

## Estudio de la biocompatibilidad *in vitro* de polimeros metacrílicos derivados de pirrolidona/ina

---

J. JIMÉNEZ<sup>1</sup>, N. GONZÁLEZ<sup>2</sup>, M. FERNÁNDEZ<sup>3</sup>, C. ELVIRA<sup>2</sup>, A. LÓPEZ<sup>1</sup>, J. SAN ROMÁN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Asociada al ICTP, CSIC. Complejo Hospitalario de Ávila. SACYL.

<sup>2</sup>Departamento de Química Macromolecular. Instituto de Ciencia y Tecnología de Polimeros (ICTP). CSIC.

<sup>3</sup>Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

### Resumen

*Este estudio analiza la biocompatibilidad de nuevos biomateriales a base de hidrogeles metacrílicos como el poli-[metacrilato de 2-etil-(2-pirrolidona)] (PEPM) y la poli-[metacrilato de 2-etil-(2-pirrolidina)], en comparación con referentes comerciales tales como la poli-(vinil pirrolidona) (PVP) y la poli-(N-N'-dimetilacrilamida) (PDMA). Se utilizaron propiedades bioquímicas, mediante los ensayos de MTT y Alamar Blue, para conocer el efecto de citotoxicidad y proliferación en cultivo de fibroblastos (células VERO), sobre los biomateriales metacrílicos. Adicionalmente, por microscopía óptica y electrónica fueron analizados el grado de adhesión, morfología, muerte celular, proliferación, contracción celular, etc. Además se estudiaron las relaciones entre citotoxicidad y estructura química. En el MTT y en el análisis óptico se obtuvo baja citotoxicidad para PEPM y PVP, media en PEPyM y alta en PDMA. En el Alamar Blue y SEM se produjo una media proliferación-adhesión en PEPM y PEPyM, alta en PVP y muerte celular en PDMA. Sus apropiadas características físico-químicas y su aceptable grado de biocompatibilidad les hacen buenos candidatos en aplicaciones tales como lentes de contacto, sistemas de liberación de fármacos e ingeniería de tejidos.*

**Palabras clave:** *Hidrogeles; derivados acrílicos; pirrolidona; pirrolidina; biocompatibilidad; células VERO.*

### Abstract

*This study analyzed biocompatibility of new biomaterials based on the methacrylic hydrogels derived poly-[2-ethyl-(2-pyrrolidone) methacrylate] (PEPM) and poly-[2-ethyl-(2-pyrrolidine) methacrylate] (PEPyM), in comparison with references such as commercial poly-(vinyl pyrrolidone) (PVP) and poly-(N, N-dimethylacrylamide) (PDMA). The biochemical properties were used to know cytotoxicity and proliferation effect over fibroblast culture (VERO cells) in contact with the methacrylic biomaterials, using MTT and Alamar Blue assays. Additionally, were analyzed adhesion grade, morphology, death cell presence, proliferation, cell contraction, etc, by optical and scanning electronic microscopy (SEM). The relationships between their chemical structures and cytotoxicity were studied. In MTT and optical analysis, low cytotoxicity was found for PEPM and PVP, medium in the case of PEPyM, and high for PDMA. In Alamar Blue and SEM, were produced a medium proliferation and adhesion rate for PEPM and PEPyM, high in PVP, and cellular death for PDMA. Their appropriate physico-chemical characteristics and approval biocompatibility grade make them good candidates in applications such as contact lenses, drug release systems and tissue engineering.*

**Keywords:** *Hydrogels; acrylic derivatives; pyrrolidone; pyrrolidine; biocompatibility; VERO cells.*

---

### Correspondencia:

J. San Román

ICTP-CSIC. Juan de la Cierva, 3. 28006, Madrid.

E-mail: jsroman@ictp.csic.es

Fax: 91 564 48 53

## Introducción

El campo de los biomateriales ha experimentado un espectacular avance en los últimos años gracias a la motivación de su investigación y al incremento de la esperanza de vida en los países desarrollados. La aplicación de un biomaterial supone la «colocación de un material extraño en un organismo vivo, buscando que esta agresión sea la menor posible e implique un resultado positivo para su calidad de vida» [1]. Esta definición abarca conceptos referidos al propio material, su interacción con el organismo o biocompatibilidad y el objetivo final de los mismos.

Los polímeros representan el grupo de biomateriales más amplio y variado por su gran versatilidad [2]. En concreto, los hidrogeles debido a su carácter hidrofílico y buena biocompatibilidad representan una opción interesante para el diseño de nuevos sistemas [3].

