

# **Estudio de las propiedades biofísicoquímicas superficiales para la optimización de materiales capaces de inhibir la adhesión bacteriana**

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

Farm. María Laura Martín



INFIQC-Departamento de Físicoquímica

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Año 2019



El presente trabajo fue realizado en el INFIQC-Departamento de Fisicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección de la Dra. Carla E. Giacomelli y se presenta a consideración de dicha Facultad para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, marzo de 2019.

Dra. Carla E. Giacomelli  
Directora de Tesis

**Comisión Evaluadora:**

Dr. Carlos Primo De Pauli  
Miembro de Comisión de Tesis

Dr. Santiago D. Palma  
Miembro de Comisión de Tesis

Dra. Sandra E. Martín  
Miembro de Comisión de Tesis

Dra. Patricia L. Schilardi  
Evaluadora Externa



## Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Químicas y al Departamento de Fisicoquímica por recibirme y brindarme el espacio para realizar el doctorado. A CONICET por otorgarme la beca. A SECyT-UNC, FONCyT, CONICET por el apoyo económico que hizo posible el desarrollo de este trabajo.

Agradezco especialmente a los miembros de la Comisión de Tesis: al Dr. Palma, a la Dra. Martín y al Doc De Pauli por los aportes realizados a lo largo de estos años, y por tomarse el tiempo y trabajo dedicado a la evaluación de este trabajo.

A Lau, gracias infinitas, primero por presentarme al hermoso grupo de trabajo del sótano cuando no sabía en donde comenzar a investigar (y si lo quería/me animaba, etcétera). Gracias por estar siempre a mi lado en estos años a nivel laboral y personal, por la doble dependencia que nos une. Por la infinita paciencia que me tuviste y porque me introduciste en el mundo científico, me enseñaste a pensar de forma crítica, a ser rigurosa, solo por decir algunas cosas.

A Carla, por recibirme en su grupo, por creer en mí quizás más que yo misma, por todas sus enseñanzas, no me dejo de sorprender con todo lo que se aprende con ella, por siempre ver el lado positivo y animarme a seguir intentando de una u otra forma.

A todos los que son y fueron parte del grupo de trabajo, gracias por recibirme tan bien, acompañarme y aguantarme.

A la Vale y a la Ceci porque me hicieron sentir acompañada, por las charlas y los mates, me dieron mil consejos personales, y en lo laboral me tuvieron una inmensa paciencia para explicarme de estadística, o de ciencias biológicas en general, respectivamente. A la Fer, que me aguantó en muchas, desde los comienzos a introducirme en el lab, particularmente en los vuelos, gracias por tus canciones y todos los momentos compartidos, siempre contagiando alegría y tranquilidad. A la Maru, que compartimos mates y congresos, tu experiencia en distintos ámbitos me sirvió muchísimo en mis inquietudes. A la Pato, por

su bondad, todas las charlas y el buen humor que te caracteriza. Al Doc de Pauli, por su alegría y estar siempre pendientes de como estamos todos. A Ricardo, que está siempre y nos tiene una paciencia infinita, siempre solo entre charlas de mujeres. A la Dari y a la Jessy, transitamos juntas el camino del doctorado, con las mismas dudas y pocas certezas, por su disposición a ayudar, por las meriendas.

A todos mis compañeros del Departamento de Fisicoquímica, que me ayudaron cuando necesité un reactivo, un ratito en un equipo o alguna cosa simple del día a día. A la Susi, que nos malcría y sin su alegría y calidez el sótano no sería el mismo.

A Carlos, por su paciencia y motivación a la hora de pasar mil horas viendo puntos rojos y verdes en una pantalla. A Sergio, por su apoyo y su claridad para explicar las ecuaciones del modelo. A Rubén, Dani y Flor, por su paciencia para explicarme varias veces lo mismo de citometría y tantas horas dedicadas. Al Dr. Montich, por las medidas en el calorímetro y en el ATR, por su buena predisposición.

A Constanza, por ayudarme a resolver mil situaciones, alejar los fantasmas y a construir lo que soy hoy.

A la Shanu y a la Gise, por estar desde que compartíamos aulas en la carrera, ese tremendo último año al que no sé como hubiera sobrevivido sin uds. Por las palabras de aliento y el tiempo compartido.

A toda mi familia en general por aguantar y entender muchas ausencias desde mi carrera de grado. A mis padres, por los valores y el amor recibidos, por la cultura del esfuerzo y la superación.

A Leo, que es el compañero más comprensivo que me pudo tocar. Por tanto amor y confianza. Por aguantarme en tantas, por entenderme y acompañarme de la mejor manera desde tantos años. Es difícil poner en palabras todo lo que me da. Por el camino transitado y el tremendo regalo que me hizo, que nos viene a inundar de amor.

A León, perdón por pasarte tanto estrés hijo, por no poder haberte disfrutado tanto como hubiera querido desde el primer momento. No naciste y ya sos mi motor, todo es por vos.

A Dios, por hacer que me haya encontrado con toda esta gente maravillosa y darme esa fuerza extra para afrontar lo que sea.





## Resumen

Se define como biomaterial a un material no viable utilizado para constituir dispositivos médicos, destinados a interactuar con sistemas biológicos. En la actualidad, las infecciones constituyen la complicación más severa y frecuente asociada al uso de dispositivos médicos, representando el mayor desafío que deben enfrentar para lograr una acción terapéutica exitosa. En particular, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es uno de los patógenos formadores de biofilm más importantes, y por esta razón, se lo considera el patógeno más prevalente en este tipo de infecciones. Debido a que la adhesión bacteriana es el primer paso en la patogénesis de las infecciones asociadas al uso de dispositivos médicos, resulta evidente que inhibiendo este proceso se reducirá la probabilidad que se desarrolle la colonización bacteriana y, de este modo, se puede prevenir el establecimiento de estas patologías.

Este trabajo de Tesis Doctoral, tiene como objetivo general contribuir a la profilaxis de infecciones asociadas al uso de dispositivos biomédicos mediante una estrategia de biofuncionalización superficial con proteínas plasmáticas. En particular, se plantea una estrategia de biofuncionalización con albúmina (ALB) y fibrinógeno (FBG) capaz de inhibir la adhesión de *S. aureus* sobre superficies modelo de biomateriales, desde su estadio inicial hasta la formación del biofilm. Para abordar este objetivo, el trabajo desarrollado se estructura en tres partes, tal como se describe a continuación.

La Parte 1 aborda el proceso de adsorción-desorción de ALB y FBG en condiciones cinéticas controladas, para optimizar las condiciones de biofuncionalización capaces de minimizar la adhesión bacteriana. El estudio del proceso de adsorción-desorción de ALB se efectúa mediante un diseño factorial de experimentos, mientras que el de FBG se realiza con el ajuste de

los resultados con un modelo teórico del proceso de adsorción-desorción. La relajación superficial de las proteínas adsorbidas, que surgen como consecuencia de la optimización de la interacción proteína-superficie, inhibe la adhesión de bacterias vivas. De esta forma, el estado relajado de las moléculas adsorbidas de ALB o FBG, asociado a cambios estructurales en las proteínas logra inhibir la adhesión de *S. aureus* en su etapa inicial y en la formación del biofilm.

Los resultados de la Parte 1 permiten desarrollar una estrategia de biofuncionalización superficial en la Parte 2, en la cual la estructura de las proteínas juega un rol fundamental. Para mimetizar el cambio estructural inducido por la superficie en condiciones cinéticas controladas, la estrategia incluye un tratamiento térmico de las soluciones de ALB o FBG, de forma previa a la biofuncionalización superficial. Este tratamiento provoca la desnaturalización parcial de las proteínas nativas. Así, la estrategia de biofuncionalización desarrollada es sencilla y consiste en la inmersión de las superficies en las soluciones de proteína de estructura parcialmente desnaturalizada. La biofuncionalización con ALB o FBG logra inhibir la adhesión inicial y la formación del biofilm de *S. aureus*. Además, la biofuncionalización con ALB mantiene su capacidad para inhibir la formación del biofilm incluso en medios de relevancia fisiológica, suplementados con suero.

El empleo de proteínas parcialmente desnaturalizadas en la biofuncionalización superficial de biomateriales podría inducir la activación del sistema inmune. En la Parte 3 se descarta la capacidad de activar la respuesta inmune innata por parte de las superficies biofuncionalizadas con proteínas parcialmente desnaturalizadas, mediante el estudio de la activación de macrófagos.

En conclusión, esta Tesis Doctoral plantea una estrategia novedosa y simple desde la Fisicoquímica, que permite sentar las bases para el diseño y desarrollo de biomateriales que se encuentran en contacto con fluidos biológicos para prevenir el establecimiento de infecciones bacterianas.



