



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00099

Matrícula: 2123808115

INTERACCION DE NANOPARTICULAS DE POLIPIRROL SINTETIZADAS POR PLASMA CON LINEAS CELULARES PARA APLICACIONES BIOMEDICAS.

En México, D.F., se presentaron a las 13:00 horas del día 12 del mes de mayo del año 2015 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ROBERTO OLAYO GONZALEZ
DRA. ATLANTIDA MARGARITA RAYA RIVERA
DR. RAMON GONZALEZ CAMARENA

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

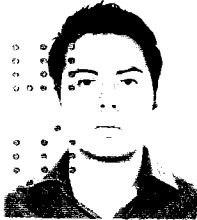
MAESTRO EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

DE: OMAR EDUARDO URIBE JUAREZ

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

APROBAR

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



OMAR EDUARDO URIBE JUAREZ
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTE

DR. ROBERTO OLAYO GONZALEZ

VOCAL

DRA. ATLANTIDA MARGARITA RAYA RIVERA

SECRETARIO

DR. RAMON GONZALEZ CAMARENA



Universidad Autónoma Metropolitana

División de ciencias básicas e ingeniería

Posgrado en Ingeniería Biomédica

***Interacción de nanopartículas
de polipirrol sintetizadas por
plasma con líneas celulares
para aplicaciones biomédicas***

PRESENTA:

Lic. Omar Eduardo Uribe Juárez

T E S I S

Para obtener el grado de:

Maestro en Ingeniería Biomédica

Asesores:

Dr. José Rafael Godínez Fernández

Dr. Roberto Olayo Gonzáles

Sinodales:

Presidente: **Dr. Roberto Olayo Gonzáles**

Secretario: **Dr. Ramón González Camarena**

Vocal: **Dra. Atlántida Margarita Raya Rivera**

Agradecimientos

Se agradece a al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por todo el apoyo económico brindado, a mis asesores de tesis el Dr. José Rafael Godínez Fernández y el Dr. Roberto Olayo Gonzáles por haberme guiado en este proyecto de investigación, al Dr. Juan Morales Corona por el tiempo que dedicó en ayudarme con distintos aspectos de este trabajo.

Sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible

Gracias!

Índice general

Agradecimientos	II
Resumen	1
1. Introducción	2
1.1. Células beta pancreáticas	2
1.2. Tipos principales de diabetes mellitus	3
1.3. Diabetes mellitus un problema de salud	4
1.4. Nuevos tratamientos para la diabetes mellitus tipo 1	5
1.5. Trasplantes pancreáticos	6
2. Antecedentes	7
3. Hipótesis	17
4. Objetivo general	18
5. Objetivos particulares	19
6. Materiales y métodos	20
6.1. Nanopartículas	20
6.1.1. Nanopartículas de PPy	20
6.1.2. Nanopartículas de PPy-I	21
6.2. Líneas celulares	22
6.2.1. RIN-M	22
6.2.2. NG 108-15	23
6.3. Cultivos celulares con nanopartículas	24
6.4. Viabilidad celular	25

7. Resultados	27
7.1. Nanopartículas de PPy	27
7.1.1. Polvo SEM	28
7.1.2. Partículas suspendidas en alcohol	31
7.2. Nanopartículas de PPy-I	33
7.2.1. Polvo SEM	33
7.2.2. Partículas suspendidas	34
7.3. Cultivos celulares con nanopartículas	36
7.3.1. RIN-M	36
7.3.2. NG 108-15	40
7.3.3. Microtejido	42
7.4. Viabilidad celular	43
7.4.1. Partículas de PPy y PPy-I con calceína y homodímero de etidio-1	43
7.4.2. RIN-M	44
7.4.3. NG 108-15	53
8. Discusión	55
8.1. Nanopartículas de PPy y PPy-I	55
8.2. Cultivos celulares	56
8.3. Interacción de las nanopartículas de PPy y PPy-I con las líneas celulares	57
8.4. Diferencias entre las nanopartículas de PPy y PPy-I	58
9. Conclusiones	59
10. Perspectivas	60
Bibliografía	61
Apéndice	67
A.1. Calceína-AM y homodímero de etidio-1	67

Resumen

En este trabajo se estudió la interacción de nanopartículas de polipirrol y polipirrol yodo sintetizadas por plasma con las líneas celulares RIN-M y NG 108-15 correspondientes a células beta de rata y a un híbrido celular de neuroblastoma de ratón y glioma de rata, respectivamente. El objetivo de este estudio fue determinar si las nanopartículas tienen efectos citotóxicos sobre dichas líneas celulares además de observar si las células se llegan a adherir a las nanopartículas y por cuanto tiempo pueden permanecer adheridas a ellas. Para ello, se hicieron cultivos con las líneas celulares y las nanopartículas en cajas petri.

No se observaron efectos citotóxicos de las nanopartículas de polipirrol y polipirrol yodo en ninguna de las dos líneas celulares; por el contrario, las nanopartículas ayudan a mantener viables a las células cuando no tienen una superficie a la cual adherirse. Las células se adhirieron a las nanopartículas desde el inicio del cultivo y continuaron haciéndolo hasta quedar completamente cubiertas por ellas llegando a permanecer adheridas durante al menos tres semanas.

Este estudio demostró que las nanopartículas de polipirrol y polipirrol yodo pueden ser utilizadas para encapsular células beta.

Capítulo 1

Introducción

Este trabajo esta centrado en una aplicación médica muy importante que es el tratamiento de la diabetes mellitus.

1.1. Células beta pancreáticas

El páncreas es una glándula endocrina y exocrina, el páncreas endocrino esta formado por islotes celulares llamados islotes de Langerhans que constituyen aproximadamente el 1 % de la masa total del páncreas, estos islotes a su vez están compuestos por tres tipos de células endocrinas llamadas células alfa, células beta y células delta. Las células alfa secretan un hormona llamada glucagón que actúa sobre el hígado aumentando la glucogénesis, la síntesis de cetonas y la degradación de glucógeno, aumentando así la concentración de glucosa y cuerpos cetónicos en plasma. Las células delta secretan una hormona llamada somatostatina que inhibe la secreción de las células alfa y beta, pero su funcionamiento en humanos aún no esta bien establecido. Las células beta secretan una hormona llamada insulina que actúa principalmente sobre las células del hígado, el tejido músculo esquelético y adiposo mediante receptores de membrana incrementando el transporte del glucosa extracelular hacia la célula, promoviendo la síntesis de glucógeno, triglicéridos y su almacenamiento además de la inhibir la glucogénesis[1].

La membrana de las células beta es permeable a la glucosa, durante la ingesta de alimentos la concentración de glucosa plasmática aumenta y por consiguiente también aumenta la concentración de glucosa dentro de las células beta que comienzan a metabolizarla para la síntesis de adenosín trifosfato(ATP).

Al aumentar la relación entre ATP y adenosín difosfato(ADP) ATP/ADP se inhibe la actividad de canales de potasio sensibles al ATP, que impiden el flujo de iones de potasio(K^+) de las células beta causando su despolarización. Al alcanzar un potencial de membrana de $-40 mV$ se activan canales de calcio sensibles a voltaje permitiendo el flujo de iones de calcio(Ca^+) hacia el interior de la célula disparando así su actividad eléctrica. La acumulación de calcio intracelular provoca la fusión de gránulos de insulina con la membrana celular produciendo así la liberación de insulina en el intersticio y posteriormente su entrada en el torrente sanguíneo.[2].

De esta forma, la concentración de insulina en el plasma aumenta durante la ingesta de alimentos y disminuye durante periodos de ayuno controlando el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas[1].

1.2. Tipos principales de diabetes mellitus

El desarrollo de la diabetes mellitus está asociado con diversas causas, que van desde la destrucción autoinmune de las células beta hasta la resistencia a la insulina de las células blanco de esta hormona. El inicio de esta enfermedad puede ser debido a uno o varios factores; sin embargo, durante ella otros factores pueden ir sumándose agravando aún más ésta enfermedad[3].

La diabetes mellitus pueden clasificarse generalmente en dos tipos, la diabetes mellitus tipo 1(DMT1) se caracteriza por una deficiencia total de la insulina, por otro lado la diabetes mellitus tipo 2(DMT2) se caracteriza por la resistencia a la insulina de las células blanco de esta hormona sumada a una insuficiencia en la secreción de insulina. Aproximadamente el 5 % de los casos de diabetes mellitus corresponden al DMT1 y el 95 % a DMT2.[3]

Hasta el momento, la diabetes mellitus es una enfermedad tratable pero no curable. El tratamiento médico para los pacientes con DMT1 consiste en inyecciones de insulina subcutáneas que se aplican periódicamente ó cuando los niveles de glucosa se encuentran elevados. La frecuencia así como la cantidad de insulina dependen de cada paciente siendo generalmente necesarias dos o más aplicaciones durante el día para mantener estables los niveles de glucemia; el tratamiento se sigue de por vida [3]. El tratamiento médico para los pacientes con DMT2 es diferente al de los pacientes con DMT1. Los niveles de glucemia de estos pacientes son controlados mediante dieta, ejercicio y la

administración de fármacos orales que bloquean extracelularmente los canales de potasio sensibles a ATP de las células beta, provocando así la liberación de la insulina para compensar la deficiente secreción de esta hormona; sin embargo, la fatiga ocasionada a las células beta puede llegar a causar su muerte provocando así la deficiencia total e irreversible de la hormona, haciendo que los pacientes con DMT2 se vuelvan dependientes de la insulina al igual que los pacientes con DMT1 [3].

1.3. Diabetes mellitus un problema de salud

La diabetes Mellitus tipo 2 es un problema de salud a nivel mundial, afecta cerca del 7% de la población mundial adulta y en México a cerca de 9% de la población adulta [4] encontrándose dentro de los primeros diez países con mayor número de casos registrados. Es un trastorno crónico metabólico degenerativo, absorbe 125 mil millones de pesos correspondientes al 15% [5] de los recursos destinados para la salud pública y ocupa la primera causa de muerte en México con un 16%. Lo más alarmante es que el índice de prevalencia de esta enfermedad va en aumento, siendo el Distrito Federal, Nuevo León, Veracruz, Estado de México, Tamaulipas, Durango y San Luis Potosí los estados con mayor índice de prevalencia con hasta 12% [4].



Figura 1.1: Índice de prevalencia por estados ENSANUT 2012.

La diabetes mellitus ocasiona complicaciones cardiovasculares deteriorando el corazón, las arterias, los vasos sanguíneos y los capilares siendo estos últimos los más afectados por que produce daños en órganos y tejidos de todo el cuerpo, siendo los órganos más afectados los riñones, el corazón, los ojos y las

extremidades, llegando a terminar en insuficiencia renal, infartos al miocardio, ceguera y amputaciones de extremidades. Se espera que para el 2030 el número de pacientes diabéticos sea el doble en la actualidad[4].

1.4. Nuevos tratamientos para la diabetes mellitus tipo 1

El tratamiento de la DMT1 es simple en teoría; sin embargo, en la realidad el tratamiento convencional tiene muchas complicaciones para reemplazar las funciones endocrinas de las células beta . Las células beta se encuentran censando constantemente los niveles de glucemia en la sangre y liberando pulsos de insulina directamente en ella [3].

Para mejorar el tratamiento de la DMT1 han sido desarrolladas insulinas análogas a la insulina humana, a partir de esta última se han hecho algunas modificaciones moleculares para aumentar o disminuir su tiempo de absorción; de esta forma este tipo de insulinas análogas tienen una acción más rápida o más lenta sobre los niveles de glucemia. Estos tipos de insulinas análogas se combinan según los niveles de glucemia; cuando los niveles de glucemia son mayores y cercanos a los niveles normales de glucemia se aplica una dosis de insulina de acción lenta, por otro lado cuando los niveles de glucemia son mayores y alejados de los niveles normales de glucemia se aplica una dosis de insulina de acción rápida [3].

También se han desarrollado sensores de glucosa conectados a una bomba de insulina; el sensor de glucosa mide aproximadamente cada minuto los niveles de glucemia en el líquido intersticial y la bomba de insulina inyecta bolos de insulina cuando los niveles de glucemia se encuentran por arriba de lo normal; un algoritmo calcula la dos de la insulina según los niveles de glucemia [3].

El uso de estos nuevos tratamientos ha mostrado mantener más estables los niveles de glucemia, con respecto al tratamiento convencional; además de disminuir la frecuencia de episodios hipoglucémicos durante la noche. La discusión entre cual de los dos tratamientos es mejor aun es tema de debate [3]. En [6] se encontró un mejor control de los niveles de glucemia, sobre todo en las

mañanas, en los pacientes con sensor y bomba de insulina que en aquellos pacientes que son tratados con insulina análoga; sin embargo, en [7] se mostró que existe poca diferencia entre los pacientes con sensor y bomba de insulina y los tratados con insulina análoga.

La principal desventaja en el tratamiento de la DMT1 con insulinas análogas resulta ser la misma que en el tratamiento convencional de esta enfermedad, las frecuentes inyecciones de insulina; por otra parte, los pacientes con bomba de insulina solo necesitan pincharse al cambiar el sitio de infusión de la insulina, lo cual se recomienda cada veinte a treinta días, la idea de este tipo de dispositivos es disminuir radicalmente la frecuencia con la que se tiene que pinchar el paciente para aplicar una dosis de insulina; sin embargo, existe el riesgo de contraer una infección en el sitio de infusión. Otra desventaja en el tratamiento con sensor y bomba de insulina es que el sensor no mide los niveles de glucemia directamente en sangre, debido a ello las mediciones pueden estar desfasadas temporalmente hasta por veinte minutos en los cambios rápidos de glucemia, por esta razón se recomienda complementar el tratamiento con el tratamiento convencional de la DMT1. Si bien esto presenta una gran desventaja, la mayor desventaja de este tipo de dispositivos es que un mal funcionamiento en la electrónica del equipo podría suministrar una sobredosis de insulina llevando al paciente a un episodio hipoglucémico y posiblemente a su muerte si no recibe atención médica oportuna [3].

1.5. Trasplantes pancreáticos

El trasplante de páncreas es frecuentemente acompañado de un trasplante de riñón; debido al riesgo de la cirugía en pacientes con DMT1, el trasplante de páncreas se realiza cuando el paciente necesita un trasplante de riñón. Los pacientes con trasplantes de páncreas llegan a obtener distintos niveles de dependencia a la insulina con el tiempo[3].

Actualmente el trasplante de islotes pancreáticos esta siendo explorado como un tratamiento para los pacientes con DMT1.

Capítulo 2

Antecedentes

En la última década se ha mostrado que el trasplante de islotes pancreáticos alogénicos en ratas y humanos diabéticos mantiene estables los niveles de glucemia hasta por tres meses[8] y nueve meses[9] respectivamente, por lo que resulta un tratamiento prometedor para pacientes diabéticos dependientes de la insulina. Para mantener funcionales los islotes trasplantados es importante aislarlos del sistema inmune, garantizar un suministro adecuado de nutrientes y oxígeno además de garantizar que la insulina se secretada en el paciente [10]. Con este fin se han desarrollado diversos tipos de dispositivos.

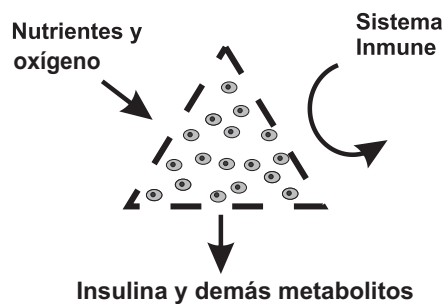


Figura 2.1: Aislamiento celular deseado para los islotes pancreáticos.

Los primeros en desarrollarse fueron dispositivos intravasculares que conectaban las células trasplantadas con la principal fuente de nutrientes del cuerpo; sin embargo, se requerían de cirugías complejas y generalmente se presentaban trombosis post operatorias[10].

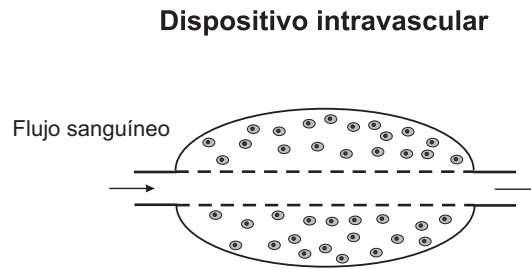


Figura 2.2: Dispositivos intravasculares, se conectan a la fuente principal de nutrientes del cuerpo

Para evitar este tipo de complicaciones, empezaron a desarrollarse cápsulas celulares que limitaban el contacto directo con el sistema inmunológico implantándose en zonas del cuerpo densamente vascularizadas como la epidermis ó el peritoneo

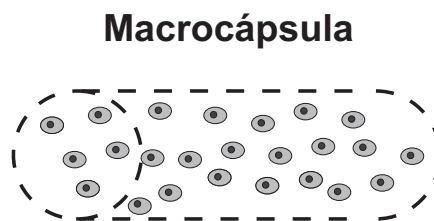


Figura 2.3: Macrocápsula, pobre difusión de nutrientes y oxígeno.

Generalmente, las cápsulas eran echas de materiales cerámicos y consistían en fibras huecas[11],[12], ofrecían una alta estabilidad mecánica y un buen aislante del sistema inmune[10]. Sin embargo, su fabricación estaba limitada a dispositivos macroscópicos que ligada a una pobre difusión de nutrientes y oxígeno resultaba en una viabilidad celular de sólo algunos escasos días.

En busca de mejorar la difusión de nutrientes y oxígeno, las cápsulas celulares se hicieron cada vez más y más pequeñas hasta la formación de cápsulas microscópicas echas generalmente a base de hidrogeles[10].

Microcápsula

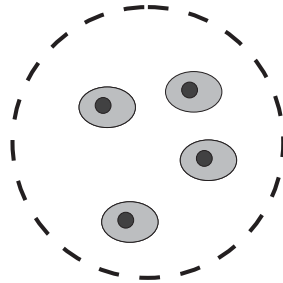


Figura 2.4: Microcápsula, mayor difusión de nutrientes y oxígeno.

Las microcápsulas contienen un número de células menor a las primeras cápsulas pero logran mantenerlas viables durante más tiempo, son obtenidas generalmente mediante los procesos de micromoldes, electrospray y microfluidos[13], [14], utilizando diferentes materiales como polietilenglicol(PEG)[15], quitosano[16], ácido hialurónico(HA)[17], gelatina[18], polivinilalcohol(PVA)[19], agarosa[20] y alginato[21], siendo este último el más utilizado. El tamaño de las microcápsulas se encuentra generalmente entre los 250 – 750 μm [13].

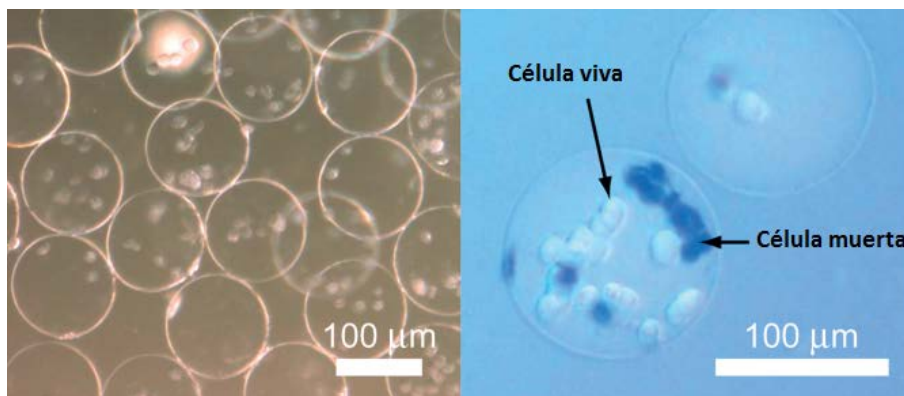


Figura 2.5: Linfocitos T encapsulados en microcápsulas de alginato, viabilidad celular con azul de tripano a la derecha [22].

