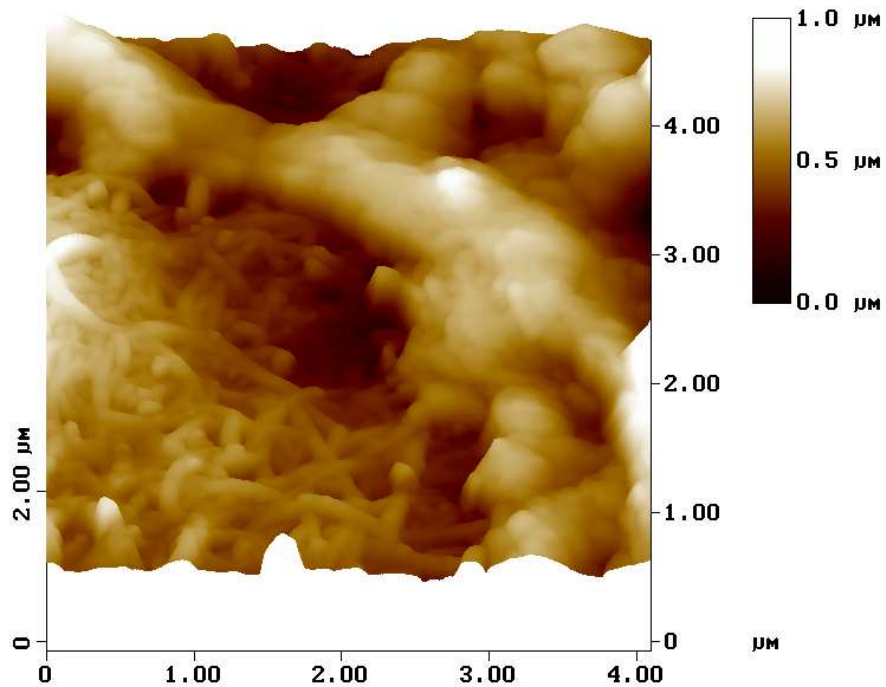
(c) Análisis de sección de célula PC12 sobre película de NTC



(d) Análisis de rugosidad de un área de la película de NTC

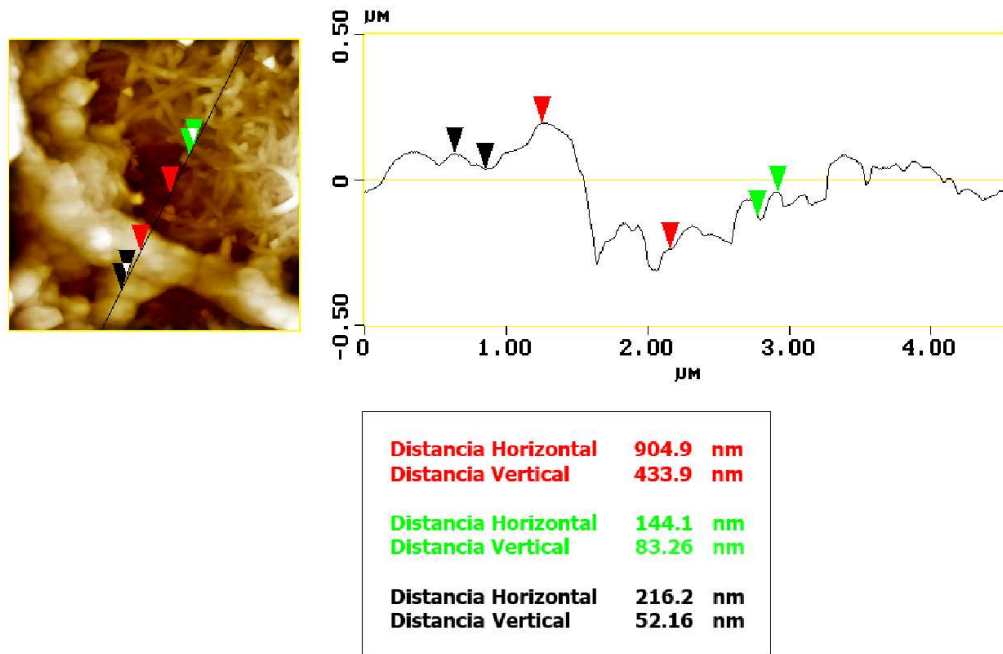


(e) Imagen AFM de alta resolución, del acercamiento a una ramificación de la célula PC12 sobre película de NTC donde se observa el área de contacto entre la célula y la película de NTC

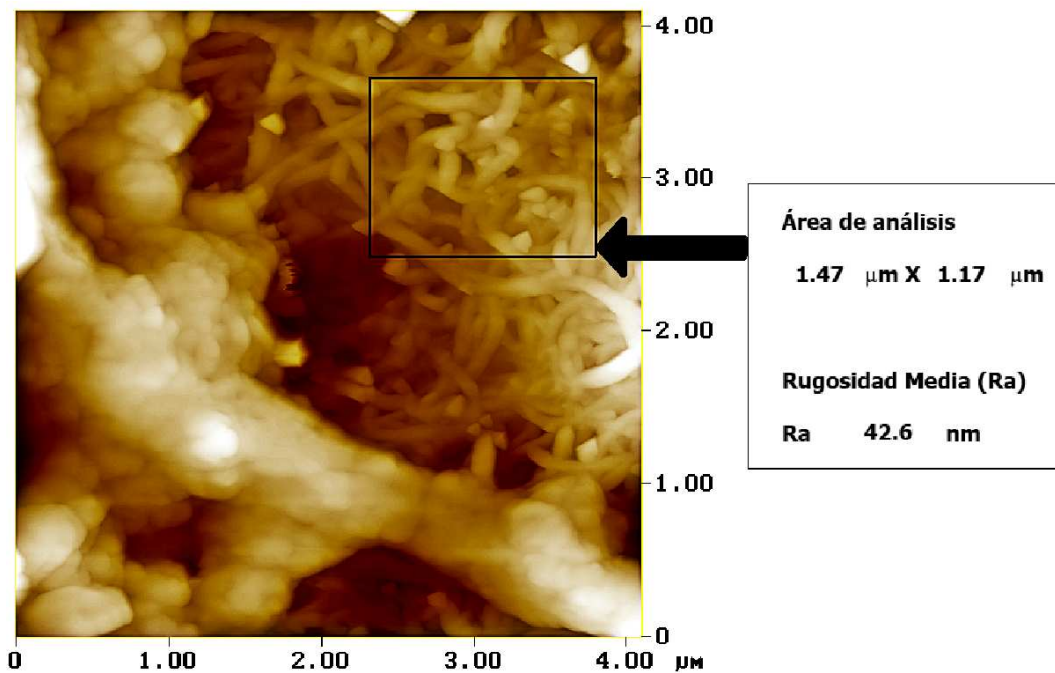


(f) Perfil 3D del acercamiento a una ramificación de la célula PC12 sobre la película de NTC





(g) Análisis de sección del acercamiento a una ramificación de la célula PC12 sobre película de NTC



(h) Análisis de rugosidad de un área de la película de NTC

Figura 5.21: Imágenes AFM de una célula PC12 crecida sobre la película de NTC. Se muestra la altura relativa que alcanzó la célula sobre la película (5.21a), y un perfil tridimensional (5.21b). En (5.21d), se muestra análisis de sección transversal, indicando que la altura de la célula es de  $2.9 \mu\text{m}$  y un ancho de  $6.6 \mu\text{m}$ . El análisis de rugosidad media (5.21c), fue de  $33.2 \text{ nm}$  en un área de  $14 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ . Acercamiento a una ramificación que sale del soma para extenderse sobre la película de NTC (5.21e), (5.21f), en este caso fue posible observar características de la superficie celular y el contacto íntimo con la película. En el análisis de sección se puede notar que la altura entre el inicio de la ramificación y la película es de  $904 \text{ nm}$  (5.21g). En la película, se tiene una rugosidad media de  $42.6 \text{ nm}$  en un área de  $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$  (5.21h).

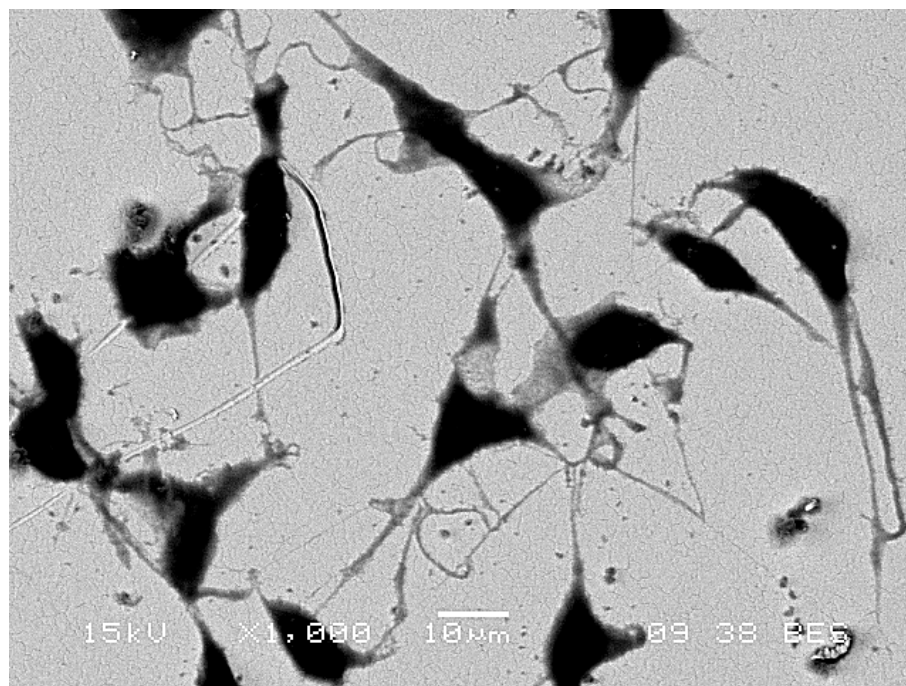
A continuación, se muestra una tabla con los valores de la rugosidad media obtenida para las distintas superficies sobre las que se trabajó (Tabla 5.7). La rugosidad en la superficie aumentó cuando se tuvo la película de nanotubos de carbono gruesa (construida con más aplicaciones de la suspensión). Por otra parte, la rugosidad de la película no se vio modificada durante el proceso de cultivo de las células PC12 ya que no se tuvieron cambios significativos en las mediciones efectuadas antes y después de esta etapa.

Tabla 5.7: Análisis de la rugosidad de la superficie de trabajo en las etapas de construcción y después del cultivo.

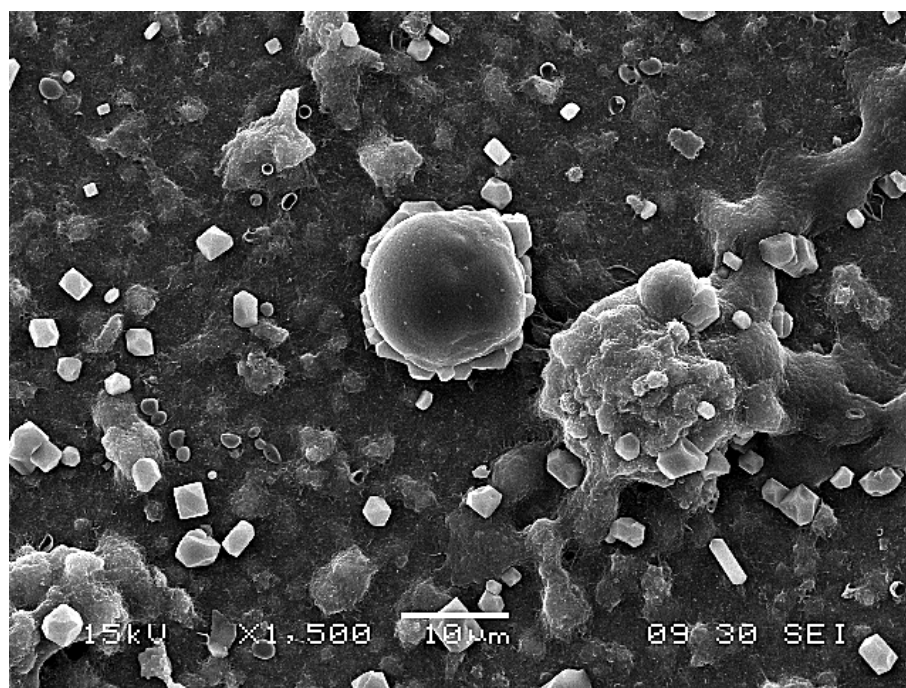
Material	Condiciones	Rugosidad media (Ra)
Placa de oro		1.1 nm
Película de NTC gruesa		119.9 nm
Película de NTC delgada	antes de cultivo	36.3 nm
	después de cultivo	33.2 nm - 42.6 nm

Para complementar la información del crecimiento celular sobre la superficie del electrodo, se realizó el estudio de este por SEM, permitiendo así tener un mayor campo visual y observar más de la superficie del electrodo. A continuación se puede observar a distintos aumentos células diferenciadas creciendo sobre los controles, células sin diferenciar y diferenciadas creciendo sobre la película de nanotubos y acercamientos a zonas donde existe la interacción entre los nanotubos de carbono y el material celular (Figura 5.22).

