

Estudio de interacciones de Estaterina con superficies de hidroxiapatita: Análisis de superficie

Claudia Mendoza-Barrera

Bioengineering Department, University of Washington, and National ESCA and Surface Analysis Center for Biomedical Problems, Seattle, WA, USA 98195-1750

Centro de Investigación en Micro y Nanotecnología, Universidad Veracruzana, Veracruz Ver, Mexico, 94294

E-mail: cmendoza_barrera@hotmail.com

En el proceso de biomineralización algunos organismos vivos incorporan compuestos minerales insolubles dentro de sus estructuras biológicas, creando biominerales que usualmente son duros pero menos frágiles que sus similares hallados en minerales geológicos, que presentan la misma composición pero diferente estructura cristalina. Las notables propiedades de los tejidos duros resultan de las actividades de ciertas proteínas que inciden en la interfase orgánica-inorgánica. El entendimiento de cómo esas proteínas reconocen e incorporan a la parte inorgánica la matriz inorgánica, puede proveer la clave para el desarrollo de superficies modificadas en la ciencia de biomateriales. En este artículo empleamos espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS) para caracterizar las interacciones de estaterina, una proteína salivaria, con superficies de hidroxiapatita HAp. Se emplearon los modos composicional, de detalle y alta resolución para establecer la composición de substratos, adsorción de proteína e isoterma de nitrógeno.

Palabras clave: Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X; Estaterina; Hidroxiapatita

In the biomineralization process some living organisms incorporate insoluble minerals compounds into their biological structures, creating biominerals that are usually hard but much less brittle than the those similar found on geological minerals. Such biominerals have the same composition but different crystal structure. The remarkable material properties of hard tissues result from the activities of a number of proteins that function at the organic-inorganic interface. A better understanding of how these proteins recognize and assemble on inorganic mineral phases should provide key insights into biological materials processing strategies and may aid in the development of surface modification approaches for biomaterials. In this paper we used x-ray photoelectron spectroscopy (XPS) to study and characterize the interactions of statherin, a salivary protein, with hydroxyapatite (HAp) surfaces. We use survey, detail and high resolution scans to establish substrates composition, protein adsorption and nitrogen isotherm.

Keywords: X-ray photoelectron spectroscopy; Statherin; Hydroxyapatite

1. Introducción

El proceso de *biomineralización* consiste en la incorporación de cristales de forma estratificada y organizada en la matriz celular o extracelular de ciertos organismos vivos, entre ellos el esqueleto y dentadura humanos [1-5]. Este proceso es controlado mayormente mediante la acción catalítica de macromoléculas ácidas como las proteínas, glicoproteínas y/o polipéptidos, quienes manipulan y controlan la formación de cristales [6]. De hecho, las regiones poliacídicas son comunes en las proteínas que interactúan con iones inorgánicos y superficies minerales, particularmente los fosfatos de calcio presentes en tejido duro, es decir, los dominios ácidos son responsables del enlace entre la hidroxiapatita, componente principal de hueso y diente, y las proteínas [7]. Sin embargo aún y cuando se sabe que las proteínas controlan directamente la nucleación y crecimiento de dichos minerales, los detalles de reconocimiento molecular en la interfase proteína-biomineral no son del todo claros. Dado que, la interacción de las proteínas con los minerales se lleva a cabo en una capa de alrededor de 100Å, es necesario emplear técnicas de caracterización superficial que provean de información relacionada con la composición, orientación, y conformación de las proteínas

cuando éstas son adsorbidas sobre la superficie del material.

Una técnica que ha demostrado que presenta excelente especificidad química, sensibilidad superficial y brinda composición elemental relacionada con la adsorción de proteínas en la superficie estudiada es la espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS) [8-9].

En este trabajo se sintetiza y caracteriza hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y se estudia, mediante XPS, su interacción con estaterina, un fosfopéptido ácido de 43 residuos, rico en prolina y tirosina con un alto grado de simetría estructural y carga, que se encuentra presente en la saliva parótida y submandibular. Entre las funciones principales de la estaterina se encuentran la de transporte de calcio y fosfatos durante la secreción en las glándulas salivarias y, la inhibición espontánea de la precipitación y crecimiento cristalino en soluciones supersaturadas de minerales de fosfatos de calcio [10-13].

