



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y
TECNOLOGÍA AVANZADA**

**POLÍMEROS SEMICONDUCTORES COMO SOPORTE
DE CRECIMIENTO CELULAR PARA BIOSENSORES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA**

P R E S E N T A:

ANGEL EDUARDO FERNÁNDEZ DUKE

DIRECTORAS DE TESIS:

**DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN,
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA
AVANZADA UNAM**

**DRA. MA. CONCEPCIÓN ARENAS ARROCENA
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN UNAM**



JURIQUILLA, QUERÉTARO, NOVIEMBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COPIA VOTOS APROBATORIOS JURADO

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la licenciatura en Tecnología del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, UNAM, campus Juriquilla.

A los apoyos recibidos:

Beca de Ayudante de Investigador SEP-CONACYT 2014 (Referencia CB-2012/176450)

Programa Nuevos Talentos CFATA-CONCYTEQ 2013

Proyecto PAPIIT No. IB101512

Proyecto CONACYT 214076-PDCPN2013-1

A mis tutoras: Dra. Luz María López Marín y Dra. Ma. Concepción Arenas Arrocena por su apoyo a lo largo de toda mi licenciatura.

A mis sinodales:

Dr. Iván Santamaría Holek

Dr. Mathieu Hautefeuille

Dr. Nestor Octavio Nazario Yepiz

A la Dra. Blanca Edith Millán Chiu por todo su apoyo en el laboratorio de Nanobio-óptica y el área de microscopía confocal y de epifluorescencia.

Al Dr. Angel Luis Rodríguez Morales por su apoyo en el área de programación.

Al Dr. Domingo Rangel Miranda por permitir el uso del potenciostato para la síntesis del polímero.

A la Unidad de Microscopía del Instituto de Neurobiología de la UNAM, por otorgar las facilidades para la realización de análisis por microscopía confocal y de epifluorescencia.

A la M. en C. Alicia del Real y M. en C. Carmen Meda por su apoyo en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del CFATA.

Al laboratorio de Química de Materiales II del Cinvestav Querétaro por su apoyo en medición de conductividad de las películas.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis profesores por toda su enseñanza impartida.

A los investigadores de los diferentes laboratorios que me permitieron trabajar con ellos para moldear mis conocimientos y multidisciplinariedad.

A mi familia y amigos por su apoyo incondicional.

A mi hermanita Vicky Fernández por su ayuda con las imágenes incluidas en esta tesis.

Dedicatoria

A mis padres

“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds the most discoveries, is not ‘Eureka!’ but ‘That’s funny...’”
Isaac Asimov

ÍNDICE

| | Página |
|--|---------------|
| Agradecimientos | II |
| Agradecimientos personales | III |
| Dedicatoria | IV |
| Índice | VI |
| Lista de abreviaturas | IX |
| Lista de figuras | XI |
| RESUMEN | XIII |
| ABSTRACT | XV |
| I. MARCO TEÓRICO | 1 |
| 1.1 Polímeros semiconductores | |
| 1.2 Aplicaciones de polímeros semiconductores en biosensores | |
| 1.3 Esplenocitos | |
| 1.4 Cultivos celulares en polímeros semiconductores | |
| 1.5 Polipirrol | |

| | |
|---|-----------|
| II. ANTECEDENTES | 5 |
| 2.1 Biosensores | |
| 2.2 Biosensores basados en células | |
| III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 8 |
| IV. HIPÓTESIS | 9 |
| V. OBJETIVOS | 9 |
| 5.1 General | |
| 5.2 Particulares | |
| VI. MATERIAL Y MÉTODOS | 10 |
| 6.1 Síntesis electroquímica de polipirrol | |
| 6.2 Espectroscopía infrarroja | |
| 6.3 Análisis de ángulo de contacto | |
| 6.4 Análisis de conductividad del polipirrol | |
| 6.5 Esterilización de las películas | |
| 6.6 Cultivo celular en polipirrol | |
| a. Líneas inmortalizadas de HEK-293, MCF-7 y NIH-3T3 | |
| b. Células de cultivo primario de bazo de ratón | |
| 6.6.1 Fijación de células con paraformaldehído y glutaraldehído | |

6.6.2 Análisis de la morfología de superficie por SEM

6.6.3 Tinción celular y análisis por microscopía confocal

VII. RESULTADOS **23**

7.1 Voltametría cíclica para obtener polipirrol en película delgada

7.2 Validación de grupos funcionales característicos del polipirrol

7.3 Determinación de mojabilidad/hidrofilia de las películas de PPy

7.4 Conductividad eléctrica

7.5 Crecimiento de células inmortalizadas sobre PPy

7.5.1 Análisis estructural por SEM

7.5.2 Tinciones celulares

7.6 Adherencia y crecimiento de células de cultivo primario

VIII. DISCUSIÓN **45**

IX. CONCLUSIONES **48**

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS **49**

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------|---|
| Ag | Plata |
| AgCl | Cloruro de Plata |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| cm | Centímetros |
| DC | Corriente directa |
| DMEM | Medio Eagle modificado por Dulbecco |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| g | Gramos |
| HEK-293 | Células inmortales derivadas de riñón de embrión humano |
| hrs | Horas |
| IP | Yoduro de propidio |
| IR | Infrarrojo |
| ITO | Óxido de Indio-Estaño |
| KΩ | Kiloohms |
| KBr | Bromuro de Potasio |
| l | Litros |
| LiClO₄ | Perclorato de Litio |
| M | Molar |
| MCF-7 | Células inmortales derivadas de un adenocarcinoma de mama |
| mg | Miligramos |
| min | Minutos |
| ml | Mililitros |
| mM | Milimolar |
| nM | Nanomolar |
| NIH-3T3 | Células inmortales derivadas de fibroblastos murinos |
| PBS | Solución isotónica y amortiguadora de fosfatos |
| PDMS | Polidimetilsiloxano |
| PET | Tereftalato de polietileno |
| PFA | Paraformaldehído |
| PPy | Polipirrol |
| Py | Pirrol |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| s | Segundos |

| | |
|------------|-----------------------|
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| UV | Ultravioleta |
| V | Volts |
| β | Beta |
| μl | Microlitros |
| μg | Microgramos |
| Ω | Ohms |

Lista de figuras y tablas

| Figura | Página |
|--|---------------|
| Fig. 1. Estructura química del polipirrol. | 4 |
| Fig. 2. Operación de un biosensor | 5 |
| Fig. 3. Línea del tiempo de biosensores | 6 |
| Fig. 4. Método de síntesis de polímero | 10 |
| Tabla 1. Número de células sembradas por área | 16 |
| Fig. 5. Gráfica representativa de síntesis de PPy | 23 |
| Fig. 6. Películas sintetizadas de PPy | 24 |
| Fig. 7. Espectro IR de PPy | 25 |
| Fig. 8. Procesamiento de imagen para análisis de ángulo de contacto | 26 |
| Fig. 9. Corrida de programa de análisis de imagen | 26 |
| Tabla 2. Ángulos de contacto en materiales | 27 |
| Tabla 3. Conductividad en materiales | 28 |
| Fig. 10. Curvas de crecimiento celular | 29 |
| Fig. 11. Microscopía electrónica de barrido de células HEK-293 | 31 |
| Fig. 12. Microscopía electrónica de barrido de células MCF-7 | 32 |
| Fig. 13. Microscopía electrónica de barrido de células NIH-3T3 | 33 |
| Fig. 14. El PPy soporta la adherencia de células eucariontes inmortalizadas | 34 |

| | |
|--|----|
| Fig. 15. Estructura de ADN con intercalador molecular | 35 |
| Fig. 16. Proceso de inmunotinción | 36 |
| Fig. 17. Crecimiento de células HEK-293 sobre películas de PPy | 37 |
| Fig. 18. Crecimiento de células NIH-3T3 sobre películas de PPy | 38 |
| Fig. 19. Crecimiento de células MCF-7 sobre películas de PPy | 39 |
| Fig. 20. El PPy soporta la división celular <i>in situ</i> de células HEK-293 | 40 |
| Fig. 21. El PPy soporta la división celular <i>in situ</i> de células NIH-3T3 | 41 |
| Fig. 22. El PPy soporta la división celular <i>in situ</i> de células MCF-7 | 42 |
| Fig. 23. Microscopía electrónica de barrido de esplenocitos de ratón cultivados sobre películas de PPy. | 44 |

RESUMEN

Desde el descubrimiento de la alta conductividad del poliacetileno en 1977 por Heeger, MacDiarmid y Shirakawa (Skotheim y Reynolds 2007), el campo de los polímeros semiconductores intrínsecos se ha expandido de manera considerable, hasta el vasto sector que conocemos hoy en día. Se han buscado las diversas aplicaciones para las que pueden ser utilizados estos polímeros, entre los que se encuentran el crecimiento de células musculares o nerviosas (Gilmore *et al* 2009), la inmovilización de proteínas como la glucosa oxidasa para el sensado de glucosa (Bajpai *et al* 2006), y muchos otros.

La posibilidad de interacción que existe entre las proteínas de una célula y los polímeros es crítica para su uso en aplicaciones médicas y científicas (Gizdavic-Nikolaidis *et al* 2011).

En particular, las propiedades que presenta el polipirrol (hidrofobicidad, homogeneidad, pH, etc.) permiten la adherencia de células, lo cual ha sido explotado para crecer algunos tipos celulares en biomateriales para regeneración de tejidos (Sharma *et al* 2012). Debido a las propiedades únicas de este material, incluyendo su conductividad eléctrica, flexibilidad, y bajo costo, su uso como soporte de biosensores de crecimiento celular ofrecería muchas ventajas con respecto a los sustratos tradicionales, que incluyen principalmente polímeros no conductores y soportes miniaturizables (silicio, polidimetilsiloxano) funcionalizados con biomoléculas de alto valor agregado (Mehling y Tay 2014).

Hasta ahora, se conoce poco sobre la diversidad de estirpes celulares capaces de adherirse y proliferar sobre este polímero conductor intrínseco, y se ha explorado muy poco la viabilidad del mismo para permitir el crecimiento de cultivos primarios (Mehling y Tay 2014), es decir provenientes de un animal. En este trabajo se propuso la investigación del

crecimiento de cultivos celulares sobre polipirrol (PPy) de las líneas inmortalizadas HEK-293 (obtenidas de riñón de embrión humano), MCF-7 (células de cáncer de mama de humano) y NIH-3T3 (fibroblastos de tejido conectivo murino), al igual que cultivos primarios de células de sistema inmune de ratón sano.

La información obtenida permitirá sentar las bases para un futuro desarrollo de biosensores basados en estos polímeros para diversas aplicaciones, tales como el diagnóstico de enfermedades, o la búsqueda de fármacos, sin la necesidad de laboratorios o personal especializado.

ABSTRACT

Since the discovery of high conductivity in polyacetylene in 1977 by Heeger, MacDiarmid and Shirakawa (Skotheim y Reynolds 2007), the intrinsic semiconductive polymers field has expanded in a considerable way, until becoming the wide sector that we know nowadays. There has been a search for different applications for these polymers, among which we can encounter the growth of muscular or nerve cells (Gilmore *et al* 2009), the immobilization of proteins such as glucose oxidase for glucose sensing (Bajpai *et al* 2006) and many others.

The possibility of interaction that exists between cell proteins and polymers is critical for their use in medical and scientific applications (Gizdavic-Nikolaidis *et al* 2011).

Particularly, the properties presented by polypyrrole (hydrophobicity, homogeneity, pH, etc.) allow the adherence of cells, which has been exploited to grow some cell types in biomaterials for tissue regeneration (Sharma *et al* 2012). Due to the unique properties of this material, including its electric conductivity, flexibility, and low cost, its use as a biosensor support for cellular growth would offer many advantages over traditional substrates that include mainly non-conductive polymers and miniaturizable supports (silica, polydimethylsiloxane functionalized with high added value biomolecules (Mehling y Tay 2014).

So far, there is little knowledge about the diversity of cell lineages capable of adhering and proliferating on this intrinsic conductive polymer, and the viability has been little explored to allow the growth of primary cell cultures (Mehling y Tay 2014), this means, obtained from animals. In this work we proposed the study of cell cultures on polypyrrole (PPy) of

immortalized cell lines HEK-293 (obtained from Human Embryo Kidney), MCF-7 (breast cancer cell line) and NIH-3T3 (fibroblasts of murine connective tissue), as well as primary cultures of healthy mouse immune system cells.

The information found will help lay the foundations for a future development of biosensors based on these polymers for different applications, such as disease diagnosis, drug research, etc., without the need for labs or specialized personnel.

I. MARCO TEÓRICO

1.1 Polímeros semiconductores

Los polímeros semiconductores, como su nombre lo indica, son moléculas de cadena larga, formadas por la unión de moléculas individuales (monómeros), las cuales tienen enlaces π alternados a lo largo de su estructura conjugada. En 1977 fue descubierta la conducción eléctrica en el poliacetileno dopado con yodo por Heeger, MacDiarmid y Shirakawa (Karimullah *et al* 2013; Skotheim y Reynolds 2007), la cual permitió a los polímeros entrar en un área de la ciencia que no había sido considerada para éstos, la electrónica.

Los polímeros semiconductores extrínsecos dependen del dopaje con otros materiales conductores (metales, negro de carbón) para ser conductores, sin embargo, los polímeros semiconductores intrínsecos no tienen esa necesidad (Fernández 2003). Para poder considerar a un polímero como semiconductor intrínseco, este debe tener una superposición de orbitales moleculares que permitan que haya electrones deslocalizados, dejando así que haya una conducción eléctrica (Gerard *et al* 2002).

Dentro de los polímeros semiconductores, hay una gran variedad de estos que son biocompatibles como son el politiofeno dopado (Akbulut *et al* 2014; Gerard *et al* 2002; Karimullah *et al* 2013), la polianilina (PANi) (Gerard *et al* 2002; Guo *et al* 2013), el polipirrol (Gerard *et al* 2002; Gürzoy *et al* 2013) solo y en compuestos con poliuretano (Guo *et al* 2013).

La principal ventaja que tienen los polímeros semiconductores es que combinan las propiedades que son atractivas de los polímeros (fácil procesamiento y síntesis, propiedades físicas y químicas ajustables) con las propiedades eléctricas de los metales

(Min *et al* 2013). Los polímeros conductores han demostrado acentuar algunas actividades celulares cuando estas se encuentran en presencia de un campo eléctrico como son el crecimiento y la migración celular (Guo *et al* 2013). Por ende, el uso de los polímeros conductores en Biomedicina se ha consagrado en gran medida a la síntesis de biomateriales de soporte para crecimiento de células, incluyendo neuronas (Thompson *et al* 2006) y cardiomiocitos (Sehgal y Banerjee 2013), además de una gran variedad de aplicaciones, entre las que se encuentran suturas quirúrgicas, dispositivos de fijación ósea, injertos vasculares, sistemas de liberación de medicamentos (Guo *et al* 2013) o como aditivos anticorrosivos, baterías orgánicas, visores electrocrómicos, entre otras para el área electrónica (Contreras 2011).

Se ha comprobado también que es posible mejorar la selectividad de los sensores por la formación electroquímica de capas poliméricas, y que mientras más capas activas del polímero se encuentren sobre el sustrato, mejores señales electroquímicas se pueden obtener comparado con otro tipo de materiales (Del Valle *et al* 2013).

1.2 Aplicaciones de polímeros semiconductores en biosensores

Los biosensores pueden tener diferentes sustratos sobre los cuales se realiza el crecimiento celular, sin embargo, la mayoría de sustratos para biosensores se basa en polímeros no conductores y soportes miniaturizables (silicio, PDMS -Mehling y Tay 2014-) funcionalizados con biomoléculas de alto valor agregado. Por ejemplo, se ha reportado el crecimiento de células sobre PDMS recubierto con poli-L-lisina obtenida a partir de bacterias (Dusseiller *et al* 2005; Liu *et al* 2011). El uso de estas moléculas implica pasos previos de purificación y producción a partir de biorreactores, elevando el costo de los

soportes. Por ello, una mejora importante en parámetros de operación se podría alcanzar aplicando una capa de polímero semiconductor, el cual permite una miniaturización efectiva, además de un fácil moldeado, y conductividad.

1.3 Esplenocitos

Los esplenocitos son células provenientes del bazo, entre las que se encuentran monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T y B. Cada una de estas células tiene diferentes funciones en el sistema inmune innato. Los monocitos viajan en el flujo sanguíneo hasta llegar a un tejido, al cual se adhieren y se diferencian en macrófagos. Siendo los macrófagos uno de los tres tipos de células fagocíticas y células presentadoras de antígeno, al mostrar en su superficie moléculas extrañas al organismo, se produce una reacción que permite la proliferación de linfocitos para actuar como efectores de la respuesta inmune (Janeway *et al* 2001). Las interacciones que se han mostrado entre linfocitos y macrófagos se han podido observar *in vivo* e *in vitro* (Albrecht *et al* 1978). Se busca comprobar la adherencia y funcionalidad de este tipo de células utilizando el PPy como sustrato.

