

Efecto de la potencia de polimerización por plasma de alilamina sobre cultivos celulares de hepatocitos

E. Pérez-Tejada^{1, 3}, M. Rosas⁴, J. Morales³, L.E. Gómez-Quiróz², M.G. Olayo⁵,
G.J. Cruz⁵, M.C. Gutierrez-Ruiz², R. Olayo³

¹Departamento de Química, ²Departamento de Ciencias de la Salud,

³Departamento de Física, ⁴Departamento de Ingeniería Eléctrica

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

⁵Departamento de Física, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Apdo. Postal 18-1027, México, D.F.

oagr@xanum.uam.mx

1. Resumen

En este trabajo se estudia la modificación superficial de sustratos de vidrio mediante polimerización por plasma de alilamina para adherir grupos amina que ayuden a incrementar la adhesividad de las células sobre el sustrato, como una alternativa viable para generar superficies para cultivo celular. El cultivo se realizó sembrando células de hepatocitos sobre las superficies modificadas. Se monitoreó el comportamiento de los cultivos celulares a intervalos de 24 horas, hasta 136 horas, mediante un microscopio invertido por contraste de fases. Se observaron diferencias cualitativas en la adhesión, morfología y proliferación de las células.

La síntesis por plasma de polialilamina se realizó en un reactor cilíndrico de vidrio a 13.56 MHz, 3.8×10^{-2} Torr y potencias de 10, 20, 30, 50, 100 y 150 W. La descarga del plasma se realizó de forma continua durante 10 min. La hidrofobicidad del sustrato se estudió mediante la energía superficial a través de la técnica de ángulo de contacto. La estructura de los polímeros se analizó mediante espectroscopia de Infrarrojo por Reflectancia Total Atenuada y la morfología por Microscopía Óptica y Electrónica de Barrido.

2. Introducción

La interacción de células en sustratos in Vitro depende de muchos factores, como las propiedades fisicoquímicas de la superficie del sustrato, afinidad hidrolítica, carga superficial, grupos químicos específicos, etc. La hidrofobicidad se ha asociado a la promoción del anclaje celular y proliferación de hepatocitos y fibroblastos. Una densidad de carga superficial positiva y grupos funcionales amina sobre la superficie promueven el anclaje de células neuronales y fibroblastos. Este tipo de cargas y/o grupos funcionales pueden llevarse a cabo por medio de especies reactivas generadas por plasma para inducir modificaciones fisicoquímicas en la superficie de los materiales que incrementen las propiedades asociadas con la biocompatibilidad, mientras que las propiedades del resto del material permanecen intactas [1-4]. Estos tratamientos pueden ser aplicados en la ingeniería biomédica.

3. Experimental

La modificación superficial de los sustratos de vidrio usados para el crecimiento celular se llevó a cabo en un reactor que consta de un tubo cilíndrico de vidrio pyrex con diámetro externo de 9 cm, longitud de 25 cm y volumen aproximado de 1500 cm^3 . A los sustratos se les realizó primero una limpieza con un plasma de aire (150 W, 10 min) para eliminar contaminantes orgánicos de la superficie. Después se sintetizó sobre ellos una película delgada de polialilamina (PAA) a potencias de 10 W, 20 W, 30 W, 50 W, 100 W, y 150 W durante 10 min. La película se caracterizó por medio de IR-ATR, ángulo de contacto y SEM.

Para realizar el cultivo celular, los sustratos de vidrio se sembraron con hepatocitos de cultivo secundario HepG2 y se colocaron dentro de cajas de cultivo con cambio de medio y registro fo-

tográfico de evolución a intervalos de 24 hr, hasta las 182 hr, utilizando un microscopio invertido por contraste de fases Zeiss Axiuvert 25 y un equipo de fotografía digital adaptado. El medio empleado fue el Williams E W4125 de Sigma, suplementado con suero fetal bovino.

4. Resultados

4.1 Espectroscopía de IR-ATR

En la Fig. 1 se muestra el espectro de IR-ATR de la PAA sintetizada a 10W. Se observan los enlaces N-H en 3325 y 1396 cm^{-1} que son parte de las moléculas de alilamina. También se pueden observar dobles enlaces en uniones C=C en 944 y 785 cm^{-1} , y C=N en 1661 cm^{-1} . En 1321 cm^{-1} se encuentran enlaces O-H, posiblemente originados por oxidación atmosférica.

