



**UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
METROPOLITANA**  
Unidad Iztapalapa

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**  
POSGRADO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

**“ANÁLISIS DE POLÍMEROS AMINADOS SÍNTETIZADOS POR PLASMA  
SOBRE LA FORMACIÓN DE REDES NEURONALES BIOLÓGICAS  
FUNCIONALES FORMADAS *IN VITRO*”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS (INGENIERÍA BIOMÉDICA)

**M. en C. ESTEPHANNY JOCELYN ALVARADO MUÑOZ**

Matrícula: 2171801319

Correo: [ej.almuz@gmail.com](mailto:ej.almuz@gmail.com)

DIRECTORES DE TESIS:

**DR. JUAN MORALES CORONA**

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

**DR. CARLOS ENRIQUE OROZCO BARRIOS**

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

JURADO:

**DRA. PHAEDRA SURIEL SILVA BERMÚDEZ (PRESIDENTA)**

**DR. GERARDO MUÑOZ HERNÁNDEZ (SECRETARIO)**

**DRA. DORA LUZ CORONA QUINTANILLA (VOCAL)**

**DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUÁREZ (VOCAL)**

**DR. HUMBERTO VÁZQUEZ TORRES (VOCAL)**

Ciudad de México, Iztapalapa

31 de mayo 2024



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00043

Matrícula: 2171801319

ANÁLISIS DE POLÍMEROS AMINADOS SINTETIZADOS POR PLASMA SOBRE LA FORMACIÓN DE REDES NEURONALES BIOLÓGICAS FUNCIONALES FORMADAS IN VITRO.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:00 horas del día 31 del mes de mayo del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. PHAEDRA SURIEL SILVA BERMUDEZ
- DRA. DORA LUZ CORONA QUINTANILLA
- DR. HUMBERTO VAZQUEZ TORRES
- DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ
- DR. GERARDO MUÑOZ HERNANDEZ

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

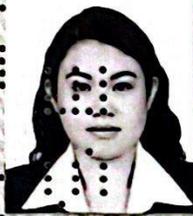
DOCTORA EN CIENCIAS (INGENIERÍA BIOMÉDICA)

DE: ESTEPHANNY JOCELYN ALVARADO MUÑOZ

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

## APROBAR

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



ESTEPHANNY JOCELYN ALVARADO MUÑOZ

ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

  
DR. ROMAN LINARES ROMERO

PRESIDENTA

DRA. PHAEDRA SURIEL SILVA BERMUDEZ

VOCAL

DRA. DORA LUZ CORONA QUINTANILLA

VOCAL

DR. HUMBERTO VAZQUEZ TORRES

VOCAL

DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ

SECRETARIO

DR. GERARDO MUÑOZ HERNANDEZ

## Agradecimientos

A CONAHCyT por el apoyo con la beca de doctorado número 622686.

A mis tutores por el apoyo y enseñanzas a lo largo de mi posgrado.

Al jurado por su valioso tiempo, consejos y aportaciones a este trabajo.

A los Doctores Guadalupe Olayo, Roberto Olayo y Guillermo Cruz, por ser mis maestros académicos y de vida.

A todos los integrantes del equipo de trabajo de los centros de investigación ININ, IMSS, CINVESTAV, UAM-I y Proyecto Camina.

A mis compañeros y amigos Diana Osorio, Omar Uribe y Teresa Gómez, por todo su apoyo y amistad.

A mi familia por ser mi razón para cumplir mis metas.

*No basta saber, se debe también aplicar. No es suficiente querer, se debe también hacer.*

*-Goethe*

## Resumen

Este trabajo presenta un estudio detallado de la fisicoquímica de los polímeros aminados sintetizados por plasma de pirrol (PPy) y alilamina (PAL) dopados con yodo y el copolímero de ambos, sus cambios de acuerdo con la potencia de síntesis y el efecto de estos sobre la diferenciación neuronal y la sinaptogénesis. Esta investigación se centra en dar respuesta a los posibles mecanismos biológicos de estos materiales sobre la recuperación motora que ha sido observada en ratas en modelos de lesión de médula espinal con el uso de implantes poliméricos en pastilla y mesopartículas.

Se obtuvieron polímeros de PPy-I, PAL-I y PPy/PAL-I a potencias de 20 W, 30 W y 40 W sobre sustratos de vidrio, así como películas sueltas para obtener mesopartículas. Se caracterizaron fisicoquímicamente para identificar los grupos funcionales presentes y los estados químicos de cada uno. También se realizaron derivaciones químicas mediante compuestos fluorados con el fin de obtener el porcentaje de aminas primarias, secundarias y grupos -OH, los cuales son de especial interés debido a sus propiedades de biocompatibilidad. Finalmente se realizaron tratamientos de estos polímeros, como recubrimientos y mesopartículas, sobre una línea celular de origen neuronal, con el fin de estudiar su efecto de diferenciación y sinaptogénesis mediante marcadores de neuronales, de los que se obtuvieron imágenes por microscopía confocal y se analizaron con programas y plugins específicos de neurociencia.

Se encontró que la potencia de síntesis tiene efecto sobre las propiedades fisicoquímicas de los polímeros. Los materiales poliméricos de mesopartículas de PPy-I y PAL-I tienen una clasificación de materiales semiconductores lo cual podría ayudar a potenciar ciertas rutas metabólicas de células excitables como neuronas. Se mostró un efecto de diferenciación celular de la línea N1E-115 con tratamiento de los polímeros PPy-I, PAL-I y PPy/PAL-I, así como el incremento de la expresión pre y post sináptica con la utilización de las mesopartículas como tratamiento a las 96 h y a las 120 h post estímulo de diferenciación.

## Abstract

This work presents a detailed study of the physicochemical properties of aminated polymers, Polypyrrole (PPy) and Polyallylamine (PAL), synthesized by Plasma, both doped with iodine, as well as their copolymer. The investigation explores the change of polymers with the synthesis power and their effects on neuronal differentiation and synaptogenesis. The focus of this research is to elucidate *in vitro* the potential biological mechanisms of these materials on the motor recovery that has been observed in rats in spinal cord injury models when utilizing polymeric implants in pellet and mesoparticles.

PPy-I, PAL-I, and PPy/PAL-I polymers were obtained at synthesis powers of 20 W, 30 W, and 40 W, on glass substrates, along with films to obtain mesoparticles. These polymers were physical chemical characterized to identify the present functional groups and chemical states of each one. Chemical derivatization was also performed using fluorinated compounds to determine the percentage of primary and secondary amines and -OH groups, which are of particular interest due to their biocompatibility properties. Finally, treatments of these polymers were administered to a neuronal-origin cell line to study their effects on differentiation and synaptogenesis using immunofluorescence markers. Images were obtained through confocal microscopy and analyzed with specific neuroscience programs and plugins.

The synthesis potency was found to influence the physicochemical properties of the polymers. The PPy-I and PAL-I mesoparticle polymer materials have a classification of semiconducting materials that could help improve certain metabolic pathways of excitable cells of cells such as neurons. A cell differentiation effect of the N1E-115 line was shown with PPy-I, PAL-I and PPy/PAL-I polymer treatment, as well as increased pre- and post-synaptic expression with the use of the mesoparticles as treatment at 96 h and 120 h after differentiation stimulus.

## Índice

1.	Introducción.....	1
2.	Marco teórico .....	3
2.1	Biomateriales.....	3
2.2	Polimerización por plasma.....	7
2.3	Polímeros aminados sintetizados por plasma .....	10
2.4	Regeneración neuronal.....	13
2.5	Nichos neurogénicos.....	18
2.6	Marcadores de diferenciación neuronal y sinapsis .....	20
2.7	Cultivo celular para el estudio neuronal .....	22
3.	Estado del arte .....	26
3.1	Antecedentes .....	26
3.2	Trabajo previo .....	29
4.	Justificación.....	31
5.	Hipótesis.....	32
6.	Objetivos.....	33
6.1	General .....	33
6.2	Específicos .....	33
7.	Métodos y desarrollo experimental .....	34
7.1	Síntesis de polímeros aminados por plasma.....	34
7.2	Distribución de tamaño de partícula .....	36
7.3	Caracterización fisicoquímica .....	36
7.3.1	Espectroscopía Infrarroja por Reflectancia Total Atenuada .....	36
7.3.2	Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X .....	37
7.3.3	Porcentaje de aminas por derivación química .....	37
7.3.4	Conductividad eléctrica.....	39
7.4	Cultivo celular.....	41
7.4.1	Ensayo de diferenciación .....	42
7.5	Inmunofluorescencia .....	43
7.5.1	Marcaje para determinación de la diferenciación neuronal.....	43
7.5.2	Marcaje para la identificación de sinapsis .....	43
7.6	Determinación del índice de diferenciación neuronal .....	46

7.7	Identificación de sitios sinápticos en las redes neuronales .....	47
8.	Resultados y discusión .....	48
8.1	Morfología y distribución de diámetro de partícula.....	48
8.2	Grupos funcionales de los materiales .....	50
8.3	Análisis elemental .....	52
8.4	Estados químicos de los materiales poliméricos .....	57
8.5	Porcentaje de aminas y grupos -OH.....	60
8.6	Conductividad eléctrica de las mesopartículas poliméricas.....	61
8.7	Diferenciación neuronal .....	63
8.8	Sinapsis de las redes neuronales .....	68
9.	Conclusiones .....	72
	Bibliografía.....	73
	Artículos de investigación.....	83
	Difusión científica .....	84
	Anexos .....	85
	Anexo 1 .....	85
	Anexo 2 .....	86
	Anexo 3 .....	87
	Anexo 4 .....	88

## Índice de Figuras

Figura 1. Generaciones de biomateriales.....	3
Figura 2. Esquema de los métodos de modificación superficial para biomateriales.....	5
Figura 3. Polimerización de pirrol por plasma, a) monómero de pirrol, b) estructura representativa de polipirrol sintetizado por plasma.....	12
Figura 4. Polimerización de alilamina por plasma, a) monómero de alilamina, b) estructura representativa de polialilamina sintetizada por plasma.....	13
Figura 5. Expresión de proteínas durante la diferenciación neuronal.....	17
Figura 6. Origen de tipos de cultivos celulares para la diferenciación neuronal y el estudio de procesos bioquímicos.....	24
Figura 7. Líneas celulares de origen neuronal más comunes para el estudio de procesos bioquímicos.....	25
Figura 8. Ángulo de contacto de los materiales sintetizados a 20 W y micrografías del cultivo de la línea celular N1E-115 sembrada sobre recubrimientos de polímeros sintetizados por plasma a 20 W, a) PPy/I, b) PAI/I, c) PPy/PAI.....	29
Figura 9. Ángulo de contacto de los materiales sintetizados a 30 W y micrografías del cultivo de la línea celular N1E-115 sembrada sobre recubrimientos de polímeros sintetizados por plasma a 30 W, a) PPy/I, b) PAI/I, c) PPy/PAI.....	29
Figura 10. Ángulo de contacto de los materiales sintetizados a 40 W y micrografías del cultivo de la línea celular N1E-115 sembrada sobre recubrimientos de polímeros sintetizados por plasma a 40 W, a) PPy/I, b) PAI/I, c) PPy/PAI.....	29
Figura 11. Longitud promedio de neuritas de N1E-115 sembradas sobre diferentes materiales poliméricos.....	30
Figura 12. Resumen de los objetivos del trabajo de investigación.....	33
Figura 13. Esquema de la polimerización de recubrimientos y mesopartículas de PPy-I y PAI-I por plasma.....	34
Figura 14. Reacción de derivación química mediante TFBA en presencia de aminas primarias.....	38
Figura 15. Reacción de derivación química mediante TFAA en presencia de aminas y grupos hidroxilo.....	39
Figura 16. Esquema de celda de monitoreo de la resistencia de las mesopartículas poliméricas en función de la temperatura.....	41
Figura 17. Esquema de proliferación y conservación de la línea N1E-115.....	41

Figura 18. Esquema de ensayo de diferenciación de la línea N1E-115 con tratamiento de mesopartículas de polímeros de PPy-I y PAL-I.....	42
Figura 19. Esquema de marcaje mediante inmunofluorescencia de proteínas de diferenciación y sinaptogénesis de los cultivos de N1E-115 tratados con mesopartículas de PPy-I y PAL-I.....	45
Figura 20. Esquema del procesamiento de imágenes para la obtención del índice de diferenciación neuronal mediante el conteo de intersecciones de neuritas y número de núcleos .....	46
Figura 21. Esquema del procesamiento de imágenes para la obtención de la densidad de vesículas sinápticas sobre las redes neuronales de N1E-115 tratadas con los polímeros PPy-I y PAL-I.....	47
Figura 22. Morfología de las mesopartículas. Micrográficas mediante SEM, a) PPy-I 20 W, b) PAL-I 30 W.....	48
Figura 23. Espectros de IR-ATR de las películas poliméricas de a) PPy-I y b) PAL-I a diferentes tiempos de enfriamiento de reactor .....	51
Figura 24. Espectros mediante XPS de los polímeros. a) PPy-I, b) PAL-I, c) PPy/PAL-I.....	54
Figura 25. Espectros mediante XPS de mesopartículas de polímeros a 0, 30, 60 y 90 segundos. a) PPy-I y b) PAL-I.....	56
Figura 26. Estados químicos mediante XPS. a) PPy-I 20, 30 y 40 W. b) PAL-I 20, 30 y 40 W. c) PPy/PAL-I 20, 30, y 40 .....	59
Figura 27. Caracterización eléctrica de las mesopartículas de PPy-I 20 W y PAL-I 30 W. a) Conductividad y b) Energía de activación .....	62
Figura 28. Diferenciación de la línea N1E-115 sobre los recubrimientos poliméricos. a) Conteo de núcleos, b) Número de cruces del análisis de Sholl, c) Índice de diferenciación neuronal...	64
Figura 29. Esquema del seguimiento del ensayo de diferenciación de la línea N1E-115 con tratamiento de mesopartículas de polímeros de PPy-I 20 W y PAL- 30 W a las 24, 48, 72, 96 y 120 h post estímulo de diferenciación.....	66
Figura 30. Diferenciación de la línea N1E-115 mediante el tratamiento con mesopartículas de PPy-I y PAL-I a 72, 96 y 120h post estímulo de diferenciación. a) Conteo de núcleos, b) Número de cruces del análisis de Sholl, c) Índice de diferenciación neuronal. ....	67
Figura 31. Micrográficas de las tinciones para identificación de vesículas sinápticas de las redes neuronales tratadas con mesopartículas de PPy-I 20 W y PAL-I 30 W a diferentes tiempos post estímulo de diferenciación, 70, 96 y 120 h.....	69

Figura 32. Índice de sinapsis respecto a la expresión de vesículas postsinápticas y presinápticas de las redes neuronales formadas por la línea celular N1E-115 mediante el tratamiento con mesopartículas de PPy-I y PAI-I a 72, 96 y 120 h post-estímulo de diferenciación. a) Índice de sinapsis respecto a la expresión de vesículas presinápticas (SYP), b) Índice de sinapsis respecto a la expresión de vesículas postsinápticas (PSD 95)..... 70

## Índice de Tablas

Tabla 1. Técnicas de polimerización de acuerdo con la energía de polimerización. ....	7
Tabla 2. Porcentaje de aminas primarias de los polímeros PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I a diferentes potencias de síntesis.....	30
Tabla 3. Condiciones de síntesis de los recubrimientos de polímeros sintetizados por plasma. ....	35
Tabla 4. Condiciones de síntesis de películas polímeros sintetizados por plasma.....	35
Tabla 5. Especificaciones de reactivos para inmunofluorescencia del ensayo de marcaje de proteínas.....	45
Tabla 6. Porcentaje atómico mediante XPS de la superficie de los recubrimientos poliméricos sintetizados a diferentes potencias en 0 segundos de devastación.....	52
Tabla 7. Porcentaje atómico mediante XPS de la superficie de los recubrimientos poliméricos sintetizados a diferentes potencias y diferentes tiempos de devastación, 30, 60 y 90 segundos. ....	53
Tabla 8. Porcentaje atómico mediante XPS de la superficie de las mesopartículas poliméricas de PPy-I 20 W y PAI-I 30 W en 0 segundos de devastación. ....	55
Tabla 9. Porcentaje atómico mediante XPS de las mesopartículas de PPy-I 20 W y PAI-I 30 W a diferentes tiempos de devastación 30, 60 y 90 segundos.....	55
Tabla 10. Porcentaje de los estados químicos presentes en los recubrimientos poliméricos mediante XPS.....	58
Tabla 11. Porcentajes elementales de los recubrimientos poliméricos antes y después de las derivaciones químicas mediante TFBA y TFAA, y sus porcentajes de aminas primarias, secundarias y grupos hidroxilos.....	60

# 1. Introducción

Los biomateriales son materiales diseñados para interactuar con sistemas biológicos, ya sea como implantes, recubrimientos para dispositivos médicos o andamios para ingeniería de tejidos. Estos materiales tienen el propósito de imitar las propiedades físicas y químicas de los tejidos biológicos nativos y, por lo tanto, tienen la capacidad de suplir, regenerar o mejorar su función. Algunos usos que se le han dado a los biomateriales en el campo médico y biomédico son prótesis de cadera, válvulas cardíacas, revestimientos de implantes dentales, entre otros.

Los polímeros son ampliamente utilizados como biomateriales en aplicaciones biomédicas, debido a que pueden ser diseñados para ser biocompatibles y biodegradables, gracias a esto, aumenta su capacidad de imitar las propiedades de los tejidos biológicos. También pueden ser diseñados para ser flexibles o rígidos, y pueden ser lo suficientemente resistentes para soportar la tensión y la deformación sin romperse. Uno de los polímeros más utilizados como biomaterial es el PPy, o polipirrol, el cual tiene aplicaciones en la ingeniería de tejidos para la regeneración de tejidos nerviosos y musculares, así como recubrimiento para implantes metálicos para mejorar la osteointegración, gracias a que es un material conductor eléctricamente y a sus propiedades de biocompatibilidad y bioactivas. También se ha explorado con ese polímeros en el área farmacológica como material para la liberación de fármacos, permitiendo la liberación controlada de agentes terapéuticos en el sitio de implante por un periodo prolongado de tiempo.

Otro de los polímeros biocompatibles con mayor uso en el área de la biomédica es la PAI, o Polialilamina, es un polímero electroconductor que se ha utilizado para incrementar la biocompatibilidad de dispositivos médicos debido a la carga de sus grupos funcionales que inducen la adhesión celular, así como la proliferación de estas. Otra de las características de la PAI que destaca en su uso para dispositivos biocompatibles es debido a que puede tener una carga superficial positiva a pH fisiológico debido a los grupos aminos en su estructura. Esta característica puede facilitar la interacción favorable con células y tejidos biológicos, ya que muchas células tienen una carga negativa en su superficie.

Los polímeros se pueden obtener por diferentes técnicas de polimerización, pero la que se explora en este trabajo es la polimerización por plasma, la cual tiene varias ventajas sobre otras técnicas de polimerización, debido a sus prácticamente nulos productos secundarios, con excepción de oligómeros de bajo peso molecular, ya que no se requiere de iniciadores, catalizadores o terminadores de reacción. Esto debido a la naturaleza de la síntesis, la cual se da por la aplicación de descargas de radio frecuencia, excitando el monómero que entra en forma de gas al reactor y así, debido a la aceleración y choque entre las partículas se forma el polímero. Lo que resulta en un polímero limpio y de bajo costo de producción, sin embargo, debido a la naturaleza de la polimerización se forman polímeros entrecruzados los cuales tienen la característica de tener bajas conductividades eléctricas, por lo cual se requiere de un “dopante” o lo que es lo mismo, un agente o elemento externo que se integre al polímero durante la síntesis e incrementa los sitios polares ayudando al movimiento de electrones y por lo tanto a la conductividad eléctrica; esta característica es importante en los polímeros biocompatibles, sobre todo, los que se pretenden para un uso en sistemas biológicos celulares o de tejidos nerviosos.

El trabajo de tesis muestra un estudio fisicoquímico de diferentes polímeros biocompatibles sintetizados por plasma y dopados con iodo Polipirrol (PPy-I), Polialilamina (PAI-I) y el copolímero de ambos Polipirrol/Polialilamina (PPy/PAI-I), sobre todo del contenido de grupos funcionales reportados como estímulos para la adhesión y proliferación celular, así como su efecto sobre la diferenciación neuronal y la sinaptogénesis en un ambiente controlado sobre la línea celular N1E-115 de origen neuronal.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Biomateriales

La ciencia de los biomateriales es el estudio (desde la perspectiva física y/o biológica) de los materiales con especial referencia a su interacción con el entorno biológico y por lo tanto un biomaterial se define como un material que es usado en una forma o estructura específica para fabricar prótesis o dispositivos biomédicos que tienen la intención de reemplazar o recuperar una función dañada del cuerpo con el fin de salvar o mejorar la calidad de vida de una persona [1].

Tradicionalmente, en el campo de los biomateriales se ha hecho hincapié en la síntesis, la caracterización y la biología de las interacciones huésped-material. Sin embargo, la mayoría de los biomateriales (que cumplen los criterios especiales de biocompatibilidad) inducen una reacción biológica inespecífica que denominamos reacción a cuerpo extraño, es por ello que ha cambiado el objetivo del desarrollo de los biomateriales en el tiempo (figura 1) desde producir una mínima reacción en el huésped, hasta la regeneración de un tejido [1]-[3].

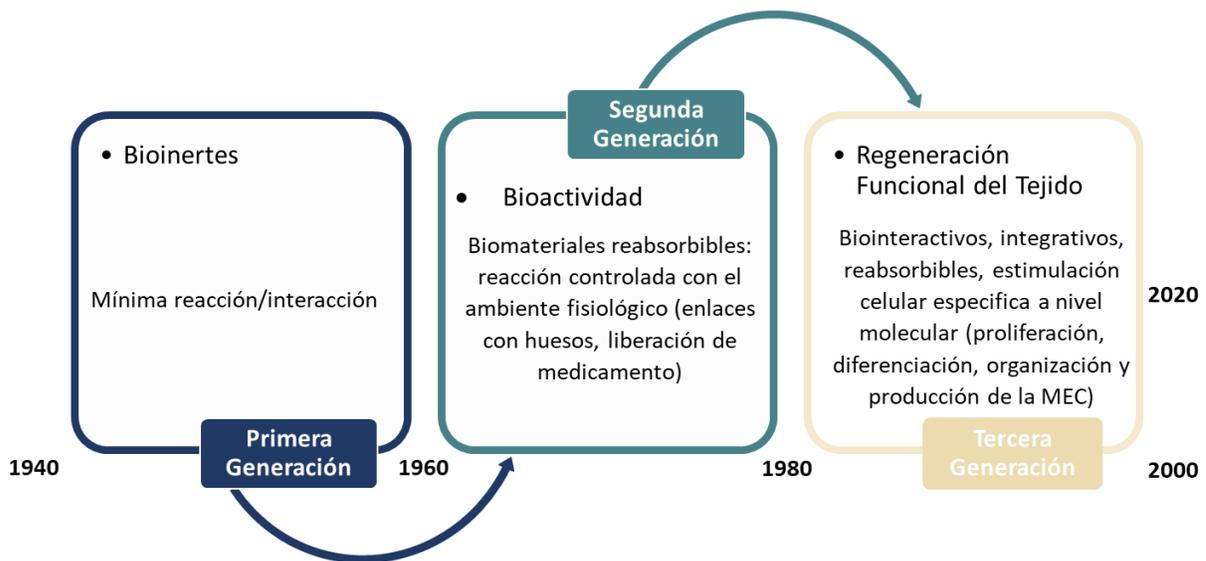


Figura 1. Generaciones de biomateriales

Para que un material sea clasificado como biomaterial, deben contar con una serie de características:

- Ser biocompatible; es decir, sin producir respuesta negativa sobre los tejidos biológicos.
- Ser durable o biodegradable.
- Cumplir con las propiedades mecánicas que el tejido huésped requiere [4], [5].

La respuesta biológica de los materiales puede ser alterada al modificar las propiedades de su superficie, dependiendo de los requerimientos de la aplicación a la cual se destina cada material. El diseño para la modificación de las superficies es llamado “bioingeniería de superficies”; una de las estrategias por seguir de esta técnica consiste en recubrir la superficie de un material que contiene una capa superficial; ésta puede ser de bajo peso molecular seguida de una capa de polímero de alto peso molecular con diferentes grupos funcionales que favorezcan la biocompatibilidad, y puedan adherirse a proteínas a esta superficie modificada; la composición de la capa de proteínas adsorbida en la superficie y su conformación pueden alterar la respuesta biológica del material en cuestión. En la ingeniería de superficies de biomateriales se investiga la creación de superficies que puede favorecer la adhesión celular para producir la adecuada cascada de señalización y así prevenir el despliegue de las proteínas con la subsecuente respuesta biológica negativa que ocurre en la mayoría de las superficies no biológicas. De los métodos existentes para la modificación de superficies (figura 2), el que se basa en la tecnología de plasma es una de las más eficientes al mejorar las propiedades de la superficie del material sin modificar las propiedades de bulto, como las mecánicas, rigidez y robustez. Las propiedades de la superficie pueden ser definidas variando los parámetros del plasma con el fin de producir diferentes tipos de superficies adecuadas para cada tipo de aplicación. El proceso de la modificación de superficies por plasma es controlable y reproducible, provee superficies estériles y puede ser fácilmente escalado a una producción industrial [1], [6], [7].

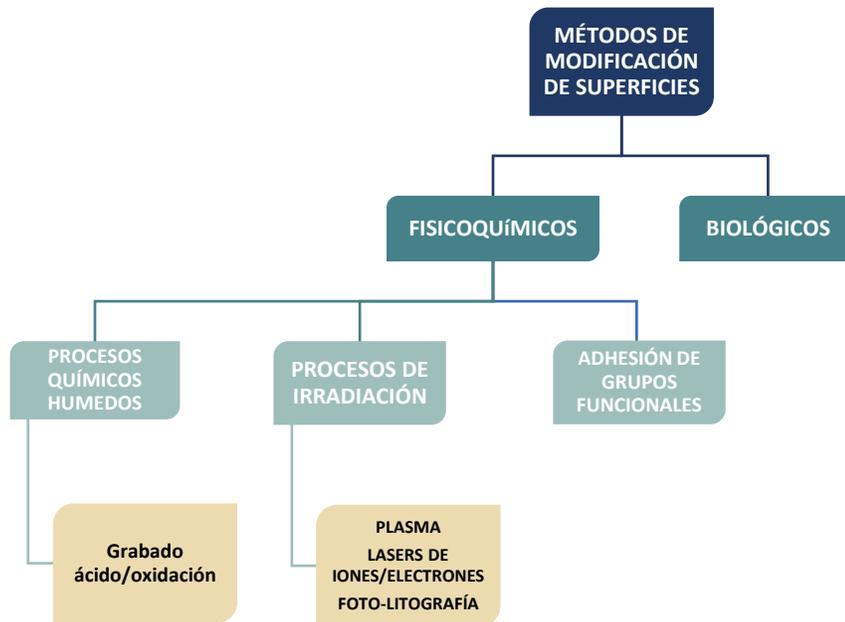


Figura 2. Esquema de los métodos de modificación superficial para biomateriales.

Los biomateriales se pueden clasificar según su fuente, como naturales (por ejemplo, fibronectina o colágeno) o sintéticos (por ejemplo, ácido poliláctico o ácido poliglicólico). También se pueden clasificar con base en su bioactividad, es decir, si son inertes (interaccionan sin provocar cambios en la estructura celular), bioreabsorbibles (son digeridos y absorbidos por oxidación de radicales libres, hidrólisis o por acción enzimática) o bioactivos (interactúan directamente con las células y tejidos circundantes sobre una base química) [8]. Otra forma de clasificación de los biomateriales se basa principalmente en el tipo de enlace predominante en el compuesto que pueden ser metálicos, cerámicos, compósitos o polímeros [9].

Los polímeros se utilizan ampliamente como biomateriales debido a diversas ventajas que ofrecen en aplicaciones médicas y biológicas como:

**Biocompatibilidad:** Muchos polímeros son biocompatibles, lo que significa que no causan una respuesta inmunológica significativa ni reacciones adversas cuando se ponen en contacto con tejidos biológicos. Esto los hace seguros para su uso en implantes médicos y dispositivos biomédicos.

**Versatilidad:** Los polímeros pueden diseñarse y modificarse para adaptarse a una amplia variedad de aplicaciones biomédicas. Pueden variar en términos de estructura química, propiedades físicas y morfología para satisfacer requisitos específicos de cada aplicación.

**Flexibilidad en la fabricación:** Los polímeros pueden procesarse de diversas formas, incluyendo moldeo por inyección, extrusión, impresión 3D, entre otros métodos. Esto permite la fabricación de dispositivos médicos con formas y tamaños personalizados para adaptarse a las necesidades del paciente.

**Baja densidad y peso ligero:** Los polímeros suelen tener una densidad baja y son ligeros en comparación con otros materiales, lo que puede ser beneficioso en aplicaciones donde se requiere reducir la carga mecánica sobre los tejidos biológicos.

**Propiedades mecánicas ajustables:** Las propiedades mecánicas de los polímeros pueden ajustarse mediante la modificación de la composición química, la estructura molecular y los procesos de fabricación. Esto permite crear biomateriales con una amplia gama de propiedades, desde elastómeros suaves hasta polímeros rígidos.

**Biodegradabilidad:** Algunos polímeros biomédicos son biodegradables, lo que significa que pueden reabsorberse en el cuerpo con el tiempo en productos que son fácilmente eliminados o metabolizados por el organismo. Esto es especialmente útil en aplicaciones temporales o donde se requiere la absorción gradual del material.

