

Evaluación *in vitro* De La Biocompatibilidad De Diamante Ultrananocristalino Crecido Sobre Zafiro Como Material Potencial Para Implantes Oculares.

J. Avila¹, * K. Falcón², C. Bonilla³, C. González³, A. Córdova³, P. Tirado³, M. Gallardo³, O. Auciello³

¹ Universidad Autónoma de Aguascalientes

² Northern Arizona University

³ Núcleo de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico, Hermosillo, Sonora, México

* jessavilalopez@gmail.com

Resumen— Los dispositivos microelectrónicos implantables en retina, se han ido mejorando a lo largo de los años, a manera de resolver la problemática que se presenta por el uso de componentes susceptibles a la corrosión química, que es ocasionada por los fluidos oculares, por lo que se ha buscado el empleo de materiales resistentes a tal corrosión y altamente biocompatibles. En este proyecto se evaluó la biocompatibilidad de una película delgada hidrofílica de Diamante Ultrananocristalino (UNCD), crecida sobre un sustrato de zafiro, como potencial implante ocular. Para esto se evaluó la viabilidad y apoptosis de células de epitelio pigmentario de la retina (línea celular ARPE-19) por el ensayo de reducción de MTT y citometría de flujo, respectivamente. Los análisis realizados sugieren una adhesión y crecimiento celular sobre la película de UNCD, así como viabilidad celular y proporciones bajas de necrosis en presencia del material. Los resultados aquí obtenidos marcan una pauta para continuar con el desarrollo de futuros implantes oculares recubiertos con UNCD, no obstante, posteriores evaluaciones y estandarizaciones tanto en el crecimiento de la película de UNCD, así como en el cultivo celular, deberán ser realizadas.

Palabras clave— ARPE-19, Biocompatibilidad, UNCD, Viabilidad.

I. INTRODUCCIÓN

De manera creciente, los dispositivos médicos están siendo empleados para resolver un gran número de problemáticas médicas, combinando tecnologías de microfabricación y fisiología para producir sistemas implantables que apoyen en el diagnóstico, monitoreo, tratamiento y restauración de funciones. El empleo de materiales biocompatibles como componentes del dispositivo es un aspecto crucial en su desarrollo y para considerar como biocompatible a un material, éste debe de ser seguro para el paciente y biológicamente inerte con los tejidos. Debido a esto, es importante realizar evaluaciones que garanticen la seguridad de los materiales y el dispositivo, para ello, se debe analizar la morfología, viabilidad y adhesión a la superficie, así como la muerte celular, para determinar en primera instancia la citotoxicidad o la biocompatibilidad del material en pruebas *in vitro*. (Pizzoferrato *et al.*, 1994). Una vez que los ensayos *in vitro* permiten establecer ciertos parámetros y determinar condiciones de los componentes del dispositivo, el desarrollo se puede escalar para realizar evaluaciones *in vivo* en las que se exploren panoramas más cercanos a la realidad de la utilidad clínica. Dispositivos microelectrónicos diseñados para ser implantados y restaurar la visión que se pierde debido a la degeneración de la retina han sido

mejorados a lo largo de los años, siendo una de las principales problemáticas la corrosión química que pueden sufrir los elementos empleados por el contacto con fluidos oculares y la biocompatibilidad de los mismos. Estos dispositivos desarrollados para restaurar la visión se han probado ya en modelos *in vivo*, y consisten en un microchip compuesto de foto receptores, los cuales al captar la luz generan una señal eléctrica que actúa como los impulsos eléctricos que la retina convierte, y son enviados a través del nervio óptico hacia el cerebro, donde se interpretan como imágenes (Xiao *et al.*, 2005).

Entre los sustratos que se han explorado para los fines mencionados, el zafiro ha demostrado tener propiedades ideales para la creación en conjunto de implantes, al ser empleado como soporte. Aunado a ello, es considerado un material de alta pureza e inerte, sin dejar de lado que, por su naturaleza translúcida, ofrece ventajas adicionales como permitir el paso de la luz y por consiguiente el monitoreo celular.