1.4 Cultivos celulares en polímeros semiconductores

Una gran cantidad de células dependen de la adherencia a una superficie sólida para su proliferación, es por eso que es muy importante conocer las características físicas del sustrato en el que se va a realizar el cultivo celular. Cuando se trata de polímeros como sustrato, la superficie que estos poseen tendrá una influencia significativa en las funciones que desarrollarán las células (Saltzman 2000). La adherencia celular es diferente en

polímeros si tienen superficies lisas o presentan fallas como son bordes o ranuras llamadas guías de contacto, sin embargo, no todas las células tienen la misma preferencia por las guías de contacto ya que depende de la longitud, tamaño y profundidad de los defectos (Meyle *et al* 1995), por lo que no necesariamente debe buscarse un sustrato completamente homogéneo.

1.5 Polipirrol

El polipirrol es uno de los polímeros semiconductores intrínsecos más estudiados, ya que presenta una gran estabilidad térmica y ambiental, simplicidad en síntesis electroquímica, modificación de sus propiedades eléctricas, además de ser un buen protector contra corrosión de electrodos metálicos (Kotanen *et al* 2013; Gürzoy *et al* 2013).

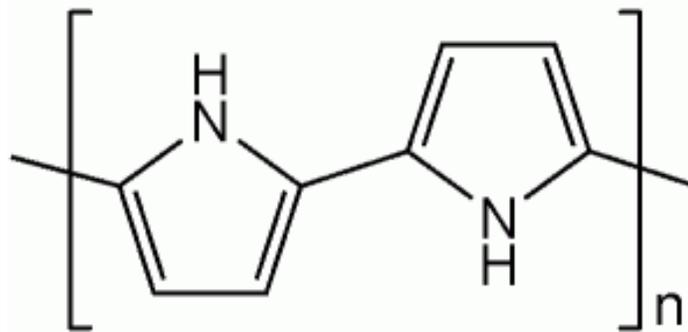


Figura 1 Estructura química del polipirrol.

Algunas de las aplicaciones para las que se utilizan los biosensores con PPy como soporte incluyen la determinación de lactosa, evitándose así el uso de procesos que, en general, consumen mucho tiempo, son caros y dependen de una intensa labor cuando consiste de aplicaciones de calidad de control rutinarias (Gürzoy *et al* 2013).

II. ANTECEDENTES

2.1 Biosensores

Los biosensores son comúnmente definidos como dispositivos analíticos que utilizan un sistema de reconocimiento biológico para usar como blanco moléculas o macromoléculas (Perumal y Hashim 2013). Estos son instrumentos de medición que utilizan procesos químicos y biológicos para medir algún resultado. Constan de componentes biológicos y fisicoquímicos y permiten el análisis de distintos parámetros por medio de una transformación de energía en los procesos químicos o biológicos.

Típicamente los biosensores constan de 3 componentes (ver Figura 2): (1) el detector, el cual identifica el estímulo; (2) el transductor, que convierte el estímulo en una señal medible; y (3) el sistema de procesamiento de señales que involucra una amplificación de la señal, y la presentación apropiada del resultado (Perumal y Hashim 2013).

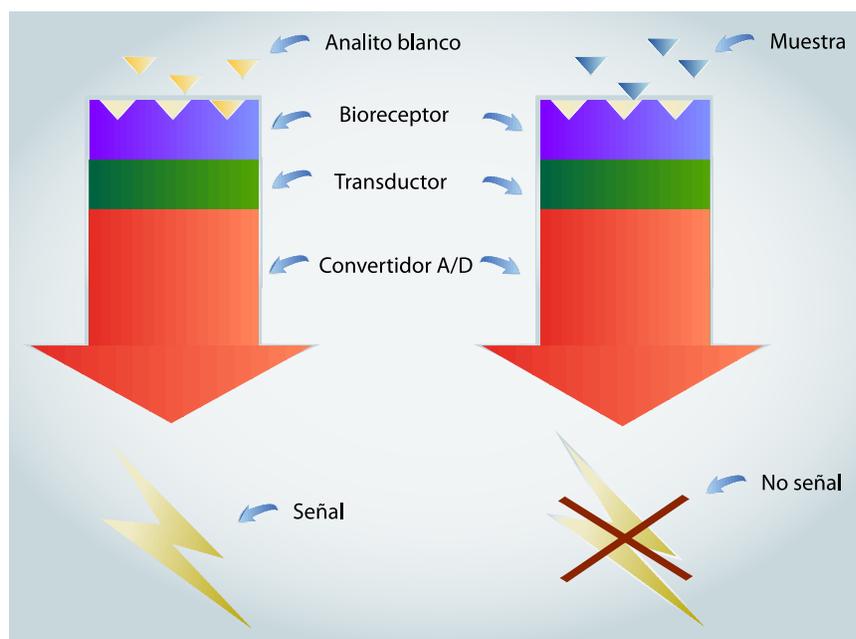


Figura 2 Operación del biosensor. Se muestran las distintas partes que lo conforman (Perumal y Hashim 2013).

En la Figura 3 podemos observar una línea del tiempo con los tipos de biosensores y el año en que se desarrollaron por primera vez. Los primeros biosensores que fueron comercializados de manera exitosa fueron aquellos que se basaban en sensores electroquímicos para analitos múltiples (Pohanka y Skládal 2008).

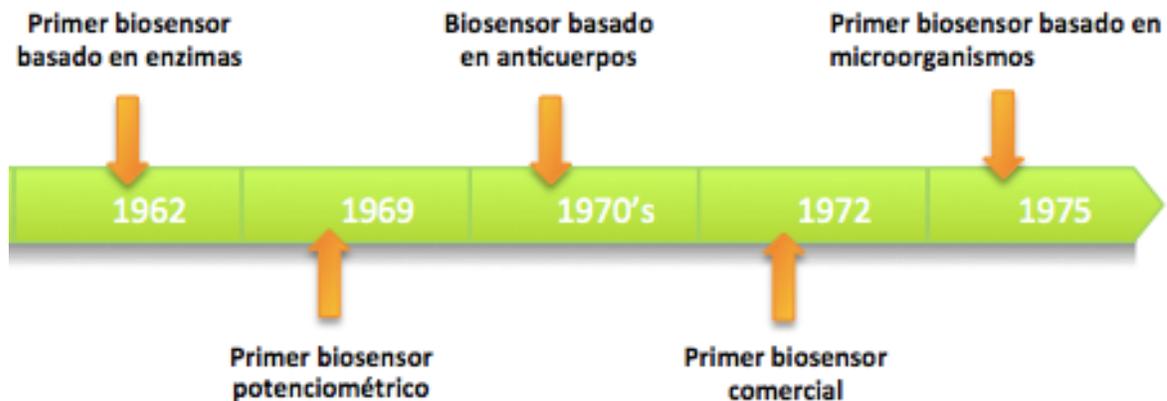


Figura 3 El primer biosensor propuesto por Clark y Lyons en 1962 medía el decremento de concentración de oxígeno en proporción a la concentración de glucosa. En 1969 se desarrolló el primer biosensor potenciométrico, mientras que unos años después comenzaron a inmovilizarse anticuerpos para hacer la detección de analitos. La compañía Yellow Springs Instrument Company (YSI) fue la primera en comercializar los biosensores con un funcionamiento de detección amperométrica de peróxido de hidrógeno. En 1975 se comienzan a utilizar bacterias, hongos y células animales y vegetales en biosensores (Setford y Newman 2005; Zhao 2007).

2.2 Biosensores basados en células

La creciente necesidad de herramientas de diagnóstico para patógenos, toxinas o compuestos bioactivos en diversas aplicaciones como clínica o farmacéutica, nos ha llevado a la búsqueda de nuevos métodos de detección que no se basen en métodos de ácidos nucleicos, inmunoquímicos o de galvanizado (Banerjee y Bhunia 2009). Por ejemplo, los métodos actuales para analizar genotoxicidad presentan algunas desventajas cuando se desean hacer estudios de manera rápida ya que los estudios pueden tardar varias semanas

para ser realizados, o no se tiene la cantidad necesaria de compuestos para hacer estudios de manera rápida y en el tiempo requerido (Zager *et al* 2010).

Los biosensores basados en células son dispositivos portables que contienen células vivas que permiten monitorear cambios inducidos por exposición a perturbaciones, y algunos de los métodos utilizados para realizar las mediciones son registros eléctricos extracelulares, mediciones ópticas, genómicas y proteómicas (Stenger *et al* 2001).

Los biosensores basados en moléculas responden únicamente a un tipo de molécula, y esto hace que el sensor sea altamente sensible y específico (Konopinska *et al* 2013), mientras que los biosensores basados en células pueden detectar diferentes moléculas que tienen funciones similares. Entre las funciones principales de los biosensores basados en células se encuentra la fácil detección de la concentración de alguna sustancia y el análisis primario de genotoxicidad de sustancias químicas (Banerjee y Bhunia 2009; Zager *et al* 2010). En particular, la posibilidad de miniaturización de un biosensor ofrece una gran cantidad de ventajas, como reducción del área de difusión y de tiempo de análisis y la posibilidad de realizar análisis de muestras con volúmenes muy pequeños (Konopinska *et al* 2013).

Las ventajas principales que se pueden obtener de realizar biosensores basados en células con polímeros semiconductores como sustrato incluyen una reducción significativa de costo de producción, velocidad de análisis, y gracias a la posibilidad de miniaturización, disminuyen la cantidad de sustancia a analizar.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe una gran necesidad para el análisis en tiempo real y libre de marcadores en la biología celular (Karimullah *et al* 2012). Debido a que se deben hacer análisis a grandes escalas y de manera eficiente y rápida, la investigación de métodos para poder realizar estos estudios es una necesidad creciente.

Una de las opciones que se tiene para realizar este tipo de análisis es la espectroscopia de impedancia celular (CIS, *cellular impedance spectroscopy*), la cual permite observar las propiedades eléctricas de las células sin necesidad de realizar un marcaje; sin embargo, esta técnica tiene sus limitaciones ya que únicamente funciona bajo algunas condiciones de trabajo o se aplica para algunas partes de la célula (Fabregat-Santiago *et al* 2004).

La mayoría de las disposiciones para espectroscopia de impedancia celular donde se tienen metales como electrodos, trabajan a frecuencias donde no importa una alta impedancia, sin embargo, las bajas frecuencias pueden tener información importante que puede ayudar al análisis e incluso podría distinguir el tipo de células que se encuentran adheridas.

Se busca un material para ser utilizado como soporte de crecimiento celular y además sea conductor para poder realizar análisis de proliferación celular, así como comprobar el efecto que se tiene en las células en presencia de alguna sustancia.

IV. HIPÓTESIS

El polímero semiconductor intrínseco polipirrol es un buen sustrato para soporte y crecimiento de distintos tipos de células.

V. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar el uso de polipirrol, un polímero conductor intrínseco, como soporte para el crecimiento de células de distintas estirpes.

5.2 Particulares

1. Sintetizar y caracterizar películas delgadas de polipirrol por el método electroquímico y determinar las condiciones óptimas bajo las cuales se pueden hacer reproducibles las propiedades de las películas.
2. Crear distintas líneas inmortalizadas de células de origen eucarionte sobre PPy, al igual que células obtenidas de bazo de ratón sano (cultivo primario).
3. Estandarizar protocolos para la observación de células sobre PPy mediante microscopías confocal y electrónica de barrido.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Síntesis electroquímica de polipirrol

Se realizó la síntesis del polipirrol de manera electroquímica. La síntesis se hace a temperatura ambiente sobre soportes de tereftalato de polietileno (PET) recubierto con una capa de 100 nm de óxido de indio-estaño (ITO –Sigma-Aldrich Ref. 639303–), la cual actúa como sustrato conductor durante la electrodeposición del polipirrol (Patois *et al* 2012).

Se preparó una solución con 0.3 ml de monómero pirrol (Sigma-Aldrich Ref. 131709), 0.53g de perclorato de litio (Sigma-Aldrich Ref. 205281) y 50 ml de agua destilada. Se agregaron los reactivos en un vaso de precipitados y se mantuvieron en agitación durante 5 minutos. Posteriormente, se colocaron cortes de 1 cm² de PET cubierto con ITO en un electrodo de trabajo conectado al potenciostato, mientras que en el contraelectrodo se colocó una malla de platino, utilizando un electrodo de referencia de plata y cloruro de plata (Ag/AgCl). El potenciostato utilizado fue de la marca ACM modelo Gill AC.

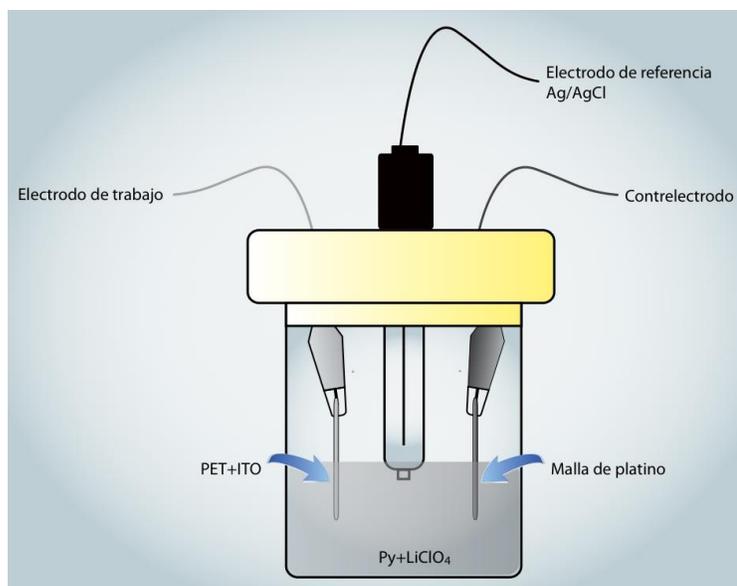


Figura 4 Esquema representativo del método de síntesis del polímero en solución acuosa.

Las muestras fueron preparadas por la técnica voltamétrica, a 1000mV durante 1 minuto. Se pudo hacer reproducible el método de síntesis tomando en cuenta una gran cantidad de precauciones al momento de colocar el sustrato:

- El monómero debe ser transparente antes de comenzar la reacción, si no es así, debe ser destilado.
- Se deben de colocar con cuidado los sustratos de PET-ITO en el caimán conectado al electrodo de trabajo, con el ITO dirigido hacia la malla de platino.
- Una vez colocada la tapa con los 3 electrodos conectados sobre el vaso de precipitados, no debe haber contacto entre los caimanes y la solución.
- La malla de platino en el contraelectrodo debe estar a la misma altura que la película de PET-ITO.
- No se deben de provocar burbujas durante la agitación de la solución.
- Cada vez que se sintetiza una película, es necesario volver a agitar la solución durante 5 minutos.
- Ninguno de los electrodos deben tocarse entre sí, y tampoco debe haber contacto con las paredes del vaso de precipitados.

6.2 Espectroscopía infrarroja

Se prepararon pastillas de PPy con KBr; para esto se colocó KBr en polvo sobre la película de polipirrol y con ayuda de un pistilo de ágata fueron incorporados ambos componentes, posteriormente la mezcla se pasó a una pastilladora y se le aplicó una presión de 7.5 toneladas con ayuda de una prensa.

Se utilizó un espectrómetro de infrarrojo mediano y cercano con transformada de Fourier (FTIR) marca Bruker, modelo Vector 33, para realizar análisis por espectroscopia FTIR de las muestras de polipirrol en el intervalo de 4000 a 700 cm^{-1} .

6.3 Análisis de ángulo de contacto

Una de las propiedades más importantes de los sustratos que permiten la adherencia de células es su mojabilidad. El estudio de esta propiedad usualmente involucra como información primordial el ángulo de contacto el cual indica el índice de mojabilidad que se presenta cuando un sólido y un líquido entran en contacto (Yuan y Lee 2013; Mindroiu *et al* 2013).

Para realizar el análisis de ángulo de contacto se desarrolló un programa con ayuda del entorno de programación Matlab2011b que permite hacer la medida por medio de imágenes. El programa se basa en ecuaciones sencillas de punto pendiente (Ecuación 1) y la ecuación de ángulo entre dos rectas (Ecuación 2).

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \quad (1)$$

$$\theta = \frac{\tan^{-1}(m_1 - m_2)}{1 + m_1 m_2} \quad (2)$$

El programa desarrollado es el siguiente:

```
clear      //borra todo lo impreso en la pantalla
clc        //borra las variables anteriormente guardadas
L=imread('ppy1.bmp'); //lee la imagen con el nombre que se haya
                //guardado
I=rgb2gray(L); //convierte la imagen que se este utilizando a
                //tonos de grises
imshow(I)  //muestra la imagen en tono de grises en la pantalla
hold       //mantiene esta imagen en pantalla y guardada para
                //poder hacer la lectura
ind=1;     //crea una nueva constante
```

```

[x,y]=size(I) //nos dice el tamaño de la imagen en matriz de
              //píxeles
for a=1:x     //se abre un ciclo for para el largo de la imagen
  for b=1:y   //se abre un ciclo for para la altura de la
              //imagen
    s=I(a,b); //asigna 's' al valor de la coordenada
    if s==255 //valora si la coordenada guardada en s es
              //igual a 255, lo que significaría que es un
              //punto blanco.
      sprintf('el valor de la coordenada %d,%d es %d',b,a,s)
      r(ind,:)= [b a] //guarda el valor de la coordenada
      ind=ind+1; //suma 1 a la constante para continuar el for
      plot(b,a, '.'); //se marca el punto blanco en la imagen
                  //original
    end //termina el if
  end //termina el for de b
end //termina el for de a
hold //se mantiene la imagen mientras se hacen los cálculos
%% Cálculo del ángulo
m1=(r(2,2)-r(1,2))/(r(2,1)-r(1,1)) //ecuación punto pendiente 1
m2=(r(3,2)-r(2,2))/(r(3,1)-r(2,1)) //ecuación punto pendiente 2
beta=atan((m2-m1)/(1+m2*m1)) //ángulo entre 2 rectas
angle=rad2deg(beta) //se cambia el resultado de radianes a
                  //grados

```

6.4 Análisis de conductividad del polipirrol

El PPy presenta una conductividad que se encuentra alrededor de los 100 Scm^{-1} en la literatura, la cual no varía en diferentes estados ambientales (Gerard *et al* 2002). Se realizó un análisis por el método de las cuatro puntas en polipirrol sintetizado sobre soportes de PET recubierto con ITO por método electroquímico. Para esto, se tomaron muestras de las películas de PPy sintetizadas sobre PET-ITO y después fueron desprendidas cuidadosamente del sustrato para medir la conductividad eléctrica sólo de la película de polipirrol.