En resumen, los polímeros ofrecen una combinación única de propiedades que los hacen altamente adecuados para una amplia variedad de aplicaciones biomédicas, desde implantes médicos hasta sistemas de liberación de fármacos y dispositivos de diagnóstico [10], [11].

Existen varias técnicas de polimerización y se clasifican según el tipo de energía que se entrega durante la reacción de polimerización; esta puede ser, química, electroquímica, fotoquímica, térmica y por plasma. Cada una tiene sus ventajas y desventajas, como se muestra en la tabla 1; y, dependiendo del tipo de aplicación para el que se requiera el polímero, se tiene que elegir el tipo de energía adecuada para la polimerización [10].

<b>TIPO DE ENERGÍA</b>
Química
Electroquímica
Fotoquímica
Térmica
Plasma

Tabla 1. Técnicas de polimerización de acuerdo con la energía de polimerización.

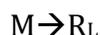
## 2.2 Polimerización por plasma

La polimerización por plasma es un proceso en el cual los polímeros se forman a partir de precursores gaseosos bajo la influencia de un plasma, el cual es un estado de la materia compuesto principalmente por iones y electrones libres, que se forman al entregar energía (descarga eléctrica, microondas, láser, corriente continua o pulsada e inducción por radiofrecuencia) a un gas y excitarlo. Este método es utilizado en diversas aplicaciones, como recubrimientos de superficies, modificación de propiedades de materiales o síntesis de materiales funcionales, las cuales dan lugar a la fabricación de implantes biomédicos, dispositivos electrónicos, sensores, biosensores y fabricación de membranas [12]–[14].

El mecanismo de la polimerización por plasma comprende las etapas de generación de especies reactivas, inicio del proceso, propagación, terminación y deposición en el sustrato, las cuales se describen a continuación:

Generación de Especies Reactivas:

La energía suministrada al gas precursor (monómero) genera un plasma, que está compuesto por iones, electrones, radicales y especies excitadas. Esto se logra mediante la aplicación de un campo eléctrico de alta frecuencia o mediante el uso de microondas. La energía del plasma rompe los enlaces de las moléculas precursoras, generando especies altamente reactivas como los radicales libres.



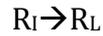
Donde:

M= monómero

R<sub>L</sub>= Radical libre

Inicio del Proceso:

Los radicales libres actúan como iniciadores para la polimerización. La formación de estos radicales puede ocurrir por la ruptura homolítica de los enlaces en las moléculas precursoras.

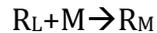


Donde:

$R_I \rightarrow$  Radical iniciador

Propagación:

Los radicales libres formados durante la iniciación se unen a las moléculas precursoras, formando enlaces covalentes y extendiendo la cadena polimérica en un proceso de propagación.



Donde:

$R_M =$  Radical del monómero

$D =$  Dímero

$T =$  Trímero

Este proceso continúa hasta que se alcanza la longitud deseada de la cadena polimérica.

Terminación:

La cadena polimérica puede terminar de varias maneras, ya sea por la combinación de dos radicales, por la reacción con especies no reactivas presentes en el plasma, o por la reacción de los radicales con las paredes de la cámara de reacción.



Donde:

$PT =$  Producto terminado

$MNR =$  Molécula no reactiva

Deposición en el Sustrato:

Finalmente, las cadenas poliméricas formadas en el plasma se depositan en el sustrato, formando un recubrimiento o película polimérica [15],[16].

Los polímeros que se generan a partir de la polimerización por plasma tienen características como alto peso molecular, alto grado de entrecruzamiento, así como alta biocompatibilidad; esto último debido a que a diferencia de otras técnicas tradicionales de polimerización (química o electroquímica), no participan reactivos secundarios que actúen como iniciadores, catalizadores o terminadores de cadena y la única generación de productos secundarios son oligómeros de bajo peso molecular [17].

La polimerización por plasma es un proceso altamente controlable que ofrece la ventaja de ser un proceso de baja temperatura, lo que permite la modificación de una amplia gama de sustratos sin dañar materiales sensibles al calor y que puede ofrecer propiedades específicas al material resultante. Además, la selección de los gases precursores, la configuración del plasma, la potencia de síntesis, el vacío del reactor, entre otros factores, pueden ajustarse para obtener las propiedades deseadas en el material polimérico final [18], [19].

Los polímeros sintetizados por plasma, debido a la naturaleza de la síntesis, resultan en materiales altamente entrecruzados y el polímero pierde las propiedades iniciales del monómero como los enlaces conjugados que juegan un papel importante en las propiedades de conductividad del polímero, por lo tanto, se utilizan técnicas como el dopaje para incrementar las propiedades de conductividad de los materiales en los casos que son requeridos [20].

El dopaje es el proceso de modificación del polímero, ya sea añadiendo electrones (reducción) o eliminando electrones (oxidación). El dopante no sólo se aplica para mejorar la conductividad eléctrica sino también para mejorar la solubilidad, procesabilidad y estabilidad del polímero. Como en los semiconductores inorgánicos, el dopaje de tipo  $n$  (donante de electrones) y de tipo  $p$  (aceptor de electrones) también es aplicable a los semiconductores orgánicos. La adición de electrones o agujeros aumenta la conductividad del polímero en varios órdenes de magnitud y, para este propósito este

el agente dopante puede ser un elemento electronegativo de la tabla periódica como el iodo, cloro o flúor, dependiendo del propósito de aplicación final del material [21], [22].

### 2.3 Polímeros aminados sintetizados por plasma

Los polímeros aminados sintetizados por plasma son polímeros que contienen grupos amino (-NH<sub>2</sub>) incorporados en su estructura química y que han sido generados o modificados mediante técnicas de polimerización por plasma. La introducción de grupos amino en los polímeros puede conferir propiedades específicas, como la capacidad de interactuar con sustancias cargadas eléctricamente, mejorar la adhesión, y facilitar la unión de moléculas bioactivas, así como el incremento de la biocompatibilidad del polímero [23], [24].

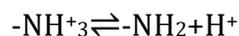
Las aminas en sistemas acuosos interactúan con moléculas de agua y se polarizan, esta interacción puede influir en las propiedades químicas y físicas de éstas. El mecanismo de polarización de las aminas es el siguiente:

1. Formación de enlaces de hidrogeno: El átomo de nitrógeno en el grupo amino actúa como un donante de hidrógeno, mientras que el oxígeno en la molécula de agua actúa como un aceptador de hidrógeno.



Este enlace de hidrógeno puede dar lugar a una polarización local en la molécula de amina, ya que el átomo de nitrógeno lleva una carga parcial positiva y el oxígeno lleva una carga parcial negativa.

2. Ionización en agua: Dependiendo de la naturaleza específica de la amina, ésta puede ionizarse en agua, especialmente si es una amina alifática o aromática con propiedades básicas. La ionización implica la pérdida de un protón (H<sup>+</sup>) del grupo amino.



La formación de ion amino (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) también contribuye a la polarización de la amina.

3. Solubilidad y distribución de carga: Las interacciones con el agua pueden influir en la solubilidad de las aminas y en la distribución de carga en la

molécula. La polaridad de las aminas y su capacidad para formar enlaces de hidrógeno afectan la manera en que interactúan con las moléculas de agua.

Las propiedades específicas de la amina y las condiciones del sistema influirán en la magnitud y la naturaleza de esta polarización [25], [26].

Algunas aplicaciones comunes de polímeros aminados sintetizados por plasma incluyen:

- **Superficies Biocompatibles:** La presencia de grupos amino puede mejorar la biocompatibilidad de los materiales, lo que los hace útiles en aplicaciones biomédicas como implantes, recubrimientos para dispositivos médicos y andamios para ingeniería de tejidos.
- **Adhesión Mejorada:** Los grupos amino pueden mejorar la adhesión de los polímeros a diversos sustratos, lo que es beneficioso en aplicaciones como recubrimientos y películas delgadas.
- **Intercambio Iónico:** La presencia de grupos amino permite la interacción electrostática y el intercambio iónico, lo que puede ser útil en aplicaciones como membranas para separación selectiva y sensores.
- **Catalizadores Soportados:** Los polímeros aminados pueden servir como soportes para catalizadores, mejorando la eficiencia y la selectividad en reacciones químicas específicas.
- **Capacidad de Captura de Sustancias Químicas:** La presencia de grupos amino puede permitir la captura selectiva de sustancias químicas específicas, lo que es útil en aplicaciones como sensores de gas y materiales de filtración [27]–[31].

El polipirrol (PPy) y la polialilamina (PAL) son ejemplos de polímeros aminados sintetizados por plasma, los cuales son muy utilizados en la industria e investigación debido a sus características de conductividad y biocompatibilidad.

El polipirrol es un polímero orgánico que se sintetiza a partir de su monómero de pirrol el cual está conformado por un anillo heterocíclico con dobles enlaces conjugados y un grupo amino en forma de amina secundaria (figura 3-a), éste, al polimerizarse por plasma genera un polímero altamente entrecruzado con una variedad de grupos

funcionales como -OH, grupos alilo, carbonilo y nitro según lo propuesto por Kumar, et. al. (figura 3-b), debido a esta variedad química y los enlaces conjugados del monómero, el polipirrol sintetizado por plasma tiene una variedad de propiedades que incluyen; conductividad eléctrica siendo este un semiconductor, propiedades mecánicas de resistencia y flexibilidad, propiedades ópticas de absorción en el rango de luz visible e infrarrojo, mejora de adhesión sobre sustratos, estabilidad química, sensibilidad a estímulos externos como pH, temperatura y humedad, así como incremento de la compatibilidad con sistemas biológicos [32], [33].

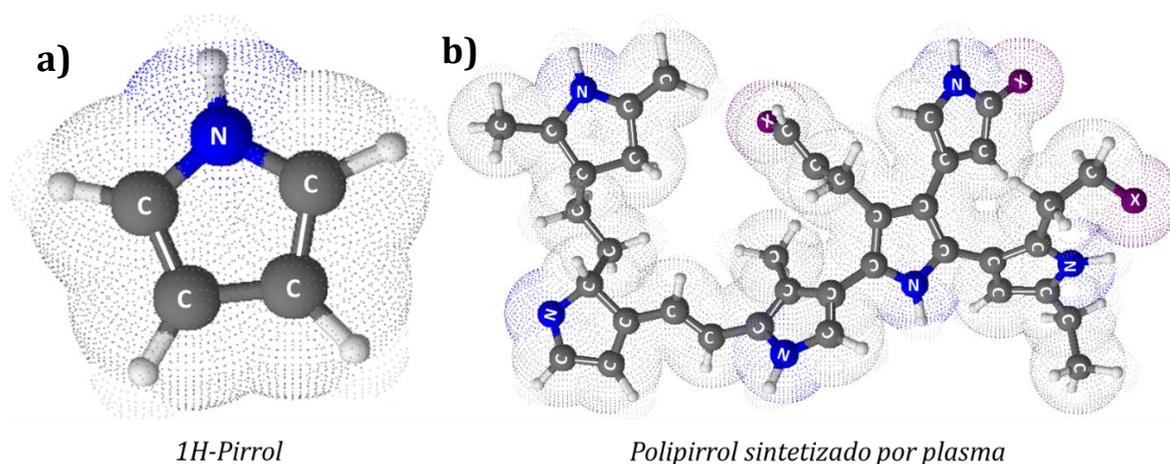


Figura 3. Polimerización de pirrol por plasma, a) monómero de pirrol, b) estructura representativa de polipirrol sintetizado por plasma.

La polialiamina es un polímero derivado de unidades de alilamina de la estructura alifática que cuenta con una amina primaria, tres carbonos y un doble enlace terminal (figura 4-a) en el grupo colgante. Cuando la alilamina se polimeriza por plasma, se forma un polímero con diferentes grupos funcionales que los que se encuentran presentes en el monómero, tales como diferentes aminas e iminas, grupos -OH, grupos alilo, carbonilo y nitro (figura 4-b). Estas características dan lugar a la modificación de superficies con propiedades tales como mejora de la adhesión, tanto de sustratos como de varios tipos celulares, control de hidrofobicidad/hidrofilicidad, incremento de la biocompatibilidad, control de porosidad, sensibilidad a estímulos externos, estabilidad química, así también, dependiendo de las condiciones de polimerización se podría obtener un polímero con propiedades conductoras [34], [35].

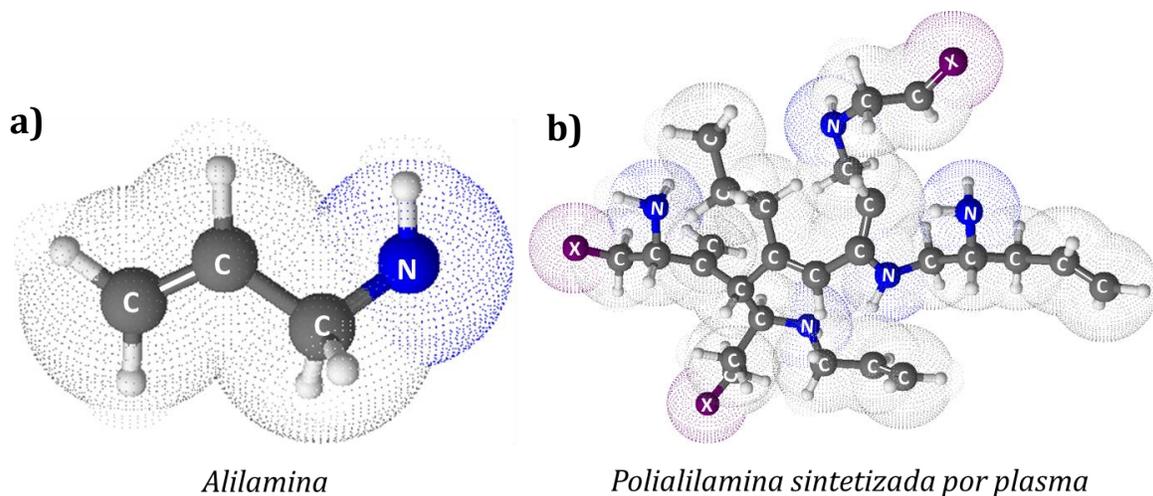


Figura 4. Polimerización de alilamina por plasma, a) monómero de alilamina, b) estructura representativa de polialilamina sintetizada por plasma.

## 2.4 Regeneración neuronal

La regeneración neuronal o neuroregeneración; se define como la recuperación progresiva, estructural y funcional celular y del sistema nervioso dañado. Es un proceso complejo que incluye la generación de nuevas neuronas, glía, mielina y sinapsis, así como la recuperación motora y sensorial de las funciones [36], [37].

Los mecanismos subyacentes a la regeneración neuronal involucran una compleja interacción de factores intrínsecos y extrínsecos que modulan la supervivencia celular, la plasticidad sináptica y la reorganización estructural en el sistema nervioso. La plasticidad neuronal, la activación de células madre neurales, la señalización neurotrófica y la modulación epigenética representan algunos de los mecanismos clave que impulsan la regeneración neuronal en entornos fisiológicos y patológicos [38].

A pesar de los avances significativos en la comprensión de los mecanismos de regeneración neuronal, persisten varios desafíos que obstaculizan la eficacia y la eficiencia de este proceso, como lo son, la formación de cicatriz glial, la inhibición de señalización neurotrófica, la limitada plasticidad neuronal en el sistema nervioso adulto y la respuesta inmune [39].

La comprensión de los mecanismos de regeneración neuronal ha generado nuevas perspectivas para el desarrollo de terapias innovadoras destinadas a promover la

recuperación funcional y la reparación de lesiones en el sistema nervioso central. Estrategias terapéuticas basadas en la manipulación de factores de crecimiento, la ingeniería de tejidos y la modulación de la plasticidad sináptica están siendo exploradas activamente para abordar una variedad de trastornos neurológicos, como lesiones de la médula espinal, accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas [40].

La regeneración neuronal involucra varios tipos de mecanismos dependiendo de las capacidades de regeneración; los cuatro principales son los siguientes:

#### Neurogénesis:

La neurogénesis es el proceso de generación de nuevas neuronas a partir de células madre neurales. Ocurre en regiones específicas del cerebro, como el hipocampo y los ventrículos laterales, donde las células madre neurales se dividen y diferencian en neuronas y células gliales. La neurogénesis se considera crucial para el aprendizaje y la memoria, así como para la plasticidad cerebral. La neuroregeneración es un proceso complejo que involucra no solo la generación de nuevas neuronas, sino también la reconexión adecuada de estas neuronas con otras células nerviosas y la restauración de la función neuronal [41], [42].

#### Regeneración Axonal:

La regeneración axonal se refiere al proceso de crecimiento y restauración de las prolongaciones nerviosas llamadas axones, que se dañan o se cortan como resultado de lesiones o enfermedades. En algunos casos, las neuronas pueden regenerar sus axones, lo que implica la formación de nuevas conexiones para restaurar la función neuronal. Algunos neurotransmisores, como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), actúan como factores de crecimiento que promueven el crecimiento y la supervivencia de las neuronas. Estos neurotransmisores pueden estimular la proliferación de células madre neurales, la formación de nuevas prolongaciones axonales y la ramificación dendrítica, lo que contribuye al proceso de regeneración neuronal. La mielina es una sustancia grasa que recubre los axones neuronales y actúa como un aislante eléctrico, facilitando la transmisión rápida y eficiente de los impulsos nerviosos. Durante el desarrollo del sistema nervioso y en la

edad adulta, las células gliales llamadas oligodendrocitos en el SNC y las células de Schwann en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) producen y envuelven los axones con mielina. La mielinización es crucial para el funcionamiento adecuado del sistema nervioso, ya que aumenta la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos y protege los axones de daños. En enfermedades como la esclerosis múltiple, la mielina se daña o se destruye, lo que conduce a la disfunción neuronal y a síntomas neurológicos [43]–[45].

#### Sinaptogénesis:

La sinaptogénesis es el proceso de formación de sinapsis, que son las conexiones funcionales entre las neuronas. Durante el desarrollo neuronal, las sinapsis se forman y se fortalecen, lo que permite la transmisión de señales eléctricas y químicas entre las células nerviosas. La sinaptogénesis es esencial para la plasticidad sináptica y el procesamiento de la información en el cerebro [46]. La formación de nuevas sinapsis es crucial para restablecer las conexiones neuronales y recuperar la función neuronal perdida. Durante la sinaptogénesis, las neuronas establecen contactos físicos y funcionales entre sí mediante la formación de estructuras sinápticas; estas estructuras incluyen terminales axonales presinápticas, que liberan neurotransmisores, y espinas dendríticas postsinápticas, que reciben las señales químicas transmitidas por los neurotransmisores. Algunos de los neurotransmisores involucrados en la sinaptogénesis son los siguientes:

**Glutamato:** Es el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central (SNC) y desempeña un papel fundamental en la formación y el fortalecimiento de las sinapsis excitatorias. El glutamato actúa sobre receptores específicos, como los receptores NMDA y AMPA, para modular la plasticidad sináptica y promover el crecimiento y la estabilización de las espinas dendríticas.

**GABA (ácido gamma-aminobutírico):** Es el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC y también participa en la sinaptogénesis. La actividad de GABA durante el desarrollo neuronal regula la formación y la maduración de sinapsis inhibitorias, lo que contribuye al equilibrio entre la excitación y la inhibición en el circuito neuronal.

Serotonina: Es un neurotransmisor monoaminérgico que desempeña un papel importante en la regulación del estado de ánimo, el sueño y otros procesos fisiológicos. La serotonina también influye en la sinaptogénesis, especialmente durante el desarrollo del cerebro, y se ha demostrado que modula la formación de sinapsis en diversas regiones cerebrales.

Dopamina: Otro neurotransmisor monoaminérgico que desempeña un papel en la sinaptogénesis. La dopamina está implicada en la regulación de la motivación, la recompensa y el aprendizaje, y se ha demostrado que influye en la formación y la plasticidad de las sinapsis en regiones cerebrales relacionadas con estas funciones.

Acetilcolina: Es un neurotransmisor que desempeña un papel importante en la transmisión sináptica en el sistema nervioso periférico y en algunas regiones del sistema nervioso central. La acetilcolina también está involucrada en la sinaptogénesis durante el desarrollo neuronal y la formación de conexiones sinápticas en regiones como el hipocampo y la corteza cerebral.

Además de los neurotransmisores mencionados, los factores neurotróficos como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) también desempeñan un papel crucial en la sinaptogénesis al regular el crecimiento, la supervivencia y la maduración de las neuronas y las sinapsis. Estos neurotransmisores y factores neurotróficos interactúan de manera compleja para coordinar la formación y la estabilización de las sinapsis durante el desarrollo neuronal y la plasticidad sináptica a lo largo de la vida [47]-[51].

#### Diferenciación Neuronal:

La diferenciación neuronal implica la transformación de células madre o progenitoras en neuronas maduras funcionalmente especializadas. Durante este proceso, las células neuronales adquieren características morfológicas y funcionales distintivas, como la formación de axones y dendritas, así como la expresión de marcadores neuronales específicos. Es importante señalar que estas clasificaciones representan simplificaciones y que el proceso de diferenciación neuronal es altamente complejo y dinámico. Las células precursoras neurales pueden experimentar múltiples fases

intermedias antes de convertirse en neuronas maduras y, durante este proceso, adquieren características morfológicas, moleculares y funcionales específicas como se muestra en la figura 5 [52].

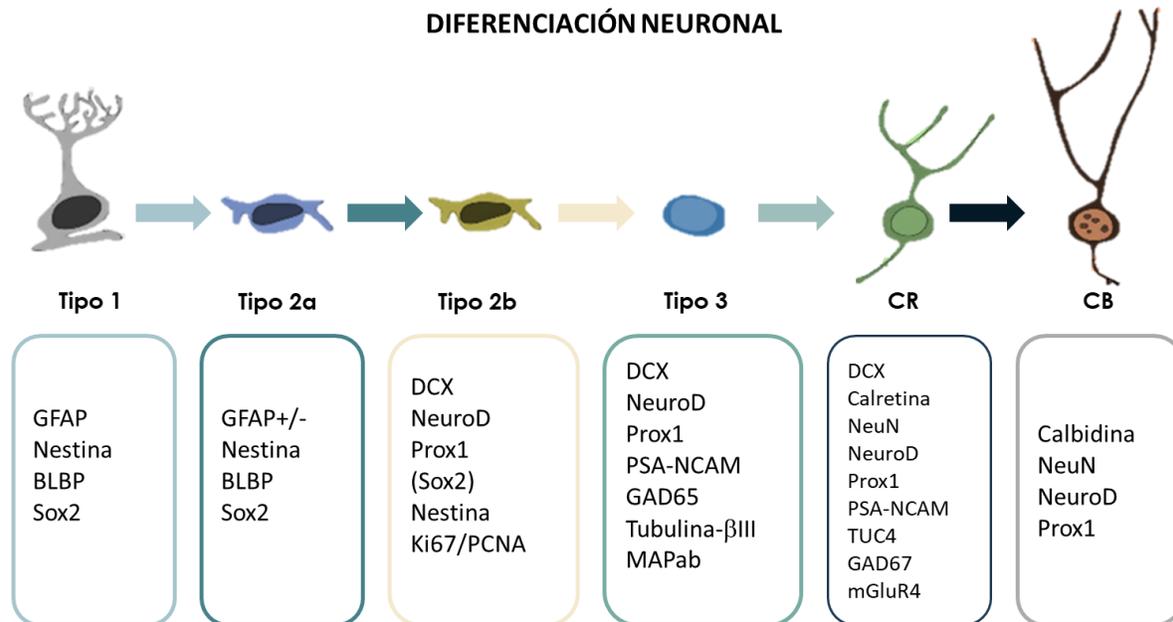


Figura 5. Expresión de proteínas durante la diferenciación neuronal. Modificada de Knoth et al., 2010 [53].

**Tipo 1:** Las células tipo 1, también conocidas como células madre neurales (NSCs, por sus siglas en inglés), son células indiferenciadas capaces de autorrenovarse y diferenciarse en diversos tipos celulares del sistema nervioso, incluyendo neuronas y células gliales.

**Tipo 2a:** Las células tipo 2a son células precursoras neurales que han comenzado a comprometerse hacia la línea de diferenciación neuronal. A menudo, muestran una mayor propensión a convertirse en neuronas en comparación con otras células precursoras neurales.

**Tipo 2b:** Las células tipo 2b son otro subtipo de células precursoras neurales que muestran un mayor grado de especialización hacia la diferenciación neuronal. Estas células están más avanzadas en su compromiso hacia el destino neuronal.

Tipo 3: Las células tipo 3 representan una etapa más avanzada en la diferenciación neuronal. Estas células han comenzado a expresar características neuronales más específicas y han adquirido características típicas de neuronas inmaduras.

CR (Cajal-Retzius): Las células CR son un tipo específico de células neuronales que desempeñan un papel crucial en el desarrollo del cerebro, particularmente en la formación de capas corticales durante la embriogénesis. Estas células secretan factores que guían la migración neuronal y la formación de circuitos cerebrales.

CB (Cajal Band Cells): Las células CB son un tipo de células que forman bandas en la corteza cerebral. Estas células están involucradas en la organización de la arquitectura cortical y se cree que desempeñan un papel en la orientación de las proyecciones neuronales [53].

Estos procesos de neuroregeneración están estrechamente relacionados y contribuyen de manera integral a la formación, el mantenimiento y la función del sistema nervioso. La comprensión de estos procesos es crucial para el desarrollo de terapias y estrategias destinadas a promover la regeneración y la salud neuronal en el contexto de lesiones, trastornos neurológicos y enfermedades neurodegenerativas.

## 2.5 Nichos neurogénicos

La neuroregeneración es una notable capacidad que se asocia con estructuras específicas del cerebro y médula espinal llamadas nichos neurogénicos, que proporcionan un entorno propicio para la proliferación y diferenciación de células madre neurales.

El término nicho neurogénico se refiere al complejo microambiente que contiene a las células neuronales progenitoras (NPC's, que incluyen a las células madre y su progenie), que tienen la función de migrar y madurar nuevas neuronas y células gliales en el sistema nervioso adulto. El nicho informa su decisión ya sea de permanecer quiescentes o dividirse y provee señales que guían la diferenciación en etapas tempranas [54].

Estos nichos se han identificado en regiones específicas del cerebro, como el hipocampo, los ventrículos cerebrales y las meninges en médula espinal; estas se

caracterizan por una compleja interacción de células gliales, neuronas, vasos sanguíneos y factores de crecimiento que influyen significativamente en la plasticidad cerebral, que se refiere a la capacidad del cerebro para adaptarse y reorganizarse en respuesta a la experiencia y lesiones. La comprensión de estos microambientes es crucial para desentrañar los mecanismos subyacentes de la plasticidad cerebral y su relevancia en la cognición, el aprendizaje y la recuperación funcional [41].

Si bien tradicionalmente se creía que la médula espinal era una región del sistema nervioso central con capacidades limitadas de regeneración, estudios recientes han revelado la presencia de nichos neurogénicos que respaldan la producción continua de nuevas células nerviosas en este tejido crucial [55], [56].

Los nichos neurogénicos en la médula espinal se caracterizan por una compleja interacción de diferentes tipos celulares como células madre neurales, células progenitoras neurales, astrocitos y oligodendrocitos, así como la señalización molecular. Se ha demostrado que las células madre y los progenitores neurales desempeñan un papel fundamental en la generación y diferenciación de neuronas y células gliales en la médula espinal [57].

Varios factores intrínsecos y extrínsecos están implicados en la regulación de la neurogénesis en la médula espinal. La señalización de factores de crecimiento, la interacción con células gliales y la influencia del microambiente extracelular son componentes críticos que determinan la proliferación y diferenciación de las células progenitoras en la médula espinal. El entendimiento completo de estos mecanismos regulatorios es crucial para desarrollar enfoques terapéuticos efectivos para el tratamiento de lesiones de la médula espinal y trastornos neurodegenerativos [58].

La comprensión de la neurogénesis en la médula espinal ha abierto nuevas perspectivas en el campo de la medicina regenerativa y el tratamiento de lesiones de la médula espinal. Estrategias terapéuticas dirigidas a potenciar la neurogénesis endógena y la aplicación de células madre neurales podrían ofrecer soluciones innovadoras para mejorar la recuperación funcional y la calidad de vida de los pacientes con lesiones de la médula espinal [59].

## 2.6 Marcadores de diferenciación neuronal y sinapsis

Los marcadores neuronales para la identificación de sinapsis y los procesos de diferenciación neuronal son proteínas o moléculas específicas que se utilizan para identificar y visualizar la presencia de estos mecanismos en tejidos o cultivos celulares. Estos marcadores juegan un papel crucial en la comprensión de las cascadas de señalización, así como en el estudio de los mecanismos subyacentes. Los marcadores más utilizados para el estudio de los procesos de diferenciación y sinápticos son los siguientes:

- MAP2 (Microtubule-Associated Protein 2): Un marcador para neuronas maduras, particularmente para dendritas [60].
- $\beta$ III-Tubulina (TUB $\beta$ 3): Un marcador específico de neuronas en etapas tempranas de diferenciación y en neuronas maduras [61].
- NeuN (Neuronal Nuclei): Un marcador nuclear que indica la presencia de neuronas maduras [62].
- GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein): Un marcador para astrocitos, que son células gliales estrelladas en el sistema nervioso central [63].
- Olig2 (Oligodendrocyte Transcription Factor 2): Un marcador específico de la línea celular de oligodendrocitos [64].
- Nestina: Un marcador para células madre/neurales y células progenitoras neurales inmaduras [65].
- Synapsina I y II: Marcadores de sinapsis pre y postsinápticas en neuronas maduras [66].
- DCX (Doublecortin): Un marcador para neuronas inmaduras y para la migración neuronal durante el desarrollo temprano [67].

