



Caracterización de Compuestos de Nanotubos de Haloisita y Polietilenglicol

D. Quintanilla¹, W. García¹, L. Peña-Parás¹, R. Vidaltamayo^{2*}

¹Departamento de Ingeniería, Universidad de Monterrey, Ave. Morones Prieto 4500 Pte., Col. Jesús M. Garza, 66238 San Pedro Garza García, NL, México.

²Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de Monterrey, Ave. Morones Prieto 4500 Pte., Col. Jesús M. Garza, 66238 San Pedro Garza García, NL, México.

Resumen— Los nanotubos de Haloisita (HNTs) son estructuras tubulares de tamaño nanométrico obtenidos de depósitos naturales. Debido a que estos nanotubos han sido estudiados a lo largo del tiempo se ha logrado comprobar su excelente compatibilidad con el cuerpo humano haciéndolos viables para aplicaciones biomédicas, como la terapia focalizada. Se busca realizar el transporte de fármacos dentro de los nanotubos de haloisita mezclados con un material resistente, absorbente y biocompatible como el PEG. El objetivo de esta investigación fue el medir el crecimiento de células embrionarias de riñón mediante la realización de pruebas de citotoxicidad a la combinación de nanotubos de Haloisita y Polietilenglicol 400 y 600. Los resultados mostraron que en presencia de nanotubos de Haloisita el número de células disminuye. Esto debido a la aglomeración (gran tamaño) que presentan los nanotubos.

Palabras clave— Aglomerados, citotoxicidad, HNTs, polietilenglicol, proliferación celular.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la industria farmacéutica y el área relacionada al sector salud han estado buscando tendencias en nanotecnología para el transporte y liberación controlada de fármacos y el manejo de biosensores [1]. Se habían estado utilizando nanotubos de carbono (CNTs) para las aplicaciones antes mencionadas; sin embargo, se ha demostrado en estudios recientes que debido a su naturaleza tóxica, estos generan efectos negativos a la salud humana y el medio ambiente. [2]. Es por esta razón que se han optado por los nanotubos de Haloisita (HNTs), los cuales están emergiendo en la industria médica por ser compuestos ecológicos, biocompatibles, de bajo precio y que presentan buenas propiedades mecánicas [3].

Debido a que los HNTs cuentan con buenas propiedades mecánicas, por ejemplo: su módulo de Young se encuentra en el rango de 230-340 GPa, un rango bastante aceptable si lo comparamos con el módulo de los Nanotubos de carbono, que se encuentra entre 270 y 950 GPa. [4][5], los HNTs, están siendo utilizados para variedad de aplicaciones biológicas y no biológicas como: carga para la liberación de fármacos y distintos tipos de macromoléculas, almacenamiento de hidrógeno molecular, conversión catalítica y procesamiento de hidrocarburos; remediando la disminución de contaminantes ambientales [3]. La literatura

define a los HNTs como materiales únicos y versátiles formados por una superficie revestida de minerales de aluminosilicato y compuestos de diferentes proporciones de Al, Si, H, O [6]. Son estructuras tubulares huecos ultra delgados con un diámetro menor a 100 nm y una longitud menor a 1.2 μm . Estas nanopartículas se forman como resultado de la tensión causada por el desajuste de celdas entre las capas adyacentes de SiO_2 y Al_2O_3 . [3]

Los nanotubos de Haloisita han sido utilizados en diversos estudios y experimentos debido a su buena resistencia a altas temperaturas. Estos usos van desde piezas cerámicas a alta calidad y descontaminación del agua hasta la carga de sustancias biológicas-activas, biomoléculas, ADN y proteínas así como el reforzar otro tipo de biomateriales (e.g. reforzamiento de membranas de quitosano). [7][8]