Primero se tiene una imagen de las células diferenciadas de aproximadamente  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  con sus procesos dendríticos desarrollados sobre una superficie plana en los controles (Figura 5.22a). La siguiente imagen muestra un par de células sin diferenciar cultivadas sobre la superficie de nanotubos así como restos de cristales formados tal vez, a partir del medio de cultivo. Bajo la célula que está más deteriorada, se observa la matriz extracelular, la cual permite que la célula se adhiriera a los nanotubos (Figura 5.22b). A continuación, se tiene un panorama más amplio de la células diferenci-

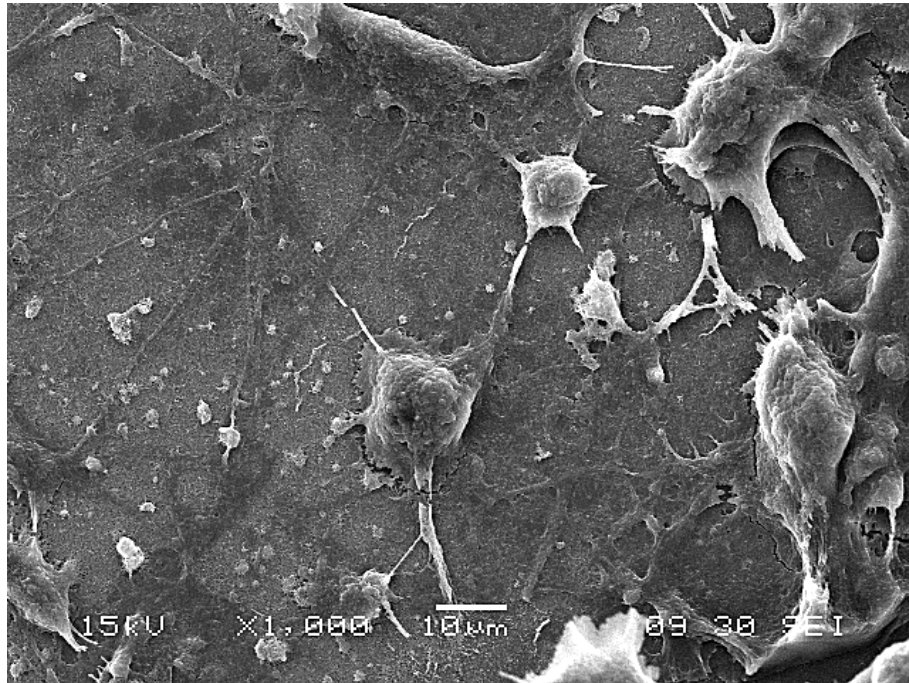


(a) Control del crecimiento celular PC12 diferenciado por SEM

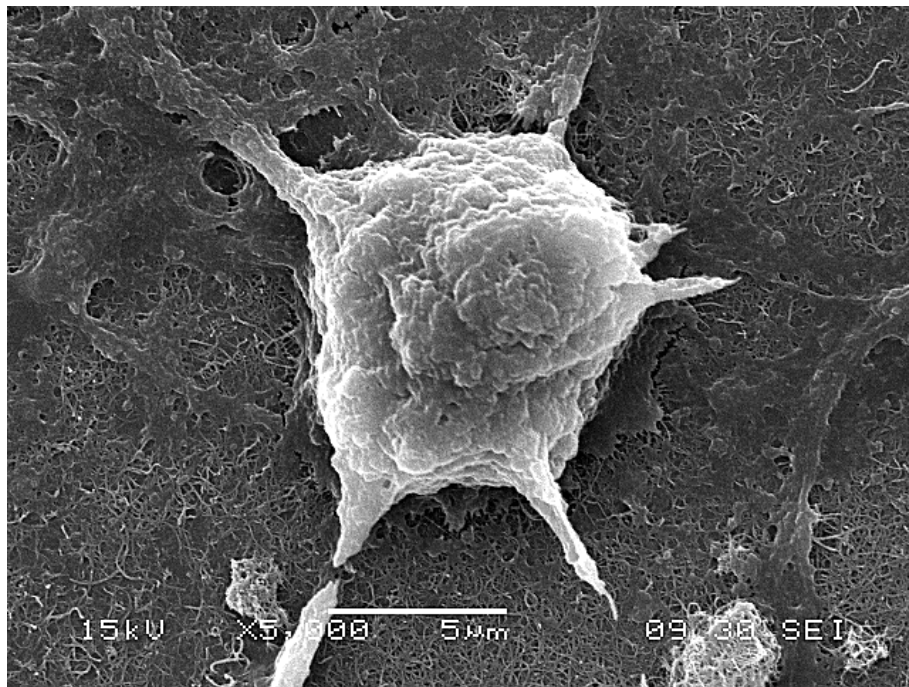


(b) Células PC12 sin diferenciar sobre película de NTC por SEM

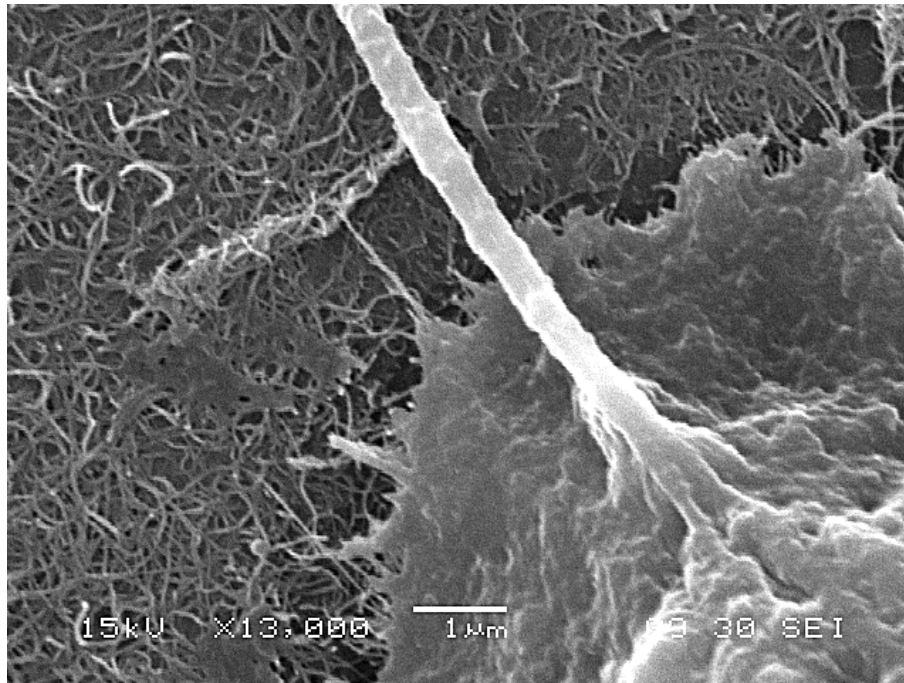




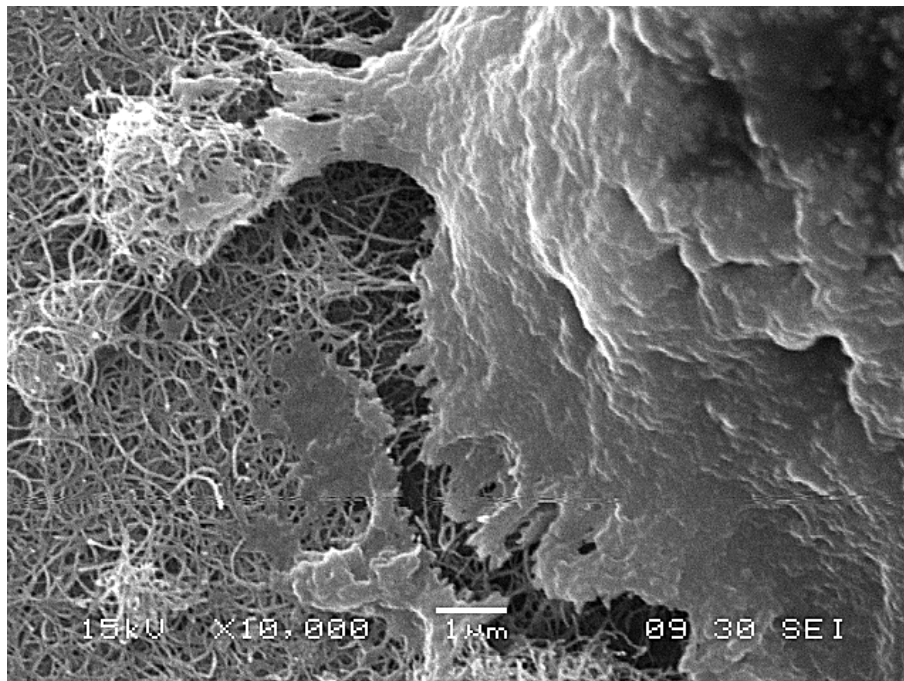
(c) Micrografía SEM de la red celular PC12 sobre película de NTC



(d) Micrografía SEM de alta resolución del acercamiento a célula PC12 crecida sobre la película de NTC



(e) Ramificación de la célula PC12, en detalle del área de contacto entre la célula y la película de NTC



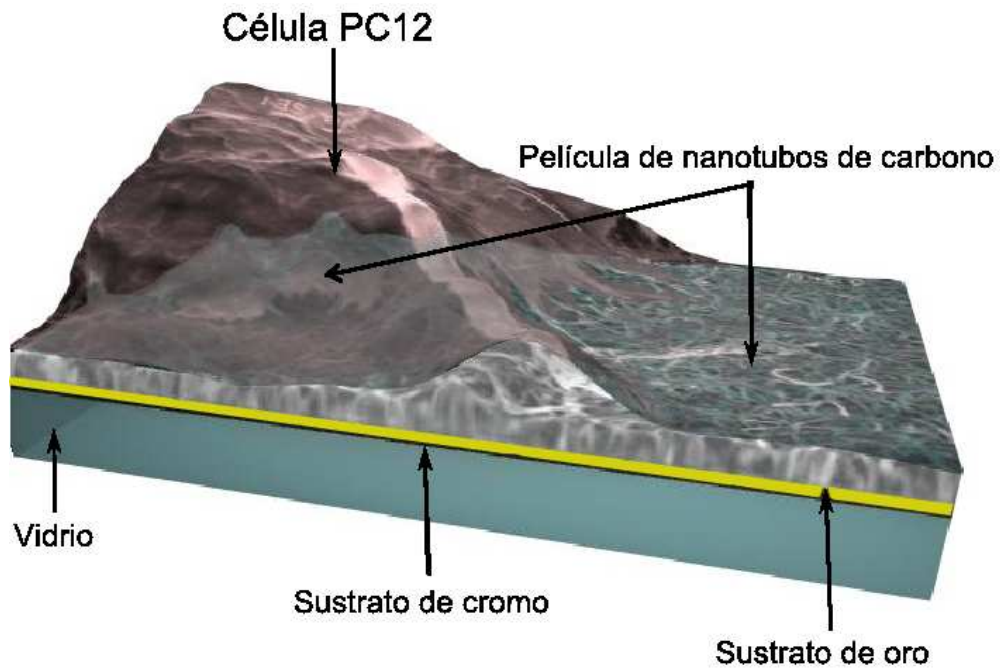
(f) Detalle de la adhesión del material celular a la película de NTC

Figura 5.22: Imágenes SEM de la línea celular PC12 sobre la película de NTC. Se aprecia que el material celular creció sobre la superficie de los electrodos y que gracias a la matriz extracelular se desarrollaron los procesos dendríticos que dieron origen a una red celular. La figura (5.22a) muestra las células PC12 diferenciadas sobre los controles. Células sin diferenciar sobre la superficie de NTC, la matriz extracelular se extiende sobre esta (5.22b). En (5.22c), las células PC12 diferenciadas desarrollan una red de conexiones a través de sus procesos dendríticos. Un acercamiento muestra la matriz extracelular desarrollada por las células para adherirse a la película (5.22d),(5.22e). En (5.22f), se observa una ruptura entre la matriz extracelular y la célula.

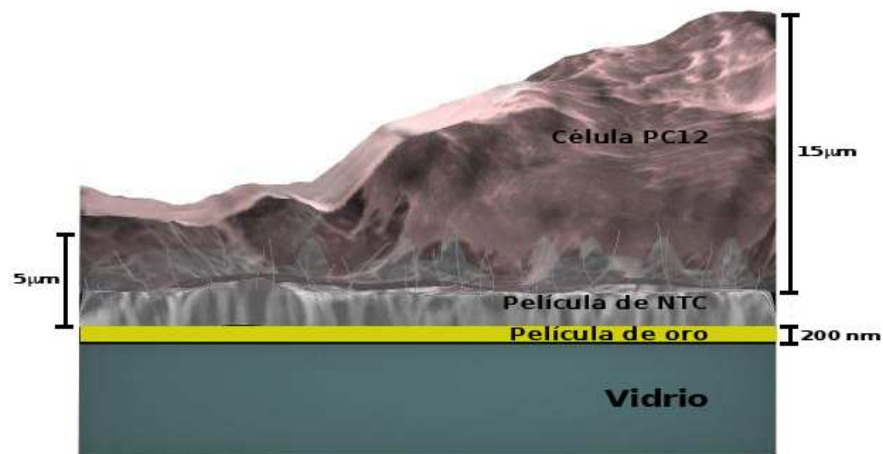


adas creciendo sobre la superficie de nanotubos. Las células así como las ramificaciones y el tejido celular que se observa, presentan varias fracturas y deterioro; sin embargo, es notorio que las células expandieron sobre la superficie toda una red de conexiones a través de sus procesos dendríticos (Figura 5.22c), el acercamiento a una célula muestra que para adherirse a la película de nanotubos, se desarrolló la matriz extracelular. Esta matriz, se interna en la superficie de la película formando una base sobre la que pueden comenzar a crecer (Figura 5.22d). Un acercamiento hacia la orilla del soma, hace más claro que la matriz extracelular cubrió y se internó en la película de nanotubos cerca de los alrededores del soma y probablemente en algunos puntos debajo de sus ramificaciones (Figura 5.22e). La matriz extracelular presenta una ruptura debido a las modificaciones que sufrió el medio y la misma célula durante el proceso de experimentación y fijación (Figura 5.22f).

El siguiente esquema, explica el posible mecanismo de contacto entre la célula y la película de nanotubos (interfase), donde la parte inferior de la célula (matriz extracelular), adopta la forma que tiene la superficie de la película (Figura 5.23). Al no contar con una orientación definida en la organización estructural de los nanotubos dentro de la película, una cierta cantidad de ellos pudieron haberse incorporado a la célula a través de la matriz extracelular.



(a) Esquema de interfase neuronal 3D



(b) Esquema de medidas de la interfase

Figura 5.23: Esquema de interfase célula PC12- película de NTC. La parte inferior de la célula adopta la forma que tiene la superficie de la película. Al no contar con una orientación definida los NTC dentro de la película, una cierta cantidad de ellos pudieron haberse incorporado a la célula a través de la matriz extracelular que sintetizaron para poder adherirse a la superficie.

## Capítulo 6

---

# Discusión

---

### 6.1. Diseño y construcción de electrodos

Como se mostró en los resultados obtenidos del desarrollo de las pruebas eléctricas sobre las placas de oro (Figura 5.1), se agregó un componente resistivo originado por la unión entre el alambre de plata y la superficie de oro conectadas por medio de la pintura conductiva de carbón. La medición efectuada con el multímetro tuvo una magnitud mucho menor que la medición elaborada con el equipo electrofisiológico (de 1189.9  $\Omega$ ), esto se debe principalmente a la forma en que los instrumentos aplicaron la estimulación para el registro de la resistencia, además, en el equipo electrofisiológico, fue necesario conectar en serie un modelo de resistencia de un valor alto para protegerlo, esto, enmascara el valor bajo de la resistencia total.

Una vez comprobada la conductividad eléctrica en las placas, se dispersaron los nanotubos de carbono que formaron la película. Los nanotubos fueron dispersados en diversas soluciones y se desarrollaron las pruebas pertinentes para decidir cuál de las dispersiones era la más apropiada.