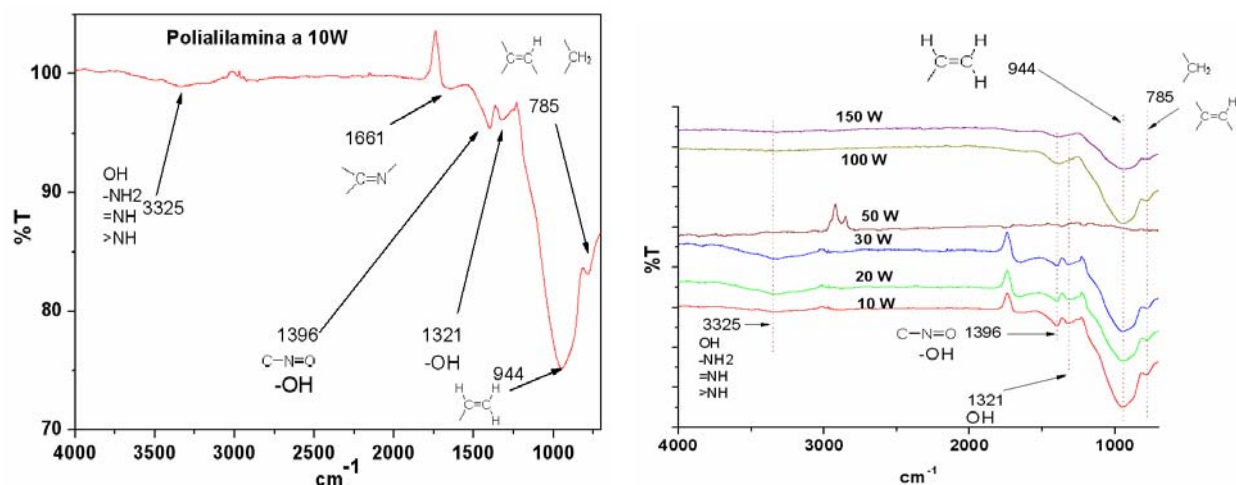


Figura 1. (a) Espectro IR-ATR del vidrio modificado con PAA a 10 W. (b) espectros IR-ATR de polialilamina depositada a diferentes potencias.

4.2 Ángulo de contacto (AC)

En la Tabla 1 se muestra el ángulo de contacto de agua bidestilada para los sustratos recubiertos con PAA a las diferentes potencias. Los valores que se muestran son el promedio de 10 medidas de AC. A mayor potencia, el AC aumenta, lo que indica que el recubrimiento es más hidrofóbico, debido a la combinación de morfología, energía superficial y al entrecruzamiento de las cadenas poliméricas.

Tabla 1. Ángulo de contacto a diferentes potencias.

Potencia (W)	Ángulo de contacto (°)
10	25 ± 1
20	27 ± 1
30	27 ± 1
50	52 ± 1
100	51 ± 1
150	50 ± 1

4.3 Cultivos celulares de hepatocitos humanos (HEP-G2)

En la Fig.2 se muestran las fotografías obtenidas por microscopía inversa para verificar la proliferación celular sobre las superficies de los sustratos sin modificar, Fig. 2(a), y modificados a 10,

20 y 30 W durante a 50 hr, ver Fig. 2(b), 2(c) y 2(d), respectivamente. El sustrato sin modificar tiene una menor proliferación de células y conforme se incrementa el la potencia de polimerización aumenta la proliferación y diferenciación de las células Hep-G2. Los experimentos se llevaron hasta 182 de cultivo y a este tiempo las células cubren toda la superficie del sustrato hasta formar una monocapa. Es importante resaltar que la película depositada a 30 W tiene una mayor cantidad de grupos amina, pico ATR en 3325 cm⁻¹, lo que indica que a las células Hep-G2 les gusta la carga eléctrica proveniente de este grupo y por consiguiente tienen una mayor diferenciación con respecto a las otras potencias.