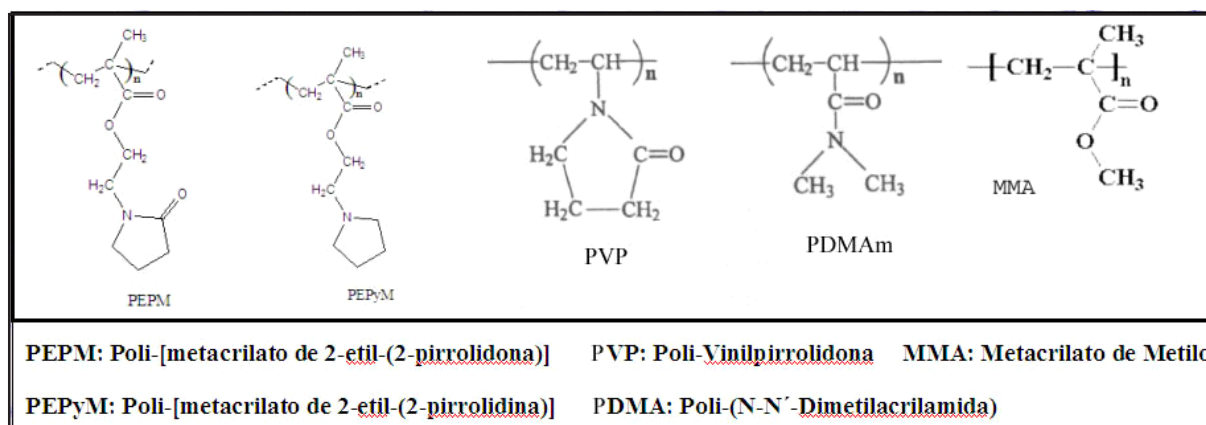
Los hidrogeles acrílicos descritos en este trabajo, muestran propiedades relevantes de cara a su utilización práctica, como son el comportamiento en medios acuosos y la sensibilidad frente a estímulos como la temperatura y el pH [4]. Estos suponen dos sistemas acrílicos nuevos desarrollados por nuestro grupo: PEPM, poli-[metacrilato de 2-etil-(2-pirrolidona)] y PEPyM, poli-[metacrilato de 2-etil-(2-pirrolidina)]. De forma adicional estos se han comparado con sistemas de origen comercial, como la poli (vinil pirrolidona) (PVP) y la poli (N-N'-dimetilacrilamida) (PDMA).

En la figura 1 se muestran las fórmulas químicas de los sistemas poliméricos acrílicos objeto del estudio. El avance en la metodología de cultivos celulares [5] ha permitido la sistemática evaluación de las respuestas biológicas «in vitro» frente a los

biomateriales, en los primeros estadios de la investigación y desarrollo. Surge así la necesidad de establecer de forma previa e ineludible, a la utilización de un biomaterial, la máxima garantía de que su interacción final con el organismo no sea tóxica, mutagénica, carcinogénica y además controlada y predecible [6]. En Europa, la norma que regula todo el proceso de evaluación en las fases experimentales es la UNE-EN ISO 10993. «evaluación biológica de los productos sanitarios» [7].

En los últimos años, se han preparado nuevos sistemas de liberación controlada y localizada de fármacos, transportadores celulares dirigidos, sistemas inteligentes que responden a señales físico-químicas del medio, etc. Los recientes logros de la ingeniería de tejidos han permitido la construcción de «andamiajes 3D» a base de biomateriales, que serán colonizados por células, obteniéndose así tejido neoformado para la reparación o regeneración tisular como alternativa a los implantes tradicionales [8,9].

Dentro del contexto descrito, hemos realizado este estudio que comprende ensayos de citotoxicidad, proliferación y adhesión «in vitro», basados en metodologías de detección bioquímica (MTT y Alamar Blue) o morfológicas (microscopía SEM y óptico), utilizando fibroblastos VERO, como garantía para establecer el grado de biocompatibilidad. Debido a las apropiadas respuestas físico-químicas de los sistemas «de novo», PEPM y PEPyM, como redes matriciales de hidrogeles que responden a estímulos ambientales (pH y temperatura), descritas en otros trabajos, les hacen buenos candidatos para su posible utilización en liberación de fármacos o ingeniería de tejidos. No obstante, su aplicación



**Figura 1.** Esquema de la estructuras químicas de los polímeros acrílicos objeto del estudio: PEPM, PEPyM, PVP, PDMA y MMA

requiere varias fases previas de evaluación biológica de biocompatibilidad, correspondiendo los estudios in vitro el objeto de este trabajo.

## Materiales y métodos

Se utilizaron discos (14 mm diámetro x 3 mm grosor) de poliestireno (PET), como superficie de soporte, sobre la que se depositaron películas de los polímeros acrílicos a ensayar: PEPm, PEPyM, PVP y PDMA. Todos ellos fueron copolimerizados con MMA (metilmetacrilato), en una proporción del 25%-p. Los sistemas ensayados fueron sintetizados por polimerización radical, y caracterizados por resonancia magnética nuclear (RMN) [10], tanto de protón ( $^1\text{H}$ ) como de carbono ( $^{13}\text{C}$ ), así como por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Las muestras fueron esterilizadas con óxido de etileno a temperatura ambiente. Se utilizó Thermanox (Thermanox $\text{\textcircled{O}}$ , THX, de Life Technologies), como control negativo.

Las células empleadas fueron obtenidas de una línea ya establecida denominada células VERO, fibroblastos de riñón de mono procedentes de American Type Culture Collection (ATCC), cedidas por el Instituto de Salud Carlos III, Madrid. El medio de cultivo fue *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM), complementado con penicilina/estreptomicina (10UI/10mg/ml), l-Glutamina (200 mM), todo ello suministrado por Sigma, y 10% suero fetal bovino (SBF) suministrado por Gibco. Tripsina-EDTA, Trypan Blue 0,4%, bromuro [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT), cacodilato sódico, ácido tánico, tetróxido de osmio y hexametildisalzano fueron suministrados por Sigma. Alamar Blue por Serotec. (Tritón X-100, TTN), Etanol absoluto y Dimetil sulfóxido (DMSO), por Scharlau. Glutaraldehído fue obtenido de Fluka. Los reactivos de microscopia óptica como son el fijador citológico Merckofix $\text{\textcircled{O}}$  por Merck, Eosina G y Thiazina, ó Dic-Quik $\text{\textcircled{O}}$  por Dade respectivamente y xileno por Panreac.

Para las siembras y los pases (cada 5 días, desde 1 a 2 frascos de cultivo), las células fueron levantadas con disolución de tripsina-EDTA y lavadas con PBS. Los cultivos fueron incubados a  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , y 5%  $\text{CO}_2$ .