En la prueba visual de dispersión de los nanotubos de carbono en las distintas soluciones (Figura 5.2), se observó que a través del tiempo, las suspensiones fueron modificando su constitución en mayor o menor grado. Bajo estas condiciones, se consideró que la solución de PVP mantuvo por más tiempo los nanotubos dispersos ya que no fue posible observar los pequeños conglomerados o la sedimentación que se presentaron en el resto de las suspensiones, mostrando con ello que esta solución fue un mejor agente de dispersión que el resto de las soluciones probadas.

Posteriormente, al depositar las suspensiones sobre la superficie de oro (Figura 5.3), la suspensión de PVP tuvo un mejor comportamiento con respecto a las otras dos suspensiones probadas, la distribución del material tuvo lugar sobre casi la totalidad de la superficie en un depósito mucho más uniforme.

De las imágenes AFM obtenidas para visualizar la distribución de los nanotubos de carbono sobre el sustrato (Figura 5.4), se observó un área donde el material estuviera presente. Por limitaciones mecánicas del instrumento no fue posible visualizar áreas grandes, en este caso se barrió un área de  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ . Los resultados obtenidos, comprueban lo inferido por la inspección visual de la distribución del material sobre el sustrato. Nuevamente, se pudo observar que la suspensión de nanotubos de PVP fue la que mejor dispersó y distribuyó sobre la placa los nanotubos de carbono mostrando menores niveles de aglomeración y nanotubos individuales.

De las pruebas de dispersión efectuadas, se pudo concluir que la suspensión de nanotubos de PVP fue la adecuada para desarrollar la película sobre el sustrato debido a que con esta suspensión, el material se distribuyó de manera más uniforme sobre el área de la placa en una red donde fue posible conseguir que los nanotubos estuvieran haciendo contacto entre ellos, esto como ya se ha mencionado, fue importante para lograr una superficie donde existiera una continuidad de contacto entre los nanotubos de la película y el sustrato metálico.

En base a los resultados anteriores, se construyó la película de nanotubos sobre el electrodo, depositando sobre el área destinada para esta, la suspensión de nanotubos preparada. Así, se construyeron dos tipos de electrodos y se observó a detalle, la morfología y la rugosidad de superficie de la película de nanotubos para cada tipo de electrodo construido.

Con los resultados de la observación mediante AFM, se confirmó la diferencia entre la superficie de la placa de oro del electrodo sin los nanotubos de carbono y la superficie del mismo, pero ahora con la película de nanotubos generada por las aplicaciones de la suspensión de nanotubos (Figura 5.5).

La superficie donde se depositaron e hicieron contacto los nanotubos de carbono esta conformada a base de granos de oro donde en un área de  $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ , se tuvo una rugosidad baja respecto a la obtenida para las siguientes superficies con los nanotubos. Esto indica que las irregularidades de la superficie son menores en el sustrato metálico que las conseguidas con la película de nanotubos. En este caso, las primeras aplicaciones de la suspensión de nanotubos sobre la superficie son las encargadas de establecer el contacto para la transmisión de electrones entre la película de oro y la de los nanotubos de carbono.

En un área de  $4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$  de dicha película en la superficie del electrodo construido sobre la placa de oro (130 aplicaciones de  $15 \mu\text{l}$  de la suspensión), se formó una red compleja y bastante espesa de nanotubos de carbono, que aseguró la posibilidad de transmisión de electrones en ella. La superficie de esta red también es mucho más rugosa que la que se tiene en la placa de oro o en las cajas Petri donde se sembraron los controles, lo que favorece o aumenta los sitios de contacto (anclaje) entre la célula y la superficie de la película.

Para el electrodo construido sobre la placa de oro/vidrio, se hicieron 50 aplicaciones de la misma cantidad de suspensión y se obtuvo en una superficie de  $8 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$ , una película sin demasiadas variaciones en altura mostrando pequeños aglomerados con una altura de hasta 167.4 nm. En este caso, la densidad en la red de nanotubos en la superficie disminuye y la regularidad o uniformidad de la superficie se incrementa. Se comprobó la conductividad eléctrica.

Las imágenes SEM que complementaron el estudio por AFM mostraron a mayor campo visual la distribución de los nanotubos de carbono en la superficie del electrodo (Figura 5.6). Estas nuevas imágenes mostraron y probaron con mayor detalle los resultados obtenidos sobre la formación de la película de nanotubos. Se observó claramente que la superficie donde se sembraron las células no es uniforme, pues se tienen demasiadas irregularidades y fallas originadas por la forma en que se construyó la película.

Con los resultados anteriores, se conoció la morfología y la rugosidad de la superficie sobre la cual se sembró el material celular. Es claro que los nanotubos hacen contacto entre ellos y con el sustrato metálico, lo cual asegura la circulación de electrones. Por otra parte es claro también que la superficie fue bastante irregular, lo que no presenta problema alguno considerando el material celular tiene mejor adherencia a los niveles de rugosidad alcanzados.

Ya construidos los electrodos y caracterizada su superficie, se desarrollaron las pruebas eléctricas para medir la resistencia eléctrica a través del electrodo (desde el alambre de plata hasta la película de los nanotubos).

En los resultados obtenidos del desarrollo de las pruebas eléctricas sobre los electrodos (Figura 5.7), nuevamente se observó que se agregó solo un componente resistivo originado por la unión entre el alambre de plata y la superficie de oro conectadas por medio de la pintura conductiva de carbón

y por el contacto físico entre esta superficie y la película de nanotubos. La medición efectuada con el multímetro tuvo una magnitud mucho menor que la medición elaborada con el equipo electrofisiológico (de aproximadamente  $698.7 \Omega$  para el electrodo construido sobre la placa de oro y de  $865.5 \Omega$  para el construido sobre la placa de oro/vidrio), esto fue debido a la forma en que los instrumentos aplican la estimulación para el registro de la resistencia, además de que en el equipo es necesario conectar un modelo de resistencia de un valor alto para su protección, que enmascaró el valor de la resistencia del electrodo. Con estas últimas pruebas, se verificó la continuidad eléctrica a través del electrodo construido y que la película de nanotubos sólo contribuyó con un efecto resistivo.

Enseguida de comprobar la continuidad eléctrica del electrodo, fue necesario esterilizarlo para poder sembrar el material celular en su superficie. La superficie de la película de nanotubos de carbono, su contacto con la superficie de oro y las conexiones con los alambres de plata, no sufrieron alteraciones físicas en esta etapa, lo que se confirmó con la visualización del electrodo en el microscopio estereoscópico. El esterilizar las muestras no afectó tampoco sus propiedades eléctricas, pues al volver a comprobar la conductividad con el multímetro digital y el equipo electrofisiológico, se obtuvieron los mismos valores aproximados de resistencia.

Se sembró entonces el material celular de cultivo primario y de línea celular sobre la superficie de electrodo y se fue monitoreando el crecimiento celular. Inicialmente se desarrolló una primera etapa de experimentos con el cultivo primario (células de cerebelo de rata).

## 6.2. Cultivo celular

En el caso del crecimiento de células de cultivo primario (Figura 5.8 a 5.10), se tomaron imágenes a un lado de los electrodos pues el cuarto de

cultivos cuenta con un microscopio invertido y, debido a que la película de nanotubos de estos electrodos se construyó sobre el sustrato de oro, no fue posible que la luz atravesara esta superficie, por lo tanto no se obtuvieron imágenes del crecimiento celular sobre la película de nanotubos en estas etapas. Sin embargo, el haber encontrado células creciendo a un lado del electrodo fue un buen indicador ya que en caso de que cualquier material involucrado en la construcción del electrodo fuera tóxico para las neuronas, estas hubieran muerto en las primeras horas de estar en contacto con el medio.

Después de 14 días de haber estado cultivando la células sobre los electrodos, se tomaron imágenes de estas en un microscopio normal, sin embargo, al tener la dificultad del paso de luz a través del material fue necesario el uso de una fuente de iluminación externa, sólo de esta forma, fue posible distinguir a las células creciendo sobre y a un lado de la película de nanotubos en el electrodo (Figura 5.11).

Los resultados obtenidos hasta este punto mostraron que tanto los materiales utilizados en la construcción del electrodo incluyendo la película de nanotubos de carbono, no fueron tóxicos para las células. Las células de cerebelo de rata obtenidas a partir de cultivo primario, son delicadas, fáciles de contaminar y duran menos tiempo que las provenientes de línea celular por lo tanto, es fácil que mueran si no se encuentran en las condiciones ideales para su crecimiento.

Por otra parte, los resultados del cultivo de la línea celular sobre los electrodos (Figuras 5.12 a 5.14), mostraron una vez más que la película de nanotubos no es tóxica ya que además de que las células se encuentran vivas sobre la superficie, se ha dado una proliferación neuronal equiparable a la exhibida en los controles.



El siguiente paso fue la diferenciación del cultivo de la línea celular. En este paso, se agregó el factor de crecimiento neuronal para hacer que las células sembradas desarrollaran procesos dendríticos y se comportaran eléctricamente como una neurona. Primero el material celular fue sembrado sobre controles y electrodos y 48 horas después se comenzó con la etapa de diferenciación. Una vez iniciado el proceso de diferenciación, también se inhibió la proliferación celular (Figura 5.15 a 5.17).

Las células PC12 fueron diferenciadas con éxito sobre los electrodos hasta lograr el desarrollo de una red celular. Con esto se mostró que además de mantenerse el material celular con vida sobre los electrodos, el proceso de diferenciación tampoco fue afectado por la película de nanotubos, pues al igual que con la proliferación, se obtuvo el mismo resultado de diferenciación en los electrodos como en los controles.

El electrodo construido así como las condiciones que se mejoraron para este experimento, permitieron un mejor seguimiento de las distintas etapas del crecimiento celular desde su proliferación hasta la diferenciación a distintos tiempos. Para ambos tipos de cultivo, el material celular se continuó cultivando hasta por 28 días (imágenes no mostradas). A este tiempo, el material celular de cultivo primario comenzaba ya a desprenderse de la superficie lo que indicaba el inicio de la muerte celular. En el caso del cultivo de la línea celular, fue posible observar que las células comenzaban a desprenderse arrancando consigo la película de nanotubos del electrodo en el área sobre la que habían crecido el soma y los procesos dendríticos. Además, en otras regiones del electrodo la película de nanotubos había empezado también a desprenderse.

Ya que se mostró que las células de cultivo primario y de la línea celular sobrevivieron a los cultivos sobre los electrodos con un excelente desarrollo morfológico, se hicieron los registros electrofisiológicos pertinentes para comprobar la funcionalidad celular y la transmisión de señales a través del electrodo.

### 6.3. Registro electrofisiológico

Los resultados de las mediciones con el equipo electrofisiológico hechas al cultivo primario fueron complicadas debido al impedimento del paso de luz del microscopio a través del sustrato metálico y la película de nanotubos. La fuente de iluminación externa, permitió observar que había material celular creciendo sobre el electrodo pero no fue posible identificar claramente el contorno del soma en las células así que se realizaron algunos intentos de pinchar con la micropipeta las células y a pesar de que en ocasiones se logró, la mayoría de las mediciones fue inestable así que solo fue posible hacer mediciones del potencial de membrana en reposo para algunas células. El promedio de los potenciales de reposo obtenidos (Tabla 5.4), es cercano al potencial de reposo de las células neuronales vivas. Con esta prueba además de las observaciones morfológicas, se tiene la certeza de que el material celular se encontraba vivo (funcional) sobre la película de nanotubos.

Para el registro de la línea celular PC12, no se tuvo este problema por la forma de construcción de los electrodos. Como primer paso, se registraron los potenciales de la membrana en reposo de las células diferenciadas en los controles y sobre el electrodo (Tabla 5.5 y 5.6); ya que las propiedades eléctricas de las células sin diferenciar no están completamente desarrolladas pues no expresan los canales iónicos necesarios para estas funciones, se omite este registro [72]. Para las células sembradas en los controles como para las células sembradas sobre los electrodos, los potenciales de membrana en reposo promedio son cercanos al potencial de reposo de las células neuronales vivas. Al igual que con el cultivo primario, no solo se tienen pruebas del crecimiento y de la morfología celular sino que también se comprueba que las células están vivas por la obtención de los potenciales de membrana en reposo.

A continuación, como segundo paso se efectuaron los registros de corrientes iónicas en la línea celular en los controles y sobre los electrodos (Figura 5.18). Sin embargo, es importante mencionar que aún cuando se siguieron los protocolos de cultivo establecidos para la obtención de potenciales de acción en este tipo celular, se observó que uno de los principales canales iónicos para su generación como es el canal de sodio, no se expresó de manera adecuada en la mayor parte de las células y por lo tanto no fue posible su registro espontáneo. La falta de estos canales, probablemente se deba al origen del material celular.

Al no contar con la capacidad celular de producir potenciales de acción, se hizo uso de una técnica para evocarlos o producirlos, técnica comúnmente empleada en la estimulación eléctrica de células excitables (Figura 5.19). Las células mostraron diferentes tipos de respuesta a este estímulo, siendo el más común, un potencial de despolarización originado por la corriente inyectada a la célula seguido por un post-potencial positivo con un decaimiento exponencial que es originado probablemente por el cierre de los canales voltaje dependientes de potasio, esto, antes de que se retorne al potencial de reposo inicial. En ese punto, las propiedades pasivas o lineales de la membrana celular retoman el control de la respuesta al estímulo eléctrico. Otro canal que pudiera intervenir en este efecto, es el canal de calcio; esta población de canales produciría una corriente entrante de despolarización. Así, los canales de calcio al inactivar, terminarían el post-potencial positivo retornando el potencial de membrana al de inicio o de reposo.

Finalmente, empleando la técnica anterior se adquirió la respuesta eléctrica de la célula al pulso de estimulación de corriente de manera simultánea. Mediante el microelectrodo se registro la respuesta eléctrica intracelular y la respuesta eléctrica extracelular se hizo mediante el electrodo construido (Figura 5.20). En este caso, es probable que la magnitud de la corriente aplicada a estas células, no fuera la suficiente para alcanzar la amplitud de voltaje máxima que se obtuvo en los registros anteriores para los poten-

ciales de acción evocados; sin embargo, el post-potencial con decaimiento exponencial fue suficiente para poder realizar el análisis de dicha respuesta. La señal proveniente del electrodo se envió a un amplificador de a.c. con una ganancia de 1000 y una frecuencia de corte de 20 kHz. Al hacer el registro extracelular, los voltajes adquiridos tuvieron la polaridad invertida con respecto al registro intracelular y siguieron en forma y magnitud la etapa de decaimiento exponencial de la señal intracelular. La confirmación del seguimiento es que las constantes de tiempo tanto para el registro intracelular como para el registro extracelular es igual en ambos casos, lo cual quiere decir, que el electrodo de nanotubos reproduce la respuesta de la célula sin distorsionarla. Se considera además que los nanotubos que se incorporaron a la matriz celular (Figura 5.23) y los que se encuentran por debajo del soma de cada célula registrada, son los puntos principales de comunicación eléctrica entre la célula y el electrodo.