El Diamante Ultrananocristalino (UNCD) por su parte, ha sido propuesto como recubrimiento para diversos dispositivos. Entre sus propiedades más relevantes se incluyen: a) Su dureza de 98 GPa con un módulo de Young de 980 GPa, los cuales son cercanos a los valores del diamante monocristalino (100 GPa y 1200 GPa, respectivamente); b) Un coeficiente de fricción bajo (0.02-0.04) en comparación a cualquier otro recubrimiento hoy en día; c) Alta resistencia a la fractura (~5.3 GPa); d) Relativamente alta conductividad eléctrica al incorporar átomos de Nitrógeno (N) en los límites del grano (N-UNCD) para proveer electrones en la banda de conducción, y e) Resistencia extrema al ataque químico efectuado por los fluidos corporales (Auciello *et al.*, 2014).

Finalmente, una característica más que se busca que tenga el sistema, es permitir la adhesión celular, para la cual se requiere que la superficie sea hidrofílica. Las películas de diamante policristalino son de naturaleza hidrofóbica, pues presentan átomos de hidrógeno en su superficie. Para volverlas hidrofílicas se pueden emplear plasma de oxígeno y métodos fotoquímicos para generar terminaciones O/OH en la superficie (Montaño-Figueroa, *et al.*, 2018).

En el presente trabajo, se realizaron las evaluaciones y elección de materiales para el desarrollo base de un potencial implante ocular, realizando análisis de la biocompatibilidad de los componentes, que permitirán establecer un camino a seguir para lograr la aplicación final del sistema.

II. METODOLOGÍA

1. Crecimiento de Películas de UNCD

Las películas de UNCD se crecieron en sustratos de zafiro por medio de la técnica de depósito de vapor químico asistido por plasma de microondas (MPCVD, por sus siglas en inglés), utilizando una mezcla de Ar/CH₄/H₂ para formar una película de diamante policristalina con tamaños de grano de 2-5 nm (UNCD) en la superficie de los sustratos de zafiro. Se trabajó con 4 variantes del sustrato: Zafiro, Zafiro con O₂ (RIE), UNCD crecido sobre zafiro y UNCD crecido sobre zafiro con tratamiento de O₂ (RIE).

2. Reactive Ion Etching (RIE) con plasma de O₂

Todos los sustratos fueron tratados con exposición a plasma de O₂ con una presión de 200 mTorr, flujo de oxígeno de 12 sccm y potencia de radiofrecuencia de 50 W en un grabador por iones reactivos de la compañía Plasma Etch.

3. Caracterización Raman

La película de UNCD se caracterizó por medio de espectroscopía Raman (NT-MDT) utilizando una longitud de onda de 488 nm.

4. Línea celular

La línea celular de epitelio pigmentario de la retina ARPE-19, fue adquirida en la American Type Culture Collection (ATCC) y cultivada a 37 °C, en una atmósfera de 95% de O₂ y 5% de CO₂ y 50% de humedad con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM-F12) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina y anfotericina B (los tres de la compañía Gibco).

5. Esterilización del material

Las cuatro variedades del sustrato fueron esterilizadas con etanol al 70% y posteriormente colocadas en placas de cultivo Corning de 6 pozos y expuestas a luz ultravioleta (UV) durante 15 minutos por cada lado.

6. Proliferación celular

En la placa de 6 pozos conteniendo los sustratos, se plaquearon 300,000 células por pozo con 3 mL de medio (4 pozos, cada uno correspondiente a uno de los sustratos analizados y dos pozos como control). Pasadas 48 horas de cultivo se observaron las células en un microscopio invertido, para verificar su proliferación.

7. Ensayo de viabilidad MTT

Pasadas 72 horas de exposición al sustrato se evaluó la viabilidad celular, utilizando un ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] (Sigma-Aldrich®). Las células de cada pozo fueron disgregadas con tripsina, centrifugadas a 1250 rpm a 15 °C por 7 minutos para separarlas y contarlas en cámara de Neubauer. Para la evaluación de viabilidad se utilizó una placa de 96 pozos, colocando 6000 células por pozo de las células despegadas expuestas al material y 100 µl de medio. Las células de cada variante y control se colocaron por triplicado y se permitió la adhesión celular a la placa, incubando por una hora en las condiciones de cultivo mencionadas al inicio. Posteriormente se agregaron 20 µl de MTT [5 mg/ml] a cada pozo, la placa se incubó por 3 horas después de las cuales se deshechó el contenido de los pozos con una sacudida rápida boca abajo de la placa de 96 pozos y se agregaron 100 µl de Dimetil Sulfoxido (DMSO) por pozo para detener la reacción y poder leer la absorbancia a 570 nm de los experimentos establecidos. Para ello, se utilizó un lector de microplacas.

