

Pruebas de toxicidad usando hepatocitos humanos sobre diferentes polímeros sintetizados por plasma

E. Pérez-Tejada^{1,3}, J. Morales³, L.E. Gómez-Quiróz², M.G. Olayo⁴,
G.J. Cruz⁴, M.C. Gutierrez-Ruiz², R. Olayo³

¹ Departamento de Química, ² Departamento de Ciencias de la Salud, ³ Departamento de Física.

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Apdo. Postal 55-534, Iztapalapa, México, D.F.

⁴ Departamento de Física, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Apdo. Postal 18-1027, México, D.F.

jmor@xanum.uam.mx

1. Resumen

En este trabajo se analiza la toxicidad de diferentes polímeros sintetizados por plasma utilizando cultivos de células derivadas de hepatocarcinoma humano HepG2. Este tipo de células son modelos aceptados para una gran variedad de estudios celulares, toxicológicos y bioquímicos. Para realizar las pruebas de toxicidad se sintetizaron películas delgadas de polipirrol, polipirrol con yodo, polialilamina y polialilamina con yodo sobre sustratos de vidrio. Se sembraron 2×10^5 células/ml sobre cada polímero usando vidrio y cajas de cultivo comerciales como testigos. La evolución de los cultivos se realizó mediante el registro periódico con un microscopio invertido asociado a un sistema de captación digital de imágenes. Se observó que los polímeros no presentan toxicidad e incrementan la adhesividad y proliferación de células HepG2. Las películas de los diferentes polímeros se sintetizaron en un reactor cilíndrico de vidrio con electrodos de acero inoxidable a 13.56 MHz, 3×10^{-2} Torr, durante 10 min. Los polímeros se caracterizaron por espectroscopia infrarroja por Reflectancia Total Atenuada y por microscopía óptica y electrónica de barrido.

2. Introducción

La modificación superficial mediante plasma utilizando grupos reactivos monofuncionales para incrementar la adhesividad y ampliar sus aplicaciones como biomateriales esta ampliamente documentada. Zhang ha investigado el efecto de polímeros sintetizados por plasma en la adsorción de proteínas y en la inmovilización de ADN utilizando dietilen glicol, monovinil éter y alilamina (C_3H_7N , $CH_2=CHCH_2NH_2$) como monómeros. En lo referente a la polimerización de alilamina encontró que la densidad de grupos amina es inversamente proporcional a la energía del plasma de corriente directa (CD) que usó [1]. Calderón [2] encontró que películas de alilamina polimerizadas por plasma son estables aún después de varios ciclos de esterilización, lo que las hace una alternativa viable para cultivos celulares; esto fue probado por Harsch [3] en 2002. En 2003 Hamerli [4] cultivó fibroblastos humanos sobre membranas de alilamina-polietilentereftalato. En 2005 Lin utilizó alilamina polimerizada por plasma para incrementar la biocompatibilidad de superficies de titanio para implantes.

3. Experimental

Se sintetizaron películas delgadas de los polímeros de pirrol (PPy), pirrol con yodo (PPy-I), alilamina (PPAa) y alilamina con yodo (PPAa-I) sobre la superficie de cubreobjetos convencionales de vidrio colocados dentro de un reactor de plasma a baja presión. El reactor de polimerización por plasma consta de un tubo de vidrio, de 9 cm de diámetro externo y 25 cm de longitud, con tapas y electrodos de acero; alimentado con monómero del material a sintetizar. El reactor opera a 13.56 MHz y 6×10^{-2} Torr. Antes de alimentar el monómero se operó el reactor a 100 W por 10 min para limpiar la superficie de los cubreobjetos con la descarga de plasma, después se alimentó el monómero respectivo (PPy, PPy-I, PPAa y PPAa-I) de forma continua por 10 min a 12 W. Después del tratamiento, el reactor se apagó y se conservó cerrado durante 30 min antes de desta-

parlo y recuperar las muestras. Las películas se caracterizaron por espectroscopia infrarroja de reflectancia total atenuada (IR-ATR) y microscopía de barrido electrónico (SEM).