Para maximizar el número de células implantadas en un menor volumen, actualmente se están desarrollando cápsulas ultra delgadas que mediante recubrimientos toman la forma de las células ó agregados celulares [10]

Capsula Ultradelgada

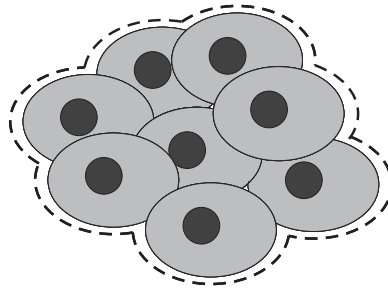


Figura 2.6: Recubrimiento que toma la forma de la célula para maximizar la difusión de nutrientes y oxígeno.

Para ello se usan distintos métodos, que permiten mantener viables los islotes después de la encapsulación. El auto ensamblaje capa por capa[23] de polímeros sobre la membrana celular ha sido utilizado para la encapsulación de islotes pancreáticos de rata con un copolímero de poli-L-lisina/ polietilenglicol/ biotina(PPB) y estreptavidina que es una proteína con afinidad para unirse a la biotina. Este tipo de encapsulación mantiene viables los islotes después de la encapsulación.

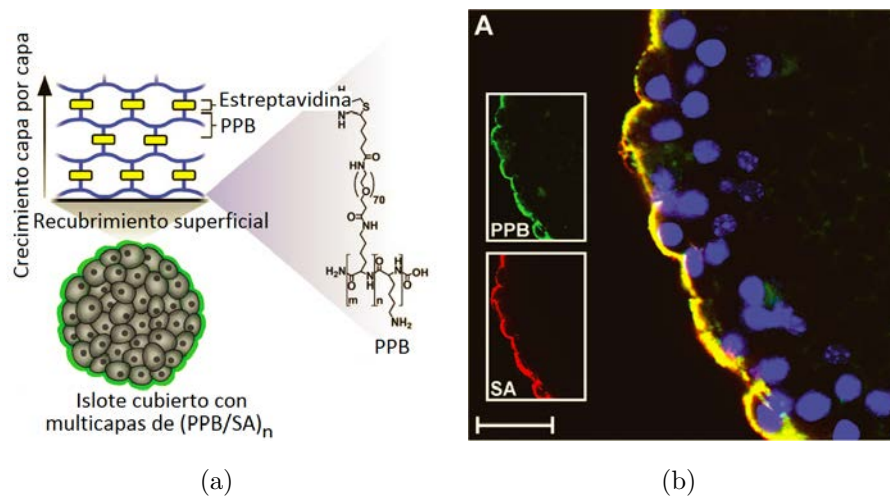


Figura 2.7: (a)Diagrama del ensamblaje de la capsula. (b) Viabilidad celular con azul de tripano. La fluorescencia de los polímeros muestra que están cubriendo los islotes.

Multicapas de polielectrolitos[24] han sido diseñadas también para encapsular células madre mesenquimales de rata utilizando PLL como catión y ácido hialurónico(HA) como anión, depositando primero una capa de PPL después

una de HA y repitiendo seis veces el proceso se obtienen cápsulas con $9 \pm 1 \text{ nm}$ de espesor que mantiene viables las células hasta por una semana.

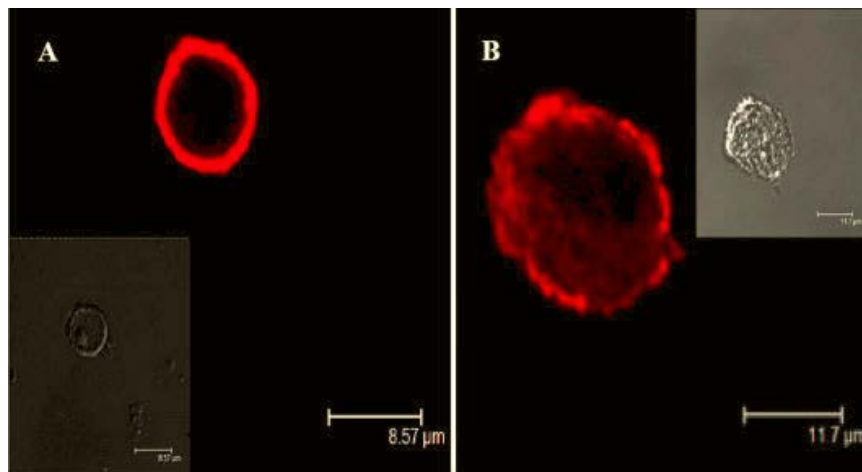
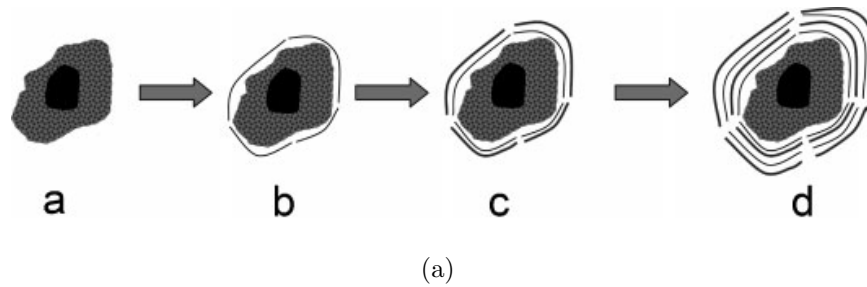
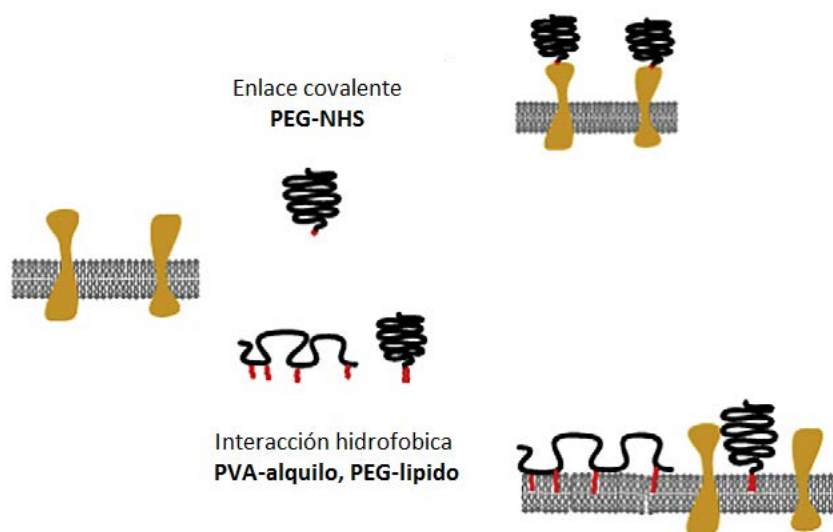
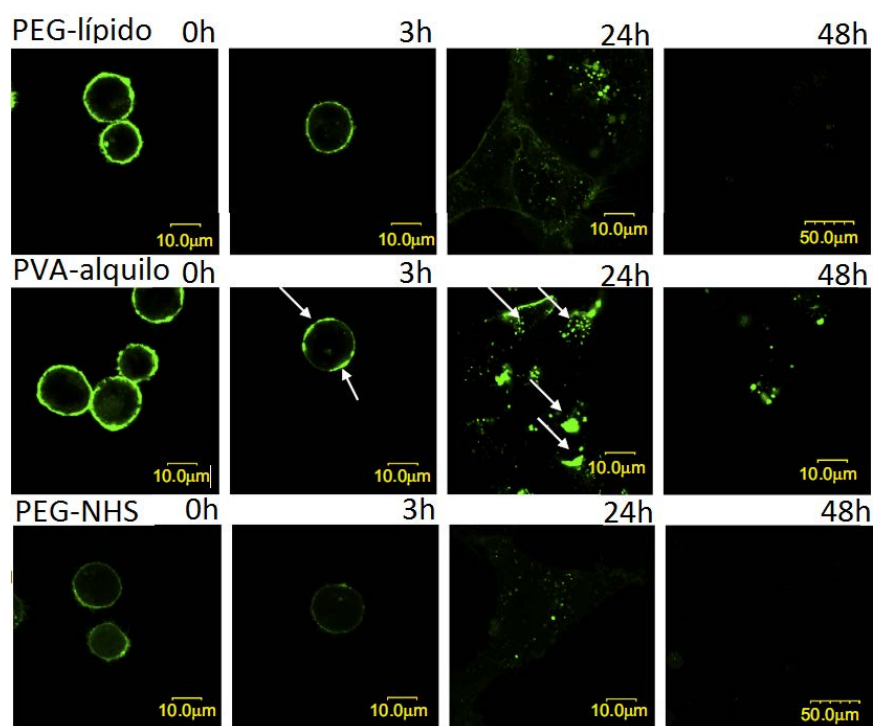


Figura 2.8: (a) Diagrama del ensamblaje de la cápsula. (b) Fluorescencia de los polímeros al tercer y séptimo día, para observar la estabilidad de la cápsula.

Interacciones hidrofóbicas así como uniones covalentes con proteínas también han sido utilizadas para el encapsulamiento celular. T. Totani H y colaboradores (2008) [25] encapsularon células humanas de riñón HEK293 con PEG-lípido, Polivinilalcohol-alquilo (PVA-alquilo) y PEG-N-Hidroxisuccinimida (PEG-NHS), los primeros dos polímeros son funcionalizados para tener interacciones hidrofóbicas y el último para generar enlaces covalentes con proteínas con grupos amino en la superficie mediante la NHS. La viabilidad celular se mantiene después de la encapsulación; sin embargo, las cápsulas no fueron estables y se desprendieron de la membrana celular al segundo día.



(a)

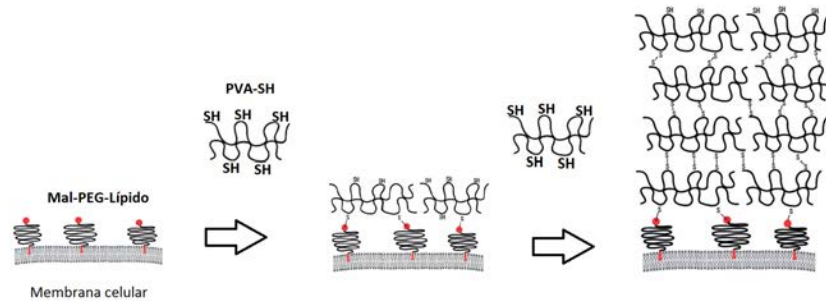


(b)

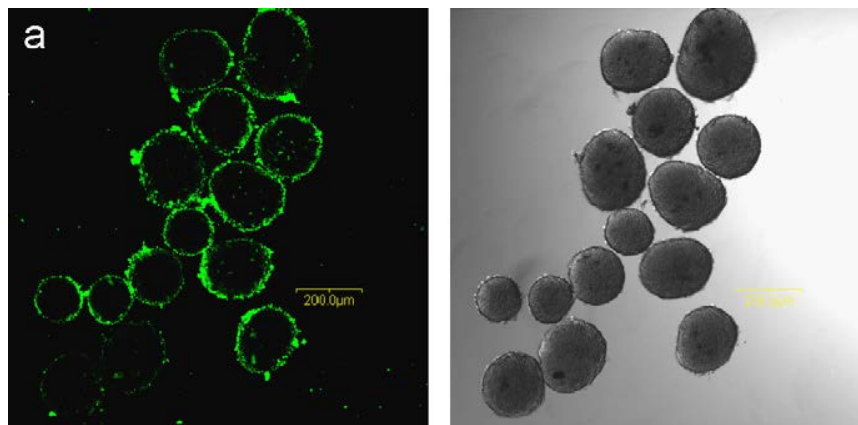
Figura 2.9: (a) Diagrama del ensamblaje de la cápsula. (b) Fluorescencia de los polímeros para cada una de las interacciones a lo largo del tiempo para observar la estabilidad de las cápsulas.

Estos métodos pueden ser combinados para encapsulaciones celulares más complejas. H. Iwata Y. y colaboradores(2007) [26] utilizaron el polímero funcio-

nalizado maleimida-PEG-lípido(Mal-PEG-lípido) para anclarse a la membrana celular y a partir de este adherir capas de PVA-Sulfhidriilo (PVH-SH). Encapsulando así islotes de Langerhans reportando que la secreción de insulina se mantiene después de la encapsulación.



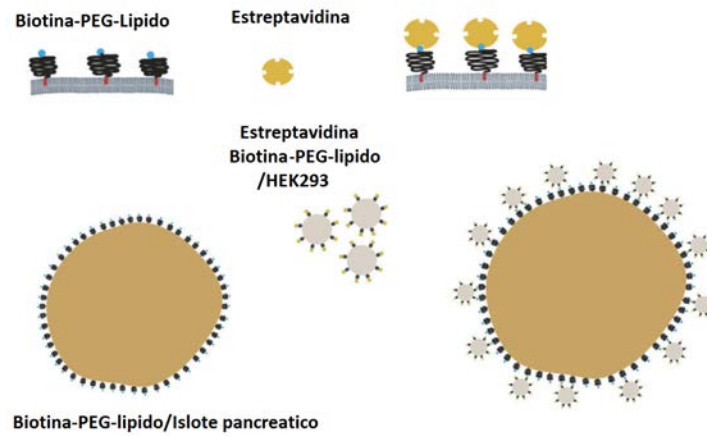
(a)



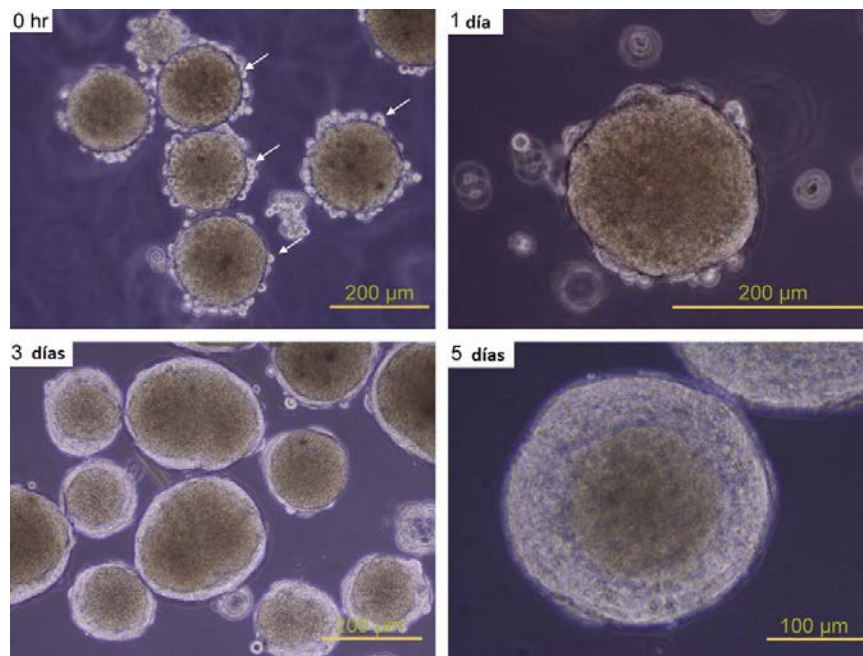
(b)

Figura 2.10: Diagrama del ensamblaje de la cápsula. (b) La fluorescencia de los polímeros muestra que están cubriendo los islotes.

Aún más interesante resulta el recubrimiento por células vivas. H. Iwata Y. y colaboradores(2009) [27] utilizan el polímero funcionalizado Biotina-PEG-lípido para cubrir islotes pancreáticos de hámster y Biotina-PEG-lípido con estreptavidina para cubrir células HEK293, después de esto los islotes pancreáticos y las células HEK293 son cultivadas juntas. El resultado de este cocultivo son islotes pancreáticos cubiertos con células HEK293. La secreción de insulina se mantiene al tercer día y no se observa necrosis en el centro del islote al quinto día.



(a)



(b)

motoneuronas

Figura 2.11: (a)Diagrama del ensamblaje de la cápsula. (b)Evolución del co-cultivo a lo largo del tiempo.

Como se ha visto hasta el momento, el principal problema para la encapsulación celular consiste en encontrar un material que mantenga vivos y funcionales a los islotes o agregados celulares durante la mayor cantidad de tiempo posible; hasta el momento, los periodos de viabilidad reportados después de la encapsulación se encuentran alrededor de una semana [24]. Además

de esto, la cápsula debe de ser estable y las células no deben desprenderse de ella [25], de lo contrario quedarían expuestas al sistema inmune; por último, la insulina debe de ser permeable a la membrana celular para que pueda ser secretada en el paciente.

El polípirrol(PPy) y polípirrol con yodo(PPy-I) sintetizados por plasma son polímeros que han sido utilizados para cubrir superficies de cultivo, promoviendo la adhesión y el crecimiento de motoneuronas NG 108-15[28]; la adhesión, crecimiento y conexión de motoneuronas NG 108-15 y células músculo esqueléticas C2C12[29]; la adhesión, supervivencia y funcionalidad hasta por veintiún días de células nerviosas de médula espinal de embriones de ratón, cuando la viabilidad de ellas había sido reportada sólo hasta por ocho días[30]; la adhesión, crecimiento y aumento en la producción de proteínas de hepatocitos HEPG2 en cocultivo con células hepáticas estrelladas [31]. Sin afectar la morfología celular, la actividad eléctrica y la producción de proteínas así como de neurotransmisores. Por estas razones, el PPy sintetizado por plasma podría ser un buen material para la encapsulación de células beta.

Si además se minimiza la cantidad de PPy y PPy-I utilizado para la encapsulación, la viabilidad y funcionalidad del islote encapsulado se maximizará [10]; de aquí que resulte natural llevar este polímero a escalas nanométricas. En años recientes nanopartículas de estos polímeros han sido sintetizadas por plasma[32], [33], manteniendo la misma variedad de grupos funcionales sobre su superficie [34].

Anteriormente, han sido reportado efectos citotóxicos de las nanopartículas de PPy sobre algunas líneas celulares; debido a esto es posible que no hayan sido utilizadas para la encapsulación de células. En [35], nanopartículas de PPy de 20, 40, 60, 80 y 100 *nm* sintetizadas por oxidación de iones metálicos en solución acuosa [36] fueron cultivadas con fibroblastos de pulmón humano IMR90 y con macrófagos alveolares de ratón J774A.1 para evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas de PPy. La viabilidad de las células cultivadas con las nanopartículas después de un día de cultivo a una concentración de 25 $\mu\text{g} \setminus \text{ml}$ fue del 70 % en promedio para los cinco tamaños de partículas, reportando además que la viabilidad fue proporcional al diámetro de las nanopartículas

de PPy, mientras que la citotoxicidad aumentaba conforme la concentración de nanopartículas de PPy [35].

No obstante, se ha mostrado que la adhesión y la biocompatibilidad del PPy y PPy-I utilizados para los recubrimientos superficiales son únicas del PPy y PPy-I sintetizados por plasma; se piensa que esto es debido a la gran variedad de grupos funcionales que se generan en su superficie tales como grupos amino, alifáticos, aromáticos y alquenos [34].

Con todos estos argumentos nos planteamos la siguiente hipótesis.

Capítulo 3

Hipótesis

Las nanopartículas de PPy y PPy-I sintetizadas por plasma pueden ser un material con buena adhesión celular que ofrecen mayor área superficial que las películas de estos mismos materiales, por lo que pueden tener aplicaciones potenciales en medicina, en particular para la encapsulación de células beta.

Capítulo 4

Objetivo general

Estudiar la interacción de las nanopartículas de PPy y PPy-I sintetizadas por plasma con las líneas celulares RIN-M y NG-108 para determinar sus aplicaciones potenciales en medicina, en particular para la encapsulación de células beta.

