



MX0500426

Energía Nuclear y Seguridad Radiológica: Nuevos Retos y Perspectivas
XIV Congreso Anual de la SNM/XXI Reunión Anual de la SMSR
Guadalajara, Jalisco, México, 10-13 de Septiembre, (2003), Memorias en CDROM

Retención de Albúmina Marcada con I-125 en el Biomineral Hidroxiapatita

Verónica E. Badillo Almaraz

Universidad Autónoma de Zacatecas / Unidad Académica de Estudios Nucleares
C. Ciprés No. 10 Fracc. La Peñuela 98068 Zacatecas, Zac.
E-mail: ebadillo@cantera.reduaz.mx

Alejandro Bugarín Cervantes

Universidad Autónoma de Zacatecas / Unidad Académica de Ciencias Químicas
Km. 0.5 carr. A Cd. Cuauhtemoc, C.P. 98600 Guadalupe, Zac.

Fabiola Monroy Guzmán

Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares
Km 36.5 Carretera México-Toluca. 52045 Edo. de México

Resumen

Las demandas de Materiales para la Salud en todo el mundo, especialmente de los sectores odontológico y traumatológico hacen que cada vez sea más estudiada la hidroxiapatita (HAP) y su biocompatibilidad con los seres vivos. La hidroxiapatita es considerada como uno de los intercambiadores inorgánicos por excelencia, por lo que la fijación de iones y moléculas ha sido extensamente estudiada y actualmente es uno de los materiales de más aceptación como implantes. La superficie del material de implante está en contacto íntimo con el tejido vivo y su biocompatibilidad se determina en gran medida por las propiedades de superficie del biomaterial, las cuales tienen un efecto directo en la respuesta celular del material. Después de administrar el implante, las proteínas se adsorben inmediatamente en la superficie del biomineral. Específicamente, las proteínas de la sangre se consideran como piezas clave al determinar la aceptación de implantes en seres vivos. La adsorción de proteínas depende de las propiedades fisicoquímicas del material así como de la composición del medio ambiente. Las propiedades superficiales de la HAP son relevantes en los mecanismos de adsorción de las proteínas. En este trabajo, se reporta la adsorción de la proteína albúmina marcada con I-125 y en función de dos parámetros fisicoquímicos importantes: el valor del pH de la solución y la naturaleza química de la solución; para ver la influencia de este último, se estudiaron tres electrolitos NaF, NaCl y NaH₂PO₄. La existencia de los sitios activos de superficie de la hidroxiapatita, es pieza clave en la interpretación de la fijación de la proteína albúmina en función también de sus propiedades ácido-base.

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace más de un siglo se realizan esfuerzos por encontrar materiales con las características adecuadas para la restauración o sustitución del tejido óseo en seres

humanos. Esta necesidad ha determinado no solo el interés de encontrar tales materiales, sino la elaboración constante de nuevas tecnologías para perfeccionarlos y dotar a los cirujanos de biomateriales “ideales” que cumplan con las exigencias más modernas en este campo.

El desarrollo de nuevos materiales para aplicaciones biomédicas ha llevado a estudiar los compuestos formados de hidroxiapatita y diversas matrices. Las mezclas de hidroxiapatita se perfilan como compuestos de gran interés clínico por su biocompatibilidad, resistencia y en el caso del medio bucal, su estética.

Este interés proviene de saber que los tejidos duros del ser humano, huesos y dientes, están constituidos por un compuesto a base de fosfato básico cálcico, de estructura y composición muy similar al mineral denominado Hidroxiapatita en la literatura biológica, y una matriz orgánica de diversos colágenos. Este fosfato es la base inorgánica biológica cálcica más estable (más insoluble); sin embargo en la naturaleza no se encuentra en estado puro químico.