# Índice

## Introducción general

1. Contexto y relevancia de las infecciones asociadas a biomateriales. ....	1
2. Patogenia de las infecciones asociadas al uso de dispositivos médicos.....	3
3. Estrategias abordadas para evitar el desarrollo de infecciones asociadas al uso de dispositivos médicos.....	5
4. Biomateriales empleados en dispositivos médicos .....	8
5. Film condicionante en el desarrollo de infecciones asociadas al uso de dispositivos médicos .....	9
6. Proceso de adsorción de proteínas sobre superficies sólidas.....	11
7. Objetivos y organización del trabajo de Tesis Doctoral.....	14
Referencias .....	18

## Parte 1: Adsorción de proteínas y adhesión bacteriana

Introducción.....	25
Referencias .....	29

### CAPÍTULO 1: Parte experimental

1.1 Introducción.....	35
1.2 Materiales.....	35
1.2.1 Reactivos.....	35
1.2.2 Superficies.....	36
1.2.3 Cepa bacteriana, medios de cultivo y tinción.....	37
1.3 Métodos.....	39
1.3.1 Modificación química de las superficies.....	39
1.3.2 Ángulo de contacto.....	40
1.3.3 Preparación de soluciones de proteínas.....	41
1.3.4 Espectroscopia UV-Visible.....	42
1.3.5 Reflectometría .....	42
1.3.5.1 Modelo del proceso de adsorción-desorción de proteínas.....	50
1.3.5.2 Estudio del proceso de adsorción-desorción de ALB utilizando un diseño factorial de experimentos .....	56
1.3.6 Preparación de la suspensión bacteriana. ....	59
1.3.7 Control de viabilidad en PBS .....	60
1.3.8 Evaluación de la capacidad de formar biofilm.....	62
1.3.9 Diseño experimental para la adsorción de proteínas y la adhesión bacteriana .....	65

1.3.10 Microscopía Confocal de Fluorescencia .....	67
1.3.11 Microscopía Electrónica de Barrido .....	69
Referencias .....	71
<b>CAPÍTULO 2: Adsorción de albúmina y adhesión bacteriana</b>	
2.1 Introducción .....	81
2.2 Resultados y Discusión .....	81
2.2.1 Diseño factorial de experimentos en el proceso de adsorción-desorción de albúmina .....	81
2.2.1.1 Velocidad inicial de adsorción .....	84
2.2.1.2 Cantidad adsorbida.....	91
2.2.1.3 Porcentaje de desorción.....	95
2.2.2 Adhesión bacteriana .....	102
2.2.2.1 Adhesión bacteriana inicial sobre superficies sin proteína adsorbida.....	103
2.2.2.2 Adhesión bacteriana inicial.....	107
2.2.2.3 Formación del biofilm .....	116
2.3 Conclusiones.....	119
Referencias .....	121
<b>CAPÍTULO 3: Adsorción de fibrinógeno y adhesión bacteriana</b>	
3.1 Introducción .....	127
3.2 Resultados y Discusión.....	127
3.2.1 Estudio del proceso de adsorción de fibrinógeno .....	127
3.2.2 Adhesión bacteriana .....	140
3.2.2.1 Adhesión bacteriana inicial .....	141
3.2.2.2 Formación del biofilm.....	144
3.3 Conclusiones.....	148
Referencias .....	150
<b>Parte 2: Biofuncionalización con proteínas y adhesión bacteriana</b>	
<b>Introducción</b> .....	155
Referencias .....	157
<b>CAPÍTULO 4: Parte experimental</b>	
4.1 Introducción.....	161
4.2 Materiales.....	161
4.2.1 Reactivos.....	161
4.2.2 Superficies.....	162
4.2.3 Cepa bacteriana, medios de cultivo y tinción .....	162
4.3 Métodos .....	163

4.3.1 Preparación de soluciones de proteínas.....	163
4.3.2 Calorimetría Diferencial de Barrido.....	164
4.3.3 Dicroísmo Circular .....	164
4.3.4 Preparación de la suspensión bacteriana.....	168
4.3.5 Diseño experimental para la biofuncionalización superficial y la adhesión bacteriana .....	169
4.3.6 Microscopía Confocal de Fluorescencia.....	171
4.3.7 Microscopía Electrónica de Barrido .....	172
Referencias .....	173

## **CAPÍTULO 5: Biofuncionalización con albúmina o fibrinógeno y adhesión bacteriana**

5.1 Introducción.....	177
5.2 Resultados y Discusión.....	177
5.2.1 Biofuncionalización con albúmina o fibrinógeno .....	177
5.2.1.1 Desnaturalización térmica.....	177
5.2.1.2 Estructura secundaria.....	180
5.2.1.3 Biofuncionalización superficial.....	184
5.2.2 Adhesión bacteriana .....	184
5.2.2.1 Adhesión bacteriana inicial .....	186
5.2.2.2 Formación del biofilm .....	187
5.3 Conclusiones.....	198
Referencias .....	199

## **Parte 3: Biofuncionalización con proteínas y activación de macrófagos**

<b>Introducción.....</b>	<b>203</b>
Referencias .....	206

## **CAPÍTULO 6: Parte experimental**

6.1 Introducción.....	211
6.2 Materiales .....	211
6.2.1 Reactivos .....	211
6.2.2 Superficies .....	212
6.2.3 Líneas celulares y medios de cultivo.....	212
6.3 Métodos .....	214
6.3.1 Preparación de soluciones de proteínas.....	214
6.3.2 Preparación de la suspensión celular.....	215
6.3.3 Diseño experimental para la biofuncionalización superficial y la activación de macrófagos .....	216
6.3.4 Análisis de la expresión de marcadores celulares mediante Citometría de Flujo .....	219

6.3.5 Cuantificación de iones nitrito en sobrenadantes de cultivo mediante la reacción de Griess.....	222
6.3.6 Determinación de citocinas en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA sándwich .....	223
Referencias .....	226

**CAPÍTULO 7: Biofuncionalización con albúmina o fibrinógeno y activación de macrófagos**

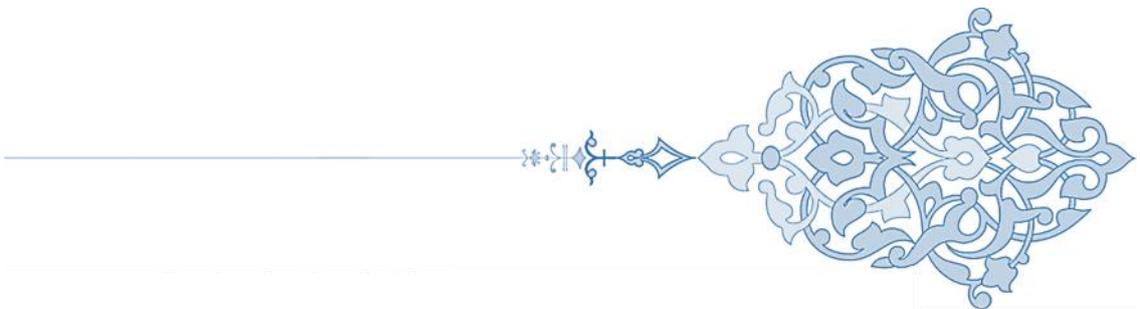
7.1 Introducción .....	231
7.2 Resultados y Discusión.....	231
7.2.1 Diseño experimental para la biofuncionalización superficial y la activación de macrófagos .....	231
7.2.2 Análisis de la expresión de marcadores celulares mediante Citometría de Flujo .....	233
7.2.2.1 Macrófagos murinos Raw .....	234
7.2.2.2 Macrófagos peritoneales de ratón .....	240
7.2.3 Cuantificación de iones nitrito en sobrenadantes de cultivo mediante la reacción de Griess.....	246
7.2.4 Determinación de citocinas en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA sándwich .....	247
7.3 Conclusiones.....	250
Referencias .....	251

**Conclusiones generales y Proyecciones**

Conclusiones generales .....	255
Proyecciones .....	258
Referencias .....	260

<b>Lista de símbolos y abreviaturas.....</b>	<b>261</b>
--	------------

# Introducción general





## **1. Contexto y relevancia de las infecciones asociadas a biomateriales**

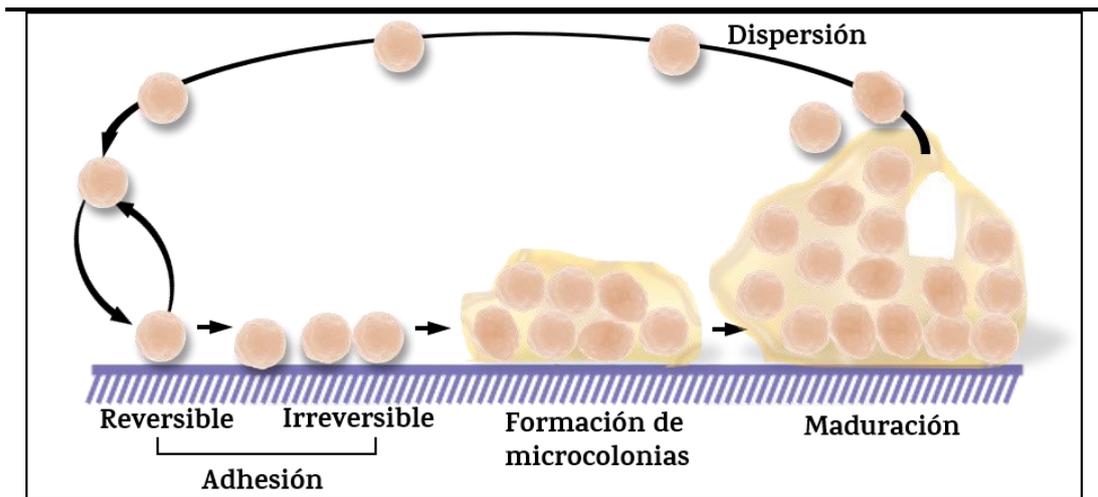
Un biomaterial se puede definir como un material no viable utilizado para constituir dispositivos médicos, destinados a interactuar con sistemas biológicos [1]. Los dispositivos médicos se pueden clasificar según el grado de invasividad y/o tiempo de contacto con los sistemas biológicos, de tal forma que abarcan una enorme gama de aplicaciones [2,3]. Sin embargo, los implantes constituyen los principales representantes dentro de los dispositivos médicos, ya que constituyen una herramienta terapéutica importante en el manejo clínico exitoso de una amplia gama de afecciones ortopédicas, permitiendo restaurar la estructura y función del sistema musculoesquelético [4]. Algunos de los implantes más utilizados en la reparación del tejido óseo incluyen cementos óseos para el llenado de defectos del hueso, prótesis articulares para artroplastia total de cadera o rodilla y dispositivos de fijación de fracturas para la restauración de fracturas [4]. El gran número de personas que actualmente poseen implantes implica que, incluso si ocurre una falla terapéutica en una pequeña proporción de pacientes, el impacto general sanitario y económico en toda la población es enorme [3,4]. Este impacto, es particularmente significativo cuando las fallas terapéuticas están provocadas por infecciones microbianas en las superficies de los biomateriales constitutivos de los implantes [3]. De hecho, en la actualidad, las infecciones constituyen la complicación más severa y frecuente asociada al uso de implantes, representando el mayor desafío que deben enfrentar los dispositivos médicos para lograr una acción terapéutica exitosa [3,4].