### Ensayo de MTT:

El ensayo de citotoxicidad fue realizado de acuerdo al método descrito por Mosmann [11] en 1983. En un experimento típico, para la obtención de los extractos (esterilizados con filtros 0,22  $\mu\text{m}$ ), los discos de los materiales experimentales y del

control negativo (THX) fueron incubados en 5 ml de medio de cultivo a  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ , en un baño termostatzado con agitación. El medio de cultivo que contiene los extractos solubles de los materiales, fue obtenido después de 1 día de incubación y reemplazado por medio fresco. Este procedimiento fue repetido a los 2 y 7 días después del comienzo del experimento y en condiciones idénticas. Todos los extractos fueron obtenidos bajo condiciones estériles y congelados a  $-18^\circ\text{C}$ . Las células fueron levantadas con tripsina (5 min.,  $37^\circ\text{C}$ ) y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Se tiñeron con Trypan Blue y se contaron en cámara Thoma. Las células fueron sembradas en placa de 96 pocillos con una densidad de  $11 \times 10^4$  células/ml e incubadas durante 24 horas a  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ . Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo fue eliminado y reemplazado con 100ml/pocillo de los extractos solubles de cada material, el THX (control positivo), y a cada día de extracción. Adicionalmente, fue añadido, en idéntica cantidad, solución 0,5% de Tritón X-100 (control negativo) y medio fresco de cultivo (control). En todos los casos, el número de réplicas fue de 16. Las placas fueron incubadas a  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ , durante 24 horas. Posteriormente, se eliminaron los extractos y se añadió 100ml/pocillo de MTT (0,5 mg/ml) y se incubaron las placas a  $37^\circ\text{C}$  durante 3 horas y 30 minutos. Como blanco, se utilizó una réplica sin células sembradas ni adición de extractos. Se eliminó el MTT y se añadieron 100ml/pocillo de DMSO que disuelve los cristales violetas de formazán, formados por células viables. La densidad óptica (D.O.) fue medida con un lector de placas Biotek ELX808IU, usando una longitud de onda de 570 nm. Los valores de D.O. fueron corregidos teniendo en cuenta la media de absorbancia del blanco.

### Ensayo de Alamar Blue

En este ensayo [12], se colocaron en placas de 24 pocillos, los discos estériles de cada material y del THX como control negativo ( $n=4$ ). Las células fueron levantadas por tripsinización, centrifugadas, teñidas y contadas. Se sembraron las mismas sobre los materiales con una densidad de  $14 \times 10^4$  células/ml. Tras la incubación a  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ , y 5%  $\text{CO}_2$  durante 1 día, se eliminó el medio de los pocillos, se lavo con PBS y añadió una solución de Alamar Blue (preparada por dilución de solución stock de Alamar Blue en MEM completo sin rojo fenol, en proporción 1:10-v). Las placas fueron incubadas a  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  durante 3 horas 30 minutos. De cada pocillo fueron tomadas alícuotas de 100 ml y traspasadas a una

placa de 96 pocillos. Después se procedió a la lectura de la. D.O. a 1, 4, 7, 14 y 21 días después de la siembra celular. Los valores de absorbancia fueron corregidos en relación a la media del blanco.

#### *Ensayo de microscopia electrónica de barrido (SEM)*

Después de 1 día de cultivo a  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ , se analizó la adhesión, morfología y proliferación celular sobre los polímeros por microscopía electrónica de barrido. Se colocaron discos estériles de cada material y del control THX en placas de 24 pocillos ( $n=2$ ). Las células fueron sembradas directamente sobre los materiales con una densidad de  $14 \times 10^4$  cel/ml. Después de 24 horas de incubación, se eliminó el medio de cada pocillo, se lavó con PBS y se fijaron las células con glutaraldehído 2,5%-v en 0,1M tampón Na cacodilato, pH 7.4, durante 2 horas a  $T^a$  ambiente y guardadas a  $4^\circ\text{C}$  durante 1 día. La post-fijación fue en tetróxido de osmio 1% (1 h) y ácido tánico 1% (1h), ambos en el mismo tampón. Después de cada adición, las muestras fueron lavadas en el tampón (5 min., 3 veces). A continuación, se deshidrataron en gradiente de solución de etanol (20, 30, 40, 50, 60, 70%-v), cada una durante 10 min. y 3 veces. Las células fueron secadas con acetato de uranilo 0,5%-v en etanol 70%-v (30 min.) , y de nuevo deshidratadas con soluciones de etanol (90, 96, 100% desecado con sulfato de sodio, por 10 min. y 2 veces). Las muestras se llevaron hasta el punto crítico de secado con hexametildisilazano (2 min. 2 veces). Posteriormente se secaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 horas, metalizadas con oro y observadas en SEM-Scan Electronic Microscope Philips XL 30, a 10-20 KeV.

#### *Microscopia óptica*

Se recolectaron las células por tripsinización y posterior centrifugación; fueron teñidas, contadas y la disolución de siembra se añadió a 5 ml/pocillo, en placas de 6 pocillos, a una concentración de  $14 \times 10^4$  cel/ml. Previo a la siembra se colocaron portaobjetos de vidrio de 22 x 22 mm en cada pocillo. Después de 1 día de incubación en idénticas condiciones, el medio de cada pocillo fue reemplazado por la misma cantidad de los extractos del MTT correspondientes a cada material ( $n=2$ ), utilizándose únicamente los extractos a 1 día, así como del control negativo THX y un control con medio fresco y completo. Tras 1 día de incubación, los cubreobjetos fueron extraídos de las placas y las células fueron fijadas mediante citospray Merkofix $\text{\textcircled{O}}$  y estabilizadas en etanol 70%-v (1-2

min. x 2). A continuación fueron teñidas con Eosina G (3-4 min.) y Thiazina (2-3 min.) en disoluciones Dic-Quik $\text{\textcircled{O}}$ . Deshidratadas en serie de etanol: 70, 96 y 100%-v (1-2 min.) y lavadas en xileno. Posteriormente fueron observadas en microscopio óptico Nikon Eclipse E600, con análisis de imagen y cámara digital Nikon DXM 1200.