Se recurre entonces a la preparación de la Hidroxiapatita en forma sintética, la cual está indicada como material de implante para regenerar o reconstruir el tejido óseo dañado o perdido mediante el relleno de cavidades o defectos, así como para sustituir fragmentos limitados y remodelar superficies óseas en especialidades como: cirugía cráneo-maxilofacial, cirugía endobucal y odontología, ortopedia y traumatología, neurocirugía, cirugía estética y otras [1]. El conocimiento exacto de la composición estequiométrica de la hidroxiapatita permite la producción de la misma con una gran pureza a escala industrial siempre buscando la mayor similitud con las propiedades equivalentes de la dentina y hueso.

Las aplicaciones médicas más conocidas de la hidroxiapatita sintética son las ortopédicas que incluyen el relleno de huesos así como la fabricación de huesos y uniones [2].

Las proteínas de la sangre se consideran como piezas clave al determinar la aceptación de implantes en seres vivos. Después de administrar el implante, las proteínas se adsorben inmediatamente en la superficie del biomineral. La adsorción de proteínas depende de las propiedades fisicoquímicas del material así como de la composición del medio ambiente.

Las propiedades superficiales de la HAP son relevantes en los mecanismos de adsorción de las proteínas. En este trabajo, se reporta la adsorción de la proteína albúmina marcada con I-125 y en función de dos parámetros fisicoquímicos importantes: el valor del pH de la solución y la naturaleza química de la solución; para ver la influencia de este último, se estudiaron tres electrolitos NaF, NaCl y NaH₂PO₄.

2. FIJACION DE MOLECULAS EN LA HIDROXIAPATITA

Para dejar en claro el papel y las consecuencias de la adsorción de proteínas en la superficie del mineral hidroxiapatita, una gran cantidad de trabajos se han dedicado a estudiar la interacción de la proteína con este material de interés ortopédico.

Estudios de la adsorción simultánea de proteínas del plasma en sistemas más complejos se han realizado últimamente en condiciones fisicoquímicas muy variadas y en diferentes materiales [3, 4, 5]. De este análisis, la hidroxiapatita resulta ser el

biomaterial que ofrece una capacidad ligeramente mayor de retención de diversas proteínas, entre ellas, la albúmina, comparado con otros biomateriales como zirconia y alúmina.

Diversas técnicas han sido utilizadas para cuantificar la fijación de la proteína albúmina en distintos biomateriales, tenemos la espectroscopia infrarrojo de transformadas de Fourier [5], electroforesis en gel para la identificación de proteínas en una mezcla, espectroscopia de absorción ultravioleta. Sin embargo, la literatura no reporta la adsorción de proteínas con métodos radioquímicos, es decir, la utilización de moléculas marcadas (proteínas) para evaluar los fenómenos fisicoquímicos en la superficie del biomaterial hidroxiapatita. El carácter innovador de este trabajo de investigación radica en el marcado de la proteína albúmina con un radionúclido (yodo-125) para luego aprovechar la emisión de radiactividad en la evaluación de la adsorción de esta macromolécula en función del pH de la solución. El objetivo último de estudiar el comportamiento de adsorción de la proteína albúmina es utilizar esta información para incrementar la biocompatibilidad del biomaterial y promover la regeneración del tejido.

3. ESTRUCTURA CRISTALINA DE LA HIDROXIAPATITA

Apatita es un termino general para designar a la familia de los minerales cristalinos que poseen una composición química $M_{10}(ZO_4)_6X_2$. Distintos elementos ocupan los sitios M, Z y X, por ejemplo, los más comunes:

M = Ca, Sr, Mg, Mn, Cd, Pb, Ni

Z = P, V, As, S, Si, Ge, CO_3

X = F, Cl, OH, Br, CO_3

Los minerales naturales de apatita se encuentran en las rocas ígneas, especialmente las pegmatitas y también las rocas sedimentarias y metamórficas. Una gran variedad de compuestos de apatita puede ser preparada haciendo múltiples combinaciones entre los elementos de los sitios M, Z y X.

Las apatitas constituyen un grupo de sólidos isomorfos cristalizando en el sistema hexagonal y cuyo prototipo es la fluorapatita fosfocálcica [6]. La estructura de la hidroxiapatita fosfocálcica ha sido descrita por Kay, Young y Posner [7]. Esta estructura se describe como un empilamiento de grupos fosfato y de iones calcio. Presenta un motivo $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ por malla elemental.