4. Resultados y discusiones

4.1 Prueba de solubilidad.

En la Fig. 1 se presenta un cubreobjeto de vidrio recubierto con una película delgada de PPy sometida al medio de cultivo. La morfología del PPy muestra diferentes rugosidades, a pesar de que la película se arruga, no se desprende ni se disuelve de su soporte de vidrio. La interacción del medio de cultivo con el material polimérico ocasiona que la película se hinche y forme esas rugosidades; sin embargo, los materiales sintetizados por esta técnica pueden llegar a ser entrecruzados y/o ramificados, lo que hace que no sean solubles en la mayoría de los solventes.

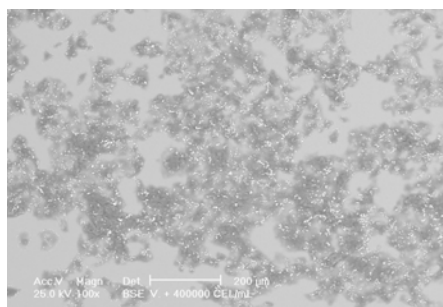


Fig 1. Micrografía de PPy sobre vidrio sometido al medio de cultivo.

4.2 Espectroscopia de IR-ATR

En la Fig. 2 se muestran los espectros de IR-ATR del PPy y del PPy-I. Los espectros presentan bandas de absorción anchas y complejas características de los materiales sintetizados por plasma. El PPy tiene una banda ancha en 3356 cm^{-1} y dos bandas próximas a 1400 cm^{-1} que se asocian a los enlaces N-H. También presenta una fuerte banda característica de los anillos aromáticos de cinco miembros en la región entre 700 y 800 cm^{-1} que se identifica con las absorciones de los anillos de pirrol. El pico en 2200 cm^{-1} se puede asociar a enlaces $\text{C}\equiv\text{N}$ y sugiere que algunos anillos de pirrol se rompieron durante la síntesis debido a la alta energía de las partículas en el plasma. La señal entre 1000 - 1100 cm^{-1} en el PPy-I representa enlaces CH.

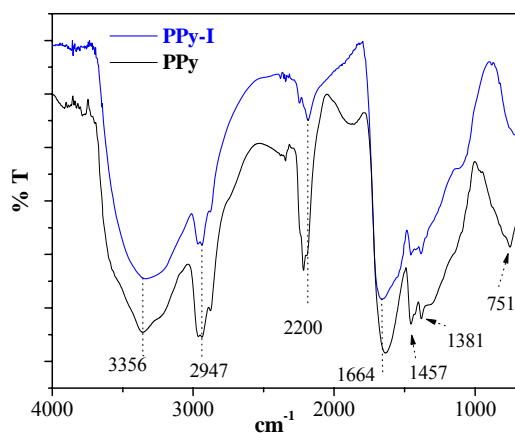


Fig.2 Espectro IR-ATR de PPy y PPy-I.

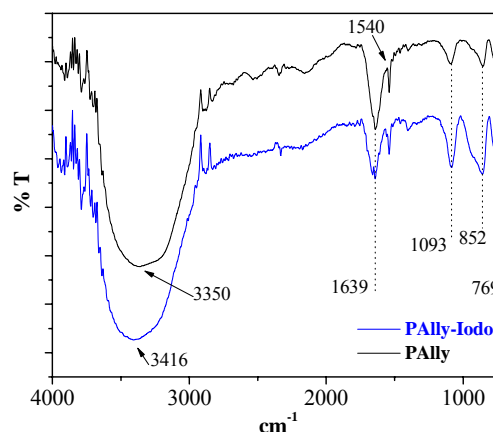


Fig.3 Espectro IR-ATR de PPAa y PPAa-I

En la Fig. 3 se muestra el espectro de infrarrojo de los polímeros de alilamina con y sin yodo. Las bandas del espectro de IR de PPAA y PPAA-I analizadas muestran la presencia de aminas en 1093 y 3350 cm^{-1} junto con grupos O-H. Las absorciones en 1093 y en 1639 cm^{-1} pueden asignarse a los enlaces C-O y C=O, respectivamente.