Antes del experimento de la adsorción proteica se caracterizó la pureza y fase de la hidroxiapatita sintetizada mediante difracción de rayos X (XRD), y se empleó XPS para obtener la razón Ca/P y establecer la no existencia de nitrógeno sobre la superficie y/o contaminación sobre la superficie. Se obtuvo la isoterma de adsorción de estaterina sobre superficies de HAp mediante XPS en modo detalle y, se estableció la concentración necesaria para formar

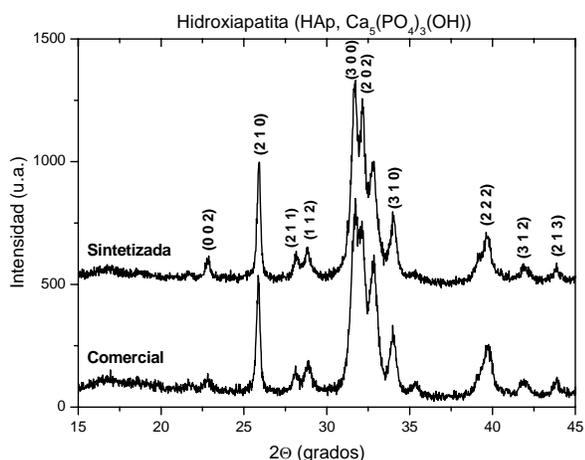


Figura 1. Espectro de XRD de muestras de Hap sintetizada y comercial.

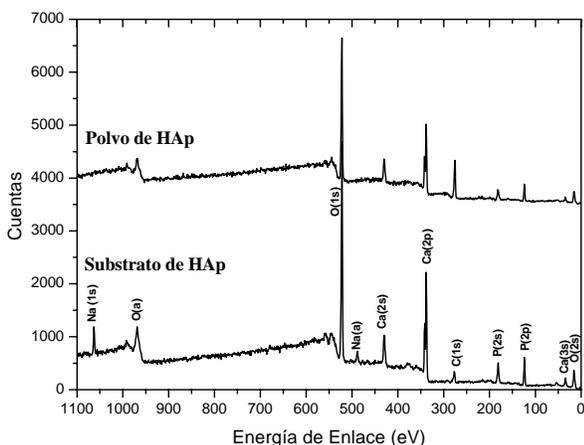


Figura 2. Espectros XPS en modo composicional de muestras de HAp en forma de polvo y de pastilla.

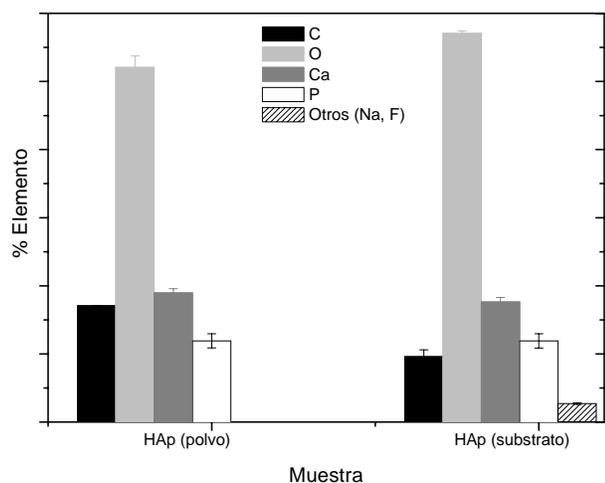


Figura 3. Concentraciones porcentuales de elementos presentes en muestras de HAp en forma de polvo y de pastilla.

monocapas y submonocapas de nitrógeno sobre los substratos del fosfato de calcio.

2. Desarrollo experimental

En la preparación de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ se empleó una solución de acetato de calcio (250ml, 0.2M) incorporada a una solución de fosfato ácido de sodio (250ml, 0.2M), agitando y manteniendo el pH a 4.5, $T=70^\circ\text{C}$ por 50 mins. El sedimento obtenido fue filtrado, lavado extensivamente con agua bidestilada y secado en condiciones normales de presión y temperatura por 24 h. El almacenamiento se realizó en caja petri sellada y en atmósfera de vacío hasta su caracterización o empleo.