Con la técnica de potenciales de acción evocados, se logró estimular y registrar simultáneamente intra y extracelularmente células individuales, sin que las células vecinas aportarán respuesta eléctrica (interferencia o ruido) alguna al registro. Entonces respecto a los resultados obtenidos en este punto, la transmisión eléctrica entre el material celular y el electrodo fue posible gracias a la película de nanotubos. El registro extracelular siguió de manera fiel la forma y magnitud de la señal intracelular provocada por un estímulo de corriente.

#### **6.4. Visualización AFM y SEM**

Con el fin de observar la forma en que las células interactuaron con la película de nanotubos, se adquirieron imágenes AFM y SEM del material celular cultivado sobre los electrodos.

De la línea celular PC12, se adquirió la imagen AFM de una célula diferenciada que adoptó una forma similar a la de una neurona bipolar así como un acercamiento en una ramificación de la célula (Figura 5.21). Al intentar observar la totalidad de la célula y la película de nanotubos en el mismo acercamiento, se modificaron las condiciones mecánicas del instrumento y, debido a las dimensiones físicas de la célula, se trabajó en los límites de este, es por ello, que la célula se observa en color blanco indicando la altura máxima en la imagen y no fue posible observar con claridad ambas superficies. En este punto, la superficie de la película vista desde las dimensiones celulares, es prácticamente plana.

El análisis de rugosidad se realizó para comparar si durante la etapa de cultivo la constitución física de la película de nanotubos cambió. La rugosidad obtenida para la película antes de cultivar el material celular sobre esta fue de 36.3 nm en un área de  $8\ \mu\text{m} \times 8\ \mu\text{m}$ , que es similar a la rugosidad medida después del cultivo que fue de 33.2 nm, indicando así que la película no sufrió cambios físicos significativos durante esta etapa.

En el acercamiento a una ramificación de la célula, fue claro que al trabajar a dimensiones menores, la calidad de la imagen así como los detalles mejoran bastante haciendo notoria la diferencia entre la superficie de la célula y la de la película nanotubos. La superficie de la célula pudo haber sufrido modificaciones ya que previo a su fijación algunas células fueron registradas electrofisiológicamente y para ello fue necesario cambiar los medios de cultivo donde crecían por soluciones salinas además, pudieron haber sido pinchadas por la micropipeta de registro o modificadas durante el proceso de fijación. Se observó también, que la superficie de la película de nanotubos es más irregular que la superficie de la célula. A este nivel, algunas de las características de la superficie celular tienen dimensiones similares a las mostradas por los nanotubos. La rugosidad de la película aumentó los sitios de contacto y por tanto la adherencia de las células en la superficie.

Las imágenes SEM que complementan el estudio de AFM, muestran un mayor campo visual y ofrecen detalles diferentes del estudio anterior (Figura 5.22). En este estudio fue posible observar con detalle el crecimiento del material celular desde la etapa anterior a la diferenciación hasta el desarrollo de la red celular formada por los procesos dendríticos. El material celular, mostró una cantidad importante de fracturas y deterioro que pudo haber sido ocasionado al hacer el cambio de soluciones para el registro electrofisiológico o cuando el material celular fue fijado sobre la superficie del electrodo mediante el tren de alcoholes. Mediante un acercamiento sobre la región que rodea el soma existe una ruptura entre la matriz extracelular que se adhiere a la película de nanotubos y la célula.

La ruptura que se presenta entre el tejido celular y la célula, pudo haber sido ocasionada por esas mismas causas, haciendo que esta modificara su tamaño (encogiéndose) rompiendo así ese tejido que se encontraba anclado en los nanotubos, arrancando consigo la superficie de la película de nanotubos adherida debajo de la célula. Otra explicación posible, es que con el tiempo que estuvo la superficie de la película de nanotubos bajo distintas soluciones y del material celular, ésta haya modificado su estructura mecánica ocasionando su desprendimiento del resto de la película como se había observado durante el transcurso del cultivo celular.

De los resultados anteriores, se consiguió información de cómo fue la interacción del material celular con la película de nanotubos de carbono. Por un lado mediante AFM se obtuvo información de las propiedades físicas reales de la película de nanotubos y de las células cultivadas. Por SEM se visualizaron áreas más grandes y detalles más específicos de lo que ocurrió en la superficie de los electrodos. Con este estudio, se mostró que la irregularidad de la superficie no presentó demasiados problemas para que las células pudieran crecer sobre ella, además, es fácil notar que las células tuvieron contacto íntimo con la película de nanotubos (Figura 5.23).

En el presente trabajo se empleó el conocimiento adquirido hasta ahora sobre la preparación de electrodos basados en nanotubos de carbono [47], [50], [74]. Se construyó un electrodo cuyo principal componente fueron los nanotubos de carbono. Se logró obtener una película de nanotubos de carbono con alta estabilidad mecánica, biocompatible y conductiva.

Por distintas razones, el registro de una población neuronal no fue posible, sin embargo por primera vez, se observaron registros electrofisiológicos de células individuales en electrodos construidos a base de nanotubos de carbono, lo que permite un mejor entendimiento de la comunicación eléctrica en este tipo de interfaces además, se mostró con gran detalle como se adhiere el material celular a la película de nanotubos.

Todo esto, además de ayudar de alguna manera a entender y soportar las explicaciones anteriores, contribuye de manera importante con conocimiento que puede ser de gran ayuda en el desarrollo de implantes neuronales de alta eficiencia.





## Capítulo 7

---

# Conclusiones

---

Los nanotubos de carbono tienen el potencial para ser empleados en la construcción de electrodos para las interfaces neuronales porque son elementos capaces de transmitir señales eléctricas sin distorsión a través de ellos, además, gracias a sus dimensiones físicas, se puede obtener una mejor ubicación para la inyección o la adquisición de señales bioeléctricas en lugares tan específicos como una neurona dentro del sistema nervioso.

En el presente proyecto, se diseñó y construyó un electrodo a base de una red de nanotubos de carbono donde se cultivó y estimuló eléctricamente material celular neuronal de cultivo primario y de una línea celular donde los nanotubos de carbono mostraron ser elementos biocompatibles que permitieron el desarrollo de material biológico y la transmisión de señales bioeléctricas provenientes de las células a través de ellos.

En cuanto a la transmisión de señales eléctricas, los nanotubos de carbono sólo presentan una resistencia baja ya que transmiten de manera fiel las señales bioeléctricas de las células estimuladas. Con la ayuda de un protocolo de estimulación, se presenta la ventaja de poder realizar registros electrofisiológicos en células individuales, a diferencia de los trabajos real-

izados anteriormente donde se obtenían registros de una población neuronal [47]-[56]. Esta diferencia permite observar con mayor claridad la fidelidad de la comunicación eléctrica entre los nanotubos de carbono y la célula neuronal. Un futuro estudio electroquímico es necesario para comprender la transmisión de esta señal bioeléctrica entre la célula neuronal y el electrodo de nanotubos.

Dentro de las mejoras que se deben hacer para la construcción de electrodos de este tipo, es indispensable mejorar la técnica de construcción de la película de nanotubos ya que después de un tiempo esta comenzaba a desprenderse.

Se considera que, aún cuando existen muchas preguntas sobre los nanotubos de carbono y su interacción con el material celular neuronal y sobre los efectos que pudieran tener dentro del cuerpo humano, el nanotubo de carbono es un material que puede estar presente en las interfaces neuronales del futuro por sus propiedades eléctricas, mecánicas y químicas reveladas hasta ahora.

---

# Bibliografía

---

- [1] [http://en.wikipedia.org/wiki/Nervous\\_system](http://en.wikipedia.org/wiki/Nervous_system), Agosto 2009.
- [2] W.J. Germann, C.L. Stanfield. *Principles of human physiology*. Benjamin Cummings, segunda edición, Octubre 2004.
- [3] F.F. Evans-Martin. *The nervous system. Your body how it works*. Chelsea House Publications, Octubre 2004.
- [4] J. Rae-Dupree, P. DuPree. *Anatomy and physiology for dummies*. John Wiley & Sons, primera edición, Mayo 2007.
- [5] D. Johnston, S. Wu. *Foundations of cellular neurophysiology*. The MIT Press, primera edición, Noviembre 1995.
- [6] S. Shoham. *Advances towards an implantable motor cortical interface*. PhD thesis, The University of Utah, Diciembre 2001.
- [7] M.J. Black, E. Bienenstock, J.P. Donoghue. Connecting brains with machines: The neural control of 2d cursor movement. <http://www.cs.brown.edu/~black/Papers/blackCapri.pdf>, Agosto 2009.
- [8] M.N. Sampedro. Reparación de las lesiones del sistema nervioso central. [http://www.infomedula.org/docs/ficheros/200205290019\\_32\\_0.pdf](http://www.infomedula.org/docs/ficheros/200205290019_32_0.pdf), Agosto 2009.
- [9] [http://www.secpre.org/documentos manual\\_59.html](http://www.secpre.org/documentos/manual_59.html), Agosto 2009.
- [10] K. Pérez. *Respuesta de las células gliales al daño neuronal in vitro*. PhD thesis, Universidad de Barcelona, Febrero 2006.
- [11] <http://fc.viguera.com/maestria2009/course/viewnolog.php?id=3>, Agosto 2009.
- [12] <http://escuela.med.puc.cl/publ/Cuadernos/2001/18.html>, Agosto 2009.
- [13] M. Nieto-Sampedro, J.E. Collazos-Castro, J.S. Taylor. Trauma en el sistema nervioso central y su reparación. *Revista Española de Neurología*, 35(6):534–552, Octubre 2002.
- [14] J.A. Kiernan. *Barr el sistema nervioso humano. Una perspectiva anatómica*. Lippincott Williams & Wilkins, novena edición, Mayo 2009.

- [15] R.S. Rosales. Lesiones de los nervios periféricos en la mano. [www.gecot.com/scm/scm\\_descarga\\_fichero.asp?id=41](http://www.gecot.com/scm/scm_descarga_fichero.asp?id=41), Agosto 2009.
- [16] G. Handa. Neural prosthesis - past, present and future. *Indian Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 17:1–2, Abril 2006.
- [17] M.A. Nicolelis. Actions from thoughts. *Nature*, 409:403–407, Enero 2001.
- [18] <http://www.uic.edu/labs/AMReL/projpr08.pdf>, Agosto 2009.
- [19] P.J. Castaño, F.Q. García, A.M. Villa. Interfaces neuronales y sistemas máquina-cerebro: fundamentos y aplicaciones. *Revista Española de Ingeniería Biomédica*, 1(1):14–22, Mayo 2007.
- [20] J.R. Wolpaw, N. Birbaumer, D.J. McFarland. Braincomputer interfaces for communication and control. *Elsevier Clinical Neurophysiology*, 113(6):767–791, Junio 2002.
- [21] M.A. Lebedev, M.A. Nicolelis. Brain-machine interfaces: past, present and future. *Elsevier Trends in Neurosciences*, 29(9):536–546, Julio 2006.
- [22] J.K. Chapin. Using multi-neuron population recordings for neural prosthetics. *Nature Neuroscience*, 7(5):452–455, Mayo 2004.
- [23] S.A. Deadwyler, R.E. Hampson. Ensemble activity and behavior: What's the code. *Science AAAS*, 270(5240):1316, Noviembre 1995.
- [24] M. Laubach, J. Wessberg, M.A Nicolelis. Cortical ensemble activity increasingly predicts behaviour outcomes during learning of a motor task. *Nature*, 405(6786):567–571, Junio 2000.
- [25] J. Wessberg, C.R. Stambaugh, J.D. Kralik. Real-time prediction of hand trajectory by ensembles of cortical neurons in primates. *Nature*, 408:361–365, Noviembre 2000.
- [26] S. Kelly, D.Burke. Parametric models and classification for direct brain interfaces. [http://dsp.ucd.ie/dspfiles/main\\_files/pdf\\_files/simon\\_ISSC2002.PDF](http://dsp.ucd.ie/dspfiles/main_files/pdf_files/simon_ISSC2002.PDF), Agosto 2009.
- [27] A.B. Schwartz. Cortical neural prosthetics. *Annual Review of Neuroscience*, 27:487–507, Julio 2004.
- [28] X. Navarro, T.B. Krueger, N. Lago. A critical review of interfaces with the peripheral nervous system for the control of neuroprostheses and hybrid bionic systems. *Journal of the Peripheral Nervous Systems*, 10(3):229–258, Septiembre 2005.
- [29] V.S. Polikov, P.A. Tresco, W.M. Reichert. Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. *Elsevier Neuroscience Methods*, 148(1):1–18, Agosto 2005.
- [30] A. Brannan, S. Richardson-Burns, D. Martin. Fabrication and characterization of nanostructured conducting polymer films on the surfaces of microfabricated neural prosthetic biosensors. <http://www.nnin.org/doc/2005NNINreuBrannan.pdf>, Agosto 2009.
- [31] M. Akay. *Handbook of neural engineering*. IEEE Press Series On Biomedical Engineering. IEEE Computer Society Press, 2007.
- [32] M. Akay, editor. *Wiley encyclopedia of biomedical engineering*, volume 6. Wiley-Interscience, primera edición, Abril 2006.