4.3 Biocompatibilidad de los polímeros sintetizados

La biocompatibilidad de los materiales se probó con células HepG2, que es una línea de cultivo celular derivada de un hepatoblastoma humano obtenido originalmente de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA). Los hepatocitos HepG2 se sembraron por triplicado a dos concentraciones diferentes, 2×10^5 y 4×10^5 células/ml, sobre cubreobjetos tratados por plasma de PPy, PPy-I, PPAA y PPAA-I y sobre cubreobjetos de vidrio sin tratar. Las muestras se colocaron dentro de cajas de cultivo comerciales de poliestireno y sobre cajas de cultivo comerciales; estos dos últimos sustratos se emplearon como testigos.

El comportamiento de los cultivos celulares se monitoreó a intervalos de 24 hr, hasta 182 hr, mediante microscopio óptico con un sistema de registro de imágenes acoplado. Se observaron diferencias en la adhesión, morfología y proliferación de las células sembradas en soportes tratados y sin tratar por plasma. Las células se adhieren, crecen sobre el PPy, se diferencian antes que las crecidas sobre los controles y proliferan con mayor rapidez. Ver Fig. 4.

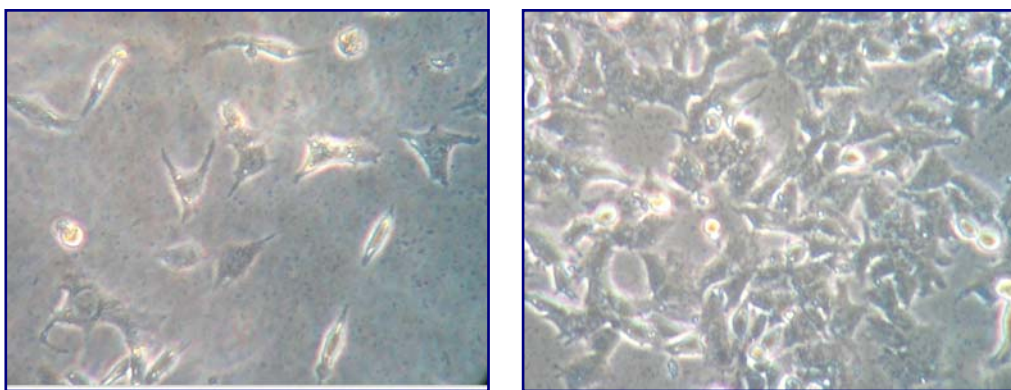


Fig. 4 Hepatocitos a 4×10^5 células/ml iniciales, 24 horas después de sembrados. a) Control, vidrio sin polímero, b) Vidrio con polipirrol.

En la Fig. 5 se aprecia el cultivo celular de Hep-G2 sobre los polímeros PPy, PPy-I, PPAA y PPAA-I con tiempo de cultivo de 136 horas. Como se puede apreciar en la Fig. 5(a), sobre el PPy hay crecimiento, proliferación y diferenciación de las células, pero su proliferación es menor en comparación con los otros materiales. En PPy-I, Fig. 5(b), hay una mayor proliferación de células dejando muy pocos espacios vacíos. En los polímeros PPAA y PPAA-I no se aprecia diferencia significativa en el crecimiento, adhesión y proliferación celular.

Los resultados sugieren que a las células hepáticas proliferan en la presencia de grupos amina e iodo. Es probable que el iodo proporcione sitios iónicos que ayuden a su diferenciación y proliferación. Ninguno de estos materiales es tóxico a las células y pueden aumentar la biocompatibilidad del sustrato sobre el cual se depositan. Hay mejores resultados si los polímeros se halogenan con iodo. Los cultivos se llevaron hasta confluencia, cuando las células recubren en monocapa la superficie disponible.