El equipo utilizado fue un medidor de resistencia Mitsubishi Loresta – GP (MCP-T610) en el laboratorio de Química de Materiales II Cinvestav, Querétaro.

6.5 Esterilización de las películas

Las películas fueron esterilizadas por distintos métodos antes de realizar el cultivo celular. Uno de ellos fue la esterilización por medio de una lámpara de luz UV de 254 nm por 5 minutos en cada lado de la película. También fueron esterilizadas con etanol al 70%, sin embargo, este método no resultó en películas que permitieran adherencia de células de manera homogénea. Se realizaron pruebas sobre las películas para intentar esterilizar por calor húmedo en autoclave, pero las películas no resisten el calor y se desprenden del sustrato de PET-ITO. Por lo anterior, la esterilización con luz UV fue el método de elección.

6.6 Cultivo celular en polipirrol

Todos los procedimientos de cultivo celular fueron realizados en condiciones de esterilidad. Células adherentes de líneas inmortalizadas fueron depositadas utilizando un protocolo típico para el cultivo de células adherentes. Se estandarizó el proceso en placas de cultivo FluoroDish (World Precision Instruments, China), recubiertas con una capa de gelatina estéril al 0.1% a fin de establecer la densidad adecuada de cada estirpe celular sobre superficies equivalentes a las películas de PPy. La gelatina debe dejarse 16 hrs en incubación a 37°C para que se adhiera al cristal.

En nuestro caso, la síntesis de películas de polipirrol fue obtenida sobre superficies de PET-ITO de 2.5x1 cm², para posteriormente ser recortadas en cuadrados de 1 cm² de PET-ITO-PPy. Las películas de PPy crecidas sobre PET-ITO tienden a flotar sobre el medio en el que se colocan, por lo que fue necesario adherirlas con dos gotas de gelatina al

0.1% a cubreobjetos de vidrio o directamente en las cajas de cultivo, previa esterilización por luz UV como se mencionó en el apartado anterior.

Líneas inmortalizadas de HEK-293, MCF-7 y NIH-3T3

Las células fueron obtenidas a partir de cultivos en cajas de 10 cm de diámetro a confluencias del 75 – 85%. Para ello, se absorbió el medio por vacío, con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio. Con una pipeta graduada se agregaron 7 ml de PBS (1000 ml de H₂O megapura, 8g de NaCl, 0.2g de KCl, 1.15g de Na₂HPO₄ y 0.2g de KH₂PO₄) en la caja para lavarla, y eliminar proteínas y péptidos residuales. Después de absorber nuevamente con vacío, se agregaron 2 ml de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich Ref. T4049), se agitó ligeramente la caja y se introdujo a la incubadora por 5 minutos. Una vez pasados los 5 minutos se observaron las células en un microscopio invertido para confirmar que ya no estuvieran adheridas sobre la caja. En caso de ser necesario, se incubaron por lapsos de 5 minutos a 37°C cuantas veces fuera necesario, se transfirieron a un tubo Falcon de 50 ml, y se agregaron 8 ml de DMEM (Gibco Ref. 11995-065) suplementado con suero fetal bovino al 10%, resuspendiendo de inmediato a fin de bloquear la proteólisis. Se tomaron 10 µl de suspensión celular para realizar un conteo de células en cámara de Neubauer. Paralelamente, la suspensión fue centrifugada a 1500rpm por 5 minutos. El medio con tripsina-EDTA fue retirado y el sedimento celular fue resuspendido en un volumen apropiado para obtener una suspensión celular con la concentración necesaria. Las concentraciones utilizadas para cada tipo de sustrato y línea celular se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1 Número de células sembradas por área de cultivo.

| Soporte | Línea celular | Número de células | Volumen |
|--|-------------------|-------------------|---------|
| 2 Películas de PPy de 1 cm ² sobre caja de cultivo de 65 mm Ø | HEK-293 / NIH-3T3 | 80 000 | 6 ml |
| 2 Películas de PPy de 1 cm ² sobre caja de cultivo de 65 mm Ø | MCF-7 | 300 000 | 6 ml |
| Película de PPy de 1 cm ² en pozos de 15.6mm | HEK-293 / NIH-3T3 | 6 000 | 1.5 ml |
| Película de PPy de 1 cm ² en pozos de 15.6mm | MCF-7 | 30 000 | 1.5 ml |

Para obtener la mejor confluencia sobre el PPy se mantuvieron los cultivos durante 72 horas en incubación. Finalmente, las células fueron fijadas con paraformaldehído y preparadas para análisis microscópicos como se indica más adelante.

Células de cultivo primario de bazo de ratón

Se utilizaron ratones macho de 6 – 8 semanas de edad. Los ratones fueron sacrificados de acuerdo con los protocolos del Bioterio del Instituto de Neurobiología (UNAM, Campus Juriquilla), y sumergidos en etanol al 70%. Los individuos fueron secados con papel absorbente y disectados para la obtención del bazo. Para ello se realizó una pequeña incisión para dejar expuesto el órgano, se extrajo con ayuda de pinzas y tijeras estériles y se colocó en 10ml de medio RPMI sin suero en una caja de Petri estéril. Se perfundió cada bazo con 5ml del medio RPMI sin suero. Se transfirieron los 10 ml de la suspensión y se colocaron en un tubo Falcon de 15 ml, en donde se dejaron sedimentar los restos de tejido por 5 minutos. Se tomó el sobrenadante, y se traspasó a otro tubo Falcon, en

el cual se centrifugó a 1500rpm por 5 minutos. Se aspiró el medio con ayuda de una pipeta conectada al vacío y se resuspendió el sedimento con las células en 1 ml de solución de lisis de eritrocitos, preparado con 250 ml de H₂O, 2.08 g de NH₄Cl, 0.25 g de KHCO₃ y 0.009 g de sal sódica de etilendiaminotetraacetato. La suspensión se incubó con esta solución a temperatura ambiente por 5 minutos. Enseguida, se realizaron 3 lavados con 10 ml de medio RPMI, centrifugando cada vez para descartar el medio. Las células fueron resuspendidas en 10ml de RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (volumen/volumen), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco 1140-050), 1% de piruvato de sodio 100 mM (Gibco 11360-070), β-mercaptoetanol al 0.1% (Gibco 21985), penicilina (100 UI/ml) y estreptomina (100µg/ml). Finalmente, los esplenocitos totales fueron analizados al microscopio en una cámara de Neubauer, tiñéndolos previamente con azul de tripano (Bio-Rad Ref. 145-0013) a fin de checar que la viabilidad fuera $\geq 95\%$.

Los esplenocitos murinos fueron cultivados sobre polipirrol en tres pasos:

- (1) Después de su obtención, se colocaron 1.5 ml de una suspensión con 300 000 esplenocitos en soportes de 1 cm² de polipirrol colocados dentro de pozos de 15.6 mm Ø, y se incubaron durante 24 horas en presencia de Concanavalina A (3 mg/ml) para permitir la adhesión de monocitos;
- (2) Los soportes de polipirrol fueron transferidos a nuevos pozos, asegurando así la ausencia de monocitos adheridos a la superficie del pozo, y se agregó una suspensión de esplenocitos no adherentes (1.5 ml de medio con 100,000 esplenocitos, preparados mediante incubación de 400,000 esplenocitos totales en presencia de Concanavalina A durante 24 hrs sobre una caja de cultivo de 10 cm Ø); se agregaron 3µl de una solución de Concanavalina A a 1 mg/ml, y se dejó incubar durante 24 y 48 hrs;

(3) La capacidad de los soportes para permitir la activación de monocitos y la consecuente proliferación de linfocitos no adherentes fue monitoreada por medición de actividad enzimática intracelular. Para ello, se utilizó el ensayo colorimétrico de la actividad de la oxidoreductasa mitocondrial dependiente de NAD(P)H, mediante el ensayo de MTT (Mosmann, 1983). El ensayo fue realizado transfiriendo 100 µl del sobrenadante de cada cultivo dentro de placas de 96 pozos, antes de agregar los reactivos de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Sigma-Aldrich Ref. CGD1, St. Louis, EUA). Paralelamente, los soportes de polipirrol con macrófagos adheridos fueron fijados con paraformaldehído para su observación por microscopía de fluorescencia.

6.6.1 Fijación de células con paraformaldehído y glutaraldehído

Las células crecidas sobre las películas fueron lavadas dos veces con PBS 1×, y fijadas con paraformaldehído al 2% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS, dejando incubar cada lavado durante 5 minutos a temperatura ambiente. Alternativamente, las muestras fueron fijadas mediante un proceso similar con una solución de glutaraldehído al 2% en solución amortiguadora de cacodilatos 0.2M.

6.6.2 Análisis de la morfología de superficie por SEM

Las películas deben ser deshidratadas 24 hrs antes del análisis. Para realizar la deshidratación las películas deben ser transferidas secuencialmente a diferentes concentraciones de etanol (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%) durante 15 minutos en cada paso. Finalmente se recubren las películas con oro mediante la

pulverización catódica (sputtering), utilizando un equipo de Electron Microscopy Sciences, modelo EMS 550.

Después de realizar la deshidratación, es necesario secar por punto crítico para poder retirar todo el líquido de las células, permitiendo así el análisis por microscopía electrónica de barrido. Una vez revisado el equipo (Pelco Critical Point Dryer model CPD2) y comprobado que no existan fugas, se coloca la tapa del equipo y se comprueba que la tapa esté bien sellada con el O-ring. Es necesario abrir la válvula de llenado y esperar a que se cubran $\frac{3}{4}$ partes de la cámara, cerrar la válvula y abrir la válvula de ventilación hasta que ya no haya líquido en la cámara. Terminando esta fase, se continúa con el proceso de llenado y vaciado de la cámara $\frac{3}{4}$ partes hasta alcanzar una temperatura de 4°C. A continuación se colocan las muestras en canastillas y se insertan en la cámara del equipo, y se continúa con el proceso de llenado y vaciado de la cámara, sin embargo, a partir de este punto, no se debe de permitir que el líquido en la cámara baje más allá de las muestras (estas deben estar siempre cubiertas de líquido) este proceso se repite hasta que ya no salga etanol en la manguera de expulsión. Al no haber más etanol, se vuelve a llenar la cámara hasta $\frac{3}{4}$ partes, sin ventilar en esta ocasión, y se activa el botón de calentamiento de cámara. La presión y temperatura en la cámara deben aumentar, y la presión debe ser controlada con la perilla de ventilación alrededor de 1200 psi. Al alcanzar una temperatura de 40°C en la cámara, se ajusta la perilla de ventilación para que disminuya la presión a un ritmo de 100 psi por minuto hasta llegar a 0 psi para evitar daños estructurales a las células.

La morfología de las películas de PPy fue analizada antes y después de realizar la esterilización con UV al igual que antes y después de crecidas las células en la superficie de las películas. Este análisis se realizó en un equipo JEOL JSM-6060LV en un área de 1 cm².

6.6.3 Tinción celular y análisis por microscopía confocal, de epifluorescencia y Apotome

Debido a la opacidad que posee el polímero, no es posible observar la adherencia de células mediante microscopía óptica. En consecuencia, diferentes fluorocromos fueron utilizados para poder observarlas con ayuda de un microscopio confocal.

A continuación se presentan los protocolos de tinción para cada uno de los métodos utilizados.

- **Tinción con calceína:** se preparó una solución de calceína 200 μM , mezclando un volumen de calceína 2000 μM en PBS 10 \times y 9 volúmenes de medio DMEM completo. Se retiró el medio de cultivo de las películas y se agregó la solución de calceína dejando incubar durante 30 minutos; se retiró el medio de tinción y se realizaron 2 lavados con PBS 1 \times , aspirando cada vez con un micropipeteador (manualmente). Finalmente, las células fueron fijadas con paraformaldehído, como se describió en el punto anterior.
- **Tinción fluorescente de anticuerpos:** para la tinción del citoesqueleto, se tiñeron las células con un anticuerpo monoclonal anti-beta-actina (Abcam, Ref. ab6276), preparado en ratón, y se reveló la presencia de anticuerpos mediante un segundo anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón, ligado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Abcam Ref. ab97022). Para ello, se retiró el medio de cultivo de las películas y se agregó 1 ml de solución permeabilizante (100 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 0.1% Nonidet® P-40), dejando incubar durante 5 minutos. Enseguida, se agregó 1 ml de una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en buffer de tinción (recién preparada), dejando incubar durante 10

minutos a temperatura ambiente. Después de retirar la solución y realizar 3 lavados con PBS 1× por 5 minutos, las películas fueron incubadas con una solución de albúmina sérica bovina al 1% y tritón al 0.1% en PBS por 60 minutos. Se agregó 0.1 ml de una solución del anticuerpo primario (anti-beta-actina, Abcam Cat. ab 6276) diluido 1:500 en solución de albúmina sérica bovina y tritón en PBS, dejando incubar por 30 minutos. Después de 3 lavados con PBS, se agregó 0.005 ml de una solución de anticuerpo secundario (anti-inmunoglobulina de ratón acoplado a FITC, Abcam Cat. ab97022, diluido 1:250 en 1.25 ml de suero), dejando incubar por 15 minutos. Por último, las películas fueron lavadas con PBS 1× y mantenidas a 4°C al abrigo de la luz hasta su análisis.

El mismo proceso se utilizó para la tinción de colágeno en las células. Se agregó un anticuerpo primario anti-colágeno I monoclonal crecido en ratón (Abcam Cat. Ab90395) y un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina de ratón (H+L) (Invitrogen Ref. A10521) obtenido de cabra, ligado a CY3.

- **Tinciones nucleares:** Se utilizaron dos intercaladores de ADN, el DAPI (Sigma-Aldrich Ref. D9542), con máximos de excitación a 358 nm (lámpara de mercurio) y de emisión a 461 nm, y el yoduro de propidio (PI –Sigma-Aldrich Ref. P4864-), con máximos de excitación a 535 nm (lámpara de mercurio) y de emisión a 617 nm. Estos agentes fueron manejados con los protocolos de manejo y desecho correspondientes a agentes de alta toxicidad.

Para la tinción con DAPI, las células fueron permeabilizadas con buffer de tinción (solución de 0.1% de tritón 100× en PBS 1×), e incubadas con una solución 300 nM de DAPI en PBS, colocando una gota de 100µl sobre cada película e incubando por

5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS, aspirando el medio con ayuda de un micropipeteador.

Para la tinción con PI, las células permeabilizadas se incubaron con 100 μ l de una solución 1:1500 de yoduro de propidio (1 mg/ml disuelto en buffer de tinción) por 5 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, las películas fueron lavadas 3 veces con PBS 1 \times y fijadas con paraformaldehído.

Las muestras fueron observadas por microscopía de epifluorescencia en un equipo de iluminación estructurada ApoTome.2 (Zeiss, Jena, Alemania), o bien en un microscopio confocal Axiovert 200 LSM 510 meta, Zeiss, equipado con un láser multilínea de Argón/2, el cual cubre desde 488 nm a 561 nm. El objetivo usado fue EC Plan-Neofluar 20 \times /0.50 M27. Los divisores utilizados fueron HFTKP 700/488. Para observar FITC y PI se utilizó un filtro colector LP (LongPass) 501-544 y un Pinhole de 98 μ m. En las muestras con DAPI usamos un filtro colector BP (BandPass) 435-485 y un Pinhole abierto desde 284 μ m hasta 1000 μ m.

VII. RESULTADOS

7.1 Voltametría cíclica para obtener polipirrol en película delgada

El equipo utilizado para realizar la síntesis fue un potenciostato ACM modelo Gill AC con entradas para dos electrodos de trabajo, un contraelectrodo y un electrodo de referencia.

En la Figura 5 se muestra cómo varía la corriente al realizar la síntesis electroquímica de PPy, de acuerdo con un monitoreo realizado con el programa Sequencer. Como puede observarse, la corriente tiene un comportamiento similar para todas las síntesis del polímero. Para que la película sea homogénea y tenga un grosor adecuado para permitir el crecimiento celular, y no se desprege al ser lavada o durante el cultivo celular, el diagrama de síntesis debe ser similar al de la Figura 5.