Capítulo 5

Objetivos particulares

Determinar

- i Si las nanopartículas de PPy y PPy-I tienen efectos citotóxicos sobre las líneas celulares RIN-M y NG 108-15.
- ii Si las nanopartículas de PPy y PPy-I presentan la misma adhesión celular que las películas de estos mismos materiales.
- iii El tiempo que las células permanecen adheridas y viables a las nanopartículas.

Capítulo 6

Materiales y métodos

6.1. Nanopartículas

Para la síntesis de las nanopartículas se utilizó pirrol y yodo, los cuales pasaron a fase de vapor al bajar la presión en el reactor. El pirrol y el yodo fueron adquiridos en Sigma Aldrich[®].

6.1.1. Nanopartículas de PPy

Las nanopartículas de PPy se sintetizaron en un reactor de plasma como el mostrado en la Figura 6.1

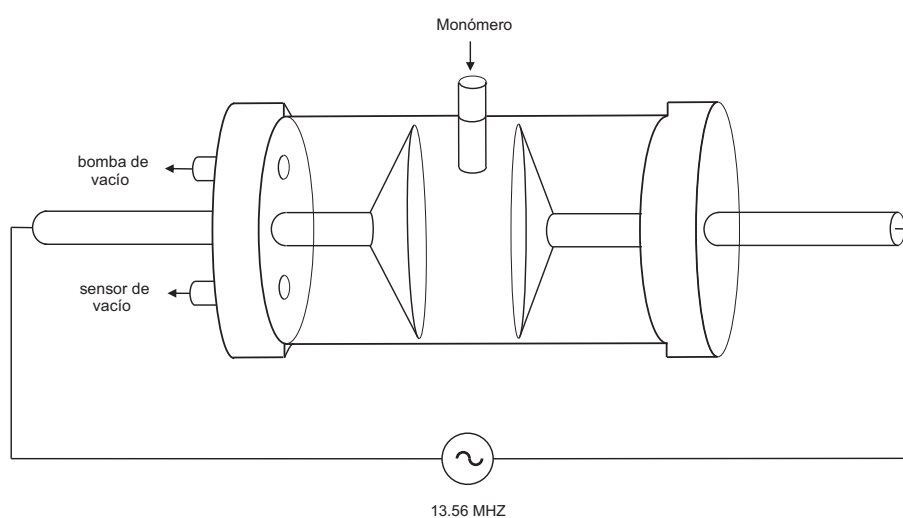


Figura 6.1: Diagrama del reactor de plasma utilizado para sintetizar las nanopartículas de PPy.

Este reactor de plasma está formado por un tubo de borosilicato de 16 *cm* de largo, 9 *cm* de diámetro exterior y 5 *mm* de espesor, a la mitad de este se encuentra embebido un segundo tubo de borosilicato de 4 *cm* de largo, 7 *mm* de diámetro exterior y 1 *mm* de espesor, por donde pasa el pirrol hacia el reactor. Los extremos del primer tubo se encuentran sellados por dos tapas de acero inoxidable, a través de ellas pasan dos electrodos redondos de acero inoxidable de 7 *cm* de diámetro, conectados a un generador de radio frecuencia a 13,56 *MHz*. Una de las tapas tiene además dos aperturas, una de ellas esta conectada a un sensor de vacío y la otra a una trampa de gases en serie con una bomba de vacío.

Se realizaron varias síntesis, cambiando la distancia entre los electrodos, la potencia y la presión en el reactor, sólo en algunos casos se obtuvieron nanopartículas de PPy.

Las nanopartículas se observaron en un microscopio electrónico de barrido. Además, dichas nanopartículas fueron suspendidas en alcohol y sonicadas durante una hora para ser observadas de nuevo en el microscopio electrónico de barrido y de transmisión.

6.1.2. Nanopartículas de PPy-I

Las nanopartículas de PPy-I se sintetizaron en un reactor de plasma como el mostrado en la figura 6.2

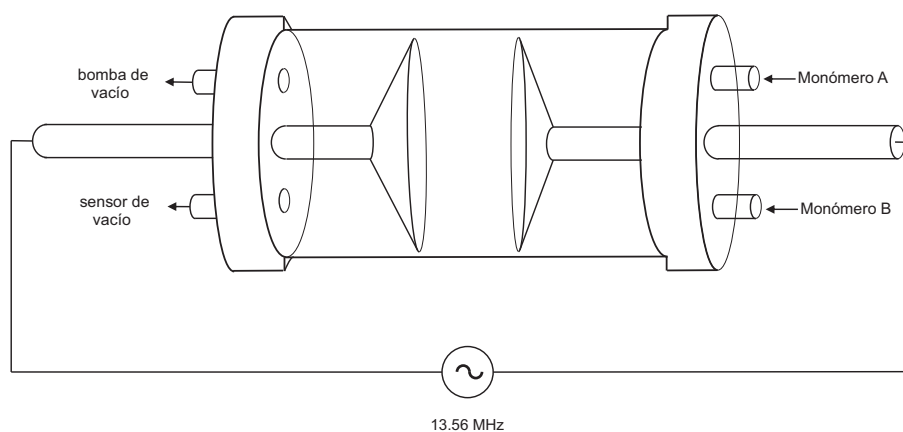


Figura 6.2: Diagrama del reactor de plasma utilizado para sintetizar las nanopartículas de PPy.

El reactor de plasma está formado por un tubo de borosilicato de 25 *cm* de

largo, 9 cm de diámetro exterior y 5 mm de espesor. Los extremos del primer tubo se encuentran sellados por dos tapas de acero inoxidable, a través de ellas pasan dos electrodos redondos de acero inoxidable de 7 cm de diámetro, conectados a un generador de radio frecuencia a 13,56 MHz. Ambas tapas tienen dos aperturas, por una de las tapas son introducidos el pirrol y el yodo, cada uno de ellos por una apertura diferente. En la otra tapa se conecta un sensor de vacío a un apertura y a la otra una trampa de gases en serie con una bomba de vacío.

A diferencia de las nanopartículas de PPy, en este caso se realizó una sola síntesis con una potencia de 40 W, 2 Torr de presión y 5 cm de separación entre los electrodos (40 W – 2 Torr – 5 cm).

Las nanopartículas se observaron en un microscopio de electrónico de barrido. Además, dichas nanopartículas fueron suspendidas en alcohol y sonicadas durante una hora para ser observadas de nuevo en el microscopio electrónico de barrido y de transmisión.

6.2. Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares RIN-M y NG 108-15 correspondientes a células beta de rata y a un híbrido celular de neuroblastoma de ratón y glioma de rata, respectivamente. Ambas líneas fueron adquiridas en ATCC[®].

6.2.1. RIN-M

Esta línea celular proviene de un insulinoma de una rata macho de la especie *Rattus Norvegicus*; el tumor se originó por altas dosis de radiación[37] y se trasplantó entre ratones de la misma especie para estabilizar la línea celular [38]. Las células de esta línea secretan insulina y somatostatina[39], tienen morfología epitelial y un tamaño aproximado de 10 μm como se puede ver en la Figura 6.3(a).

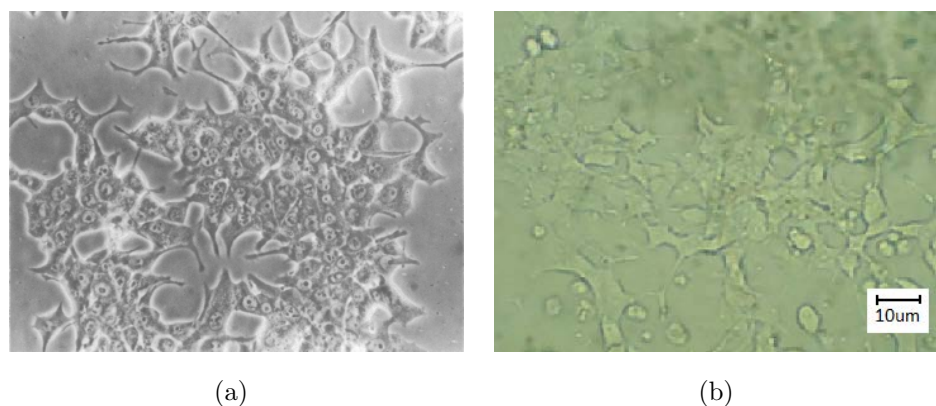


Figura 6.3: (a) Imagen de la línea celular RIN-M reportada en [39], la imagen reportada no tiene barra de escala. (b) Imagen de la línea celular RIN-M proliferada en el laboratorio.

Esta línea celular se proliferó siguiendo el protocolo de ATCC[®] utilizando RPMI-1640 como medio de cultivo base y completándolo con suero fetal bovino y antibiótico con antimicótico al 10 % y 1 % del volumen total, respectivamente. La línea celular se incubó en un ambiente humedecido con 5 % de CO₂ a 37° C, utilizando cajas petri de cultivo de 100 × 20 mm y cambiando el medio de cultivo cada tres días. La morfología de los cultivos fue similar a la reportada por el proveedor Figura, , como se puede ver en la 6.3(b).

6.2.2. NG 108-15

Esta línea celular proviene de la fusión de las líneas celulares N18TG2 y C6-BU-1, que corresponden a neuroblastoma de ratón y glioma de rata, respectivamente [40] , [41]. Las células de esta línea tienen morfología epitelial y un tamaño de 10 μm a 20 μm como se puede ver en la Figura 6.4(a).

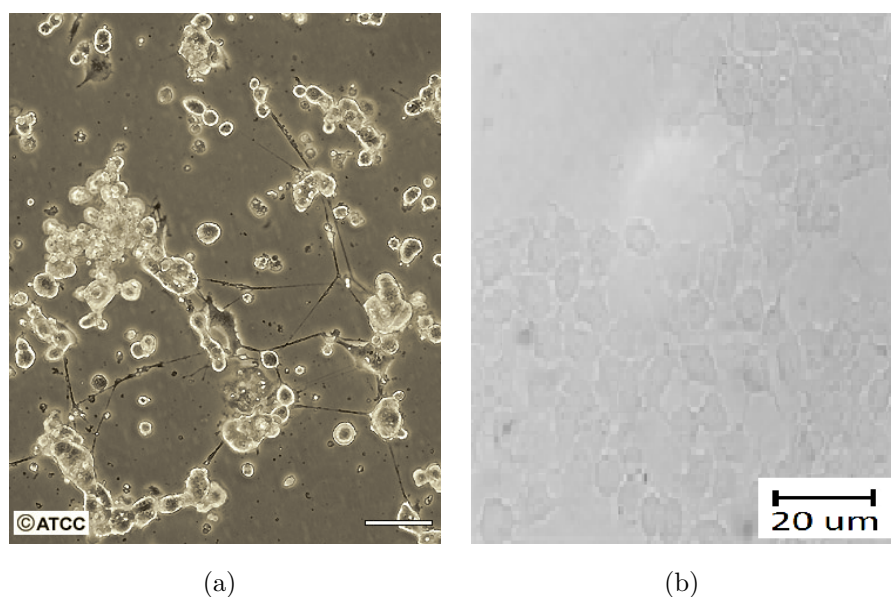


Figura 6.4: (a) Imagen de la línea celular NG 108-15 reportada por ATCC[®]. La barra de escala corresponde a 20 μm . (b) Imagen de la línea celular NG 108-15 proliferada en el laboratorio.

Esta línea celular se proliferó utilizando DMEM como medio de cultivo base y completándolo con suero fetal bovino, glutamina, hat y antibiótico con antimicótico al 10%, 2%, 1%, y 1% del volumen total, respectivamente. La línea celular se incubó en un ambiente humedecido con 5% de CO_2 a 37°C, utilizando botellas de cultivo con cuello en ángulo de 75° y cambiando el medio de cultivo cada tres días. La morfología de los cultivos fue similar a la reportada por el proveedor, como se puede ver en la Figura 6.4(b).

6.3. Cultivos celulares con nanopartículas

Los cultivos para ambas líneas celulares se dividieron en tres grupos, uno de células sin partículas, otro de células con partículas de PPy y el último de células con partículas de PPy-I. Todos ellos se cultivaron a 37°C en un ambiente humedecido con 5% de CO_2 , con cajas petri de 35 × 10 mm y usando sus respectivos medios de cultivo.

Para el grupo de células sin nanopartículas se depositaron 1×10^6 células en un tubo eppendorf y se completó con medio de cultivo para tener un volumen

final de 2 ml . Las células en el tubo eppendorf fueron centrifugadas a $1\,200\text{ rpm}$ por 5 minutos formando así un botón celular que fue disgregado resuspendiendo con ayuda de una pipeta. Por último, esta suspensión se depositó en una caja petri y se llevó a la incubadora.

Para el grupo de células con nanopartículas de PPy se depositaron 1×10^6 y $200\ \mu\text{g}$ en un tubo eppendorf y se completó con medio de cultivo para tener un volumen final de 2 ml . Las células con las nanopartículas en el tubo eppendorf fueron centrifugadas a $1\,200\text{ rpm}$ por 5 minutos formando así un botón celular con nanopartículas de PPy que fue disgregado resuspendiendo con ayuda de una pipeta. Por último esta suspensión se depositó en una caja petri y se llevó a la incubadora.

Para el grupo de células con nanopartículas de PPy-I se repitió el mismo procedimiento que en el grupo de células con nanopartículas de PPy, pero en este caso se usaron las nanopartículas de PPy-I.

Los conteos celulares se llevaron a cabo con una cámara de Neubauer. El medio de cultivo se cambió cada tercer día. La línea celular RIN-M se cultivó por tres semanas y se usaron los pasajes 22–23; mientras que la línea celular NG108-15 sólo por una semana y usó el pasaje 83. Se tomaron fotos de los cultivos con ayuda de un microscopio óptico y una cámara digital del 10 MP.

6.4. Viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular, se hicieron pruebas de viabilidad con un kit de Calceína-AM y Homodímero de Etidio-1¹ adquirido en AccesoLab[®] utilizando además pipetas con puntas de 3 mm de diámetro para no destruir los agregados celulares formados en los cultivos.

Para ello, primero se lavaron las células con un buffer fosfato salino (PBS). Esto se hizo sin centrifugar, esperando a que las células precipitarán en el fondo del tubo, lo cual tomaba aproximadamente cinco minutos. Una vez precipitadas se quitó el sobrenadante y se agregó 2 ml de PBS fresco quedando

¹Para más detalles de esta técnica ver la sección de apéndice A.1

de nuevo las células en suspensión, el proceso se repitió dos veces más pero agregando $500\ \mu\text{l}$ al final del último lavado y llevando esta suspensión a una nueva caja petri de $35 \times 10\ \text{mm}$.

Una vez lavadas, se preparó una solución de PBS con Calceina-AM y Homodímero de Etidio-1 en una concentración de $[1\ \mu\text{M}]$ y $[2\ \mu\text{M}]$, que corresponden a las concentraciones recomendadas por el kit. Inmediatamente después, se añadieron $500\ \mu\text{l}$ de esta solución en cada caja petri y se cubrieron para protegerlas de la luz, dejándolas reposar durante treinta minutos antes de ser vistas en el microscopio confocal.

Con esta técnica de viabilidad, las células viables fluorescen en color verde mientras que las células muertas fluorescen en color rojo.

Capítulo 7

Resultados

7.1. Nanopartículas de PPy

Durante la síntesis se observó la formación de un material amarillo en algunas zonas del reactor, como se puede ver en la Figura 7.1(a). Al final de la síntesis se obtuvo PPy en forma de película y en forma de polvo, con una coloración café y amarilla respectivamente Figura, como se muestra en la figura 7.1(b).

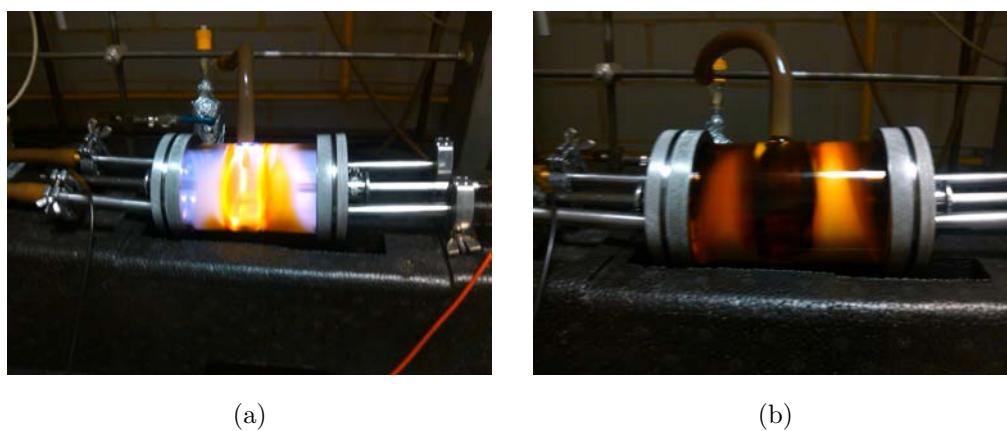


Figura 7.1: (a) Imagen del reactor durante la síntesis. (b) Imagen del reactor al final de la síntesis.

7.1.1. Polvo SEM



Figura 7.2: Polvo de PPy obtenido a $45 W - 1.9 Torr - 2.5 cm$.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido mostraron que el polvo de PPy era en realidad un conglomerado de partículas esféricas de PPy. En las Figuras 7.3(a)-7.6(a) se muestran las partículas obtenidas bajo diferentes condiciones de síntesis.

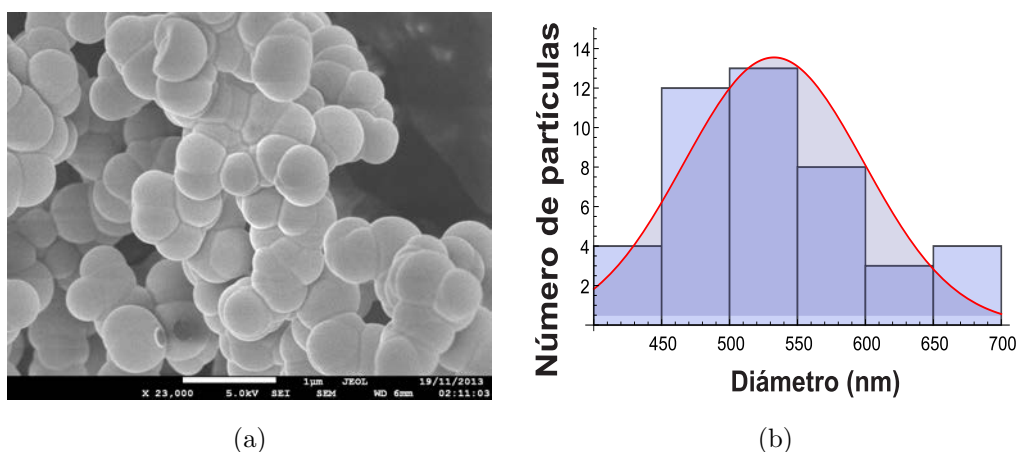


Figura 7.3: Polvo de PPy sintetizado a $45 W - 1 Torr - 3 cm$. (a) Imagen de microscopía electrónica de barrido. (b) Histograma del diámetro de las partículas.