Estos marcadores neuronales se utilizan ampliamente en la investigación para identificar y caracterizar diferentes tipos de células neuronales y etapas de diferenciación durante el desarrollo del sistema nervioso. Su uso permite una comprensión más profunda de los procesos de diferenciación y la plasticidad neuronal,

así como su aplicación en la identificación de patologías y la evaluación de terapias potenciales.

Los marcadores pre y postsinápticos son proteínas específicas que se encuentran en la región pre y postsináptica de una sinapsis, respectivamente. Estos marcadores desempeñan funciones clave en la transmisión y la modulación de señales entre las neuronas en una sinapsis.

#### Marcadores Presinápticos:

Estos marcadores se encuentran en la región presináptica de la sinapsis, que es la parte de la sinapsis desde la cual se libera el neurotransmisor. Estas proteínas incluyen enzimas y proteínas de transporte involucradas en la síntesis, el empaquetado y la liberación de neurotransmisores. Algunos ejemplos de marcadores presinápticos son la sinaptobrevina, la sinaptotagmina y la syntaxina [46].

#### Marcadores Postsinápticos:

Los marcadores postsinápticos se localizan en la región postsináptica de la sinapsis, que es la parte receptora de la sinapsis donde se reciben los neurotransmisores liberados por la neurona presináptica. Estas proteínas incluyen receptores de neurotransmisores y proteínas de señalización que son responsables de la transducción de la señal sináptica y la generación de respuestas postsinápticas. Ejemplos de marcadores postsinápticos son el receptor NMDA, el receptor AMPA y el receptor GABA-A [68].

Estos marcadores pre y postsinápticos son fundamentales para la función sináptica normal y la comunicación neuronal eficiente. La identificación y el estudio de estos marcadores proporcionan información importante sobre la estructura y la función de las sinapsis, así como sobre los mecanismos subyacentes a la plasticidad sináptica y la modulación de la transmisión sináptica en el sistema nervioso.

**PSD-95 (Post-synaptic density protein 95):** Un componente importante de la región postsináptica de las sinapsis excitatorias, implicado en la organización de receptores y proteínas de señalización en la sinapsis [69].

Synaptophysin: Una proteína transmembrana presente en las vesículas presinápticas, que se utiliza comúnmente como un marcador de la densidad sináptica y la actividad presináptica [70].

VGAT (Vesicular GABA transporter): Un transportador de vesículas que carga el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA) en las vesículas presinápticas, específico para sinapsis inhibitorias [71].

VGLUT (Vesicular glutamate transporter): Un transportador de vesículas que carga el neurotransmisor glutamato en las vesículas presinápticas, específico para sinapsis excitatorias [72].

Bassoon: Una proteína presente en la región activa presináptica de las sinapsis, involucrada en la organización y el mantenimiento de la estructura sináptica [73].

Estos marcadores neuronales son ampliamente utilizados en la investigación para visualizar y cuantificar la actividad sináptica, así como para estudiar la plasticidad sináptica y los cambios en la función sináptica en diferentes contextos fisiológicos y patológicos. Su uso permite una comprensión más profunda de la organización y la dinámica de las sinapsis en el sistema nervioso.

## 2.7 Cultivo celular para el estudio neuronal

Los cultivos celulares son sistemas experimentales en los que se cultivan y mantienen células fuera de su entorno natural, típicamente en un entorno de laboratorio controlado. Esta herramienta permite estudiar el comportamiento, la función y las interacciones de las células en un contexto *in vitro*, por lo tanto, es una forma muy efectiva de estudiar procesos biológicos específicos como la regeneración neuronal. Para este fin, se pueden utilizar varios tipos celulares (figura 6) como lo son:

Cultivos Primarios de Neuronas: Los cultivos primarios de neuronas se derivan directamente de tejido nervioso, generalmente del cerebro de animales neonatos. Estos cultivos proporcionan un entorno tridimensional más adecuado para el crecimiento celular y permiten el estudio de la diferenciación y la formación de sinapsis en un entorno que se asemeja más estrechamente a las condiciones *in vivo* [74].

**Cultivos de Células Madre Neurales:** Los cultivos de células madre neurales, que pueden ser células madre embrionarias o células madre inducidas, se utilizan para estudiar la diferenciación neuronal en un entorno controlado. Estos cultivos permiten el estudio de los mecanismos moleculares y celulares que regulan la diferenciación de las células madre en neuronas y otros tipos de células nerviosas [75].

**Cultivos de Células Gliales:** Los cultivos de células gliales, como los astrocitos y los oligodendrocitos, también se utilizan en el estudio de la sinapsis neuronal, ya que desempeñan un papel crucial en el mantenimiento y la función sináptica. Estos cultivos permiten investigar la interacción entre las células gliales y las neuronas en el contexto de la formación y la función sináptica [76].

**Cultivos de Células Neuronales Inducidas:** Los cultivos de células neuronales inducidas se generan a partir de células no neurales, como fibroblastos, mediante reprogramación celular a un estado neuronal. Estos cultivos proporcionan un modelo celular útil para estudiar la diferenciación neuronal y la formación de sinapsis en un entorno controlado y reproducible [77].

**Cultivos de línea celular neuronal:** Estos cultivos se generan a partir de tejido nervioso o de tumores relacionados con el sistema nervioso, en muchos casos, las líneas celulares han sido "inmortalizadas", lo que significa que han adquirido la capacidad de dividirse indefinidamente. Esto se logra a menudo mediante la introducción de mutaciones genéticas o la expresión de genes específicos. Representan un sistema simplificado pero valioso que permite estudiar la morfología, la función y los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a la diferenciación, la plasticidad sináptica, la neurogénesis, la neurodegeneración, la respuesta a lesiones y enfermedades, así como la respuesta de las neuronas a diversas señales ambientales y farmacológicas. En resumen, permiten la observación directa de procesos celulares en un entorno controlado, lo que facilita la comprensión de los mecanismos involucrados en la regeneración del sistema nervioso y proporciona información valiosa para el desarrollo de enfoques terapéuticos [78], [79].

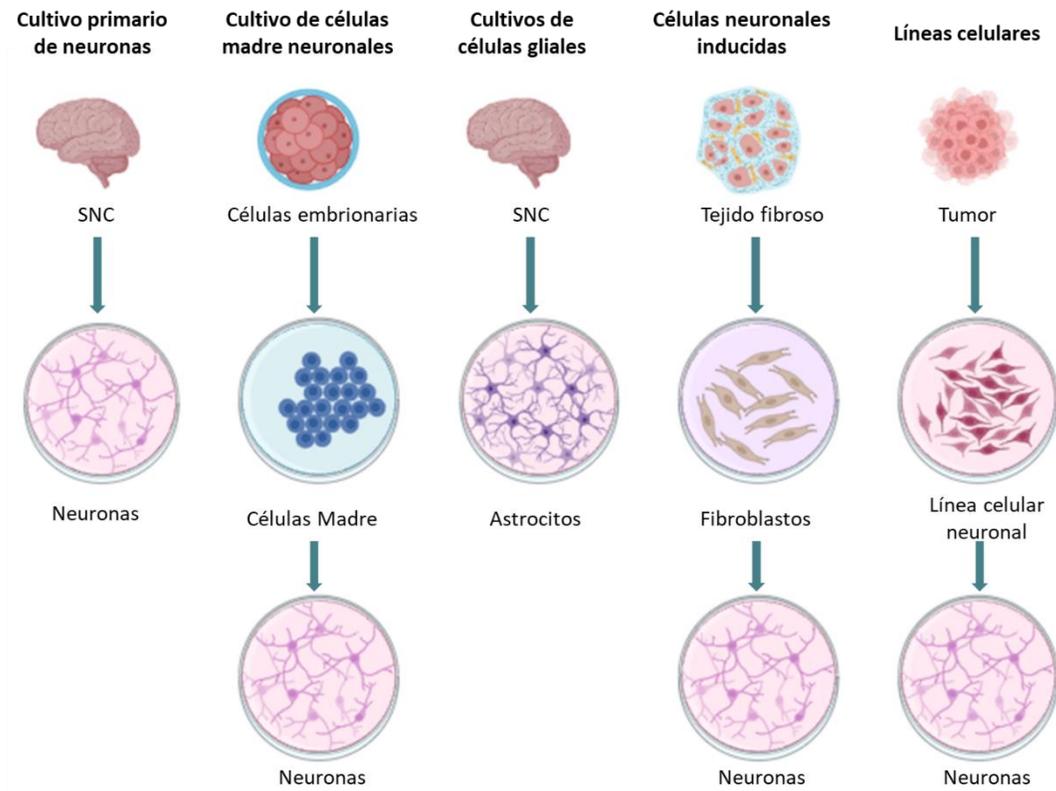


Figura 6. Origen de tipos de cultivos celulares para la diferenciación neuronal y el estudio de procesos bioquímicos (Biorender).

Existen varias líneas celulares ampliamente utilizadas en la investigación para estudiar la diferenciación y la sinapsis neuronal. Estas líneas celulares son modelos útiles para comprender los procesos de diferenciación y función sináptica en un entorno de laboratorio controlado. Algunas de las líneas celulares comunes incluyen:

**PC12:** Una línea celular derivada de un tumor de médula adrenal de rata. Estas células pueden diferenciarse en células con características neuronales en respuesta a factores de crecimiento y otros estímulos, lo que las convierte en un modelo útil para estudios de diferenciación neuronal y formación de sinapsis [80].

**SH-SY5Y:** Una línea celular de neuroblastoma humano ampliamente utilizada en la investigación neurocientífica. Esta línea celular es capaz de diferenciarse en células con fenotipo neuronal, lo que la convierte en un modelo valioso para estudiar la diferenciación y la plasticidad neuronal.

Neuro-2a: Una línea celular neuronal murina derivada de un neuroblastoma de ratón. Esta línea celular se utiliza ampliamente en estudios de neurogénesis y diferenciación neuronal, así como para investigar mecanismos moleculares involucrados en la formación y función sináptica.

N1E-115: Es una línea celular derivada de un neuroblastoma de ratón y se ha utilizado en una amplia gama de investigaciones en neurociencia, se deriva de un neuroblastoma de ratón, lo que la convierte en un modelo útil para el estudio de procesos neuronales y el desarrollo del sistema nervioso. Esta línea celular es conocida por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en neuronas similares a las células ganglionares del sistema nervioso, lo que la convierte en un modelo valioso para estudiar la diferenciación neuronal y la plasticidad sináptica. Es capaz de proliferar y crecer de manera robusta en cultivo, lo que permite la generación de cantidades suficientes de células para estudios experimentales y funcionales. Se ha utilizado ampliamente en estudios sobre el desarrollo neuronal, la neurotransmisión, la expresión génica neuronal y la plasticidad sináptica, lo que ha permitido avances significativos en la comprensión de los mecanismos subyacentes a la función del sistema nervioso. Responde a estímulos ambientales y moleculares, lo que la convierte en un modelo útil para estudiar la plasticidad neuronal en respuesta a factores extrínsecos e intrínsecos. La línea celular N1E-115 ha sido fundamental en la investigación neurocientífica y ha contribuido significativamente a la comprensión de una variedad de procesos neuronales y sinápticos en el sistema nervioso [81]–[83].

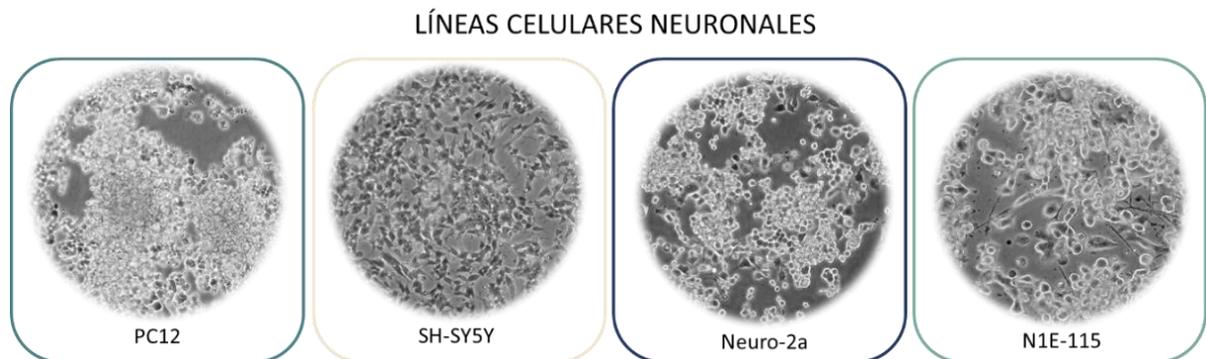


Figura 7. Líneas celulares de origen neuronal más comunes para el estudio de procesos bioquímicos (desde ATCC).

### 3. Estado del arte

#### 3.1 Antecedentes

En un trabajo publicado en 2008 por Olayo, et. al. [84] se mostró un estudio en un modelo murino en donde se colocaron como implantes, pastillas de polímeros sintetizados por plasma de polipirrol dopado con iodo (PPy-I) y de un copolímero de polipirrol con polietilenglicol dopado con iodo (PPy/PEG-I) en un modelo de lesión de médula espinal por sección completa. Se mostró la médula espinal control después de 30 días de la lesión por sección completa, en donde se observó la médula adelgazada en el lugar de la lesión, pero reconectada debido al rápido metabolismo y capacidad de regeneración de las ratas, y se mostró la tinción con Luxol Fast blue que tiñe la mielina de los axones y los cuerpos de Nissl, con espacios en blanco que son la formación de quistes debido a la lesión y se puede observar una gran cantidad de ellos; también se mostró la médula lesionada por sección completa y tratada con polímero de PPy-I, en donde se observó la pastilla del polímero embebida en la médula y una mayor cantidad de tejido preservado en comparación del control. Y finalmente mostraron la médula espinal del animal tratado con el copolímero de PPy/PEG-I que, aunque de igual manera que con la pastilla de PPy-I se encuentra embebida en la médula y se observó una mayor cantidad de tejido preservado respecto al control, ésta es visiblemente menor que en el caso del tratamiento con PPy-I, al igual que la cantidad de quistes formados que se observan con este tratamiento.

Esto demuestra la biocompatibilidad en el sistema nervioso central de los polímeros PPy-I y PPy/PEG-I sintetizados por plasma, así como su capacidad de incrementar la cantidad de tejido preservado en la médula espinal.

En otro trabajo publicado por Cruz, et. al. del año 2012 [85], se mostró el efecto de implantes de PPy/I, copolímero de PPy/PEG y PPy sin dopaje de yodo, en un modelo de lesión por sección completa en ratas de la cepa Long Evans. Se mostró una histología a las 8 semanas de tratamiento con los materiales, de secciones longitudinales de los aminaes tratados con los diferentes materiales con una tinción de hematoxilina y eosina, la cual tiñe de azul/purpura los núcleos y el citoplasma en color rosa de las células del tejido. El área del tejido preservado debería tener 52 mm<sup>2</sup> que es el área total estudiada de la médula espinal, por lo que se obtuvieron los porcentajes de preservación del tejido con cada tratamiento. El control alcanzó un porcentaje de 17.37% (9.03 mm<sup>2</sup>) en la semana 8 de recuperación, en seguida la histología del tratamiento con PPy produjo una conservación de tejido del 24.92% (12.96 mm<sup>2</sup>), mientras que en el PPy/I se conservó el 24.12% (12.54 mm<sup>2</sup>) y finalmente en el tratamiento con copolímero de PPy/PEG se conservó el 21.94% (11.41 mm<sup>2</sup>), por lo tanto es notable que tanto el tratamiento con PPy y el dopado (PPy/I), fueron los tratamientos más eficaces para ayudar a la conservación del tejido en el sitio de lesión, siendo esta área significativamente diferente a la del control.

En cuanto a la motricidad se obtuvieron los diferentes grupos de ratas con los distintos tratamientos a lo largo de 8 semanas de evaluación. En la semana final de la evaluación el grupo control obtuvo un puntaje promedio de 2.2 BBB, el grupo tratado con PPy obtuvo un promedio de 4.6 puntos en BBB, el grupo con tratamiento de PPy-I obtuvo 4.7 puntos de BBB y finalmente el grupo con el tratamiento de copolímero PPy/PEG obtuvo un puntaje de 3 en la escala BBB. Se puede observar como el tratamiento de PPy-I obtuvo mayor puntaje en la escala BBB desde la semana 1 de evaluación hasta la semana 6, y finalmente terminar la evaluación en semana 8 con un puntaje muy similar al tratamiento con PPy y tratamientos obtuvieron un puntaje significativamente diferente al control sin tratamiento.

En 2016 Mondragón-Lozano; et. al [86]; publicaron un estudio en donde realizaron implantes en medula espinal en ratas de la cepa Long Evans, en un modelo de lesión por contusión el tratamiento del polímero fue aplicado en forma de una solución de mesopartículas de PPy-I 48 h después de la lesión. Esta forma de aplicación del polímero permitió mayor área de contacto con el sitio de lesión de la médula espinal, lo cual impactó en la disminución de la formación de quistes y en una mayor cantidad de tejido preservado en comparación al grupo control y el grupo inyectado solo el vehículo de solución salina. Por otro lado, en la evaluación de motricidad mediante BBB, que fue seguida semanalmente durante 2 meses dando como resultado un puntaje de  $6 \pm 1.04$  para el grupo control (lesionado),  $4.25 \pm 1.30$  para el grupo control con vehículo y un puntaje de  $12.5 \pm 1.85$  para el grupo tratado con PPy/I a las 8 semanas de seguimiento. El tejido preservado con el tratamiento de PPy-I fue significativamente diferente respecto a los controles, llegando a un puntaje de  $15.09 \pm 0.46 \text{ mm}^2$ , en comparación con  $9.16 \pm 1.03 \text{ mm}^2$  y  $11.56 \pm 0.69 \text{ mm}^2$  del control y el grupo inyectado con vehículo respectivamente, estos resultados representan una diferencia del 64.74% respecto al control con lesión por contusión y un 30.54% respecto al grupo inyectado con solución salina. Los resultados mostraron que la inyección de mesopartículas de PPy-I tiene un efecto terapéutico significativo incluso administrada en una fase tardía (48 h después de la lesión). Por otro lado, en 2014 Morales-Guadarrama, et. al, [87] publicaron un estudio en donde se evaluó el efecto terapéutico de PPy-I en un modelo crónico de lesión traumática de medula espinal en un modelo de Monos Rhesus. El implante de polímero se realizó 2 meses después de la lesión traumática y posteriormente los monos se evaluaron mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Se mostró la médula de un mono lesionada viéndose retraída hacia los extremos y en la médula lesionada tratada con PPy/I se puede observar la médula separada por la lesión sin embargo no se observa retracción de ésta y se notó mayor tejido preservado.

### 3.2 Trabajo previo

En el trabajo previo publicado en la tesis de maestría titulada “Estudio del efecto de polímeros aminados sintetizados por plasma sobre la diferenciación neuronal” en 2018

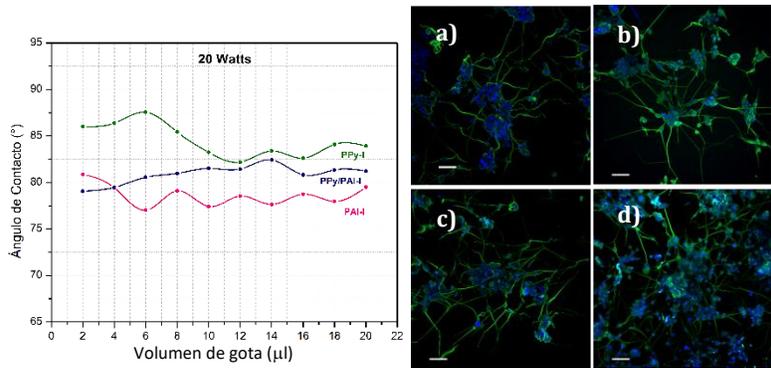


Figura 8. Ángulo de contacto de los materiales sintetizados a 20 W y micrografías del cultivo de la línea celular N1E-115 sembrada sobre recubrimientos de polímeros sintetizados por plasma a 20 W. a) PPy/I, b) PAI/I, c) PPy/PAI

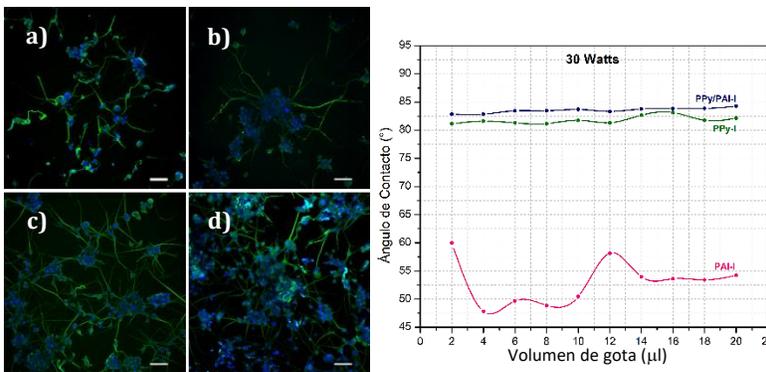


Figura 9. Ángulo de contacto de los materiales sintetizados a 30 W y micrografías del cultivo de la línea celular N1E-115 sembrada sobre recubrimientos de polímeros sintetizados por plasma a 30 W. a) PPy/I, b) PAI/I, c) PPy/PAI

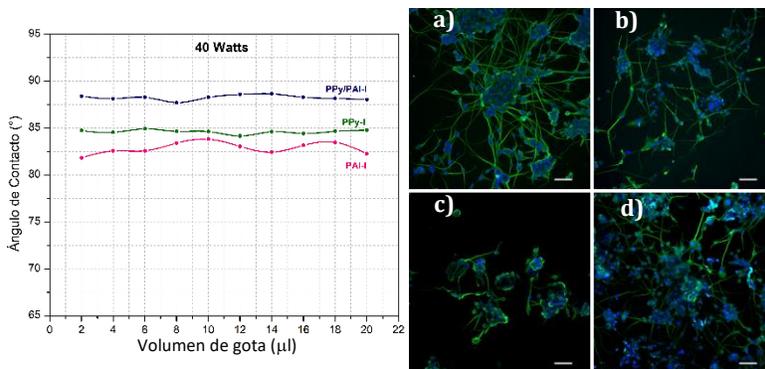


Figura 10. Ángulo de contacto de los materiales sintetizados a 40 W y micrografías del cultivo de la línea celular N1E-115 sembrada sobre recubrimientos de polímeros sintetizados por plasma a 40 W. a) PPy/I, b) PAI/I, c) PPy/PAI

[88], se encontró, en relación a la fisicoquímica de los materiales sintetizados (PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I) que la variación en la potencia de síntesis es importante debido a que ésta puede cambiar las propiedades

fisicoquímicas de los materiales poliméricos y por lo tanto el efecto sobre las cascadas químicas de procesos biológicos. De los materiales que se probaron, el material de PAI-I sintetizado a 30 W mostró alta cantidad de nitrógeno (C/N=14.4) el cual coincide con el mayor porcentaje de aminas primarias (31.4%) calculadas mediante derivación química con TFBA y analizadas mediante EDS (Tabla 2), así como el menor ángulo de contacto

como se muestra en la figura 14 (45°-65°) clasificándose como hidrofílico a diferencia de los demás polímeros que resultaron con un ángulo de contacto promedio de 81-88° (figuras 8-10). Se sembró la línea celular de origen neuronal N1E-115 sobre recubrimientos de los polímeros de PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I sintetizados a 20 W, 30 W y 40 W, así como en un control que fue el sustrato de vidrio

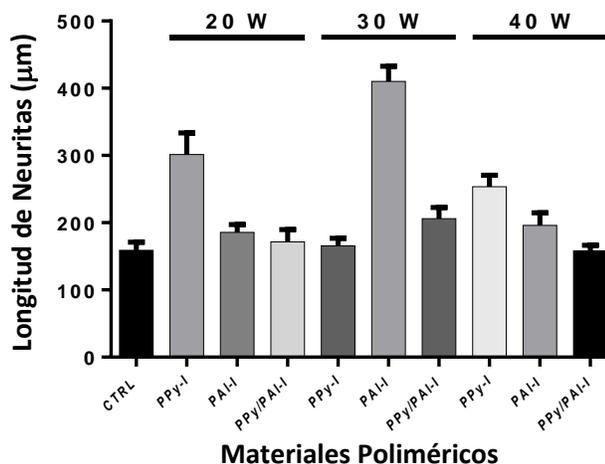


Figura 11. Longitud promedio de neuritas de N1E-115 sembradas sobre diferentes materiales poliméricos.

sobre el cual se polimerizó, y se encontró que sobre el polímero PAI-I sintetizado a 30 W se produjo la mayor longitud promedio de neuritas de la red neuronal formada con 407 mm y una longitud de 287 mm en el caso del polímero de PPy-I, que fueron los dos materiales que resultaron con una diferencia significativa respecto del control que obtuvo una longitud promedio de neuritas de 158 mm (figura 11).

POLÍMERO	PORCENTAJE DE [NH <sub>2</sub> ]/[N] A DIFERENTES POTENCIAS DE SÍNTESIS		
	20 W	30 W	40 W
PPy-I	6.7	2.1	4.96
PAI-I	12.7	31.4	9.9
PPy/PAI-I	8.33	3.19	3.14

Tabla 2. Porcentaje de aminas primarias de los polímeros PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I a diferentes potencias de síntesis.

## 4. Justificación

Con base en los trabajos de Olayo, et al (2007), Cruz, et al (2012), Morales-Guadarrama, et al (2014) y Mondragón-Lozano et al, (2016) [84]–[87], se conoce que los polímeros sintetizados por plasma de PPy-I y PAI-I, tienen un efecto benéfico como tratamientos en lesiones por sección y por contusión de médula espinal, disminuyendo la cantidad de quistes e incrementando la cantidad de tejido preservado en el sitio de lesión, sin embargo, estos hallazgos no describen los mecanismos biológicos que ayudan a recuperar la motricidad de los animales, los cuales recobran la movilidad del tren posterior después de la lesión, este efecto tendría que ser asociado a un proceso de neuroregeneración. Por lo tanto, es necesario proponer y estudiar un mecanismo de regeneración neuronal en un entorno controlado para los procesos de regeneración que podrían estar siendo promovidos por dichos materiales.

Por lo anterior, en el presente proyecto se propone estudiar en un modelo *In vitro* con una línea de origen neuronal, el efecto de los polímeros aminados sintetizados por plasma, PPy-I y PAI-I, sobre la formación de redes neuronales funcionales, mediante el marcaje de proteínas específicas de procesos de regeneración neuronal (diferenciación neuronal y sinaptogénesis), con el objetivo de determinar un posible mecanismo de acción fisiológico de los materiales.

## 5. Hipótesis

Los materiales poliméricos derivados de pirrol y alilamina dopados con iodo sintetizados por plasma contribuyen a la diferenciación neuronal y a la formación de redes neuronales sinápticas.

## 6. Objetivos

### 6.1 General

Evaluar el efecto de los polímeros derivados de pirrol y alilamina dopados con iodo en la diferenciación neuronal y la formación de sitios sinápticos sobre redes neuronales cultivadas *in vitro*.

### 6.2 Específicos

- Sintetizar polímeros aminados biocompatibles por plasma de PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I.
- Identificar las características fisicoquímicas de los materiales poliméricos sintetizados.
- Cuantificar el porcentaje de aminas primarias, secundarias y grupos -OH de los polímeros sintetizados.
- Evaluar el efecto de diferenciación neuronal de cada material polimérico sintetizado.
- Cuantificar los sitios de sinapsis de las redes neuronales formadas sobre cada uno de los polímeros.

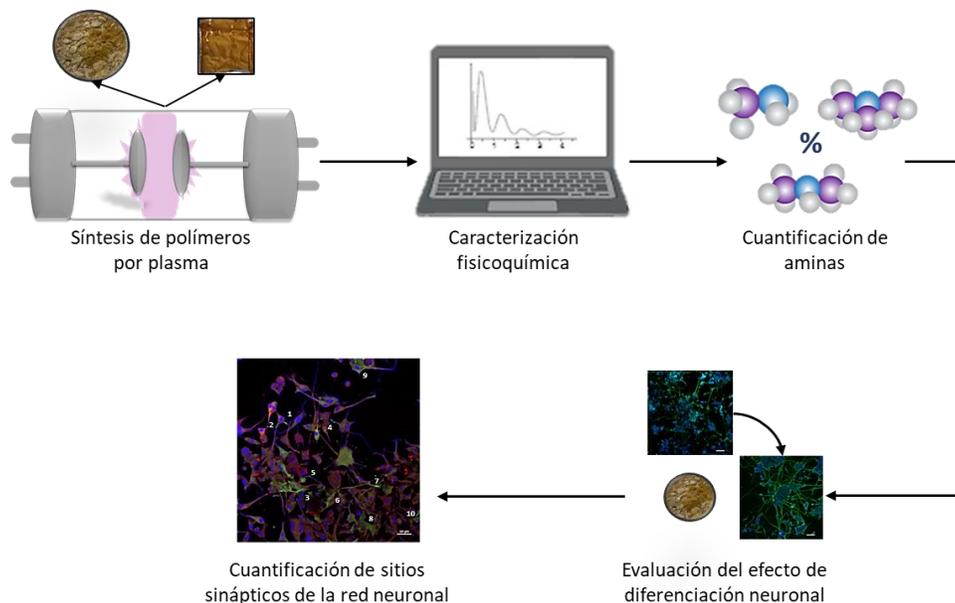


Figura 12. Resumen de los objetivos del trabajo de investigación.