- [33] G.E. Wnek, G.I. Bowlin, editor. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*, volume 1. Informa Healthcare, segunda edición, Mayo 2008.
- [34] J.P. Donoghue. Connecting cortex to machines: recent advances in brain interfaces. *Nature Neuroscience*, 5:1085–1088, Noviembre 2002.
- [35] G.A. Silva. Nanotechnology approaches for the regeneration and neuroprotection of the central nervous system. *Surgical Neurology*, 63(4):301–306, Junio 2005.
- [36] P.J. Harris. *Carbon nanotubes and related structures*. Cambridge University Press, primera edición, Enero 1999.
- [37] <http://www.cheaptubesinc.com/nanotechfaqs.htm>, Agosto 2009.
- [38] M. Daenen, R.D. de Fouw. The wondrous world of carbon nanotubes: a review of current nanotube technologies. [http://students.chem.tue.nl/ifp03/Wondrous World of Carbon Nanotubes\\_Final.pdf](http://students.chem.tue.nl/ifp03/Wondrous%20World%20of%20Carbon%20Nanotubes_Final.pdf), February 2003.
- [39] P.M. Ajayany, T.W. Ebbesen. Nanometre-size tubes of carbon. *Reports on Progress in Physics*, 60: 1025–1062, Mayo 1997.
- [40] P.T. Kissinger, W.R. Heineman. *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*. CRC, segunda edición, Enero 1996.
- [41] <http://nano.ece.uci.edu/Nano04/Lectures/Lecture13Notes.pdf>, Agosto 2009.
- [42] S.Ayad, R. Boot-Handford. *The Extracellular Matrix FactsBook*. Academic Press, segunda edición, Junio 1998.
- [43] A.B. Kaiser, K.J. Challis, G.C. McIntosh. Frequency and field dependent conductivity of carbon nanotube networks. *Elsevier Applied Physics*, 2(2):163–166, Abril 2002.
- [44] G. Gruner. Carbon nanonets spark new electronics. <http://www.ece.gatech.edu/research/labs/bwn/nanos/papers/nanonets.pdf>, Mayo 2007.
- [45] E. Bekyarova, M.E. Itkis, N. Cabrera. Electronic properties of single-walled carbon nanotube networks. *Journal of the American Chemical Society*, 127(16):5990–5995, Abril 2005.
- [46] Y.W. Fan, F.Z. Cui, S.P. Hou. Culture of neural cells on silicon wafers with nano-scale surface topograph. *Journal of Neuroscience Methods*, 120(1):17–23, Octubre 2002.
- [47] T.J. Webster, M.C. Waid, J.L. Mackenzie. Nano-biotechnology: carbon nanofibres as improved neural and orthopaedic implants. *Institute of Physics Nanotechnology*, 15(1):48–54, Enero 2004.
- [48] S. Bejanin. Nanocoatings for surface functionalization. <http://www.surfactis.com/pdf/surfactis.pdf>, Agosto 2009.
- [49] D.L. Shi, J. Lian, W. Wang. Luminescent carbon nanotubes by surface functionalization. *Advanced Materials*, 18:189–193, Enero 2006.
- [50] V. Lovat, D. Pantarotto, L. Lagostena. Carbon nanotube substrates boost neuronal electrical signaling. *Nano letters*, 5(6):1107–1110, Mayo 2005.

- [51] D.B. Nguyen-Vu, H. Chen, A. Casell. Carbon nanofiber nanoelectrode array for closed-loop electrical stimulation. [http://www.ifess.org/ifess05/Poster Session 1/Nguyen-Vu TDB.pdf](http://www.ifess.org/ifess05/Poster_Session_1/Nguyen-Vu_TDB.pdf), Julio 2005.
- [52] J. Xie, L. Chen, K.R. Aatre. Somatosensory neurons grown on functionalized carbon nanotube mats. *Smart Materials and Structures Institute of Physics*, 15:N85–N88, Junio 2006.
- [53] K. Wang, H.A. Fishman, H. Dai. Neural stimulation with carbon nanotube microelectrode array. *Nano letters*, 6(9):2043–2048, Agosto 2006.
- [54] M.K. Gheith, T.C. Pappas, A.V. Lipo. Stimulation of neural cells by lateral current in conductive layer by layer films of single walled carbon nanotubes. *Advanced Materials*, 1(18):2975–2979, Agosto 2006.
- [55] T. Gabay, M. Ben-David, I. Kalufa. Electro-chemical and biological properties of carbon nanotube based multielectrode arrays. *Nanotechnology Institute of Physics*, 18(3):352, Enero 2007.
- [56] A. Mazzatenta, M. Giugliano, S. Campidelli. Interfacing neurons with carbon nanotubes: Electrical signal transfer and synaptic stimulation in cultured brain circuits. *The Journal of Neuroscience*, 27(26): 6931–6936, Junio 2007.
- [57] [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342007000600011&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342007000600011&lng=pt&nrm=iso), Agosto 2009.
- [58] <http://www.imss.gob.mx/NR/rdonlyres/4248D910-0FE4-4EBF-9595-790ED69A65CA/0/ac0101.pdf>, Agosto 2009.
- [59] M.P. Mattson, R.C. Haddon, A.M. Rao. Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth. *Journal of Molecular Neuroscience*, 14(3):175–182, Junio 2000.
- [60] H. Hu, Y. Ni, V. Montana. Chemically functionalized carbon nanotubes as substrates for neuronal growth. *Nano letters*, 6(3):507–509, Junio 2004.
- [61] J.F. Shackelford. *Ciencia de materiales para ingenieros*. Prentice Hall, tercera edición, Junio 1995.
- [62] <http://www.2spi.com.mx/catalog/gold-sub.shtml>, Agosto 2009.
- [63] <http://asemblon.com/system/files/GoldPreparationProcedure.pdf>, Agosto 2009.
- [64] Ma. A. García. Estudio de células del sistema nervioso por microscopía de fuerza atómica. Master's thesis, IPN, Marzo 2005.
- [65] X.Q. Brown, K. Ookawa, J.Y. Wong. Evaluation of polydimethylsiloxane scaffolds with physiologically-relevant elastic moduli: interplay of substrate mechanics and surface chemistry effects on vascular smooth muscle cell response. *Elsevier biomaterials*, 26(16):3123–3129, Septiembre 2005.
- [66] A.Y. Fu, H. Chou, C. Spence. An integrated microfabricated cell sorter. *Analytical Chemistry*, 74(11): 2451–2457, Abril 2002.
- [67] <http://en.wikipedia.org/wiki/Viscosity>, Agosto 2009.
- [68] D.R. González. Desinfección y esterilización. [http://www.uvs.sld.cu/Desinfeccion y Esterilizacion.pdf](http://www.uvs.sld.cu/Desinfeccion_y_Esterilizacion.pdf), Agosto 2009.

- [69] R.I. Freshney. *Culture of Animal Cells*. Wiley-Liss, cuarta edición, Abril 2000.
- [70] P.H. O'lague, S.L. Huttner. Physiological and morphological studies of rat pheochromocytoma cells (pc12) chemical fused and grow in culture. *Neurobiology*, 77(3):1701–1705, Marzo 1980.
- [71] P. Castellanos, R. Godínez, V. Medina. *Electrofisiología humana. Un enfoque para ingenieros*. UAM, Enero 1997.
- [72] B. Rudy, B. Kirschenbaum, L.A. Greene. Nerve growth factor-induced increase in saxitoxin binding to rat pc12 pheochromocytoma cells. *Journal of Neuroscience*, 2(10):1405–1411, Abril 1982.
- [73] <http://www.elergonomista.com/biologia/mech.htm>, Agosto 2009.
- [74] T.D. Nguyen-Vu, H. Chen. Vertically aligned carbon nanofiber architecture as multifunctional 3-d neural electrical interface. *IEEE transactions on biomedical engineering*, 54(6):1121–1127, Junio 2007.





# Apéndices



## Apéndice A

---

# Diseño e instalación de cuarto de cultivos

---

Una parte fundamental del proyecto fue el diseño y puesta en marcha del cuarto de cultivos celulares pues es en este lugar donde se llevaron a cabo los trabajos de adquisición, descongelación y crecimiento de material celular. Este espacio debe cumplir con las mejores condiciones de asepsia posibles, ser libre de polvo, estar aislado de la circulación de personal y contar con un sistema de ventilación y eliminación de bacterias eficiente. También es importante que se cuente con un sistema de alimentación de energía ininterrumpida.

El cuarto de cultivos se construyó en el laboratorio de Biofísica edificio AT cubículo 221 de la Universidad Autónoma Metropolitana plantel Izta-palapa.

El cuarto de cultivo se diseñó de manera que se tuvieran dos secciones. La primer sección es el llamado cuarto gris, que es un área donde se almacenan soluciones, reactivos y material celular (a baja temperatura), instrumental, cristalería, equipo de laboratorio (esterilizadora, centrífuga, baño

maría, etc.) y un espacio para lavado de material. Esta sección es un área de trabajo que no se encuentra en contacto continuo con el material celular.



Figura A.1: Cuarto Gris.

La segunda sección es propiamente el cuarto limpio, que es donde se van a mantener los cultivo celulares, esta área debe contar con equipo de laboratorio (campana de flujo laminar, incubadora de  $CO_2$ , microscopio invertido, mechero), área de almacenamiento de material esterilizado y un sistema de adquisición de imágenes.

La segunda sección o cuarto limpio debe mantener siempre una presión positiva con respecto al cuarto gris para que al abrir la puerta, las partículas de polvo o bacterias no entren. Es por ello que se instalo un ventilador que extrae el aire del cuarto gris, lo hace pasar por un filtro de  $0.2 \mu m$  y finalmente lo envía hacia el cuarto limpio, esto se hace de manera constante mientras se esté trabajando en el cuarto.



Figura A.2: Cuarto Limpio.

Por otra parte, en ambas secciones se instalaron lámparas UVC cuya longitud de onda está entre 200 y 290 nm que es la porción más energética del espectro UV y tiene acción bactericida. Para lograr que las secciones se encuentren limpias de bacterias, se instaló un temporizador que enciende las lámparas en los momentos que nadie se encuentra trabajando en los cuartos por un periodo no menor de 4 horas.

La sección del cuarto limpio cuenta, como ya se mencionó, con una incubadora de  $CO_2$ . Para que la incubadora funcione adecuadamente fue necesario efectuar la instalación del tanque de  $CO_2$ . El tanque se encuentra en el cuarto gris y se instaló un manómetro para regular la presión de trabajo de la incubadora así como las mangueras adecuadas para hacer llegar el gas. Es importante decir que los elementos de conexión utilizados deben ser los requeridos por las especificaciones para evitar fugas o accidentes.

En esta sección se instaló también un sistema de adquisición de video que consta de una computadora personal con tarjeta y software de adquisición de imágenes y una cámara CCD empotrada a un microscopio invertido. Este sistema tiene el fin de ir registrando el crecimiento del material celular en sus diferentes etapas.

Se habilitó el mobiliario restante efectuando una limpieza primero con agua, después con benzal y al último con alcohol antes de entrar en el cuarto para evitar posibles contaminaciones debidas al mismo. Finalmente se habilitó el resto del equipo a utilizar.

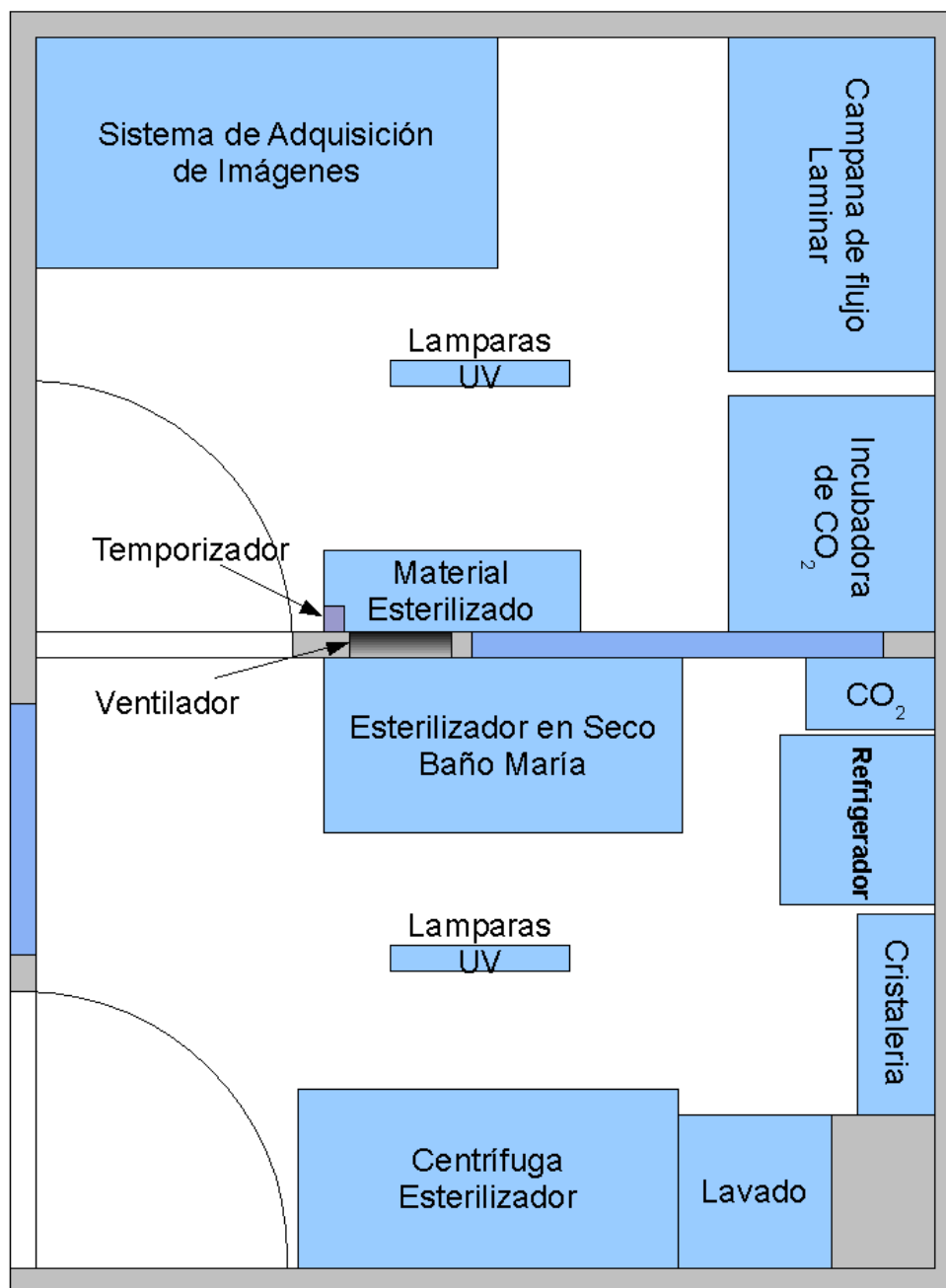


Figura A.3: Cuarto de Cultivos.





## Apéndice B

---

# Manuales de operación

---

Dentro del proyecto y específicamente en la puesta en marcha del cuarto de cultivos fue necesario desarrollar los instructivos de operación del equipo que se utilizó en el laboratorio.

### **B.1. Instrucciones de operación del esterilizador de vapor**

#### **Instrucciones de seguridad**

Antes de operar

- Revisar que los instrumentos y salidas de presión estén en su lugar y que no estén obstruidos.
- No poner aceite dentro o sobre el esterilizador.
- No exponerlo a cambios de temperaturas extremos (enfriamiento o calentamiento repentino).
- No utilizar el esterilizador con otros fines (cocinar). Use anteojos de seguridad.



Figura B.1: Esterilizador de vapor.

- Verificar que el contacto metal-metal entre la tapa y el esterilizador este lubricado.

Al finalizar

- No tocar las superficies calientes. Use las agarraderas. Y tenga trapos húmedos para manejar los elementos calientes.
- Extremo cuidado al mover el esterilizador cuando este contenga líquidos calientes.
- Alejar partes del cuerpo del vapor que sale de la válvula de control al abrirla.
- No aflojar las mariposas del esterilizador hasta que el manómetro registre cero y haber desalojado la presión sobrante mediante la válvula de control.
- No abrir hasta que la unidad se halla enfriado. Incline la tapa poniéndola en ángulo lejos de usted para evitar el contacto directo con el vapor restante.