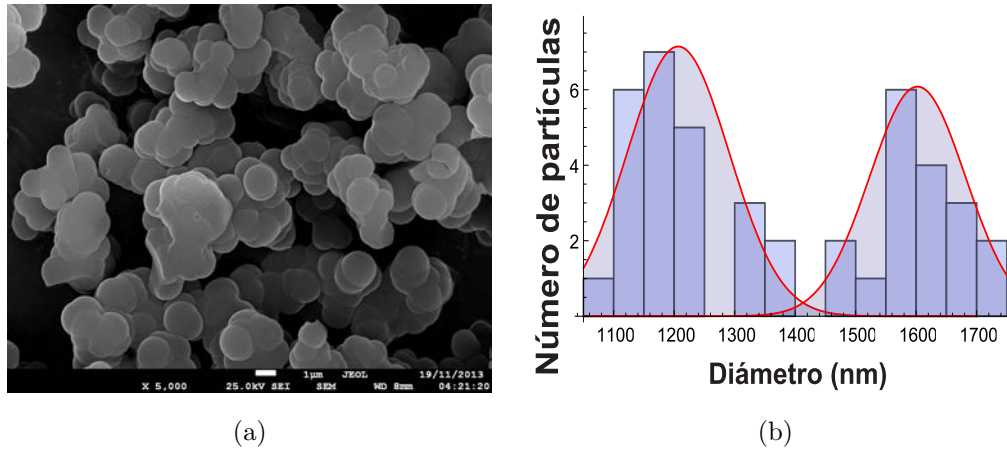


Figura 7.4: Polvo de PPy sintetizado a $45\text{ W} - 1.2\text{ Torr} - 3\text{ cm}$. (a) Imagen de microscopia electrónica de barrido. (b) Histograma del diámetro de las partículas.

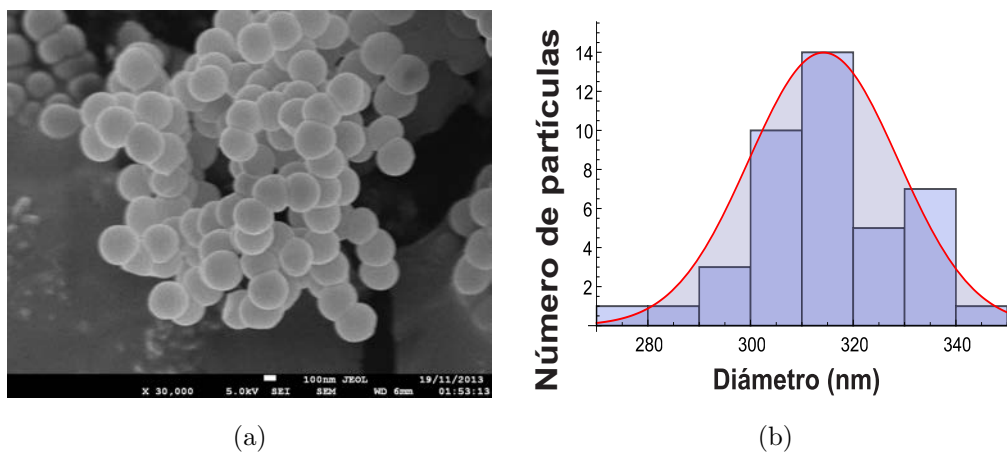


Figura 7.5: Polvo de PPy sintetizado a $45\text{ W} - 1.6\text{ Torr} - 3\text{ cm}$. (a) Imagen de microscopia electrónica de barrido. (b) Histograma del diámetro de las partículas.

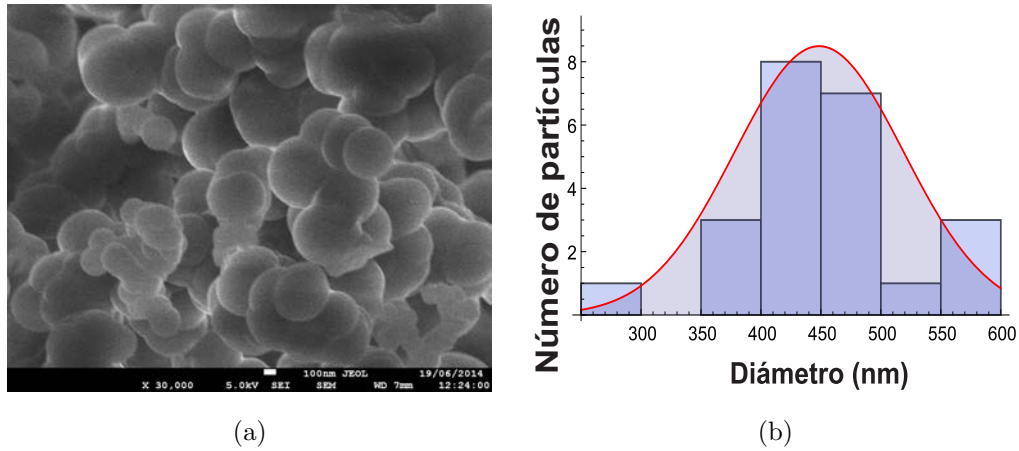


Figura 7.6: Polvo de PPy sintetizado a $45\text{ W} - 1.9\text{ Torr} - 2.5\text{ cm}$. (a) Imagen de microscopía electrónica de barrido. (b) Histograma del diámetro de las partículas.

Los diámetros de las partículas se ajustan a una distribución de tipo normal, como se puede ver en las Figuras 7.3(b)-7.6(b), y van desde algunos cientos de nanómetros hasta $1.6\ \mu\text{m}$. Los diámetros de las partículas tienen las siguientes medias y desviaciones estándar: las sintetizadas a $45\text{ W} - 1\text{ Torr} - 3\text{ cm}$ tienen una media de 533 nm con una desviación estándar de 66 nm ; las sintetizadas a $45\text{ W} - 1.2\text{ Torr} - 3\text{ cm}$ tienen una media de $1.2\ \mu\text{m}$ y $1.6\ \mu\text{m}$ con una desviación estándar de 84 nm y 80 nm respectivamente; las sintetizadas a $45\text{ W} - 1.6\text{ Torr} - 3\text{ cm}$ una media de 314 nm con una desviación estándar de 15 nm y las sintetizadas a $45\text{ W} - 1.9\text{ Torr} - 2.5\text{ cm}$ una media de 448 nm con una desviación estándar de 70 nm .

La mayor cantidad de nanopartículas obtenidas en una sola síntesis fue de 290 mg , esta cantidad se muestra en la Figura 7.2, corresponden a la síntesis de $45\text{ W} - 1.9\text{ Torr} - 2.5\text{ cm}$. Estas partículas fueron utilizadas en todos los cultivos celulares.

7.1.2. Partículas suspendidas en alcohol

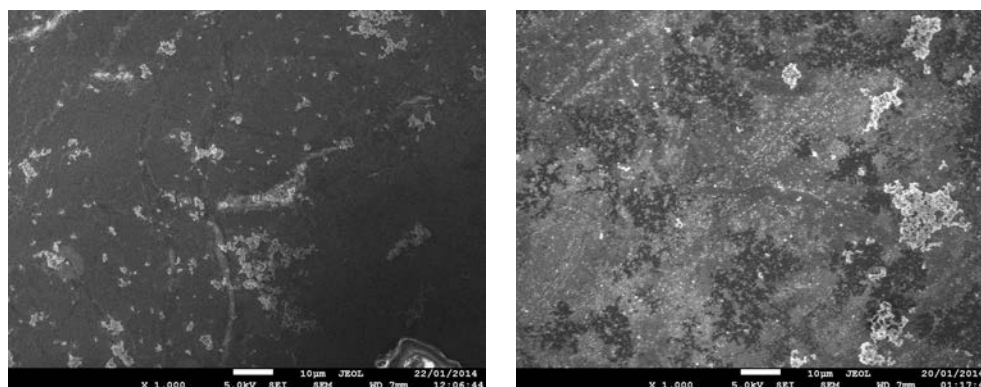


(a)

(b)

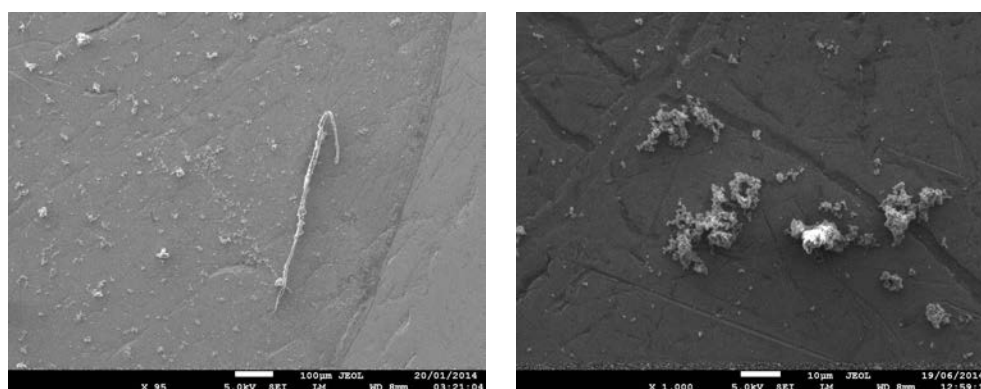
Figura 7.7: (a) Nanopartículas de PPy en polvo (b) Nanopartículas de PPy suspendidas en alcohol.

SEM



(a)

(b)



(c)

(d)

Figura 7.8: Imagen de las partículas de PPy suspendidas en alcohol con microscopía electrónica de barrido (a) $45\text{ W} - 1\text{ Torr} - 3\text{ cm}$ barra de escala $10\ \mu\text{m}$, (b) $45\text{ W} - 1.2\text{ Torr} - 3\text{ cm}$ barra de escala $10\ \mu\text{m}$, (c) $45\text{ W} - 1.6\text{ Torr} - 3\text{ cm}$, barra de escala $100\ \mu\text{m}$ (d) $45\text{ W} - 1.9\text{ Torr} - 2.5\text{ cm}$ barra de escala $10\ \mu\text{m}$.

Las nanopartículas permanecieron en suspensión durante al menos cuatro semanas, como se muestra en la Figura 7.7(b); algunas de ellas se encuentran dispersas y otras en agregados de hasta $10\ \mu\text{m}$, como se puede ver en la Figura 7.8.

TEM

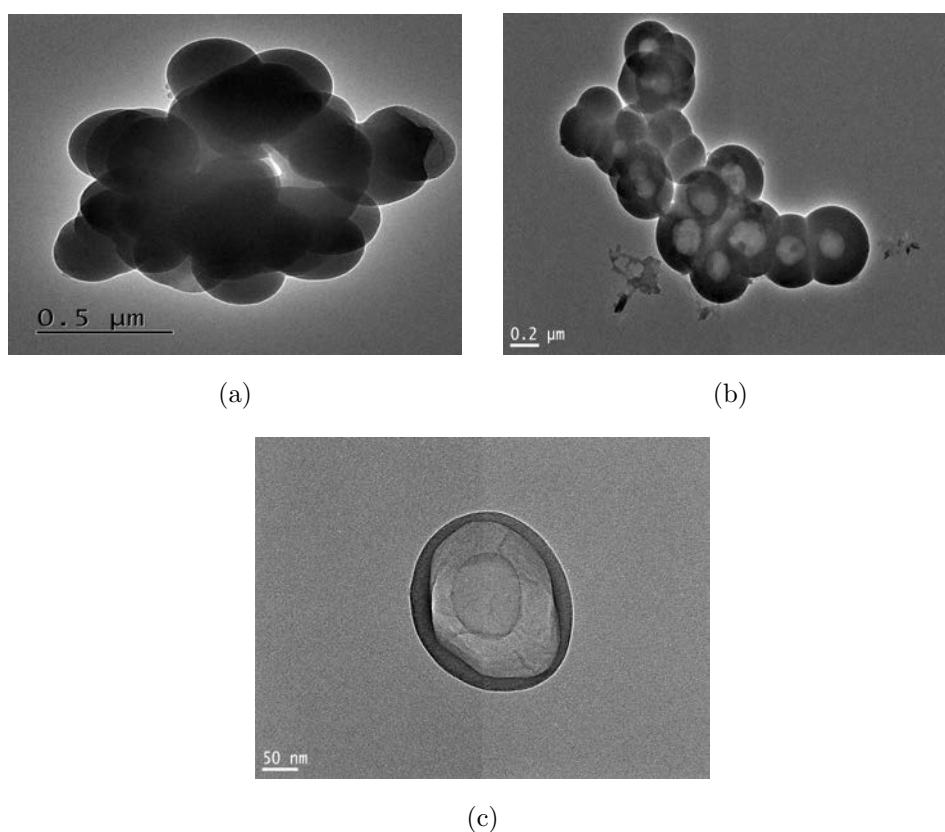


Figura 7.9: Imagen de las nanopartículas de PPy suspendidas en alcohol con microscopía electrónica de transmisión. (a) Nanopartículas uniformes. (b) Nanopartículas huecas. (c) Nanopartículas con estructura.

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión muestran que dentro de una misma síntesis se obtienen dos tipos de partículas diferentes, unas con densidad constante y otras de menor densidad en el centro, como se puede ver en las Figuras 7.9(a) y 7.9(b), respectivamente. Algunas de ellas incluso llegan a mostrar un tipo de estructura interna, como se muestra en la Figura 7.9(c).

7.2. Nanopartículas de PPy-I

Al igual que las nanopartículas de PPy, durante la síntesis se observó la formación de un material amarillo en algunas zonas del reactor, como se puede ver en la Figura 7.10(a). Al final de la síntesis se obtuvo PPy-I en forma de película y en forma de polvo, con una coloración café y amarilla respectivamente, como se muestra en la Figura 7.10(b).

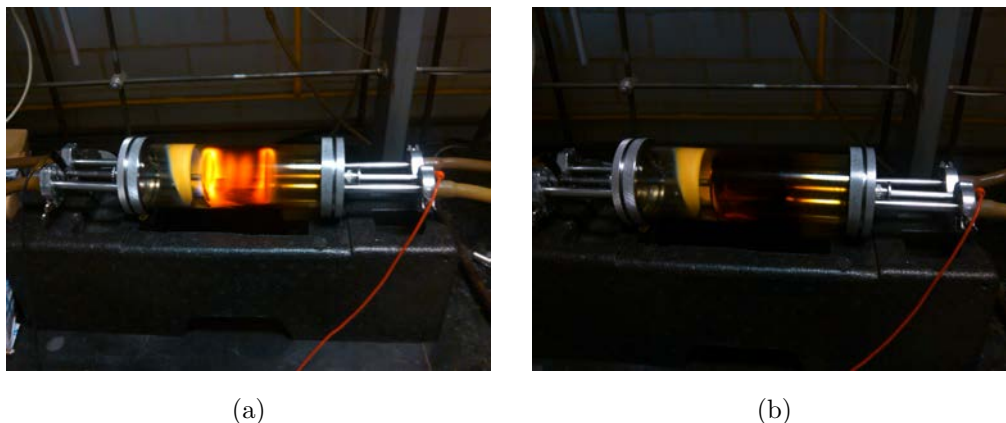


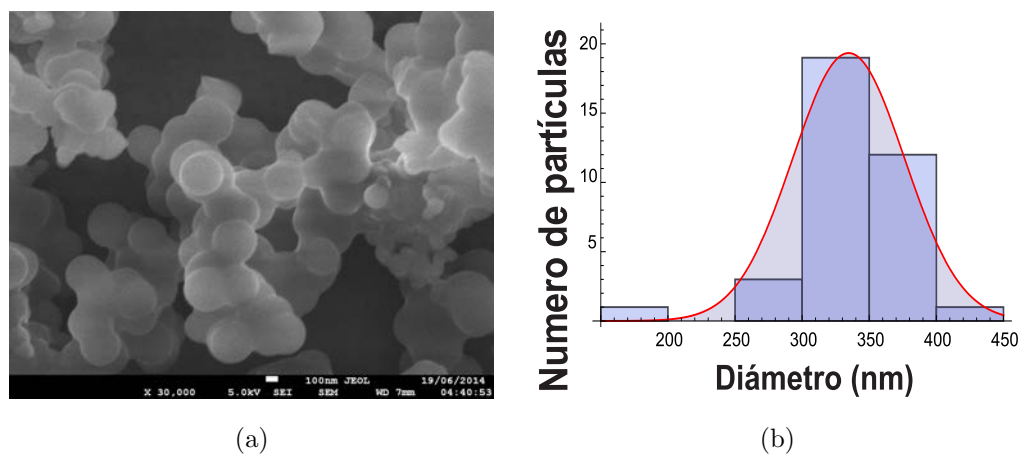
Figura 7.10: (a) Imagen del reactor durante la síntesis. (b) Imagen del reactor al final de la síntesis.

7.2.1. Polvo SEM



Figura 7.11: Polvo de PPy-I sintetizado a $40\text{ W} - 2\text{ Torr} - 5\text{ cm}$.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido mostraron que el polvo de PPy-I era en realidad un conglomerado de partículas esféricas de PPy-I. La Figura 7.12(a) muestra las partículas obtenidas en esta síntesis.



Polvo de PPy sintetizado a $40\text{ W} - 2\text{ Torr} - 5\text{ cm}$. (a) Imagen de microscopia electrónica de barrido. (b) Histograma del diámetro de las partículas.

Los diámetros de las partículas se ajustan a una distribución de tipo normal, como se puede ver en la Figura . Dichas partículas tiene una media de 335 nm y una desviación estándar de 42 nm . La cantidad de nanopartículas obtenidas fue de 41 mg , lo cual fue suficiente para realizar todos los experimentos. Esta cantidad se muestra en la Figura 7.11.

7.2.2. Partículas suspendidas



Figura 7.12: (a) Nanopartículas de PPy-I en polvo- (b) Nanopartículas de PPy-I suspendidas en alcohol.

SEM

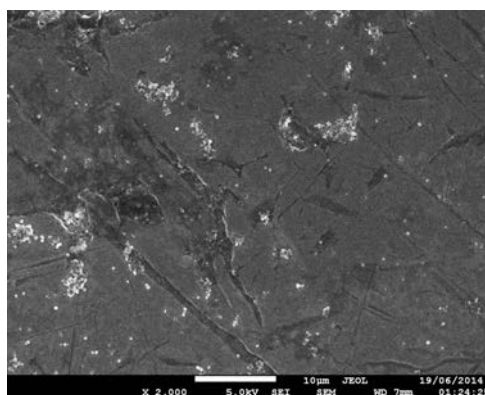
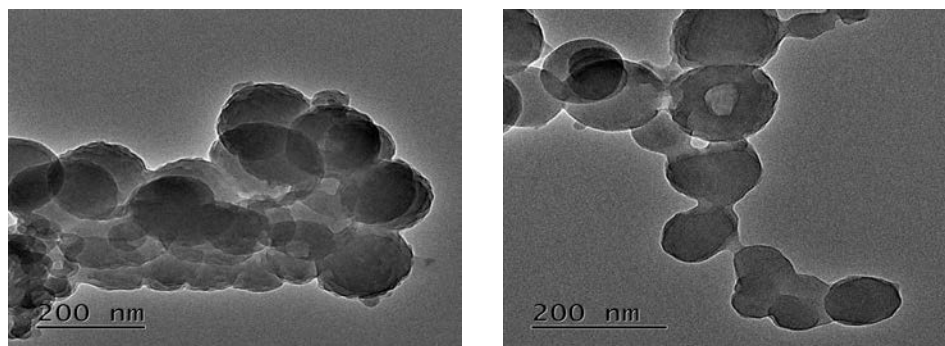


Figura 7.13: Imagen de las nanopartículas de PPy-I suspendidas en alcohol con microscopia electrónica de barrido, barra de escala de $10\ \mu\text{m}$.

Las nanopartículas permanecieron en suspensión durante al menos cuatro semanas, como se muestra en la Figura 7.12, algunas de ellas se encuentran dispersas y otras en agregados de hasta $10\ \mu\text{m}$, como se puede ver en la Figura 7.13.

TEM



(a)

(b)

Figura 7.14: Imagen de las nanopartículas de PPy-I suspendidas en alcohol con microscopia electrónica de transmisión. (a) Partículas huecas, (b) Partículas uniformes.

Las imágenes de microscopia electrónica de transmisión muestran que dentro de una misma síntesis se obtienen dos tipos de partículas diferentes, unas con densidad constante y otras de menor densidad en el centro, como se puede ver en las Figuras 7.14(a) y 7.14(b), respectivamente.