## 7. Métodos y desarrollo experimental

### 7.1 Síntesis de polímeros aminados por plasma

Los materiales poliméricos se sintetizaron en un reactor de plasma compuesto de un tubo de vidrio de 10 l de capacidad, cuenta con bridas de acero inoxidable en los extremos del tubo, las cuales cada una tiene dos orificios, donde en una de ellas se conectaron los contenedores de monómeros, pirrol (Sigma Aldrich, 98%) y alilamina (Sigma Aldrich, 98%) con ayuda de una llave en “Y” y en la otra salida se conectó el contenedor con yodo para el dopaje, a través de llaves J. Young. En una de las salidas de la otra brida se conectó un medidor de presión Pirani y a la otra salida se conectó el sistema de vacío que consta de una trampa de nitrógeno a la que va conectada una bomba de vacío (figura 13).

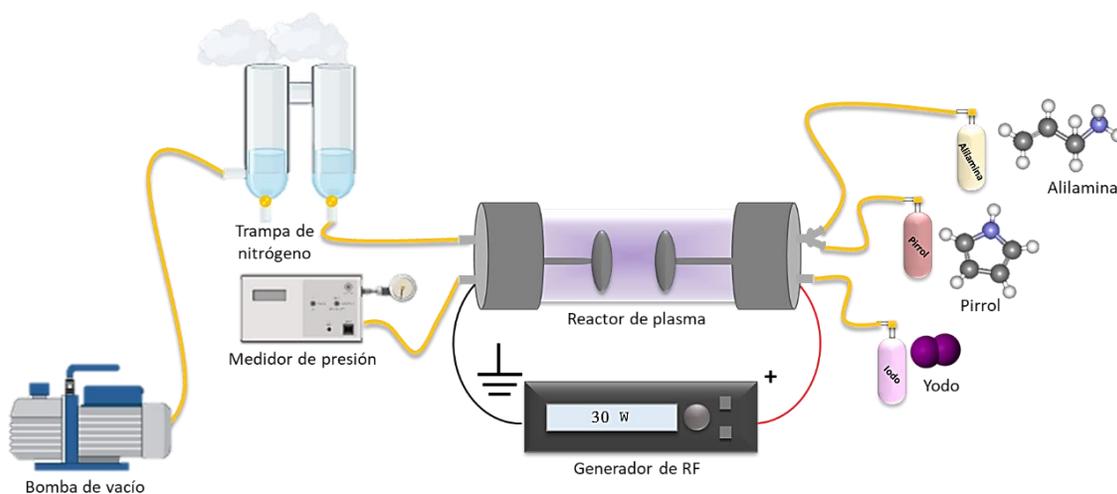


Figura 13. Esquema de la polimerización de recubrimientos y mesopartículas de PPy-I y PAI-I por plasma.

Se utilizaron polímeros como recubrimientos y como mesopartículas. Para la síntesis de los recubrimientos se colocaron portaobjetos recortados de 1X1 cm<sup>2</sup>, se pegaron a la pared del tubo del reactor. Se obtuvieron 9 materiales en diferentes condiciones de síntesis utilizando monómeros de pirrol, alilamina y su combinación (tabla 3). Se utilizó yodo como dopante en donde se abrió la válvula de yodo para dopar 3 de cada 10 min. Al final de cada síntesis se dejó enfriar el reactor durante 1 hora y finalmente se sacaron los portaobjetos recubiertos y se conservaron en cajas Petri de plástico hasta su uso.

Polímero	Tiempo de Reacción (minutos)	Potencia (W)	Presión (Torr)
PPy-I	15	20, 30 y 40	5.5X10 <sup>-1</sup> – 1.1
PAI-I	25	20, 30 y 40	6.5X10 <sup>-1</sup> – 1.4
PPy/PAI-I	15	20, 30 y 40	8.5X10 <sup>-1</sup> – 1.4

Tabla 3. Condiciones de síntesis de los recubrimientos de polímeros sintetizados por plasma.

Para la obtención de las mesopartículas, se sintetizaron los polímeros de PPy-I 20 W y PAI-I 30 W que fueron los polímeros con resultados más favorables en el trabajo previo donde se probaron en un cultivo *in vitro* neuronal, estos se depositaron sobre las paredes del reactor y se doparon con yodo durante 3 de cada 10 min, se realizaron las síntesis durante 6 y 8 h para obtener la mayor cantidad posible de polímeros con potencia de 20 y 30 W para PPy-I y PAI-I respectivamente (tabla 4); al finalizar las síntesis se dejó enfriar el reactor durante 1, 12, 24 y 48 h, para después recuperar el polímero adherido a las paredes del tubo del reactor con ayuda de agua destilada para hinchar la película y después rasparla del tubo. Las películas obtenidas se molieron en un molino de bolas durante 15 min para obtener las mesopartículas en forma de un polvo fino color ámbar.

Polímero	Tiempo de Reacción (horas)	Potencia (W)	Presión (Torr)
PPy-I	6	20	3.2X10 <sup>-1</sup> – 8X10 <sup>-1</sup>
PAI-I	8	30	4.8X10 <sup>-1</sup> – 1.1

Tabla 4. Condiciones de síntesis de películas polímeros sintetizados por plasma.

## 7.2 Distribución de tamaño de partícula

Para el caso de las mesopartículas de los polímeros PPy-I 20 W y PAI-I 30 W, se midieron los diámetros de partícula de cada material con ImageJ a partir de micrografías obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Se obtuvieron 10 micrografías por cada material para al final tener un total de 200 mediciones de partículas por cada material. La distribución de diámetro de partícula y la media armónica de las partículas medidas fue calculada mediante la ecuación de distribución normal:

$$f(\phi) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{\phi-\mu}{\sigma}\right)^2} \quad [89]$$

Donde:

$\phi$ = diámetro de partícula

$\mu$ = media armónica

$\sigma$ = desviación estándar

Finalmente se obtuvieron las gráficas de distribución normal, destacando la media armónica de cada tamaño de partícula de los materiales.

## 7.3 Caracterización fisicoquímica

### 7.3.1 Espectroscopía Infrarroja por Reflectancia Total Atenuada

Se analizaron los grupos funcionales presentes en los materiales mediante Espectroscopía Infrarroja por Reflectancia Total Atenuada (IR-ATR) a diferentes tiempos de enfriamiento del reactor (1, 12, 24 y 48 h) después de finalizada la síntesis, sin abrir el reactor. El equipo utilizado fue un Nicolet iS20 FTIR Spectrometer de Thermo Scientific, en donde primero, con ayuda del software OMNIC Paradigm, se tomó el espectro del ambiente y posteriormente se colocó la muestra en el centro del diamante y con un tornillo se comprimieron las muestras para correr el programa utilizando 100 barridos en un intervalo de 4000  $\text{cm}^{-1}$  a 500  $\text{cm}^{-1}$  y se obtuvieron los espectros de cada material. Los espectros obtenidos se normalizaron respecto al pico con mayor transmitancia y se asignaron a cada grupo funcional de acuerdo con la bibliografía.

### 7.3.2 Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X

Se obtuvo el análisis elemental y los estados químicos de los recubrimientos poliméricos de PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I y de las mesopartículas de PPy-I y PAI-I mediante la técnica de Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS), mediante un espectroscopio XPS Thermo K-Alpha equipado con una fuente monocromada de rayos X de aluminio. El diámetro del área de análisis fue de 400  $\mu\text{m}$ . Se usó una fuente de iones de argón para neutralizar cargas estáticas en las muestras. Las muestras se colocaron en el equipo y se hizo vacío para poder iniciar el funcionamiento del láser; se obtuvieron los espectros de XPS, así como el análisis elemental de cada material polimérico. Posteriormente se procesaron los espectros mediante OriginPro 8.1 para hacer la deconvolución del orbital N1s y así asignarlos de acuerdo con la bibliografía y las tablas de B. Vincent Crist [90], para obtener los estados químicos del nitrógeno y sus porcentajes presentes en cada material.

### 7.3.3 Porcentaje de aminas por derivación química

Se obtuvieron los porcentajes de los grupos funcionales amina primaria ( $-\text{NH}_2$ ), amina secundaria ( $-\text{NH}$ ) e hidroxilos ( $-\text{OH}$ ), mediante derivación química con los reactivos de 4-(trifluorometil)benzaldehído (TFBA) y anhídrido trifluoroacético (TFAA).

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

El 4-trifluorometil benzaldehído (TFBA) forma enlaces específicos con aminas primarias (figura 14) los cuales se pueden identificar posteriormente por diversas técnicas de caracterización debido a que el flúor es un elemento que no se encuentra originalmente presente en los grupos amina [91].

Para el caso de la derivación química mediante TFBA, de la cual se cuantificaron los grupos  $-\text{NH}_2$ , los recubrimientos se colocaron en un vidrio de reloj que se metió dentro de una caja Petri que contenía 1 mL de TFBA, con el objetivo de que el reactivo no mojara las muestras, posteriormente la caja Petri se selló con parafilm y se introdujo a

un horno a 45°C durante 3 h para permitir que el vapor del TFBA reaccionara con la superficie de los polímeros. Finalmente se sacaron las muestras y se cambiaron a una nueva caja Petri para conservarse hasta ser analizadas mediante XPS. Para el caso de la identificación de los grupos funcionales -NH<sub>2</sub>, -NH y -OH mediante TFAA las muestras de igual manera fueron colocadas en un vidrio de reloj dentro de una caja Petri que contenía 2 mL del reactivo y se introdujo a un horno a 35 °C durante 30 min, después se retiraron del horno y fueron conservados sellados para el posterior análisis. Los porcentajes elementales obtenidos mediante XPS antes y después de la derivación se analizaron y se estimaron los porcentajes de aminas primarias, secundarias y grupos hidroxilo [92].

Se ha demostrado que el TFBA reacciona selectivamente con las aminas primarias mediante una reacción específica del nitrógeno con el carbono carbonílico del TFBA [93], por lo que los análisis elementales con XPS permitieron identificar el flúor presente en la molécula de TFBA que reacciona con los nitrógenos de las aminas primarias y así calcular el porcentaje de aminas primarias con respecto al carbono presente en la molécula mediante la siguiente fórmula:

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

En donde:

*u* = Elementos antes de la derivación química.

*d* = Elementos después de la derivación química.

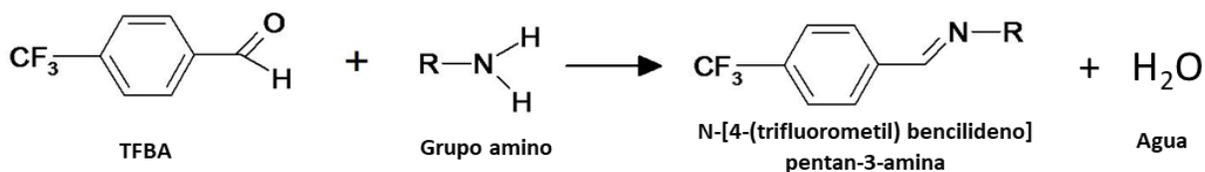


Figura 14. Reacción de derivación química mediante TFBA en presencia de aminas primarias

Por otra parte, la derivación química mediante TFAA se utilizó para estimar los porcentajes de aminas primarias y secundarias presentes en los materiales; sin embargo, también se ha demostrado que reacciona con grupos -OH (figura 15); por lo tanto, los porcentajes combinados de estos grupos funcionales se calcularon mediante la siguiente formula:

$$\frac{[NH_2] + NH + OHu}{[C]u} = \frac{\frac{1}{3}[F]d}{[C]d - \frac{2}{3}[F]d} \times 100$$

En donde:

$u$  = Elementos antes de la derivación química.

$d$  = Elementos después de la derivación química.

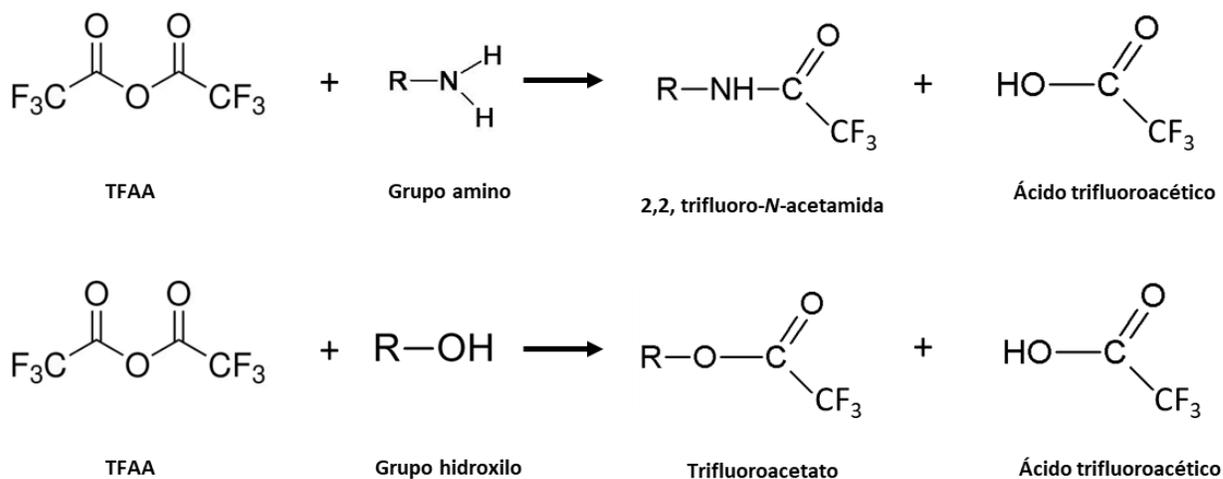


Figura 15. Reacción de derivación química mediante TFAA en presencia de aminas y grupos hidroxilo.

#### 7.3.4 Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica de las mesopartículas de los polímeros PPy-I 20 W y PAI-I 30 W se estimó midiendo la variación de la resistencia en función a la humedad relativa.

Dado que:

$$\sigma = \eta q \mu$$

Donde:

$\sigma$  = Conductividad, (S/cm), Siemen = Mho =  $1/\Omega$

$q$  = Carga del portador (C).

$\mu$  = Movilidad de cargas,  $\text{cm}^2/(\text{V}\cdot\text{s})$ .

$\eta$  = Densidad de portadores de carga ( $\text{cm}^{-3}$ ).

La conductividad eléctrica es el inverso de la resistividad:

$$\sigma = \frac{1}{\rho}, \quad \rho = \frac{RA}{l}$$

Sustituyendo:

$$\sigma = \frac{1}{\frac{RA}{l}} = \frac{l}{RA}$$

Donde:

$R$  = Resistencia en  $\Omega$

$A$  = Área de la muestra,  $\text{cm}^2$

$l$  = Espesor de la muestra, cm

El procedimiento experimental que se utilizó para medir la resistencia de los materiales para estimar la conductividad se esquematiza en la figura 16 el cual consistió en un arreglo de placas paralelas aislantes que en el centro cuentan con electrodos de cobre de  $1 \text{ cm}^2$  de área, en donde se colocó 1 g de mesopartículas poliméricas y se presionaron con un tornillo para fijar la muestra de polímero. Posteriormente, se introdujeron a una caja de aluminio recubierta con plástico para aislar las placas del ambiente exterior y se colocó sobre una plancha, con ayuda de dos multímetros se midió la resistencia y la temperatura en cada aumento de grado centígrado desde  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ , posteriormente se apagó la plancha y se midió nuevamente resistencia y temperatura en el enfriamiento desde  $100^\circ\text{C}$  hasta  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .



Figura 16. Esquema de celda de monitoreo de la resistencia de las mesopartículas poliméricas en función de la temperatura.

#### 7.4 Cultivo celular

Se proliferó la línea celular de origen neuronal N1E-115 (neuroblastoma de rata, ATCC) en cajas Corning de 75 cm<sup>2</sup> con medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM, Gibco) sin piruvato, suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco), 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco) y 1% Glutamax (glutamina, Gibco), durante 15 días; al llegar a confluencia, las células se despegaron con solución PUCK'S (Anexo 1), se centrifugaron durante 5 min a 800 rpm para eliminar los restos de medio de cultivo y solución PUCK'S y se conservaron en crioviales con 500,000 células en 1 mL de SFB con 5% de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma) en nitrógeno líquido y también fueron utilizadas para ensayos de diferenciación (figura 17).

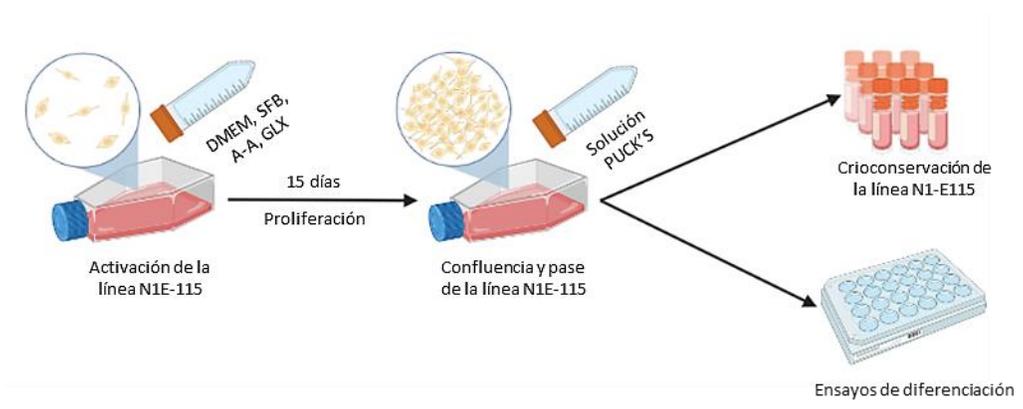


Figura 17. Esquema de proliferación y conservación de la línea N1E-115.

### 7.4.1 Ensayo de diferenciación

El proceso para el ensayo de diferenciación se esquematiza en la figura 18; se llevó a cabo en una placa de 24 pozos con cubreobjetos de 14 mm de diámetro previamente esterilizados (Anexo 2), en donde se sembraron 8000 células en cada pozo con un volumen de 300  $\mu$ L de DMEM suplementado por pozo y se incubaron durante 2 h, esto permitió que las células se adhirieran a los cubreobjetos. Posteriormente, se les añadió a 9 pozos una suspensión de 15  $\mu$ g de mesopartículas de polímero de PPy-I y a otros 9 pozos de igual forma, se les añadieron 15  $\mu$ g de mesopartículas de polímero de PAI-I previamente esterilizados y lavados (Anexo 3) y medio suplementado sin suero en un volumen de 400  $\mu$ L en cada pozo; luego se incubaron durante 2 h para que el polímero se adhiriera a las células. Finalmente se cambió el medio de cultivo a cada pozo, incluyendo el control, por medio de diferenciación, que consiste en medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM, Gibco) sin piruvato, 2% de Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco), 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco), 1% Glutamax (glutamina, Gibco) y 1.25% de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma) y se corrió el ensayo de diferenciación a diferentes tiempos, 72 h, 96 h y 120 h. Al concluir cada tiempo señalado se retiraron 3 cubreobjetos con cada tratamiento de cada polímero y control y se les realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 1X (Anexo 4), y posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA, Sigma) durante 10 min y se mantuvieron en solución PBS 1X a 4°C. Se realizaron 3 ensayos independientes con fines estadísticos.

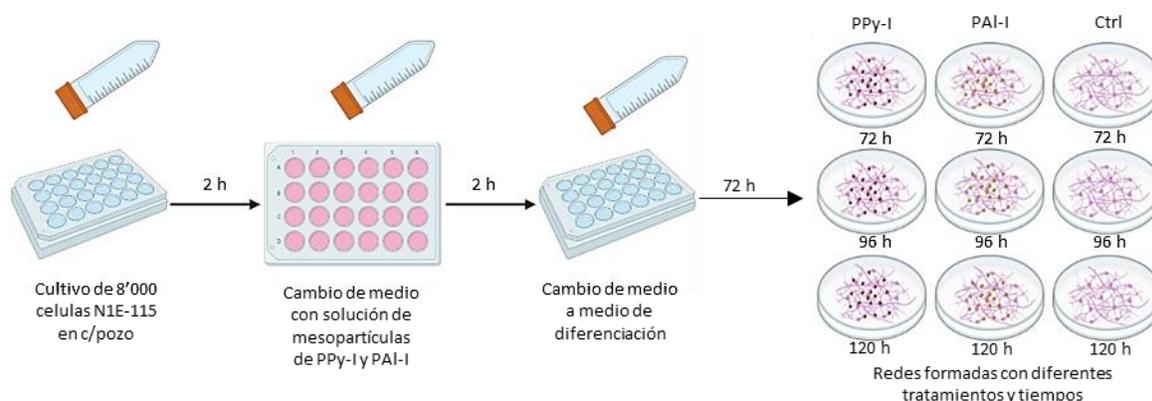


Figura 18. Esquema de ensayo de diferenciación de la línea N1E-115 con tratamiento de mesopartículas de polímeros de PPy-I y PAI-I.

## 7.5 Inmunofluorescencia

### 7.5.1 Marcaje para determinación de la diferenciación neuronal

Para el marcaje de las células diferenciadas sobre los recubrimientos de las películas se siguió el procedimiento del trabajo previo de maestría descrito en la tesis titulada “Efecto de polímeros aminados sintetizados por plasma sobre la diferenciación neuronal en un modelo *in vitro*”[88], el cual consistió en permeabilizar las células N1E-115 con Tritón al 0.1% durante 30 min, en seguida se agregó 40 µl de suero normal de cabra (SNC) al 5% a cada uno de las redes formadas sobre los portaobjetos durante 10 min. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario βIII-Tubulina en una concentración 1:3000 durante 12 h a temperatura ambiente y luego se agregó el anticuerpo secundario (Alexa 488 anti-mouse) que se incubó 2 h, pasado el tiempo, se marcó con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) y finalmente se fijaron incluyéndose en Vectashield. Entre cada paso se realizaron 3 lavados con PBS 1X (Apéndice 4) durante 10 min para retirar el exceso del reactivo anterior.

### 7.5.2 Marcaje para la identificación de sinapsis

Para la identificación de vesículas presinápticas y postsinápticas se realizó una inmunofluorescencia con doble marcaje con el fin de marcar el cuerpo de las neuronas y las vesículas; los marcadores utilizados para el proceso se describen en la tabla 5. El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Lavados de las células: se hicieron 3 lavados con PBS 1X (Apéndice 4) durante 10 min cada uno para retirar el exceso de PFA 4% de las células.
2. Bloqueo y permeabilización de las células: se hizo con una solución con Tritón al 0.2% y Suero Normal de Cabra al 10%, durante 1 hora.
3. Lavado de las células: se hicieron 3 lavados con PBS 1X durante 10 min cada uno.
4. Marcaje con anticuerpos primarios: se utilizó una solución de PSD en una concentración 1:100 y Sinapsina (SYP) en una concentración 1:450 y se dejó incubar durante toda la noche a temperatura ambiente.
5. Lavado de las células: se hicieron 3 lavados con PBS 1X durante 10 min cada uno.

6. Anticuerpos secundarios: Alexa 488 anti-rabbit en una concentración 1:300 y Alexa 594 anti-mouse en una concentración 1:300, durante 2 h.
7. Lavado de células: se hicieron 3 lavados con PBS 1X durante 10 min cada uno.
8. Bloqueo: se realizó de nuevo un bloqueo con Suero Normal de Cabra al 10% durante 30 min.
9. Lavado de células: se hicieron 3 lavados con PBS 1X durante 10 min cada uno.
10. Anticuerpo primario: En seguida se colocó el anticuerpo primario  $\beta$ III-Tubulina-rabbit en una concentración 1:600, durante 1 hora.
11. Lavado de células: se hicieron 3 lavados con PBS 1X durante 10 min cada uno.
12. Anticuerpo secundario: Dylight 405 anti-rabbit en una concentración 1:50, durante 1 hora.
13. Lavado de células: se hicieron 3 lavados con PBS 1X durante 10 min cada uno.
14. Marcaje de núcleos: se incubó con DAPI durante 10 min.
15. Lavado de células: Se hicieron 3 lavados con PBS 1X durante 10 min cada uno.
16. Montaje: se incluyeron los cubreobjetos en vectashield, se montaron sobre un portaobjetos y se sellaron con barniz de uñas transparente.

Todas las soluciones se prepararon con PBS 1X. El proceso anterior se esquematiza en la figura 19.

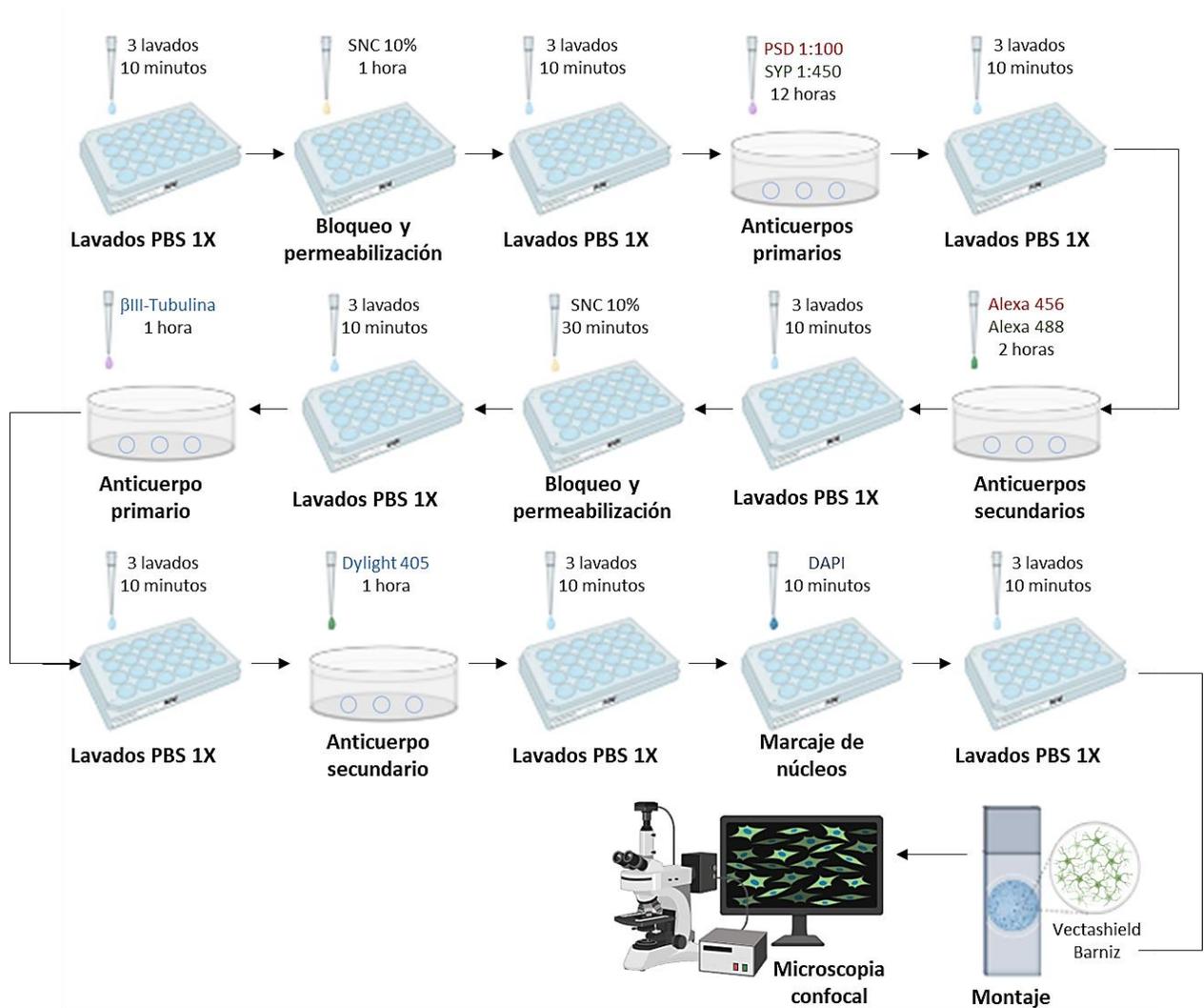


Figura 19. Esquema de marcaje mediante inmunofluorescencia de proteínas de diferenciación y sinaptogénesis de los cultivos de N1E-115 tratados con mesopartículas de PPy-I y PAI-I.

REACTIVO	ESPECIE	CONCENTRACIÓN	CASA COMERCIAL
Suero Normal	Caballo	10%	Biowest
Sinapsina	Conejo	1:450	Synaptic Systems
PSD	Ratón	1:150	Synaptic Systems
βIII-Tubulina	Ratón	1:600	Invitrogen
Alexa 488	Conejo	1:300	Invitrogen
Alexa 594	Ratón	1:300	Molecular Probes
Dylight 405	Conejo	1:50	Abcam
DAPI	--	1 µg/mL	Abcam

Tabla 5. Especificaciones de reactivos para inmunofluorescencia del ensayo de marcaje de proteínas.

