

Conformación de proteínas sobre materiales soporte para terapias regenerativas

*José Carlos Rodríguez Hernández, Cristina González García,
José Luis Gómez Ribelles, Manuel Monleón Pradas, Manuel Salmerón Sánchez
Centro de Biomateriales, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, E-46022
Valencia, España, www.upv.es/cb*

jorodhel@ter.upv.es

Resumen

La adhesión celular sobre la superficie de sustratos sintéticos está mediada por proteínas presentes en la matriz extracelular (fibronectina, laminina) las cuales se adsorben cuando se encuentran expuestas o bien a los fluidos fisiológicos *in vivo*, o provenientes del medio de cultivo (*in vitro*) [1]. La respuesta biológica está pues condicionada a la concentración de proteínas adsorbidas, así como a la conformación que éstas adquieran y a la fuerza de adhesión entre sustrato-proteína. Es bien conocida la existencia de secuencias peptídicas (RGD) que fomentan la adhesión celular que, dependiendo de la conformación que la proteína adquiera al adsorberse sobre el sustrato, están disponibles o no para la interacción celular. El proceso de adsorción proteína-material es un proceso físico-químico complejo que depende en gran medida de las características superficiales del sustrato (energía superficial, grupos funcionales presentes en la superficie, propiedades electroquímicas, cargas superficiales,...), así como de la naturaleza de la proteína (grupos funcionales susceptibles de interacciones con los del sustrato, cargas,...) y el ambiente en donde tiene lugar la adsorción (electrolitos, concentración,...). En cualquier caso, serán los balances energéticos y entrópicos los que den cuenta de la tendencia del proceso global de adsorción [2-4].

La microscopía de fuerza atómica (AFM) ha sido ampliamente usada como herramienta en el ámbito biológico [5,6], y más concretamente en el análisis de la adsorción de proteínas [7,8]. Existen diversos trabajos en los que distintos tipos de proteínas han sido analizadas por AFM, aunque la mayoría de ellos se basan en superficies extremadamente planas, (cubres de vidrio, mica, etc). Nuestro trabajo está basado en superficies no modelo, con topografías apreciables, en las que, si bien la proteína no se puede detectar en la magnitud altura, la señal de fase que aparece en el modo de funcionamiento “tapping” proporciona la información buscada (Figura 1) [9]. En ocasiones especiales, con áreas barridas muy planas, las proteínas también fueron apreciables en las señales de altura y amplitud, lo que permitió correlacionar lo obtenido en la señal de fase con las otras magnitudes (altura y amplitud).

Los materiales utilizados son de dos tipos. Por un lado, (1) los que pertenecen a la familia de los acrilatos: poliácido de etilo (PEA) y poliácido de hidroxietilo (PHEA), así como sus copolímeros. El PEA es un polímero hidrófobo, mientras que el PHEA es un hidrogel (absorbe agua hasta casi dos veces su propio peso). La estructura química de estos dos homopolímeros se diferencia básicamente en la existencia de un grupo hidroxilo (-OH) en la cadena lateral del PHEA, mientras que en el PEA dicho grupo hidroxilo es sustituido por un hidrógeno (-H). De este modo, copolimerizando ambos monómeros, se puede controlar el porcentaje de grupos -OH en la superficie del material (x_{OH}) (desde $x_{OH}=1$ para el PHEA hasta $x_{OH}=0$ para el PEA). Por otro lado, (2) se empleó el ácido poliláctico, material biodegradable de gran importancia en la llamada medicina regenerativa.

Se emplearon proteínas características de la matriz extracelular (concretamente, fibronectina *Fn* y laminina *Ln*), y, el fibrinógeno (*Fg*), debido a su gran importancia en el proceso de homeostasis, a través de la formación de fibrina y posterior coagulación. Nuestros resultados muestran una amplia variedad de experimentos que incluyen la adsorción desde diferentes concentraciones de proteína durante diferentes tiempos (cinética) [9-11]. Un ejemplo

de ello aparece en la Figura 2, donde se pueden ver imágenes de fase de las distintas conformaciones que las proteínas adquieren sobre el PEA (polímero hidrófobo, $x_{OH}=0$).