El Polietilenglicol (PEG) es un polímero soluble en agua debido a sus propiedades hidrofílicas; su estructura química es $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$ [11]. La designación numérica determina el peso molecular aproximado, además, entre menor sea éste, su estado físico será más líquido y entre mayor sea, más sólido. En diferentes estudios se ha demostrado la biocompatibilidad de dicho polímero, ya que posee propiedades que no producen inmunogenicidad y antigenicidad, además de que no son rechazadas por parte de las proteínas. Asimismo, se encuentra en la lista GRAS de la FDA (compuestos generalmente reconocidos como seguros) y ha obtenido su aprobación para consumo interno. Gracias a sus propiedades, se utiliza en la industria farmacéutica para transporte de fármacos, en el cultivo de tejidos y para la conservación de órganos [10]. Para la terapia focalizada el PEG ayuda a las diversas funciones celulares como la supervivencia, proliferación y diferenciación. En la liberación de fármacos se necesita preservar la bioactividad de los mismos por lo que se deben considerar factores importantes sobre el PEG como el objetivo del fármaco, la gelación del material, la cinética-dinámica de carga y liberación del medicamento e interacciones con otros compuestos (e.g. nanotubos). [11-14]

Por otra parte, las células de embrión de riñón humano (HEK por sus siglas en inglés) han sido aprovechadas desde años atrás en el área de investigación científica, ya que ofrecen una plataforma eficiente para la producción a gran

escala de vectores lineales y proteínas recombinantes, son fáciles de cultivar, transferir y comúnmente son utilizadas como modelo para examinar al receptor transferido: en esta investigación se estudiará el comportamiento de dichas células con nanotubos de Haloisita (HNTs), PEG 600 y 400 [15].

Este proyecto contribuye al campo de la Ingeniería biomédica ya que se involucra con áreas de investigación de biomateriales e ingeniería de tejidos debido a su posible aplicación como transporte de fármacos.

II. METODOLOGÍA

A. Materiales

Los HNTs como el PEG 400 y el PEG 600 fueron adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Con la finalidad de saber el número de células presentes en la placa de 96 pocillos, se utilizó el CellTiter-Glo. Este material se obtuvo de la compañía Promega (USA, Madison, Wisconsin). Las células HEK fueron obtenidas de la compañía American Type Culture Collection (ATCC). (Manassas, VA, USA). Estas células contienen adenovirus y son empleadas notoriamente en ensayos clínicos que se realizan de terapia genética, gracias a su capacidad de producción a gran escala (su tiempo de duplicación es de 48 h). Dicha línea celular cuenta con el gen adenoviral E1 en su genoma, el cual permite que se lleve a cabo el proceso de replicación [15]. Las células HEK tienen un tamaño de 10 μm aproximadamente; generalmente crecen adheridas a una superficie, pero se pueden adaptar a replicarse en alguna suspensión [16].

B. Elaboración de las muestras

Debido a que el PEG 600 a temperatura ambiente se encuentra en estado sólido, debe ser sometido a un proceso de dispersión mecánica, es por ello que es necesario someterlo a un proceso de sonicación, en el cual después de un tiempo aproximado de 60 min cambia de fase a un estado líquido. Para la dispersión mecánica se optó por utilizar el método de sonicación de baño. Una vez que se encuentra en estado líquido se le agregan los HNTs; y se sonifica la muestra, esto con el objetivo de homogeneizarla. Se sigue el mismo proceso con la mezcla de PEG 400 y HNTs, omitiendo el proceso de la primera dispersión, debido a que éste ya se encuentra líquido a temperatura ambiente. El proceso para homogeneizar las muestras lleva alrededor de 40 min. Después de que las muestras han sido homogeneizadas, se procede a esterilizarlas en la autoclave. Para ello se utilizó el proceso de ciclo líquido.



Fig. 1. Tubos con muestras después de salir de la autoclave.

Una vez que las mezclas han sido esterilizadas, se procede a agregarles el medio celular y son mezcladas con un agitador vórtex. Después, se procede a depositar cada uno de los grupos del experimento en una columna de una placa de pozos (Fig. 2). Esto con la finalidad de tener varios duplicados y obtener un promedio, para adquirir datos más precisos. Por último, se procede a dejarlas crecer en una incubadora por 24 h. Como se indica en la Tabla 1, se utilizó una razón de 5 mg de nanotubos de Haloisita por cada 10 ml de PEG 400, PEG 600 y concentración celular.