El conjunto de tetraedros fosfato y de cationes calcio constituye una red en forma de nido de abejas donde se forman canales centrados en los ejes helicoidales. En estos canales cristalográficos se localizan los iones hidróxido al centro de triángulos formados por los cationes calcio en la posición (2). En una malla de apatita de estequiometría ideal, existen diez cationes calcio (Ca^{2+}), seis iones fosfato (PO_4^{3-}) y dos iones hidróxido (OH^-).

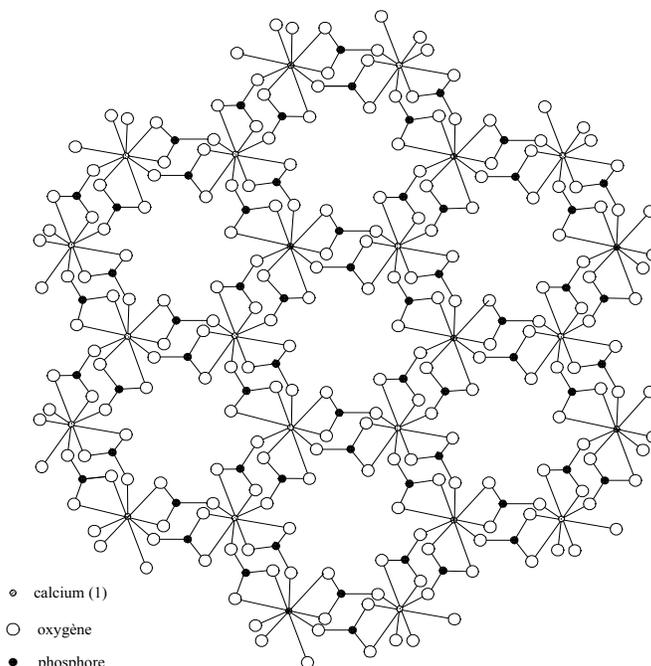


Figura 1.-Proyección sobre el plano de base de la red hexagonal de las apatitas [8]

4. LA PROTEINA ALBUMINA

Las proteínas son biopolímeros (macromoléculas orgánicas), de elevado peso molecular, constituidas básicamente por carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N); aunque pueden contener también azufre (S) y fósforo (P) y, en menor proporción, hierro (Fe), cobre (Cu), magnesio (Mg), yodo (I), etc.

Estos elementos químicos se agrupan para formar unidades estructurales (monómeros) llamados AMINOACIDOS, a los cuales podríamos considerar como los "ladrillos de los edificios moleculares proteicos". Estos edificios macromoleculares se construyen y desmoronan con gran facilidad dentro de las células, y a ello debe precisamente la materia viva su capacidad de crecimiento, reparación y regulación [9].

Las proteínas son, en resumen, biopolímeros de aminoácidos y su presencia en los seres vivos es indispensable para el desarrollo de los múltiples procesos vitales.

4.1 Aminoácidos.

Son las unidades básicas que forman las proteínas. Su denominación responde a la composición química general que presentan, en la que un grupo amino (-NH₂) y otro carboxilo o ácido (-COOH) se unen a un carbono α (-C-). Las otras dos valencias de ese carbono quedan saturadas con un átomo de hidrógeno (-H) y con un grupo químico variable al que se denomina radical (-R).