Referencias:

- [1] Anselme K. *Biomaterials* 21 (2000) 667
- [2] García, AJ. *Adv Polym Sci*, 203 (2006) 171
- [3] Werner C, Pompe T, Salchert K. *Adv Polym Sci* 203 (2006) 63
- [4] Wahlgren M, Arnebrant T. *Trends Biotechnol* 9 (1991) 201
- [5] Nagao E, Dvorak JA. *Biophys J* 76 (1999) 3289
- [6] Yu M, Ivanisevic A. *Biomaterials* 25 (2004) 3655
- [7] Schönafinger A, Morbitzer A, Kress D, Essen L-O, Noll F, Hampp N. *Langmuir* 22 (2006) 7185
- [8] Pernodet N, Rafailovich M, Sokolov J, Xu D, Yang N-L, McLeod K. *J Biomed Mater Res* 64A (2003) 684
- [9] Rodríguez Hernández JC, Salmerón Sánchez M, Soria JM, Gómez Ribelles JL, Monleón Pradas M. *Biophys J* 93 (2007) 202
- [10] Costa Martínez E, Rodríguez Hernández JC, Machado M, Mano JF, Gómez Ribelles JL, Monleón Pradas M, Salmerón Sánchez M. *Tissue Eng* (aceptado)
- [11] Rico Tortosa P, Rodríguez Hernández JC, Moratal D, Monleón Pradas M, Salmerón Sánchez M. *Biomaterials* (en revisión)

Figuras:

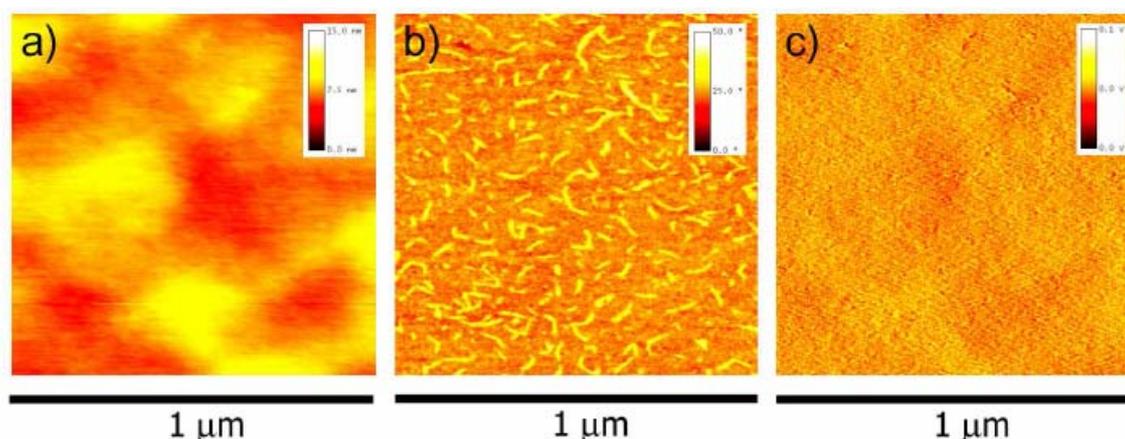


Figura 1. Distintas señales obtenidas del TM-AFM para la laminina adsorbida sobre un copolímero de PEAPHEA ($x_{OH}=0.7$): a) altura; b) fase; c) amplitud.

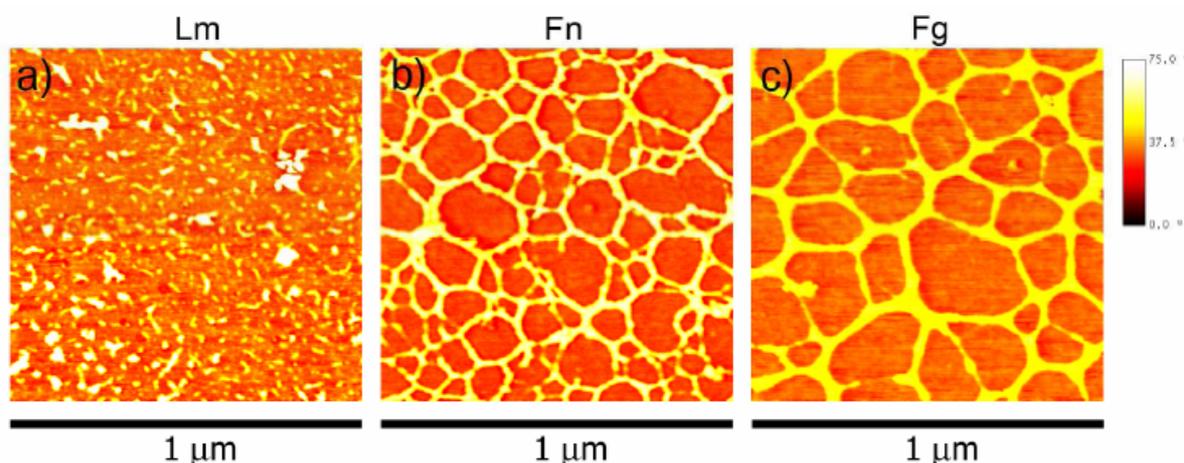


Figura 2. Imágenes de fase de TM-AFM en aire para diferentes proteínas sobre PEA ($x_{OH}=0$) con un tiempo de exposición de 10 minutos y a una misma concentración (20 $\mu\text{g/ml}$): a) laminina (Lm); b) fibronectina (Fn); c) fibrinógeno (Fg). Todas las imágenes comparten escala.