En este trabajo se empleó un solo tipo de fosfato de calcio: hidroxiapatita (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), sintetizado según las condiciones mencionadas anteriormente, el cual fue analizado mediante difracción de rayos X (XRD) para verificar estructura y parámetros de red. Después de ello se prepararon substratos de 13mm de diámetro mediante compresión a 7 tons por 5 minutos sin sistema de extracción para vacío (C Carver press) que fueron analizados mediante espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS) en modo composicional. Todas las muestras empleadas en este artículo fueron almacenadas en ambiente de vacío hasta que fueron empleadas.

Los experimentos de adsorción de proteínas se realizaron empleando estaterina (538 kDa) sintetizada y donada por el laboratorio del Dr. Patrick Stayton de University of Washington Engineered Biomaterials (UWEB), Seattle WA, Estados Unidos de America. Se siguió el protocolo desarrollado por Wagner para la formación de todas las submonocapas y monocapas de estaterina sobre substratos de HAp [14]. No se empleó purificación extra cuando las proteínas fueron empleadas. Este protocolo consiste en la exposición de los substratos de HAp a soluciones con diferentes concentraciones de estaterina en condiciones normales de presión y temperatura por un periodo de 2h a $\text{pH}=7.4$, lavado con PBS (solución buferada de fosfato) para desplazar y remover las proteínas no enlazadas al substrato y lavado con agua doblemente desionizada para remover sales residuales de PBS. Todos los experimentos se realizaron empleando solución PBS (OmniPur EMD) a 1x y $\text{pH}=7.4$ [15, 8]. Las muestras fueron secadas en aire y almacenadas en desecador a vacío hasta ser estudiadas mediante XPS (generalmente no posterior a 24h de llevado a cabo el experimento).

El control empleado fueron substratos sin exponer a soluciones de proteína o PBS, HAp (blanco). Las muestras sintetizadas de HAp, antes del experimento de adsorción de proteínas o de análisis de superficies, fueron analizadas mediante difracción de rayos X (diffractómetro Phillips 1820) provisto con un haz $\text{CuK}\alpha$ (1.3856 nm). Los barridos se realizaron de 20° a 60° con una velocidad de 0.2° operando a 40mA y 20kV. Los parámetros de red fueron calculados y comparados con los estándares de las bases JCPDS.

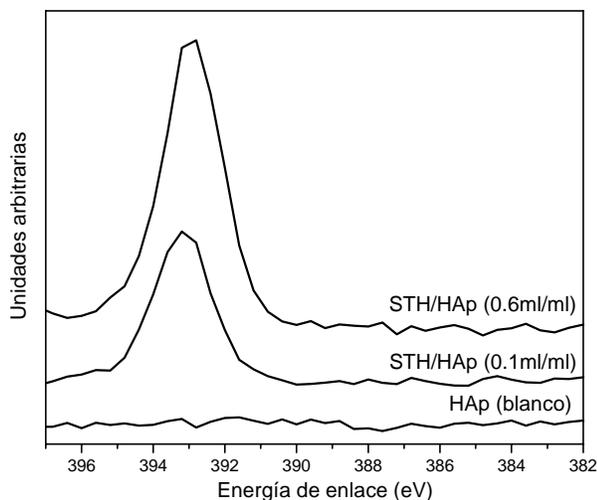


Figura 4. Espectros de detalle de nitrógeno de estaterina sobre HAp donde se muestra la presencia de nitrógeno solo para aquellas superficies expuestas a la proteína.

Se empleó un espectrómetro Surface Science Instruments (S-probe) con una fuente de rayos X monocromática de Al $K\alpha_{1,2}$ (1486.6 eV), detector multicanales, neutralizador y analizador hemisférico (SSI, Mountain CA). Se tomaron espectros en modos composicional y de detalle alrededor de nitrógeno (378-390eV) para obtener la razón Ca/P de los substratos prensados con los polvos de HAp sintetizados, a una energía de paso de 150 eV. También se adquirieron espectros en modo composicional (0-1100 eV), de detalle

alrededor de nitrógeno (378-390eV) y de alta resolución de carbono 1s (277-294 eV) para los experimentos de Adsorción de estaterina, bajo las mismas condiciones de energía de paso.