8. Determinación de apoptosis por Citometría de Flujo

La muerte celular fue evaluada por citometría de flujo, mediante detección de Anexina V y Yoduro de Propidio con el kit Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor™ 488 & Propidium Iodide (PI) de Thermo Fisher Scientific siguiendo las instrucciones del fabricante.

III. RESULTADOS

A. Caracterización Raman

En el espectro Raman de la película de UNCD crecida en zafiro (Fig. 1) se observaron las bandas G (1550 cm⁻¹), TPA₁ (1490 cm⁻¹), D (1340 cm⁻¹), TPA₂ (1130 cm⁻¹) y un pico en 412 cm⁻¹.

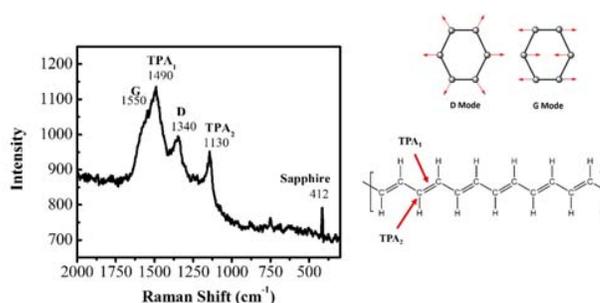


Fig. 1. Espectro Raman de la Película de UNCD crecida sobre zafiro.

B. Proliferación celular

Las células crecidas en presencia del material y observadas al microscopio a las 48 horas de ser plaqueadas (Fig. 2), mostraron en general una alta confluencia de entre 80-90%, tanto en superficie alejada del material como en las áreas cercanas a este. De manera particular, en campos específicos de visión de los sustratos recubiertos con UNCD, se apreció un leve desprendimiento de material en forma de cristales sobre la superficie.

C. Viabilidad celular

Los resultados del ensayo de MTT presentados en la Figura 3, muestran una proliferación celular en todos los sustratos evaluados, con porcentajes superiores al 100% del control hasta en un 74%. El material de Zafiro-UNCD-RIE fue el que mostró el mayor porcentaje de viabilidad celular.

D. Determinación de apoptosis

En todos los dot plots obtenidos de los análisis por citometría de flujo (Fig. 4), se observó una gran proporción de células ubicadas en el cuadrante inferior izquierdo y por ende negativas para ambos marcadores usados: Anexina V y Yoduro de Propidio). En ningún dot plot de las células crecidas en los sustratos se observan eventos positivos para Anexina V, o dobles positivos para Anexina V y Yoduro de Propidio, solo se observan algunos eventos positivos para Yoduro de Propidio.

IV. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se tuvo el objetivo de realizar evaluaciones de biocompatibilidad *in vitro* de una película de Diamante Ultrananocrystalino crecida sobre zafiro, con potencial uso en implantes oculares. De manera inicial, se caracterizó la película de UNCD evaluando su espectro Raman, en el que se detectaron las bandas características del UNCD reportadas ya en la literatura (Birrel *et al.*, 2005): banda G (1550 cm^{-1}) que indica la presencia de enlaces tipo sp_2 en la frontera de grano, la banda D (1340 cm^{-1}) que indica desorden en las estructuras de carbono sp_2 formadas en la frontera de grano, rompiendo las reglas de selección que prohibirían este modo de vibración en un cristal ideal de grafito. Por último, las bandas TPA_1 (1490 cm^{-1}) y TPA_2 (1130 cm^{-1}) indican la presencia de estructuras tipo trans-poli acetileno en la frontera de grano, asociadas a enlaces $\text{C}=\text{C}$ y $\text{C}-\text{H}$ presentes en el trans-poli acetileno, respectivamente.

Las bandas detectadas por Raman se deben a enlaces formados en las fronteras de grano del UNCD, espectro característico del material, mientras que la ausencia del pico en 1332 cm^{-1} (atribuido a carbono sp_3) indican que se tiene un tamaño de grano muy pequeño (2-5 nm) ya que la señal del diamante es opacada por la señal de la frontera de grano debido al efecto de resonancia. Por último, el pico detectado en 412 cm^{-1} es igual al reportado en literatura para el zafiro (Kadleiková *et al.*, 2001). Con todo lo anterior, se pudo

confirmar que se depositó UNCD en los sustratos de zafiro. Respecto al desprendimiento de UNCD, pudieron interferir varios factores que pudieron causar tal evento, como una deposición débil en el material y mala calidad o cuidado del sustrato.