7.3. Cultivos celulares con nanopartículas

7.3.1. RIN-M

Inicio del cultivo

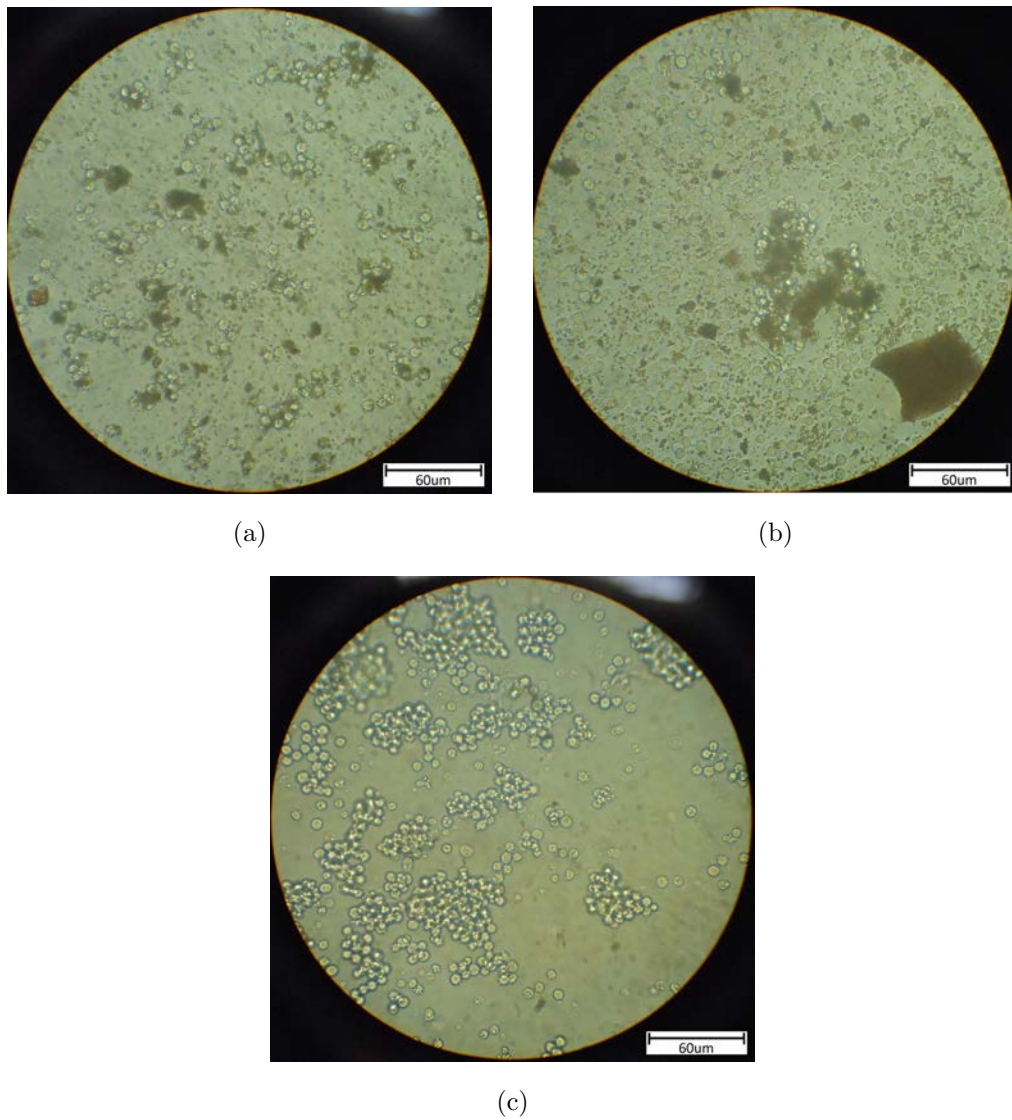


Figura 7.15: RIN-M inicio del cultivo (a) PPy (x40), (b) PPy-I (x40), (c) control(x40).

Un día de cultivo

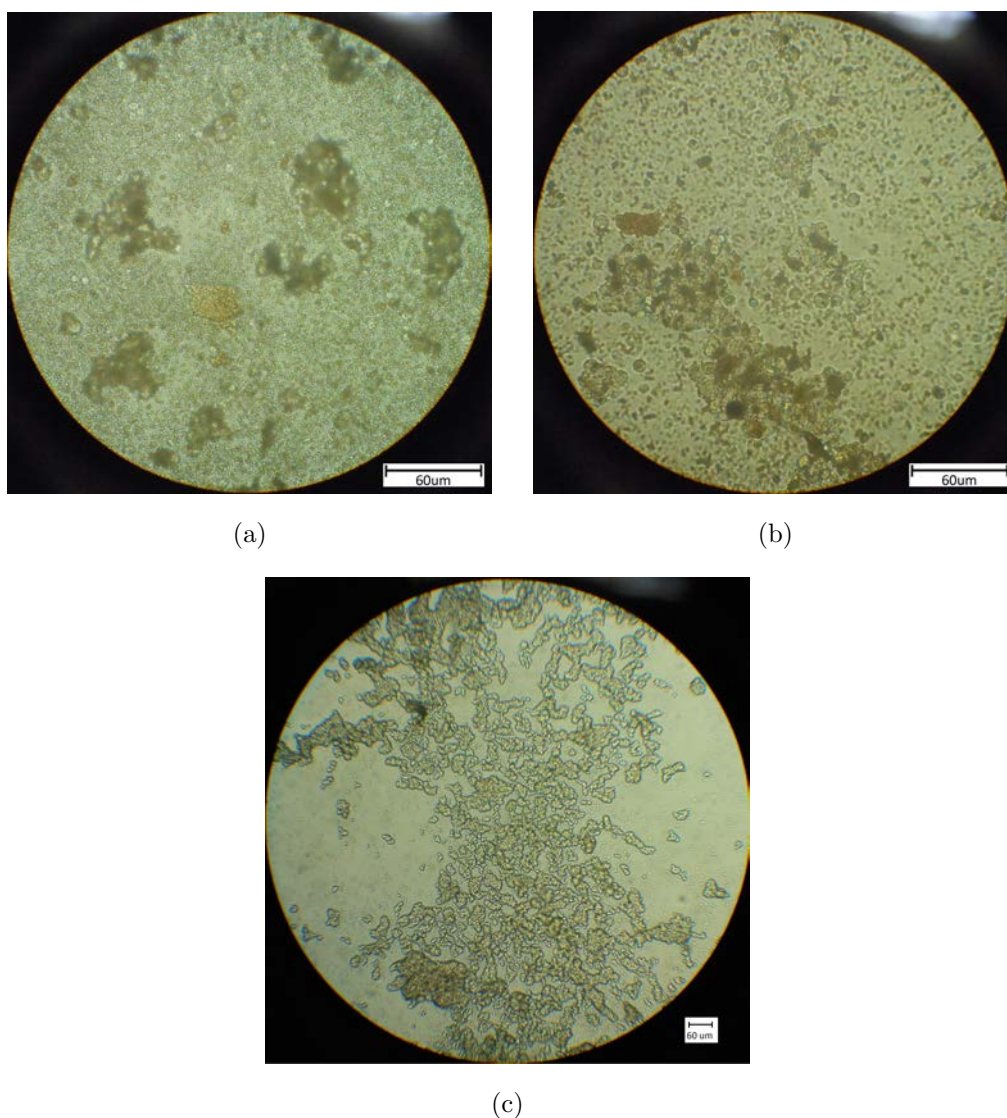
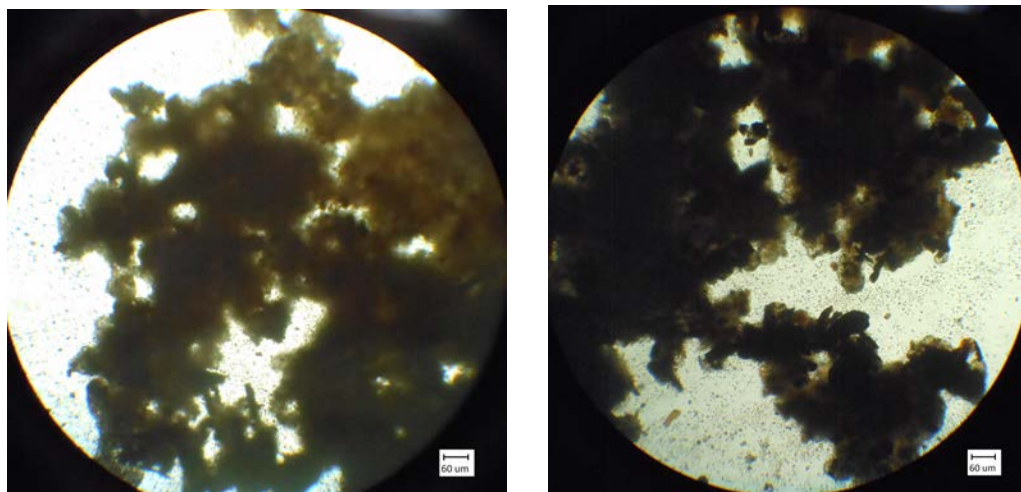


Figura 7.16: RIN-M un día de cultivo (a) PPy (x40), (b) PPy-I (x40), (c) control(x10).

Las células en el grupo control comienzan a formar agregados celulares desde el inicio del cultivo y después de un día de cultivo continúan agregándose formando agregados de mayor tamaño, como se muestra en las Figuras 7.15(c) y 7.16(c). Las células de los grupos con nanopartículas de PPy y PPy-I se adhieren a las nanopartículas desde el inicio del cultivo y forman agregados celulares más pequeños que los del grupo control que no parecen aumentar su tamaño después de un día de cultivo, como se muestra en las Figuras 7.15(a), 7.15(b), 7.16(a) y 7.16(b).

Un semana de cultivo



(a)

(b)



(c)

Figura 7.17: RIN-M una semana de cultivo (a) PPy (x10), (b) PPy-I (x10), (c) Cajas de cultivo, arriba a la derecha grupo PPy, arriba a la izquierda grupo PPy-I y abajo grupo control.

Los tres grupos forman un agregado celular en el centro de la caja que es perceptible a simple vista, como se puede ver en la Figura 7.17(c). Las células en el grupo con nanopartículas de PPy y PPy-I han quedado completamente cubiertas por las nanopartículas, como se puede ver en las Figuras 7.17(a) y 7.17(b).

En la segunda semana no se aprecian cambios significativos.

Tres semana de cultivo

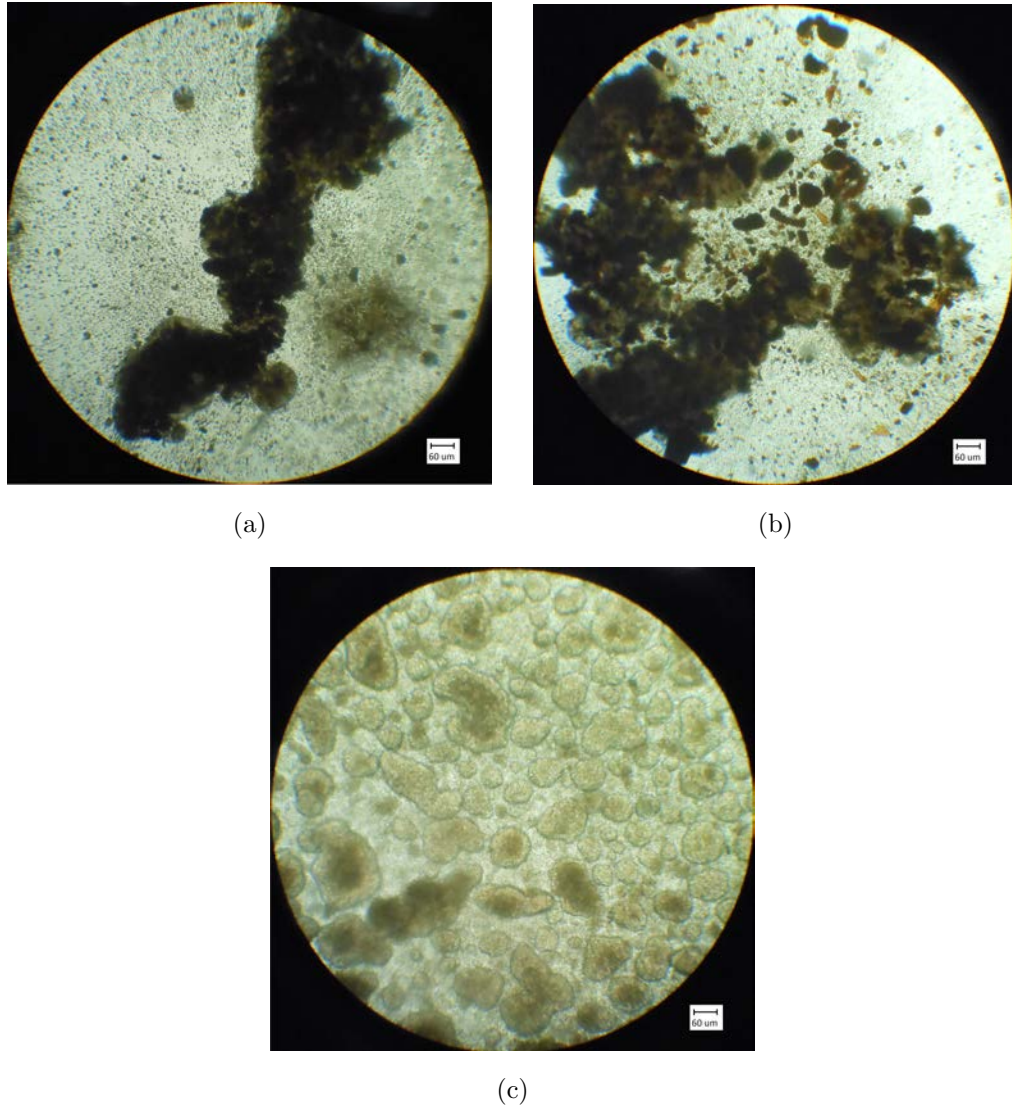


Figura 7.18: RIN-M tres semanas de cultivo (a) PPy (x10), (b) PPy-I (x10), (c) control(x10).

El agregado celular del grupo de células con nanopartículas de PPy y PPy-I también comienza a dividirse en agregados más pequeños pero de mayor tamaño que los del grupo control, las nanopartículas aún se encuentran cubriendo los agregados celulares, como se puede ver en las Figuras 7.18(a) y 7.18(b).

7.3.2. NG 108-15

Siete días de cultivo

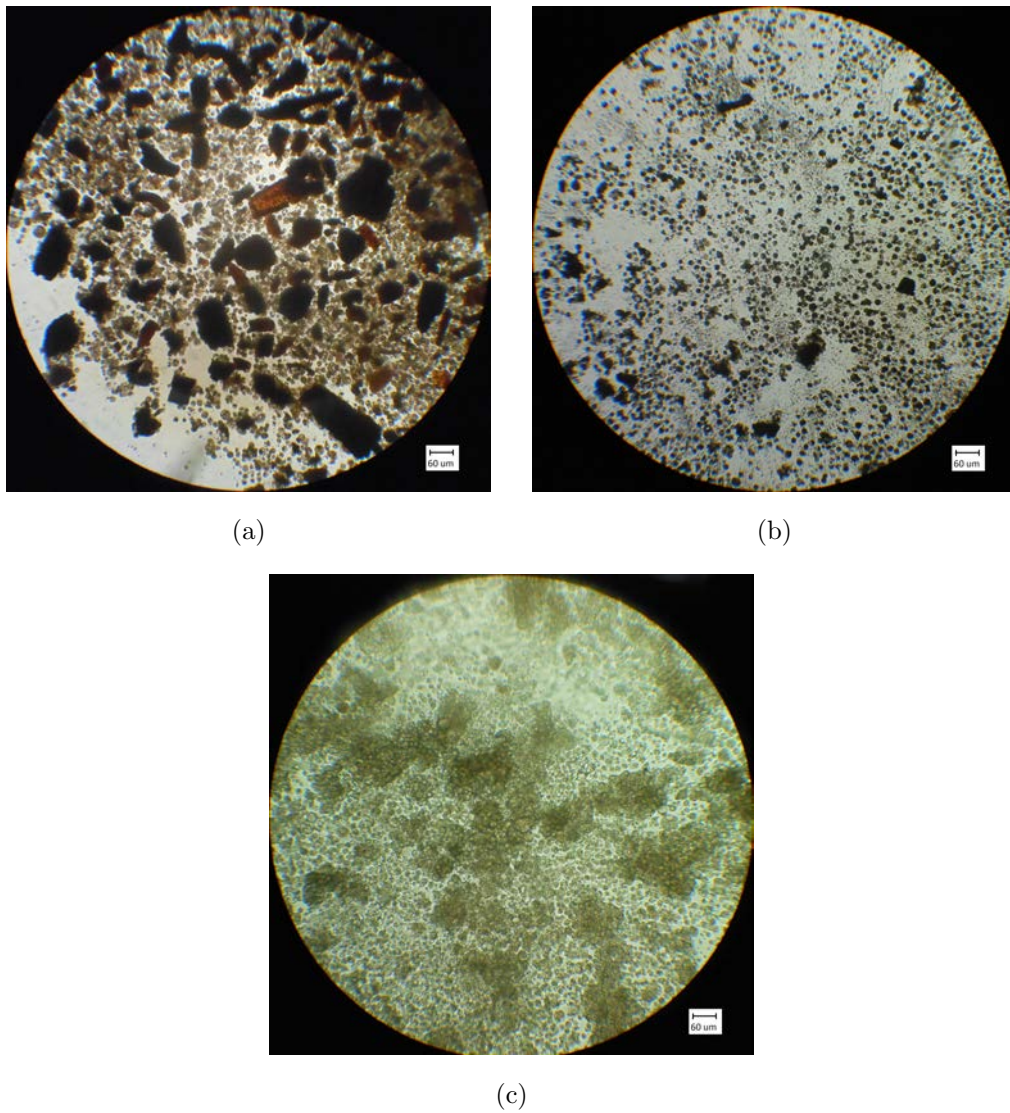


Figura 7.19: NG 108-15 una semana de cultivo (a) PPy (x10), (b) PPy-I (x10), (c) control(x10).