### **Instrucciones de limpieza y mantenimiento**

- Al terminar de operar el esterilizador se debe extraer el agua, enjuagarlo con un poco de agua destilada y secar completamente con trapo limpio (de uso exclusivo).
- No dejar agua en la unidad por periodos prolongados de tiempo.
- Mantener la tapa sobre el esterilizador mientras no este en uso.

- Cuando comience a notarse la presencia de acumulaciones de sales o depósitos de minerales reportar inmediatamente para su limpieza.
- Revise periódicamente las partes del esterilizador y notifique puntualmente a la persona responsable.

### **Instrucciones de operación**

- Remover la tapa haciendo girar las mariposas en sentido anti-horario. Siempre afloje dos mariposas opuestas a la vez.
- Remover el recipiente interno de aluminio.
- Colocar el estante de soporte en el interior del esterilizador (si no lo está).
- Llenar el esterilizador con agua destilada hasta que alcance una altura de entre 6 y 7 centímetros de profundidad. Puede agregar agua destilada previamente calentada para reducir el tiempo de inicio.
- Por otra parte coloque la parrilla con el borde hacia abajo en el fondo del recipiente interno de aluminio.
- Coloque los artículos a esterilizar sobre la parrilla a manera de que el vapor circule libremente, si lo desea puede poner una toalla limpia (exclusiva) sobre los artículos a esterilizar para absorber cualquier humedad proveniente de la tapa por condensación.
- Poner el recipiente interno de aluminio dentro del esterilizador verificando que el tubo de escape de aire este dentro del recipiente interno de aluminio y al lado derecho.
- Poner la tapa asegurándose de que el tubo de escape de aire es insertado en la guía o canal que se encuentra en la pared interna del recipiente interno de aluminio y que la flecha de señal en la tapa este alineada con la línea de marca a un lado del esterilizador.
- Apretar fuertemente las mariposas, siempre dos mariposas opuestas a la vez. Conectar el equipo y cambiar la posición del interruptor a la posición “ON” (encendido) verificando que la luz piloto se ha prendido. Ajustar el termostato un número anterior al máximo.
- Abrir la válvula de control colocando su palanca en posición vertical. Es importante dejar escapar el vapor por lo menos entre 5 o 7 minutos o hasta que se vea un flujo de vapor continuo para así remover el aire existente dentro de la unidad.

- Cerrar la válvula de control y registrar el cambio de presión indicado por el manómetro de vapor.
- Regular el calor deseado a través de la perilla del termostato. Cuando el manómetro de vapor alcance la presión de trabajo (19-21 psi) reduzca el calor aplicado. Mantenga vigilada la presión y ajuste el calor necesario donde esta se conserve.
- Una vez que se alcance la presión de trabajo, cronometrar un tiempo no menor de 35 minutos para que se lleve a cabo la esterilización de los artículos.
- Apagar el equipo cambiando la posición del interruptor a “OFF” (apagado). Abrir con cuidado la válvula de control (se recomienda el uso de trapo húmedo) para dejar escapar el vapor contenido en el interior.
- Cuando la presión en el manómetro de vapor indique cero, abrir las mariposas siempre aflojando dos mariposas opuestas a la vez. Use almohadillas o trapos húmedos puesto que los elementos estarán muy calientes.
- Remover con cuidado la tapa y posteriormente extraer el recipiente interno de aluminio con un par de almohadillas para evitar contacto directo.
- Sacar los artículos esterilizados.
- Repetir nuevamente los pasos para seguir esterilizando y si no, vacíe el agua contenida mientras esta se encuentre relativamente caliente, colocando la tapa 15 minutos después. Cierre ligeramente las mariposas y deje la válvula de control abierta.

### Partes del esterilizador

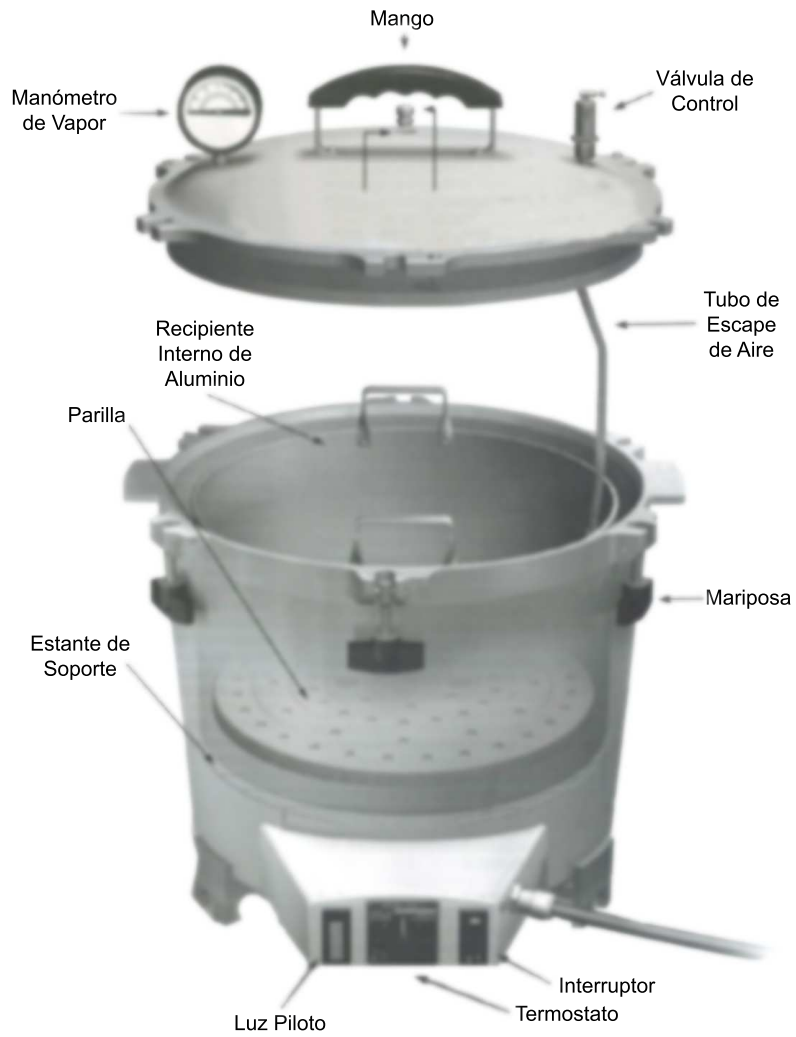


Figura B.2: Esquema del esterilizador.

## B.2. Instrucciones de operación de la incubadora de $CO_2$



Figura B.3: Incubadora de  $CO_2$ .

### Instrucciones de seguridad

Antes de operar

- No utilizar en presencia de materiales flamables/combustibles o de contenedores presurizados.
- No calentar cualquier sustancia sobre temperaturas que ocasionen la emisión de gases tóxicos.
- Utilizar solo dióxido de carbono, no inyectar oxígeno o cualquier otra mezcla en la incubadora.
- Verificar que las conexiones eléctricas y mecánicas(de gases) esten en buenas condiciones.

Al finalizar

- No tocar las superficies calientes. Use las agarraderas. Y tenga trapos húmedos para manejar los elementos calientes.

### **Instrucciones de limpieza y mantenimiento**

- Al terminar de operar el esterilizador se debe extraer el agua, enjuagarlo con un poco de agua destilada y secar completamente con trapo limpio (de uso exclusivo).
- No dejar agua en la unidad por periodos prolongados de tiempo.

### **Instrucciones de operación**

- Encienda la cámara presionando el botón de encendido “ON”.
- Para ajustar la temperatura presione el botón “SET”, posteriormente el botón “TEMP” y finalmente presione los botones con las flechas hacia arriba/abajo para ajustar la temperatura deseada.
- Espere 5 segundos mientras el valor es ingresado a la memoria. Esto se confirma con la emisión de dos sonidos cortos al finalizar este tiempo. Si esto no sucede vuelva a programar el valor deseado con el procedimiento anterior.
- Si desea ajustar el valor del  $CO_2$  o de la temperatura en la puerta repita los dos pasos anteriormente mencionados.
- La lectura tanto de temperatura como de  $CO_2$  que se observa en la pantalla se puede variar si el botón “SCAN/HOLD” es presionado. Al ser presionado una vez, la lectura será la de la temperatura dentro de la incubadora. Al ser presionado dos veces, la lectura será la del  $CO_2$  dentro de la incubadora.

### Partes de la incubadora de $CO_2$

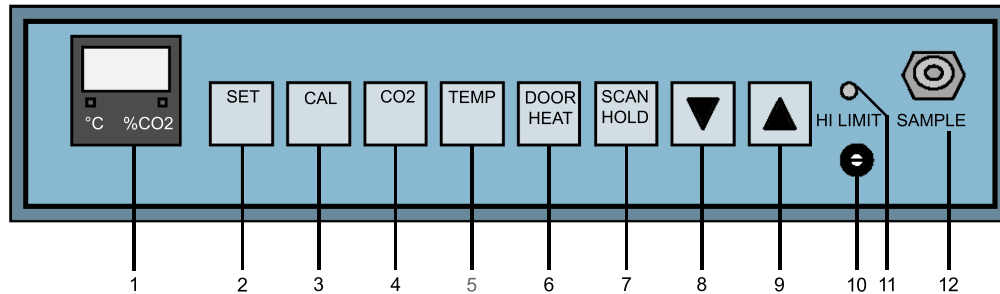
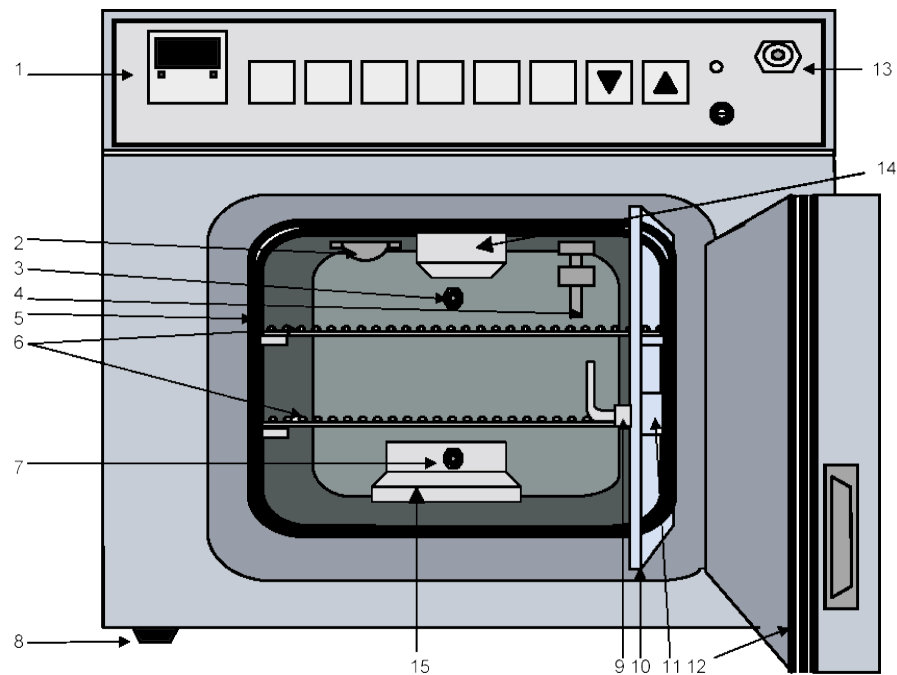


Figura B.4: Controles de la Incubadora de  $CO_2$ .



- |                       |                                   |
|-----------------------|-----------------------------------|
| 1. Control panel      | 9. Inner glass door, handle shaft |
| 2. $CO_2$ sensor      | 10. Inner glass door              |
| 3. $CO_2$ inlet port  | 11. Inner glass door, handle      |
| 4. Temperature sensor | 12. Outer door gasket             |
| 5. Chamber gasket     | 13. $CO_2$ sample port            |
| 6. Chamber shelves    | 14. Fan Cover                     |
| 7. Sample port inlet  | 15. Humidity Trough               |
| 8. Leveling feet      |                                   |

Figura B.5: Esquema de la Incubadora de  $CO_2$ .



## Apéndice C

---

# Material y Equipo

---

### Equipo

- Fuente de alimentación Tektronix PS280 D.
- Multímetros YFE YF-1100A, Tektronix CDM 250.
- Osciloscopio Tektronix TDS2024B.
- Esterilizadora All American Sterilizer Model 25X.
- Báscula de precisión Sartorius CP124S.
- Campana de flujo laminar vertical.
- Incubadora de  $CO_2$  Lab-line mod.314.
- Sonicador Branson 2510R-MT.
- Nanoscope III-Multimode SPM, Digital Instruments.
- Axopatch 200A Axon Instruments.
- Baño térmico Cole-Parmer mod. 1095-00.

- Estirador o "Puller" para micropipetas.
- Microscopio óptico invertido modelo Carl Zeiss.
- Sistema de purificación de agua Millipore.
- Agitador magnético con calentamiento.

### **Instrumental**

- Bisturí, tijeras.
- Pipetas Pasteur y pipetas de 10 ml.
- Cortador de vidrio Silverschnitt
- Tubos de ensayo de 12 y 50 ml.
- Cajas Petri.

### **Reactivos y soluciones**

- Mezcla crómica ( $K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$ ).
- Acetona industrial.
- Alcohol etílico anhídrido absoluto (J.T. Baker).
- Etanol al 70 %.
- Agua destilada.
- Agua des-ionizada.
- Agua gradiente Milli-Q (conductividad 18Ω).

- Medio mínimo enriquecido Dulbecco (DMEM).
- Medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco).
- Suero fetal bovino (Gibco).
- Suero de caballo (Gibco).
- Solución de Hanks.
- Citosina-arabinósido.
- Tripsina.
- Silicon (SIGMACOTE).

### **Material biológico**

- Ratas Wistar de 7 a 8 días de nacidas (bioterio UAM).
- Línea celular PC12 (ATCC).

### **Material Especial**

- Nanotubos de carbono multipared (Cheap Tubes).
- Placas de vidrio con sustrato Au (111) (Metallhandel).
- Sylgard 184 elastómero de silicona (Dow Corning).
- Alambre de plata 0.125mm (World Precision Instruments Inc).
- Pintura conductiva de carbón (SPI supplies).



## Apéndice D

---

# Asepsia de cuarto y preparación de material

---

### D.1. Asepsia de cuarto

Para lograr una adecuada asepsia del cuarto de cultivos este debe estar libre de entradas de polvo o de aire, además se debe tener un sistema de luz ultravioleta para eliminar bacterias.