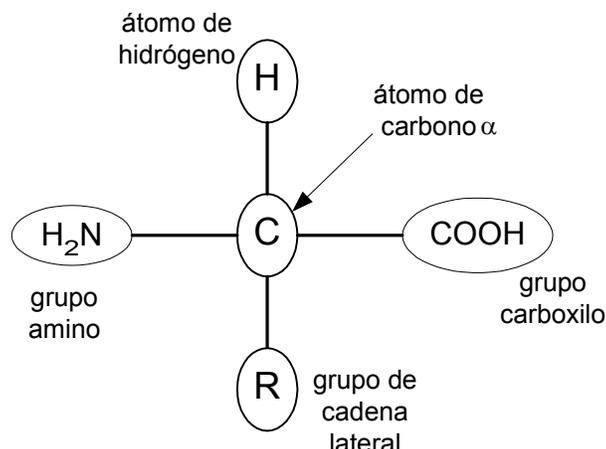


Figura 2. Representación de la fórmula general de un aminoácido

Tridimensionalmente el carbono α presenta una configuración tetraédrica en la que el carbono se dispone en el centro y los cuatro elementos que se unen a él ocupan los vértices. Cuando en el vértice superior se dispone el $-\text{COOH}$ y se mira por la cara opuesta al grupo R, según la disposición del grupo amino ($-\text{NH}_2$) a la izquierda o a la derecha del carbono α se habla de " α -L-aminoácidos o de " α -D-aminoácidos respectivamente. En las proteínas sólo se encuentran L-aminoácidos de configuración.

5. ESTUDIO DE LA FIJACION DE LA PROTEINA EN LA ALBUMINA

El protocolo experimental para el estudio de la retención de la proteína albúmina en el biomineral hidroxiapatita, se divide en tres etapas: la primera destinada a la preparación de suspensiones y ajuste del valor de pH de la solución; la segunda es el marcado de la proteína albúmina con el radiotrazador y la última consiste en el análisis radioquímico y químico del sobrenadante en el tubo de centrifugación.

Una masa de 0.25 g de hidroxiapatita se coloca en un tubo de policarbonato de 50 mL y se dispersa por agitación en un volumen de 25 mL de solución salina a concentración y pH dados.

El ajuste de pH se ha efectuado al agregar micro-volúmenes variables de NaOH en cada tubo. Las cantidades de base que se agregan se han determinado a partir de una curva de titulación de la hidroxiapatita en una solución salina. Antes de ponerlas en agitación, se pesaron las suspensiones para conocer precisamente los volúmenes finales de la fase líquida.

El tiempo de agitación que se sugiere en la literatura [10] es el que se adoptó para lograr el equilibrio termodinámico, es decir, la agitación se prolongó durante 14 días.

El marcado de la proteína albúmina se realizó según las técnicas reportadas en la literatura [11]. El método de marcado utilizado para introducir yodo-125 a una molécula es por oxidación del yoduro de sodio ($\text{NaI-}^{125}\text{I}$) en una especie más reactiva como el yodo libre (I^-) o radicales de yodo cargados positivamente (I^+). En el presente trabajo,

se utilizó el método de marcado por oxidación con Cloramina-T. La proteína utilizada en este estudio es Human Serum Albúmina (Sigma Co.) en una solución salina de NaH_2PO_4 en una concentración de 10mg/ml.

Una vez transcurrido el tiempo necesario al equilibrio termodinámico, se introdujo una alícuota de 100 μL de la solución que contiene la albúmina marcada con ^{125}I . La misma operación se realizó en dos tubos los cuales contenían únicamente 25 mL de solución con el fin de conocer la actividad total de la albúmina marcada. Después de adicionar la albúmina marcada a las suspensiones, estas se volvieron a poner en agitación durante 24 horas.

Una vez transcurrido ese tiempo, se centrifugan las suspensiones 8000 rpm para lograr la separación de fases, se toman alícuotas de 3 mL del sobrenadante con una pipeta Eppendorf, calibrada con anterioridad y se procede al análisis de la actividad contenida en ellas.

La actividad de las alícuotas ha sido evaluada con un detector de NaI en el equipo Auto-In-V-tron 4010, calibrado para el radionúclido ^{125}I .

En este trabajo, los coeficientes de distribución de la proteína albúmina marcada con I-125, se obtienen a partir de la siguiente expresión:

$$K_d = \left(\frac{A^\circ}{A} - 1 \right) \frac{V}{m}$$

en donde:

A° = Actividad total inicial de albúmina- ^{125}I introducida en el sistema (cpm)

A = Actividad total restante de albúmina- ^{125}I en la fase acuosa (cpm)

V = Volumen de la fase acuosa (ml)

m = Masa de hidroxapatita utilizada (g)

6. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Los coeficientes de obtención de la albúmina marcada con I-125 se presentan en las Figuras 3, 4 y 5.