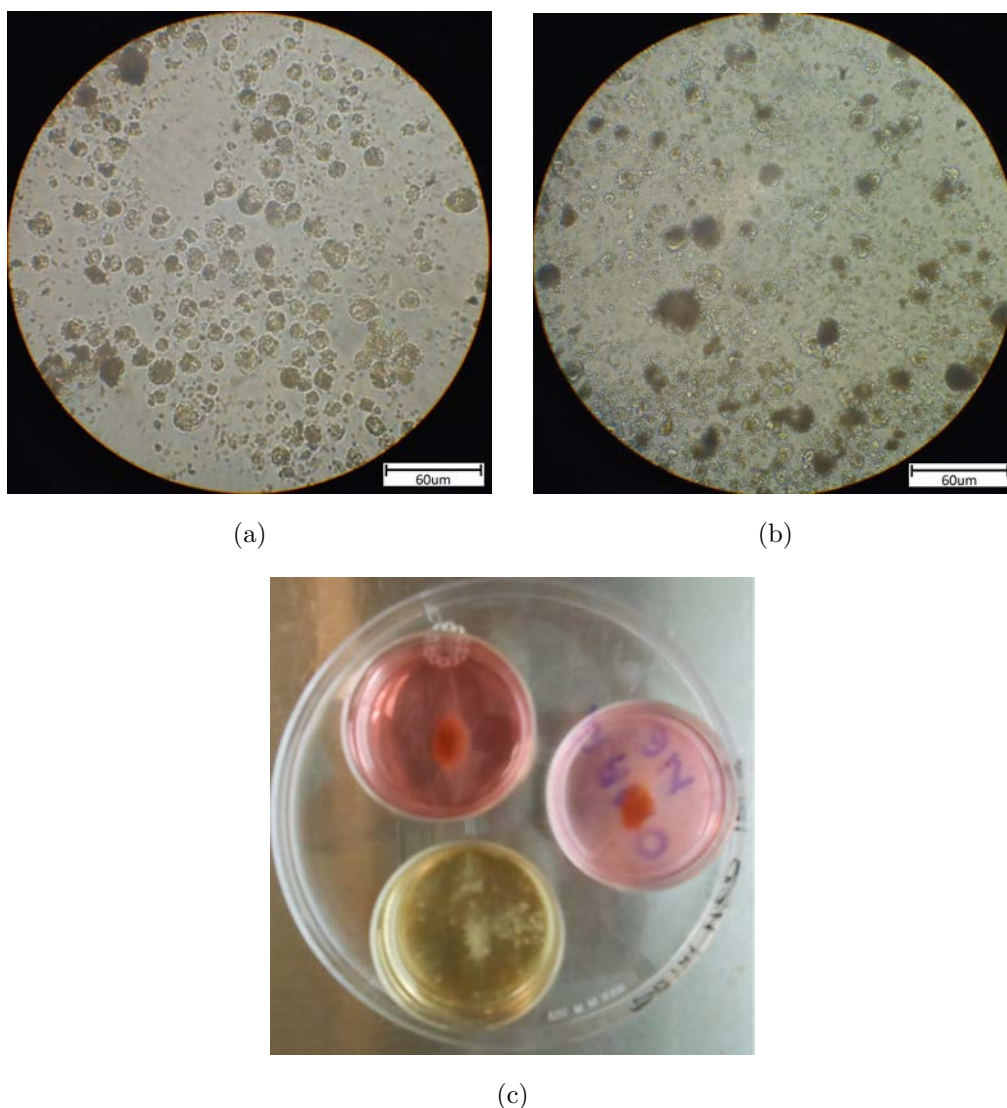


Figura 7.20: NG 108-15 una semana de cultivo (a) PPy (x40), (b) PPy-I (x40), (c) (c) Cajas de cultivo, arriba a la derecha grupo PPy, arriba a la izquierda grupo PPy-I y abajo grupo control.

Los tres grupos comienzan a formar un agregado celular en el centro de la caja de cultivo, como se puede ver en la Figura 7.20(c). Los agregados celulares del grupo control son más grandes que los agregados de los grupos con nanopartículas de PPy y PPy-I, como se puede observaren las Figuras 7.19(a), 7.19(b) y 7.19(c).

Las células en los grupos con nanopartículas de PPy y PPy-I se encuentran adheridas a las nanopartículas y casi cubiertas por ellas; incluso se encuentran muchas células aisladas cubiertas por las nanopartículas, como se puede ver en

las Figuras 7.19(a), 7.19(b), 7.20(a) y 7.20(b).

7.3.3. Microtejido

En pruebas preliminares se cultivaron células RIN-M con nanopartículas de PPy sintetizadas a $45\text{ W} - 1.6\text{ Torr} - 3\text{ cm}$ durante cinco semanas, al término de las cinco semanas se fijaron y se llevaron a observar al microscopio electrónico de barrido de barrido.

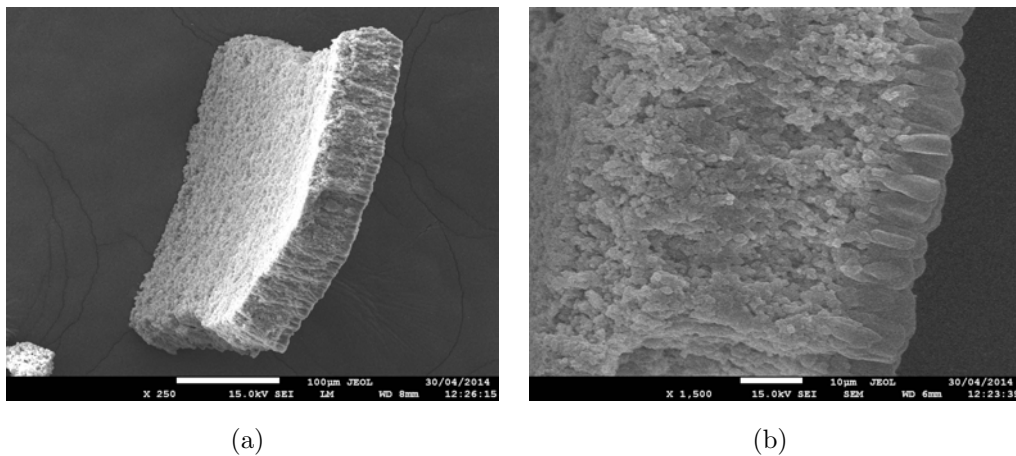


Figura 7.21: RIN-M con nanopartículas de PPy, cinco semanas. (a)x250. (b) x1,500.

La imagen mostró la formación de un microtejido de aproximadamente $150\ \mu\text{m}^2$, como se puede observar en la Figura 7.21(a). Las células se encuentran organizadas formando una película sobre lo que parece ser su propia matriz extracelular, como se muestra en la Figura 7.21(b). No se observan nanopartículas de PPy.

7.4. Viabilidad celular

7.4.1. Partículas de PPy y PPy-I con calceína y homodímero de etidio-1

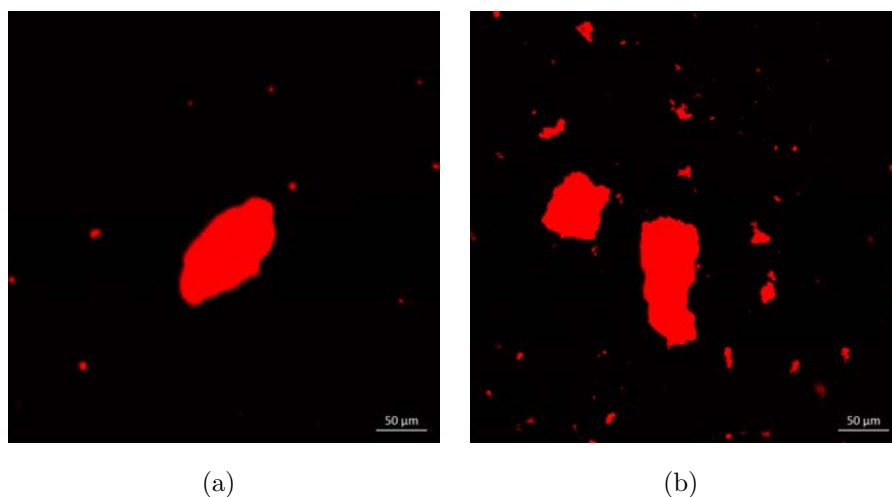


Figura 7.22: Imagen del microscopio confocal de las nanopartículas con calceína y homodímero de etidio-1. (a) PPy (b) PPy-I

Las nanopartículas de PPy y PPy-I mostraron fluorescencia en una longitud de onda cercana a la que fluoresce el homodímero de etidio-1, como se muestra en la Figura 7.22. La fluorescencia de las partículas y el homodímero de etidio-1 no pudieron ser separadas por el equipo de microscopía confocal en donde se adquirieron las imágenes, debido a ello las células muertas en las imágenes fueron generalmente enmascaradas por la fluorescencia de las nanopartículas.

7.4.2. RIN-M

Un día

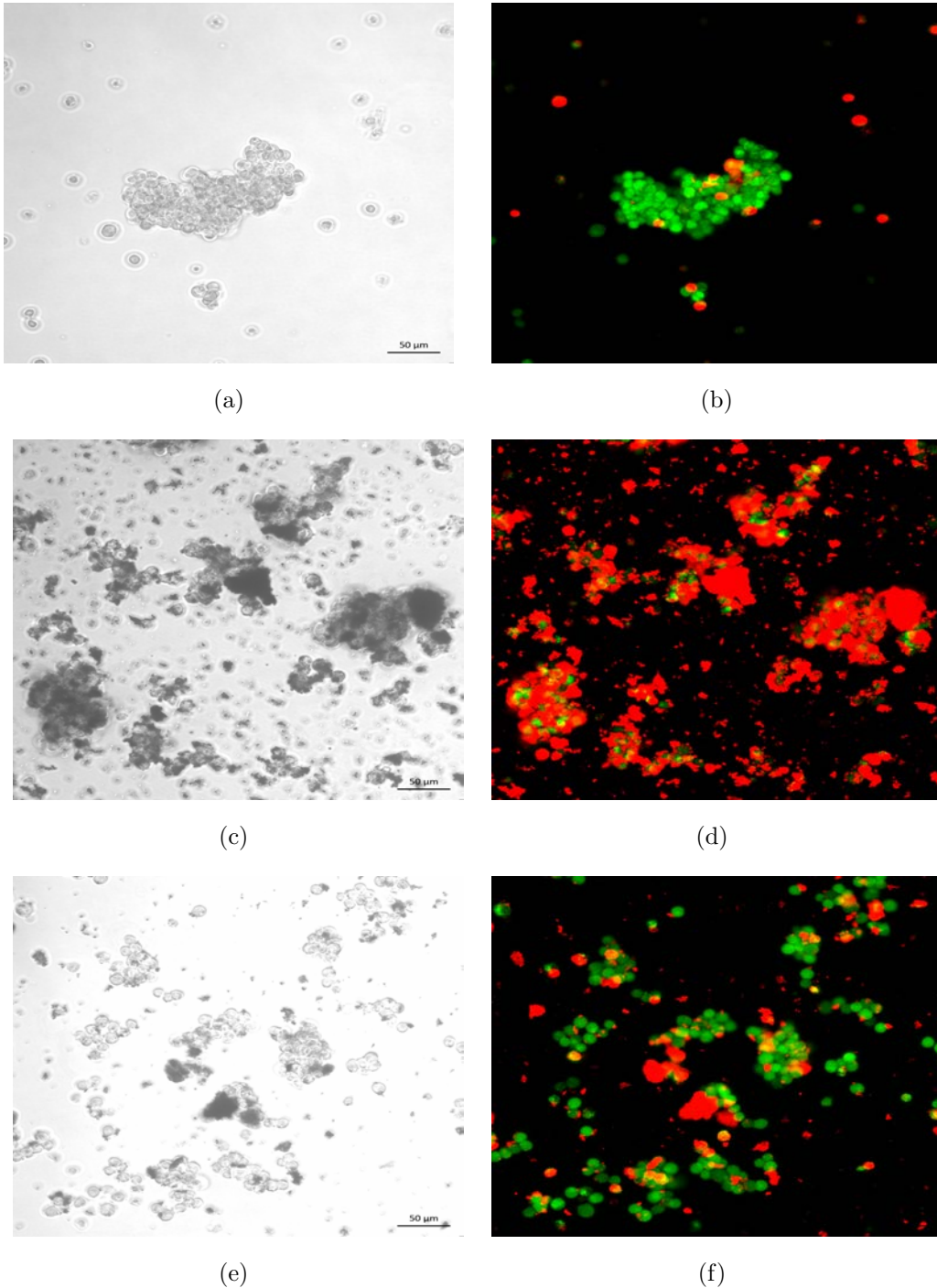


Figura 7.23: RIN-M viabilidad celular un día. (a) control campo claro. (b) Viabilidad control. (c) PPy campo claro. (d) Viabilidad PPy. (e) PPy-I campo claro. (f) Viabilidad PPy-I.

A un día de cultivo, en el grupo control se observan células aisladas alrededor de los agregados celulares, como se puede ver en la Figura 7.23(a). La mayoría de las cuales se encuentran muertas, salvo algunas cuantas que se mantienen viables; por el contrario en el agregado la mayoría de las células se encuentran viables salvo algunas cuantas muertas, como se puede observar en la Figura 7.23(b).

En el grupo de nanopartículas de PPy las células forman agregados celulares de distintos tamaños y muy pocas células se encuentran aisladas, aún cuando no se encuentran adheridas a otras células se encuentran adheridas a pequeñas porciones de PPy, como se puede ver en la Figura 7.23(c). La fluorescencia de las nanopartículas tiñe de rojo la mayor parte de la imagen impidiendo observar las células muertas; no obstante es posible observar que hay células vivas, esto puede verse en la Figura 7.23(d).

En el grupo de nanopartículas de PPy-I se encontraron agregados con pequeñas porciones de PPy-I, se observan agregados celulares de distintos tamaños y muy pocas células aisladas, aun cuando no se encuentran adheridas a otras células se encuentran adheridas a pequeñas porciones de nanopartículas de PPy-I, como se puede ver en la Figura 7.23(e). Las nanopartículas de PPy-I fluorescen menos que las nanopartículas de PPy, aún así no se pueden distinguir las células muertas; no obstante todas las células parecen ser viables incluso las células aisladas con pequeñas porciones de nanopartículas de PPy-I, esto puede verse en la Figura 7.23(f).

Una semana

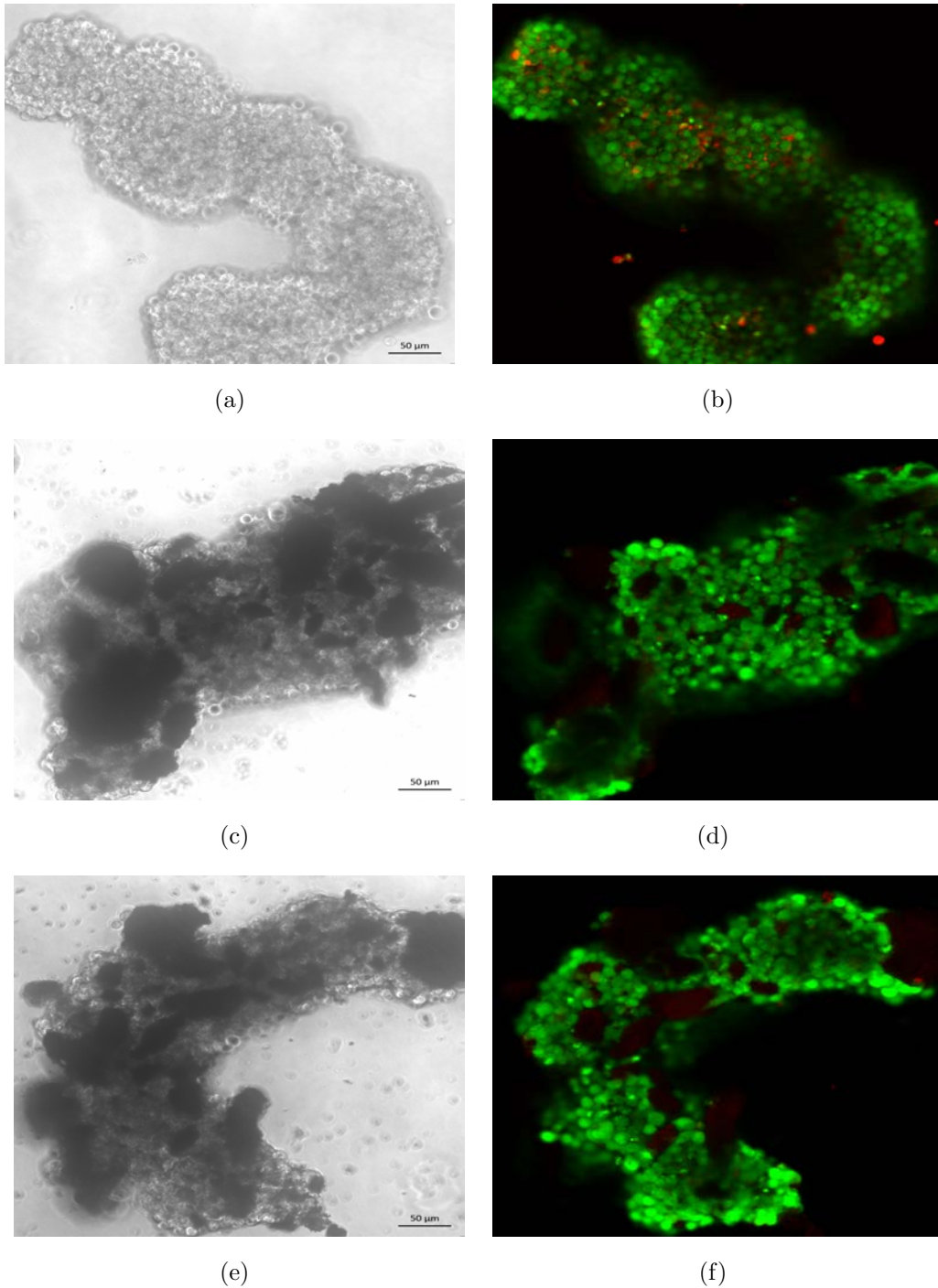


Figura 7.24: RIN-M viabilidad celular una semana. (a) control campo claro. (b) Viabilidad control. (c) PPy campo claro. (d) Viabilidad PPy. (e) PPy-I campo claro. (f) Viabilidad PPy-I.

A una semana de cultivo, en el grupo control los agregados han aumentado de tamaño y no se observan células aisladas al rededor de ellos, como se puede observar en la Figura 7.24(a); la mayor parte de las células se encuentran viables, las células muertas se encuentran principalmente en el centro del agregado y algunas cuantas en la periferia de este, como se puede ver en la Figura 7.24(b).

En el grupo de nanopartículas de PPy los agregados han aumentado de tamaño y se encuentran cubiertos por las nanopartículas de PPy, pueden verse algunas células aisladas que rodean al agregado, como se puede observar en la Figura 7.24(c), la fluorescencia de las nanopartículas de PPy parece haber desaparecido por completo salvo algunas pequeñas porciones que aun muestran fluorescencia aunque muy tenue, no se observan células muertas sólo se pueden observar células viables, como se puede ver en la Figura 7.24(d). Las células aisladas no muestran fluorescencia por lo que podrían estar en un plano focal diferente.

En el grupo de nanopartículas de PPy-I los agregados han aumentado de tamaño y se encuentran cubiertos por las nanopartículas de PPy-I, pueden verse algunas células aisladas que rodean al agregado, como se puede observar en la Figura 7.24(e). La fluorescencia de las nanopartículas de PPy-I parece haber desaparecido por completo salvo algunas pequeñas porciones que aun muestran fluorescencia aunque muy tenue pero de mayor intensidad que en comparación con el grupo de nanopartículas de PPy. Se observan dos esferas con mayor fluorescencia que podrían ser células muertas salvo estas dos todas las demás células parecen ser viables, como se muestra en la Figura 7.24(f). Las células aisladas no muestran fluorescencia por lo que podrían estar en un plano focal diferente.