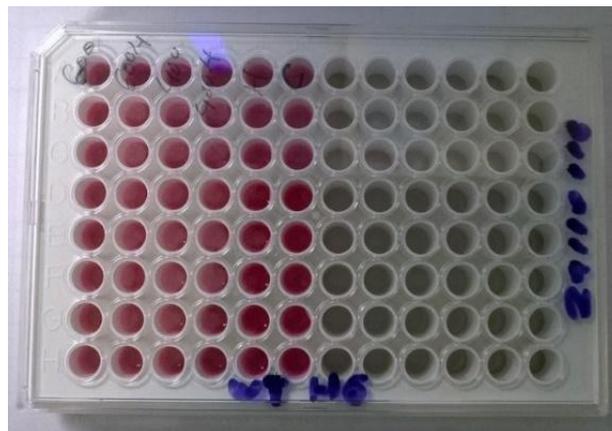


Fig. 2. Placa de pozos con los seis grupos del experimento.

Tabla 1. Grupos del Experimento

	Concentración HNTs	Concentración PEG	Concentración de Células
Grupo Control	-	-	10 ml
HNTs	5mg	-	10 ml
PEG 400	-	10 ml	10 ml
PEG 400 + HNTs	5 mg	10 ml	10 ml
PEG 600	-	10 ml	10 ml
PEG 600 + HNTs	5 mg	10 ml	10 ml

C. Proliferación Celular

Para medir la proliferación celular se llevó a cabo una prueba de luminiscencia llamada CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Esta prueba determina el número de células cultivadas mediante la cuantificación de ATP presente en un determinado pozo. Asimismo, se utiliza para medir la cantidad de células en pocillos múltiples [17]. Primero, se les agrega directamente a las células cultivadas un reactivo (CellTiter-Glo® Reagent). Después, debido a que la prueba es homogénea, da como resultado lisis celular al mismo tiempo que se produce una señal luminiscente. Esta señal es proporcional a la cantidad de ATP presente existente. Finalmente, se mide con un Luminómetro la cantidad de luminiscencia presente i.e. intensidad de brillo. Este brillo es la cantidad de ATP la cual es directamente proporcional al número de células. El tiempo estimado en el que el reactivo (para la luminiscencia) hace efecto es de al menos 10 min., por lo que se puede comenzar a coleccionar datos de inmediato [18].

III. RESULTADOS

Como se muestra en la Fig. 3, existe una relación lineal entre el número de células presente en cada pozo y la luminiscencia. Dado que los datos obtenidos se encuentran en términos de luminiscencia, se utiliza el método de CellTiter-Glo para crear una conversión de luminiscencia a cantidad de células por pozo.

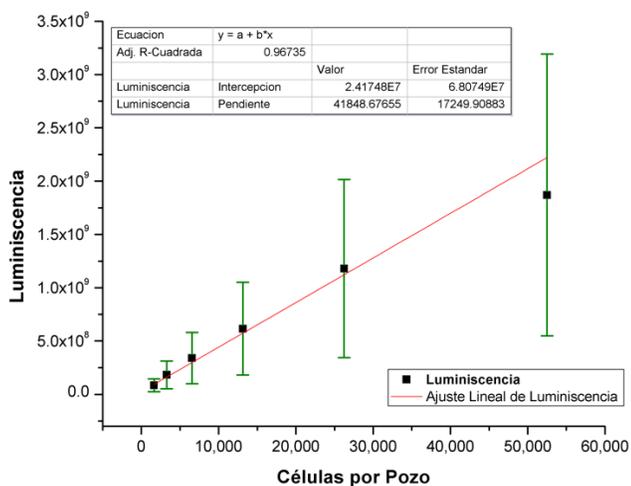


Fig. 3. Relación existente entre señal de luminiscencia y número de células.