La energía de enlace del C(1s) fue empleada como referencia de los corrimientos de energía dada la naturaleza aislante de las muestras de HAp.

3. Resultados y Discusión

La figura 1 muestra los patrones de difracción de rayos X de los polvos de HAp sintetizados, así como de una muestra de HAp comercial (Sigma-Aldrich). Como se observa, los patrones de los polvos de HAp sintetizados se encuentran en acuerdo con aquellos reportados en las bases de datos [16]. Las constantes cristalográficas (a,b,c) de la HAp hexagonal obtenida mediante síntesis química presentan una pequeña deformación de red en relación con los valores correspondientes a la HAp hexagonal comercial; (9.36 Å, 9.37 Å, 6.63 Å) y (9.42 Å, 9.42 Å, 6.88 Å) respectivamente. Esta diferencia podría estar asociada con esfuerzos asociados al proceso de producción.

Antes de realizar los experimentos de adsorción de proteínas se realizaron experimentos en modos composicional, alta resolución y de detalle sobre los polvos y substratos de HAp para verificar que no existiese contaminación sobre ellos. La figura 2 muestra espectros

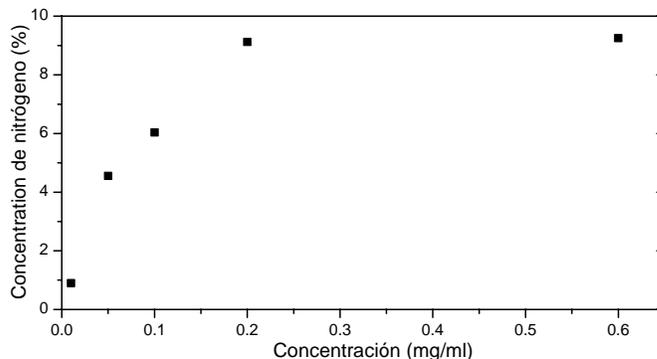


Figura 5. Isotherma de nitrógeno de estaterina sobre superficies de hidroxiapatita obtenidas mediante XPS en modo detalle.

típicos en modo composicional para la HAp en polvo como de un sustrato después de su prensado. Se observa la presencia de los picos característicos de fosfatos de calcio Ca2s, Ca2p, P2s, P2p y O1s, así como aquellos que confirman la presencia de carbono C1s adventicio - proveniente del ambiente- en una concentración de alrededor de 10% en las 4 muestras examinadas. En el caso de los substratos obtenidos mediante prensado se obtienen pequeñas concentraciones de elementos contaminantes como Na, F y Mg (<3%) posiblemente debidos a enlaces iónicos en la muestra, o por su exposición a ellos en el momento del prensado.

Las cuantificaciones de dichos resultados se presentan en la figura 3. De los espectros de alta resolución alrededor de C y P se obtuvo la razón Ca/P, la cual arroja un valor medio de 1.48 ± 0.08 , valor que es congruente con el valor teórico reportado de 1.67.

Una vez verificada la composición de los substratos, se emplearon estas superficies para realizar experimentos de adsorción de estaterina con diferentes concentraciones (0.01, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.6 mg/ml). Siendo las proteínas macromoléculas formadas por aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos cuyos componentes básicamente son carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno – aunque algunas suelen además contener azufre o fósforo, hierro, magnesio o cobre-, es posible emplear XPS para discriminar si es que se obtiene adsorción proteica sobre ciertas superficies y en que concentración elemental [8, 9]. En particular la secuencia de 43 aminoácidos que se empleó es D – pS – pS – E – E – K – F – L – R – R – I – G – R – F – G – Y – G – Y – G – P – Y – Q – P – V – P – E – Q – P – L – Y – P – Q – P – Y – Q – P – Q – Y – Q – Q – Y – T – F. La figura 4 muestra – de abajo hacia arriba- espectros de detalle de nitrógeno de HAp (blanco), estaterina a 0.05 mg/ml sobre HAp (STH/HAp) y a 0.6 mg/ml sobre HAp (STH/HAp). Se encontró que sólo aquellos substratos de HAp que fueron expuestos a estaterina presentaban significativas cantidades de nitrógeno.