#### *Análisis estadístico*

El análisis de la varianza (*one-way ANOVA*) y el test de multicomparación de Tukey (*Tukey Honestly Significant Difference, HDS*), fueron usados para analizar las diferencias entre la absorbancia, en los ensayos de MTT y Alamar Blue, de los materiales en comparación con el control negativo THX. El análisis estadístico de los datos se realizó en *Statistica* para Windows (Statsoft, Inc., 1999). En todas las hipótesis estadísticas fueron consideradas diferencias significativas a  $p < 0,05$ , y no significativas para  $p > 0,05$ .

## **Resultados**

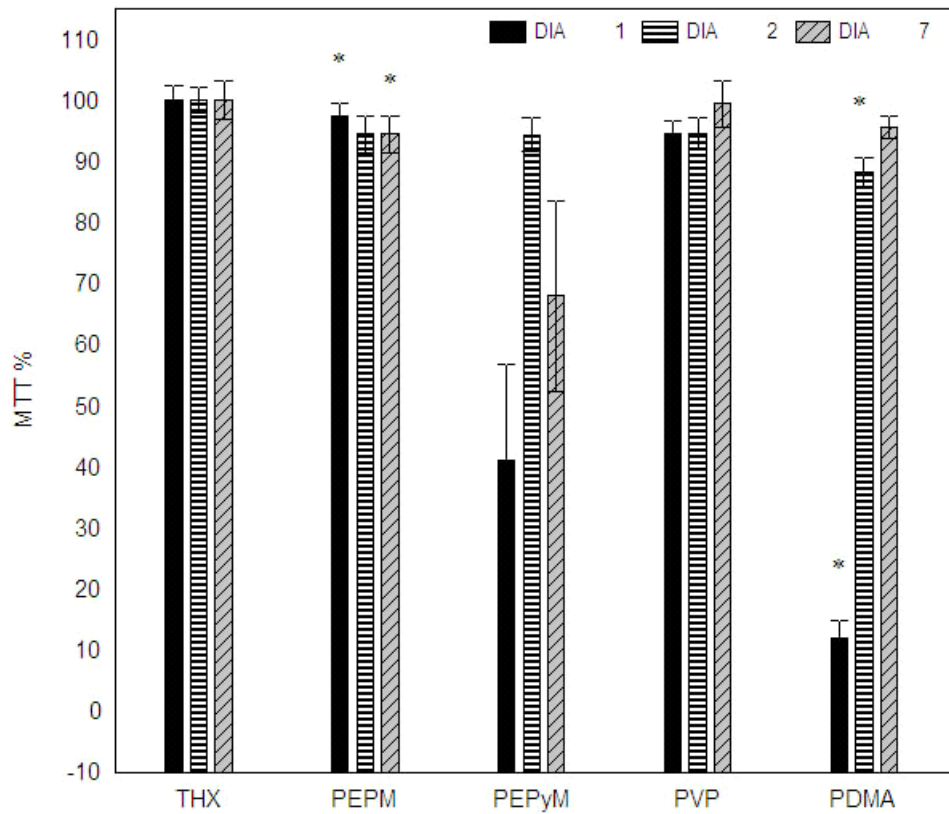
#### *Ensayo de MTT:*

En la figura 2 se muestran los resultados del ensayo de MTT para los sistemas ensayados. Los sistemas PEPM y PVP, presentan niveles de crecimiento celular superiores al 90%, muy similar al control THX. En cuanto a PDMA, se observa una viabilidad celular muy reducida en los extractos correspondientes a 1 día. La viabilidad se recupera a niveles altos en los extractos correspondientes a 2 y 7 días. El PEPyM presenta un patrón de liberación de compuestos citotóxicos irregular. Existe una toxicidad media inicial (supervivencia del 40%), que es eliminada en la primera extracción correspondiente a los extractos a 2 días. Tras 7 días de incubación se produce una nueva caída de la proliferación celular, correspondiente a los extractos a 7 días.

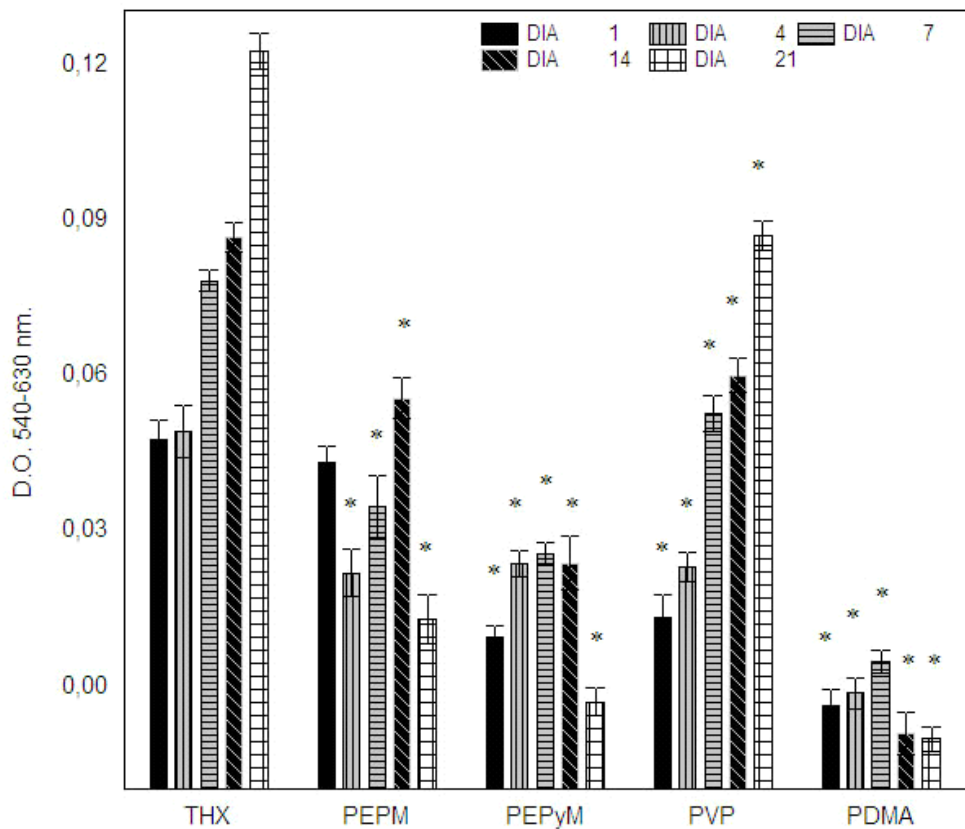
Se encontraron diferencias significativas o altamente significativas para la mayoría de los materiales y días. Existen diferencias no significativas para PEPM a 1 día y 7 días y para PVP a 7 días.