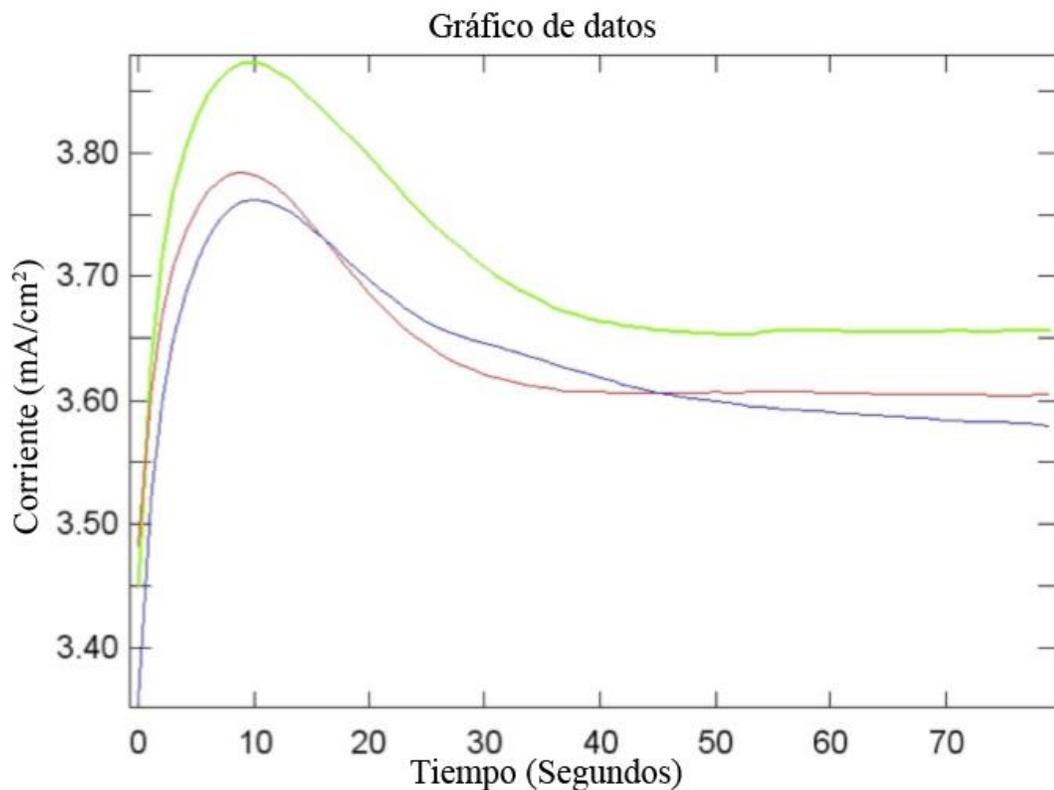


Figura 5 Variación de la corriente con respecto al tiempo de síntesis del PPy.

La homogeneidad en la película se puede observar desde que se estabiliza la polimerización por medio de la corriente (alrededor de los 50s), sin embargo, en esta etapa resultaría muy delgada comparada con la talla de células eucariontes, por lo que las rugosidades podrían ser insuficientes para la adherencia celular.

Gracias a estos cuidados, se pueden sintetizar películas de PPy con espesor controlado promedio de 5.869 μm , basándose únicamente en el tiempo que se mantienen con corriente en el electrodo de trabajo. En la Figura 6 se pueden observar algunas películas de PPy sintetizadas por este método a 1000mV durante 70 segundos.

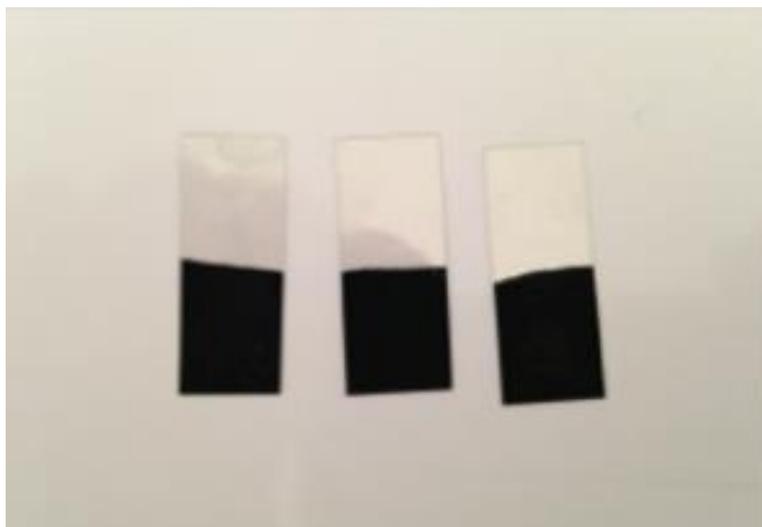


Figura 6 Películas de PPy sintetizadas por método electroquímico a 70 segundos.

7.2 Validación de grupos funcionales característicos del polipirrol

Las películas sintetizadas fueron analizadas por espectroscopía FTIR (espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier) para confirmar la presencia de los picos característicos del PPy. Este análisis fue realizado por transmitancia en pastillas de PPy con KBr, ya que el KBr no absorbe radiación en la región del IR.

Las diferentes gráficas del espectro IR en la Figura 7 muestra los picos de películas realizadas con dos distintos tiempos de síntesis electroquímica, lo cual demuestra que la obtención del polímero PPy no depende del tiempo de polimerización. Sin embargo, el PPy podría variar en otras de sus características, tales como su conductividad, resistencia al lavado, o hidrofilia, por lo que, en lo subsecuente, las películas fueron sintetizadas en 70 s de incubación, y analizadas en cuanto a sus características de conductividad e hidrofilia.

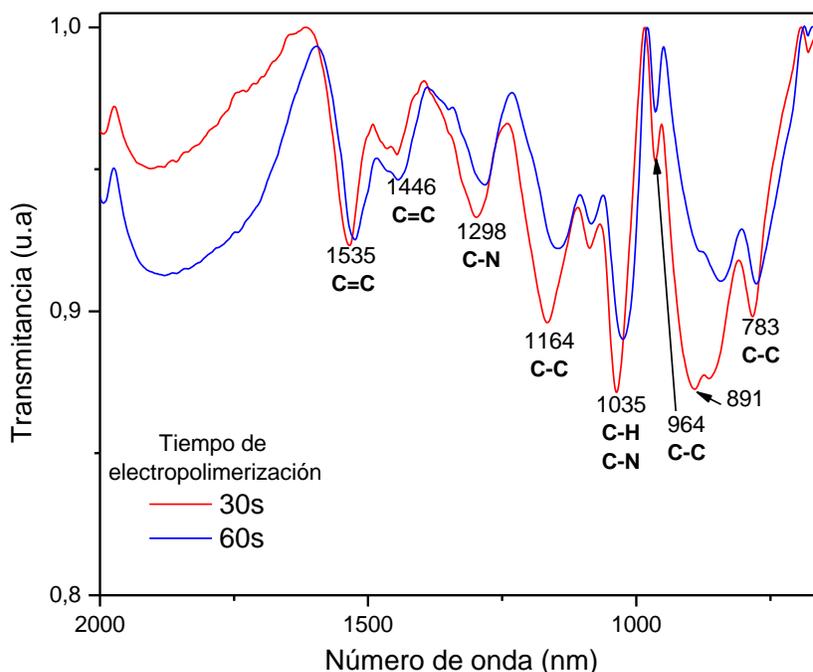


Figura 7 Espectro infrarrojo de las películas de PPy. Se señalan las bandas características de absorción del compuesto así como los estiramientos correspondientes a cada uno de los enlaces marcados.

7.3 Determinación de mojabilidad/hidrofilia de las películas de PPy

Para el análisis de hidrofilia de las películas se realizaron mediciones del ángulo de contacto, las cuales se realizaron mediante análisis de fotografías con ayuda del entorno de programación Matlab. En la Figura 8 a) podemos observar la imagen original que se lee por Matlab y b) la imagen ya procesada, mientras que en la Figura 9 se puede ver el resultado de las coordenadas obtenidas y el ángulo de contacto del sustrato.

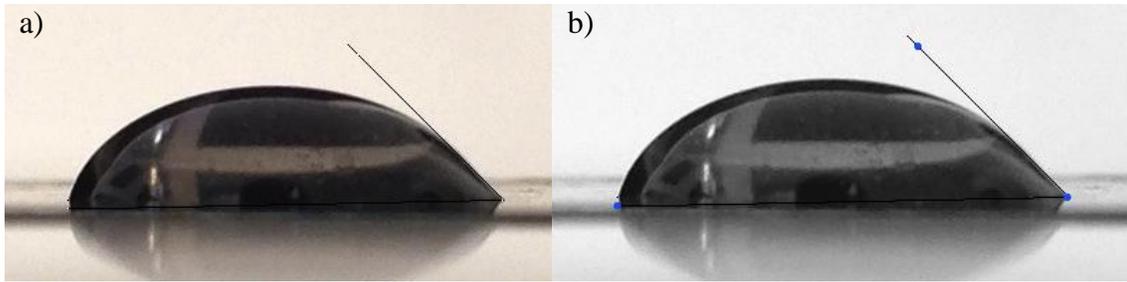


Figura 8 Medición del ángulo de contacto en soportes de PPy. a) Imagen antes de procesamiento por Matlab, b) Imagen después de procesamiento.

```

Current plot held
x = 200
y = 402
ans = el valor de la coordenada 255,37 es 255
r =
255    37
ans = el valor de la coordenada 359,142 es
255
r =
255    37
359   142
ans = el valor de la coordenada 46,148 es 255
r =
255    37
359   142
46   148
Current plot released
m1 = 1.0096
m2 = -0.0192
beta = -0.8093
angle = 46.3723

```

Figura 9 Procesamiento de la imagen en la cual se obtiene el ángulo de contacto del soporte.

Se obtuvo un promedio de ángulo de contacto de 46.64° para las 34 películas de PPy analizadas por este método. En la Tabla 2 podemos observar una comparación de los ángulos de contacto de diferentes materiales con el del polipirrol obtenido en este proyecto.

Tabla 2 Comparación de ángulo de contacto en distintos materiales (Stangegaard *et al* 2006).

| Material | Ángulo de contacto |
|--------------------|------------------------------|
| PPy (experimental) | $46.64^\circ \pm 8.35^\circ$ |
| Teflón | 110° |
| PDMS | 109° |
| Caja de cultivo | $58^\circ \pm 3^\circ$ |

El ángulo de contacto óptimo es distinto para cada línea celular, sin embargo, el ángulo de contacto que presenta una mejor adherencia para los fibroblastos se encuentra entre 50° y 60° (Kim *et al* 2007), aunque empresas como Corning Life Sciences afirma que la línea celular HEK-293, al igual que los fibroblastos, incrementan su adhesión a sus superficies de bajo ángulo de contacto ($12.3^\circ - 16.3^\circ$).

7.4 Conductividad eléctrica

La resistividad eléctrica promedio de $1.614 \Omega \cdot \text{cm}$ del polipirrol, una conductividad de 0.6195 S/cm , y una resistencia por cuadro de $2.784 \text{ K}\Omega$ son más altas que aquellas encontradas en la literatura de cerca de $2.67 \times 10^{-3} \text{ S/m}$ (Gerard *et al* 2002; Strover *et al* 2013). En la Tabla 3 podemos observar una comparación de la conductividad eléctrica de distintos materiales como el silicio y vidrio, con el valor obtenido experimentalmente del PPy (Mitchel 2004).

Tabla 3 Comparación de conductividad en distintos materiales.

| Material | Conductividad |
|--------------------|-------------------------------------|
| PPy (experimental) | $6.195 \times 10^{-1} \text{ S/cm}$ |
| Silicio | $4.3 \times 10^{-4} \text{ S/cm}$ |
| Vidrio (silicio) | $< 10^{-10} \text{ S/cm}$ |

7.5 Crecimiento de células inmortalizadas sobre PPy

Se sembraron tres estirpes de células inmortales adherentes sobre el polímero, a fin de explorar la adherencia que este permitía. Como se mencionó anteriormente, la mojabilidad de un sustrato es una de las características importantes para permitir adherencia. Sin embargo, cada línea celular presenta requerimientos diferentes para adherirse a una superficie, y existen algunos soportes que permiten la adherencia de ciertos tipos celulares, pero no de otros (Halldorsson *et al* 2015; Wiederhorn *et al* 2011). En particular, se eligieron 3 líneas de células inmortalizadas, cuya proliferación permitiría observar su adhesión sobre el sustrato durante su crecimiento. Varios reportes indican que las líneas NIH-3T3 y HEK-293 son capaces de crecer en soportes distintos, incluido el vidrio (Wiederhorn *et al* 2011), aunque dicho crecimiento no es necesariamente reproducible.

Durante el presente trabajo nos dedicamos a implementar un método para analizar el crecimiento celular sobre superficies de PPy. El crecimiento presentado fue homogéneo para las líneas celulares HEK-293 y NIH-3T3, sin embargo, la proliferación de la línea MCF-7 fue más dispersa, pero como se puede observar en las imágenes de tinciones

celulares y por microscopía electrónica en las siguientes secciones, hubo adherencia de todas las líneas celulares y de las células obtenidas de bazo de ratón sano.

La adherencia y crecimiento celular fue analizado por medio de ensayos MTT, realizados por triplicado a las 24, 48 y 72 horas de la siembra, con una cantidad inicial de 6,000 células en el caso de las líneas HEK-293 y NIH-3T3 y con 30,000 células para la línea MCF-7. En la Figura 10, se pueden observar las gráficas obtenidas para cada una de las líneas celulares.

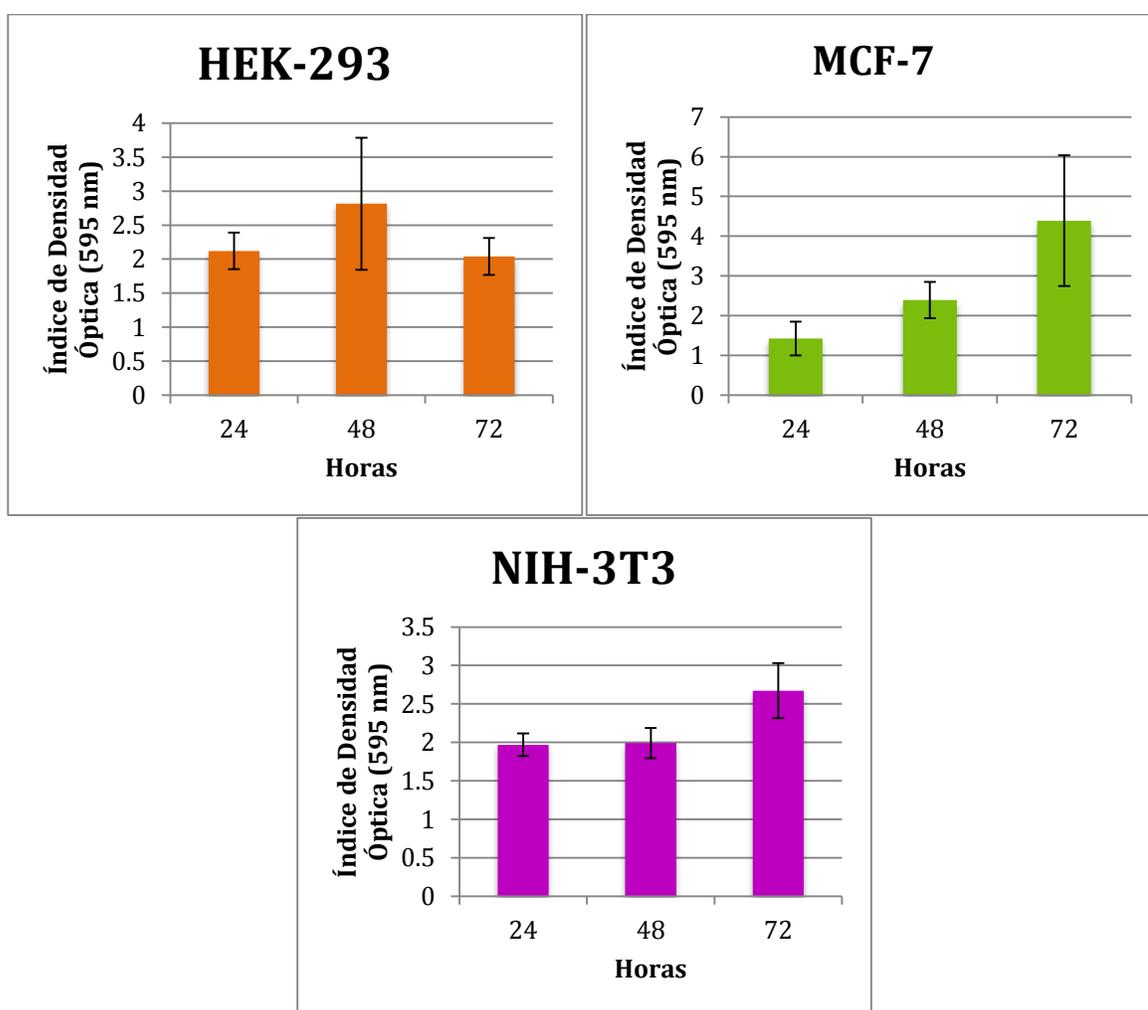


Figura 10 Curvas de crecimiento de las células adheridas sobre PPy analizadas por ensayos de MTT.

7.5.1 Análisis estructural por SEM

En las Figuras 11, 12 y 13 se puede observar el polímero con los distintos cultivos celulares crecidos en la superficie y adheridos a la película. Las células se encuentran adheridas principalmente en los defectos de la superficie como se mencionó en la sección 2.3.