## 7.6 Determinación del índice de diferenciación neuronal

Para calcular un índice de diferenciación neuronal considerando la complejidad de la red y el número de núcleos por cada red formada sobre los distintos materiales, a cada micrografía se le resta el canal azul (DAPI, núcleos) del canal verde ( $\beta$ -III Tubulina, citoesqueleto). Posteriormente, se analizaron las complejidades de las redes neuronales formadas sobre los materiales (canal verde) utilizando el programa FIJI con la herramienta de análisis de Sholl, con la que se obtuvo la suma de los cruces de cada neurita con los círculos concéntricos de cada arco en toda el área de las neuritas de cada imagen. A continuación, se contó el número de núcleos en el canal azul de cada imagen con el plugin ITCN del mismo programa FIJI (Figura 20). Finalmente se analizaron 15 imágenes por material, se determinó un índice de diferenciación y se realizó un análisis de ANOVA y prueba de Tukey para diferencias significativas.

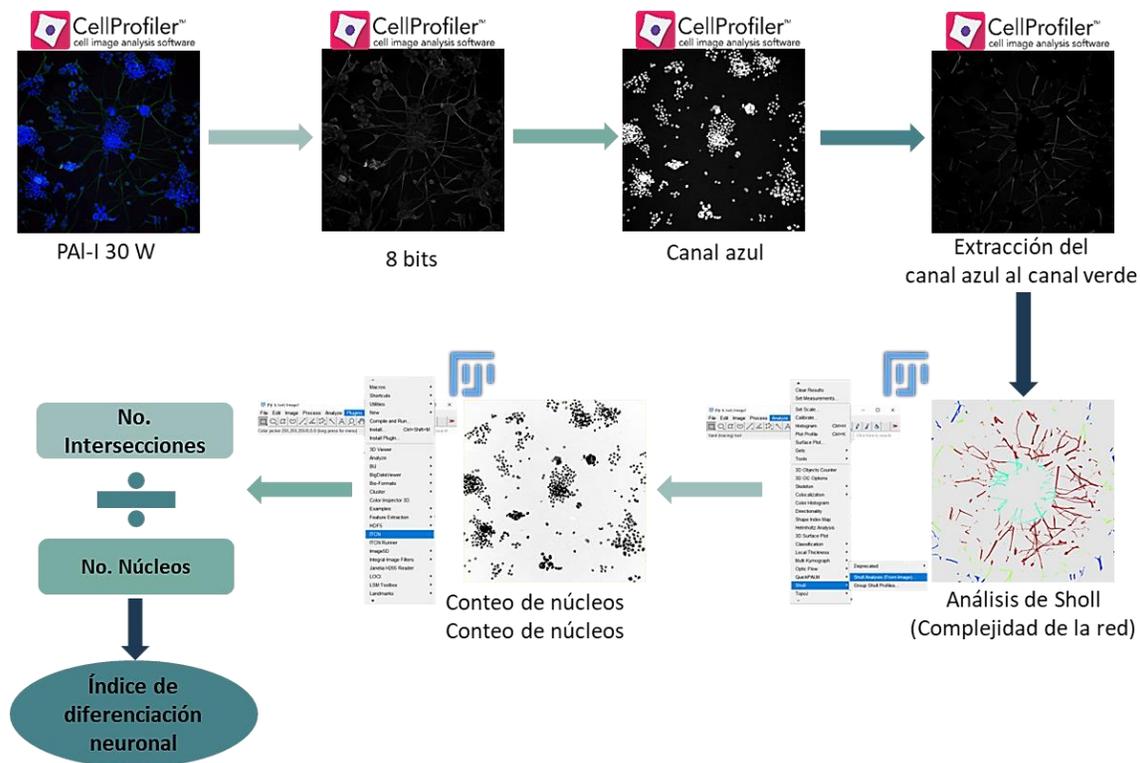


Figura 20. Esquema del procesamiento de imágenes para la obtención del índice de diferenciación neuronal mediante el conteo de intersecciones de neuritas y número de núcleos.

## 7.7 Identificación de sitios sinápticos en las redes neuronales

Para la identificación de sitios sinápticos se convirtieron las micrografía obtenidas por microscopía confocal en imágenes de 8 bits y separaron los canales verdes (sinapsina, presináptico), rojo (PSD 95, postsináptico, autofluorescencia de polímeros) y azul (cuerpo celular neuronal) y se les realizó un ajuste de contraste para resaltar los puntos correspondientes a vesículas y núcleos, posteriormente con ayuda del plug in ITCN del programa FIJI se realizó un conteo de todos estos puntos en las imágenes. Se hizo una ponderación entre el número de vesículas de sinapsina (canal verde) con el número de núcleos de las células neuronales (canal azul) para la obtención de una relación entre la expresión de este marcador presináptico y la cantidad de células en las redes neuronales formadas lo que nos entrega la densidad de vesículas sinápticas por célula y por cada tratamiento de material.

(PPy-I y PAI-I) y de igual forma se realizó este procedimiento para la identificación de la densidad postsináptica marcada con PDS 95 (canal rojo) como se muestra en el esquema de la figura 21. Finalmente se analizaron 15 imágenes por cada material y realizó una prueba ANOVA con un análisis de Tukey para diferencias significativas.

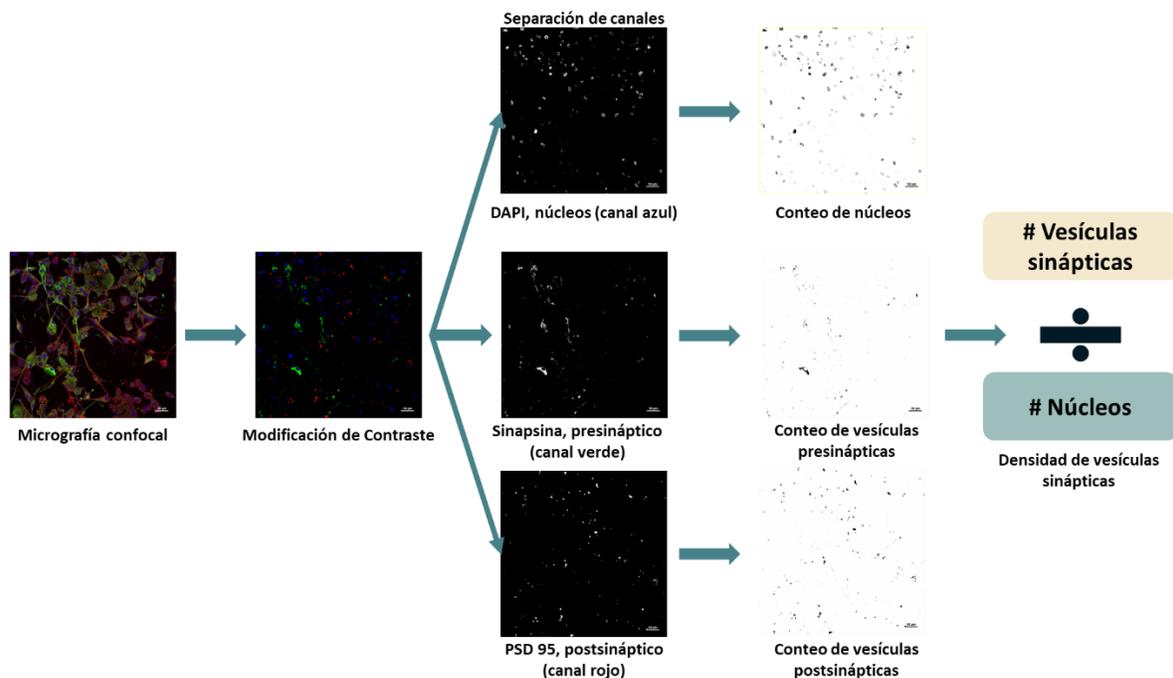


Figura 21. Esquema del procesamiento de imágenes para la obtención de la densidad de vesículas sinápticas sobre las redes neuronales de N1E-115 tratadas con los polímeros PPy-I y PAI-I.

## 8. Resultados y discusión

### 8.1 Morfología y distribución de diámetro de partícula

Las partículas de los polímeros de PPy-I 20 W y PAI-I 30 W resultaron amorfas agrupadas en pequeños cúmulos, o aglomerados (figura 22 a-b); también se puede observar el material en forma de pequeñas laminas como se observa en la figura 22-a. El tamaño de partículas del material de PPy-I resultó con un intervalo de 1.4-17  $\mu\text{m}$  con una media armónica de 4.23  $\mu\text{m}$  (figura 22-c), en el caso del material de PAI-I 30 W resultó con intervalo de 0.8-12.8  $\mu\text{m}$  con una media armónica de 3.52  $\mu\text{m}$  (figura 22-d) ligeramente más pequeño que el material de PPy-I.

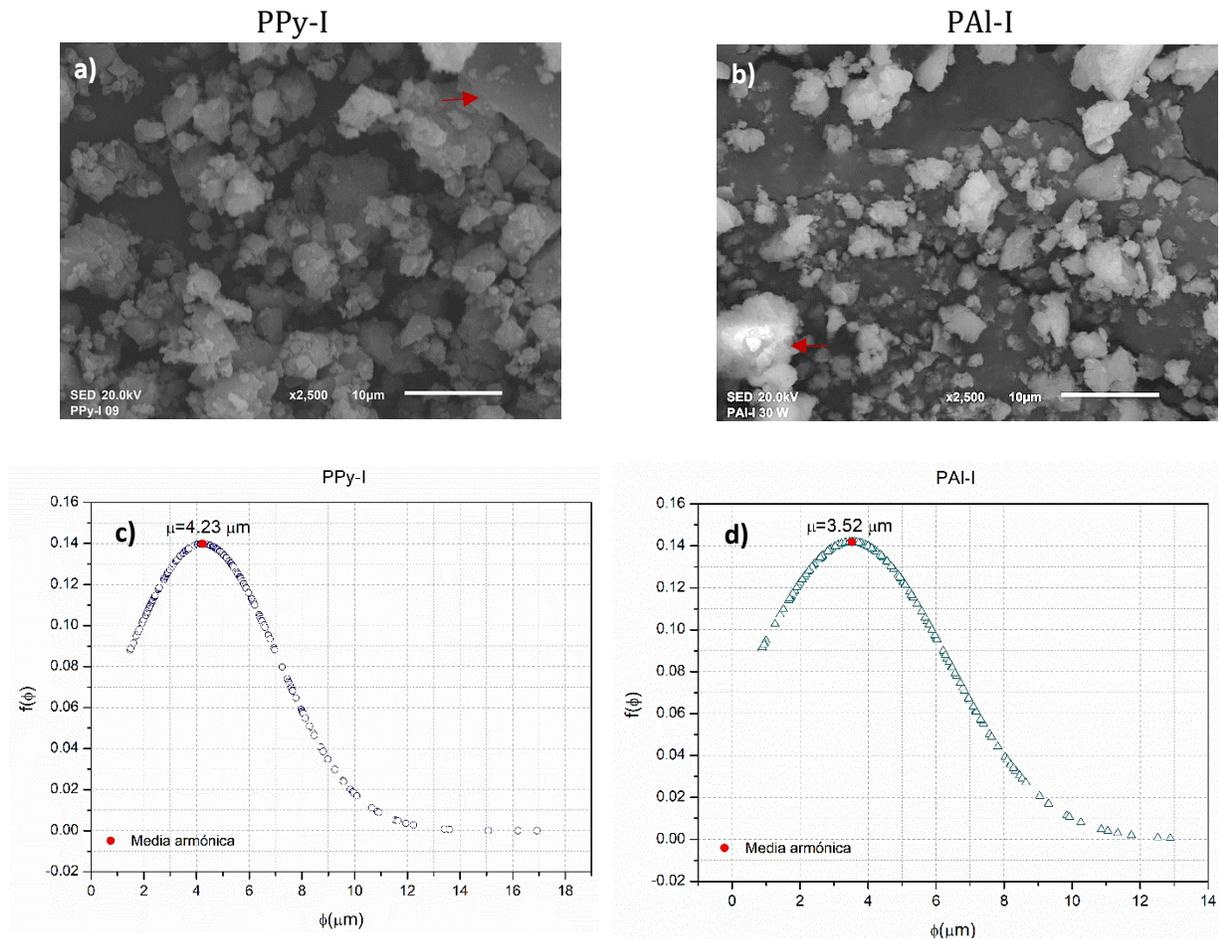


Figura 22. Morfología de las mesopartículas. Micrografías mediante SEM, a) PPy-I 20 W, b) PAI-I 30 W.

Las partículas de los materiales se clasifican según su tamaño, siendo nanopartículas las que se encuentran en un intervalo de 1-100 nm, micropartículas las que se encuentran en un intervalo de 1-1000  $\mu\text{m}$  y mesopartículas, las cuales se encuentran en un intervalo intermedio entre las nanopartículas y las micropartículas, localizándose en un intervalo de 10 nm -0.1  $\mu\text{m}$ . De acuerdo con esta clasificación, las partículas de ambos materiales PPy-I y PAI-I, se clasifican como micropartículas. Las micropartículas de biomateriales se diseñan y sintetizan para aplicaciones de ingeniería de tejidos como andamios tridimensionales para el crecimiento celular, y el tamaño se ajusta dependiendo del tipo celular. El soma de las células N1E-115 tiene un tamaño de 10-20  $\mu\text{m}$ , por lo tanto, el tamaño de las partículas de PPy-I y PAI-I resultó de entre 1/5 y 1/3 respectivamente, del diámetro del soma de la línea celular, lo que las volvió adecuadas para adherirse al soma y tener por lo menos una partícula de polímero en cada soma del cultivo celular de N1E-115 como se muestra más adelante en la figura 29.

En el soma de las células nerviosas se producen varias reacciones bioquímicas de regulación y control para su supervivencia de éstas. Cuando el soma de una célula nerviosa es estimulado por una molécula aminada (como un neurotransmisor), puede desencadenar una serie de eventos eléctricos gracias a una cascada de señalización, estos eventos comienzan con el reconocimiento de la molécula para posteriormente provocar la apertura de canales iónicos específicos para generar un potencial de membrana, como su despolarización, cuando la despolarización alcanza un umbral crítico se genera un potencial de acción, el cual es una rápida inversión en el potencial de membrana que viaja a lo largo del axón de la neurona, este potencial de acción generado en el soma se propaga a lo largo del axón hacia las terminales axónicas de esta neurona a la que se le conoce como neurona presináptica y provoca la liberación de neurotransmisores que se unen a la siguiente neurona que se conoce como neurona postsináptica para iniciar el proceso sináptico en esa célula que se ira propagando a través del sistema nervioso [94]–[96][56].

Este proceso de iniciación de potencial de acción mediante una molécula aminada propone que es posible iniciar estímulos eléctricos que desencadenaran reacciones de proliferación, diferenciación, entre otras, en las células nerviosas mediante las moléculas adecuadas que sean reconocidas por la membrana del soma celular [97][98].

## 8.2 Grupos funcionales de los materiales

La espectroscopía Infrarroja por ATR muestra los espectros de PPy-I sintetizado a 20 W (figura 23-a) y PAI-I sintetizado a 30 W (figura 23-b) en un intervalo de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$  a diferentes tiempos de enfriamiento del reactor. Las bandas en  $3180\text{ cm}^{-1}$  y  $3205\text{ cm}^{-1}$  indican la presencia de enlaces -N-H correspondientes a grupos funcionales amina primaria y secundaria, imina e imida [99], [100] las cuales se observan en ambos materiales, la morfología correspondiente al pico de absorción de los grupos -OH en el IR es un pico ancho en el mismo intervalo que -N-H el cual se observa en mayor proporción conforme incrementa el tiempo de enfriamiento del reactor. En  $2950\text{ cm}^{-1}$  se encuentran los enlaces -C-H pertenecientes a estructuras alifáticas, que se puede observar más definida en los polímeros con menos tiempo de enfriamiento en el reactor, así como más definida hasta en 24 h en el polímero de PPy-I; esto debido a la presencia de más dobles enlaces ya presentes en el monómero del pirrol, lo cual sugiere mayor ruptura del anillo de pirrol en PPy-I y en el caso de PAI-I 30 W mayor sustitución del doble enlace del monómero de alilamina [100], [101], aunque se ven enmascaradas estas señales conforme se incrementa el tiempo de enfriamiento debido a la mayor presencia de -OH. En  $2180\text{ cm}^{-1}$  y  $2200\text{ cm}^{-1}$ , se observan bandas correspondientes a los grupos de triple enlace  $\text{C}\equiv\text{C}$  y  $\text{N}\equiv\text{C}$  no conjugados [99] los cuales se encuentran en mayor proporción en el polímero de PPy-I, lo cual sugiere mayor deshidrogenación en éste. En  $1610\text{ cm}^{-1}$  y  $1623\text{ cm}^{-1}$  se observan bandas correspondientes a dobles enlaces  $\text{C}=\text{C}$  y  $\text{C}=\text{N}$ , esta señal es la más intensa en ambos materiales. Las señales en  $1400\text{ cm}^{-1}$  corresponden a enlaces C-H y =C-H de alquenos del anillo del pirrol y la señal en  $1454\text{ cm}^{-1}$  de PAI-I corresponde al enlace -C-N. La señal de  $1000\text{ cm}^{-1}$  corresponde a -C-H del PPy-I, así como la señal en  $880\text{ cm}^{-1}$  de PAI-I únicamente presente en la película con 12 h de enfriamiento. La señal  $732\text{ cm}^{-1}$  pertenece a grupos -C-H y C-O estos se deben a la creación de enlaces múltiples y/o la adición de átomos de oxígeno debido a la oxidación atmosférica [101].

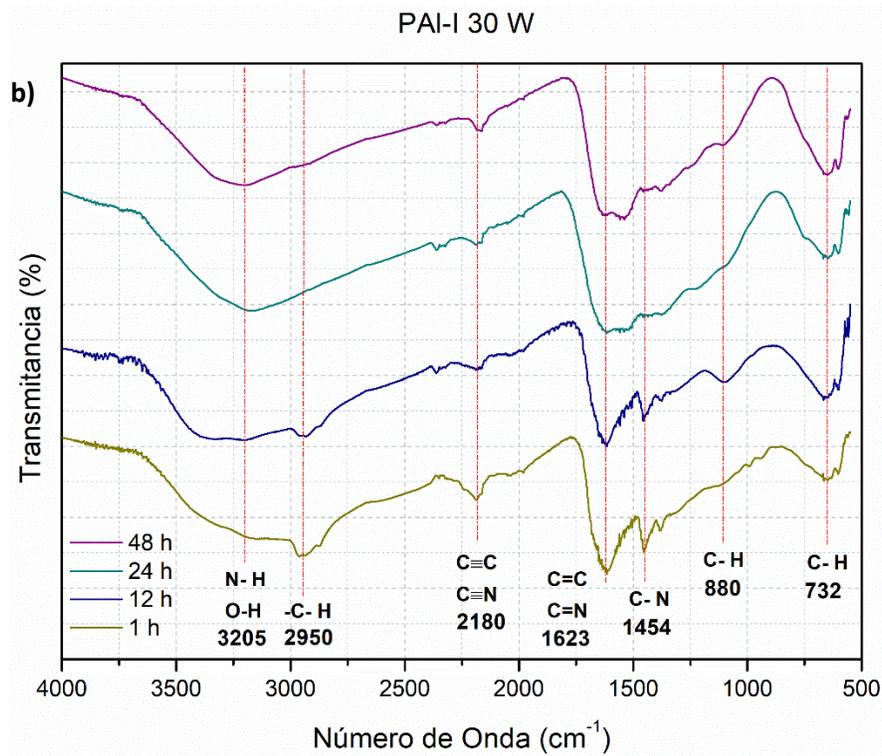
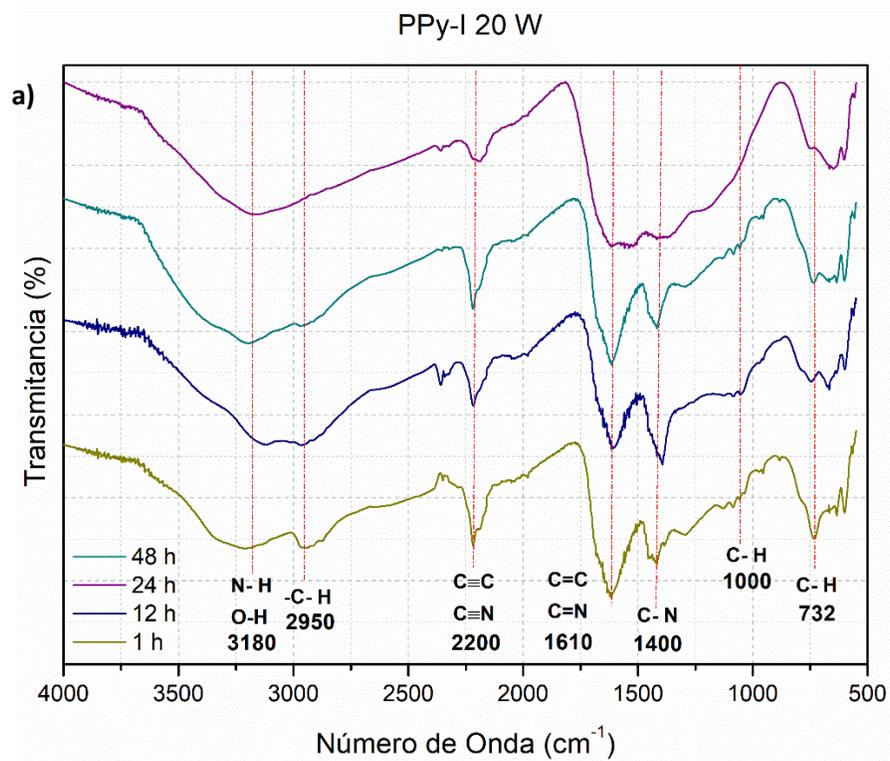


Figura 23. Espectros de IR-ATR de las películas de a) PPy-I y b) PAI-I a diferentes tiempos de enfriamiento de reactor.

### 8.3 Análisis elemental

El análisis elemental de los materiales, tanto en los recubrimientos como en las micropartículas poliméricas, se obtuvo mediante XPS (figura 24). En el caso de los recubrimientos, adicional al análisis superficial, se realizaron 3 devastaciones de 30, 60 y 90 segundos sobre los polímeros, con el fin de obtener el análisis en varias profundidades de los polímeros. El grosor promedio de las películas poliméricas depositadas sobre los portaobjetos resultó de 4.1  $\mu\text{m}$ , 1.8  $\mu\text{m}$ , 6.1  $\mu\text{m}$  para PPy-I 20 W, PPy-I 30 W y PPy-I 40 W respectivamente, para PAI-I fue de 1.3  $\mu\text{m}$  en 20 W, 1.6  $\mu\text{m}$  en 30 W y 4.0  $\mu\text{m}$  en 40 W y para el copolímero de PPy/PAI-I resultó de 5.4  $\mu\text{m}$ , 9.2  $\mu\text{m}$  y 2.0  $\mu\text{m}$  para 20 W, 30 W y 40 W respectivamente. En la tabla 6 se muestra el análisis elemental de estos materiales en la superficie a 0 segundos de devastación.

MATERIAL	PORCENTAJE ATÓMICO ELEMENTAL DE LOS RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS (%)			
	C1s	N1s	O1s	Otros
PPy-I 20 W	72.97	10.74	16.29	0.97
PPy-I 30 W	71.01	9.8	13.99	5.2
PPy-I 40 W	69.05	11.36	14.67	4.92
PAI-I 20 W	84.92	9.38	5.7	0
PAI-I 30 W	83.53	10.18	6.3	0
PAI-I 40 W	71.25	10.9	12.26	5.59
PPy/PAI-I 20 W	74.03	10.08	11.79	4.1
PPy/PAI-I 30 W	59.91	2.69	22.28	15.12
PPy/PAI-I 40 W	74.17	8.5	13.8	3.53

Tabla 6. Porcentaje atómico mediante XPS de la superficie de los recubrimientos poliméricos sintetizados a diferentes potencias en 0 segundos de devastación.

En el caso de las devastaciones, en general se encuentra mayor porcentaje de carbono conforme se incrementa la devastación, es decir, en la parte más superficial de los polímeros se encuentra mayor cantidad de porcentaje de nitrógeno y oxígeno (tabla 7).

MATERIAL	PORCENTAJE ATÓMICO ELEMENTAL DE LOS RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS (%)								
	Devastación 30 segundos			Devastación 60 segundos			Devastación 90 segundos		
	C1s	N1s	O1s	C1s	N1s	O1s	C1s	N1s	O1s
PPy-I 20 W	81.89	12.72	5.38	83.47	11.01	4.19	84.8	11.01	4.19
PPy-I 30 W	83.06	12.06	4.88	84.74	11.24	4.02	85.55	10.9	3.55
PPy-I 40 W	82.7	12.72	4.47	84.42	11.85	3.73	85.76	10.86	3.37
PAI-I 20 W	83.1	12.22	4.37	82.86	12.26	4.3	83.68	12.03	4.29
PAI-I 30 W	83.6	12.41	3.99	84.68	11.77	3.55	84.94	11.17	3.88
PAI-I 40 W	79.05	12.78	5.7	82.5	12.12	4.56	83.62	12.01	4.15
PPy/PAI-I 20 W	83.42	11.49	4.28	85.58	10.89	3.52	86.06	10.98	2.82
PPy/PAI-I 30 W	62.48	8.06	16.7	70.52	9.71	11.43	75.41	10.37	8.24
PPy/PAI-I 40 W	81.31	12.76	4.53	84.8	11.06	4.14	85.01	11.29	3.71

Tabla 7. Porcentaje atómico mediante XPS de la superficie de los recubrimientos poliméricos sintetizados a diferentes potencias y diferentes tiempos de devastación, 30, 60 y 90 segundos.

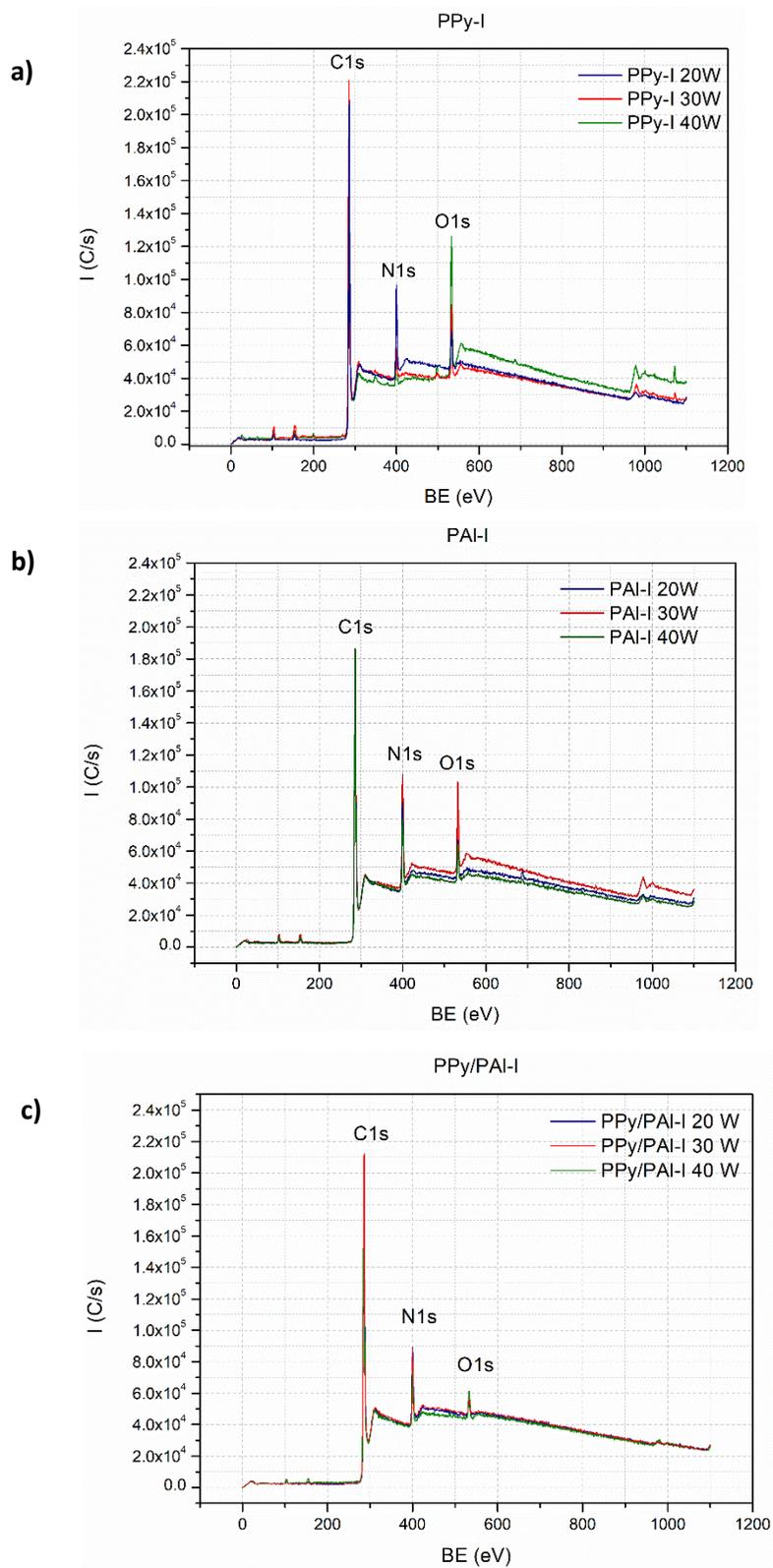


Figura 24. Espectros mediante XPS de los polímeros. a) PPy-I, b) PAI-I, c) PPy/PAI-I.