La Figura 3 presenta los resultados obtenidos en NaH_2PO_4 0.02M y una relación sólido/solución igual a 10 g/l. De la figura se desprende una fuerte retención de la albúmina en medios ácidos y una disminución de esta retención en función del pH hasta ser casi despreciable en medios básicos.

La Figura 4 presenta los resultados obtenidos en NaCl 0.02M y una relación sólido/solución igual a 10 g/l. La retención de la albúmina presenta un comportamiento similar que en una solución de fosfatos, es decir, una retención de albúmina importante en medios ácidos y una disminución de esta retención en medios básicos, sin llegar a ser despreciable hasta el valor de pH de 11.5.

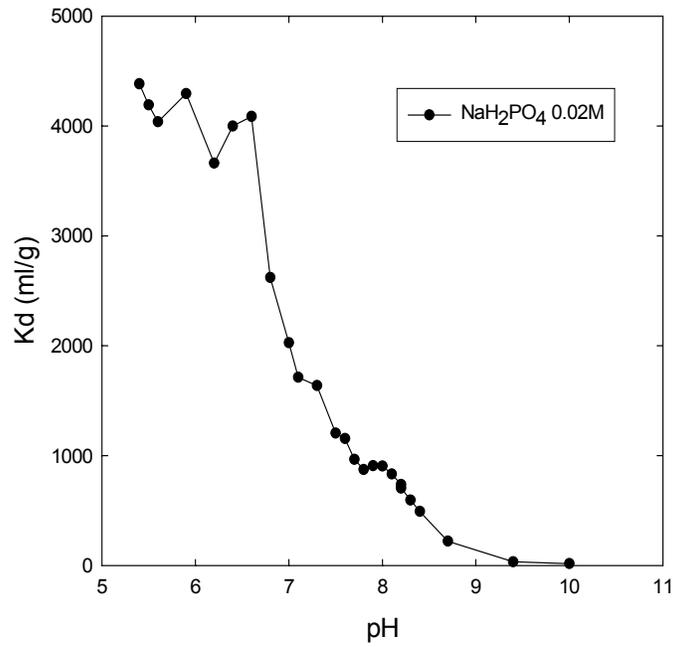


Figura 3. Fijación de la albúmina marcada-I125 en una hidroxiapatita sintética BIO-RAD en función del pH. Solución NaH_2PO_4 0.02M.

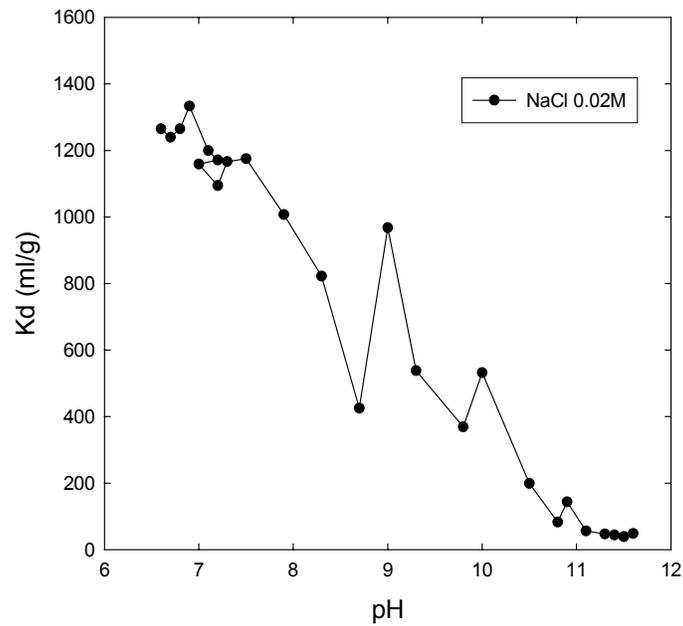


Figura 4. Fijación de la albúmina marcada-I125 en una hidroxiapatita sintética BIO-RAD en función del pH. Solución NaCl 0.02M