En los acercamientos de cada línea celular podemos observar en los filipodios de las células que permiten que se mantengan en esta posición, lo que indica que hay adherencia celular en la película.

7.5.2 Tinciones celulares

Las tinciones celulares se realizaron con el fin de observar las células adheridas al polímero ya que éste es muy oscuro y no permite hacer el análisis de las células por microscopía óptica.

Dentro de las tinciones utilizadas se utilizaron los siguientes métodos para marcar las células:

- **Internalización pasiva de calceína.** (Sigma-Aldrich Ref. C0875-5G) A 37°C, se transporta de manera pasiva a través de la membrana celular, debido a su talla pequeña. Absorbe en 495nm (lámpara de luz azul) y emite en 515nm, dentro del rango del verde (Figura 14).

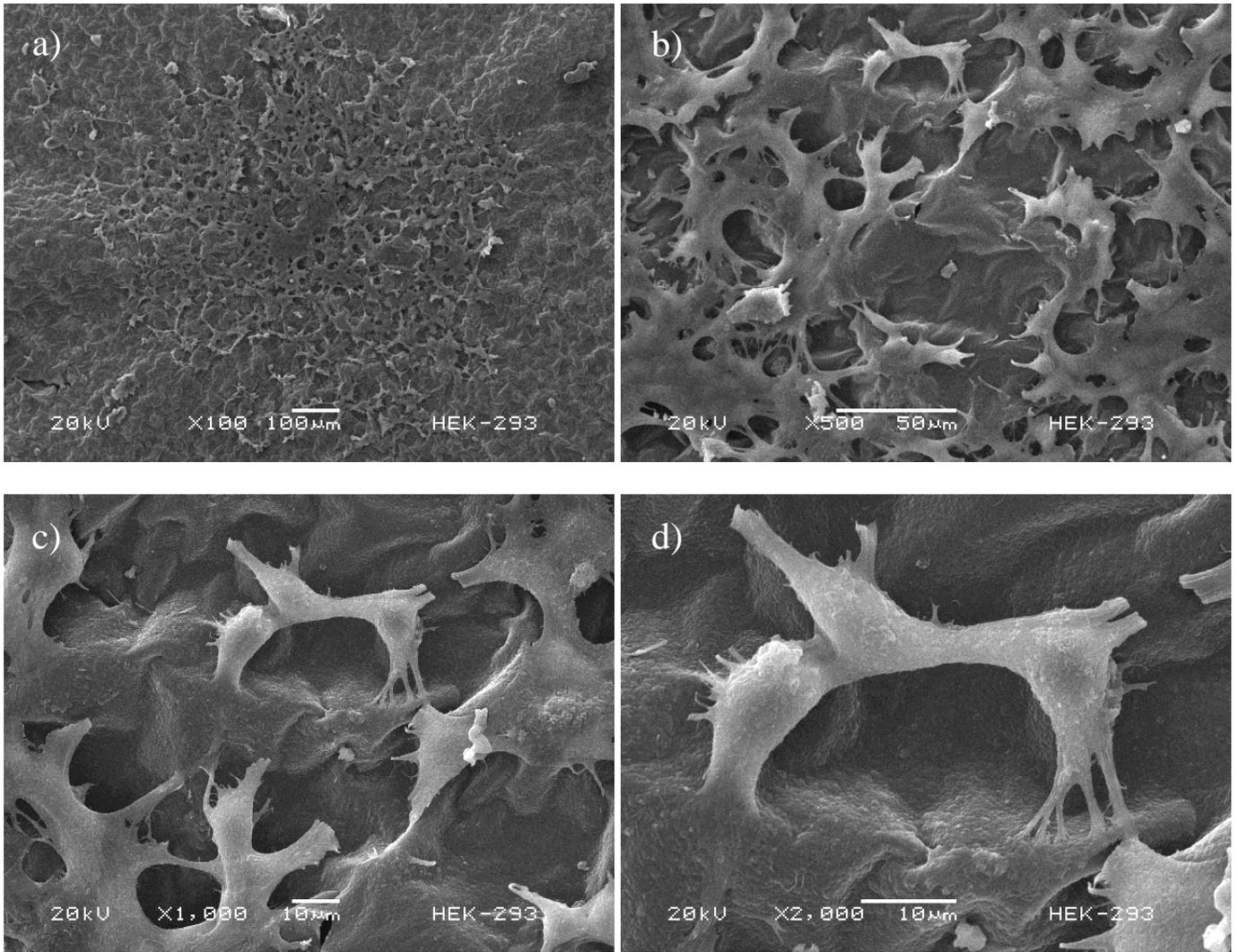


Figura 11 Microscopía electrónica de barrido de células HEK-293. Imágenes de células de la línea inmortalizada HEK-293, células derivadas de riñón de embrión humano, cultivadas durante 72 hrs., y preparados para observación al microscopio electrónico de barrido. En el acercamiento de la imagen d) se pueden observar las miofibrillas adheridas al polímero.

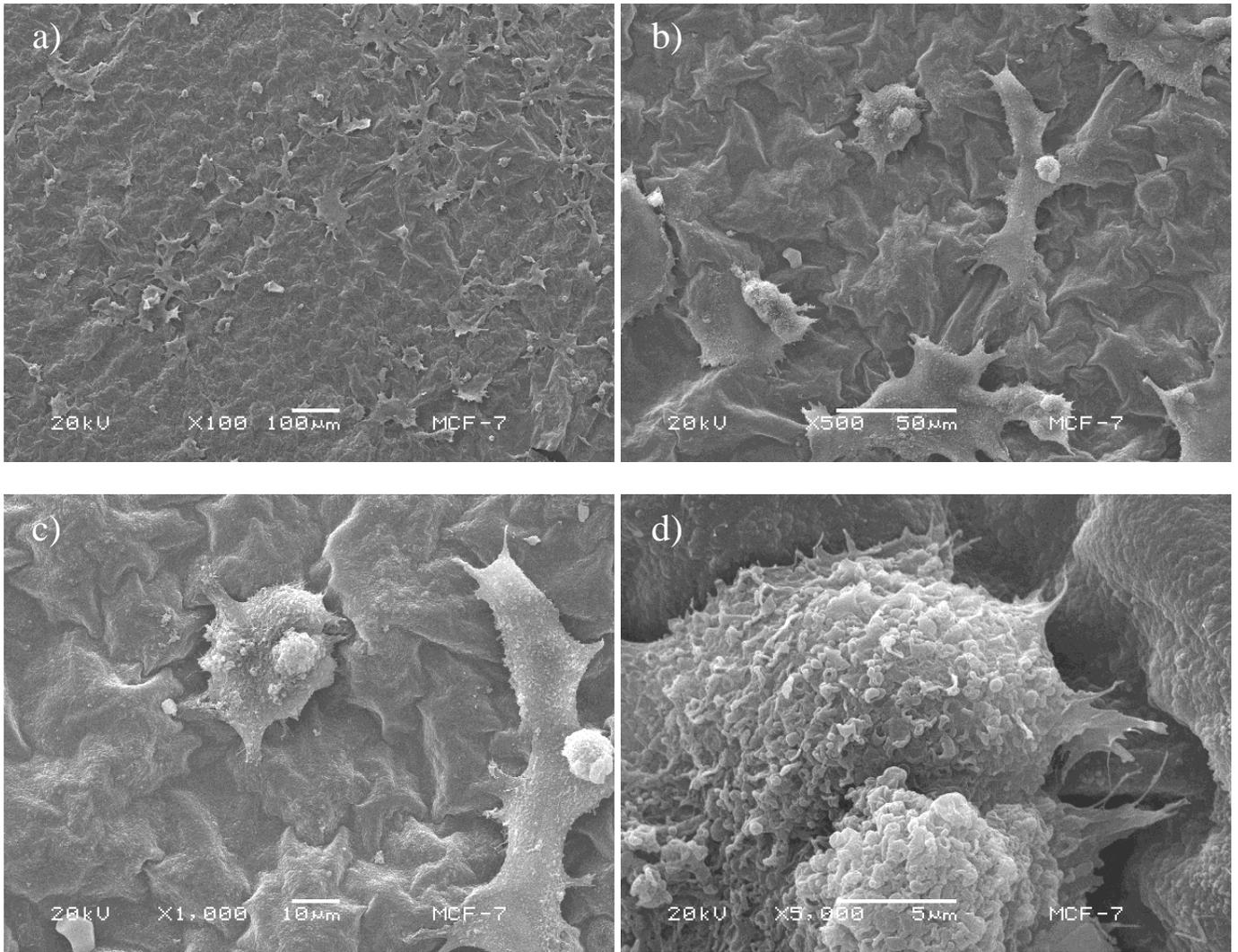


Figura 12 Microscopía electrónica de barrido de células MCF-7. Imágenes de células de la línea inmortalizada MCF-7, células derivadas de cáncer de mama, cultivadas durante 72 hrs., y preparados para observación al microscopio electrónico de barrido. En el acercamiento de la imagen d) se pueden observar las miofibrillas adheridas al polímero.

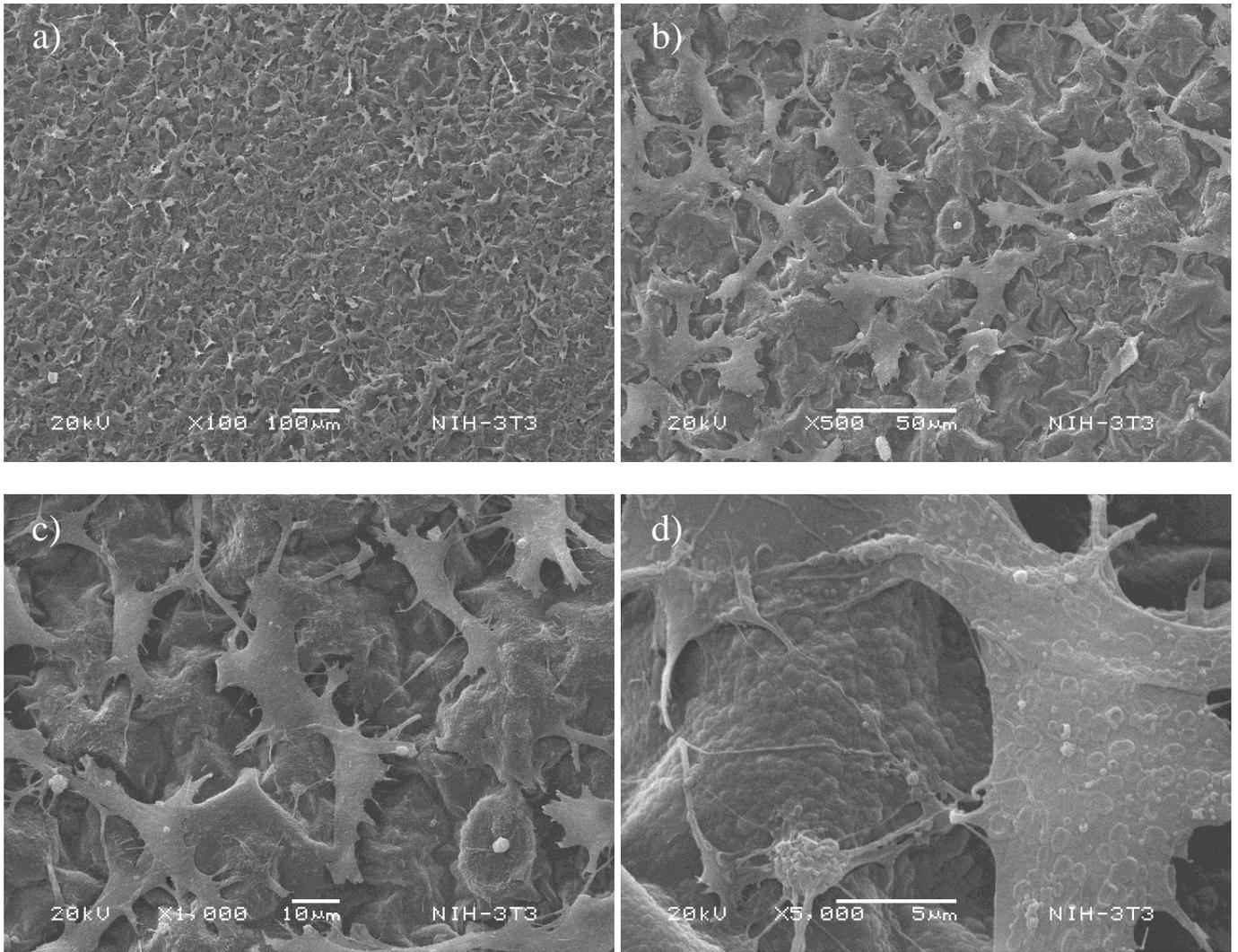


Figura 13 Microscopía electrónica de barrido de células NIH-3T3. Imágenes de células de la línea inmortalizada NIH-3T3, derivada de fibroblastos adherentes embrionarios de ratón, cultivados sobre PPy por 72 hrs., y preparados para observación al microscopio electrónico de barrido. En el acercamiento de la imagen d) se pueden observar las miofibrillas adheridas al polímero.

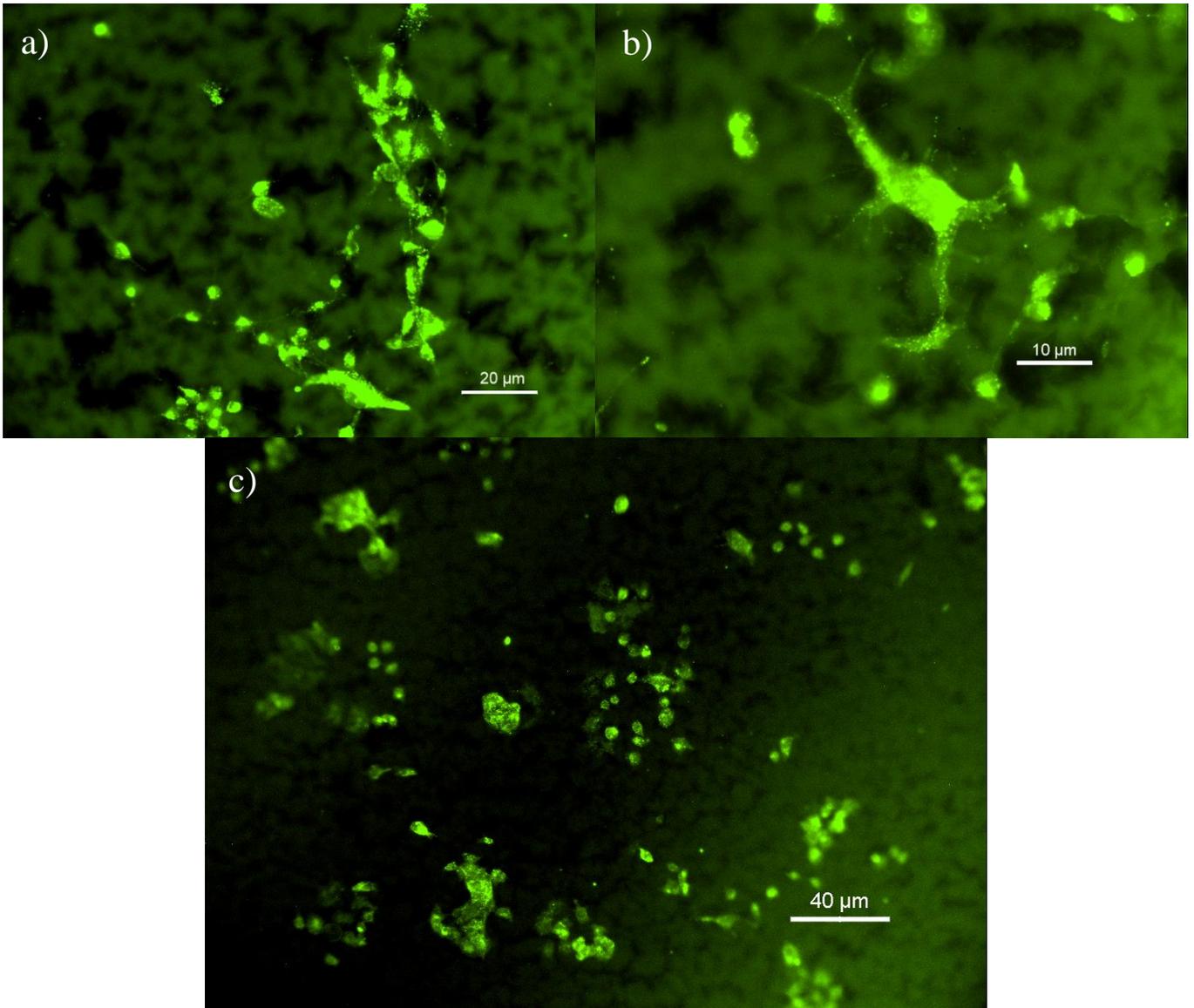


Figura 14 El PPy soporta la adherencia de células eucariontes inmortalizadas. Células NIH-3T3 (a y b) y MCF-7 (c) cultivadas durante 48 hrs., marcadas con calceína durante 30 min, fijadas con paraformaldehído al 2% y observadas al microscopio de epifluorescencia.