En cuanto a las mesopartículas, también se realizó el análisis elemental superficial mediante XPS y haciendo devastaciones a 30, 60 y 90 segundos (figura 25). En la tabla 8 se muestran los porcentajes atómicos superficiales en donde se puede observar que en comparación con los recubrimientos, en las mesopartículas es identificable el iodo, que se debe a una mayor cantidad de este elemento presente en esta forma de polímeros, además las cantidades de nitrógeno son mayores y el porcentaje de oxígeno es mucho menor que en los recubrimientos, lo cual se debe al SiO<sub>2</sub> del vidrio en donde se colocan los polímeros en forma de recubrimiento, por lo tanto se identifica mayor cantidad de oxígeno.

MATERIAL	PORCENTAJE ATÓMICO ELEMENTAL DE LAS MESOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS (%)			
	C1s	N1s	O1s	I3d
PPy-I 20 W	75.71	15.02	6.45	2.81
PAI-I 30 W	77.48	16.46	4.04	2.02

Tabla 8. Porcentaje atómico mediante XPS de la superficie de las mesopartículas poliméricas de PPy-I 20 W y PAI-I 30 W en 0 segundos de devastación.

La tabla 9 muestra el análisis elemental de las mesopartículas poliméricas a diferentes tiempos de devastación, se puede observar que conforme más superficial es el análisis, disminuye el porcentaje de carbono, aumenta el porcentaje de nitrógeno y oxígeno y en general disminuye el porcentaje de iodo, con excepción del polímero PPy-I 20 W a 90 segundos de devastación, estas tendencias se observan en ambos polímeros. El incremento en los elementos N y O en la superficie de acuerdo con los espectros de IR mostrados anteriormente, sugieren que se puede deber a una mayor exposición al ambiente residual (aire en el reactor) durante la síntesis.

MATERIAL	PORCENTAJE ATÓMICO ELEMENTAL DE LAS MESOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS (%)											
	Devastación 30 segundos				Devastación 60 segundos				Devastación 90 segundos			
	C1s	N1s	O1s	I1s	C1s	N1s	O1s	I1s	C1s	N1s	O1s	I1s
PPy-I 20 W	82.32	14.2	2.89	0.59	84.29	12.92	2.22	0.57	85.52	11.75	2.14	2.26
PAI-I 30 W	82.96	12.67	2.56	1.8	84.98	11.14	2.2	1.68	86.3	10.15	1.98	1.57

Tabla 9. Porcentaje atómico mediante XPS de las mesopartículas de PPy-I 20 W y PAI-I 30 W a diferentes tiempos de devastación 30, 60 y 90 segundos.

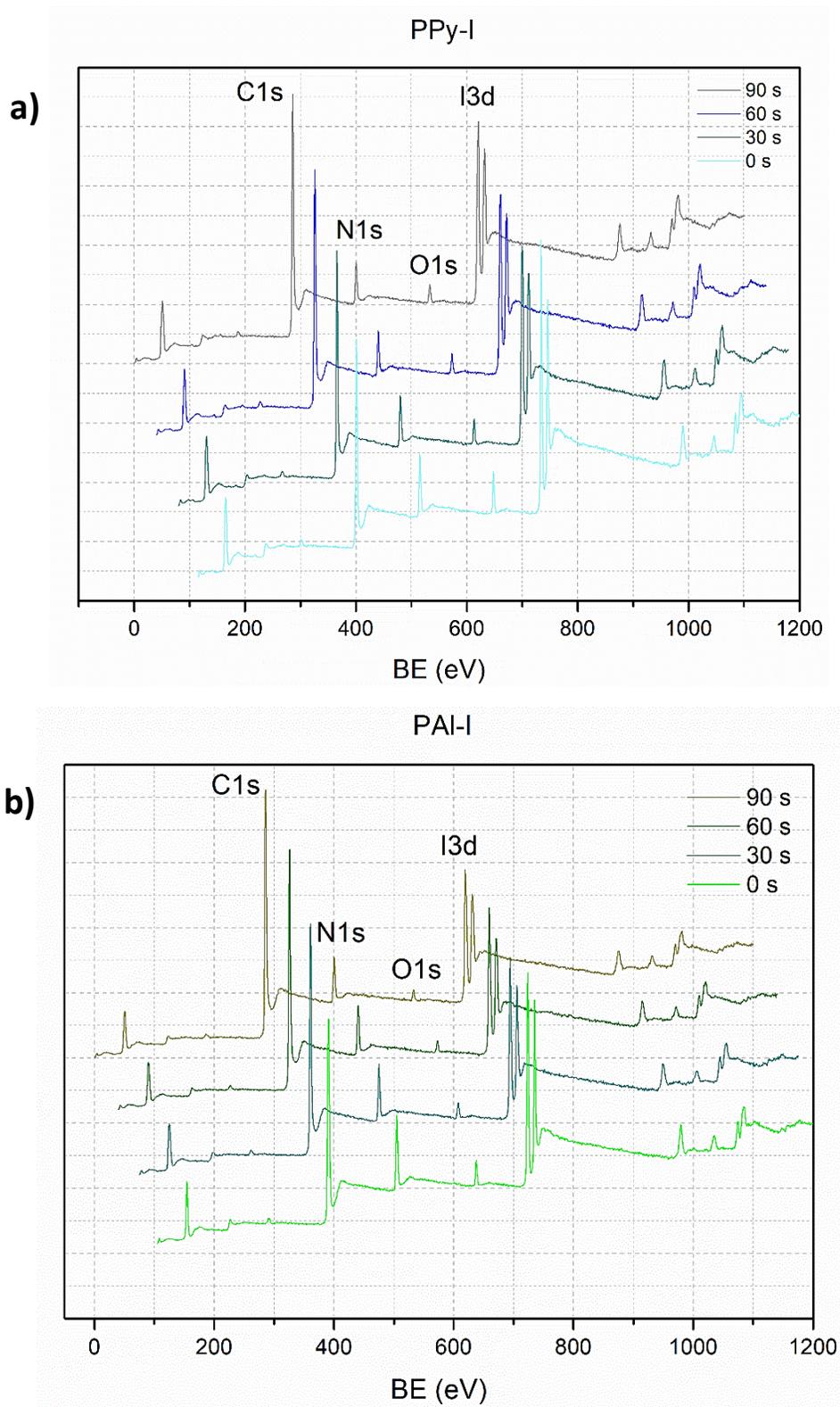


Figura 25. Espectros mediante XPS de mesopartículas de polímeros a 0, 30, 60 y 90 segundos. a) PPy-I y b) PAI-I.

#### 8.4 Estados químicos de los materiales poliméricos

La deconvolución de los estados químicos pertenecientes al N1s de todos los materiales como recubrimientos se muestran en la figura 26. Las deconvoluciones se realizaron con 4 o 5 curvas Gaussianas, en donde a cada una, de acuerdo con su porcentaje de área, se le asoció un porcentaje de estado químico de acuerdo con la energía de formación calculada.

La primera curva en donde se muestra que el estado C-NH-H que corresponde a una amina primaria con energía de enlace de 11.04 eV que se encuentra presente en todos los materiales, incluso en los materiales de PPy-I en donde no hay aminas primarias en el monómero inicial. El siguiente estado químico está formado por los enlaces NH=C que tiene una energía de enlace de 10.38 eV y se encuentra presente en todos los polímeros y en mayor porcentaje en el polímero de PAI-I 30 W; el estado químico correspondiente a una amina secundaria representado por C-NH-C con una energía de enlace de 10.08 eV, resultó el estado con mayor porcentaje presente en los materiales poliméricos. Otro estado químico presente en todos los polímeros fue N=C con una energía de enlace de 9.42 eV, y el último estado químico presente en los materiales fue el estado oxidado de C-N=O con una energía de enlace de 8.02 eV, excepto en PPy-I 20 W, 30 W y PPy/PAI-I 40 W.

Se destaca la presencia del grupo funcional amina primaria presente en los polímeros de PPy-I debido a que los porcentajes presentes en los materiales sintetizados en las diferentes potencias son similares a los porcentajes de este grupo presentes en los polímeros de PAI-I, que tiene una amina primaria presente desde su monómero, esto debido a que durante la síntesis por plasma los materiales cambian sus propiedades fisicoquímicas y se observan grupos funcionales y estados químicos que no se encuentran presentes en el monómero inicial debido a la deshidrogenación de los monómeros y los compuestos intermedios durante la síntesis [102]–[104].

El porcentaje de los estados químicos mostrados en las gráficas de la figura 26 se muestra en la siguiente tabla.

Estado químico	PORCENTAJE DE ESTADOS QUÍMICOS DE LOS RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS (%)								
	PPy-I 20 W	PPy-I 30 W	PPy-I 40 W	PAI-I 20 W	PAI-I 30 W	PAI-I 40 W	PPy/PAI-I 20 W	PPy/PAI-I 30 W	PPy/PAI-I 40 W
C-NH-H	3.3%	3.5%	2.9%	4.3%	6.7%	2.8%	4.3%	5.8%	5%
NH=C	26.8%	24.5%	24.6%	22.6%	32.2%	25.4%	26.8 %	25.7%	19%
C-NH-C	49.9%	56.9%	41.2%	54.9%	32.2%	42.2%	46.8%	44.4%	60.1%
C≡N	20%	15.1%	23%	13.8%	25.1%	25.2%	17.6%	18.6%	15.8%
C-N=O	--	--	3.3%	4.5%	3.7%	4.5%	4.5%	5.4%	--

Tabla 10. Porcentaje de los estados químicos presentes en los recubrimientos poliméricos mediante XPS.

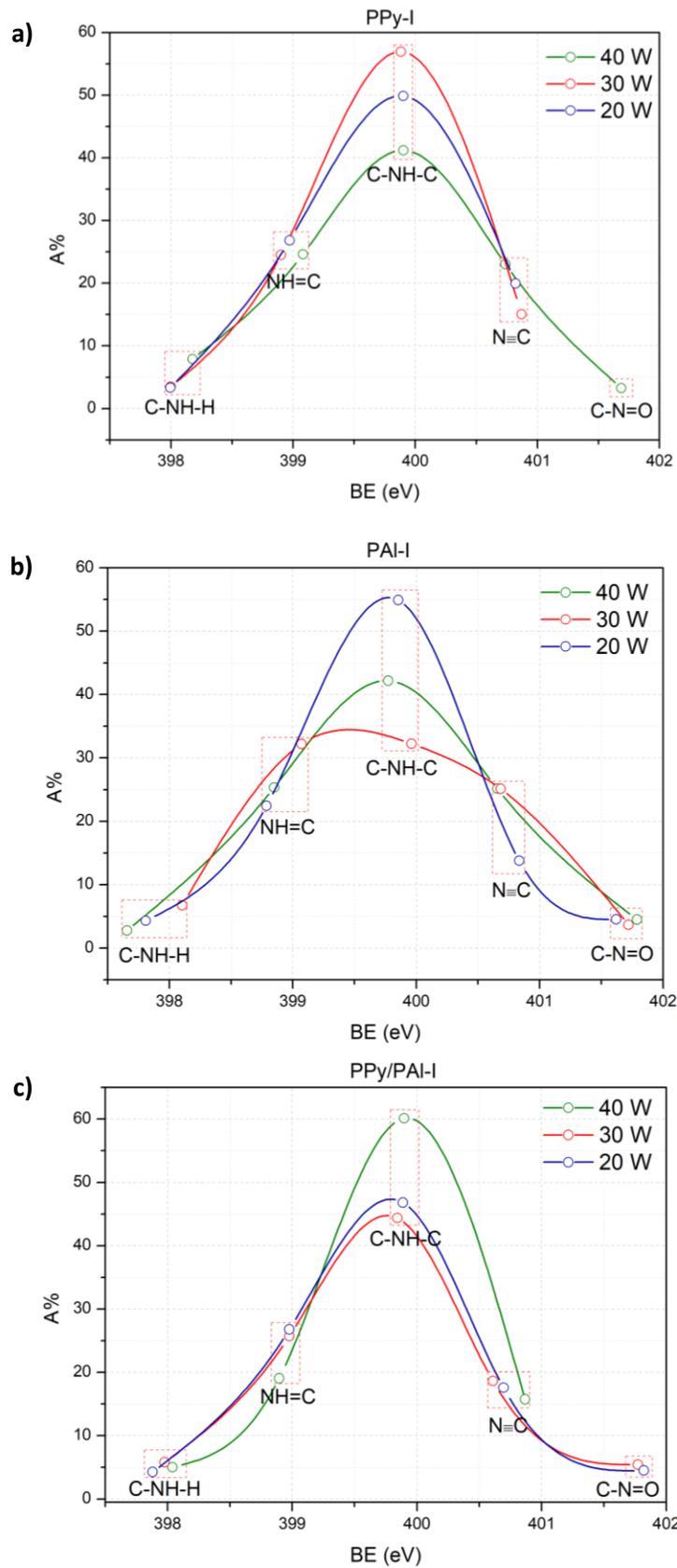


Figura 26. Estados químicos mediante XPS. a) PPy-I 20, 30 y 40 W. b) PAI-I 20, 30 y 40 W. c) PPy/PAI-I 20, 30, y 40.

## 8.5 Porcentaje de aminas y grupos -OH

Los porcentajes de aminas primarias, secundarias y grupos -OH se estimaron utilizando la técnica de derivación química con los reactivos de TFBA y TFAA.

La tabla 10 muestra que los materiales con los mayores porcentajes de aminas primarias estimados por derivación con TFBA fueron las muestras de PAI-I preparadas a 20 y 40 W con  $0.85\pm 0.12\%$  y  $1.30\pm 0.25\%$  respectivamente, lo que se debió a que el monómero de alilamina tiene una amina primaria en su estructura; sin embargo, también había aminas primarias en los polímeros de PPy-I en los que el monómero de pirrol contenía sólo una amina secundaria, esto se debe a la naturaleza de la polimerización por plasma, en la que se generan polímeros reticulados por escisión de los anillos de pirrol y posterior polimerización en diferentes sitios de monómeros que se hidrogenaron para formar aminas primarias.

POLIMEROS	COMPOSICIÓN ELEMENTAL ANTES Y DESPUÉS DE LA DERIVACIÓN QUÍMICA											[NH <sub>2</sub> ]/[C] (%) (TFBA)	[NH <sub>2</sub> +NH+OH]/ [C] (%) (TFAA)
	POLIMEROS			DERIVACIÓN TFBA				DERIVACIÓN TFAA					
	[C]%	[N]%	[O]%	[C]%	[N]%	[O]%	[F]%	[C]%	[N]%	[O]%	[F]%		
PPy-I 20 W	83.4	11.8	4.8	76.0	11.0	8.0	1.3	83.2	9.2	3.5	4.1	0.57±0.09	1.68±0.07
PPy-I 30 W	85.5	10.9	3.5	80.8	8.6	5.2	5.2	81.3	11.4	4.2	1.5	0.58±0.11	1.66±0.09
PPy-I 40 W	84.3	11.8	3.9	78.7	11.6	5.9	1.5	75.7	9.4	8.5	3.6	0.59±0.12	1.64±0.13
PAI-I 20 W	83.2	12.2	4.3	72.2	11.5	9.3	2.0	75.9	10.8	7.3	4.6	0.85±0.12	2.12±0.20
PAI-I 30 W	84.9	11.1	3.8	79.4	10	5.2	4.1	79.0	13.1	5.2	1.8	0.28±0.10	1.52±0.20
PAI-I 40 W	81.7	12.3	4.8	74.8	10.9	7.5	2.8	79.3	6.5	5.3	8.3	1.30±0.25	2.10±0.22
PPy/PAI-I 20 W	85.0	11.1	3.5	79.3	11.5	5.4	1.3	76.8	9.3	6.6	5.2	0.49±0.04	1.62±0.11
PPy/PAI-I 30 W	75.4	10.3	8.2	85.0	8.4	3.5	3.0	81.4	9.7	3.3	3.2	0.60±0.03	1.72±0.15
PPy/PAI-I 40 W	83.7	11.7	4.1	77.2	11.4	6.0	1.5	81.7	9.4	3.8	4.4	0.63±0.06	1.85±0.21

Tabla 11. Porcentajes elementales de los recubrimientos poliméricos antes y después de las derivaciones químicas mediante TFBA y TFAA, y sus porcentajes de aminas primarias, secundarias y grupos hidroxilos.

Los porcentajes de los grupos funcionales -NH<sub>2</sub>, -NH y -OH determinados por TFAA también fueron mayores para los polímeros de PAI-I 20 W con 2.12±0.22% y PAI-I 40 W con 2.10±0.22%, en los que también se formaron aminas secundarias por sustitución durante la polimerización [105]. Asumiendo la exactitud de los experimentos de derivación, la diferencia entre los dos procesos de derivación (TFAA-TFBA) puede indicar las proporciones de los grupos -NH y -OH. Las películas de PAI-I se encuentran entre los 3 polímeros que mostraron una gran diferencia entre las dos derivaciones y, por tanto, entre los grupos -NH y -OH. El amplio pico a 3355 cm<sup>-1</sup> y la alta hidrofiliidad [88] de los polímeros de PAI-I sugieren que la diferencia entre porcentajes se debe principalmente a la presencia de grupos -OH debido a la similar energía de enlace según las tablas de Crist [90].

#### 8.6 Conductividad eléctrica de las mesopartículas poliméricas

La respuesta eléctrica de los polímeros se estudió en función de la temperatura en un intervalo de 20-100°C y, por lo tanto, en función de la humedad que iba perdiendo el material conforme se incrementaba la temperatura. Se puede observar en la figura 27-a que la conductividad de PPy-I va de 1.2X10<sup>-7</sup> a 1.7X10<sup>-6</sup> S/cm, mientras que las mesopartículas de PAI-I mostraron una conductividad que va de 1.2X10<sup>-9</sup> a 1.9X10<sup>-8</sup> S/cm. Los polímeros mostraron un comportamiento creciente en la conductividad eléctrica directamente proporcional al incremento de temperatura. Por lo anterior mencionado se puede clasificar a ambos materiales como materiales semiconductores. La característica de conductividad es muy importante para la comunicación celular, en particular para las células excitables como lo son las neuronas, debido a que estas se comunican a través de impulsos eléctricos, y un material como soporte para estas que favorezca esta comunicación podría facilitar, potenciar o incluso inducir procesos como la diferenciación neuronal y la sinapsis.

La energía de activación (E<sub>a</sub>) es a la energía necesaria para pasar un electrón de la banda de valencia a la de conducción. Cada tipo de material tiene un valor diferente de energía de activación, de acuerdo a su estructura; los materiales conductores tienen una energía de activación cercana a 0 eV, los semiconductores inorgánicos de 0.75 a 3.0 eV, los semiconductores orgánicos de 0.01 a 2.5 eV y los aislantes de 5.0 eV a 10.0 eV

[106]. De acuerdo con la anterior clasificación, las mesopartículas sintetizadas de PPy-I 20 W y PAI-I 30 W se clasifican como orgánicos semiconductores en el intervalo de temperatura analizada, incluyendo las temperaturas altas (80°C – 100°C).

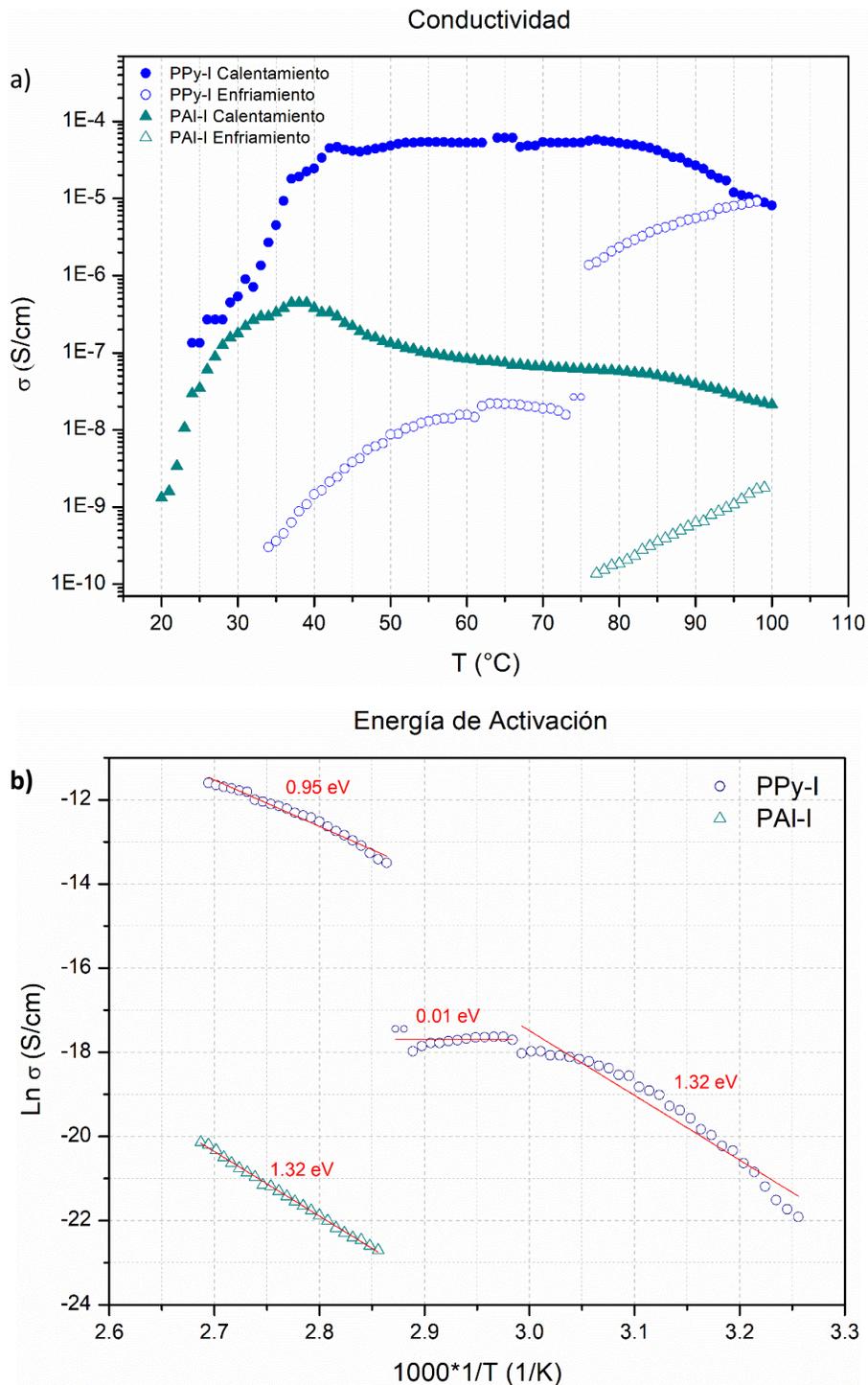


Figura 27. Caracterización eléctrica de las mesopartículas de PPy-I 20 W y PAI-I 30 W. a) Conductividad y b) Energía de activación.

## 8.7 Diferenciación neuronal

El número de núcleos de la línea celular N1E-115 sembrada sobre los recubrimientos poliméricos fue significativamente diferentes respecto al control. El promedio de núcleos celulares sobre los materiales y el control a las 72 h post estímulo de diferenciación se muestra en la figura 28-a, en donde se puede observar que el promedio de número de núcleos en el control fue de 819, en el caso de PPy-I 20 W, 30 y 40 W fue de 328, 408 y 420 respectivamente, para PAI-I 20, 30 W y 40 W fue de 432, 516 y 433, respectivamente, y por último los materiales de copolímero PPy/PAI-I 20 W, 30 W y 40 W fue de 444, 348 y 414. El número de núcleos es un indicador de diferenciación, debido a que las células en estado indiferenciado continúan proliferando, mientras que las células especializadas, es decir, diferenciadas a un tipo celular en específico, frenan su proliferación, por lo tanto, podemos inferir que las células sembradas sobre los materiales tuvieron una mayor diferenciación dado el menor número de núcleos presentes. Por otra parte, otro indicador de diferenciación neuronal es la complejidad de la red formada, esta se puede estimar mediante el análisis de Sholl, el cual arroja la cantidad de cruces entre las neuritas de la red neuronal, en el caso del control el promedio de cruces fue de 83.3, para PPy-I 20 W, 30 W y 40 W resultaron de 76, 104 y 97 respectivamente, en el caso de PAI-I 20W, 30 W y 40 W resultó de 112.4, 101.5 y 82.9 respectivamente y, por último, los resultados del copolímeros PPy/PAI-I fueron de 116.5, 102.6 y 69.1; en este caso, ninguna red formada sobre los polímeros fue significativamente diferente respecto al control, solo se presentaron diferencias entre los materiales, ya que las redes formadas sobre el copolímero PPy/PAI-I 40 W presentó una menor cantidad de cruces promedio y es significativamente diferente respecto a las redes formadas sobre los materiales de PAI-I 20 W y el copolímero PPy/PAI-I 20 W los cuales fueron los materiales con mayor cantidad de cruces promedio, esto sugiere que el polímero de PAI-I sintetizado por plasma a bajas potencias como 20 W, contribuye a la diferenciación de la línea celular N1E-115 mediante el mecanismo de ramificación dendrítica. Tomando en cuenta los dos indicadores anteriores, se obtuvo el índice de diferenciación neuronal de 0.10 para el control, de 0.25 para PPy-I 20 W, 0.27 para PPy-I 30 W y 0.25 para PPy-I 40 W, de

0.26 para PAI-I 20 W, 0.20 para PAI-I 30 W y 0.21 PAI-I 40 W y para el copolímero resultó de 0.29 para PPy/PAI-I 20 W, 0.30 para PPy/PAI-I 30 W y 0.19 para PPy/PAI-I 40 W.

Debido a la significancia de las diferencias entre el índice de diferenciación neuronal del cultivo control con los cultivos sembrados sobre los materiales poliméricos, se puede inferir que los materiales poliméricos tienen un efecto de diferenciación neuronal sobre la línea celular N1E-115 desde las 72 h post estímulo de diferenciación.

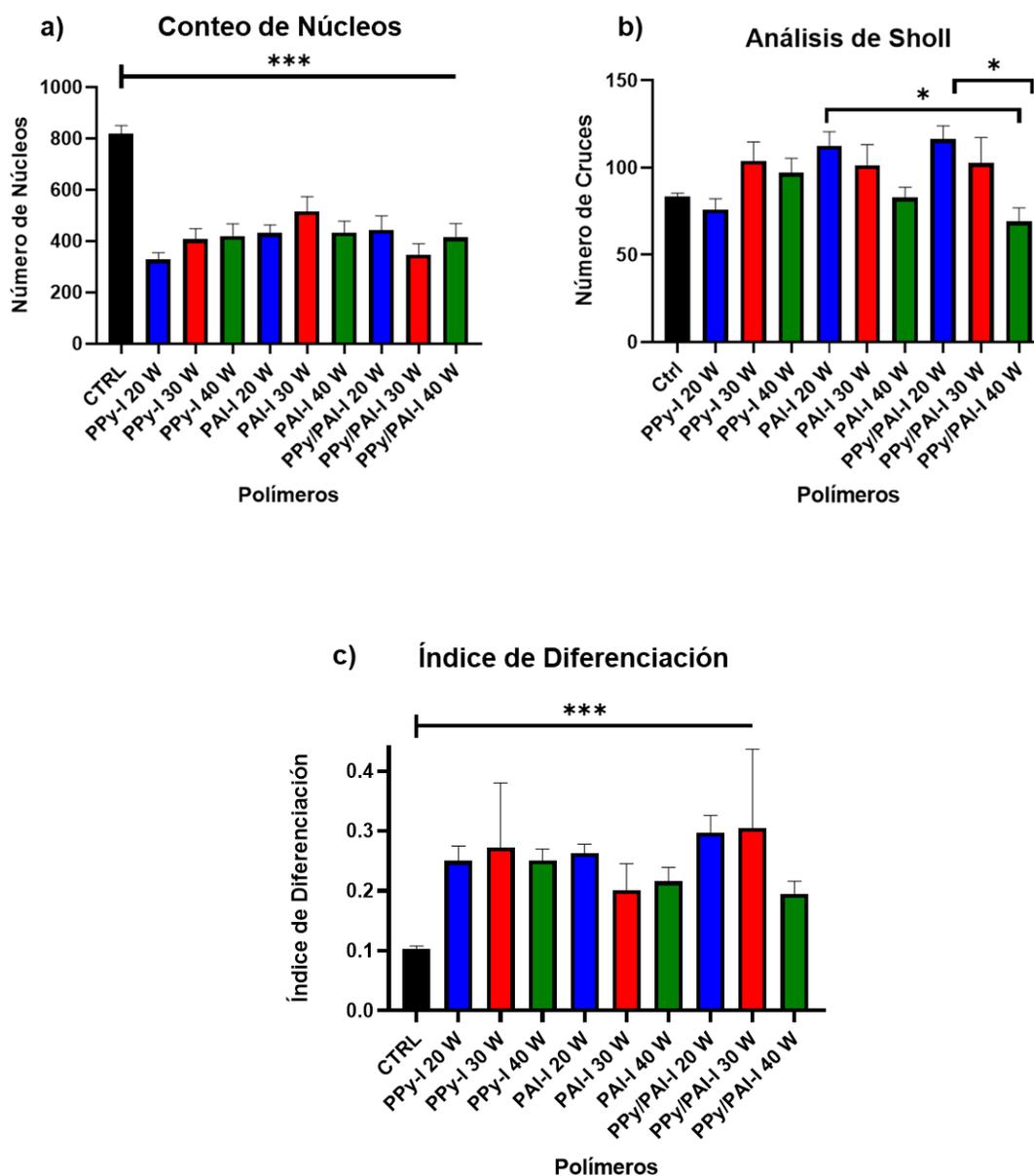


Figura 28. Diferenciación de la línea N1E-115 sobre los recubrimientos poliméricos. a) Conteo de núcleos, b) Número de cruces del análisis de Sholl, c) Índice de diferenciación neuronal.