En la Fig. 4 las muestras que contienen HNTs cuentan con un menor número de células a comparación del grupo control. Asimismo, en el estudio realizado por Vidaltamayo (2016), donde se llevaron a cabo pruebas de citotoxicidad con nanotubos de haloisita en células C6 (Células de

Glioblastoma de Rata), se determinó que los nanotubos a pesar de ser biocompatibles, evitaban la proliferación celular. Se creía que esto era debido a la inhibición por contacto, particularidad que poseen las células C6. De manera que se decidió realizar este estudio con células HEK, para obtener otra perspectiva, debido a que este tipo de células no poseen dicha propiedad característica de las células C6. Además, las células C6 deben su característica de inhibición de la proliferación a los factores inhibidores de crecimiento. Por otro lado, las células HEK 293 cuentan con la característica de duplicación de un tiempo de 48 horas, lo cual es óptimo para el experimento. [21] [22]

Los resultados obtenidos fueron que a pesar de que las células HEK no detienen su reproducción a causa de la inhibición por contacto, la proliferación celular se vio disminuida en presencia de HNTs. [1]

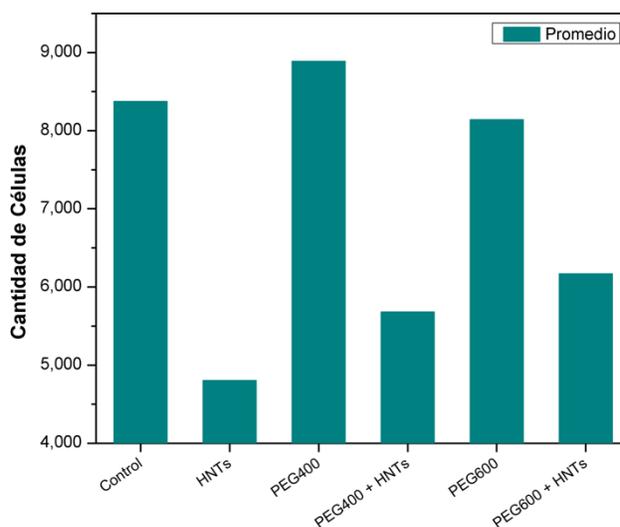


Fig. 4. Proliferación celular en los seis grupos del experimento

IV. DISCUSIÓN

En consecuencia al comportamiento celular obtenido por el experimento, se procedió a analizar una muestra de HNTs en el SEM (Microscopio Electrónico de Barrido). En la Fig. 5, se muestra la imagen obtenida de la muestra de los nanotubos de Haloisita donde se aprecia la formación de aglomerados de HNTs que van en el orden de los micrómetros i.e. tamaño muy similar al de las células HEK. Por ende, se concluye la proliferación celular se vio afectada por la presencia de dichos aglomerados, ya que forman una capa sobre las células que impiden su crecimiento.

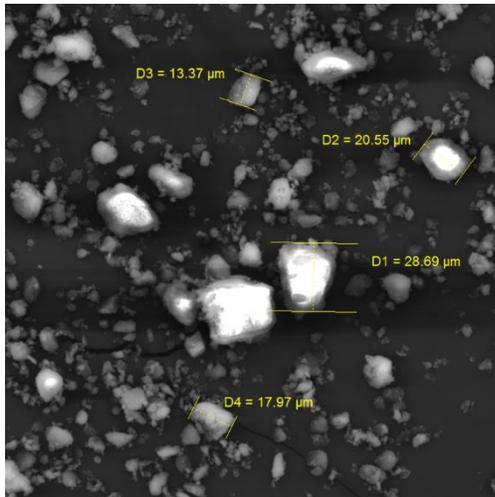


Fig. 5. Aglomeración de HNTs.