#### *Ensayo de Alamar Blue:*

En la figura 3 se muestran los resultados del ensayo de Alamar Blue. Los sistemas poliméricos ensayados fueron similares al MTT. El control THX posee un patrón característico. La PVP presenta una dinámica muy similar al THX, aunque con valores proliferativos inferiores a todos los días. Presenta problemas en la adhesión celular en los



**Figura 2.** Resultados de citotoxicidad del ensayo de MTT de muestras de los biomateriales ensayados: PEPM, PEPyM, PVP, PDMA, y control THX. \* Diferencias significativas respecto del control THX.  $p < 0,001$



**Figura 3.** Resultados de proliferación y adhesión celular del ensayo de Alamar Blue de los biomateriales ensayados: PEPM, PEPyM, PVP, PDMA y control THX. \* Diferencias significativas respecto del control THX.  $p < 0,001$



primeros días, pero esta es recuperada progresivamente hasta alcanzar un máximo a 21 días. En PDMA la proliferación es prácticamente nula a todos los días. En PEPM después de 1 día, se da un ligero descenso, el crecimiento aumenta hasta el día 14, dándose una caída acusada a 21 días. En PEPyM existen niveles de crecimiento bajos que se incrementan ligeramente tras la siembra, hasta producirse la muerte celular a 21 días.

Se encontraron diferencias altamente significativas para todos los materiales y días a excepción de PEPM a 1 día que presentó diferencias no significativas respecto del control THX.

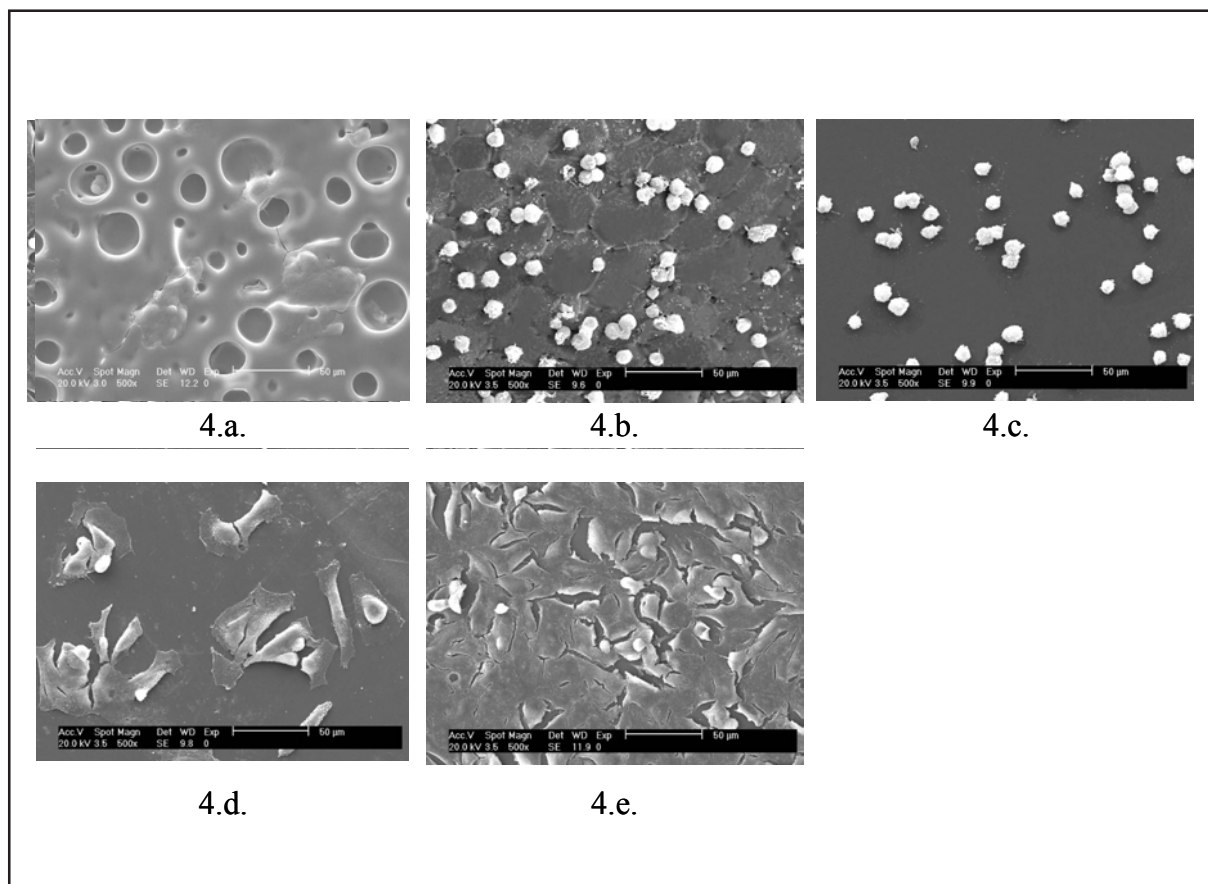
*Ensayo de microscopía electrónica de barrido (SEM):*