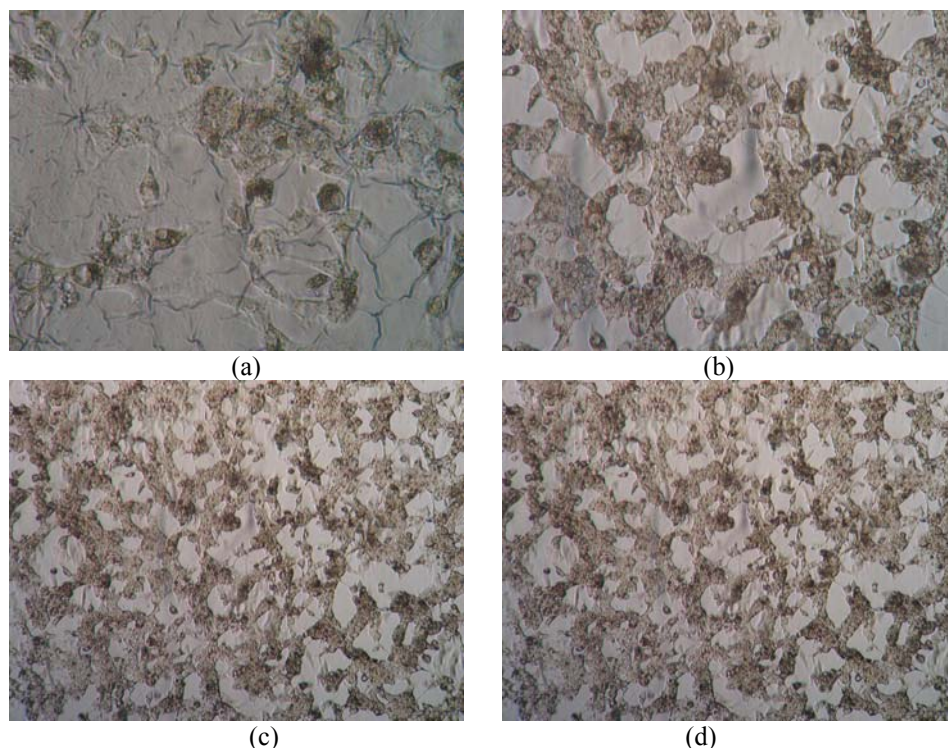


Fig. 5. Cultivo celular a 136 horas sobre (a) PPy, (b) PPy-I, (c) PPAA y (d) PPAA-I.

5. Conclusiones

Se comparó la proliferación celular de HepG2 sobre películas delgadas poliméricas sintetizadas por plasma de Polipirrol, Polialilamina, Polipirrol-yodo y Polialilamina-yodo polimerizados por separado a las mismas condiciones de operación sobre cubreobjetos de vidrio. En todos los casos se observa adherencia y proliferación, tomándose la diferenciación celular como indicador de funcionalidad. Se descarta el efecto toxico de los polímeros de pirrol y alilamina sobre hepatocitos HepG2.

6. Referencias

1. Zhang Z., Foerch R., Knoll W., *European Cells and Materials*, 2003, 6. Suppl. 1, 52.
2. Calderon J.G., Harsch A., Gross G.W., Timmons R.B., *J Biomed Mater Res*, 1998, 42, 597-603.
3. Harsch A., Calderon J., Timmons R.B., Gross G.W., *J Neurosci Methods*, 2000, Jun 1, 98(2),135-44.
4. Hamerli P., Weigel T., Groth T., Paul D., *Biomaterials*, 2003, 24(22), 3989-99.

Agradecimiento

Los autores agradecen al programa de mejoramiento del profesorado, PROMEP, bajo el programa de Apoyo a la Incorporación de Nuevos Profesores de Tiempo Completo, CONVENIO 33805, y al CONACYT con el proyecto de investigación 52411, por el financiamiento parcial al desarrollo del trabajo.