- **Tinción de núcleos mediante intercaladores de ADN.** Los intercaladores son moléculas que se agregan al ADN o ARN de manera intercalada (Figura 15), usualmente utilizados para detener la replicación, sin embargo, en este caso utilizamos moléculas fluorescentes para permitir la observación por microscopía

confocal de las zonas de la célula donde se encuentran ácidos nucleicos. DAPI: (4', 6-diamino-2-fenilindol) se une a ADN en zonas ricas en Adenina y Timina. Tiene un máximo de absorción en una longitud de onda de 358nm y emite a 461nm, lo que indica que absorbe en UV y emite en azul. PI: yoduro de propidio. Se une a ácidos nucleicos. Su absorción se encuentra en los 535nm y su emisión en 617nm.

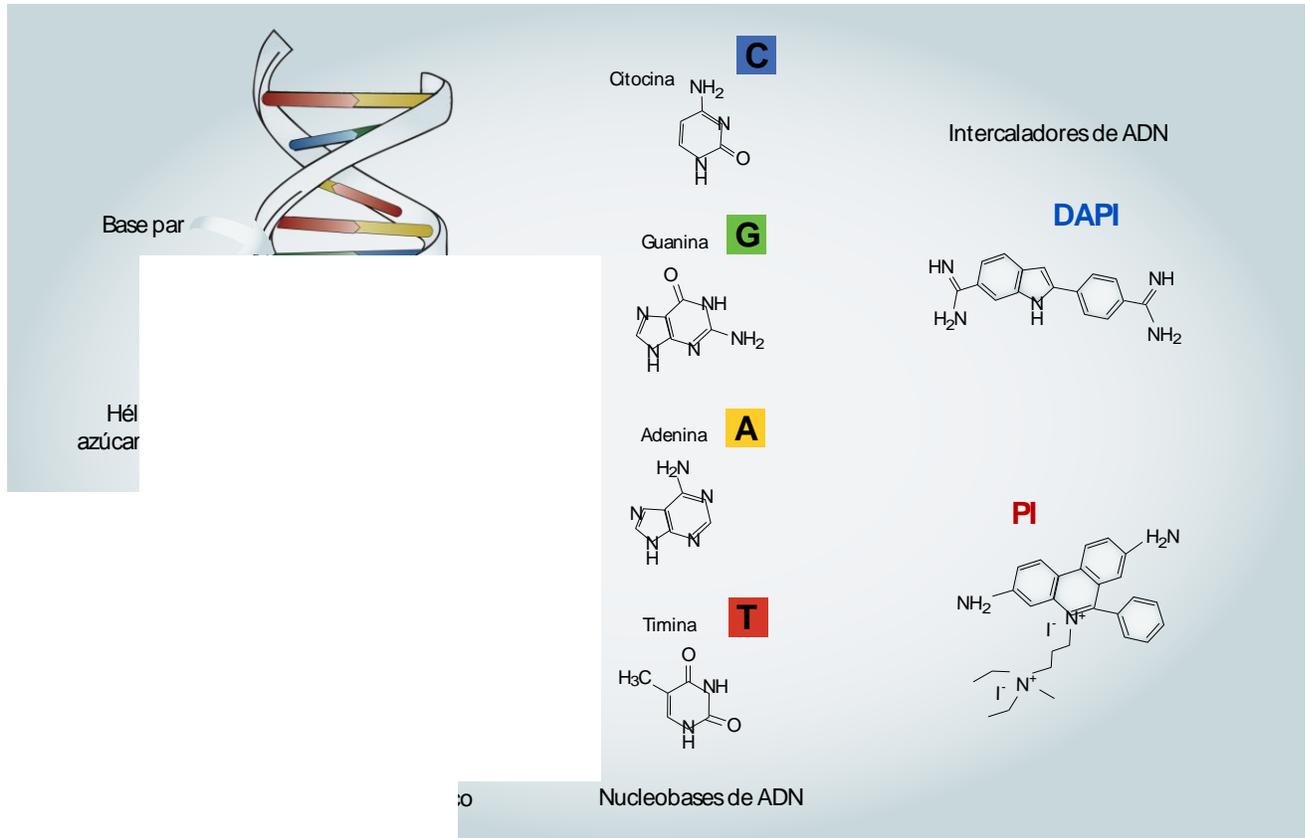


Figura 15 Representación de la estructura de ADN con intercaladores moleculares.

- **Inmunotinción de citoesqueleto.** En la Figura 16 podemos observar el proceso de inmunotinción con isotiocianato de fluoresceína (FITC). El FITC tiene un punto máximo de absorción en 492nm y una emisión a los 518nm, absorbiendo y emitiendo en el rango del verde.

Las imágenes de tinciones celulares (Figuras 17, 18 y 19) nos indican que las tres líneas celulares utilizadas se adhieren a las películas de PPy, se muestra también una

proliferación de las tres líneas celulares, logrando teñir células incluso que se encuentran en estado mitótico, y presentando una adherencia de las nuevas células al mismo polímero (Figuras 20, 21 y 22).

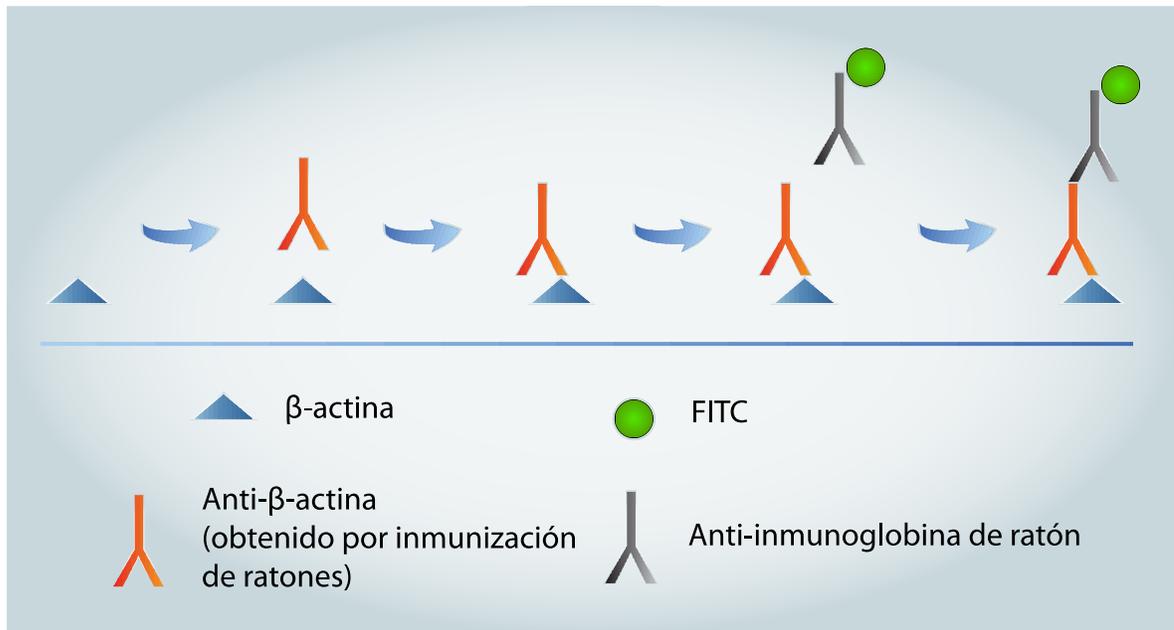


Figura 16 Esquema representativo de la inmunotinción realizada. Se agrega una solución con un anticuerpo anti-beta-actina (obtenido en ratón) a las películas con las células adheridas. Estos anticuerpos se unen a la beta-actina, la cual es un componente esencial del citoesqueleto (Bunnell *et al* 2011). Posteriormente se agrega una solución con un anticuerpo secundario (anti-inmunoglobulina de ratón) el cual posee una molécula de FITC (fluorescente) en la región constante. El anticuerpo secundario captura al anticuerpo primario, y después de varios lavados, la película mantiene únicamente aquellos anticuerpos con FITC adheridos. Esto permite hacer el análisis por fluorescencia del citoesqueleto.

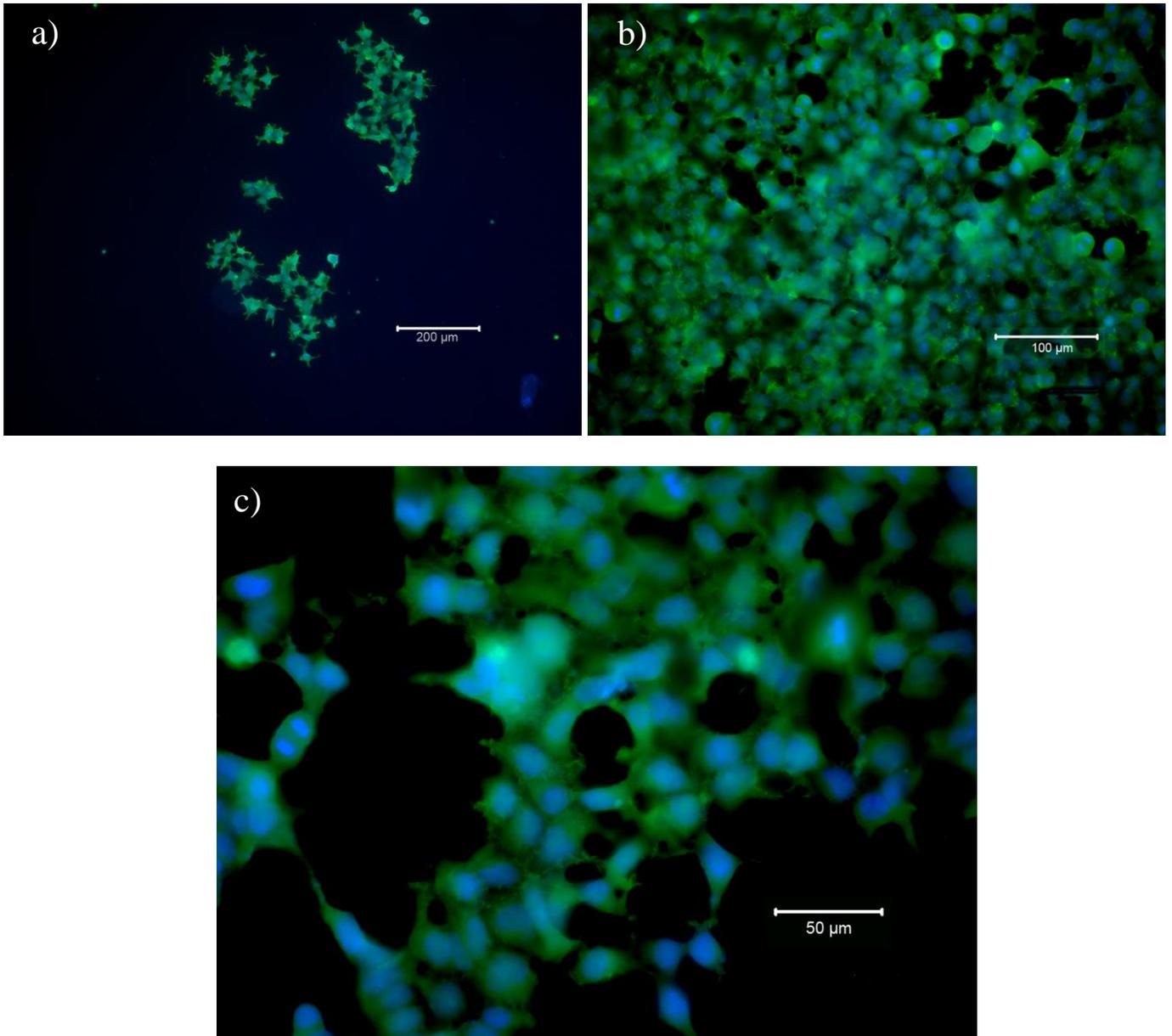


Figura 17 Crecimiento de células HEK-293 sobre películas de PPy. Las células fueron cultivadas sobre PPy, fijadas con paraformaldehído 2% y marcadas con anticuerpo anti-actina acoplado a FITC (verde), y con tinción nuclear con DAPI (azul). Se muestran imágenes de cultivos a las 72 hrs. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio ApoTome (Zeiss).

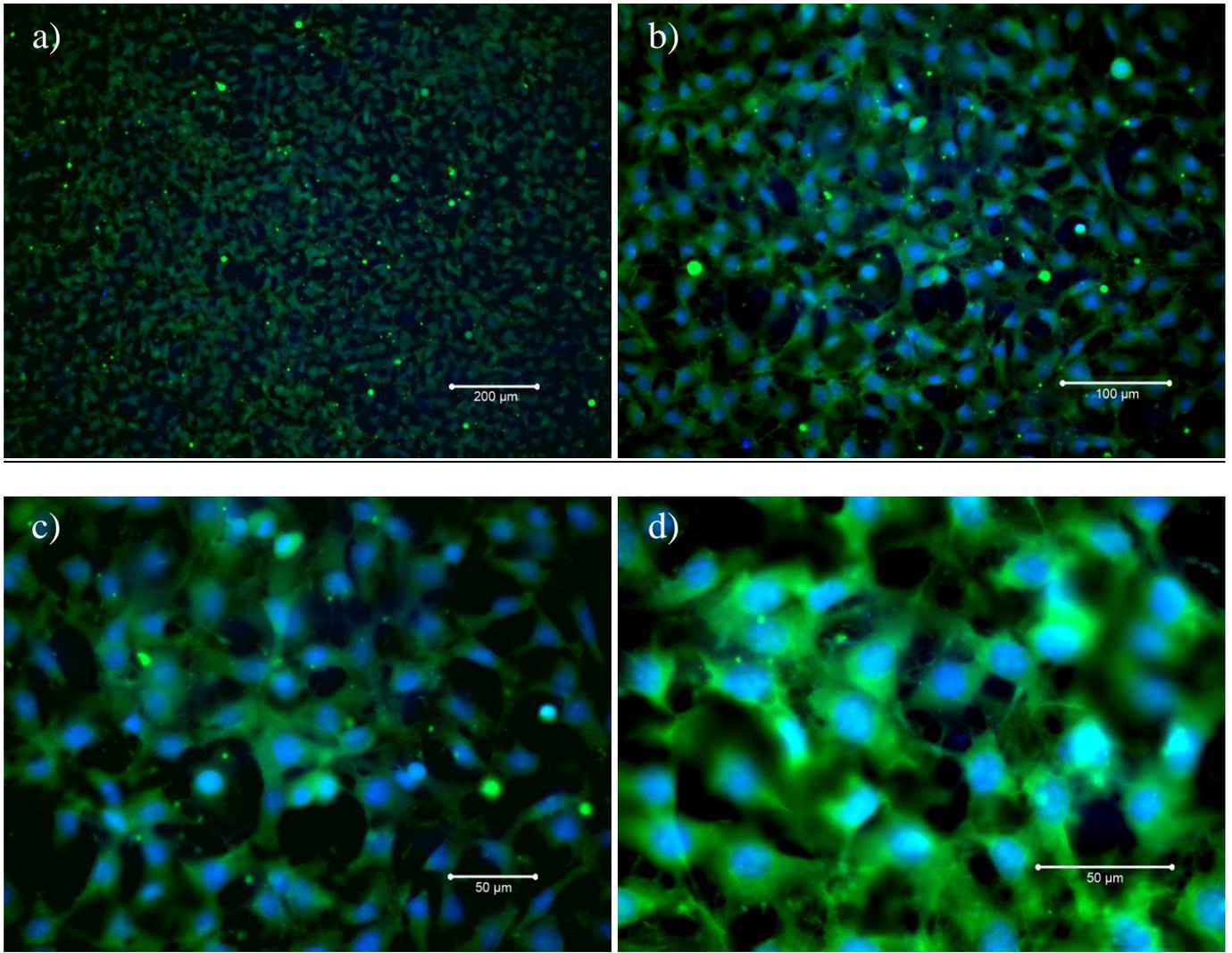


Figura 18 Crecimiento de células NIH-3T3 sobre películas de PPy. Las células fueron cultivadas sobre PPy, fijadas con paraformaldehído 2% y marcadas con anticuerpo anti-actina acoplado a FITC (verde), y con tinción nuclear con DAPI (azul). Se muestran imágenes de cultivos a las 72 hrs. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio ApoTome (Zeiss).