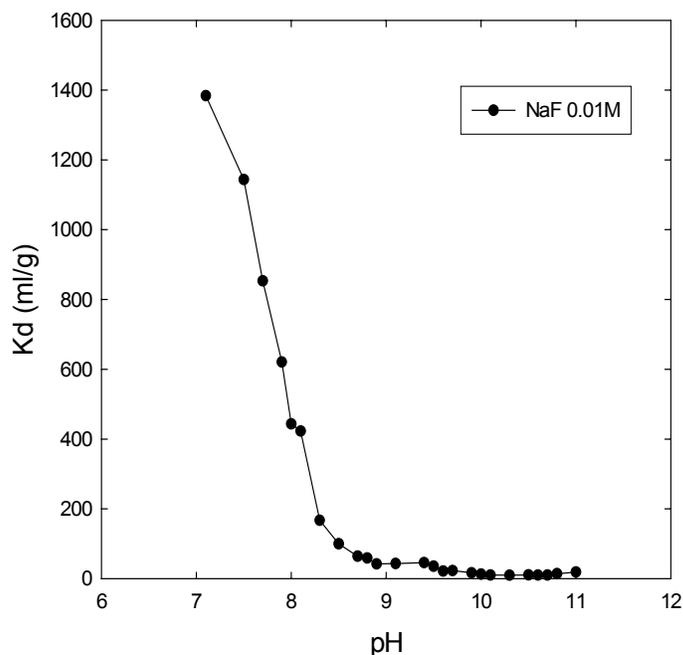


Figura 5. Fijación de la albúmina marcada-I125 en una hidroxiapatita sintética BIO-RAD en función del pH. Solución NaF 0.02M.

La Figura 5 presenta los resultados obtenidos en NaF 0.02M y una relación sólido/solución igual a 10 g/l. De la figura se desprende una fuerte retención de la albúmina en medios ácidos y una disminución de esta retención en función del pH hasta ser casi despreciable en medios básicos.

7. INTERPRETACION DE RESULTADOS

La posibilidad de relacionar la fijación de la proteína albúmina en la hidroxiapatita en función de la existencia de sitios activos en la superficie de la hidroxiapatita es casi inexistente en la literatura, mientras que en el caso de otros sólidos ésta hipótesis es bastante aceptada e implementada, para el caso de adsorción de iones.

La reactividad superficial ha sido confundida con la sustitución de iones en los sitios cristalográficos o bien con la existencia de los mal llamados “poros” en la estructura cristalina de la hidroxiapatita.

En el estado actual de informaciones experimentales adquiridas, resulta bastante complicado interpretar y concluir a partir de los resultados experimentales adquiridos. Sin embargo, podemos por un lado, referirnos a la literatura, en la que dos tipos de sitios activos han sido reportados para la hidroxiapatita por Cases et al [18] quienes admiten la existencia de los siguientes tipos de sitios de superficie:

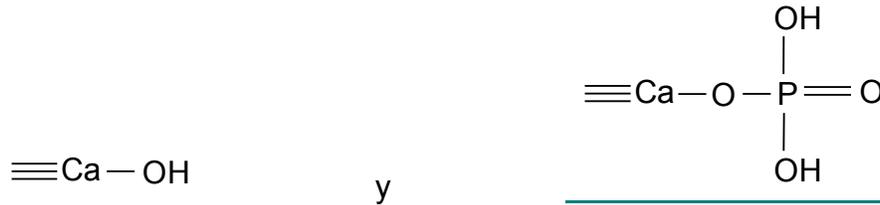


Figura 6. Esquematización de los dos tipos de sitios activos de superficie de un fosfato de calcio (hidroxiapatita). Sitios hidroxilo y sitios fosfato respectivamente.