Antes de comenzar con actividades de cultivo dentro del cuarto, es necesario limpiar perfectamente techo, paredes, piso, ventanas, puerta, mobiliario y equipo existente. Es necesario realizar esta limpieza cada vez que el cuarto halla dejado de operar y se desee volver a introducir cultivos o bien por lo menos 3 veces en un año.

En este caso la limpieza se realiza de la siguiente forma:

- I. Con un trapo o gasa limpios y dextran.
- II. Con un trapo o gasa limpios y benzal.

### III. Con un trapo o gasa limpios y alcohol al 70 %.

Una vez limpio el cuarto, se realizan pruebas de esterilidad en los cuartos para comprobar que el ambiente esta libre de bacterias. Para esto, se vierte una cierta cantidad de medio de cultivo (ver G.2) en tubos de centrifugación y se dejan ligeramente abiertos de 24 a 48 horas en los lugares estratégicos donde el material celular estará en contacto, es decir, campana de flujo laminar, incubadora de  $CO_2$  y algunos otros lugares como la gaveta de almacenamiento de material estéril, área de almacenamiento de soluciones etc.

Si al término de ese periodo de tiempo el líquido en el interior de los tubos se observa ligeramente o muy turbio el cuarto no cumple con las condiciones de asepsia necesarias. Si por el contrario el líquido permanece como cuando se deposito o no presenta signos de turbidez, el cuarto cuenta con las condiciones de asepsia requeridas.

## D.2. Lavado de material

Al utilizar el material por primera ocasión en cultivo celular es necesario lavarlo muy bien con estropajo, jabón y agua. Después se deben seguir estos pasos:

- I. Sumergir el material en una solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 24 hrs.
- II. Sacar y enjuagar el material en 10 ocasiones con agua corriente tallando con un estropajo exclusivo para el lavado del material.
- III. Sumergir el material en una solución de HCl al 5 % por 24 hrs.
- IV. Sacar y enjuagar el material en 10 ocasiones con agua corriente.

- V. Sumergir el material en agua destilada/bidestilada por 24 hrs.
- VI. Sacar y enjuagar el material con agua desionizada.
- VII. Dejar secar el material sobre una superficie limpia por 24 hrs. o bien secar en horno por 1 hr. a una temperatura de 100 °C.

### **D.3. Esterilización de material**

Para esterilizar el material este debe haber sido previamente lavado. Una vez completamente seco el material, se cubre con papel aluminio la boca de frascos, matraces, probetas etc., después se cubre con papel Kraft y se asegura el papel con ligas de hule. En un área visible se adhiere un pedazo de cinta testigo para comprobar la esterilización del material.

En la esterilización de las pipetas, es necesario colocar un pequeño tapón de algodón de aproximadamente tenga 1.5 cm de profundidad, después se introduce en un contenedor de pipetas que tenga en el fondo una gasa con algodón para proteger las puntas de las pipetas.

Finalmente se introduce el material en una bolsa de plástico, se cierra y se sigue el instructivo del esterilizador a utilizar (ver B.1).

### **D.4. Siliconización de material**

La siliconización del material de vidrio es necesaria cuando este se va a utilizar en la obtención del cultivo primario, el fin principal de este proceso es evitar que el material celular se adhiera al material de vidrio. Para ello se debe seguir el protocolo que se muestra a continuación.

## Material

- Pipetas Pasteur (20)
- Agitadores (2)
- Embudos (3)
- Cajas Petri (10)
- Tubos para centrífuga (20)
- Pipetas de 5 y 10 ml
- Matraz Erlenmayer de 25 ml (3)

## Procedimiento

- Lavar el material siguiendo el protocolo de Lavado de Material.
- En un recipiente grande de plástico diluir la solución Sigmacote a 0.1-1 % en agua desionizada.
- Sumergir el material dentro de la solución verificando que esta haga contacto tanto con la superficie externa como la interna.
- Dejar secar el material sobre una superficie limpia por 24 hrs. o bien secar el material en un horno a 100 °C por 45 minutos.
- Esterilizar el material siguiendo el procedimiento indicado (ver D.3).

Nota. Cuando se prepara la solución se observa como si el agua tuviera aceite en ella, esto es el silicón, conforme se va introduciendo el material, ese aspecto comienza a desaparecer por lo que de ser necesario debe agregar un poco más de solución Sigmacote al agua.



## Apéndice E

---

# AFM

---

El microscopio de AFM es un instrumento que produce una imagen a través de una interacción física entre la sonda del instrumento y la muestra, esta interacción física, se debe a distintos tipos de fuerzas incluidas las fuerzas de van der Waals. Es capaz de hacer mediciones topográficas (en los ejes x, y, z) de casi cualquier tipo de superficie obteniendo una imagen tridimensional del plano de la superficie que se está estudiando, lo cual complementa los tipos de microscopía donde únicamente es posible tener una representación bidimensional.

La resolución en el plano x-y, varía entre 0.1 y 1 nm mientras que en z se puede alcanzar hasta los 0.01 nm. Otra característica importante es que no es necesario que la muestra tenga algún tipo especial de preparación o que esta se encuentre en un ambiente controlado como en vacío, se puede incluso tener la muestra en aire o en líquido.

Además, se tiene la posibilidad de hacer la medición de otros tipos de propiedades físicas presentes a escala nanométrica como fuerza magnética, fuerza eléctrica, etc. En este caso es empleado para hacer una caracterización topográfica de la película de nanotubos y para ello se trabaja con los modos de operación conocidos como: modo de contacto y modo oscilante.

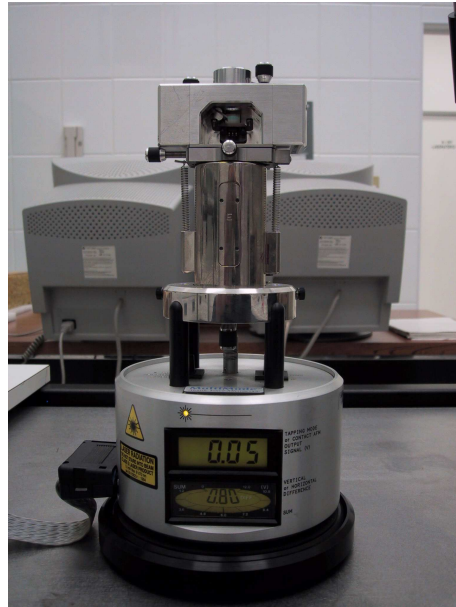


Figura E.1: Microscopio AFM.

La sonda del microscopio es una punta fina de aproximadamente  $5 \mu\text{m}$  de alto y menor a  $10 \text{ nm}$  de diámetro en la parte más delgada de la punta, esta colocada en un extremo de un cantilever que tiene de entre  $100$  a  $500 \mu\text{m}$  de longitud. Sobre la superficie del cantilever se proyecta un láser que se refleja hacia un fotodetector. La punta se mueve gracias a un material piezoeléctrico sobre la superficie de la muestra o viceversa y las fuerzas existentes entre la punta y la superficie de la muestra hacen que el cantilever sufra deflexiones o torceduras las cuales son captadas por el fotodetector que registra las variaciones en el láser reflejado.

La imagen final es el resultado de estas variaciones las cuales se representan como una imagen tridimensional en donde las alturas relativas entre punto y punto son diferenciadas por distintas tonalidades.

Este microscopio mantiene el control del sistema en base al modo de fuerza constante o el modo de altura constante. El primer modo monitorea la fuerza que se ejerce entre la superficie y la punta conforme la interacción entre ellas tratando así de mantenerla constante durante el barrido. Este modo se recomienda para muestras sólidas, rígidas y/o cristalinas. En el segun-

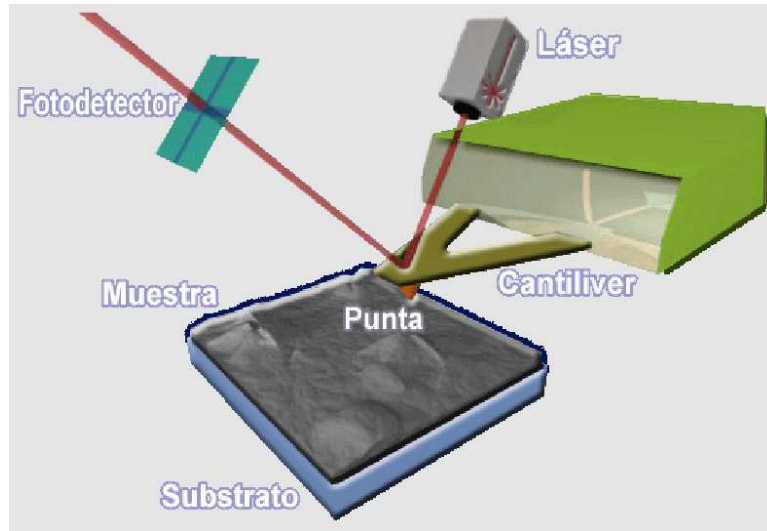


Figura E.2: Principio de operación AFM.

do modo la variable que se monitorea y se controla, es la distancia entre la punta y la muestra. Este modo es útil cuando se desea analizar superficies planas.

Por otra parte el microscopio de AFM cuenta con dos formas importantes de interacción con la muestra: el modo de contacto y el modo oscilante.

## E.1. Modo de contacto

En modo de contacto, el cantilever se encuentra en contacto constante con la superficie de la muestra. Cuando los átomos de la superficie están lo suficientemente cerca de los átomos de la punta estos comienzan a interactuar hasta que se logra un equilibrio entre las fuerzas existentes de atracción-repulsión para que posteriormente las fuerzas de repulsión sean las que predominen en este modo. Existen además dos tipos de fuerzas una llamada fuerza capilar y otra es la fuerza ejercida por el cantilever, la combinación de estas fuerzas hacen que el cantilever deflexione o se tuerza de acuerdo con los cambios de topografía de la superficie de la muestra. Este

modo no es conveniente para muestras en las que su superficie sea suave (como material biológico) pues al hacer mover la punta, es posible que se arrastre material consigo.

## **E.2. Modo oscilante**

En el modo oscilante, se hace que la sonda del instrumento oscile mediante un piezoeléctrico a una frecuencia específica sobre la superficie de la muestra, tocándola intermitentemente es decir, entrando y saliendo de las zona donde predominan las fuerzas de repulsión/atracción. La amplitud de la oscilación del cantilever es de decenas de nm. Las variaciones en la superficie de la muestra se traducen a variaciones en la amplitud de la oscilación, así la imagen de topografía se obtiene registrando dicho cambio. Este modo de operación elimina las fuerzas laterales así como las capilares que pueden dañar la muestra y reducir la resolución de la imagen, por lo que es ideal para muestras con superficies blandas.

Otro tipo de imagen que se obtiene con este modo de interacción, es donde la frecuencia de oscilación de la señal se ve modificada debido a cambios en la viscoelasticidad en la superficie de la muestra. Esta señal se compara con la de la frecuencia original y se mide la diferencia de fase. Con lo que se puede analizar la dureza o elasticidad del material.

## Apéndice F

---

# Equipo electrofisiológico

---

Los equipos empleados para hacer las mediciones correspondientes de la actividad eléctrica, forman parte de la instrumentación necesaria en electrofisiología: el registro intracelular y el registro extracelular.

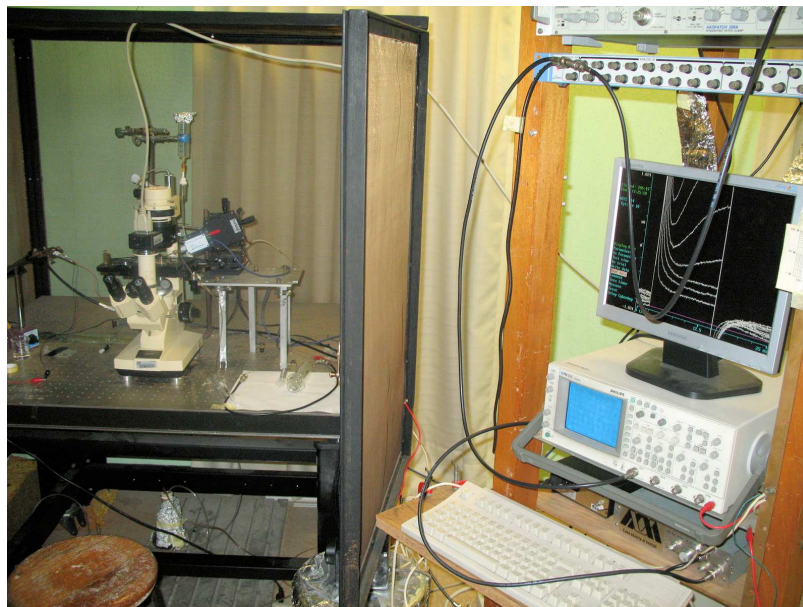


Figura F.1: Equipo electrofisiológico.

El material celular a estudiar es sumergido en una solución electrolítica que encuentra conectada a tierra. Posteriormente, se hace contacto físico entre el material celular y la micropipeta de registro. Ambas técnicas, utilizan micropipetas con características diferentes dependiendo la técnica que se vaya a trabajar.

## **F.1. Construcción de micropipetas**

Las micropipetas son construidas a base de capilares de vidrio (borosilicato) que se colocan en un estirador el cual aplica una tensión en los extremos mientras que en el centro se aplica calor, con esto se logra que el capilar se parta en dos. Con los parámetros que se programan en el equipo se pueden obtener diferentes diámetros y longitudes de la punta de la micropipeta, a continuación, se pule la punta calentando su superficie con el fin de lograr una superficie de la punta sin irregularidades. Esto es importante para obtener un adecuado contacto entre las superficies de la membrana celular y de la punta de la pipeta, generado resistencias eléctricas entre las superficies en el rango de los gigaohms evitando fuga de corriente y disminuyendo drásticamente el ruido en la señal.

A continuación se rellena con una solución electrolítica que ayuda a conservar la continuidad eléctrica en el circuito cuando la micropipeta se coloque en la terminal del equipo. En ocasiones al llenar la micropipeta con la solución, es posible que queden burbujas de aire en la punta lo que provoca efectos indeseables en el sistema agregando una resistencia en serie muy grande, es por lo tanto necesario eliminarlas completamente.

## **F.2. Registro intracelular**

El registro intracelular consiste en la inserción de una micropipeta en el interior de la célula para obtener el potencial bioeléctrico del interior celular respecto al exterior.

Esta técnica permite medir el potencial de membrana en estado de reposo o en la presencia de potenciales de acción, además es posible inyectar una cantidad de corriente al interior celular para modificar el potencial de membrana.

## **F.3. Fijación de corriente**

En esta técnica, se aplican pulsos de corriente directa para estimular la célula, esta corriente despolariza o hiperpolariza la célula y se registra el cambio en el potencial de membrana provocado.