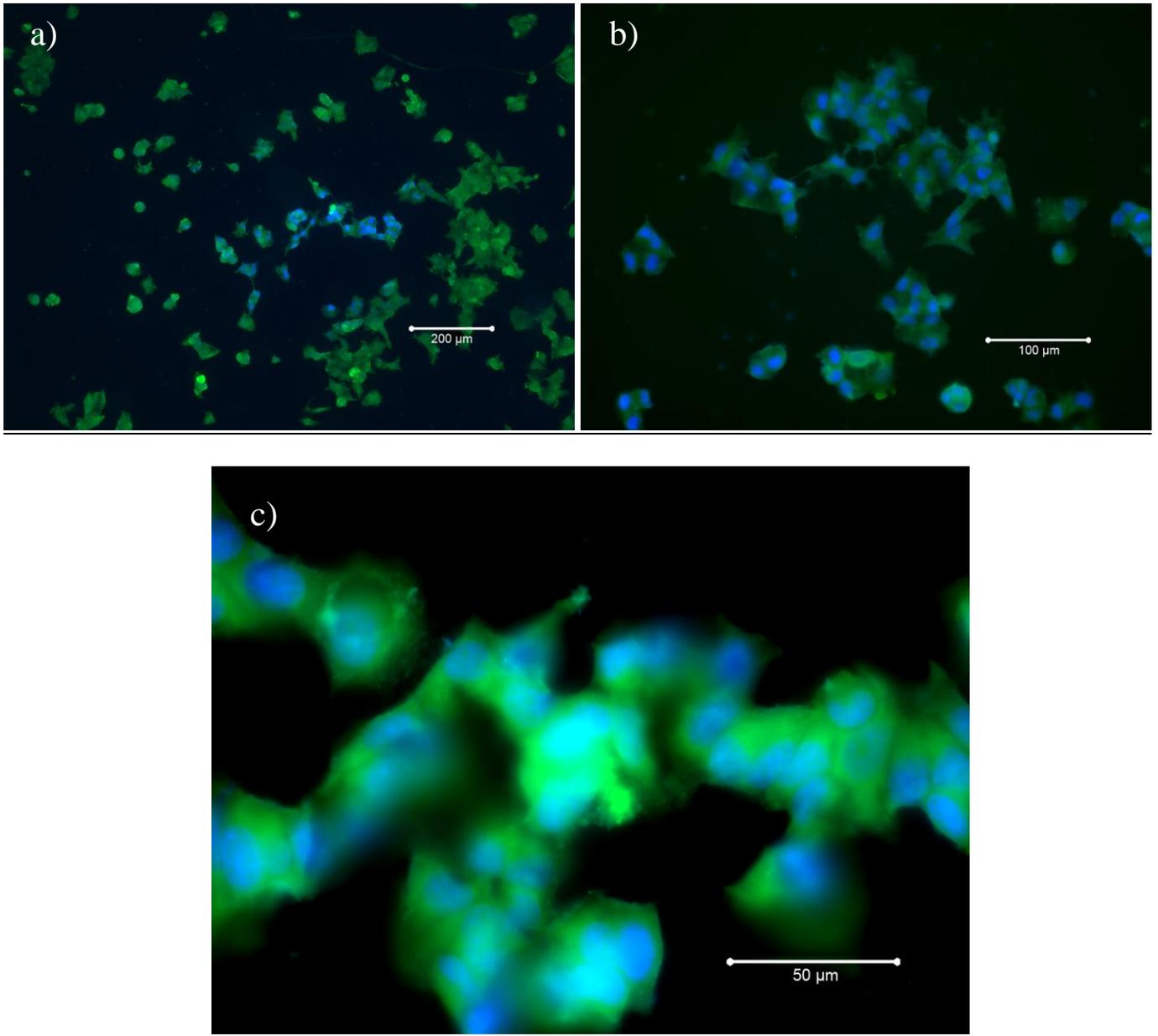


Figura 19 Crecimiento de células MCF-7 sobre películas de PPy. Las células fueron cultivadas sobre PPy, fijadas con paraformaldehído 2% y marcadas con anticuerpo anti-actina acoplado a FITC (verde), y con tinción nuclear con DAPI (azul). Se muestran imágenes de cultivos a las 72 hrs. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio ApoTome (Zeiss).

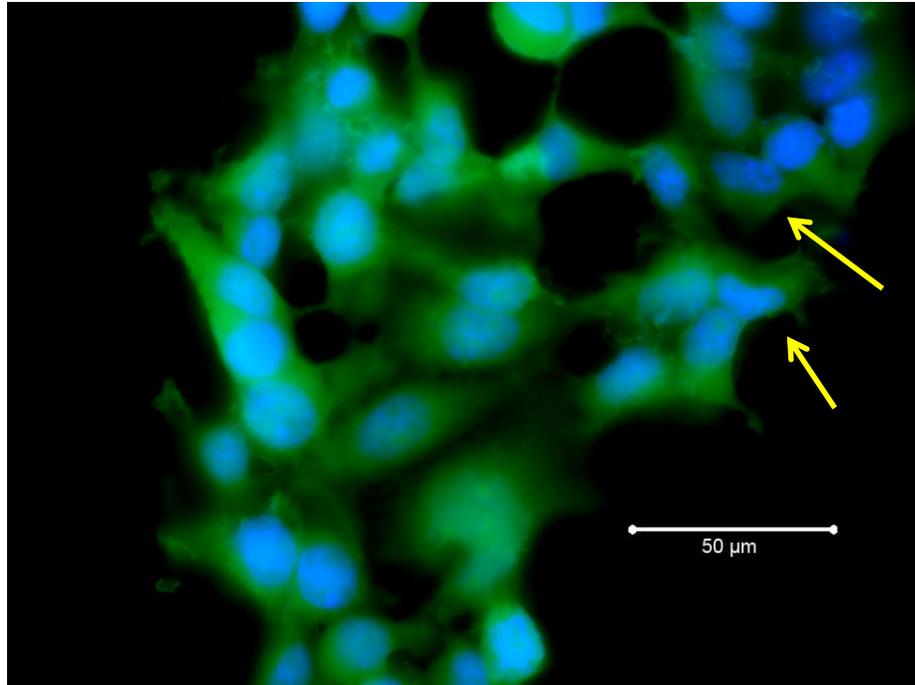


Figura 20 El PPy soporta la división *in situ* de células HEK-293. Las células fueron cultivadas sobre PPy, fijadas con paraformaldehído 2% y marcadas con anticuerpo anti-actina acoplado a FITC (verde), y con tinción nuclear con DAPI (azul). Se muestra una imagen de cultivo a las 72 hrs. La imagen fue capturada con un microscopio ApoTome (Zeiss). Algunas células se observan más brillantes e inclusive con material nuclear dividido, en concordancia con un estado mitótico (flechas amarillas).

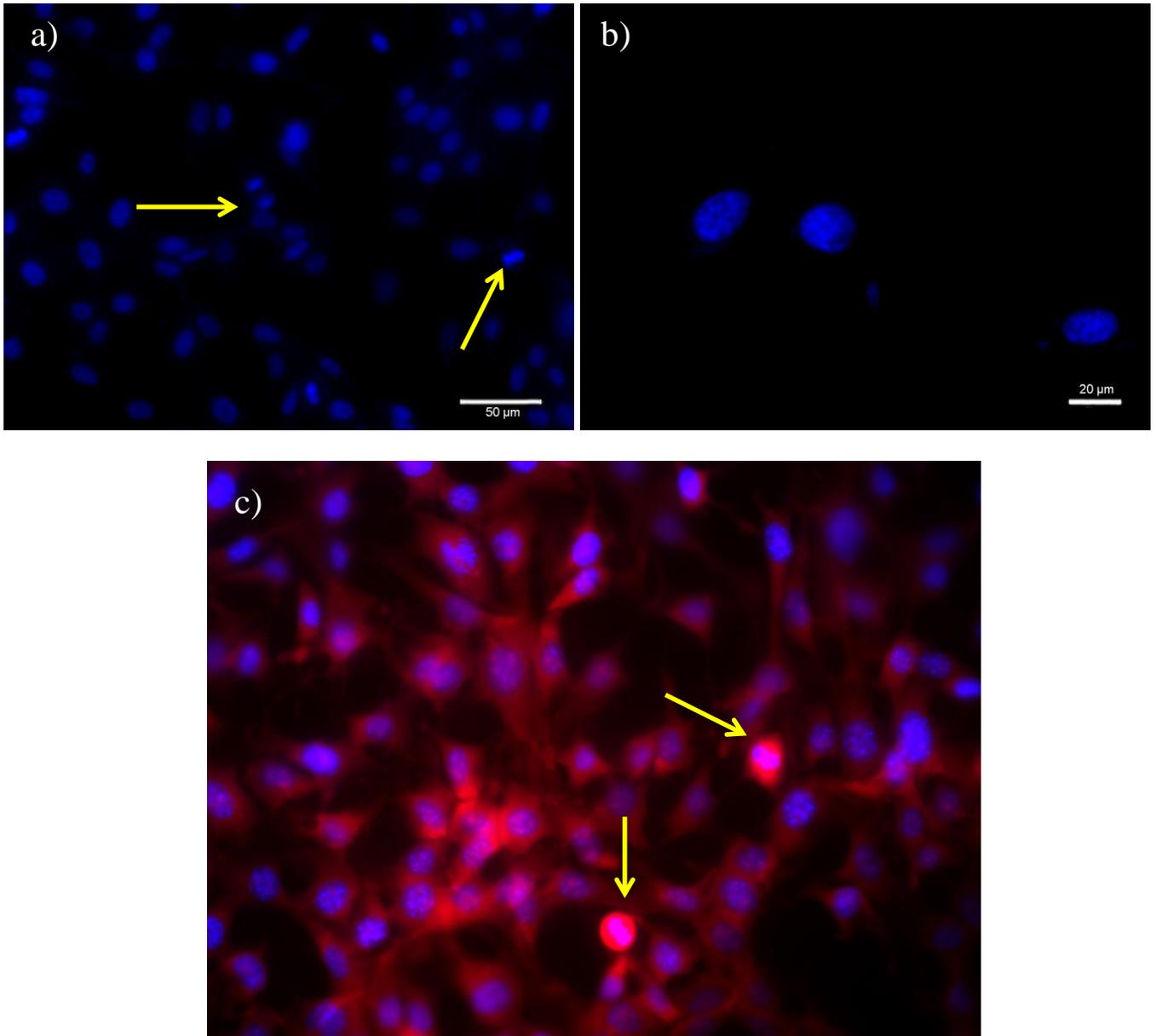


Figura 21 El PPy soporta la división *in situ* de células NIH-3T3. Las células fueron cultivadas sobre PPy, fijadas con paraformaldehído 2% y marcadas con anticuerpo anti-Fc murino unido a Cyanine 3 (rojo), y con tinción nuclear con DAPI (azul). Se muestran imágenes de cultivos a las 72 hrs. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio ApoTome (Zeiss). La mayor parte de las células muestran el marcaje nuclear delimitándose en cromosomas dentro del núcleo (b y c). Algunas células se observan más brillantes e inclusive con material nuclear dividido, en concordancia con un estado mitótico (flechas amarillas).

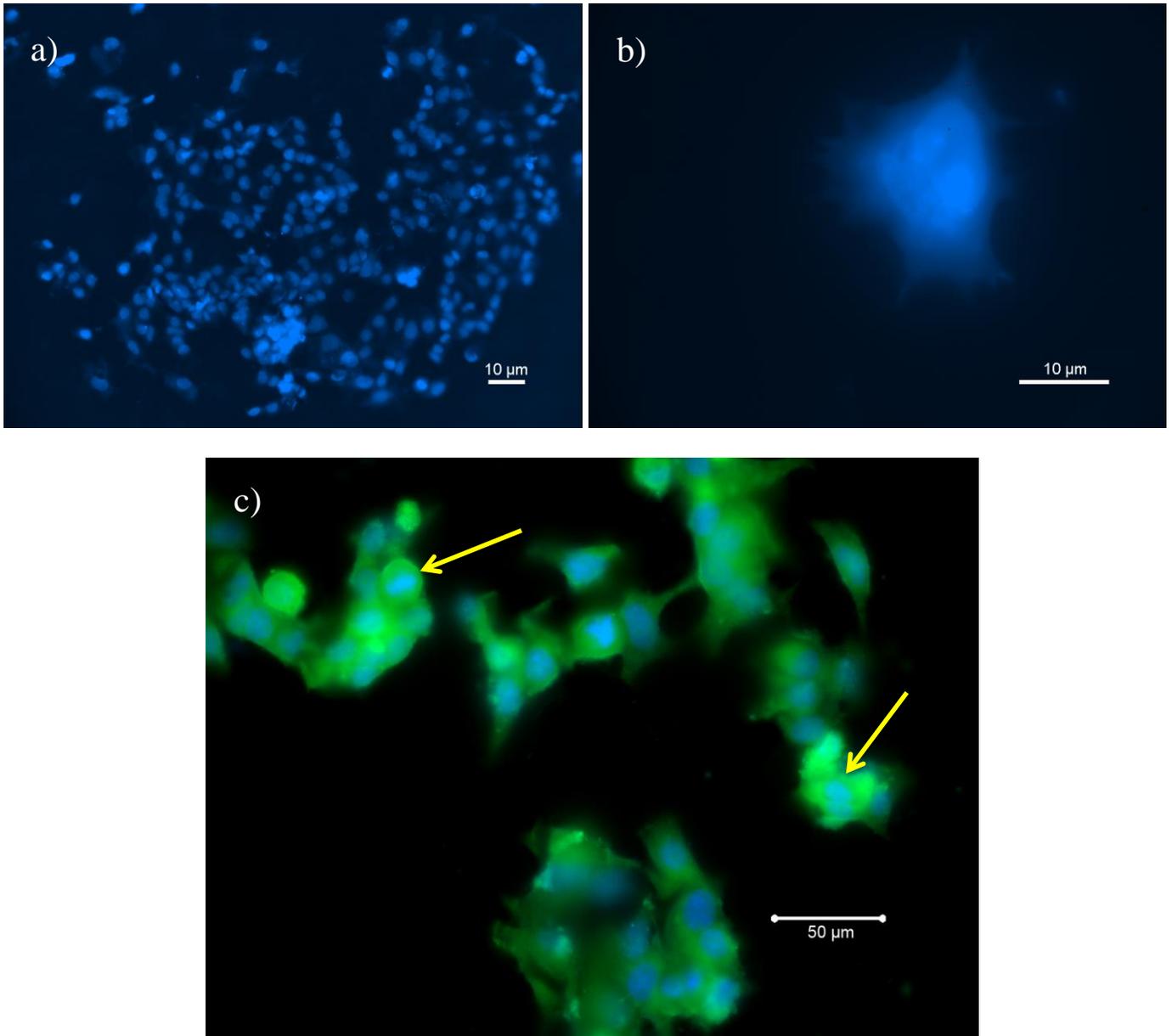


Figura 22 El PPy soporta la división *in situ* de células MCF-7. Las células fueron cultivadas sobre PPy, fijadas con paraformaldehído 2% y marcadas con anticuerpo anti-actina acoplado a FITC (verde), y con tinción nuclear con DAPI (azul). Se muestran imágenes de cultivo a las 72 hrs. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio ApoTome (Zeiss). La mayor parte de las células muestran el marcaje nuclear delimitándose en cromosomas dentro del núcleo (b y c). Algunas células se observan más brillantes e inclusive con material nuclear dividido, en concordancia con un estado mitótico (flechas amarillas).

7.6 Adherencia y crecimiento de células de cultivo primario

También se observó proliferación y adherencia de células del sistema inmunológico obtenidas por cultivo primario de bazo de ratón. En la Figura 23 podemos observar imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de células del cultivo primario obtenido de bazo de ratón.

Como se puede observar en la Figura 23, el PPy permite la adherencia de células como monocitos/macrófagos incluso después de haber sido lavadas con solución isotónica. También se muestran algunas células no adherentes, las cuales fueron precipitadas cuidadosamente en el polímero para poder ser analizadas en la misma microscopía.

Las células no adherentes (linfocitos) presentaron proliferación en la solución que se encontraba sobre el sustrato que contenía las células adherentes (monocitos/macrófagos) y que fueron activadas con Concanavalina A. Esto muestra que las células adherentes mantienen su funcionalidad al ser adheridas y mantenidas en cultivo sobre el PPy.

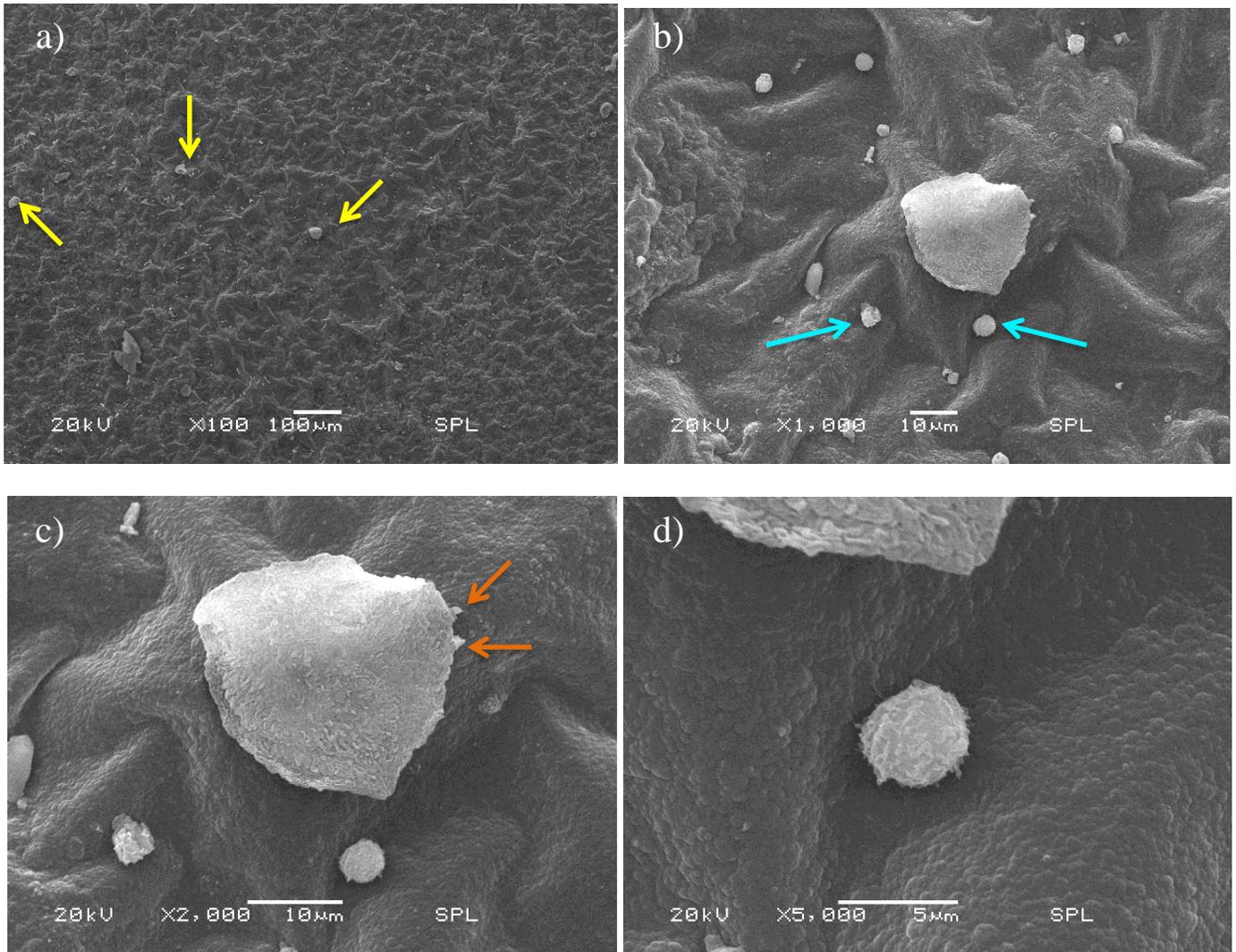


Figura 23 Microscopía electrónica de barrido de esplenocitos de ratón cultivados sobre películas de PPy. Se muestran imágenes con distintos acercamientos de células cultivadas durante 72 hrs., y preparadas para observación al microscopio electrónico de barrido. Las imágenes muestran células adherentes con tamaño correspondiente a monocitos-macrófagos, indicadas mediante flechas amarillas en la imagen de menor amplificación (a - c). Células no adherentes, con morfología redonda, y tallas concordantes con linfocitos también visibles (b - d), indicados con flechas azules. En la imagen c) se pueden observar las miofibrillas del monocito-macrófago adherido al polímero, señaladas con flechas anaranjadas.