La diferenciación neuronal mediante las mesopartículas de PPy-I 20 W y PAI-I 30 W a través del tiempo se muestra con las imágenes representativas en la figura 29 en donde se observa la formación de las redes neuronales desde las primeras 48 h. A las 72 h post tratamientos se puede observar una cantidad de núcleos muy similar en todos los cultivos, siendo el promedio de núcleos presentes en el cultivo control de 653 y cruces dendríticos promedio de 42, mientras que a este tiempo el cultivo de PPy-I cuenta con 652 y 48 cruces; y el cultivo de PAI-I con 755 núcleos promedio y 45 cruces dendríticos promedio. A las 96 h se puede observar una reducción significativa en el número de células en los cultivos con tratamiento de mesopartículas PPy-I y PAI-I teniendo 387 y 340 núcleos promedio respectivamente, mientras que los cultivos control cuentan con casi el doble con 714 células a este tiempo, en cuanto a los cruces dendríticos promedio a las 96 h, resultaron de 58, 49 y 46 para el control, PPy-I y PAI-I respectivamente. A las 120 h el número de núcleos sigue disminuyendo un poco sin mostrar diferencias significativas con respecto a las 96 h e incrementando el número de cruces promedio, esto debido al proceso de diferenciación celular, dando como resultado 699 núcleos celulares y 49 cruces en el caso del control, 343 núcleos y 62 cruces en el caso del cultivo tratado con las mesopartículas de PPy-I y para PAI-I en este tiempo resultó de 307 núcleos celulares y 53 cruces celulares.

Con los resultados anteriores se calculó el índice de diferenciación de los cultivos tratados con las mesopartículas y el grupo control a través del tiempo, resultando de 0.064, 0.083 y 0.060 para los cultivos control, PPy-I y PAI-I respectivamente a las 72 h, mostrando un ligero incremento de diferenciación en los cultivos tratados con PPy-I para este tiempo, a las 96 h el índice de diferenciación resultó de 0.098 para el grupo control, de 0.13 para el grupo PPy-I y de igual manera de 0.13 para el grupo tratado con PAI-I y finalmente a las 120 h post tratamientos resultó de 0.10 en el grupo control casi sin diferencia que a las 96 h, en el caso de PPy-I a las 120 h resultó de 0.18 y de igual manera 0.18 para los cultivos tratados con mesopartículas de PAI-I, todo esto se representa en la figura 30-c.

Los resultados anteriores muestran que existe una diferencia significativa en la diferenciación a partir de las 96 horas post estímulo de diferenciación.

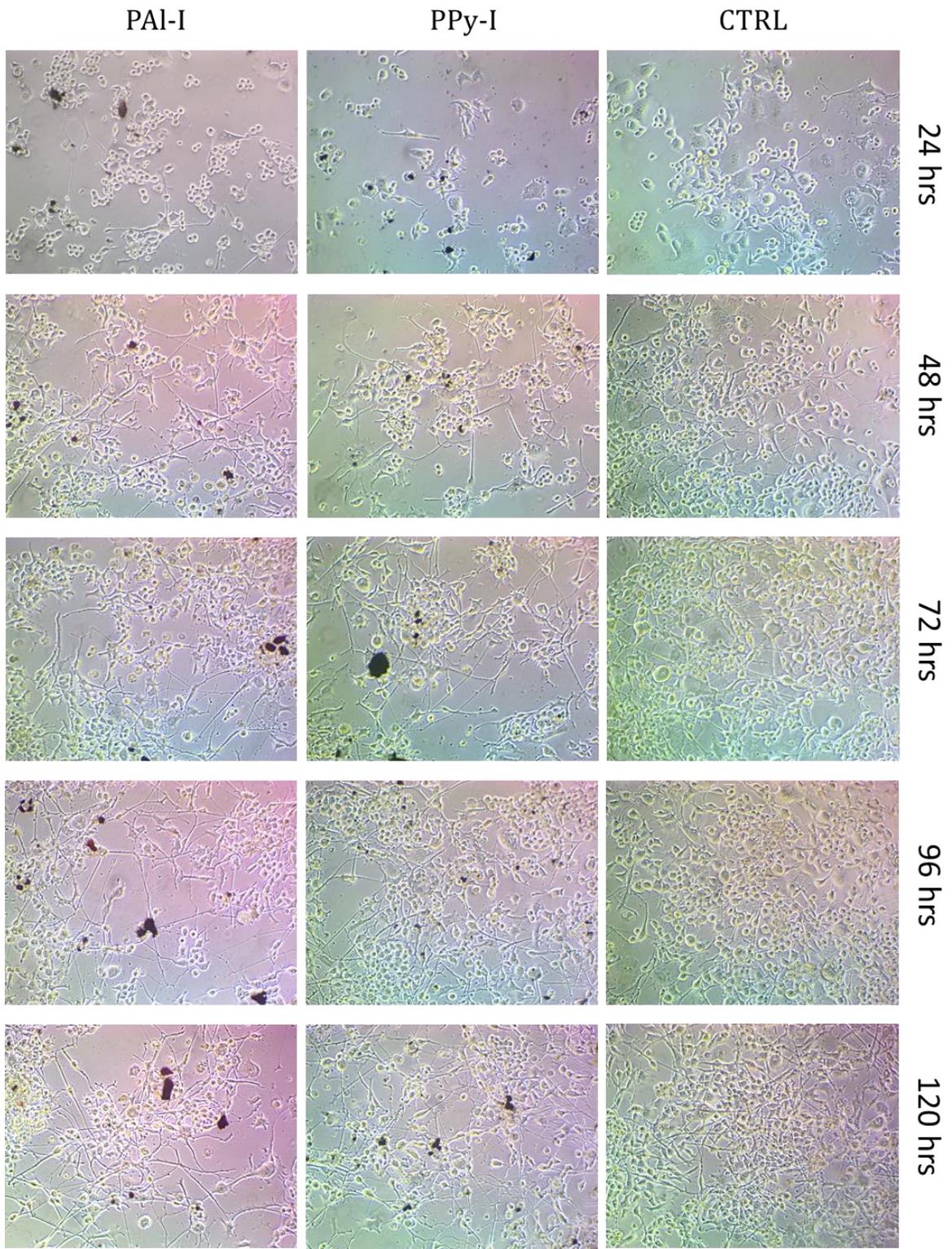


Figura 29. Esquema del seguimiento del ensayo de diferenciación de la línea N1E-115 con tratamiento de mesopartículas de polímeros de PPy-I 20 W y PAI- 30 W a las 24, 48, 72, 96 y 120 h post estímulo de diferenciación.

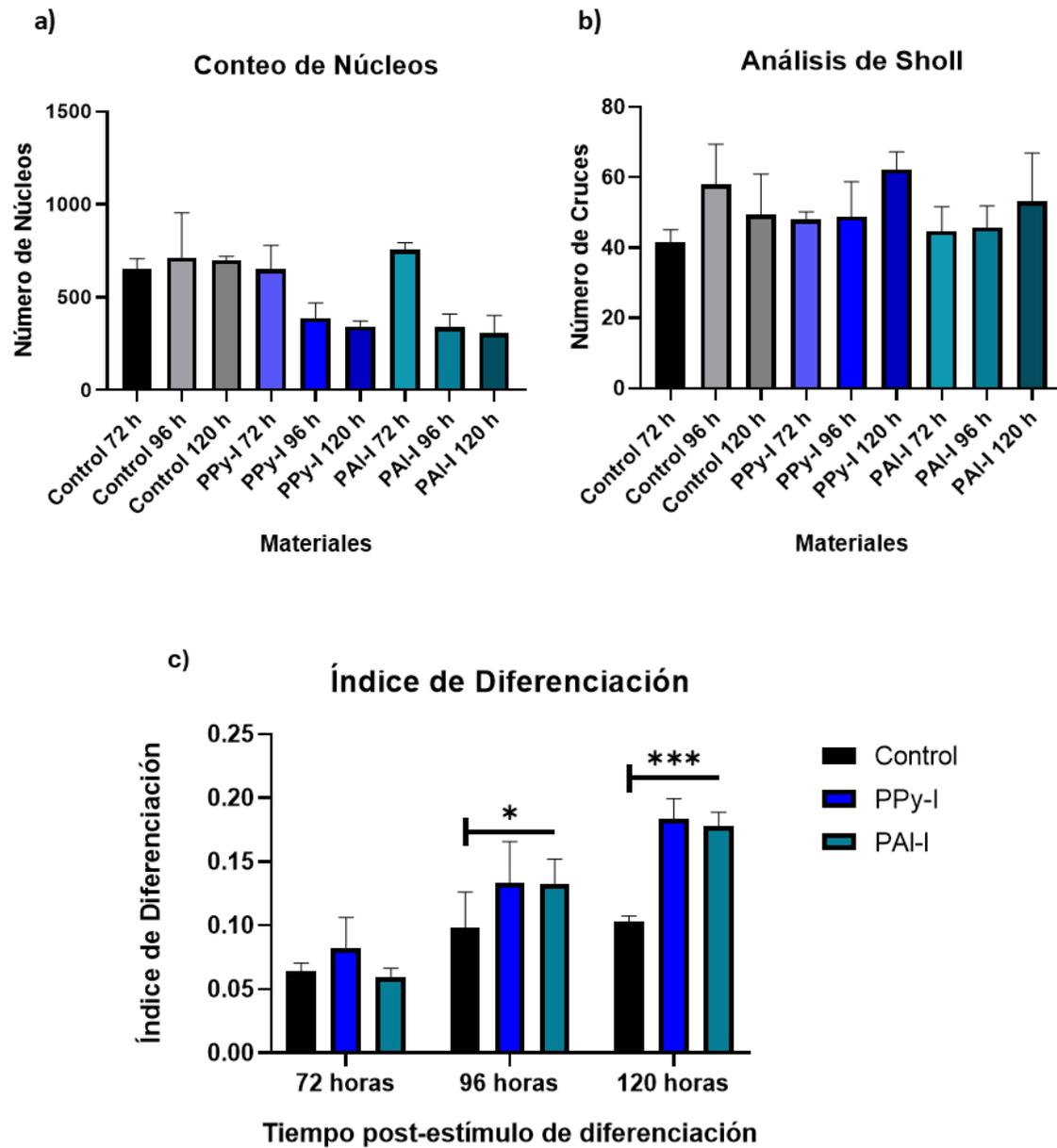


Figura 30. Diferenciación de la línea N1E-115 mediante el tratamiento con mesopartículas de PPy-I y PAI-I a 72, 96 y 120 h post estímulo de diferenciación. a) Conteo de núcleos, b) Número de cruces del análisis de Sholl, c) Índice de diferenciación neuronal.

## 8.8 Sinapsis de las redes neuronales

El seguimiento mediante marcadores de vesículas pre y post sinápticas se muestra en la figura 31-a. Para este experimento se utilizaron los polímeros PPy-I 20 W y PAI-I 30 W debido a que en estudios anteriores [88], se demostró que estos polímeros incrementaron la longitud dendrítica de los cultivos neuronales de la línea celular N1E-115 sembrada sobre estos en forma de recubrimientos. En este ensayo se observó que el marcador Alexa 488 (verde) que representa las vesículas presinápticas de sinapsina (SYP) se incrementó a través de tiempo, incluido en el grupo control siendo el índice de expresión sináptica de acuerdo a las SYP a las 72 h de 0.13 para el grupo control, de 0.19 para el cultivo tratado con PPy-I y de 0.21 para el grupo PAI-I, a las 96 h de 0.38 para el grupo control, de 0.45 para el grupo PPy-I y de 0.66 para grupo PAI-I, a las 120 h post tratamientos el índice de expresión presináptica fue de 0.16 para el grupo control, pudiendo notar un visible decremento en la expresión de SYP, esto se puede deber al visible incremento celular que se muestra en la gráfica de la figura 30-a lo cual indica la proliferación de células no especializadas, es decir, de células que se siguen dividiendo y no poseen las características biológicas de una neurona, por otro lado este índice resultó de 0.61 para el grupo PPy-I y de 1.00 para el grupo PAI-I mostrando una diferencia significativa independiente en el tiempo de 96 h y 120 h, al incremento de la expresión de esta proteína vesicular con la utilización de las mesopartículas de los materiales poliméricos (figura 32-a).

En el caso de la expresión de las vesículas post sinápticas de PSD 95 marcado con Alexa 594 (rojo) los resultados de la expresión vesicular mostrados en la figura 32-b resultaron a las 72 h post tratamientos de 0.11 para el grupo control, de 0.35 para el grupo PPy-I mostrando una diferencia significativa respecto al control, y de 0.32 para el grupo PAI-I, a las 96 h se muestra un índice de expresión post sináptica de 0.18 para el grupo control, de 0.76 para el grupo PPy-I y de 0.95 para el grupo PAI-I y finalmente a las 120 h resultó de 0.35, 0.82 y 1.42 para los grupos control, PPy-I y PAI-I respectivamente, mostrando diferencia significativa entre los tratamientos y en el tiempo a las 96 h y 120 h sobre la expresión de la densidad post sináptica.

Esto muestra que los polímeros de PPy-I y PAI-I tienen un efecto de incremento en la expresión de vesículas post sinápticas a las 72 h y a las 120 h con la utilización de PPy- y PAI-I respectivamente.

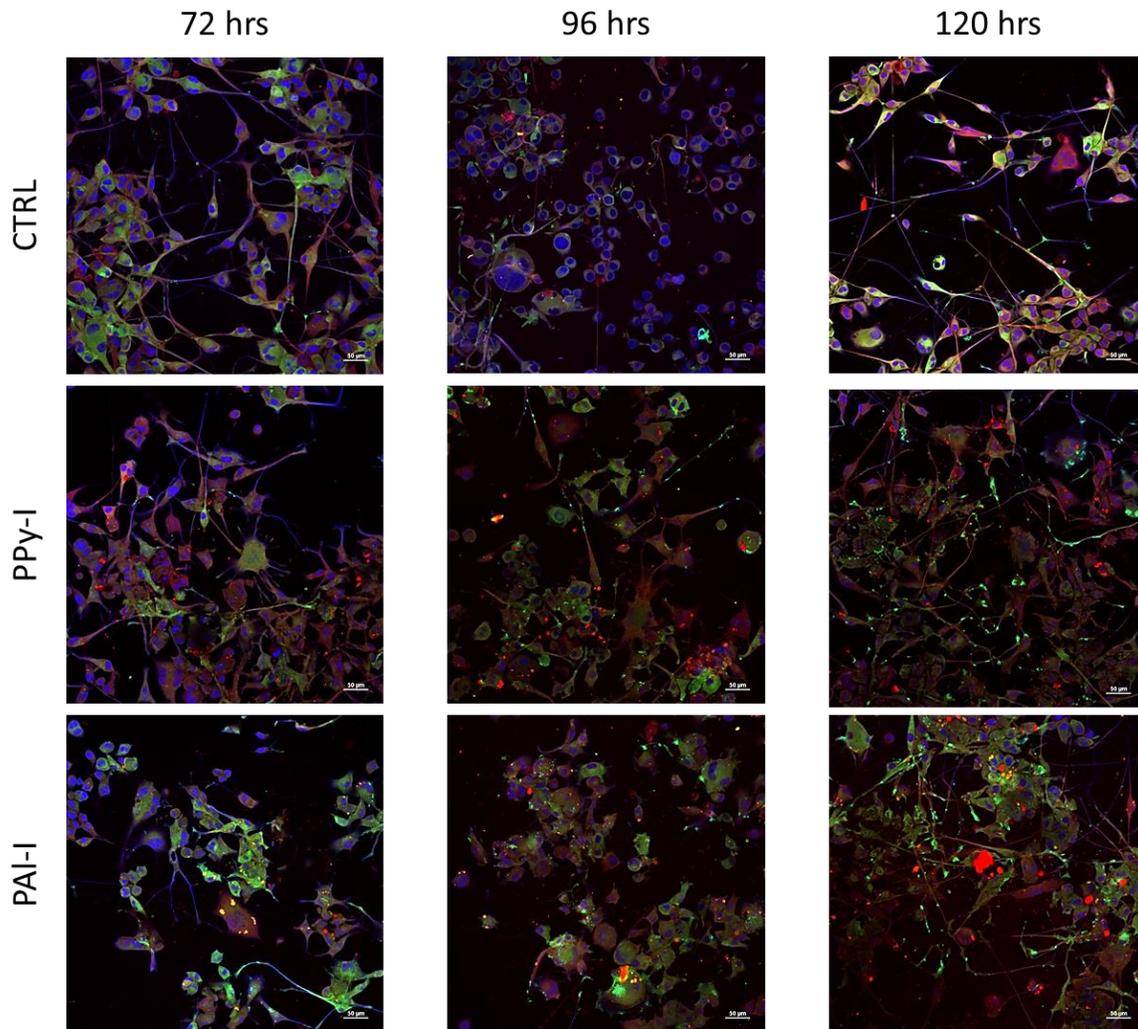


Figura 31. Micrografías de las tinciones para identificación de vesículas sinápticas de las redes neuronales tratadas con mesopartículas de PPy-I 20 W y PAI-I 30 W a diferentes tiempos post estímulo de diferenciación, 70, 96 y 120 h. Sinapsina, Alexa 488 (verde), PSD 95, Alexa 594 (rojo),  $\beta$ III-Tubulina, Dylight 405 (azul) y polímeros, autofluorescencia (rojo).

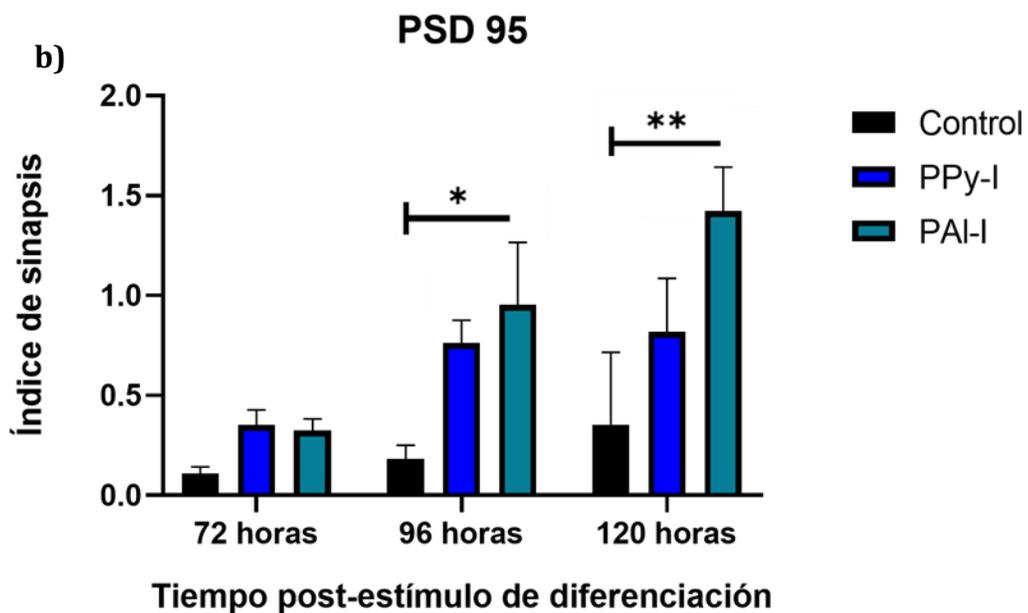
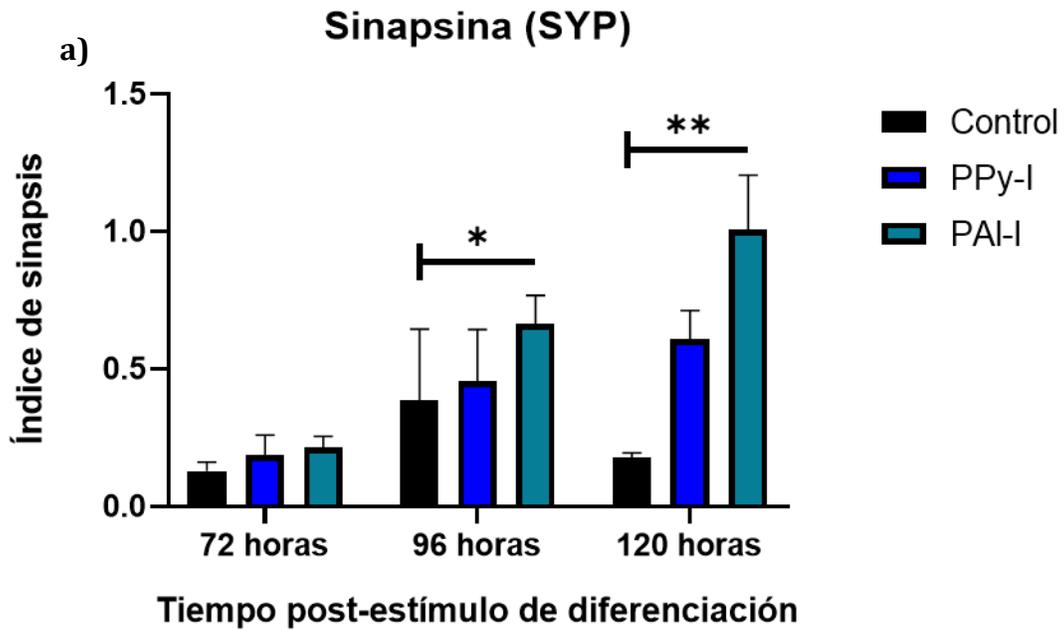


Figura 32. Índice de sinapsis respecto a la expresión de vesículas postsinápticas y presinápticas de las redes neuronales formadas por la línea celular N1E-115 mediante el tratamiento con mesopartículas de PPy-I y PAI-I a 72, 96 y 120 h post estímulo de diferenciación. a) Índice de sinapsis respecto a la expresión de vesículas presinápticas (SYP), b) Índice de sinapsis respecto a la expresión de vesículas postsinápticas (PSD 95).

Existen varios biomateriales que se han sintetizado y utilizado con el fin de promover la diferenciación neuronal y formar conexiones sinápticas, por ejemplo, hidrogeles fabricados de matriz extracelular (ECM) que proporcionan un entorno tridimensional similar al tejido natural, lo que favorece la adhesión, proliferación y diferenciación neuronal; también se han utilizado con el mismo propósito materiales biodegradables como el ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliglicólico (PGA), éstos se utilizan como andamios o como recubrimientos de los mismos con el propósito de incrementar su biocompatibilidad y por lo tanto algunos mecanismos biológicos como la proliferación y diferenciación celular [107]–[110].

Por otro lado, unos de los materiales más utilizados con el propósito de diferenciación de células excitables son los polímeros conductores y semiconductores como el polipirrol y polialilamina, debido a que pueden transportar cargas eléctricas y proporcionar un entorno eléctricamente activo que favorece la comunicación entre las neuronas y así estimular, tanto la diferenciación neuronal como la sinapsis [111]–[113].

A diferencia de la mayoría de los materiales mencionados anteriormente, sintetizados por métodos convencionales, los materiales sintetizados por plasma son fáciles de sintetizar y solo participan los monómeros en la reacción, debido a esto los materiales no son contaminados con otro tipo de sustancias o residuos secundarios, lo que incrementa su biocompatibilidad [114]–[116].

Otra ventaja de la utilización de los materiales probados en este trabajo su aplicación directa en el sitio de lesión, no es necesario la fabricación de algún andamio para promover la adherencia del polímero a las células diana y basta con preparar una suspensión de mesopartículas en forma de inyección para que, éstas migren y se adhieran a los núcleos celulares como se demostró en las imágenes de la figura 29 y así producir el efecto de estimulación para la diferenciación y promover el incremento de vesículas presinápticas y densidad proteica post sináptica.

## 9. Conclusiones

Los biomateriales poliméricos sintetizados por plasma PPy-I, PAI-I y PPy/PAI-I contribuyen a la diferenciación neuronal, así como PPy-I 20 W y PAI-I 30 W contribuyen a la tendencia y al incremento de la expresión de las vesículas presinápticas (sinapsina) después a las 96 h y 120 h así como a la densidad postsináptica (PSD) a las 96 h y 120 h post estímulo de diferenciación de la línea celular N1E-115, por lo cual se infiere que estos mecanismos neuronales son en parte los que se activan en el tratamiento de lesiones medulares con implantes de los biopolímeros de PPy-I y PAI-I.

Los biomateriales sintetizados por plasma y dopados con iodo cambian sus propiedades fisicoquímicas de acuerdo con la potencia de síntesis y se observan grupos funcionales y estados químicos que no se encuentran presentes en el monómero inicial debido a la deshidrogenación de los monómeros y los compuestos intermedios durante la síntesis.

Se puede observar mayor índice de diferenciación con los tratamientos sintetizados a potencias bajas (20 W y 30 W), en donde se encuentra una mayor variedad de estados químicos nitrogenados, lo cual sugiere la importancia de la diversidad química en los materiales para este efecto.

# Bibliografía

- [1] L. Minati, C. Migliaresi, L. Lunelli, G. Viero, M. Dalla Serra, and G. Speranza, "Plasma assisted surface treatments of biomaterials," *Biophys. Chem.*, vol. 229, pp. 151–164, 2017, doi: 10.1016/j.bpc.2017.07.003.
- [2] C. Kalirajan, A. Dukle, A. J. Nathanael, T. H. Oh, and G. Manivasagam, "A critical review on polymeric biomaterials for biomedical applications," *Polymers*. 2021. doi: 10.3390/polym13173015.
- [3] W. R. Wagner, S. E. Sakiyama-Elbert, G. Zhang, and M. J. Yaszemski, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 2020. doi: 10.1016/C2017-0-02323-6.
- [4] D. Williams and X. Zhang, *Definitions of Biomaterials for the Twenty-First Century*. 2019. doi: 10.1016/C2018-0-02529-3.
- [5] E. P. Ivanova, K. Bazaka, and R. J. Crawford, *New Functional Biomaterials for Medicine and Healthcare*. 2014. doi: 10.1533/9781782422662.
- [6] Y. Xiao *et al.*, "A Versatile Surface Bioengineering Strategy Based on Mussel-Inspired and Bioclickable Peptide Mimic," *Research*, 2020, doi: 10.34133/2020/7236946.
- [7] A. Baradaran-Rafii, E. Biazar, and S. Heidari-Keshel, "Cellular response of stem cells on nanofibrous scaffold for ocular surface bioengineering," *ASAIO J.*, 2015, doi: 10.1097/MAT.0000000000000242.
- [8] A. Nugud, L. Alghfeli, M. Elmasry, I. El-Serafi, and A. T. El-Serafi, "Biomaterials as a Vital Frontier for Stem Cell-Based Tissue Regeneration," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 10, no. March, pp. 1–13, 2022, doi: 10.3389/fcell.2022.713934.
- [9] J. Rösler, H. Harders, and M. Bäker, *Mechanical behaviour of engineering materials: Metals, ceramics, polymers, and composites*. 2007. doi: 10.1007/978-3-540-73448-2.
- [10] K. Namsheer and C. S. Rout, "Conducting polymers: a comprehensive review on recent advances in synthesis, properties and applications," *RSC Adv.*, vol. 11, no. 10, pp. 5659–5697, 2021, doi: 10.1039/d0ra07800j.
- [11] P. R. Yaashikaa, P. Senthil Kumar, and S. Karishma, "Review on biopolymers and composites – Evolving material as adsorbents in removal of environmental pollutants," *Environ. Res.*, 2022, doi: 10.1016/j.envres.2022.113114.
- [12] M. Asandulesa *et al.*, "Chemically polymerization mechanism of aromatic compounds under atmospheric pressure plasma conditions," *Plasma Process. Polym.*, 2013, doi: 10.1002/ppap.201200068.
- [13] D. Thiry, S. Konstantinidis, J. Cornil, and R. Snyders, "Plasma diagnostics for the low-pressure plasma polymerization process: A critical review," *Thin Solid*

*Films*. 2016. doi: 10.1016/j.tsf.2016.02.058.