En la figura 4 se muestran micrografías por SEM de colonización de fibroblastos VERO sobre los biomateriales ensayados. En PEPM no existe proliferación celular activa, sin llegar a formarse monocapa celular. Las células están aisladas o

formando agrupaciones. Su morfología es globosa, poco aplanadas y sin prolongaciones. En PEPyM no ha habido proliferación celular. Las células son globosas, turgentes y por tanto viables aunque con un bajo nivel de adhesión al sustrato. En PDMA, se observa nula viabilidad por fuerte daño de citotoxicidad, siendo mínimo el grado de adhesión. Las células se muestran deformadas y poco turgentes. En PVP aunque existe un grado medio de proliferación, su grado de adhesión es bueno. Las células aunque carecen de largas prolongaciones se muestran aplanadas, exhibiendo morfologías particulares. En los controles PET y THX se ha dado una proliferación muy activa, estando bien unidas al sustrato y formándose una monocapa celular continua.

*Ensayo de microscopía óptica:*

En la figura 5 se muestran imágenes de microscopía óptica de fibroblastos VERO sometidos durante 24 horas a los extractos a 1 día de los biomateriales ensayados. En PEPM existe alta proliferación, llegándose a la confluencia del cultivo.



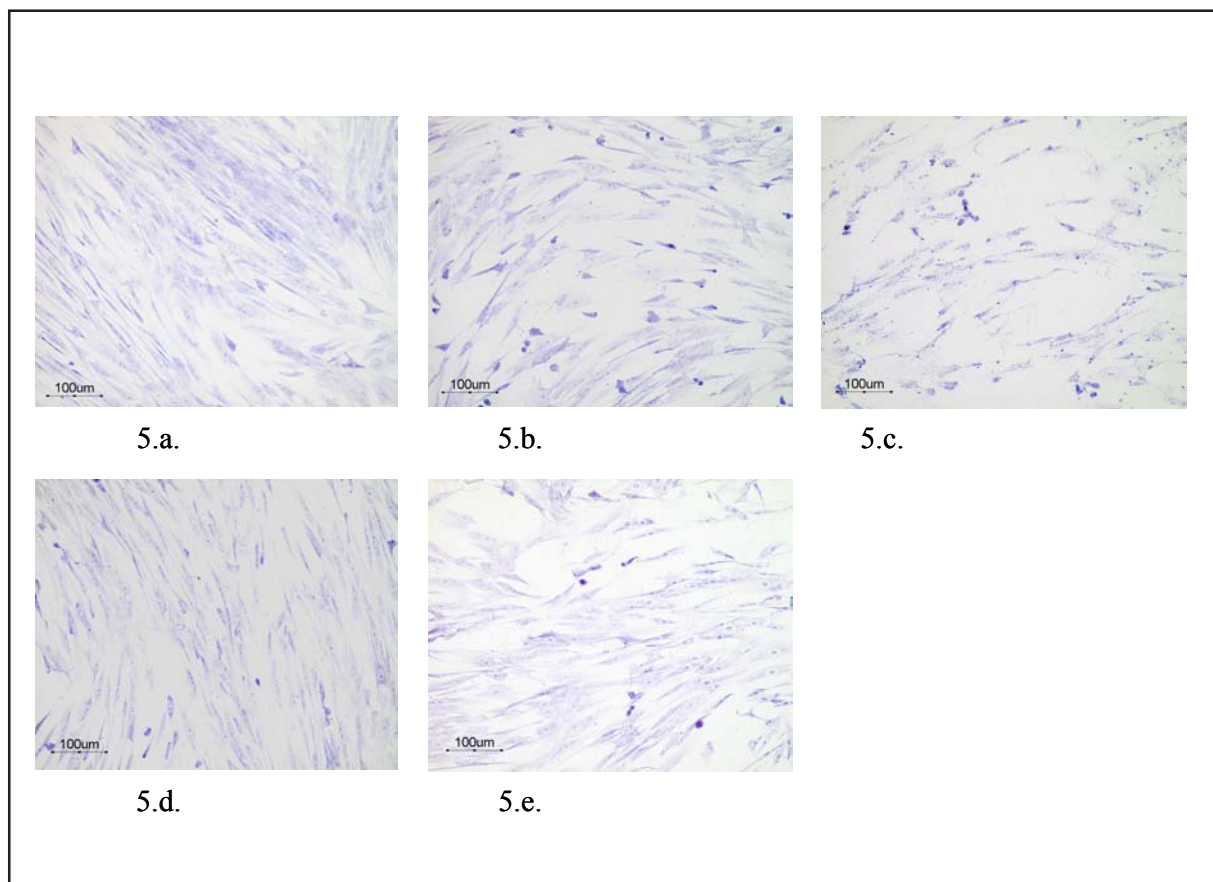
**Figura 4.** Micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de colonización de los biomateriales por fibroblastos (células VERO). Todas las imágenes se muestran como vista general a 500 aumentos, y a 1 día de cultivo. 3.a. PEPM 3.b. PEPyM 3.c. PDMA 3.d. PVP 3.e. THX