Por otra parte, en la evaluación de viabilidad por el ensayo de MTT, se observó que la proliferación celular fue mayor en los cuatro sustratos que en el control. Esto puede ser explicado por el aumento de área superficial que representa el sustrato en el pozo, pues éstos se movían libremente sin estar fijos, por lo que se puede inferir que las células crecieron tanto adheridas a la placa como adheridas al material.

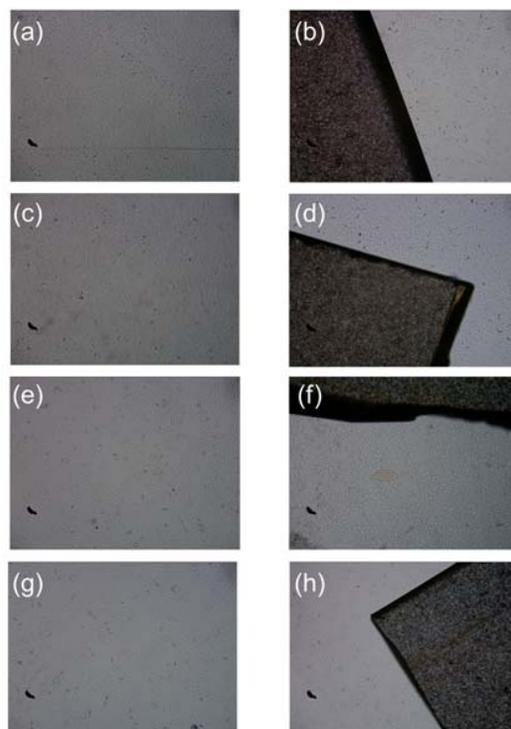


Fig. 2. Células ARPE-19 crecidas sobre diferentes materiales: a) y b): Zafiro; c) y d): Zafiro+RIE; e) y f): Zafiro+UNCD; g) y h): Zafiro+UNCD+RIE.

Porcentajes de conteos celulares en cámara de Neubauer antes de analizar las células por citometría de flujo, fueron muy similares a los observados en el ensayo de MTT (resultados no mostrados). De manera individual, el mayor porcentaje de viabilidad fue obtenido en el sustrato de Zafiro-UNCD-RIE, lo que era de esperarse pues teóricamente hablando es el material más afín y con mejores características biocompatibles, sin embargo, esto no podría confirmarse aún ya que los sustratos empleados presentaban leves diferencias de superficie entre ellos.

En cuanto a los resultados de apoptosis, no se observaron eventos de apoptosis temprana ni apoptosis tardía, que serían indicados por marcajes positivos para Anexina V y

marcajes dobles positivos para Anexina V y Yoduro de Propidio, respectivamente. Se detectaron solamente pocos eventos positivos para Yoduro de Propidio, que indican necrosis celular, cuya causa en esta etapa del proyecto sería difícil de establecer, por lo que se deben de realizar evaluaciones complementarias que permitan determinar si factores como la deposición del material o el desprendimiento del mismo, ocasionan un cierto grado mínimo de necrosis.

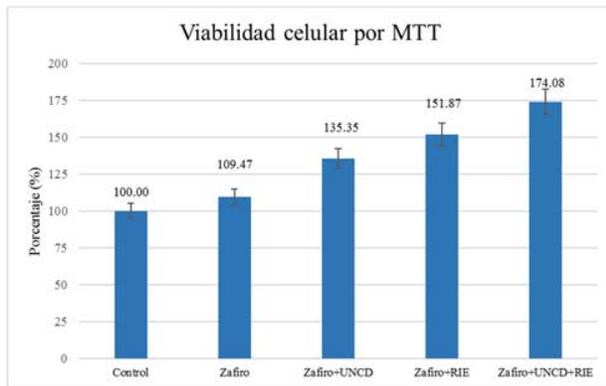


Fig. 3. Viabilidad celular por MTT de la línea ARPE-19 crecida en 4 diferentes sustratos. Error estándar de cada material evaluado por triplicado.