Las infecciones nosocomiales que se definen como aquellas infecciones adquiridas por los pacientes durante su estadía en un hospital u otras instalaciones de atención médica, y que en general están asociadas a los dispositivos médicos, constituyen un problema mundial [5-7]. Las infecciones asociadas a dispositivos médicos difieren notablemente en epidemiología, etiología y gravedad, dependiendo, principalmente, del sitio anatómico, del tiempo de aplicación y de la profundidad del tejido que lo alberga [3]. Dentro de las complicaciones que puede provocar el uso de dispositivos médicos se encuentran: la necesidad de prolongar la hospitalización, de implementar procedimientos quirúrgicos adicionales y de extracción del implante. Además, generan un aumento de la resistencia a los antimicrobianos, infecciones crónicas del tejido tratado (en el caso del hueso, por ejemplo, osteomielitis crónica y pérdida de hueso circundante) y aumento de la tasa de mortalidad [8-14]. En consecuencia, las infecciones relacionadas al uso de implantes en el tratamiento de distintos traumas revisten importancia clínica, social y económica [3]. Asimismo, estas infecciones poseen una alta prevalencia, asociada al aumento en el uso de dispositivos médicos en las últimas décadas [8]. La tasa de prevalencia depende del tipo de implante o procedimiento quirúrgico. En este sentido, la prevalencia de estas infecciones varía desde menos del 1% en procedimientos de artroplastía, menos del 10% en implantes mamarios y en marcapasos cardíacos, del 5 al 10% en dispositivos de fijación de fracturas y en implantes dentales y del 20 al 50% en cirugía de trauma luego de fractura expuesta, dependiendo de la severidad de la fractura [4,7,8,15].

## **2. Patogenia de las infecciones asociadas al uso de dispositivos médicos**

Las infecciones asociadas al uso de dispositivos médicos se desarrollan por la adhesión bacteriana persistente sobre la superficie de los implantes, seguida por la colonización y formación de un biofilm maduro [11,12,16–20]. Las bacterias existen en dos formas o estados: bacterias en estado planctónico, se encuentran libremente suspendidas en una solución, o bacterias sésiles, como una unidad adherida a una superficie o dentro de los confines de un biofilm [19,21]. Así, un biofilm se define como una comunidad sésil microbiana caracterizada por células que están irreversiblemente unidas a un sustrato o a una interfaz y entre sí; están incrustadas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares autoproducidas, y exhiben un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y la transcripción de genes [19,21–25].

El proceso de la formación del biofilm involucra diferentes estadios, los cuales se presentan en la Figura 1, que se inician con la adhesión de bacterias planctónicas a cualquier tipo de superficie [21,24–26]. Inicialmente la unión es reversible, mediada por interacciones inespecíficas, que se torna en una unión irreversible, debido a las interacciones específicas [21,24–27]. Las células bacterianas crecen, se multiplican e interaccionan entre ellas para formar microcolonias [21,24,25]. Una vez formadas estas microcolonias, el biofilm experimenta una etapa de maduración, en la cual se construye una arquitectura más compleja para permitir el transporte de nutrientes hacia el interior del biofilm [21,24,27]. En la etapa final, algunas células bacterianas se pueden dispersar del biofilm y volver al estado planctónico para ocupar nuevos nichos [24–26].



**Figura 1.** Estadios involucrados en la formación del biofilm bacteriano

Las infecciones asociadas al uso de dispositivos médicos son causadas por diferentes especies bacterianas, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia Coli* y *Pseudomonas aeruginosa* [25,26,28,29]. En particular, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es un microorganismo de gran importancia clínica, ya que es uno de los patógenos formadores de biofilm más importantes, que causa complicaciones que van desde infecciones menores hasta infecciones que amenazan la vida como sepsis, endocarditis y neumonía [24,30]. Por esta razón, se lo considera el patógeno más prevalente en las infecciones intrahospitalarias, asociado a infecciones por el uso de dispositivos biomédicos de diferente naturaleza, tales como catéteres, marcapasos, prótesis, válvulas cardíacas, entre otros [20,24–26,29–31]. El tratamiento con antimicrobianos, a menudo es ineficaz debido al desarrollo de cepas resistentes, como el *S. aureus* resistente a la meticilina que, en un comienzo se circunscribió al ambiente hospitalario, pero en los últimos años se ha extendido a toda la comunidad [30,32].

### **3. Estrategias abordadas para evitar el desarrollo de infecciones asociadas al uso de dispositivos médicos**

Las principales dificultades que enfrenta el tratamiento de estas infecciones están relacionadas al biofilm desarrollado sobre la superficie de los implantes, resultando en un modo de defensa ante la acción de los antimicrobianos [8,25,26,28]. Además, los mecanismos locales de defensa del huésped se encuentran comprometidos y la existencia de inflamación en el tejido local que conduce a una vasculatura deficiente e isquemia, también causan dificultades en el tratamiento [8]. En estas circunstancias, si no hay respuesta frente al tratamiento farmacológico, la sustitución del implante representa la única posibilidad real de erradicar la infección, aunque el riesgo de una recaída sigue siendo alto [20]. En este sentido, resulta evidente la necesidad de prevenir el desarrollo de estas patologías mediante diferentes enfoques, como el mejoramiento de técnicas asépticas, el control de la esterilidad del ambiente y la profilaxis antibiótica perioperatoria [9-12,18].

Por otra parte, se han desarrollado una gran variedad de estrategias de funcionalización superficial, empleando compuestos sintéticos y/o biomoléculas, para obtener biomateriales resistentes a las infecciones [4,20,33]. Estas estrategias de funcionalización se pueden clasificar según las facultades que le confieren al biomaterial: 1) inhibir la adhesión bacteriana, 2) ejercer acción antibacteriana, o 3) combatir la formación del biofilm. La primera estrategia incluye el uso de compuestos para constituir recubrimientos superficiales o estructuración de superficies con el propósito de repeler bacterias, otorgándole al biomaterial la capacidad de inhibir la adhesión bacteriana. Entre ellos, se encuentran los polímeros hidrofílicos, como polietilenglicol (PEG) y poli(óxido de etileno) (PEO), que actúan por efecto estérico debido al volumen de exclusión superficial [34-36]. Por otra parte, se

proponen recubrimientos con heparina, que ejerce su acción mediante un aumento de la hidrofiliidad superficial [16]. En este sentido, otro ejemplo lo constituyen los copolímeros que contienen grupos fosfonato y/o ácido fosfónico, ya que inhiben la adhesión bacteriana convirtiendo a las superficies en super-hidrofílicas [37]. Una propuesta novedosa incluye la microestructuración de superficies utilizando un diseño biomimético, que se basa en las características microtopográficas de las hojas de loto y de la piel de tiburón (rugosidad de la superficie, hidrofobicidad y carga) para conformar sustratos sólidos con propiedades antiadhesivas [33].

Para implementar la segunda estrategia de funcionalización de superficies, se emplean una gran variedad de compuestos para dotar de propiedades antibacterianas al biomaterial [38,39]. Cabe destacar que un biomaterial antibacteriano se define como aquel que inhibe el crecimiento u ocasiona la muerte de células bacterianas [3]. Dentro de los recubrimientos con compuestos con conocidas propiedades antibacterianas, se pueden mencionar a las nanopartículas metálicas [40,41] de plata [42], cobre y sus complejos [43] y el óxido de zinc [44]. Además, se utilizan compuestos antimicrobianos, como vancomicina [45,46] o gentamicina [47]. Por otro lado, se funcionaliza la superficie con quitosán [29,48,49], ya que es un polisacárido que provoca la muerte bacteriana por mecanismos no dilucidados aún; aunque se postula, que interacciona con la membrana celular bacteriana ocasionando la pérdida del contenido intracelular [20]. Otro ejemplo, lo constituyen los péptidos antimicrobianos que actúan por disrupción de la integridad de las membranas bacterianas o alteración de la expresión de genes que codifican proteínas bacterianas que regulan el metabolismo o la adhesión celular [4,50–52]. Asimismo, se han propuesto estrategias de recubrimiento antibacteriano basadas en un diseño biomimético. En estos casos, se cristalizan sobre la

superficie sólida los dos principales componentes lipídicos nanoestructurados de las alas de la cigarra y la libélula, que matan a las bacterias por acción mecánica sobre su pared celular [53].

Por último, la tercera estrategia para prevenir el desarrollo de infecciones asociadas al uso de dispositivos médicos involucra el recubrimiento superficial con compuestos que permitan combatir la formación del biofilm. Recientemente, se reportó que el recubrimiento con proteínas fúngicas (hidrofobinas) reduce la formación del biofilm de diferentes cepas de *Staphylococcus epidermidis* [54,55]. Si bien, no se conoce con certeza su mecanismo de acción, se postula que intervendría en el ADN extracromosómico de las bacterias, involucrado en la adhesión y/o en la proliferación celular [55]. Otros compuestos estudiados para su uso en recubrimientos que previenen el desarrollo del biofilm incluyen enzimas, que degradan polisacáridos o ADN extracelular, permitiendo disminuir la biomasa del biofilm y aumentar su permeabilidad frente a la acción bactericida de agentes antibacterianos [4]. Por otra parte, se puede nombrar a los recubrimientos con óxido de titanio, cuya actividad bactericida potenciada por tratamiento fotocatalítico permite combatir la formación del biofilm mediante la producción de especies reactivas de oxígeno [56–58]. Por último, se estudiaron recubrimientos con polimeros hidrofóbicos como polietilenoimina (PEI), que previenen la formación del biofilm a través de la interacción con la pared celular bacteriana, provocando pérdida del contenido proteico intracelular [59,60].