VIII. DISCUSIÓN

El polímero utilizado fue el PPy debido a las propiedades de hidrofilia, adherencia celular, conductividad, facilidad de síntesis, manejabilidad y facilidad de dopaje que presenta (Mindroiu *et al* 2013).

El proceso de síntesis que se utilizó para el PPy fue el método electroquímico, el cual es uno de los métodos más eficientes y baratos para sintetizar el polímero (Mindroiu *et al* 2013), además de que permite manipular el grosor de la película modificando únicamente el tiempo que está presente el campo eléctrico. El cronoamperograma de la Figura 6 nos muestra una densidad de corriente máxima de 3.81 ± 0.05 mA/cm² el cual es un poco alto comparado con la literatura de 2.2 mA/cm² en solución acuosa; sin embargo, de ahí pueden derivar los cambios en la morfología estructural del polímero, al igual que su rugosidad, conductividad y el ángulo de contacto (Mindroiu *et al* 2013).

Gracias al programa desarrollado con la ayuda del entorno de programación Matlab, se obtuvo una mojabilidad cercana a la reportada en la literatura, que varía entre los 50° y 60°, dependiendo del dopaje que presenta el PPy y el sustrato sobre el cual se sintetiza (Teasdale 1993). La mojabilidad que encontramos en el polipirrol de 46.64° permite que haya un contacto constante entre las células y el sustrato, lo que facilita la adherencia, crecimiento, proliferación y movilidad celular.

Las mediciones obtenidas de conductividad eléctrica, resistividad eléctrica y resistencia por cuadro son más altas de las esperadas comparando con la literatura (Gerard *et al* 2002) de cerca de 2.67×10^{-3} S/m (Strover *et al* 2013), siendo la nuestra de 0.6196 S/cm, creemos que el polímero con esta conductividad puede permitir la realización de mediciones de diferencia de impedancia con las células crecidas sobre éste.

Se pudo comprobar que el polipirrol es un buen sustrato que permite la adherencia y proliferación celular, de la misma manera que mantiene la funcionalidad de las células. Gracias a las diferentes microscopías pudimos observar las células que se mantenían adheridas a pesar de las tinciones y lavados que se les hacía a las películas. El crecimiento celular sobre las películas es homogéneo para todas las líneas, cubriendo todas las partes del polímero de manera homogénea.

Los análisis microscópicos mostraron que el soporte se recubre de células, y arrojaron evidencia de células en plena división celular, así como adherencia de las nuevas células al sustrato. Con los ensayos de proliferación con MTT realizados, pudimos conocer los tiempos ideales de incubación para el crecimiento y proliferación de cada una de las líneas celulares. En el caso de las líneas MCF-7 y NIH-3T3, observamos que el mayor número de células se encuentra a las 72 horas, después de este tiempo, el soporte se cubre por completo de células y el medio en el que se encuentran pierde los sustratos necesarios para las células por lo que la proliferación decremента; la línea HEK-293 por su parte, comienza a mostrar el mismo decremento después de las 48 hrs, debido a la alta velocidad de proliferación, propagación y adherencia que presenta. En conjunto, los ensayos realizados mostraron que la proliferación responde a una cinética proporcional al tiempo de cultivo. Adicionalmente, los análisis por microscopía permitieron la observación de filipodios de células individuales sobre el soporte, indicando la adherencia de las mismas.

El soporte de PPy permitió el crecimiento de un cultivo celular primario de esplenocitos de ratón. En este caso, se mostró la adherencia de una fracción de células al sustrato, y la capacidad de este sustrato con células adherentes para promover la proliferación de células no adherentes. Estos datos nos indican que el soporte permitió la adherencia de monocitos y su diferenciación a células presentadoras de antígeno, y su

funcionalidad para inducir la proliferación de linfocitos inducida por un mitógeno. Estos resultados representan la mayor contribución que se presenta en la tesis, la cual gira alrededor de la funcionalidad de células de un cultivo primario diferenciado sobre el soporte. Es necesario realizar un marcaje de subpoblaciones celulares para conocer las células que se encuentran adheridas sobre el polímero.

Con este proyecto se busca la realización de un biosensor que permita el análisis de crecimiento, proliferación, funcionalidad y adherencia celular por medio de impedancia, la cual ocupa un método eficiente, de bajo costo y no destructivo de las interfases biológicas ya que se utiliza en un rango de potenciales pequeños (Seven *et al* 2013).

IX. CONCLUSIONES

- Se logró sintetizar un polímero que presenta las características necesarias para poder permitir la adherencia de las diferentes líneas celulares, así como cultivos celulares primarios de esplenocitos de ratón.
- Se caracterizó el polímero por diferentes métodos y se obtuvieron medidas cercanas a aquellas encontradas en la literatura.
- Se estandarizó el proceso de tinción celular con distintos fluoróforos sobre PPy, para comprobar la adherencia, crecimiento y proliferación de células en el soporte utilizado.
- Se estandarizó un método para observar crecimiento celular sobre PPy mediante microscopía electrónica de barrido.
- Queda pendiente una fenotipificación de esplenocitos por medio de anticuerpos dirigidos contra marcadores de superficie para comprobar la diferenciación de monocitos en macrófagos y las subpoblaciones de linfocitos propagados.
- Como futuros experimentos, sería recomendable hacer micrograbados con láser para poder analizar microfluidez en el polímero, además de colocar electrodos en las películas para realizar las mediciones de conductividad después de haber crecido las células en el polímero, y de esta manera conocer su funcionamiento como sustrato para medir impedancia.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akbulut, H., Yavuz, M., Guler, E., Demirkol, D.O., Endo, T., Yamada, S., Timur, S., Yagci, Y. (2014) Electrochemical deposition of polypeptides: bio-based covering materials for surface design. *Polymer Chemistry*, 5: 3929-3936.
- Albrecht, R.M., Hinsdill, R.D., Sandok, P.L., Horowitz, S.D. (1978) Murine Macrophage-Lymphocyte Interactions: Scanning Electron Microscopic Study. *Infection and Immunity*, 21(1): 254-268.
- Bajpai, V., He, P., Goettler, L., Dong, J.H., Dai, L. (2006) Controlled syntheses of conducting polymer micro- and nano-structures for potential applications. *Synthetic Metals*, 156: 466-469.
- Banerjee, P., Bhunia, A.K. (2009) Mamalian cell-based biosensors for pathogens and toxins. *Trends in biotechnology*, 27(3): 179-188.
- Bunnell, T.M., Burbach, B.J., Shimizu, Y., Ervasti, J.M. (2011) β -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Molecular Biology of the Cell*, 22(21): 4047-4058.
- Contreras, Y.D. (2011) Desarrollo de una plataforma de detección amperométrica de biomarcadores en tuberculosis activa. *Tesis de licenciatura*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Del Valle, M.A., Chen, Y.Y., Alarcón, A., Ramos, A., Hernández, L.A., Canales, C., González, B. (2013) Inclusion of glutathione peroxidase on polypyrrole modified electrode, to be assayed as glutathione sensor. *J. Chil. Chem. Soc.*, 4: 1991-1993.
- Du, X., Hao, X., Wang, Z., Ma, X., Guan, G., Abuliti, A. (2013) Highly stable polypyrrole film prepared by unipolar pulse electro-polymerization method as electrode for electrochemical supercapacitor. *Synthetic Metals*, 175: 138-145.
- Dusseiller, M.R., Schlaepfer, D., Koch, M., Kroschewski, R., Textor, M. (2005) An inverted microcontact printing method for arrayed micro-3-D culturing of single cells. *Biomaterials*, 26: 5917-5925.
- Fabregat-Santiago, F., Bisquert, J., Garcia-Belmonte, G., Boschloo, G., Hagfeld, A. (2004) Influence of electrolyte in transport and recombination in dye-sensitized solar cells studied by impedance spectroscopy. *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 87: 117-131.
- Fernández, T. (2003) Polímeros conductores: síntesis, propiedades y aplicaciones electroquímicas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 4(4): 1-32.

- Gilmore, K.J., Kita, M., Han, Y., Gelmi, A., Higgins, M.J., Moulton, S.E., Clark, G.M., Kapsa, R., Wallace, G.G. (2009) Skeletal muscle cell proliferation and differentiation on polypyrrole substrates doped with extracellular matrix components. *Biomaterials*, 30: 5292-5304.
- Gerard, M., Chaubey, A., Malhotra, B.D. (2002) Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, 17: 345-359.
- Gizdavic-Nikolaidis, M.R., Bennett, J.R., Swift, S., Easteal, A.J., Ambrose, M. (2011) Broad spectrum antimicrobial activity of functionalized polyanilines. *Acta Biomaterialia*, 7: 4204-4209.
- Guo, B., Glavas, L., Albertsson, A.C. (2013) Biodegradable and electrically conducting polymers for biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 38: 1263-1286.
- Gürzoy, O., Çelik, G., Gürzoy, S.S. (2013) Electrochemical Biosensor Based on Surfactant Doped Polypyrrole (PPy) Matrix for Lactose Determination. *Journal of Applied Polymer Science*, 131, 40200.
- Halldorsson, S., Lucumi, E., Gómez-Sjöberg, R., Fleming, R.M.T. (2015) Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosensors and Bioelectronics*, 63: 218-231.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M.J. (2001) The components of the immune system. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Chapter 1.
- Karimullah, A.S., Cumming, D.R.S., Riehle, M., Gadegaard, N. (2013) Development of a conducting polymer cell impedance sensor. *Sensors and Actuators*, 176: 667-674.
- Kim, S.H., Ha, H.J., Ho, Y.K., Yoon, S.J., Rhee, J.M., Kim, M.S., Lee, H.B., Khang, G. (2007) Correlation of proliferation, morphology and biological responses of fibroblasts on LDPE with different surface wettability. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 18(5): 609-622.
- Konopinska, K., Pietrzak, M., Malinowska, E. (2013) Studies on the construction and operation of miniaturized potentiometric biosensors. *J Solid State Electrochem*, 17: 1665-1675.
- Kotanen, C.N., Wilson, A.N., Dong, C., Dinu, C.Z., Justin, G.A., Guiseppi-Elie, A. (2013) The effect of physicochemical properties of bioactive electroconductive hydrogels on the growth and proliferation of attachment dependent cells. *Biomaterials*, 34: 6318-6327.
- Liu, X., Barizuddin, S., Shin, W., Mathai, C.J., Gangopadhyay, S., Gillis, K.D. (2011) Microwell Device for Targeting Single Cells to Electrochemical Microelectrodes for High-Throughput Amperometric Detection of Quantal Exocytosis. *Analytical chemistry*, 83: 2445-2451.

- Mehling, M., Tay, S. (2014) Microfluidic cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 25: 95-102.
- Meyle, J., Gültig, K., Nisch, W. (1995) Variation in contact guidance by human cells on a microstructured surface. *Journal of Biomedical Materials Research*, 29(1): 81-88.
- Min, Y., Yang, Y., Poojari, Y., Lio, Y., Wu, J.C., Hansford, D.J., Epstein, A.J. (2013) Sulfonated Polyaniline-Based Organic Electrodes for Controlled Electrical Stimulation of Human Osteosarcoma Cells. *Biomacromolecules*, 14: 1727-1731.
- Mindroiu, M., Ungureanu, C., Ion, R., Pirvu, C. (2013) The effect of deposition electrolyte on polypyrrole surface interaction with biological environment. *Applied Surface Science*, 276: 401-410.
- Mitchel, B.S. (2004) Electrical Conductivity of Selected Materials. *An Introduction to Materials Engineering and Science: For Chemical and Materials Engineers*. Appendix 8: 893-899.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Methods*, 65(1-2): 55-63.
- Patois, T., Sanchez, J.B., Berger, F., Rauch, J.Y., Fievet, P., Lakard, B. Ammonia gas sensors based on polypyrrole films: Influence of electrodeposition. *Sensors and actuators*, 171-172: 431-439.
- Perumal, V., Hashim, U. (2013) Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of applied biomedicine*, 12: 1-15.
- Pohanka, M., Skládal, P. Electrochemical biosensors – principles and applications. *Journal of Applied Biomedicine*, 6: 57-64.
- Saltzman, W.M. Cell Interactions with Polymers. *Principles of Tissue Engineering 2nd edition*, Chapter 19, Academic Press.
- Sehgal, R.R., Banerjee, R. (2013) Fabrication of nanomaterials for growth factor delivery in tissue engineering. *Nanomaterials in Tissue Engineering: Fabrication and Applications*. Chapter 7.
- Setford, S.J., Newman, J.D. (2005) Enzyme Biosensors. *Microbial Enzymes and Biotransformations*. Chapter 2.
- Seven, B., Bourourou, M., Elouarzaki, K., Constant, J.F., Gondran, C., Holzinger, M., Cosnier, S., Timur, S. (2013) Impedimetric biosensor for cancer cell detection. *Electrochemistry Communications*, 37: 36-39.

Sharma, Y., Tiwari, A., Kobayashi, H. (2012) Conducting Polymer Composites for Tissue Engineering Scaffolds. *Biomedical Materials and Diagnostic Devices*, 581-593.

Skotheim, T.A., Reynolds, J.R. (2007) Handbook of Conducting Polymers 3rd edition. Estados Unidos de América: CRC Press Taylor and Francis Group. *Processing and Applications*.

Stangegaard, M., Wang, Z., Kutter, J.P., Dufva, M., Wolff, A. (2006) Whole genome expression profiling using DNA microarray for determining biocompatibility of polymeric surfaces. *Molecular BioSystems*, 2: 421-428.

Stenger, D.A., Gross, G.W., Keefer, E.W., Shaffer, K.M., Andreadis, J.D., Ma, W., Pancrazio, J.J. (2001) Detection of physiologically active compounds using cell-based biosensors. *Trends in Biotechnology*, 19(8): 304-309.

Strover, L.T., Malström, J., Laita, O., Reynisson, J., Aydemir, N., Nieuwoudt, M.K., Williams, D.E., Dunbar, P.R., Brimble, M.A., Travas-Sejdic, J. (2013) A new precursor for conducting polymer-based brush interfaces with electroactivity in aqueous solution. *Polymer*, 54: 1305-1317.

Teasdale, P. (1993) Characterization of the chemical properties of polypyrrole and polyaniline. *Tesis de Doctorado*, University of Wollongong.

Thompson, B.C., Moulton, S.E., Ding, J., Richardson, R., Cameron, A., O'Leary, S., Wallace, G.G., Clark, G.M. (2006) Optimising the incorporation and release of a neurotrophic factor using conducting polypyrrole. *Journal of Controlled Release*, 116(3): 285-294.

Wiederhorn, S.M., Chae, Y.H., Simon Jr., C.G., Cahn, J., Deng, Y., Day, D. (2011) Cell adhesion to borate glasses by colloidal probe microscopy. *Acta Biomaterialia*, 7(5): 2256-2263.

Yuan, Y., Lee, T.R. (2013) Contact Angle and Wetting Properties. *Surface Science Techniques*, Chapter 1.

Zager, V., Cemazar, M., Hreljac, I., Lah, T.T., Sersa, G., Filipic, M. (2010) Development of human cell biosensor system for genotoxicity detection based on DNA damage-induced gene expression. *Radiol Oncol*, 44: 42-51.

Zhao, J. (2007) Sol-gel immobilized liposomes as an artificial cell-based biosensor for listeriolysin O detection. *Tesis de Doctorado*, Purdue University.

(Página en Blanco)