No se observan fenómenos de muerte celular por necrosis y/o apoptosis ni alteraciones morfológicas celulares. En PEPyM la proliferación se ha reducido, produciéndose pérdida de superficie ocupada por muerte celular. La morfología externa de las células muestra modificaciones: Cuerpo celular ensanchado, multipolar, con pseudópodos más largos y estrechos (atrofia celular) y cierto grado de vacuolización. En PVP existen amplias zonas de pérdida celular debido a fenómenos de alteración de la adhesión celular. No existen células en muerte celular o picnosis, ni alteraciones de su morfología externa. Existe cierta disminución de la relación volumen citoplasma/núcleo (redondeo celular). En PDMA, se ha producido muerte celular generalizada, con células muy alteradas a todos los niveles. Alta atrofia y colapso citoplasmático (células arqueadas, con prolongaciones de mínimo diámetro y sinuosas, etc), y nuclear que provoca cariólisis, observándose material intracitoplasmático. En el control THX el desarrollo del cultivo es óptimo, con alta proliferación-adhesión y ausencia de alteraciones celulares internas o externas.

## Discusión

Ciertos residuos del proceso de síntesis polimérica pueden ser liberados al medio externo, principalmente monómero residual [13] y provocar efectos citotóxicos, evaluables mediante cultivo celular por técnicas bioquímicas. El MTT, demuestra la ausencia de citotoxicidad (supervivencia > 90%) para PEPM y PVP. En PEPyM existe toxicidad media inicial (40%), que es eliminada en la siguiente extracción. Tras 7 días, el acumulo de citotóxicos provoca una nueva caída de viabilidad. En PDMA la liberación de tóxicos es máxima y única a 1 día, ya que no persisten sus efectos en días sucesivos. A este respecto, ciertos estudios indican como tras un lavado previo del biomaterial, se pueden reducir sus efectos citotóxicos de forma significativa [14].

En el Alamar Blue, PVP muestra el mayor grado de biocompatibilidad; aunque presenta problemas iniciales en la adhesión, sigue un patrón proliferativo similar al THX. En PEPM y PEPyM, por sus niveles proliferativos, se puede considerar un grado medio



**Figura 5.** Imágenes de microscopía óptica de proliferación de células VERO. Todas se muestran como vista general a 200 aumentos y a 1 día de cultivo. 4.a. PEPM 4.b. PEPyM 4.c. PDMA 4.d. PVP 4.e. THX

de aceptación biológica, siempre menor para PEPyM. En PDMA, la máxima toxicidad provoca la muerte inicial del cultivo. En el SEM, para PEPM y PEPyM, la morfología celular demuestra un bajo grado de adhesión y por tanto de proliferación. También en este caso, los resultados de biocompatibilidad son menores para PEPyM. En PVP, consideramos un buen grado de adhesión, si bien la proliferación no alcanza los valores del control. En PDMA nuevamente la fuerte citotoxicidad del material lleva a la muerte del cultivo. En el óptico, PEPM por su alta proliferación y ausencia de muerte y/o alteración celular fue considerado altamente biocompatible. En PEPyM y PVP, consideramos un nivel medio, ya que existen problemas proliferativos, relacionados con la adhesión en PVP y con la muerte celular en PEPyM. Los efectos del PDMA demuestran otra vez su alta citotoxicidad. De esta forma se demuestra como componentes liberados al medio y detectados sus efectos por ensayos bioquímicos, son capaces de ejercer ciertas alteraciones, que aunque leves, pueden observarse también por métodos morfológicos.

Para el desarrollo posterior de nuestros sistemas, ha sido necesario analizar sus efectos citotóxicos y proliferativos. Dichos efectos pueden ser debidos al monómero residual, así en la literatura existen numerosos estudios de base en acrilatos y metacrilatos [15,16], algunos relacionan sus estructuras y propiedades químicas con el grado de toxicidad.

Ciertos estudios relacionan directamente la citotoxicidad con la hidrofilia [17,18]. Otros estudios analizan la citotoxicidad por hemólisis en relación a la hidrofobia y su efecto sobre la membrana y lisis celular [19,20]. Hanks et al. [21] y E. Yoshii [22] correlacionaron estructura química y grado de hidrofilia/hidrofobia con la dosis IC50. En general, el aumento de longitud de la cadena alquílica de sustitución del éster, aumenta el grado de toxicidad, y esto podría explicarse por el aumento de hidrofobia.

Adicionalmente, la adición de grupos funcionales, añaden citotoxicidad. Se ha demostrado como la adición de grupos hidroxilo o amina elevan en mayor grado la citotoxicidad que los sustituyentes alifáticos [17].

En general, la toxicidad de base de este grupo de biomateriales radica en la presencia del grupo acrílico del monómero residual [23]. En la literatura se muestran los sistemas PVP y PMMA como altamente biocompatibles [24,25]. En este estudio, la poli (vinil pirrolidona) (PVP), así como el sistema metilmetacrilato (MMA), posiblemente debido a su menor tamaño molecular, ausencia de largas cadenas alifáticas y alta hidrofiliidad, se muestran más biocompatibles que los derivados metacrílicos PEPM y PEPyM, de mayor tamaño, con cadena carbonada alifática y un anillo (sustituyente etil pirrolidona/ina). En estos últimos la presencia del anillo no es responsable de citotoxicidad, como demuestra la alta biocompatibilidad de VP, que también lo posee. La presencia del carbonilo (grupo hidrofílico), como única diferencia, en el anillo del PEPM es responsable de su mayor grado de biocompatibilidad respecto de PEPyM, posiblemente por el aumento que proporciona en su grado de hidrofilia. Posiblemente la presencia de la amina terciaria ionizable en el anillo de PEPyM sea responsable de su menor biocompatibilidad. En PDMA, a pesar de su menor tamaño, es posible que el nitrógeno del grupo funcional, sea el responsable de sus efectos citotóxicos [26], hecho muy reportado en la bibliografía.