Los cuales podrán ionizarse según el pH de la solución según los mecanismos siguientes:

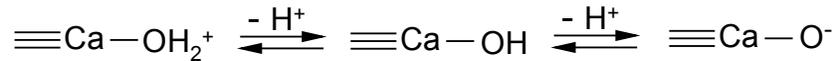


Figura 7. Protonación y liberación de iones hidrógeno en el sitio activo **hidroxilo**

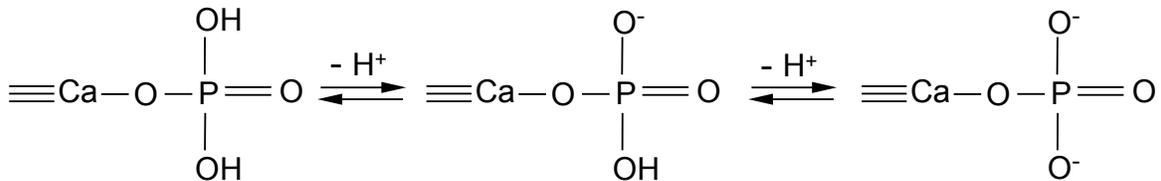


Figura 8. Protonación y liberación de iones hidrógeno en el sitio activo **fosfato**

Según estos autores, Cases et al [12], los sitios hidroxilo presentan un comportamiento anfótero y los sitios fosfato están completamente ionizados a partir del valor de pH>5.

Además, podemos analizar el comportamiento anfótero en disolución acuosa de los aminoácidos los cuales también son capaces de ionizarse, dependiendo del pH, según el diagrama siguiente:

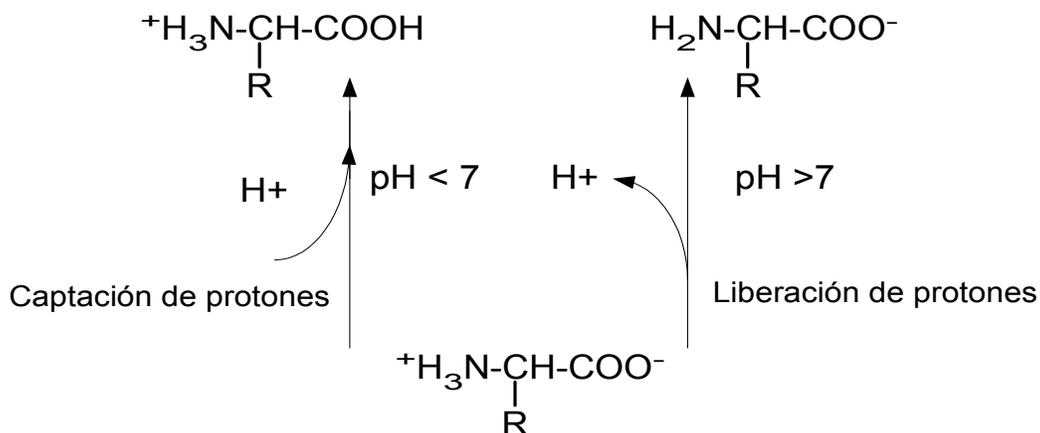


Figura 9. Protonación y liberación de iones hidrógeno en los grupos funcionales de un aminoácido.

Si observamos los valores del pH de la solución en los cuales la adsorción de la proteína albúmina comienza a ser importante, vemos que es por debajo del valor de pH=7. De acuerdo a Cases et al [12], por debajo de este valor de pH, el sitio calcio estaría protonado y la compensación de cargas positivas no podría efectuarse con las cargas positivas del grupo amino de la proteína, resultaría mas bien en una repulsión de cargas entre los dos grupos funcionales. En lo que respecta al grupo funcional carboxilo, según la Figura 9, este se encuentra sin ionizarse a valores inferiores de pH 7, por lo que no podría tampoco compensar las cargas positivas del sitio hidroxilo.