#### **4. Biomateriales empleados en dispositivos médicos**

Como resultado de los importantes avances científicos y tecnológicos que se han producido en los últimos 50 años existe en la actualidad una gran diversidad y sofisticación en los materiales utilizados en aplicaciones médicas [1]. La mayoría de los biomateriales son compuestos sintéticos que se pueden clasificar en dos clases principales: polímeros y metales [1,8,61]. Entre los polímeros se encuentran el polietileno tereftalato (PET), ácido poliglicólico (PGA), polimetilmetacrilato (PMMA) y ácido poliláctico (PLA), entre otros [1,62]. Dentro de los metales se puede nombrar, por ejemplo, al acero inoxidable, al titanio, y al oro. La superficie de los metales se encuentra recubierta por óxido, que se forma espontáneamente y es responsable de brindarles a este tipo de materiales resistencia a la corrosión producida por fluidos biológicos y por los microorganismos presentes en dichos fluidos (biocorrosión) [1,63,64]. En efecto, se utilizan como biomateriales distintos tipos de óxidos, entre los más utilizados se encuentran el óxido de titanio y el óxido de zinc, cuyas propiedades superficiales son semejantes a las del óxido de silicio [1,62,65]. En particular, las propiedades superficiales están determinadas principalmente por la presencia de grupos hidroxilo en la superficie de los óxidos (silanol, titanol, etc) [66]. Es decir, los biomateriales constituidos por óxidos comparten la reactividad y la funcionalidad superficial, otorgada por los grupos hidroxilo superficiales [61,67–69].

En este trabajo de Tesis Doctoral se emplearán superficies planas y reflejantes de óxido de silicio (sílica) como sistemas modelo de biomateriales. La ventaja de emplear estas superficies radica en que permiten modificar de manera sencilla y reproducible en la escala de laboratorio las propiedades superficiales, imitando las propiedades de distintos biomateriales basados en

óxidos. De esta manera, su comportamiento puede ser extendido fácilmente hacia otros biomateriales. Por esta razón, en la bibliografía se encuentra una gran cantidad de publicaciones que emplean sílica, ya sea en la industria alimenticia [70–72], o como un biomaterial prometedor para la reparación y regeneración del tejido óseo [73–77].

## **5. Film condicionante en el desarrollo de infecciones asociadas al uso de dispositivos médicos**

En general, los dispositivos médicos se encuentran en contacto con soluciones ricas en proteínas, cuya composición varía dependiendo de su sitio anatómico de aplicación [16]. De hecho, durante la exposición inicial a los fluidos fisiológicos, se forma rápidamente un film proteico sobre la superficie del biomaterial que puede considerarse la verdadera interfaz con las bacterias [16,78]. Este film se denomina condicionante, ya que condiciona la adhesión de bacterias, primera etapa en la patogenia de las infecciones relacionadas al uso de biomateriales [26,27,79]. La presencia de proteínas plasmáticas adsorbidas sobre el biomaterial implantado altera sus propiedades superficiales, desarrollando nuevas interacciones que determinan la adhesión bacteriana y la formación del biofilm [27,80]. En general se supone que la adsorción de proteínas aumenta la adhesión bacteriana [16,81,82]. De hecho, algunas cepas bacterianas poseen proteínas que pueden establecer interacciones específicas con receptores de determinadas proteínas plasmáticas, tales como colágeno, fibrinógeno, fibronectina, laminina, elastina, entre otras [7,16,20,83]. Esta funcionalidad de las bacterias les ayuda a contribuir a la patogenia de la infección, alterando las funciones originales de las proteínas plasmáticas [7,84]. Sin embargo, en el proceso de adhesión bacteriana intervienen diversos factores propios de las propiedades del biomaterial, de las proteínas y de las

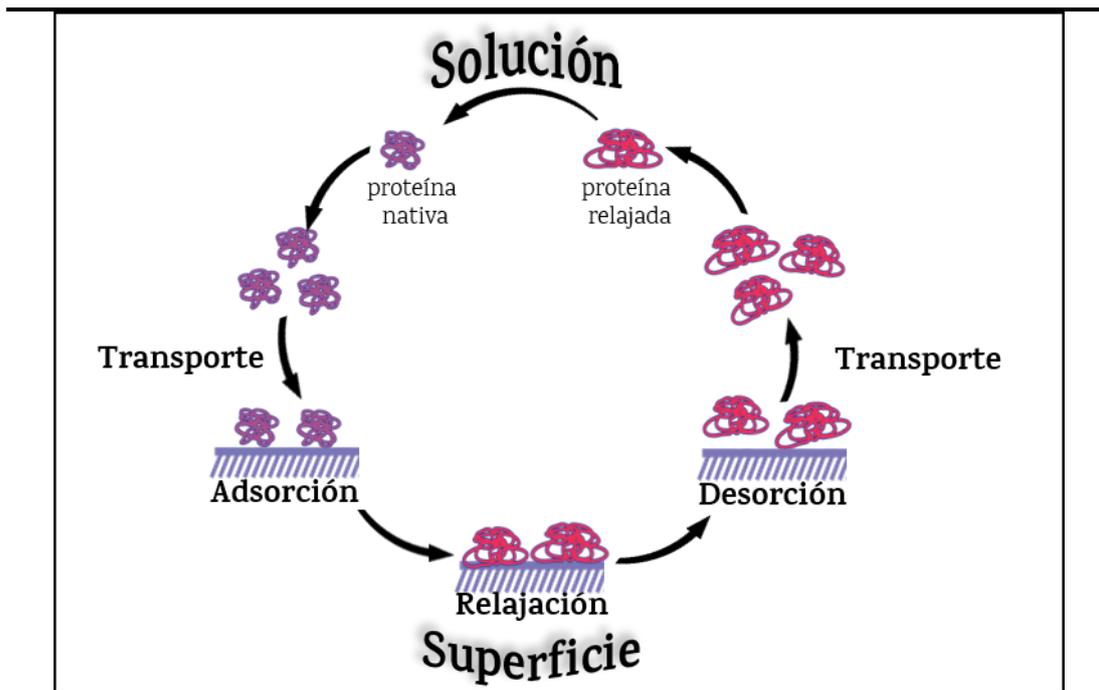
células bacterianas. Por lo tanto, una generalización acerca de la tendencia de este proceso está lejos de ser alcanzada. En este sentido, hay evidencia que la adhesión bacteriana se puede modular variando las propiedades fisicoquímicas superficiales como hidrofobicidad y carga [21,26,27,80,85]. De hecho, las características propias del biomaterial, como topografía y las propiedades fisicoquímicas, afectan la cantidad y conformación de las proteínas adsorbidas [16,27]. Algunos trabajos postulan una relación entre la composición, cantidad y conformación de las proteínas adsorbidas con la adhesión bacteriana [81,86-88].

Es evidente que, independientemente del biomaterial y del lugar del implante, las infecciones asociadas a biomateriales se evitan inhibiendo la adhesión bacteriana inicial para prevenir la formación del biofilm. Si bien en algunos casos se logra minimizar este efecto utilizando estrategias de funcionalización de biomateriales con diversos compuestos, es necesario establecer una estrategia general que permita evitar la formación del biofilm. Indiscutiblemente, las proteínas representan un nexo entre las superficies de los biomateriales y la adhesión bacteriana. Sobre estas bases, se puede plantear una estrategia de biofuncionalización con proteínas plasmáticas aprovechando, además, que presentan toxicidad nula, son biocompatibles y biodegradables [42]. En consecuencia, para diseñar biomateriales capaces de inhibir la adhesión bacteriana es necesario conocer en profundidad el proceso de adsorción de proteínas plasmáticas sobre superficies sólidas que da lugar a la formación del film condicionante.

## **6. Proceso de adsorción de proteínas sobre superficies sólidas**

La adsorción de polímeros sobre superficies se produce de forma ubicua. Entre los biopolímeros, las proteínas son las más activas en superficie. Las proteínas en regiones interfaciales atraen la atención de varias disciplinas, que van desde la Ciencia de los Suelos y los Alimentos, hasta las Ciencias Médicas [78]. Estrictamente hablando, la adsorción sobre una superficie es la acumulación de moléculas en la región interfacial [89]. Si esta acumulación resulta de interacciones físicas (electrostáticas, hidrofóbicas, de dispersión, etc.) se denomina adsorción física. En cambio, si se forma un enlace específico (covalente, de coordinación, etc.) entre las moléculas y la superficie, se designa adsorción química [90]. En este trabajo de Tesis Doctoral, se empleará la palabra adsorción para referirse a la adsorción física.

El proceso de adsorción de proteínas ocurre prácticamente en todos los casos en que una solución de proteínas se pone en contacto con una fase sólida, y comprende una serie de etapas que se esquematizan en la Figura 2. En primer lugar, las proteínas deben ser transportadas desde la solución a la región sub-superficial, donde interaccionan con la superficie. Esta interacción puede resultar en la adsorción de las biomoléculas. Una vez que se encuentran adsorbidas sobre la superficie, pueden relajarse para optimizar la interacción proteína-superficie aumentando el número de punto de contacto entre ambas partes. Esta relajación, normalmente involucra rearrreglos estructurales o cambios conformacionales en las biomoléculas. El grado de relajación de las proteínas sobre la superficie depende fundamentalmente de las propiedades de la superficie (hidrofobicidad, carga, etc.) y de la proteína (estabilidad estructural, carga, etc.). Dependiendo del grado de relajación, las proteínas se pueden desorber de la superficie, por ejemplo, por intercambio con las



**Figura 2.** Etapas involucradas en el proceso de adsorción de proteínas

moléculas de la solución. Así mismo, cuando las proteínas vuelven a la solución, las moléculas pueden reestructurarse y volver al estado nativo o permanecer en el estado relajado [91]. La escala de tiempo para estos procesos difiere considerablemente. En general, las proteínas se adsorben muy rápido y cambian su estructura dentro de los primeros segundos del proceso. Sin embargo, algunos cambios conformacionales y la desorción pueden llevar horas y hasta días [90].