Para comprobar que los HNTs son los agentes que impiden la reproducción natural de las células, se realizaron también las pruebas de citotoxicidad en células HEK en presencia de PEG 400 y PEG 600. Al comparar el número de células vivas, se puede deducir que el PEG no detiene la proliferación celular, sin embargo, los HNTs sí. Esto sucede debido a que en las muestras que contenían HNTs, la cantidad de células disminuyó considerablemente a comparación del grupo control y de los grupos que sólo contenían PEG 400 y PEG 600, respectivamente. Debido a las pruebas realizadas, a comparación de los HNTs, el PEG resulta ser compatible. Por lo tanto, es un biomaterial altamente atractivo para diversas aplicaciones biomédicas como transporte de fármacos, medicina regenerativa (matrices y andamios) y como lubricantes.

V. CONCLUSIÓN

En este proyecto se planteó que el crecimiento celular de las HEK no se vería afectado, debido a que en la literatura los HNTs han sido catalogados como biocompatibles. No obstante, la proliferación celular se vio perjudicada por la presencia de los HNTs, ya que se los aglomerados de este material formaron una capa sobre las células que evitaba que fueran capaces de reproducirse, esto debido a que las aglomeraciones de nanotubos no le daban espacio a las células para dividirse.

Por lo tanto, se concluye que la biocompatibilidad de los nanotubos dependen de su dispersión; el tamaño de los nanotubos no es del orden nanométrico si no micrométrico, i.e. del tamaño de las células. Asimismo, las propiedades no fueron ideales con respecto a citotoxicidad ya que al momento de sonificarlas para lograr una dispersión completa, los tubos HNTs no se esparcieron correctamente. Por ende, se deduce que es necesaria una buena dispersión de nanopartículas para transporte de fármacos o aplicaciones

biomédicas, e.g. los nanotubos en concentración de 5mg pueden obstruir el conducto por donde se administre el fármaco, dado que el tamaño de los nanotubos es similar al de las células HEK. Por otra parte, estas aglomeraciones de nanopartículas pueden funcionar de manera más eficiente para transporte de fármacos si se modifican químicamente para obtener partículas de menor tamaño.

RECONOCIMIENTOS

Nuestro equipo de investigación agradece tanto al Departamento de Ingeniería como al Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad de Monterrey, por brindarnos las herramientas necesarias para poder llevar a cabo este proyecto. Asimismo, los autores agradecen el apoyo financiero otorgado por la DINV, número de fondo UIN16506.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. Vidaltamayo, L. Peña-Parás, A. Sánchez-Fernández, J. Kort-Mascort, S. Flores-Torres and V. Zomosa-Signoret, "Cytotoxicity, Viability, and Luminescence Testing of Silane Modified Halloysite Nanotubes.," in *MONTREAL'2016 AES-ATEMA International Conference. 2016*, 2016.
- [2] R. Kamble, M. Ghag, S. Gaikawad and B. Panda, "Halloysite Nanotubes and Applications: A review," *Journal of Advanced Scientific Research*, vol. 3, no. 2, pp. 25-29, 2013.
- [3] D. Rawtani and Y. Agrawal, "Applications of Halloysite Nanotubes: A Review," *RevAdvMaterSci*, no. 30, pp. 282-295, 2012.
- [4] A. Sánchez-Fernández, L. Peña-Parás, R. Vidaltamayo, R. Cué-Sampedro, A. Mendoza-Martínez and V. Zomosa-Signoret, "Synthesization, Characterization, and in Vitro Evaluation of Cytotoxicity of Biomaterials Based on Halloysite Nanotubes. Materials.," vol. 7, no. 12, pp. 7770-7780, 2014. DOI: 10.3390/ma7127770
- [5] Min-Feng Yu, Oleg Lourie, Mark K. Dyer, Katerina Moloni, Thomas F. Kelly, Rodney S. Ruoff, "Strength and Breaking Mechanism of Multiwalled Carbon Nanotubes Under Tensile Load", *Science* vol. 287, 2000.
- [6] J. Pili, "Mecanismos Relacionados con la Manifestación IN VITRO de la Heteroploidía en Células de Mamíferos [Doctor en Ciencias Naturales].," 2012.
- [7] K. Govindasamy, C. Fernandopulle and P. Pasbakhsh, "Synthesis and Characterization of Electrospun Chitosan Membranes Reinforced by Halloysite Nanotubes," *Journal of Mechanics in Medicine and Biology*, vol. 14, no. 4, p. 20 pgs, 2014.
- [8] V. Della Porta, E. Bramanti, B. Campanella, M. Rosaria Tine and C. Duce, "Conformational analysis of bovine serum albumin adsorbed on Halloysite Nanotubes and Kaolinite: a Fourier Transform....," *RSC Advances*, 2016.
- [9] L. Guimarães, A. Enyashin, G. Seifert and H. Duarte, "Structural, Electronic, and Mechanical Properties of Single-Walled Halloysite Nanotube Models.," *The Journal of Physical Chemistry.*, vol. 114, no. 26, pp. 11358-11363, 2010. DOI: 10.1021/jp100902e