- [14] J. Friedrich, "Mechanisms of Plasma Polymerization – Reviewed from a Chemical Point of View," *Plasma Process. Polym.*, vol. 8, no. 9, pp. 783–802, Sep. 2011, doi: 10.1002/ppap.201100038.
- [15] J. Carneiro de Oliveira, A. Airoudj, P. Kunemann, F. Bally-Le Gall, and V. Roucoules, "Mechanical properties of plasma polymer films: a review," *SN Applied Sciences*. 2021. doi: 10.1007/s42452-021-04655-9.
- [16] A. T. Bell, "The Mechanism and Kinetics of Plasma Polymerization," in *Plasma Chemistry*, 2022. doi: 10.1515/9783112539545-002.
- [17] B. R. Coad, P. Favia, K. Vasilev, and H. J. Griesser, "Plasma polymerization for biomedical applications: A review," *Plasma Processes and Polymers*. 2022. doi: 10.1002/ppap.202200121.
- [18] H. J. Jang, E. Y. Jung, T. Parsons, H. S. Tae, and C. S. Park, "A review of plasma synthesis methods for polymer films and nanoparticles under atmospheric pressure conditions," *Polymers*. 2021. doi: 10.3390/polym13142267.
- [19] J. Y. Kim *et al.*, "Transparent polyaniline thin film synthesized using a low-voltage-driven atmospheric pressure plasma reactor," *Materials (Basel)*, 2021, doi: 10.3390/ma14051278.
- [20] J. Y. Kim *et al.*, "In-situ iodine doping characteristics of conductive polyaniline film polymerized by low-voltage-driven atmospheric pressure plasma," *Polymers (Basel)*, 2021, doi: 10.3390/polym13030418.
- [21] A. K. Poddar, S. S. Patel, and H. D. Patel, "Synthesis, characterization and applications of conductive polymers: A brief review," *Polym. Adv. Technol.*, vol. 32, no. 12, pp. 4616–4641, 2021, doi: 10.1002/pat.5483.
- [22] B. Nadekar *et al.*, "Plasma-Polymerized and Iodine-Doped Polyvinyl Acetate for Volatile Organic Compound Gas Sensing Applications," *ACS Appl. Polym. Mater.*, 2023, doi: 10.1021/acsapm.2c01963.
- [23] L. F. Mora-Cortes *et al.*, "Biocompatible enhancement of poly(ethylene terephthalate) (PET) waste films by cold plasma aminolysis," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2022, doi: 10.1002/jctb.7106.
- [24] S. Taheri *et al.*, "Binding of Nanoparticles to Aminated Plasma Polymer Surfaces is Controlled by Primary Amine Density and Solution pH," *J. Phys. Chem. C*, 2018, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b03382.
- [25] C. A. Hunter, "Quantifying intermolecular interactions: Guidelines for the molecular recognition toolbox," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 43, no. 40, pp. 5310–5324, 2004, doi: 10.1002/anie.200301739.
- [26] A. Avdeef, "Physicochemical Profiling (Solubility, Permeability and Charge State)," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 1, no. 4, pp. 277–351, 2005, doi:

10.2174/1568026013395100.

- [27] A. Jardine, "Amino-functionalized polysaccharide derivatives: Synthesis, properties and application," *Curr. Res. Green Sustain. Chem.*, 2022, doi: 10.1016/j.crgsc.2022.100309.
- [28] D. Kumar, B. Sahu, and S. Banerjee, "Amino Acid-Derived Smart and Functional Polymers for Biomedical Applications: Current Status and Future Perspectives," *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2023. doi: 10.1002/macp.202300207.
- [29] Y. Tang, H. Zhang, Q. Wei, X. Tang, and W. Zhuang, "Biocompatible chitosan-collagen-hydroxyapatite nanofibers coated with platelet-rich plasma for regenerative engineering of the rotator cuff of the shoulder," *RSC Adv.*, 2019, doi: 10.1039/c9ra03972d.
- [30] M. Zahid *et al.*, "Investigating the antibacterial activity of polymeric membranes fabricated with aminated graphene oxide," *Membranes (Basel)*., 2021, doi: 10.3390/membranes11070510.
- [31] Z. Chen *et al.*, "Amination strategy to boost the CO<sub>2</sub> electroreduction current density of M-N/C single-atom catalysts to the industrial application level," *Energy Environ. Sci.*, 2021, doi: 10.1039/d0ee04052e.
- [32] J. Morales, M. G. Olayo, G. J. Cruz, M. M. Castillo-Ortega, and R. Olayo, "Electronic conductivity of pyrrole and aniline thin films polymerized by plasma," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 38, no. 24, pp. 3247–3255, 2000, doi: 10.1002/1099-0488(20001215)38:24<3247::AID-POLB60>3.0.CO;2-U.
- [33] L. M. Gomez, G. J. Cruz, M. G. Olayo, M. Gonzalez-Torres, F. Gonzalez-Salgado, and O. G. Lopez-Gracia, "Analysis of crosslinking in polypyrrole particles synthesized by plasma," *Polym. Bull.*, 2014, doi: 10.1007/s00289-014-1249-4.
- [34] G. J. Cruz *et al.*, "Polymerization mechanisms in plasma polyallylamine," *J. Mater. Sci.*, vol. 52, no. 2, pp. 1005–1013, 2017, doi: 10.1007/s10853-016-0396-4.
- [35] E. Colín, M. G. Olayo, G. J. Cruz, L. Carapia, J. Morales, and R. Olayo, "Affinity of amine-functionalized plasma polymers with ionic solutions similar to those in the human body," *Prog. Org. Coatings*, vol. 64, no. 2–3, pp. 322–326, 2009, doi: 10.1016/j.porgcoat.2008.08.033.
- [36] V. Gorantla, F. Zor, and J. Janjic, *Reconstructive Transplantation and Regenerative Medicine: The Emerging Interface*. 2021. doi: 10.1201/9780429260179.
- [37] C. Eaves, "Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine," *Nat. Med.*, 2002, doi: 10.1038/nm0402-326.
- [38] F. H. Gage, "Molecular and cellular mechanisms contributing to the regulation, proliferation and differentiation of neural stem cells in the adult dentate gyrus.," *The Keio journal of medicine*, vol. 59, no. 3. Japan, pp. 79–83, 2010. doi: 10.2302/kjm.59.79.

- [39] J. Silver, "The glial scar is more than just astrocytes," *Experimental Neurology*. 2016. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.06.018.
- [40] S. C. Cramer *et al.*, "Harnessing neuroplasticity for clinical applications.," *Brain*, vol. 134, no. Pt 6, pp. 1591–1609, Jun. 2011, doi: 10.1093/brain/awr039.
- [41] G. li Ming and H. Song, "Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions," *Neuron*. 2011. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.001.
- [42] F. H. Gage, "Mammalian neural stem cells," *Science*. 2000. doi: 10.1126/science.287.5457.1433.
- [43] J. P. Rasmussen and A. Sagasti, "Learning to swim, again: Axon regeneration in fish," *Experimental Neurology*. 2017. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.02.022.
- [44] Z. Yan, L. Chu, X. Jia, L. Lin, and S. Cheng, "Myelin basic protein enhances axonal regeneration from neural progenitor cells," *Cell Biosci.*, 2021, doi: 10.1186/s13578-021-00584-7.
- [45] Q. Su *et al.*, "Engineered Schwann Cell-Based Therapies for Injury Peripheral Nerve Reconstruction," *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2022. doi: 10.3389/fncel.2022.865266.
- [46] T. C. Südhof, "Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle," *Neuron*. 2013. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.022.
- [47] M. S. Bassi, E. Iezzi, L. Gilio, D. Centonze, and F. Buttari, "Synaptic plasticity shapes brain connectivity: Implications for network topology," *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. doi: 10.3390/ijms20246193.
- [48] Y. Zheng, Y. R. Mao, T. F. Yuan, D. S. Xu, and L. M. Cheng, "Multimodal treatment for spinal cord injury: A sword of neuroregeneration upon neuromodulation," *Neural Regeneration Research*. 2020. doi: 10.4103/1673-5374.274332.
- [49] I. Srivastava, E. Vazquez-Juarez, L. Henning, M. Gómez-Galán, and M. Lindskog, "Blocking astrocytic gaba restores synaptic plasticity in prefrontal cortex of rat model of depression," *Cells*, 2020, doi: 10.3390/cells9071705.
- [50] L. De Beaumont, S. Tremblay, J. Poirier, M. Lassonde, and H. Théoret, "Altered bidirectional plasticity and reduced implicit motor learning in concussed athletes," *Cereb. Cortex*, 2012, doi: 10.1093/cercor/bhr096.
- [51] A. Scimemi, "Structure,function,and plasticity of GABA transporters," *Front. Cell. Neurosci.*, 2014, doi: 10.3389/fncel.2014.00161.
- [52] G. Tian *et al.*, "Neuronal differentiation of adipose-derived stem cells and their transplantation for cerebral ischemia," *Neural Regen. Res.*, 2012, doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.25.011.
- [53] R. Knoth *et al.*, "Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years," *PLoS One*, vol. 5, no. 1, 2010, doi:

10.1371/journal.pone.0008809.

- [54] C. S. Bjornsson, M. Apostolopoulou, Y. Tian, and S. Temple, "It takes a village: Constructing the neurogenic niche," *Developmental Cell*. 2015. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.010.
- [55] H. Katoh, K. Yokota, and M. G. Fehlings, "Regeneration of spinal cord connectivity through stem cell transplantation and biomaterial scaffolds," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 13, no. June, pp. 1–22, 2019, doi: 10.3389/fncel.2019.00248.
- [56] E. C. Cope and E. Gould, "Adult Neurogenesis, Glia, and the Extracellular Matrix," *Cell Stem Cell*. 2019. doi: 10.1016/j.stem.2019.03.023.
- [57] F. Barnabé-Heider *et al.*, "Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord.," *Cell Stem Cell*, vol. 7, no. 4, pp. 470–482, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.stem.2010.07.014.
- [58] A. R. Filous and J. M. Schwab, "Determinants of Axon Growth, Plasticity, and Regeneration in the Context of Spinal Cord Injury.," *Am. J. Pathol.*, vol. 188, no. 1, pp. 53–62, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.ajpath.2017.09.005.
- [59] G. H. D. Poplawski and M. H. Tuszynski, "Regeneration of Corticospinal Axons into Neural Progenitor Cell Grafts After Spinal Cord Injury," *Neuroscience Insights*. 2020. doi: 10.1177/2633105520974000.
- [60] R. A. DeGiosio, M. J. Grubisha, M. L. MacDonald, B. C. McKinney, C. J. Camacho, and R. A. Sweet, "More than a marker: potential pathogenic functions of MAP2," *Front. Mol. Neurosci.*, 2022, doi: 10.3389/fnmol.2022.974890.
- [61] C. D. Katsetos *et al.*, "Class III  $\beta$ -tubulin isotype ( $\beta$  III) in the adrenal medulla: I. Localization in the developing human adrenal medulla," *Anat. Rec.*, 1998, doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(199803)250:3<335::AID-AR8>3.0.CO;2-Z.
- [62] R. J. Mullen, C. R. Buck, and A. M. Smith, "NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates," *Development*, 1992, doi: 10.1242/dev.116.1.201.
- [63] J. Wetherington, G. Serrano, and R. Dingledine, "Astrocytes in the Epileptic Brain," *Neuron*. 2008. doi: 10.1016/j.neuron.2008.04.002.
- [64] K. L. Ligon *et al.*, "Olig2-Regulated Lineage-Restricted Pathway Controls Replication Competence in Neural Stem Cells and Malignant Glioma," *Neuron*, 2007, doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.009.
- [65] E. Hunziker and M. Stein, "Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, doi: 10.1006/bbrc.2000.2611.
- [66] L. T. H. Tang, T. J. Craig, and J. M. Henley, "SUMOylation of synapsin Ia maintains synaptic vesicle availability and is reduced in an autism mutation," *Nat. Commun.*, 2015, doi: 10.1038/ncomms8728.
- [67] L. W. Fan and Y. Pang, "Dysregulation of neurogenesis by neuroinflammation:

- Key differences in neurodevelopmental and neurological disorders," *Neural Regeneration Research*. 2017. doi: 10.4103/1673-5374.202926.
- [68] R. C. Malenka and R. A. Nicoll, "Long-term potentiation - A decade of progress?," *Science*. 1999. doi: 10.1126/science.285.5435.1870.
- [69] M. Sheng and M. E. Greenberg, "The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system," *Neuron*. 1990. doi: 10.1016/0896-6273(90)90106-P.
- [70] T. C. Südhof, "The synaptic vesicle cycle: A cascade of protein-protein interactions," *Nature*, 1995, doi: 10.1038/375645a0.
- [71] S. L. McIntire, R. J. Reimer, K. Schuske, R. H. Edwards, and E. M. Jorgensen, "Identification and characterization of the vesicular GABA transporter," *Nature*, 1997, doi: 10.1038/39908.
- [72] S. Takamori *et al.*, "Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle," *Cell*, 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.10.030.
- [73] S. Tom Dieck *et al.*, "Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals," *J. Cell Biol.*, 1998, doi: 10.1083/jcb.142.2.499.
- [74] K. Warwick, "Cultured neural networks," *International Journal of Adaptive Control and Signal Processing*. 2009. doi: 10.1002/acs.1090.
- [75] M. R. Akins and A. D. R. Garcia, "Neurogenesis in the Adult Brain," in *Encyclopedia of Cell Biology: Volume 1-6, Second Edition*, 2022. doi: 10.1016/B978-0-12-821618-7.40021-0.
- [76] A. Verkhratsky and A. Butt, *Glial Neurobiology: A Textbook*. 2007. doi: 10.1002/9780470517796.
- [77] T. Vierbuchen, A. Ostermeier, Z. P. Pang, Y. Kokubu, T. C. Südhof, and M. Wernig, "Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors," *Nature*, 2010, doi: 10.1038/nature08797.
- [78] I. Vetter and R. J. Lewis, "Characterization of endogenous calcium responses in neuronal cell lines," *Biochem. Pharmacol.*, 2010, doi: 10.1016/j.bcp.2009.10.020.
- [79] G. Giordano and L. G. Costa, "Primary neurons in culture and neuronal cell lines for in vitro neurotoxicological studies," *Methods Mol. Biol.*, 2011, doi: 10.1007/978-1-61779-170-3\_2.
- [80] D. K. Fujii, S. L. Massoglia, N. Savion, and D. Gospodarowicz, "Neurite outgrowth and protein synthesis by PC12 cells as a function of substratum and nerve growth factor," *J. Neurosci.*, 1982, doi: 10.1523/jneurosci.02-08-01157.1982.
- [81] J. Yoo, M. J. Jeong, B. M. Kwon, M. W. Hur, Y. M. Park, and M. Y. Han, "Activation of dynamin I gene expression by Sp1 and Sp3 is required for neuronal differentiation of N1E-115 cells," *J. Biol. Chem.*, 2002, doi:

10.1074/jbc.M111788200.

- [82] C. Cosgrove and P. Cobbett, "Induction of temporally dissociated morphological and physiological differentiation of N1E-115 cells," *Brain Res. Bull.*, 1991, doi: 10.1016/0361-9230(91)90280-W.
- [83] J. E. Oh *et al.*, "Differentiation of neuroblastoma cell line N1E-115 involves several signaling cascades," *Neurochem. Res.*, 2005, doi: 10.1007/s11064-005-2607-2.
- [84] R. Olayo *et al.*, "Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 2, pp. 817–826, 2008, doi: 10.1007/s10856-007-3080-z.
- [85] G. J. Cruz *et al.*, "Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 23, no. 10, pp. 2583–2592, 2012, doi: 10.1007/s10856-012-4715-2.
- [86] R. Mondragon-Lozano *et al.*, "Delayed injection of polypyrrole doped with iodine particle suspension after spinal cord injury in rats improves functional recovery and decreased tissue damage evaluated by 3.0 Tesla in vivo magnetic resonance imaging," *Spine J.*, vol. 17, no. 4, pp. 562–573, 2017, doi: 10.1016/j.spinee.2016.02.012.
- [87] A. Morales-Guadarrama *et al.*, "Spinal cord injury of rhesus monkey implanted with PPy/I plasma polymer, MRI study," *IFMBE Proc.*, vol. 49, pp. 174–177, 2015, doi: 10.1007/978-3-319-13117-7\_46.
- [88] E. J. Alvarado Muños, J. Morales Corona, and E. Orozco Barrios Carlos, "Estudio del efecto de polímeros aminados sintetizados por plasma sobre la diferenciación neuronal en un modelo in vitro," 2018, [Online]. Available: [http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/ver\\_texto.php?recno=122621&documento=UAMII122621.pdf](http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/ver_texto.php?recno=122621&documento=UAMII122621.pdf)
- [89] F. González-Salgado, M. G. Olayo, G. J. Cruz, L. M. Gómez, E. Ordonez, and G. García-Rosales, "Synthesis of titanium oxide nanoparticles by plasma," *Superf. y Vacío*, 2012.
- [90] B. V. Crist, "The XPS library website: A resource for the XPS community including - The XPS library of information, XPS spectra-base having >70,000 monochromatic XPS spectra, and spectral data processor (SDP) v8.0 software," *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena*, vol. 248, no. December 2020, p. 147046, 2021, doi: 10.1016/j.elspec.2021.147046.
- [91] A. Manakhov, M. Michlíček, A. Felten, J. J. Pireaux, D. Nečas, and L. Zajíčková, "XPS depth profiling of derivatized amine and anhydride plasma polymers: Evidence of limitations of the derivatization approach," *Appl. Surf. Sci.*, 2017, doi: 10.1016/j.apsusc.2016.10.099.
- [92] J. C. Ruiz *et al.*, "Approaches to quantify amine groups in the presence of

- hydroxyl functional groups in plasma polymerized thin films," *Steel Res. Int.*, vol. 11, no. 9, pp. 888–896, Sep. 2014, doi: 10.1002/ppap.201400016.
- [93] J. Ryssy *et al.*, "Chemical and physical processes in the retention of functional groups in plasma polymers studied by plasma phase mass spectroscopy," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 18, no. 6, pp. 4496–4504, 2016, doi: 10.1039/c5cp05850c.
- [94] T. C. Südhof, "Towards an Understanding of Synapse Formation," *Neuron*. 2018. doi: 10.1016/j.neuron.2018.09.040.
- [95] T. M. Sanderson, J. Georgiou, and G. L. Collingridge, "Illuminating Relationships Between the Pre- and Post-synapse," *Frontiers in Neural Circuits*. 2020. doi: 10.3389/fncir.2020.00009.
- [96] S. A. Maynard, J. Ranft, and A. Triller, "Quantifying postsynaptic receptor dynamics: insights into synaptic function," *Nature Reviews Neuroscience*. 2023. doi: 10.1038/s41583-022-00647-9.
- [97] J. Dolzer, S. Krannich, K. Fischer, and M. Stengl, "Oscillations of the transepithelial potential of moth olfactory sensilla are influenced by octopamine and serotonin," *J. Exp. Biol.*, 2001, doi: 10.1242/jeb.204.16.2781.
- [98] J. T. Clark, A. Ganguly, J. Ejercito, M. Luy, A. Dahanukar, and A. Ray, "Chemosensory detection of aversive concentrations of ammonia and basic volatile amines in insects," *iScience*, 2023, doi: 10.1016/j.isci.2022.105777.
- [99] D. Mangindaan, W. H. Kuo, C. C. Chang, S. L. Wang, H. C. Liu, and M. J. Wang, "Plasma polymerization of amine-containing thin films and the studies on the deposition kinetics," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 206, no. 6, pp. 1299–1306, 2011, doi: 10.1016/j.surfcoat.2011.08.046.
- [100] S. Eufinger, W. J. Van Ooij, and T. H. Ridgway, "DC plasma-polymerization of pyrrole: comparison of films formed on anode and cathode," *J. Appl. Polym. Sci.*, 1996, doi: 10.1002/(SICI)1097-4628(19960829)61:9<1503::AID-APP10>3.0.CO;2-R.
- [101] G. J. Cruz *et al.*, "Polymerization mechanisms in plasma polyallylamine," *J. Mater. Sci.*, 2017, doi: 10.1007/s10853-016-0396-4.
- [102] S. J. Cho and J. H. Boo, "A study on the characteristics of plasma polymer thin film with controlled nitrogen flow rate," *Nanoscale Res. Lett.*, 2012, doi: 10.1186/1556-276X-7-62.
- [103] O. Sharifahmadian *et al.*, "Mechanically robust nitrogen-rich plasma polymers: Biofunctional interfaces for surface engineering of biomedical implants," *Mater. Today Adv.*, 2021, doi: 10.1016/j.mtadv.2021.100188.
- [104] J. P. Booth, M. Mozetič, A. Nikiforov, and C. Oehr, "Foundations of plasma surface functionalization of polymers for industrial and biological applications," *Plasma Sources Sci. Technol.*, 2022, doi: 10.1088/1361-6595/ac70f9.

- [105] J. Friedrich, G. Kühn, R. Mix, and W. Unger, "Formation of plasma polymer layers with functional groups of different type and density at polymer surfaces and their interaction with Al atoms," *Plasma Process. Polym.*, 2004, doi: 10.1002/ppap.200400008.
- [106] MARIBEL GONZÁLEZ TORRES, "ESTUDIO DE POLÍMEROS POROSOS SINTETIZADOS POR PLASMA," UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO, 2012. [Online]. Available: <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/14122/399042.pdf?sequence=1>
- [107] M. P. Lutolf and J. A. Hubbell, "Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering," *Nat. Biotechnol.*, vol. 23, no. 1, pp. 47–55, 2005, doi: 10.1038/nbt1055.
- [108] D. H. Kim and D. C. Martin, "Sustained release of dexamethasone from hydrophilic matrices using PLGA nanoparticles for neural drug delivery," *Biomaterials*, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.12.021.
- [109] G. A. Silva *et al.*, "Selective Differentiation of Neural Progenitor Cells by High-Epitope Density Nanofibers," *Science (80-. )*, 2004, doi: 10.1126/science.1093783.
- [110] Q. Gu *et al.*, "Functional 3D Neural Mini-Tissues from Printed Gel-Based Bioink and Human Neural Stem Cells," *Adv. Healthc. Mater.*, 2016, doi: 10.1002/adhm.201600095.
- [111] E. Tomaskovic-Crook, Q. Gu, S. N. A. Rahim, G. G. Wallace, and J. M. Crook, "Conducting Polymer Mediated Electrical Stimulation Induces Multilineage Differentiation with Robust Neuronal Fate Determination of Human Induced Pluripotent Stem Cells," *Cells*, 2020, doi: 10.3390/cells9030658.
- [112] S. Z. Yow, T. H. Lim, E. K. F. Yim, C. T. Lim, and K. W. Leong, "A 3D Electroactive Polypyrrole-Collagen Fibrous Scaffold for Tissue Engineering," *Polymers (Basel)*, 2011, doi: 10.3390/polym3010527.
- [113] L. Zhang, W. R. Stauffer, E. P. Jane, P. J. Sammak, and X. T. Cui, "Enhanced Differentiation of Embryonic and Neural Stem Cells to Neuronal Fates on Laminin Peptides Doped Polypyrrole," *Macromol. Biosci.*, 2010, doi: 10.1002/mabi.201000176.
- [114] A. Arkhangelskiy, A. Quaranta, A. Motta, Y. Yang, V. K. Yadavalli, and D. Maniglio, "Atmospheric Plasma-Assisted Deposition and Patterning of Natural Polymers," *Adv. Mater. Interfaces*, 2022, doi: 10.1002/admi.202200454.
- [115] P. Slepíčka, N. S. Kasálková, E. Stránská, L. Bačáková, and V. Švorčík, "Surface characterization of plasma treated polymers for applications as biocompatible carriers," *Express Polym. Lett.*, 2013, doi: 10.3144/expresspolymlett.2013.50.

- [116] S. Yoshida, K. Hagiwara, T. Hasebe, and A. Hotta, "Surface modification of polymers by plasma treatments for the enhancement of biocompatibility and controlled drug release," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 233, pp. 99–107, 2013, doi: 10.1016/j.surfcoat.2013.02.042.

## Artículos de investigación

“Enhanced neuronal differentiation using plasma-synthesized amino polymers”

International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials | International

Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, DOI:

<https://doi.org/10.1080/00914037.2024.2312824>

Autores: Estephanny Jocelyn Alvarado Muñoz; Roberto Olayo; María Guadalupe Olayo González; Guillermo Jesús Cruz Cruz; Omar Eduardo Uribe Juárez; Hermelinda Salgado-Ceballos; Angélica Coyoy Salgado; Daniel Martínez Fong; Carlos Enrique Orozco Barrios; Juan Morales Corona

"Quartz crystal microbalance application and in silico studies to characterize the interaction of bovine serum albumin with plasma polymerized pyrrole surfaces: implications for the development of biomaterials" Journal: Langmuir | Langmuir 2023,

39, 32, 11213–11223 Publication Date: August 1, 2023 DOI:

<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c00308>

Autores: Serratos, Iris; Sanchez Luviano, Alberto; Millán-Pacheco, Cesar; Morales-Corona, Juan; Alvarado Muñoz, Estephanny; Campos-Teran, Jose; Olayo, Roberto

"Quantifying amines in polymers by XPS" Springer Journals | Polymer Bulletin | POBU-

D-22-00942 Publication Date: May 16, 2023 DOI: [https://doi.org/10.1007/s00289-](https://doi.org/10.1007/s00289-023-04829-y)

[023-04829-y](https://doi.org/10.1007/s00289-023-04829-y)

Autores: M. Guadalupe Olayo; E. Jocelyn Alvarado; Maribel González- Torres; Lidia M. Gómez; Guillermo J. Cruz

“Application of plasma polymerized pyrrole nanoparticles to prevent or reduce de-differentiation of adult rat ventricular cardiomyocytes” Journal of Materials Science:

Materials in Medicine 2021-09 | Journal article DOI: [https://doi.org/10.1007/s10856-](https://doi.org/10.1007/s10856-021-06595-7)

[021-06595-7](https://doi.org/10.1007/s10856-021-06595-7) Part of ISSN: 0957-4530

Autores: Omar Uribe-Juarez; Rafael Godínez; Juan Morales-Corona; Myrian Velasco; Roberto Olayo-Valles; M. C. Acosta-García; E. J. Alvarado; Luis Miguel-Alavez; Oscar-J. Carrillo-González; María G. Flores-Sánchez et al.

## Difusión científica

"Neuronal differentiation of the N1E-115 cell line promoted by aminated biomaterial coatings synthesized by plasma polymerization" IV Congress of Neurobiology of the Mexican Society of Biochemistry. 03/abr/2022

"Plasma-synthesized amino polymers as a use for neuronal regeneration". Pláticas: Seminario de Investigación, Facultad de Ingeniería Biomédica, Mecánica e Ingeniería Eléctrica, Universidad Autónoma de Coahuila, México. 30/01/2023

"Biomaterials and Tissue Engineering for Neuronal Regeneration". Pláticas: Conociendo la Ingeniería Biomédica, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 15/oct/2021

# Anexos

## Anexo 1

### 1. Preparación de solución PUCK'S

A continuación, se describen los reactivos y concentraciones utilizados para la preparación de solución PUCK'S, utilizada para retirar las células N1E-115 de las cajas de cultivo y evitar el daño mecánico sobre las células.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (mM)	CASA COMERCIAL
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.5	Sigma Aldrich
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.81	VWR International
KCl	5.36	Sigma Aldrich
NaCl	137	VWR International

- Se disolvieron todos los reactivos en 400 mL de agua miliQ
- Se ajustó el pH a 7.3-7.4 usando ácido clorhídrico (HCL) o hidróxido de sodio (NaOH)
- Se aforó el al volumen final de 500 ml
- Se esterilizó la solución con una unidad de filtración de 0.22 µm de poro de filtro.
- Finalmente se almacenó a 5 °C y se mantuvo en condiciones estériles.

Todo el proceso se llevó a cabo en una campana de flujo laminar para evitar contaminaciones.

## Anexo 2

### 2. Esterilización de cubreobjetos para siembra de la línea celular N1E-115

A continuación, se describen el protocolo de esterilización de cubreobjetos para la siembra de la línea celular N1E-115 para los ensayos de diferenciación celular y marcadores de sinapsis.

- Los cubreobjetos circulares de 18 mm de diámetro se colocaron en un frasco de vidrio estéril con tapa de rosca y se cubrieron con etanol al 70%.
- En seguida se sonicaron en el frasco con la solución durante 2 h.
- Después se desechó la solución de etanol y se enjuagaron con agua miliQ.
- Se secaron uno por uno de los cubreobjetos con ayuda de un flujo de aire.
- Posteriormente, se colocaron nuevamente en un frasco de vidrio estéril tapado sin presionar la tapa y se metieron a un microondas durante 10 min dando espacio de enfriamiento de 1 minuto por cada minuto de calentamiento.
- Finalmente se dejaron se cerró bien la tapa del frasco y se dejaron enfriar a temperatura ambiente para posteriormente poder ser utilizados.

Todo el proceso se llevó a cabo en una campana de flujo laminar para evitar contaminaciones.

## Anexo 3

### 3. Esterilización de mesopartículas de PPy-I y PAI-I

A continuación, se describen el protocolo de esterilización de las mesopartículas de los polímeros de PPy-I y PAI-I para su utilización como tratamiento sobre la formación de redes neuronales de la línea celular N1E-115 para los ensayos de diferenciación celular y marcadores de sinapsis.

- Se colocaron 10 mg del polímero en un vial de vidrio estéril y se esterilizaron durante 30 min con luz ultravioleta.
- En seguida se colocaron 2 mL de agua miliQ en cada vial con polímero.
- Posteriormente, se sonicaron los viales con los polímeros en agua miliQ durante 24 h.
- En seguida se drenó el agua quedando solo las mesopartículas y se enjuago con 2 mL de PBS 1X estéril en 3 ocasiones.
- Finalmente se colocó 1 mL de PBS 1X en cada vial y se reservaron hasta su uso a 5 °C.

Todo el proceso se llevó a cabo en una campana de flujo laminar para evitar contaminaciones.

## Anexo 4

### 4. Preparación de solución PBS

A continuación, se describen los reactivos y concentraciones utilizados para la preparación de la solución PBS utilizada para la dilución

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (mM)	CASA COMERCIAL
KCl	2.7	Sigma Aldrich
NaCl	137	Sigma Aldrich
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10	VWR International
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.8	VWR International

- Se disolvieron todos los reactivos en 800 mL de agua miliQ
- Se ajustó el pH a 7.3-7.4 usando ácido clorhídrico (HCL) o hidróxido de sodio (NaOH)
- Se aforó el al volumen final de 1000 ml
- Se esterilizó la solución con una unidad de filtración de 0.22 µm de tamaño de poro.
- Finalmente se almacenó a 5 °C y se mantuvo en condiciones estériles.

Todo el proceso se llevó a cabo en una campana de flujo laminar para evitar contaminaciones.