Como consecuencia de la complejidad de la estructura de las proteínas, estas pueden interactuar entre ellas y con la superficie adsorbente a través de una gran variedad de mecanismos. Sin embargo, es posible establecer una clasificación para las interacciones determinantes del proceso de adsorción de proteínas en superficies sólidas [78,89,92]:

❧ Interacciones superficie-proteína: estas interacciones pueden tener diferentes orígenes, tales como atracción electrostática o repulsión entre la proteína y la superficie y/o interacciones de van der Waals. La contribución

más importante a las interacciones electrostáticas de largo alcance son las interacciones coulombicas debido a la carga neta superficial y de la proteína. Alguna inhomogeneidad en la distribución de carga en la proteína, llamada “distribución de carga tipo mosaico”, da lugar a un momento dipolar que también puede contribuir a la interacción electrostática.

❧ Deshidratación superficial (de las proteínas y/o de la superficie): los grandes radios (2 a 4 nm) de las moléculas de proteína comparados con los de las moléculas de agua (0,14 nm) generan, durante la adsorción, un desplazamiento de grandes cantidades de agua. Esta deshidratación es acompañada por una importante ganancia entrópica, ya que muchas moléculas de agua dejan de estar “unidas” a la superficie o a la proteína. Por lo tanto, esta interacción es de gran relevancia y puede favorecer o desfavorecer el proceso de adsorción. La deshidratación de las superficies hidrofóbicas facilita la adsorción de proteínas, mientras que la deshidratación de las hidrofílicas, se opone. Sin embargo, el carácter hidrofóbico de la proteína también determina la medida en que esta deshidratación afecta al proceso de adsorción.

❧ Cambios estructurales en las moléculas adsorbidas: la estructura tridimensional de las proteínas es un delicado balance entre las interacciones hidrofóbicas en el interior de la molécula y la repulsión electrostática de los grupos cargados superficiales. Cuando una molécula de proteína se pone en contacto con una superficie hidrofóbica, este balance puede cambiar debido a que el interior hidrofóbico de la proteína puede evitar la hidratación de una manera alternativa, interactuando con la superficie. En consecuencia, la proteína pierde, total o parcialmente, su estructura nativa lo que da lugar a una mayor área ocupada de la superficie y una menor repulsión entre los grupos superficiales cargados de la proteína adsorbida. La magnitud de la

pérdida en la estructura depende de las características de la superficie, una superficie hidrofóbica favorece el desdoblamiento mientras que, una hidrofílica lo inhibe. Por otra parte, cabe destacar que las superficies siempre son menos polares que la solución acuosa, incluyendo las superficies hidrofílicas (óxidos, por ejemplo). Sin embargo, los sitios superficiales pueden formar puente hidrógeno con las proteínas, ocasionando pérdida en su estructura al romper el balance responsable de mantener la estructura secundaria (balance entre puentes hidrógeno intra e intermoleculares, proteína-agua o proteína-superficie).

❧ Interacciones proteína-proteína: se deben principalmente a la acumulación de proteínas en la superficie y dependen, por lo tanto, del grado de cubrimiento superficial. La repulsión electrostática entre moléculas con igual carga y la pérdida entrópica del sistema se oponen a la formación de una monocapa completa. Las interacciones dipolo-dipolo entre moléculas adsorbidas pueden ser atractivas o repulsivas dependiendo de la alineación de las moléculas.

## **7. Objetivos y organización del trabajo de Tesis Doctoral**

El presente trabajo de Tesis Doctoral tiene como objetivo general contribuir a la profilaxis de infecciones asociadas al uso de dispositivos biomédicos mediante una estrategia de biofuncionalización superficial con proteínas plasmáticas. En este contexto, se pretende comprender el proceso de adsorción-desorción de las proteínas más abundantes en el plasma para sentar las bases que permitan desarrollar estrategias de funcionalización superficial que minimicen la adhesión bacteriana y la formación del biofilm. Específicamente, se estudiará el proceso de adsorción-desorción de albúmina

(ALB) y fibrinógeno (FBG) sobre superficies de sílica para optimizar una estrategia de biofuncionalización capaz de inhibir la adhesión de *Staphylococcus aureus*. Para cumplir con este objetivo, el trabajo desarrollado se estructura en tres partes, cada una de ellas descripta por objetivos específicos particulares, tal como se indica a continuación.

En la **primera parte**, se pretenderá determinar en qué condiciones de adsorción de ALB y FBG sobre superficies de sílica es posible inhibir la adhesión de *S. aureus*. Para concretar esta parte, se plantearon las siguientes preguntas disparadoras:

- ⊗ ¿Cómo es el proceso de adsorción-desorción de ALB y FBG?
- ⊗ ¿La interacción proteína-superficie perturba la estructura nativa de ALB y de FBG?
- ⊗ ¿Cómo se relaciona la presencia de cada una de las proteínas sobre la superficie con la adhesión bacteriana de *S. aureus*?
- ⊗ ¿Es posible inhibir la formación del biofilm en superficies con ALB y FBG previamente adsorbidas?

Estas preguntas definen los **objetivos particulares** para esta primera parte:

- ⊗ Estudiar el efecto de los distintos factores involucrados en el proceso de adsorción de ALB y FBG sobre superficies de sílica.
- ⊗ Correlacionar el estado superficial de ALB y FBG con la adhesión de *S. aureus*.
- ⊗ Optimizar las condiciones de adsorción de ALB y FBG para inhibir la adhesión de *S. aureus* y la formación del biofilm.

A partir de los resultados de esta primera parte, se sientan las bases para proponer estrategias de biofuncionalización superficial con ALB y FBG que permitan inhibir la adhesión bacteriana y la formación del biofilm en la **segunda parte** de esta Tesis. Esta parte, se estructura en torno a las siguientes preguntas disparadoras:

- § ¿Cómo se puede imitar la perturbación estructural de ALB y FBG ejercida por la superficie para implementar una estrategia de biofuncionalización sencilla?
- § ¿Es posible inhibir la formación del biofilm de *S. aureus* mediante la biofuncionalización superficial con ALB y FBG?
- § ¿Cómo responden las superficies biofuncionalizadas frente a la formación del biofilm en medios de relevancia fisiológica?

Nuevamente, estas preguntas definen los **objetivos particulares** para la segunda parte de la Tesis Doctoral:

- § Simular la perturbación estructural de ALB y FBG ejercida por la superficie para emplear estas biomoléculas en el proceso de biofuncionalización superficial.
- § Optimizar una estrategia de biofuncionalización superficial para inhibir la formación del biofilm de *S. aureus*.
- § Estudiar el efecto de la biofuncionalización superficial en la formación del biofilm de *S. aureus* en medios de relevancia fisiológica.

Finalmente, se evaluará si la biofuncionalización superficial con ALB y FBG induce una respuesta inmune en la **tercera parte** de esta Tesis. Esta última parte surge de las siguientes preguntas disparadoras:

- ⊗ ¿La presencia de ALB y FBG de estructura perturbada en las superficies biofuncionalizadas induce una respuesta inmune?
- ⊗ ¿Los componentes de medios de relevancia fisiológica enmascaran el efecto de la biofuncionalización superficial frente a la respuesta inmune?

Estas preguntas determinan los últimos **objetivos particulares** de esta Tesis Doctoral:

- ⊗ Evaluar la activación de macrófagos frente a la biofuncionalización superficial con ALB y FBG en medios de relevancia fisiológica.
- ⊗ Comparar la respuesta de macrófagos frente a la biofuncionalización superficial con ALB y FBG en medios libres de proteína y de relevancia fisiológica.

## Referencias

- [1] B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, *Biomaterial Science - An Introduction to Materials in Medicine.*, Elsevier Inc., California, EEUU, 2004.
- [2] Anexo II Disp 2318/02(Reg GMC 40/00). Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, (2008).
- [3] D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola, A review of the clinical implications of anti-infective biomaterials and infection-resistant surfaces, *Biomaterials*. 34 (2013) 8018–8029. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.07.048.
- [4] M. Wang, T. Tang, Surface treatment strategies to combat implant-related infection from the beginning, *J. Orthop. Transl.* (2018) 1–13. doi:10.1016/j.jot.2018.09.001.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention, 2016. National and state healthcare-associated infections progress report.
- [6] R. Greenhalgh, N.C. Dempsey-Hibbert, K.A. Whitehead, Antimicrobial strategies to reduce polymer biomaterial infections and their economic implications and considerations, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 136 (2019) 1–14. doi:10.1016/j.ibiod.2018.10.005.
- [7] R.O. Darouiche, Device-Associated Infections: A Macroproblem that Starts with Microadherence, *Clin. Infect. Dis.* 33 (2001) 1567–1572. doi:10.1086/323130.
- [8] T.A. van Vugt, J.A.P. Geurts, J.J. Arts, N.C. Lindfors, Biomaterials in treatment of orthopedic infections, Elsevier Ltd., 2016. doi:10.1016/B978-0-08-100205-6.00003-3.
- [9] J.-M. Yin, Z.-T. Liu, S.-C. Zhao, Y.-J. Guo, Diagnosis, management, and prevention of prosthetic joint infections, *Front. Biosci.* 18 (2013) 1349–1357.
- [10] J. Marschall, L.A. Mermel DO ScM, M. Fakh MPH, L.R. Hadaway MEd BC CRNI, A. Kallen MPH, N.P. O, A.R. Marie Pettis BSN CIC, M.E. Rupp, T. Sandora MPH, L.L. Maragakis MPH, D.S. Yokoe MPH, L.A. Mermel, M. Fakh, L. Hadaway, A. Kallen, A. Marie Pettis, T. Sandora, L.L. Maragakis, D.S. Yokoe, Strategies to Prevent Central Line-Associated Bloodstream Infections in Acute Care Strategies to Prevent Central Line-Associated Bloodstream Infections in Acute Care Hospitals: 2014 Update, *Source Infect. Control Hosp. Epidemiol. Infect Control Hosp Epidemiol.* 35 (2014) 753–771. doi:10.1086/676533.
- [11] C.J. Crnich, P. Drinka, Medical Device-Associated Infections in the Long-Term Care Setting, *Infect. Dis. Clin. North Am.* (2012). doi:10.1016/j.idc.2011.09.007.
- [12] N.P. O'Grady, M. Alexander, L.A. Burns, E.P. Dellinger, J. Garland, S.O. Heard, P.A. Lipsett, H. Masur, L.A. Mermel, M.L. Pearson, I.I. Raad, A.G. Randolph, M.E. Rupp, Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-related Infections, *Clin. Infect. Diseases.* 52 (2011) 162–193. doi:10.1093/cid/cir257.
- [13] W.C. Wang, M. Lagoudis, C.-W. Yeh, K.S. Paranhos, Management of peri-implantitis – A contemporary synopsis, *Singapore Dent. J.* 38 (2017) 8–16. doi:10.1016/j.sdj.2017.10.001.
- [14] C.T. Lee, Y.W. Huang, L. Zhu, R. Weltman, Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis, *J. Dent.* 62 (2017) 1–12. doi:10.1016/j.jdent.2017.04.011.