- [10] X. Lin, X. Ju, R. Xie, M. Jiang, J. Wei and L. Chu, "Halloysite Nanotube Compositated Thermo-responsive Hydrogel System for Controlled-release.," *Chinese Journal of Chemical Engineering.*, vol. 21, no. 9, pp. 991-998, 2012.
- [11] L. Rao, H. Zhou, T. Li, C. Li, Y. Yanwen and Y. Duan, "Polyethylene glycol-containing polyurethane hydrogel coatings for improving the biocompatibility of neural electrodes.," *Journal of Acta Biomaterialia.*, vol. 8, no. 6, pp. 2233-2242, 2012. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.03.001
- [12] J. Chen, S. Spears, J. Huddleston and R. Rogers, "Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media.," *Green Chemistry.*, vol. 7, no. 2, pp. 64-82, 2005. DOI: 10.1039/B413546F
- [13] C. Lin and K. Anseth, "PEG Hydrogels for the Controlled Release of Biomolecules in Regenerative Medicine.," *Pharmaceutical Research.*, vol. 26, no. 3, pp. 631-643, 2009. DOI: 10.1007/s11095-008-9801-2
- [14] N. Peppas, P. Bures, W. Leobandung and H. Ichikawa, "Hydrogels in pharmaceutical formulations.," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.*, no. 50, pp. 27-46, 2000. DOI: 10.1016/S0939-6411(00)00090-4
- [15] N. Peppas, J. Hilt, A. Khademhosseini and R. Langer, "Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology.," *Advanced Materials.*, vol. 18, no. 11, pp. 1345-1360, 2006.
- [16] N. Peppas, K. Keys, M. Torres-Lugo and A. Lowman, "Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery.," *Journal of Controlled Release.*, vol. 62, no. 1-2, pp. 81-87, 1999.
- [17] ATCC.org, "293 [HEK-293] ATCC® CRL-1573™," 2014. [En línea]. Disponible en : <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1573.aspx#generalinformation>. [Accesado el 20 Noviembre 2016].
- [18] V. Martínez-Salazar, "Optimización del cultivo de células HEK293 en suspensión para su crecimiento y producción de adenovirus," 2007.
- [19] Promega, "CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Protocol (Technical Bulletin)," 2015. [Online]. Available: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol/>. [Accessed 28 Noviembre 2016].
- [20] N. Alcantar, E. Aydil and J. Israelachvili, "Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces.," *Journal of Biomedical Materials Research.*, vol. 51, no. 3, p. 343, 2000. DOI: 10.1002/1097-4636(20000905)51:3<343::AID-JBM7>3.0.CO;2-D
- [21] Celeromics, "Células Hek 293," [En Línea]. Disponible en: <http://www.celeromics.com/es/Soporte/cell-lines/Hek%20293%20cells.php>. [Accesado el 16 Septiembre 2017].
- [22] C. Mendes, L.-B. Soares, M. Alvarez and T. Goncaives, "Glicosaminoglicanos modular C6 glioma adhesión celular a componentes de la matriz extracelular y alterar la proliferación celular y migración celular," *BMC Cell Biology.*, no. 6, pp. 31-31, 2005.