Dos semanas

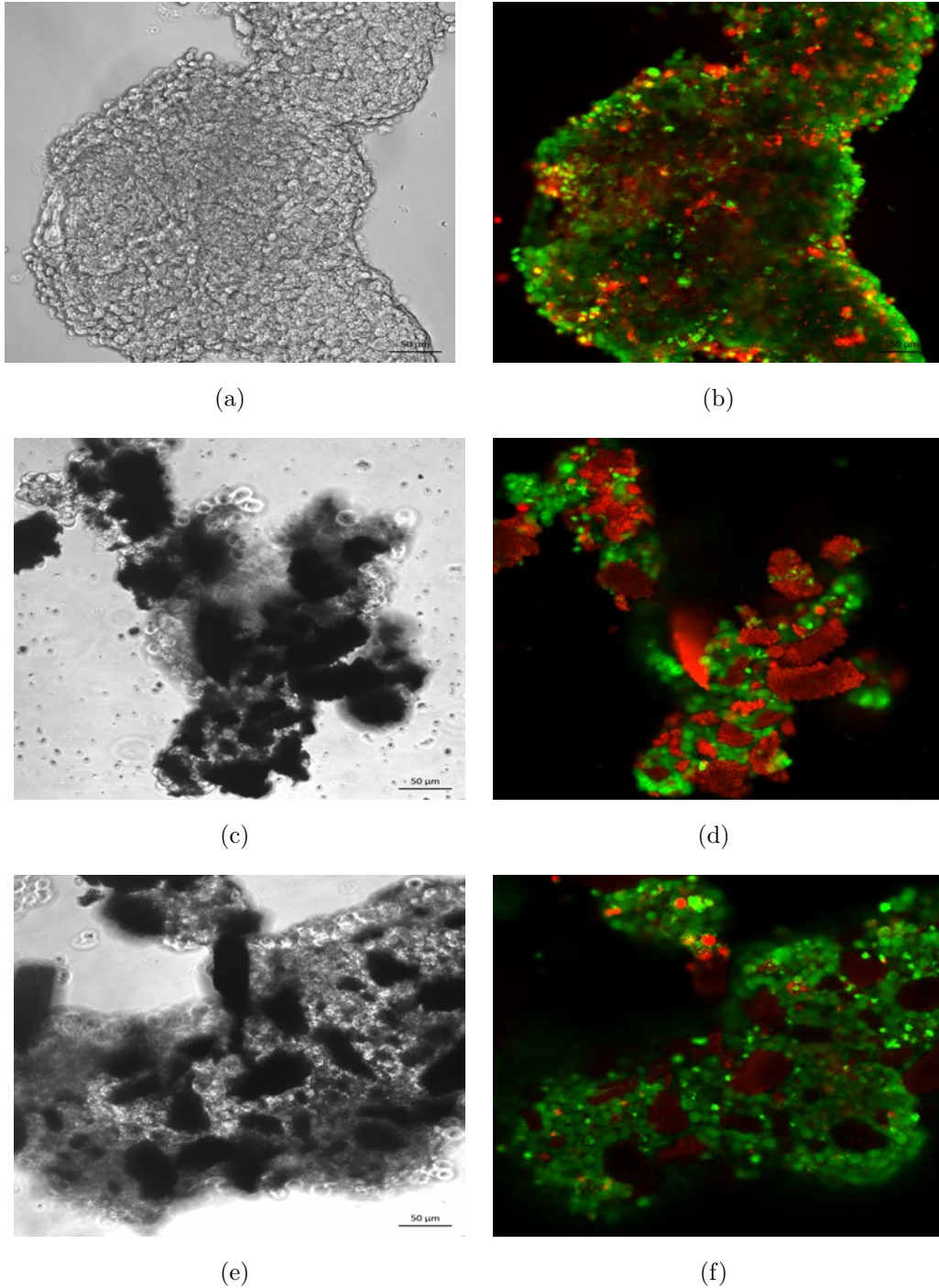


Figura 7.25: RIN-M viabilidad celular dos semanas. (a) control campo claro. (b) Viabilidad control. (c) PPy campo claro. (d) Viabilidad PPy. (e) PPy-I campo claro. (f) Viabilidad PPy-I.

A dos semanas de cultivo, en el grupo control los agregados mantienen su tamaño y no se observan células aisladas al rededor de ellos, como se puede ver en la Figura 7.25(a). Se observa una gran cantidad de células muertas en todo el agregado principalmente en el centro de este, las células viables se encuentran en mayor medida en la periferia del agregado, como se muestra en la Figura 7.25(b).

En el grupo de nanopartículas de PPy los agregados mantienen su tamaño y continúan cubiertos por las nanopartículas de PPy, pueden verse algunas células aisladas que rodean al agregado, como se muestra en la Figura 7.25(c). Las nanopartículas de PPy muestran zonas intensamente fluorescentes y otras con poca o nula fluorescencia además de una textura rugosa que pareciera estar formada por pequeñas esferas. Sólo pueden distinguirse unas pocas células muertas aún se observa una gran cantidad de células viables, como se puede ver en la Figura 7.25(d). Las células aisladas no muestran fluorescencia por lo que podrían estar en un plano focal diferente.

En el grupo de nanopartículas de PPy-I los agregados mantienen su tamaño y continúan cubiertos por las nanopartículas de PPy-I, como se puede ver en la Figura 7.25(e). Las nanopartículas de PPy-I muestran fluorescencia muy tenue y otras sin fluorescencia. Pueden verse algunas células muertas distribuidas uniformemente en el agregado, aún se observa una gran cantidad de células viables, como se muestra en la Figura 7.25(f).

Tres semanas

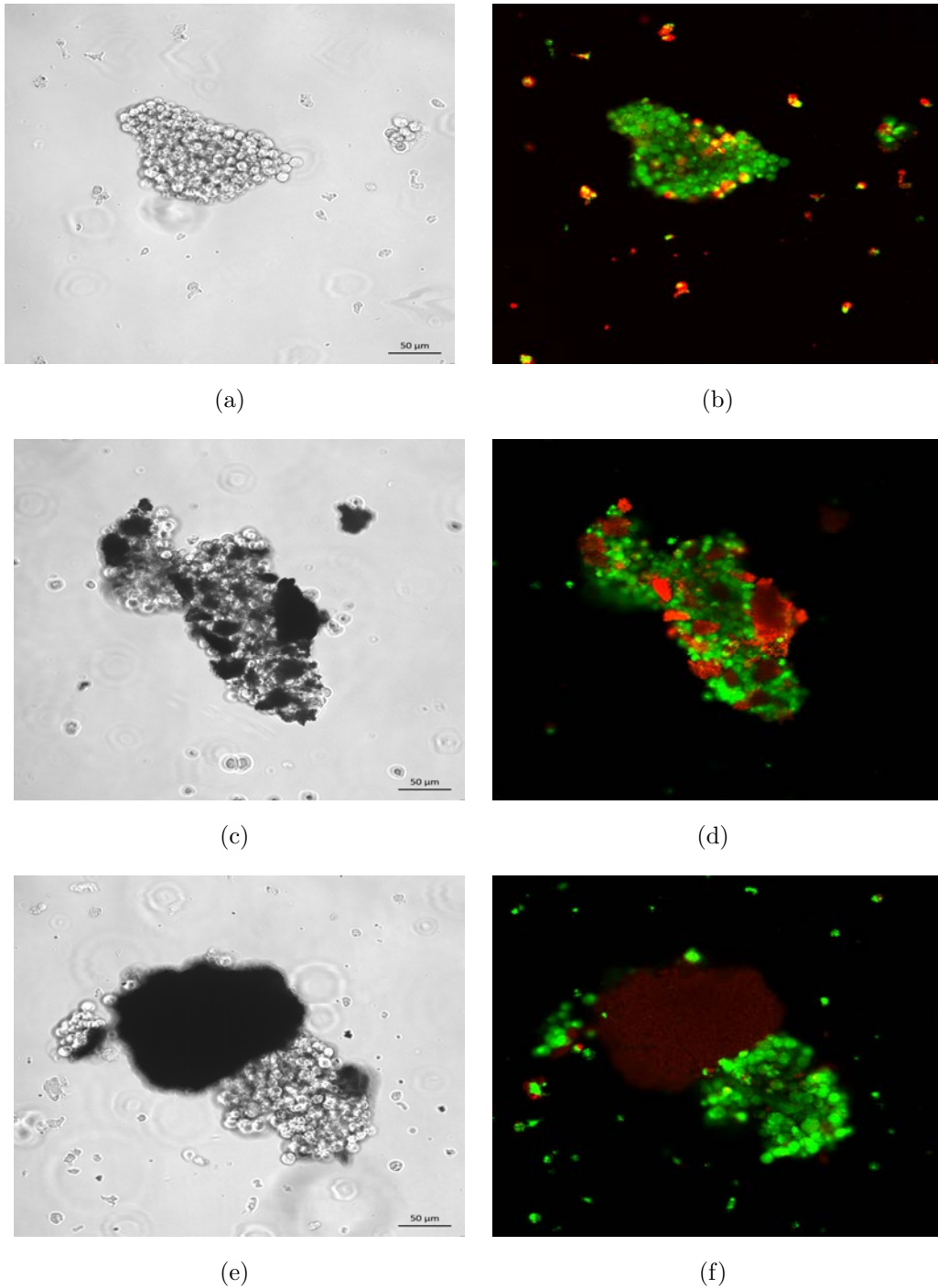


Figura 7.26: RIN-M viabilidad celular tres semanas. (a) control campo claro. (b) Viabilidad control. (c) PPy campo claro. (d) Viabilidad PPy. (e) PPy-I campo claro. (f) Viabilidad PPy-I.

A tres semanas de cultivo, en el grupo control los agregados disminuyen su tamaño, pueden verse agregados más pequeños y células aisladas alrededor del agregado más grande, como se muestra en la Figura 7.26(a). Se observan células vivas y muertas en el agregado más grande casi en la misma proporción, las células que rodean a dicho agregado se encuentran muertas salvo algunas pocas, como puede verse en la Figura 7.26(b).

En el grupo de nanopartículas de PPy los agregados disminuyen su tamaño y continúan cubiertos por las nanopartículas de PPy, pueden verse algunas células aisladas que rodean al agregado, como se observa en la Figura 7.26(c). Las nanopartículas de PPy muestran zonas intensamente fluorescentes y otras con poca o nula fluorescencia además de una textura rugosa que pareciera estar formada por pequeñas esferas. Sólo pueden distinguirse unas pocas células muertas, aún se observa una gran cantidad de células viables, las células aisladas alrededor del agregado continúan viables, como se puede ver en la Figura 7.26(d).

En el grupo de nanopartículas de PPy-I los agregados disminuyen su tamaño y tienen zonas que están cubiertos por las nanopartículas de PPy-I y otras zonas descubiertas; también pueden verse células aisladas que rodean al agregado, como se muestra en la Figura 7.26(e). Las nanopartículas de PPy-I muestran una fluorescencia tenue, no se observan células muertas, todas las células se mantienen viables aun aquellas que se encuentran aisladas alrededor del agregado, como se puede ver en la Figura 7.26(f).

La fluorescencia de las nanopartículas impide observar las células muertas por lo que no se puede estimar la viabilidad celular de los grupos con nanopartículas de PPy y PPy-I; sin embargo, en las imágenes adquiridas a una semana de cultivo las nanopartículas de PPy y PPy-I presentan fluorescencia casi nula, como se puede ver la Figura 7.24; por lo cual es posible estimar y comparar la viabilidad celular para los tres grupos a una semana de cultivo, realizando un simple conteo de los píxeles verdes y rojos.

$$Viabilidad \cong \frac{Píxeles \text{ Verdes}}{Píxeles \text{ Verdes} + Píxeles \text{ Rojos}}$$

El grupo de células con nanopartículas de PPy tiene una viabilidad del 98 % a una semana de cultivo; el grupo de células con nanopartículas de PPy-I tiene una viabilidad del 96 % a una semana de cultivo; el grupo control tiene

una viabilidad del 80 %, 53 % y 60 % a una, dos y tres semanas de cultivo respectivamente.

7.4.3. NG 108-15

Siete días

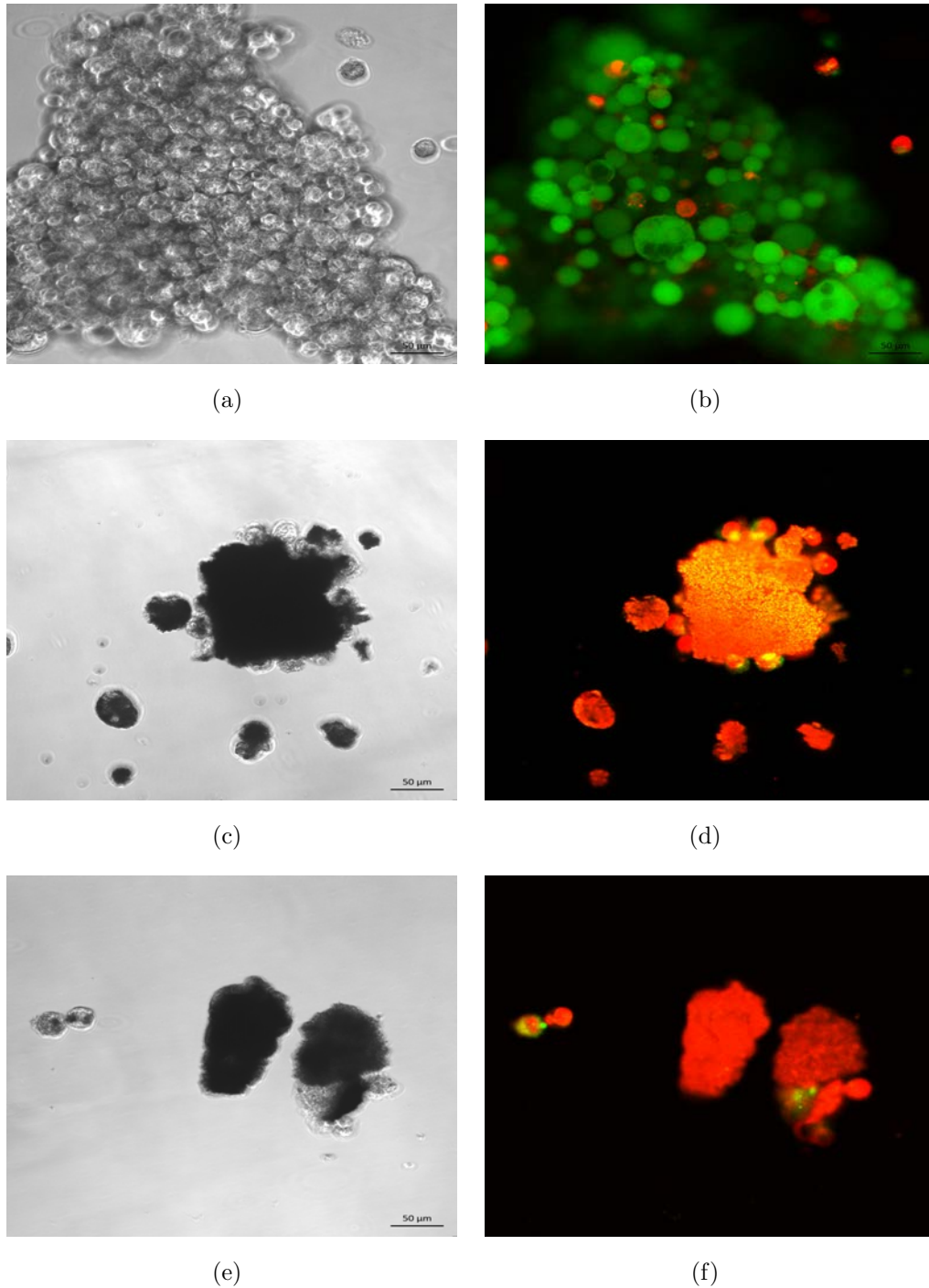


Figura 7.27: NG 108-15 viabilidad celular una semana. (a) control campo claro. (b) Viabilidad control. (c) PPy campo claro. (d) Viabilidad PPy. (e) PPy-I campo claro. (f) Viabilidad PPy-I.

A una semana de cultivo, en el grupo control los agregados muestran pocas células aisladas alrededor de ellos, como se muestra en la Figura 7.24(a). Las células aisladas se encuentran muertas mientras que las células en el agregado permanecen viables salvo algunas cuantas muertas, como se puede ver en la Figura 7.24(b).

En el grupo de nanopartículas de PPy los agregados son de menor tamaño que los del grupo control; alrededor de ellos se encuentran algunas células aisladas; los agregados y las células aisladas se encuentran cubiertas por nanopartículas de PPy, como se muestra en la Figura 7.24(c). No se pueden observar células viables o muertas los colores se encuentran mezclados, como se puede ver en la Figura 7.24(d).

En el grupo de nanopartículas de PPy los agregados son de menor tamaño que grupo de nanopartículas de PPy, se encuentran formados sólo por algunas pocas células, como se muestra en la Figura 7.24(e). No se pueden observar células viables o muertas los colores se encuentran mezclados, como se puede ver en la figura Figura 7.24(f).

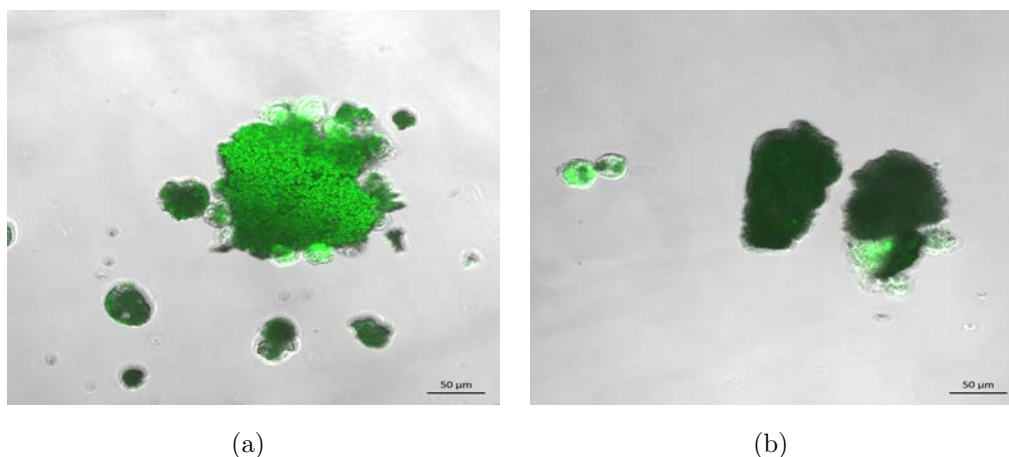


Figura 7.28: NG 108-15 solo células viables una semana. (a) PPyI. (b) PPy.

Las imágenes de la Figura 7.27 no permiten estimar la viabilidad celular de los grupos con nanopartículas de PPy y PPy-I; sin embargo, al observar sólo la fluorescencia de la calceína en la Figura 7.28, se puede ver que las células siguen viables y cubiertas por el las nanopartículas a una semana del cultivo.

Capítulo 8

Discusión

8.1. Nanopartículas de PPy y PPy-I

El tamaño de las nanopartículas de PPy no parece relacionarse de manera directa con los variables físicas del reactor como la potencia, presión y distancia entre los electrodos. Existen modelos que explican la formación de las nanopartículas de PPy en el reactor de plasma en base a la distribución tetraédrica de los enlaces del carbono [32]; sin embargo, ningún modelo relaciona el tamaño de las nanopartículas con estas variables. Por otra parte, se observó que a mayor presión en el reactor la cantidad de nanopartículas de PPy obtenidas también fue mayor, esto resulta natural ya que la presión en el reactor esta relacionada con la cantidad de monómero dentro de él y por tanto con la cantidad de nanopartículas producidas.

Otros autores mostraron que la longitud de onda y la intensidad a la que fluorescen las nanopartículas de PPy sintetizadas por plasma están relacionadas con la potencia y el tiempo de la síntesis, respectivamente [42]. Como pudo verse en las imágenes del microscopio confocal, la longitud de onda a la que fluorescieron las nanopartículas de PPy y PPy-I fue muy cercana a la longitud de onda de fluorescencia del homodímero de etidio-1; debido a ello, no fue posible determinar la viabilidad celular de los cultivos con nanopartículas para periodos de tiempo mayores a una semana.

Se tiene evidencia experimental que muestra el decaimiento y desaparición de la fluorescencia del PPy cuando se incide con láseres de 532 *nm* y 633 *nm*, a

este fenómeno se le denomina "quench" (pérdida de fluorescencia). El tiempo en el que desapareció la fluorescencia del PPy fue menor cuando se utilizó mayor intensidad en cada láser.

El láser utilizado para excitar el homodímero de etidio-1 en el microscopio confocal fue de 528 nm ; por esta razón, se plantea que la desaparición de la fluorescencia así como la textura rugosa observada en algunas imágenes puede ser causada por este fenómeno. Dado que aquellas zonas de la muestra cercanas al plano focal de la imagen son incididas con mayor intensidad, debido a la convergencia del lente, las nanopartículas de PPy cercanas a este plano tendrán mayor pérdida de la fluorescencia que aquellas que se encuentren en planos distantes al plano focal como puede verse en las Figuras 7.25(d) y 7.26(d). La textura rugosa observada en estas mismas Figuras, puede ser resultado de este fenómeno y de la morfología esférica de las nanopartículas. Con las nanopartículas de PPy-I podrían estar sucediendo el mismo fenómeno, para comprobar esta hipótesis es necesario realizar más trabajo con el microscopio confocal; sin embargo, esto se queda pendiente para un trabajo a futuro.