- [15] I. Uckay, P. Hoffmeyer, D. Lew, D. Pittet, Prevention of surgical site infections in orthopaedic surgery and bone trauma: State-of-the-art update, *J. Hosp. Infect.* (2013). doi:10.1016/j.jhin.2012.12.014.
- [16] D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola, A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces, *Biomaterials.* 34 (2013) 8533–8554. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.07.089.
- [17] M. Ramasamy, J. Lee, Recent nanotechnology approaches for prevention and treatment of biofilm-associated infections on medical devices, *Biomed Res. Int.* (2016). doi:10.1155/2016/1851242.
- [18] P. Vergidis, R. Patel, Novel Approaches to the Diagnosis, Prevention, and Treatment of Medical Device-Associated Infections, *Infect. Dis. Clin. North Am.* (2012). doi:10.1016/j.idc.2011.09.012.
- [19] G.O. Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter, Biofilm Formation As microbial Development, *Annu. Rev. Microbiol.* 54 (2000) 49–79. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49.
- [20] C.R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro, J.W. Costerton, Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials, *Biomaterials.* (2012). doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.031.
- [21] T.R. Garrett, M. Bhakoo, Z. Zhang, Bacterial adhesion and biofilms on surfaces, *Prog. Nat. Sci.* 18 (2008) 1049–1056. doi:10.1016/j.pnsc.2008.04.001.
- [22] R.M. Donlan, J.W. Costerton, Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms., *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (2002) 167–19. doi:10.1128/CMR.15.2.167.
- [23] L. Hobley, C. Harkins, C.E. MacPhee, N.R. Stanley-Wall, Giving structure to the biofilm matrix: An overview of individual strategies and emerging common themes, *FEMS Microbiol. Rev.* 39 (2015) 649–669. doi:10.1093/femsre/fuv015.
- [24] P.Y. Chung, Y.S. Toh, Anti-biofilm agents: Recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*, *Pathog. Dis.* 70 (2014) 231–239. doi:10.1111/2049-632X.12141.
- [25] A. Kumar, A. Alam, M. Rani, N.Z. Ehtesham, S.E. Hasnain, Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens, *Int. J. Med. Microbiol.* 307 (2017) 481–489. doi:10.1016/j.ijmm.2017.09.016.
- [26] A. Roosjen, W. Norde, H.C. Van Der Mei, H.J. Busscher, The use of positively charged or low surface free energy coatings versus polymer brushes in controlling biofilm formation, *Prog. Colloid Polym. Sci.* 132 (2006) 138–144. doi:10.1007/2882\_026.
- [27] K. Hori, S. Matsumoto, Bacterial adhesion: From mechanism to control, *Biochem. Eng. J.* (2010) 424–434. doi:10.1016/j.bej.2009.11.014.
- [28] W.F. Oliveira, P.M.S. Silva, R.C.S. Silva, G.M.M. Silva, G. Machado, L.C.B.B. Coelho, M.T.S. Correia, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants, *J. Hosp. Infect.* 98 (2017) 111–117. doi:10.1016/j.jhin.2017.11.008.
- [29] J. Hernandez-Montelongo, E.G. Lucchesi, I. Gonzalez, W.A.A. Macedo, V.F. Nascimento, A.M. Moraes, M.M. Beppu, M.A. Cotta, Hyaluronan/chitosan nanofilms assembled layer-by-layer and their antibacterial effect: A study using *Staphylococcus aureus* and

- Pseudomonas aeruginosa*, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 141 (2016) 499–506. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.02.028.
- [30] T.J. Foster, J.A. Geoghegan, V.K. Ganesh, M. Höök, Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*, Nat. Publ. Gr. 12 (2014). doi:10.1038/nrmicro3161.
- [31] J.M. Brown, J.B. Mistry, J.J. Cherian, R.K. Elmallah, M. Chughtai, S.F. Harwin, M.A. Mont, Femoral Component Revision of Total Hip Arthroplasty, Orthopedics. 39 (2016) e1129–e1139. doi:10.3928/01477447-20160819-06.
- [32] M.P.D. Deege, D.L. Paterson, Reducing the Development of Antibiotic Resistance in Critical Care Units, Curr. Pharm. Biotechnol. 12 (2011) 2062–2069.
- [33] V.B. Damodaran, N.S. Murthy, Bio-inspired strategies for designing antifouling biomaterials, Biomater. Res. 20 (2016) 1–11. doi:10.1186/s40824-016-0064-4.
- [34] L.C. Xu, C.A. Siedlecki, Protein adsorption, platelet adhesion, and bacterial adhesion to polyethylene-glycol-textured polyurethane biomaterial surfaces, J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater. 105 (2017) 668–678. doi:10.1002/jbm.b.33592.
- [35] P. Kingshott, J. Wei, D. Bagge-Ravn, N. Gadegaard, L. Gram, Covalent attachment of poly(ethylene glycol) to surfaces, critical for reducing bacterial adhesion, Langmuir. 19 (2003) 6912–6921. doi:10.1021/la034032m.
- [36] A. Roosjen, H.C. Van Der Mei, H.J. Busscher, W. Norde, Microbial adhesion to poly(ethylene oxide) brushes: Influence of polymer chain length and temperature, Langmuir. 20 (2004) 10949–10955. doi:10.1021/la048469l.
- [37] T. Huang, H. Liu, P. Liu, P. Liu, L. Li, J. Shen, Zwitterionic copolymers bearing phosphonate or phosphonic motifs as novel metal-anchorable anti-fouling coatings, J. Mater. Chem. B. 5 (2017) 5380–5389. doi:10.1039/C7TB01017F.
- [38] L. Rizzello, R. Cingolani, P.P. Pompa, Nanotechnology tools for antibacterials materials, Nanomedicine. 8 (2013) 807–821. doi:10.2217/NNM.13.63.
- [39] D.A. Phoenix, F. Harris, S.R. Dennison, Novel Antimicrobial Agents and Strategies, Wiley-VHC, Weinheim, Germany, 2015. doi:10.1002/9783527676132.
- [40] V.V. Kumar, S.P. Anthony, Antimicrobial studies of metal and metal oxide nanoparticles, in: Surf. Chem. Nanobiomaterials, Elsevier Inc., 2016: pp. 265–300. doi:10.1016/B978-0-323-42861-3.00009-1.
- [41] J.T. Huerta, J.M. Bermudez, D.A. Quinteros, D.A. Allemandi, S.D. Palma, New trends, challenges, and opportunities in the use of nanotechnology in restorative dentistry, Nanobiomaterials Dent. Appl. Nanobiomaterials. 11 (2016) 133–160. doi:10.1016/B978-0-323-42867-5.00006-0.
- [42] L.E. Valenti, C.E. Giacomelli, Unaffected features of BSA stabilized Ag nanoparticles after storage and reconstitution in biological relevant media, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 132 (2015) 71–77. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.05.002.
- [43] X. Zhang, J. Li, X. Wang, Y. Wang, R. Hang, X. Huang, B. Tang, P.K. Chu, Effects of copper nanoparticles in porous TiO<sub>2</sub> coatings on bacterial resistance and cytocompatibility of

osteoblasts and endothelial cells, (2017) 110–120. doi:10.1016/j.msec.2017.08.061.