## **F.4. Fijación de voltaje**

Esta técnica permite controlar el potencial de membrana manteniendo constante tanto su magnitud como su polaridad. Comúnmente se polariza al potencial de reposo de la membrana y a partir de ahí se aplican pulsos rectangulares de voltaje de magnitudes distintas con el fin de modificar transitoriamente el potencial de membrana y registrar corriente iónicas transmembranales necesarias para mantener el potencial de membrana.

Esta técnica presenta las siguientes características:

- Elimina las corriente capacitivas.
- Las corrientes que fluyen son proporcionales a la conductancia de la membrana (al número de canales iónicos abiertos).
- Se ofrece un control sobre las variables que determinan la apertura/cierre de los canales iónicos (voltaje dependientes).

#### **F.4.1. Patch clamp**

Es una técnica especial en la fijación de voltaje que permite la observación de el flujo de corriente a través de canales iónicos individuales, además simplifica las mediciones del flujo de corriente a través de toda la membrana celular principalmente en células muy pequeñas donde la micropipeta no es fácil de introducir. En esta técnica, las corriente medidas son muy pequeñas en el orden de los pA en un solo canal y de nA en toda la célula.

En este tipo de técnica, es necesario obtener un buen sello entre la micropipeta y la membrana celular, para lograrlo, las corrientes que circulan a través del sello no deben distorsionar las mediciones de voltaje o corriente.

La modalidad de Patch Clamp utilizada en este proyecto fue de célula completa.

### **F.5. Registro extracelular**

En este tipo de registro, la actividad eléctrica es tomada fuera de la célula, y es amplificada por un amplificador de a.c. para poder registrarlas ya



que son señales muy pequeñas que provienen del flujo de corrientes iónicas a través del fluido extracelular. La solución salina tiene una resistividad muy baja y las corrientes son muy pequeñas por lo tanto las señales que se registran son muy pequeñas, del orden de 10 a 500  $\mu\text{V}$ .

Para este caso, el registro extracelular, se hace a través del electrodo construido a base de nanotubos de carbono. De igual manera, la señal obtenida es enviada hacia un amplificador de a.c. para su registro.



## Apéndice G

---

# Soluciones

---

### G.1. HBSS Solución de Hank's con seroalbúmina bovina

Para preparar un litro de solución:

Componente	Peso Molecular	g/L	mM
<i>CaCl</i> <sub>2</sub>	111	0.14	1.3
KCl	74.55	0.4	5.4
<i>KH</i> <sub>2</sub> <i>PO</i> <sub>4</sub>	136.1	0.06	0.4
<i>MgCl</i> <sub>2</sub> <i>6H</i> <sub>2</sub> <i>O</i>	203.3	0.1	0.5
<i>MgSO</i> <sub>4</sub> <i>7H</i> <sub>2</sub> <i>O</i>	246.5	0.1	0.4
NaCl	58.44	8.0	136.9
<i>NaHCO</i> <sub>3</sub>	84.01	0.35	4.2
<i>Na</i> <sub>2</sub> <i>HPO</i> <sub>4</sub> <i>7H</i> <sub>2</sub> <i>O</i>	268.1	0.09	0.3
Total de Sales			149.4
Otros			
D-glucosa	180.2	1	5.5
Rojo de Fenol	354.4	0.01	0.0
HEPES, Sal Na	260.3	2.08	8.0
Seroalbúmina bovina		3.0	

Tabla G.1: Solución Hank's.

Nota1. Si utiliza HEPES, la molaridad equivalente de NaCl debe ser omitida y la osmolaridad revisada.

Nota2. Si es necesario se puede agregar unas gotas de antibiótico para prevenir contaminación.

Disolver perfectamente, filtrar y mantener en refrigeración.

## G.2. Medio de cultivo DMEM enriquecido

Para preparar 100 ml de medio:

Componente	Cantidad(ml)
DMEM enriquecido	87.5
<i>NaHCO</i> <sub>3</sub>	2.5
Suero bovino fetal	10
Antibiótico	1
Insulina	0.0001

Tabla G.2: Medio de cultivo DMEM enriquecido.

## G.3. Azul de tripano

Para preparar 10 ml de azul de tripano:

Componente	Cantidad
Azul de tripano	0.02 gr
PBS	10 ml

Tabla G.3: Azul de tripano.

Disolver perfectamente, filtrar y envasar protegiéndolo de la luz.

## G.4. Tripsina

Para preparar 10ml al 0.025 %:

Componente	Cantidad
Tripsina	0.025 gr
HBSS	100 ml

Tabla G.4: Solución de tripsina.

## G.5. Solución intracelular

Para preparar 100ml:

Componente	Peso Molecular	mM	Cantidad (g)
NaCl	58.44	8	0.0468
KCl	74.55	132.5	0.9878
$CaCl_2$	110.99	0.002	0.00002
$MgCl_2$	203.30	2	0.0407
Glucosa	180.16	10	0.1802
HEPES	238.3	10	0.2383
EGTA	380.35	0.04	0.0015

Tabla G.5: Solución intracelular.

pH = 7.4 (Ajustado con NaOH)

## G.6. Solución extracelular

Para preparar 1 lt:

Componente	Peso Molecular	mM	Cantidad (g)
NaCl	58.44	134.5	7.8602
KCl	74.55	4.5	0.3355
$CaCl_2$	110.99	2	0.2220
$MgCl_2$	203.30	1	0.2033
Glucosa	180.16	10	1.8016
HEPES	238.3	10	2.383

Tabla G.6: Solución extracelular.

pH = 7.4 (Ajustado con NaOH)

-

## G.7. Solución extracelular normal

Para preparar 1 lt:

Componente	Peso Molecular	mM	Cantidad (g)
NaCl	58.44	160	9.3504
KCl	74.55	4.5	0.3355
$CaCl_2$	110.99	2	0.2220
$MgCl_2$	203.30	1	0.2033
HEPES	238.3	5	1.1920

Tabla G.7: Solución extracelular.

pH = 7.4 (Ajustado con NaOH)

## G.8. Medio de cultivo PC12

Para preparar 200 ml de medio:

Componente	Cantidad(ml)
Medio RPMI 1640	420
Suero de caballo	50
Suero bovino fetal	25
Estreptomicina	5

Tabla G.8: Medio de cultivo PC12.





---

# Lista de Símbolos y Abreviaciones

---

---

Abreviación	Descripción
$\mu\text{m}$	Micrómetros
Å	Ángstrom
A	Ampere
a.c.	Corriente Alterna
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica (Atomic Force Microscopy por sus siglas en inglés)
Au	Oro
BIOMEMS	Sistemas Biológicos Micro-Electro-Mecánicos (Biological Micro-Electro-Mechanical Systems por sus siglas en inglés)
$\text{CO}_2$	Bióxido de Carbono
GPa	Giga Pascal
HBSS	Solución de Hank de Sales Balanceadas
KHZ	Kilo Hertz
LBL	Capa por Capa (Layer by Layer por sus siglas en inglés)
ms	Mili Segundo
mV	Mili Volt
MWCNT	Nano Tubo de Carbón Multipared (Multi Wall Carbon Nano Tube por sus siglas en inglés)
nA	Nano Ampere
NaOH	Hidróxido de Sodio
nm	Nanómetros
NTC	Nanotubos de carbono
PVP	Polyvinylpirrolidone
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido (Scanning Electron Microscope por sus siglas en inglés)
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio (Sodium Dodecyl Sulphate por sus siglas en inglés)
SWCNT	Nano Tubo de Carbono de pared Simple (Single Wall Carbon Nano Tube por sus siglas en inglés)

---

---

## Índice de figuras

---

1.1. Estructura de un nervio . . . . .	2
1.2. Partes de una neurona . . . . .	3
1.3. Electrodo en brazalete (“Cuff”) . . . . .	11
1.4. Electrodo planar . . . . .	12
1.5. Electrodo intrafascicular . . . . .	13
1.6. Electrodo regenerativo . . . . .	14
1.7. Electrodo de penetración . . . . .	15
2.1. Modelo de los diferentes tipos de nanotubos de carbono . . . . .	18
2.2. Conductividad eléctrica por estructura de los NTC . . . . .	19
4.1. Diagrama de flujo del proyecto . . . . .	30
4.2. Diagrama de flujo diseño y construcción de electrodos . . . . .	32
4.3. Diagrama de flujo preparación de placas . . . . .	33
4.4. Construcción de placa de oro Au (111) . . . . .	34
4.5. Placas de vidrio-oro cortadas . . . . .	37
4.6. Limpieza de placas . . . . .	38
4.7. Pintura de carbón conductivo . . . . .	39
4.8. Placas recubiertas con sylgard . . . . .	40
4.9. Esquema de prueba eléctrica en placas . . . . .	41
4.10 Diagrama de flujo de preparación de la suspensión de NTC . . . . .	42
4.11 Nanotubos de carbono secos . . . . .	44

4.12	Nanotubos de carbono tratados con ultrasonido . . . . .	45
4.13	Nanotubos de carbono dispersos en acetona-alcohol . . . . .	46
4.14	Nanotubos de carbono dispersos en las sustancias . . . . .	47
4.15	Placas de oro con nanotubos de carbono . . . . .	47
4.16	Montaje de placas en AFM . . . . .	48
4.17	Diagrama de flujo de la preparación de electrodos . . . . .	49
4.18	Depósito de nanotubos de carbono en placas de oro . . . . .	51
4.19	Caracterización de la superficie de la película de nanotubos por AFM . . . . .	52
4.20	Adhesión de alambre sobre película de nanotubos de carbono .	53
4.21	Esquema de la prueba de conductividad eléctrica en electrodos .	53
4.22	Diagrama de flujo de la obtención del cultivo celular . . . . .	55
4.23	Diagrama de flujo de la obtención del cultivo primario . . . . .	57
4.24	Cámara de Neubauer . . . . .	60
4.25	Diagrama de flujo de la obtención de cultivo de línea celular . .	61
4.26	Conteo de células PC12 en cámara de Neubauer . . . . .	64
4.27	Diagrama de flujo del cultivo celular en controles y electrodos .	65
4.28	Control y electrodo en incubadora . . . . .	67
4.29	Monitoreo de crecimiento celular con microscopio óptico . . . .	67
4.30	Diagrama de flujo del registro electrofisiológico . . . . .	69
4.31	Registro electrofisiológico de cultivo primario técnica de “Patch Clamp” . . . . .	71
4.32	Diagrama de flujo del registro de células de línea celular . . . .	72
4.33	Esquema del registro extracelular mediante el electrodo . . . . .	75
4.34	Registro extracelular mediante el electrodo . . . . .	75
4.35	Diagrama de flujo de visualización de AFM y SEM del crec- imiento neuronal . . . . .	76
5.1.	Gráficas de la señales de las pruebas eléctricas en placas de oro	80
5.2.	Dispersión de los NTC en soluciones por un periodo de 5 días .	82
5.3.	Depósito de distintas suspensiones de NTC sobre placas de oro .	83
5.4.	Imágenes AFM de la distribución de NTC sobre placas de oro .	86

5.5. Imágenes AFM de superficie de la película de NTC en electrodos	92
5.6. Imágenes SEM de superficie de la película de NTC en electrodos	95
5.7. Gráficas de la señales de las pruebas eléctricas en ambos tipos de electrodos . . . . .	97
5.8. Células del cerebelo de rata a 48 horas de sembradas . . . . .	99
5.9. Células del cerebelo de rata a 7 días de sembradas . . . . .	100
5.10 Células del cerebelo de rata a 14 días de sembradas . . . . .	100
5.11 Células del cerebelo de rata sobre película de NTC en electrodo	101
5.12 Línea celular PC12 sin diferenciar a 48 horas . . . . .	102
5.13 Línea celular PC12 sin diferenciar a 4 días . . . . .	103
5.14 Línea celular PC12 sin diferenciar a 6 días . . . . .	104
5.15 Línea celular PC12 diferenciada a 48 horas . . . . .	104
5.16 Línea celular PC12 diferenciada a 4 días . . . . .	105
5.17 Línea celular PC-12 diferenciada a 6 días . . . . .	105
5.18 Registro electrofisiológico de corrientes iónicas y curvas de conductancia . . . . .	108
5.19 Registro electrofisiológico de potenciales de acción evocados . .	110
5.20 Registro electrofisiológico simultáneo de los potenciales de acción evocados . . . . .	112
5.21 Imágenes AFM de la línea celular PC12 sobre película de NTC	118
5.22 Imágenes SEM de la línea celular PC12 sobre película de NTC .	122
5.23 Esquema de interfase célula PC12-película de NTC . . . . .	124
A.1. Cuarto Gris . . . . .	150
A.2. Cuarto Limpio . . . . .	151
A.3. Cuarto de Cultivos . . . . .	153
B.1. Esterilizador de vapor . . . . .	156
B.2. Esquema del esterilizador . . . . .	159
B.3. Incubadora de $CO_2$ . . . . .	160
B.4. Controles de la Incubadora de $CO_2$ . . . . .	162
B.5. Esquema de la Incubadora de $CO_2$ . . . . .	162

E.1. Microscopio AFM . . . . .	172
E.2. Principio de operación AFM . . . . .	173
F.1. Equipo electrofisiológico . . . . .	175

---

## Índice de tablas

---

2.1. Características eléctricas y mecánicas de diferentes materiales y nanotubos . . . . .	18
4.1. Composición química de nanotubos de carbono . . . . .	43
5.1. Valores de resistencia calculados para la placa de oro conectada	81
5.2. Resistencia eléctrica de ambos tipos de electrodos . . . . .	96
5.3. Valores de resistencia calculados para ambos tipos de electrodos	98
5.4. Estadística potenciales de membrana en reposo cultivo primario	106
5.5. Estadística potenciales de membrana en reposo controles PC12 .	107
5.6. Estadística potenciales de membrana en reposo electrodos PC12	107
5.7. Análisis de la rugosidad en diferentes etapas . . . . .	119
G.1.Solución Hank's . . . . .	181
G.2.Medio de cultivo DMEM enriquecido . . . . .	182
G.3.Azul de tripano . . . . .	182
G.4.Solución de tripsina . . . . .	183
G.5.Solución intracelular . . . . .	183
G.6.Solución extracelular . . . . .	184
G.7.Solución extracelular . . . . .	184
G.8.Medio de cultivo PC12 . . . . .	185



**Casa abierta al tiempo**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias  
(Ingeniería Biomédica)

**Diseño y caracterización de interfaz células neuronales-substrato  
metálico a través de una película de nanotubos de carbono**

Presenta

**Ing. Israel Morales Reyes**

Director de tesis. Dr. Nikola Batina  
Codirector de tesis. Dr. Rafael Godínez Fernández

Sinodales

Presidente. Dr. Nikola Batina

Secretario. Dr. Ramón González Camarena

Vocal. Dr. Roberto Avila Pozos

México D.F. Noviembre 2009