## Conclusiones

Estos estudios de citotoxicidad, proliferación y adhesión sobre sistemas metacrílicos derivados de etil pirrolidona (PEPM) y etil pirrolidina (PEPyM), en comparación con compuestos comerciales afines como la poli (vinil pirrolidona) (VP) y la poli (dimetilacrilamida) (DMA), constituyen resultados novedosos por tratarse de sistemas de nuevo diseño de síntesis por nuestro grupo de trabajo [27]. Si bien resultan poco citotóxicos, si presentan problemas generales de adhesión y proliferación sobre su superficie, siendo la biocompatibilidad de PEPyM inferior, en todos los casos, al de PEPM. Sus apropiadas características físico-químicas y su aceptable grado de biocompatibilidad, les hacen buenos candidatos en diferentes campos biomédicos: lentes de contacto, recubrimientos biológicos, matrices de liberación de fármacos e ingeniería de tejidos.



## Bibliografía

1. **López A, Parra J, Jiménez J, San Román J.** El lenguaje y la interpretación de la biopatología orientada a biomateriales y biomecánica. *Biomecánica* 2004;12(1):54-63.
2. **Ottenbrite RM, editors.** *Frontiers in Biomedical Polymer Applications.* Lancaster, Pennsylvania, USA: Technomic Pbl. Co, 1990.
3. **Yannas IV, Lee E, Orgill DP, et al.** Síntesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *PNAS* 1999;86: 933-937.
4. **Harland RS, Prud'Homme RK, editors.** *Polyelectrolyte gels: properties, preparation, and applications.* Washington D. C. American Chemical Society, 1992.
5. **Enders JF, Weller TH, Robbins FC.** Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science* 1949;109:85-87.
6. **López A, Parra J, Jiménez J, San Román J.** Análisis anatomopatológico de biomateriales. En: Sastre R, De Aza S, San Román J, editores. *Biomateriales.* Italia: Faenza Eritrice, 2004. p. 239-268.
7. **UNE-EN, ISO 10993.** AENOR, 1998.
8. **Von Recum AF, Laberge M.** Educational goals for biomaterials science and engineering: prospective view. *Journal of Applied Biomaterials* 1995;6:137-144.
9. **Hubbell JA.** Synthetic biodegradable polymers for tissue engineering and drug delivery. *Curr Opin Sol State Mater Sci* 1998;3: 246-251.
10. **Phan QT, Pétiard R, Waten H, Llauro-Darricades MF, editors.** *Proton and Carbon NMR spectra of polymers.* 6ª Edición. USA: Wiley, 2003.
11. **Mossman T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983;65:55-63.
12. **O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F.** Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 2000; 367:5421-5426.
13. **Baker S, Brooks SC, Walker DM.** The release of residual monomeric methyl methacrylate from acrylic appliances in the human mouth: an assay for monomer in saliva. *J Dent Res* 1988;67: 1295-1299.
14. **Gough JE, Downes S.** Osteoblast cell death on methacrylate polymers involves apoptosis. *J Biomed Mater Res* 2001;57:497-505.
15. **Sato K, Takakuwa M, Ohmura T, Sato A.** Cytotoxic effects of dental resin monomers on cultured human pulp cells. *J Jpn Dent Mater* 1995;14:341-347.
16. **Yokota W, Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y.** Studies on concentration and cytotoxicity of base monomers eluted from light-cured composites resins. *Jpn J Conserv Dent* 1991;34:459-467.
17. **Lawrence WH, Bass GE, Purcell, WP, Autian J.** Use of mathematical models in the study of structure-toxicity relationships of dental compounds. Esters of acrylic and methacrylic acids. *J Dent Res* 1972;51:526-535.
18. **Bass GE, Lawrence WH, Purcell WP, Autian J.** Further evaluation of a quantitative mathematical model for predicting acute toxicity of acrylate and methacrylate esters. *J Dent Res* 1972;51:1632-1638.
19. **Dillingham EO, Laurence WH, Autian J.** Acrylate and methacrylate esters: relationship of hemolytic activity and in vivo toxicity. *J Biomed Mater Res* 1983;17:945-957.
20. **Fujisawa S, Imai Y, Kojima K, Masuhara E.** Studies on hemolytic activity of bisphenol a diglycidyl methacrylate (BIS-GMA). *J Dent Res* 1978;57:98-102.
21. **Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG.** Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res* 1991;70:1450-1455.
22. **Yoshii E.** Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 1997;37:517-524.
23. **Oberly R, Tansy MF.** LC50 values for rats acutely exposed to vapors of acrylic and methacrylic acid esters. *J Toxicol Environ Health* 1985;16:811-822.
24. **Wiese KG, Heinemann DE, Ostermeier D, Peters JH.** Biomaterial properties and biocompatibility in cell culture of a novel self-inflating hydrogel tissue expandir. *J Biomed Mater Res* 2001;54:179-188.
25. **Dalby MJ, Di Silvio L, Harper EJ, Bonfield W.** In vitro adhesion and biocompatibility of osteoblast-like cells to poly (methylmethacrylate) and poly (ethylmethacrylate) bone cements. *J Mater Sci* 2002;13:311-314.
26. **Edwards PM.** Neurotoxicity of acrylamide and its analogues and effects of these analogues and other agents on acrylamide neuropathy. *Br J Ind Med* 1975;32:31-38.
27. **González N, Elvira C, San Román J.** Hydrophilic and hydrophobic copolymer systems based on acrylic derivatives of pyrrolidone and pyrrolidine. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2003;41: 395-407.