- [44] J. Karbowniczek, L. Cordero-Arias, S. Virtanen, S.K. Misra, E. Valsami-Jones, L. Tuchscher, B. Rutkowski, K. Górecki, P. Bała, A. Czyrska-Filemonowicz, A.R. Boccaccini, Electrophoretic deposition of organic/inorganic composite coatings containing ZnO nanoparticles exhibiting antibacterial properties, *Mater. Sci. Eng. C*. (2017). doi:10.1016/j.msec.2017.03.180.
- [45] B. Jose, V. Antoci, A.R. Zeiger, E. Wickstrom, N.J. Hickok, Vancomycin covalently bonded to titanium beads kills *Staphylococcus aureus*, *Chem. Biol.* 12 (2005) 1041–1048. doi:10.1016/j.chembiol.2005.06.013.
- [46] M.C. Lawson, K.C. Hoth, C.A. Deforest, C.N. Bowman, K.S. Anseth, Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilms using polymerizable vancomycin derivatives, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 468 (2010) 2081–2091. doi:10.1007/s11999-010-1266-z.
- [47] S. Kondaveeti, T.C. Damatoa, A.M. Carmona-Ribeiro, M.R. Sierakowski, D.F.S. Petri, Sustainable hydroxypropyl methylcellulose/xyloglucan/gentamicin films with antimicrobial properties, *Carbohydr. Polym.* 165 (2017) 285–293. doi:10.1016/j.carbpol.2017.02.066.
- [48] Z. Ma, A. Garrido-Maestu, K.C. Jeong, Application, mode of action, and in vivo activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review, *Carbohydr. Polym.* (2017) 257–265. doi:10.1016/j.carbpol.2017.08.082.
- [49] F. Kara, E.A. Aksoy, Z. Yuksekdog, N. Hasirci, S. Aksoy, Synthesis and surface modification of polyurethanes with chitosan for antibacterial properties, *Carbohydr. Polym.* (2014) 39–47. doi:10.1016/j.carbpol.2014.05.019.
- [50] S.R. Dennison, F. Harris, D.A. Phoenix, Magainins – A Model for Development of Eukaryotic Antimicrobial Peptides (AMPs), in: D.A. Phoenix, F. Harris, S.R. Dennison (Eds.), *Nov. Antimicrob. Agents Strateg.*, First Edit, Weinheim, Germany, 2015: pp. 47–58.
- [51] M. Hassan, M. Kjos, I.F. Nes, D.B. Diep, F. Lotfipour, Antimicrobial Peptides from Prokaryotes, in: D.A. Phoenix, F. Harris, S.R. Dennison (Eds.), *Nov. Antimicrob. Agents Strateg.*, Weinheim, Germany, 2015: pp. 71–84.
- [52] H. Geng, Y. Yuan, A. Adayi, X. Zhang, X. Song, L. Gong, X. Zhang, P. Gao, Engineered chimeric peptides with antimicrobial and titanium-binding functions to inhibit biofilm formation on Ti implants, *Mater. Sci. Eng. C*. (2018). doi:10.1016/j.msec.2017.08.062.
- [53] E.P. Ivanova, S.H. Nguyen, Y. Guo, V.A. Baulin, H.K. Webb, V.K. Truong, J. V. Wandiyanto, C.J. Garvey, P.J. Mahon, D.E. Mainwaring, R.J. Crawford, Bactericidal activity of self-assembled palmitic and stearic fatty acid crystals on highly ordered pyrolytic graphite, *Acta Biomater.* 59 (2017) 148–157. doi:10.1016/j.actbio.2017.07.004.
- [54] R.Y. Zhang, D.D. Hu, J.G. Gu, J.X. Zhang, P.H. Goodwin, Q.X. Hu, Purification of a novel hydrophobin PN1 involved in antibacterial activity from an edible mushroom *Pleurotus nebrodensis*, *Eur. J. Plant Pathol.* (2015). doi:10.1007/s10658-015-0734-4.
- [55] M. Artini, P. Cicatiello, A. Ricciardelli, R. Papa, L. Selan, P. Dardano, M. Tilotta, G. Vrenna, M.L. Tutino, P. Giardina, E. Parrilli, Hydrophobin coating prevents *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation on different surfaces, *Biofouling*. (2017). doi:10.1080/08927014.2017.1338690.

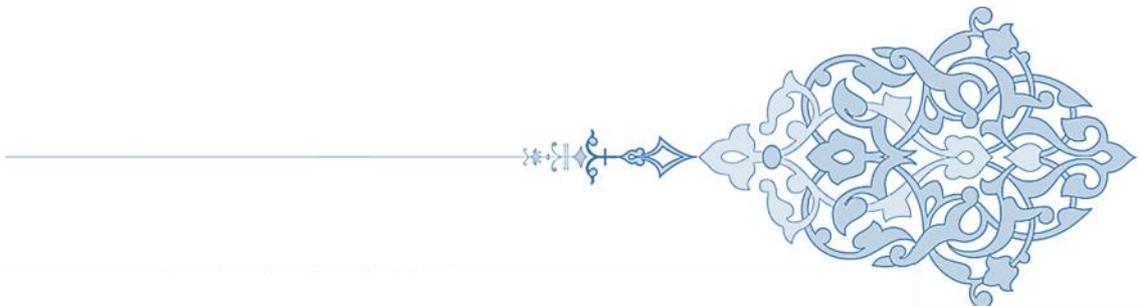
- [56] H.J. Haugen, S.P. Lyngstadaas, Antibacterial effects of titanium dioxide in wounds, in: *Wound Heal. Biomater.*, Elsevier Ltd, 2016: pp. 439–450. doi:10.1016/B978-1-78242-456-7.00021-0.
- [57] C. Giordano, E. Saino, L. Rimondini, M.P. Pedferri, L. Visai, A. Cigada, R. Chiesa, Electrochemically induced anatase inhibits bacterial colonization on Titanium Grade 2 and Ti6Al4V alloy for dental and orthopedic devices, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 88 (2011) 648–655. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.07.054.
- [58] V. Nandakumar, Z. Han, Z. Fritz, V. Krishna, B. Koopman, B. Moudgil, Visible light photocatalytic bacterial inactivation on titanium dioxide coatings, *KONA Powder Part. J.* 34 (2017) 234–240. doi:10.14356/kona.2017011.
- [59] T.P. Schaer, S. Stewart, B.B. Hsu, A.M. Klibanov, Hydrophobic polycationic coatings that inhibit biofilms and support bone healing during infection, *Biomaterials*. 33 (2012) 1245–1254. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.038.
- [60] B.B. Hsu, J. Ouyang, S.Y. Wong, P.T. Hammond, A.M. Klibanov, On structural damage incurred by bacteria upon exposure to hydrophobic polycationic coatings, *Biotechnol. Lett.* 33 (2011) 411–416. doi:10.1007/s10529-010-0419-1.
- [61] G. Rohman, Materials used in biomaterial applications, in: V. Migonney (Ed.), *Biomaterials*, Wiley-VHC, New Jersey, EEUU, 2014: pp. 27–74. doi:10.1002/9781119043553.
- [62] J.E. Lemons, Biomaterials, Dental Materials, and Device Retrieval and Analysis, in: Y. Rosen, N. Elman (Eds.), *Biomater. Sci. An Integr. Clin. Eng. Approach*, CRC Press, Boca Ratón, EEUU, 2012: pp. 135–148. doi:10.1201/b12303-6.
- [63] J. Telegdi, A. Shaban, G. Vastag, Biocorrosion—Steel, *Ref. Modul. Chem. Mol. Sci. Chem. Eng.* (2018) 28–42. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.13591-7.
- [64] L.Y. Cui, S.D. Gao, P.P. Li, R.C. Zeng, F. Zhang, S.Q. Li, E.H. Han, Corrosion resistance of a self-healing micro-arc oxidation/polymethyltrimethoxysilane composite coating on magnesium alloy AZ31, *Corros. Sci.* 118 (2017) 84–95. doi:10.1016/j.corsci.2017.01.025.
- [65] N.G. Hoogeveen, M.A. Cohen Stuart, G.J. Fleer, Polyelectrolyte Adsorption on Oxides. I. Kinetics and Adsorbed Amounts, *J. Colloid Interface Sci.* 182 (1996) 133–145. doi:10.1006/jcis.1996.0444.
- [66] A. Kanta, R. Sedev, J. Ralston, Thermally- and photoinduced changes in the water wettability of low-surface-area silica and titania, *Langmuir*. 21 (2005) 2400–2407. doi:10.1021/la047721m.
- [67] T.M. Mcintire, S.R. Smalley, J.T. Newberg, S. Lea, J.C. Hemminger, B.J. Finlayson-pitts, a S. Lea, Substrate Changes Associated with the Chemistry of Self-Assembled Monolayers on Silicon Substrate Changes Associated with the Chemistry of Self-Assembled Monolayers on Silicon, *Langmuir*. 22 (2006) 5617–5624. doi:10.1021/la060153l.
- [68] A. Nieto Peña, Tesis Doctoral. Aplicaciones biomédicas de materiales mesoporosos de sílice y de carbón, Universidad Complutense de Madrid., 2010.
- [69] D.K. Aswal, S. Lenfant, D. Guerin, J. V. Yakhmi, D. Vuillaume, Self assembled monolayers on silicon for molecular electronics, *Anal. Chim. Acta.* 568 (2006) 84–108. doi:10.1016/j.aca.2005.10.027.

- [70] R. Brady, B. Woonton, M.L. Gee, A.J. O'Connor, Hierarchical mesoporous silica materials for separation of functional food ingredients - A review, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9 (2008) 243–248. doi:10.1016/j.ifset.2007.10.002.
- [71] R. Ishii, T. Itoh, T. Yokoyama, S.I. Matsuura, T. Tsunoda, S. Hamakawa, F. Mizukami, T.A. Hanaoka, Preparation of mesoporous silicas using food grade emulsifiers and its application for enzyme supports, *J. Non. Cryst. Solids.* 358 (2012) 1673–1680. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2012.04.032.
- [72] M. Kariminejad, E. Sadeghi, M. Rouhi, R. Mohammadi, F. Askari, M. Taghizadeh, S. Moradi, The effect of nano-SiO<sub>2</sub> on the physicochemical and structural properties of gelatin-polyvinyl alcohol composite films, *J. Food Process Eng.* 41 (2018) 1–9. doi:10.1111/jfpe.12817.
- [73] S. Wang, X. Wang, F.G. Draenert, O. Albert, H.C. Schröder, V. Mailänder, G. Mitov, W.E.G. Müller, Bioactive and biodegradable silica biomaterial for bone regeneration, *Bone.* 67 (2014) 292–304. doi:10.1016/j.bone.2014.07.025.
- [74] R.K. Perumal, A. Gopinath, R. Thangam, S. Perumal, D. Masilamani, S.K. Ramadass, B. Madhan, Collagen-silica bio-composite enriched with *Cynodon dactylon* extract for tissue repair and regeneration, *Mater. Sci. Eng. C.* 92 (2018) 297–306. doi:10.1016/j.msec.2018.06.050.
- [75] S. Rangaraj, R. Venkatachalam, In vitro and in vivo characteristics of biogenic high surface silica nanoparticles in A549 lung cancer cell lines and *Danio rerio* model systems for inorganic biomaterials development, *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 46 (2018) 1415–1424. doi:10.1080/21691401.2017.1369427.
- [76] D. Arcos, M. Vallet-regí, Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration, *Acta Biomater.* 6 (2010) 2874–2888. doi:10.1016/j.actbio.2010.02.012.
- [77] M.I.A. Echazú, M.V. Tuttolomondo, M.L. Foglia, A.M. Mebert, G.S. Alvarez, M.F. Desimone, Advances in collagen, chitosan and silica biomaterials for oral tissue regeneration: From basics to clinical trials, *J. Mater. Chem. B.* 4 (2016) 6913–6929. doi:10.1039/c6tb02108e.
- [78] W. Norde, Adsorption of (Bio)Polymers, with Special Emphasis on Globular Proteins, in: M. Dekker (Ed.), *Colloids Interfaces Life Sci.*, New York, 2003. doi:10.1201/9780203912157.ch15.
- [79] R.P. Schneider, Conditioning Film-Induced Modification of Substratum Physicochemistry--Analysis by Contact Angles, *J. Colloid Interface Sci.* 182 (1996) 204–213. doi:10.1006/jcis.1996.0452.
- [80] J.D. Patel, M. Ebert, R. Ward, J.M. Anderson, *S. epidermidis* biofilm formation: Effects of biomaterial surface chemistry and serum proteins, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 80 (2007) 742–751. doi:10.1002/jbm.a.31103.
- [81] K. Dong Park, Y. Soo Kim, D. Keun Han, Y. Ha Kim, E. Hee Bae Lee, H. Suh, K. Suk Choi, Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces, *Biomaterials.* 19 (1998) 851–859. doi:10.1016/S0142-9612(97)00245-7.
- [82] P. Moazzam, A. Razmjou, M. Golabi, D. Shokri, A. Landarani-Isfahani, Investigating the BSA protein adsorption and bacterial adhesion of Al-alloy surfaces after creating a hierarchical (micro/nano) superhydrophobic structure, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 104 (2016) 2220–2233. doi:10.1002/jbm.a.35751.
- [83] F.M. Burke, A. Di Poto, P. Speziale, T.J. Foster, The A domain of fibronectin-binding protein