V. CONCLUSIÓN

Las evaluaciones realizadas para determinar la biocompatibilidad de los componentes base de un potencial implante ocular, compuesto de una película delgada de Diamante Ultrananocrystalino crecida sobre zafiro y con un tratamiento para volverlo hidrofílico, permitieron sentar las bases de los primeros aspectos a considerar y estandarizar. Se observaron valores altos de viabilidad y bajos de apoptosis, de las células ARPE-19 utilizadas. Consideraciones como el tamaño exacto del sustrato, deben ser tomadas en cuenta para realizar comparaciones entre las diferentes variables de cada sustrato, así como la calidad y origen de los componentes. De igual manera, es necesario realizar mayores repeticiones de los ensayos aquí empleados, para posteriormente complementar con evaluaciones *in vivo*, que puedan finalmente escalarse después en una aplicación clínica.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a la empresa Rubio Pharma y Asociados S.A. de C.V. por el financiamiento económico para la realización de este proyecto, así como al Núcleo de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico por la facilitación de la infraestructura.

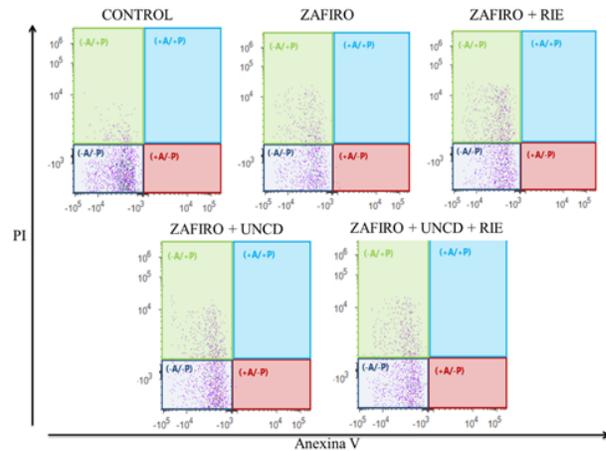


Fig. 4. Determinación de apoptosis de células ARPE-19 por detección de Anexina V y Yoduro de Propidio mediante citometría de flujo.

BIBLIOGRAFÍA

- Akagawa Y, Hashimoto M, Kondo N, Yamasaki A, Tsuru H. Tissue reaction to implanted biomaterials. *J Prosthet Dent.* 1985;53(5):681-686. doi:10.1016/0022-3913(85)90023-X
- American Type Culture Collection. (2011). MTT Cell Proliferation Assay Instruction Guide. *Components*, 6597, 1–6.
- Auciello O, Gurman P, Guglielmotti MB, Olmedo DG, Berra A, Saravia MJ. Biocompatible ultrananocrystalline diamond coatings for implantable medical devices. *MRS Bulletin.* 2014;39(7):621-629. doi:10.1557/mrs.2014.134.
- Bajaj P, Akin D, Gupta A, et al. Ultrananocrystalline diamond film as an optimal cell interface for biomedical applications. *Biomed Microdevices.* 2007;9(6):787-794. doi:10.1007/s10544-007-9090-2
- Birrell J, Gerbi JE, Auciello O, Gibson JM, Johnson J, Carlisle JA. Interpretation of the Raman spectra of ultrananocrystalline diamond. *Diam Relat Mater.* 2005;14(1):86-92. doi:10.1016/j.diamond.2004.07.012
- Carbon N Y. 2018. doi:https://doi.org/10.1016/j.carbon.2018.06.062
- Pishchik V, Lytvynov LA, Dobrovinskaya ER. Sapphire: Material, manufacturing, applications.; 2009. doi:10.1007/978-0-387-85695-7
- Kadleiková, M., Breza, J., & Veselý, M. (2001). Raman spectra of synthetic sapphire. *Microelectronics Journal*, 32(12), 955–958. doi:10.1016/s0026-2692(01)00087-8
- Montaño-figueroa AG, Alcantar-peña JJ, Tirado P, Obaldia E De, Auciello O. Tailoring of polycrystalline diamond surfaces from hydrophilic to superhydrophobic via synergistic chemical plus micro-structuring processes.
- Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, et al. Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater.* 1994;15(3):173-190. doi:10.1016/0267-6605(94)90081-7
- Shenderova, O., Gruen, D. *Ultrananocrystalline Diamond Synthesis, Properties and Applications*; 2012. ISBN: 9781437734652
- Xiao X, Wang J, Liu C, Carlisle, J., Mech, B., Greenberg, R. et al. In vitro and in vivo evaluation of ultrananocrystalline diamond for coating of implantable retinal microchips. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2006; 77(2):273-281. doi:10.1002/jbm.b.3044