Para monitorear la conformación de proteínas se realizó la isoterma de nitrógeno de estaterina sobre HAp. Se esperaba que el aumento en la concentración de la proteína

afectara la conformación de la proteína dado que la cantidad de proteína adsorbida sería mayor. En otras palabras, por la presencia de carga en la proteína se espera que aún en concentraciones menores, ésta busque adsorberse sobre la superficie, pero si esta concentración es mayor entonces la adsorción de nitrógeno y por tanto del espesor de la capa aumentara hasta el momento de la saturación.

La isoterma de nitrógeno obtenida mediante el modo composicional demuestra la formación de submonocapas y monocapas mediante auto-ensamblado de estaterina sobre superficies de hidroxiapatita (Figura 5). Para concentraciones menores a 0.2mg/ml de estaterina se obtuvieron submonocapas de proteína, mientras que en el caso de concentraciones iguales o superiores se obtienen monocapas. El punto de saturación se presenta en concentraciones alrededor de 0.6mg/ml.

4. Conclusiones

En este trabajo se utilizó la espectroscopia de análisis de superficies XPS, en modos composicional, alta resolución y de detalle de nitrógeno, para detectar e identificar estaterina adsorbida sobre superficies de hidroxiapatita. Los resultados muestran que XPS tiene la capacidad de diferenciar entre la formación de monocapas y submonocapas de proteínas sobre superficies de HAp. Sin embargo, estudios más extensos deben ser diseñados para confirmar como la concentración de la proteína influye en la conformación sobre la superficie.

Agradecimientos

La autora agradece a los doctores David G. Castner, Heather E. Canavan, Roger Michel, Lara J. Gamble, Daniel J. Graham, Rikki Goobes y en particular al Dr. David Caster, de la Universidad de Washington por su valiosa cooperación y discusiones en la realización de este trabajo.

Este trabajo fue apoyado por NIH-EU (NIBIB Beca EB-002027 de NESAC/BIO), OEA (Beca 20031750) y CONACyT –SNI (Estímulo 60901).

Referencias

- [1] RZ LeGeros. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **395**, 81 (2002).
- [2] GMS El Shafei y NA Moussa. *J of Colloid and Interface Science* **238**, 160 (2001).
- [3] K Kandori, M Saito, H Saito, A Yasukawa, T Ishikawa. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical And Engr Aspects* **94**, 225 (1995).
- [4] H Zeng, KK Chittur y WR Lacefield. *Biomaterials* **20**, 377 (2000).
- [5] AL Boskey. *Journal of Cellular Biochemistry Supplements* **30/31**, 83 (1998).
- [6] S Weiner y L Addadi. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 252 (1991).
- [7] M Gilbert, WJ Shaw, JR Long, K Nelson, GP Drobny, CM Gianchelli y PS Stayton. *J Biol Chem* **275**, 16213 (2000).
- [8] MS Wagner, TA Horbett y DG Castner. *Langmuir*, **19**, 1708 (2003).
- [9] MS Wagner y DG Castner. *Applied Surface Science*, **203**, 698 (2003).
- [10] DI Hay. *Arch. Oral. Biol*, **18**, 1531 (1973).
- [11] DI Hay. *Handbook of Experimental Aspects of Oral Chemistry*. Editor: E.P. Lazzari, Boca Raton, FL, CRC Press Inc, **1983**, 319.
- [12] DI Hay y EC Moreno. En: *Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology*. Editor: JO Tenovuo, (CRC Press Inc, Boca Raton, FL, 1989) p.131
- [13] DI Hay, EC Moreno y DH Schlesinger. *Inorg. Perspect. Biol. Med.*, **2**, 271 (1979).
- [14] MS Wagner et.al. *Langmuir*, **17**, 4649 (2001).
- [15] TA Horbett. *Techniques for protein adsorption studies*. En: *Techniques of biocompatibility testing*. Editor: Williams DF, (CRC Press Inc, Boca Raton, FL, 1986) p.183.
- [16] JCPS International Centre for Diffraction Data (database software), ver. 1.30; Newtown Square, PA, 1997 y referencias incluidas dentro de esa base.