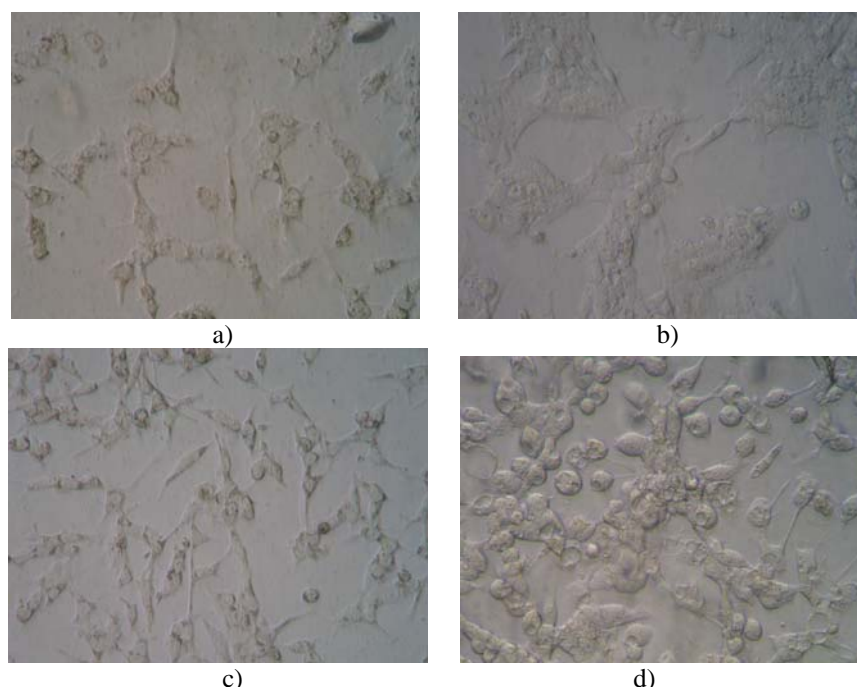


Figura 2 Microscopía inversa, muestra las células del cultivo base de Hep-G2 sobre un sustrato de vidrio sin modificar (a) y sobre los sustratos modificados a 10 W (b), 20 W (c) y 30 W (d).

4.4 Microscopía de Barrido Electrónico (SEM)

En la Fig. 3 se muestran las fotografías SEM del sustrato a 150 W. Se observa adhesión y crecimiento celular sobre el sustrato, las células se encuentran aglomeradas de manera uniforme y forman capas de células que se apilan unas sobre otras.

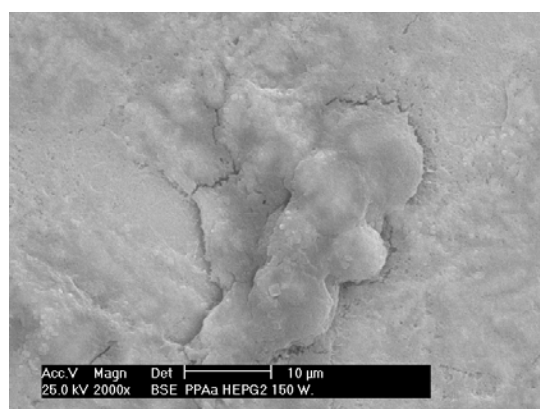


Figura 3. Fotografía SEM que muestra el crecimiento de células sobre el sustrato de vidrio modificado a 150 W.

5 Conclusiones

Los polímeros sintetizados sobre la superficie de los sustratos contienen enlaces tipo C-C, C-N, C=C y C=N que son originados por las moléculas de Alilamina, con un aumento en la hidrofobicidad conforme aumenta la potencia de polimerización. Las células Hep-G2 proliferan y se diferencian mejor en los sustratos recubiertos con PAA en comparación con los de vidrio sin modificar. Se observa crecimiento celular sobre el sustrato con diferencias cualitativas en la adhesión, morfología y proliferación de las células. El sustrato sin modificar tiene una menor proliferación y conforme se incrementa la potencia de polimerización se incrementa la proliferación celular. Los espectros de ATR indican que la película depositada a 30 W tiene una mayor cantidad de grupos amina, esto hace que las células se diferencien y se adhieran mejor a este sustrato. A tiempo de cultivo grandes las células tienden a formar una monocapa sobre la superficie tratada con PAA. Las células se encuentran aglomeradas de manera uniforme formando capas que se apilan unas sobre otras.

6. Referencias

1. Gaur, S., and Vergason G., Society of Vacuum Coaters, (2000), 267-271.
2. P.K. Chu, J.Y. Chen, L.P. Wang, N. Huang, Materials Science and Engineering 36: (2002), 143–206.
3. S. Denes, Ferencz, Manolache, S., Polym. Sci. 29: (2004), 815–885.
4. Chia-Cheng, Lin, Hsin-Chung, Cheng, Chiung-Fang, Huang, Che-Tong, Lin, Sheng-Yang, Lee, Chin-Sung, Chen, Keng-Liang, Ou, Japanese Journal of Applied Physics, Vol. 44, No. 12, (2005), 8590–8598.

Agradecimientos

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.