En base a estas consideraciones, tendremos que dirigirnos hacia el sitio activo fosfato y tratar de entender la fijación de albúmina en este segundo grupo funcional de superficie de la hidroxiapatita. Vemos esta vez la Figura 8 referente a la protonación de este grupo funcional según el pH de la solución y observamos que a valores de pH inferiores de 7, este grupo se encuentra sin ionizarse o escasamente ionizado, y si vemos la Figura 9, vemos que a estos mismos valores de pH inferiores al valor de 7, el grupo funcional carboxilo no está ionizado; por lo que pudiéramos deducir un desplazamiento del grupo fosfato por el grupo carboxilo y la consecuente formación de un complejo estable entre el Ca de superficie que soporta originalmente al grupo funcional fosfato y al grupo funcional carboxilo de la proteína albúmina.

Debido a la alta densidad de grupos carboxilos en la superficie de las proteínas, tal como los encontrados en las proteínas ácidas (la albúmina es una proteína ácida según el punto isoeléctrico), la formación de un complejo estable entre el calcio de la hidroxiapatita y el grupo carboxilo de la proteína es altamente probable.

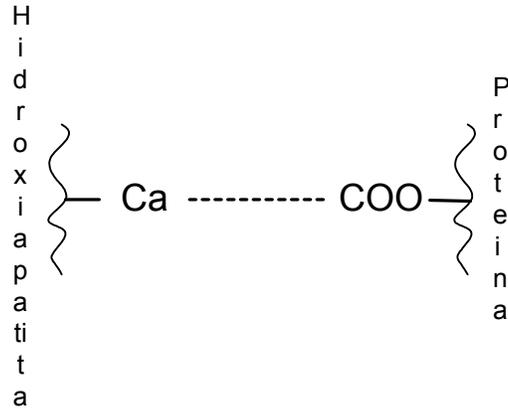


Figura 10. Esquematización de la formación del complejo HAP-Ca-albúmina para explicar la fijación de esta proteína en función del pH de la solución.

REFERENCIAS

1. A Bugarín Cervantes. “Aplicaciones médicas del mineral hidroxiapatita”. Cuarto seminario de Autoformación. FCQ-UAZ. Junio (2002) 32 páginas.
2. H. Aoki. Science and Medical Applications of Hydroxyapatite. JAAS. 84 páginas. (1991)
3. K. Kandori, S. Sawai, Y. Yamamoto, H. Saito, T. Ishikawa – Adsorption of albumin on calcium hydroxylapatite. *Colloids and Surfaces*, **68**, p.283-289 (1992)
4. Å. Rosengren, E. Pavlovic, S. Oscarsson, A. Krajewski, A. Ravaglioli, A. Piancastelli – Plasma protein adsorption pattern on characterized ceramic biomaterials. *Biomaterials* **23**, p.1237-1247 (2002).
5. H. Zeng, K.K. Chittur, W.R. Lacefield – Analysis of bovine serum albumin adsorption on calcium phosphate and titanium surfaces, *Biomaterials*, **20**, p.377-384 (1999).
6. D. McConnell - A Structural Investigation of the Isomorphism of the apatite group. *Journal of the Mineralogical Society of America*, **23**, No. 1, p.1-19 (1938).
7. M.I. Kay, R.A. Young, A.S Posner - Crystal Structure of Hydroxyapatite. *Nature*. **204**, p.1050-1052 (1964).
8. C.A. Beevers, D.B McIntyre - The atomic structure of fluor-apatite and its relation to that of tooth and bone material. *Mineral Magazine* (1945).
9. J. Laguna, E. Piña-Garza – *BIOQUIMICA*. Cuarta Edición. JGH Editores México. (1995).
10. V.E. Badillo Almaraz, Tesis de la Universidad de Paris-XI, 1999.
11. Curso Nacional de Capacitación sobre Metodología de Radioisótopos orientado al Radioinmunoanálisis. Proyecto ARCAL VIII. ININ-OIEA. 190 páginas Junio (1990).
12. J.-M. Cases, P. Jacquier, S.M. Smani, J.E. Poirier, J.Y. Bottero – Propriétés Electrochimiques superficielles des apatites sédimentaires et flottabilité. *Revue de l'Industrie Minérale*. Enero-Febrero, p.1-12 (1989).