8.2. Cultivos celulares

Desde el inicio del cultivo se observa la adhesión de las células a las nanopartículas formando agregados más pequeños que los observados en el grupo control. Las células aisladas adheridas a pequeñas porciones de nanopartículas se mantienen viables mientras que generalmente las células aisladas en el grupo control mueren.

Todas las células de cuerpo humano salvo algunas excepciones, como las células sanguíneas, necesitan estar adheridas a una superficie para mantenerse con vida, de lo contrario a través mensajeros químicos inician el proceso de muerte celular programada o apoptosis. Algunas células cancerígenas pueden bloquear estas señales químicas para impedir el proceso de apoptosis y mantenerse viables aun cuando no estén adheridas a una superficie. Posiblemente las células en el grupo control se están adhiriendo entre ellas para no iniciar el proceso de apoptosis y seguir siendo viables, llevándolas así a formar agregados celu-

lares más grandes que las células en los grupos con nanopartículas de PPy y PPy-I. En los grupo de células con nanopartículas de PPy y PPy-I, las células adheridas a pequeñas porciones de material se mantienen viables por lo que no necesitan agregarse con muchas otras células, formando así agregados celulares más pequeños que los del grupo control.

A partir de la segunda semana se puede observar muerte celular en los agregados del grupo control, esto puede ser debido a varias causas como hipoxia, pobre difusión de nutrientes o incluso a apoptosis. Además de esto también puede verse que los agregados del grupo control en la tercera semana comienzan a disgregarse en agregados más pequeños; lo cual es posiblemente resultado de esta muerte celular. Por otra parte en el grupo de células con nanopartículas, los agregados celulares disminuyen ligeramente con respecto a la segunda semana y son más grandes que los del grupo control. No se puede observar muerte celular en estos grupos debido a la fluorescencia de las nanopartículas de PPy y PPy-I; sin embargo, si se puede observar que hasta la tercera semana una gran de células continúan vivas en ambos grupos. Por está razón pueden seguir manteniendo su tamaño y más aún empezar a formar microtejidos como se puede ver en la Figura 7.21.

8.3. Interacción de las nanopartículas de PPy y PPy-I con las líneas celulares

Las células de la línea celular RIN-M permanecen adheridas a las nanopartículas de PPy y PPy-I al menos hasta por tres semanas; a diferencia de lo que ocurre con muchos de los materiales utilizados para encapsular células [24], [26], las nanopartículas de PPy y PPy-I brindan un recubrimiento celular durante más tiempo. Esto debido probablemente a sus propiedades de adhesión; que a su vez, se piensa son debidas a la gran variedad química que se genera en la superficie de las nanopartículas al sintetizarlas por plasma.

No se observaron efectos citotóxicos en las líneas celulares con las nanopartículas de PPy y PPy-I; a diferencia de lo reportado en [35] que indican efectos citotóxicos con concentraciones menores de nanopartículas a las utilizadas en

este trabajo; esto muestra que las nanopartículas de PPy sintetizadas por plasma son completamente diferentes a las sintetizadas por otros métodos. Más aún, las nanopartículas de PPy y PPy-I ayudan a mantener viables a las células hasta al menos por tres semanas, en contraste con la viabilidad reportada en otros tipos de encapsulación [23]-[27].

Los resultados de los cultivos con la línea celular RIN-M muestran que las nanopartículas de PPy y PPy-I pueden ser utilizadas para encapsular células beta en agregados de distintos tamaños e incluso la encapsulación de una célula beta sola; además de esto los resultados de los cultivos con la línea celular NG 108-15 muestran que las nanopartículas de PPy y PPy-I pueden ser utilizadas para encapsular más tipos celulares y no solo células beta.

8.4. Diferencias entre las nanopartículas de PPy y PPy-I

Las películas o recubrimientos de PPy-I han mostrado mejores resultados en cultivos de células nerviosas que los reportados con películas o recubrimientos de PPy en estos mismos tipos de células [30].

Las células en el grupo con nanopartículas de PPy-I parecen tener una viabilidad ligeramente mayor que las células en el grupo con nanopartículas de PPy; sin embargo, este resultado es cualitativo y no puede utilizarse para determinar diferencias entre ambos tipos de nanopartículas. Para determinar cual de los dos tipos de nanopartículas es mejor para la encapsulación de células beta, se planea medir secreción de insulina; sin embargo, esto también se deja pendiente para un trabajo a futuro.

Capítulo 9

Conclusiones

La adhesión celular reportada en las películas de PPy y PPy-I en recubrimiento de biomateriales también se encuentra en las nanopartículas de PPy y PPy-I.

No se observaron efectos citotóxicos de las nanopartículas de PPy y PPy-I sobre las líneas celulares, más aún las nanopartículas de PPy y PPy-I ayudan a mantener viables a las células aun cuando sólo se encuentran adheridas a pequeñas porciones de ellas.

Las nanopartículas de PPy y PPy-I pueden ser usadas para la encapsulación de diversos tipos celulares, en particular para la encapsulación de células beta.

Capítulo 10

Perspectivas

Debido a los resultados obtenidos en este trabajo, se desea continuar con este proyecto y encapsular islotes pancreáticos de rata. También se desea evaluar la funcionalidad, estabilidad y biocompatibilidad de la cápsula; para su posterior implantación en ratas diabéticas.

Además de esto, se pretende seguir explorando las aplicaciones médicas de las nanopartículas de PPy y PPy-I. En particular, se desea explorar el desarrollo de microtejidos.

Bibliografía

- [1] Dorothy S. Luciano. J. Vander, James H. Sherman. *Human Physiology The Mechanism of Body Function*. McGraw Hill, 2001.
- [2] Gerardo J. Félix-Martínez and J. Rafael Godínez Fernández. Mathematical models of electrical activity of the pancreatic b-cell: a physiological review. *Islets*, 6(3):e949195, October 2014.
- [3] Leonid Poretsky and Beth Israel. *Principles of Diabetes Mellitus*. Springer, 2002.
- [4] Encuesta nacional de salud y nutrición 2012.
- [5] Estadística a propósito del día mundial de la diabetes 2013.
- [6] Irl B. Hirsch, Bruce W. Bode, Satish Garg, Wendy S. Lane, Allen Sussman, Peter Hu, Olga M. Santiago, and Jerzy W. Kolaczynski. Continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) of insulin aspart versus multiple daily injection of insulin aspart/insulin glargine in type 1 diabetic patients previously treated with CSII. *Diabetes Care*, 28(3):533–538, March 2005.
- [7] R. M. Thomas, A. Aldibbiat, W. Griffin, M. a. A. Cox, N. J. Leech, and J. a. M. Shaw. A randomized pilot study in Type 1 diabetes complicated by severe hypoglycaemia, comparing rigorous hypoglycaemia avoidance with insulin analogue therapy, CSII or education alone. *Diabetic Medicine*, 24(7):778–783, July 2007.
- [8] Sara Bohman and Aileen J. F. King. Islet alpha cell number is maintained in microencapsulated islet transplantation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(2):729–733, December 2008.

- [9] P. Soon-Shiong, R. E. Heintz, N. Merideth, Q. X. Yao, Z. Yao, T. Zheng, M. Murphy, M. K. Moloney, M. Schmehl, and M. Harris. Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet*, 343(8903):950–951, April 1994.
- [10] E. H. Nafea, A. Marson, L. A. Poole-Warren, and P. J. Martens. Immunisolating semi-permeable membranes for cell encapsulation: focus on hydrogels. *Controlled Release*, 154(2):110–122, September 2011.
- [11] Kwang Ho Lee, Da Yoon No, Su-Hwan Kim, Ji Hee Ryoo, Sau Fung Wong, and Sang-Hoon Lee. Diffusion-mediated in situ alginate encapsulation of cell spheroids using microscale concave well and nanoporous membrane. *Lab on a Chip*, 11(6):1168–1173, March 2011.
- [12] Y. Yu R. Wang D.T. Liang S. Liu L. Liu, S. Gao. Bio-ceramic hollow fiber membranes for immunoisolation and gene delivery I: membrane development. *Membrane Science*, 280(1–2):375–382, February 2006.
- [13] Stefania Mazzitelli, Lorenzo Capretto, Federico Quinci, Roberta Piva, and Claudio Nastruzzi. Preparation of cell-encapsulation devices in confined microenvironment. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(11-12):1533–1555, November 2013.
- [14] AhRan Kang, JiSoo Park, Jongil Ju, Gi Seok Jeong, and Sang-Hoon Lee. Cell encapsulation via microtechnologies. *Biomaterials*, 35(9):2651–2663, March 2014.
- [15] Johnna S. Temenoff, Hansoo Park, Esmail Jabbari, Daniel E. Conway, Tiffany L. Sheffield, Catherine G. Ambrose, and Antonios G. Mikos. Thermally cross-linked oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels support osteogenic differentiation of encapsulated marrow stromal cells in vitro. *Biomacromolecules*, 5(1):5–10, February 2004.
- [16] Yi Hong, Haiqing Song, Yihong Gong, Zhengwei Mao, Changyou Gao, and Jiacong Shen. Covalently crosslinked chitosan hydrogel: properties of in vitro degradation and chondrocyte encapsulation. *Acta Biomaterialia*, 3(1):23–31, January 2007.

- [17] Shalu Suri and Christine E. Schmidt. Cell-laden hydrogel constructs of hyaluronic acid, collagen, and laminin for neural tissue engineering. *Tissue Engineering*, 16(5):1703–1716, May 2010.
- [18] Atsuto Hoshikawa, Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda, Hiromi Oda, Kozo Nakamura, and Kunihiko Mabuchi. Encapsulation of chondrocytes in photopolymerizable styrenated gelatin for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering*, 12(8):2333–2341, August 2006.
- [19] Meirigeng Qi, Yuanjun Gu, Naoaki Sakata, Dohoon Kim, Yasumasa Shirouzu, Chizuru Yamamoto, Akihito Hiura, Shoichiro Sumi, and Kazutomo Inoue. PVA hydrogel sheet macroencapsulation for the bioartificial pancreas. *Biomaterials*, 25(27):5885–5892, December 2004.
- [20] Nguyen Minh Luan and Hiroo Iwata. Xenotransplantation of islets enclosed in agarose microcapsule carrying soluble complement receptor 1. *Biomaterials*, 33(32):8075–8081, November 2012.
- [21] Kerim M. Gattás-Asfura, Christopher A. Fraker, and Cherie L. Stabler. Covalent stabilization of alginate hydrogel beads via Staudinger ligation: assessment of poly(ethylene glycol) and alginate cross-linkers. *Biomedical Materials Research*, 99(1):47–57, October 2011.
- [22] Wei-Heong Tan and Shoji Takeuchi. Monodisperse alginate hydrogel microbeads for cell encapsulation. *Advanced Materials*, 19(18):2696–2701, September 2007.
- [23] John T. Wilson, Wanxing Cui, and Elliot L. Chaikof. Layer-by-layer assembly of a conformal nanothin PEG coating for intraportal islet transplantation. *Nano Letters*, 8(7):1940–1948, July 2008.
- [24] Nalinkanth G. Veerabadran, Poorna L. Goli, Skylar S. Stewart-Clark, Yuri M. Lvov, and David K. Mills. Nanoencapsulation of stem cells within polyelectrolyte multilayer shells. *Macromolecular Bioscience*, 7(7):877–882, July 2007.
- [25] Yuji Teramura, Yoshihiro Kaneda, Takahiko Totani, and Hiroo Iwata. Behavior of synthetic polymers immobilized on a cell membrane. *Biomaterials*, 29(10):1345–1355, April 2008.

- [26] Yuji Teramura, Yoshihiro Kaneda, and Hiroo Iwata. Islet-encapsulation in ultra-thin layer-by-layer membranes of poly(vinyl alcohol) anchored to poly(ethylene glycol)-lipids in the cell membrane. *Biomaterials*, 28(32):4818–4825, November 2007.
- [27] Yuji Teramura and Hiroo Iwata. Islet encapsulation with living cells for improvement of biocompatibility. *Biomaterials*, 30(12):2270–2275, April 2009.
- [28] E. Zuñiga-Aguilar, R. Godínez, MA. Morales, F. Cifuentes, O. Ramírez-Fernández, J. Morales, and R. Olayo. Crecimiento de células nerviosas motoras sobre material modificado superficialmente por polimerización por plasma. In *V Latin American Congress on Biomedical Engineering*, volume 33, pages 120–123, May 2013.
- [29] E. Zuñiga-Aguilar, R. Godínez, O. Ramírez-Fernández, J. Morales, and R. Olayo. Development of a neuromuscular junction model on surfaces modified by plasma polymerization. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, 34(3):217–226, December 2013.
- [30] E. Zuñiga-Aguilar, R. Olayo, O. Ramírez-Fernández, J. Morales, and R. Godínez. Nerve cells culture from lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization. *Biomaterials Science*, 25(7):729–747, March 2014.
- [31] J. Morales L. Gómez-Quiroz M.C. Gutiérrez-Ruiz E. Zúñiga-Aguilar O. Ramírez-Fernández, R. Godínez and R. Olayo. Glow discharge plasma modified surfaces for hepatic co-culture models. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 33(2):127–135, December 2013.
- [32] M. Vasquez Ortega, M. Ortega, J. Morales, M. G. Olayo, G. J. Cruz, and R. Olayo. Core-shell polypyrrole nanoparticles obtained by atmospheric pressure plasma polymerization. *Polymer International*, 63(12):2023–2029, December 2014.
- [33] G. J. Cruz, M. G. Olayo, O. G. López, L. M. Gómez, J. Morales, and R. Olayo. Nanospherical particles of polypyrrole synthesized and doped by plasma. *Polymer*, 51(19):4314–4318, September 2010.

- [34] G.J Cruz, J Morales, and R Olayo. Films obtained by plasma polymerization of pyrrole. *Thin Solid Films*, 342(1–2):119 – 126, 1999.
- [35] Sojin Kim, Wan-Kyu Oh, Yoon Seon Jeong, Jin-Yong Hong, Bo-Ram Cho, Ji-Sook Hahn, and Jyongsik Jang. Cytotoxicity of, and innate immune response to, size-controlled polypyrrole nanoparticles in mammalian cells. *Biomaterials*, 32(9):2342 – 2350, 2011.
- [36] Jin-Yong Hong, Hyeonseok Yoon, and Jyongsik Jang. Kinetic study of the formation of polypyrrole nanoparticles in water-soluble polymer/metal cation systems: a light-scattering analysis. *Small*, 6(5):679–686, March 2010.
- [37] W. L. Chick, S. Warren, R. N. Chute, A. A. Like, V. Lauris, and K. C. Kitchen. A transplantable insulinoma in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(2):628–632, February 1977.
- [38] A. F. Gazdar, W. L. Chick, H. K. Oie, H. L. Sims, D. L. King, G. C. Weir, and V. Lauris. Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(6): 3519–3523, June 1980.
- [39] S. J. Bhathena, H. K. Oie, A. F. Gazdar, N. R. Voyles, S. D. Wilkins, and L. Recant. Insulin, glucagon, and somatostatin receptors on cultured cells and clones from rat islet cell tumor. *Diabetes*, 31(6 -1):521–531, June 1982.
- [40] B. Hamprecht. Structural, electrophysiological, biochemical, and pharmacological properties of neuroblastoma-glioma cell hybrids in cell culture. *International Review of Cytology*, 49((1)):99–170, 1977.
- [41] B. Hamprecht, T. Glaser, G. Reiser, E. Bayer, and F. Propst. Culture and characteristics of hormone-responsive neuroblastoma X glioma hybrid cells. *Methods in Enzymology*, 109:316–341, 1985.
- [42] Ping Yang, Jing Zhang, and Ying Guo. Synthesis of intrinsic fluorescent polypyrrole nanoparticles by atmospheric pressure plasma polymerization. *Applied Surface Science*, 255(15):6924 – 6929, May 2009.

- [43] Edna S. Kaneshiro, Michael A. Wyder, Yi-Ping Wu, and Melanie T. Cushion. Reliability of calcein acetoxy methyl ester and ethidium homodimer or propidium iodide for viability assessment of microbes. *Microbiological Methods*, 17(1):1 – 16, January 1993.

Apéndice

A.1. Calceina-AM y homodimero de etidio-1

La Calceina-AM es una molécula no fluorescente que al hidrolizarse se divide en calceina y acetoximetil, es permeable a la membrana celular y en presencias de esteras¹ la división ocurre mas rapido. Una vez dividida, la calceina es una molécula florescente y no permeable a la membrana celular, se exita a 494 nm y emite a 517 nm^2 , debido a esto la Calceina-AM resulta un buen marcador para las células viables.

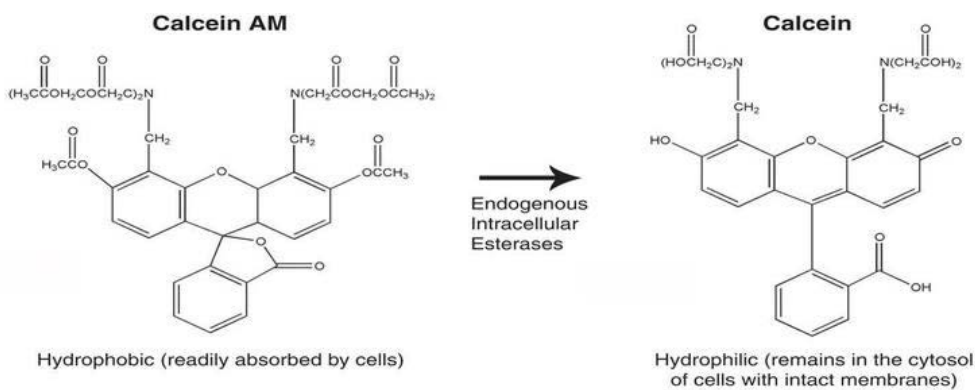


Figura A.1: Molécula de Calceina-AM y Calceina

El Homodimero de Etidio-1 es una molécula fluorescente y no permeable a la membrana celular, puede entrecruzarse con ácidos nucleicos y mejora cuarentas veces su fluorescencia, se excita a 528 nm y emite a 617 nm^3 , al poder

¹Enzima que rompe enlaces esteres

²Verde

³Rojo

entrar solo en células con membrana dañada resulta un buen carcador de células no viables.

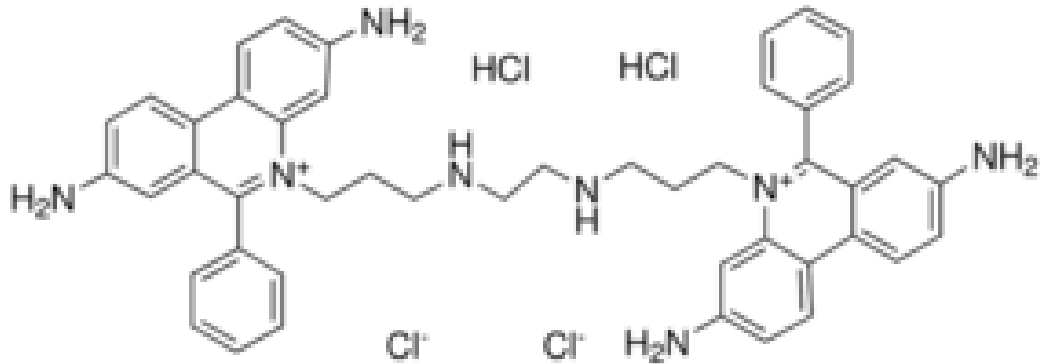


Figura A.2: Molecula del Homodimero de Etido-1

Desde 1993 hasta la fecha, la calceína y el homodimero de etido-1 se han usado para realizar pruebas de viabilidad celular [43], [?].