- B of *Staphylococcus aureus* contains a novel fibronectin binding site, FEBS J. 278 (2011) 2359–2371. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08159.x.
- [84] Y.P. Ko, M.J. Flick, Fibrinogen Is at the Interface of Host Defense and Pathogen Virulence in *Staphylococcus aureus* Infection, Semin. Thromb. Hemost. 42 (2016) 408–421. doi:10.1055/s-0036-1579635.
- [85] B. Fang, S. Gon, M. Park, K.N. Kumar, V.M. Rotello, K. Nusslein, M.M. Santore, Bacterial adhesion on hybrid cationic nanoparticle-polymer brush surfaces: Ionic strength tunes capture from monovalent to multivalent binding, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 87 (2011) 109–115. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.05.010.
- [86] A. Hasan, S.K. Pattanayek, L.M. Pandey, The Effect of Functional Groups of Self-Assembled Monolayers on Protein Adsorption and Initial Cell Adhesion, ACS Biomater. Sci. Eng. 4 (2018) 3224–3233. doi:10.1021/acsbiomaterials.8b00795.
- [87] S. Bisht, K.S. Singh, R. Choudhary, S. Kumar, S. Grover, A.K. Mohanty, V. Pande, J.K. Kaushik, Expression of fibronectin-binding protein of *L. acidophilus* NCFM and in vitro refolding to adhesion capable native-like protein from inclusion bodies, Protein Expr. Purif. 145 (2018) 7–13. doi:10.1016/j.pep.2017.11.007.
- [88] R.G. Moody, M.P. Williamson, Structure and function of a bacterial Fasciclin I Domain Protein elucidates function of related cell adhesion proteins such as TGFBIp and periostin, FEBS Open Bio. 3 (2013) 71–77. doi:10.1016/j.fob.2013.01.001.
- [89] W. Norde, J. Buijs, H. Lyklema, Adsorption of globular proteins, in: J. Lyklema (Ed.), Fundam. Interface Colloid Sci., Elsevier, 2005: p. 3.1-3.59. doi:10.1016/S1874-5679(05)80007-8.
- [90] L. Valenti, Tesis Doctoral. Desde la optimización de la interacción enzima-superficie hacia la obtención de inmunoensayos en fase sólida, Universidad Nacional de Córdoba, 2008.
- [91] W. Norde, C.E. Giacomelli, Conformational changes in proteins at interfaces: From solution to the interface, and back, Macromol. Symp. 145 (1999) 125–136. doi:10.1002/masy.19991450114.
- [92] C.E. Giacomelli, Tesis Doctoral. Propiedades adsorptivas de las interfaces sólidos coloidales-solución acuosa, Universidad Nacional de Córdoba, 1997.

# PARTE 1

## Adsorción de proteínas y adhesión bacteriana





## **Parte 1: Adsorción de proteínas y adhesión bacteriana**

### **Introducción**

Los biomateriales utilizados para implantes están expuestos a la adsorción de macromoléculas presentes en el fluido biológico circundante; en general, se trata de proteínas plasmáticas que, en determinadas condiciones, favorecen la colonización bacteriana. Así, las proteínas adsorbidas representan un nexo entre las propiedades superficiales del material y la colonización bacteriana [1-4]. Como consecuencia, se estudió el efecto que la adsorción de proteínas plasmáticas posee sobre la adhesión bacteriana. Con este fin, se planteó estudiar en profundidad el proceso de adsorción de ALB y FBG sobre superficies de sílica mediante Reflectometría, una técnica óptica que permite estudiar la cinética del proceso de adsorción-desorción de macromoléculas. A partir del empleo de esta técnica, se puede estimar las velocidades relativas de cada una de las etapas involucradas en el proceso de adsorción (ver Figura 2, de la Introducción general), las cuales determinan la cantidad adsorbida y la conformación de las moléculas adsorbidas sobre la superficie [5,6].

El proceso de adsorción de ALB fue extensamente estudiado en la literatura [7-12]. Sin embargo, no ha sido abordado con un diseño experimental que permita optimizar el proceso en cuanto a minimizar la adhesión bacteriana. En particular, para estudiar el proceso de adsorción-desorción de ALB se empleó un diseño factorial de experimentos, que permite evaluar simultáneamente el efecto que tienen distintos factores experimentales en el proceso de interés con un número acotado de experimentos. De este modo, es posible elegir los factores o condiciones experimentales relevantes para el próximo conjunto de experimentos [13].

El estudio de la adsorción de FBG, por otro lado, ha sido abordado bajo una amplia gama de condiciones experimentales, utilizando diversas técnicas como Elipsometría [14–16], Microscopía de Fuerza Atómica [17,18], Microbalanza de Cristal de Cuarzo [16,19], Radiomarcado [20] y distintas Técnicas Espectroscópicas [16,21–23]. Sin embargo, sólo algunos trabajos se dedicaron a estudiar los aspectos cinéticos y la estructura de FBG adsorbida en monocapas. Se puede destacar el trabajo de Wertz y Santore [12,24], quienes determinaron *in situ* la cinética de adsorción de FBG utilizando una técnica de marcadores fluorescentes. Debido a que la adsorción de FBG ha sido mucho menos explorada que la de ALB, se utilizó un modelo teórico apropiado para interpretar los resultados experimentales del proceso de adsorción-desorción de FBG obtenidos por Reflectometría.

A partir del estudio del proceso de adsorción-desorción de las proteínas evaluadas, se pretende conocer como es la interacción proteína-superficie. En particular, el rol que cumple el proceso de relajación, donde ocurren cambios estructurales en las moléculas de proteína adsorbidas para optimizar la interacción proteína-superficie [5,25]. En este sentido, los resultados del estudio del proceso de adsorción-desorción de ALB y FBG se utilizaron para elegir las condiciones experimentales que permitan minimizar la adhesión bacteriana.

La ALB fue seleccionada por ser la proteína más abundante en el plasma humano [26], biocompatible e inmunogénica [27]. Por lo tanto, su interacción con la superficie de los biomateriales constituyentes de los dispositivos médicos determina (al menos en los estadios iniciales) la formación del film condicionante. Es decir, la presencia de ALB adsorbida representa uno de los nexos más significativos entre las propiedades superficiales del material y la colonización bacteriana *in vivo*. Por otra parte, se trata de una proteína de fácil manipulación y económica que puede ser

utilizada para la biofuncionalización de superficies de manera sencilla. Por su lado, el FBG no sólo es una de las proteínas más abundante en el plasma humano [26], sino que también cumple un importante rol biológico asociado a la trombosis y la hemostasia [28,29]. La bacteria *Staphylococcus aureus* posee proteínas ancladas en la pared celular que pueden unirse específicamente a diferentes sitios en la molécula de FBG y alterar su función [30,31]. De hecho, se considera al FBG como determinante en la infección por *Staphylococcus* [32,33]. Los sitios de unión de estas proteínas de la bacteria incluyen las regiones del C-terminal de la cadena  $\gamma$  y el C-terminal de la cadena  $\alpha$  de la molécula de FBG [31,33]. De esta manera, con esta proteína, es posible evaluar el rol de las interacciones específicas en la adhesión bacteriana.

El proceso de adhesión bacteriana se puede dividir en diferentes fases según el tipo de interacciones involucradas (ver Figura 1, de la Introducción general): una fase inicial, instantánea y reversible y una fase irreversible que es dependiente del tiempo [32]. Más aún, para la formación del biofilm es necesario un periodo de tiempo suficiente para el desarrollo de la comunidad sésil microbiana [34]. En consecuencia, el estudio de la adhesión bacteriana se dividió en dos etapas: adhesión bacteriana inicial y formación del biofilm. Para ello, de forma inmediata y consecutiva a la adsorción de proteínas (ALB o FBG) sobre las superficies, se realizó la adhesión de *S. aureus* para estudiar tanto la adhesión bacteriana inicial como la formación del biofilm. Se utilizó Microscopía Confocal de Fluorescencia para evaluar la adhesión bacteriana de forma cuantitativa y Microscopía Electrónica de Barrido para evaluar la morfología de las células adheridas.

En definitiva, la primera parte de este trabajo de Tesis Doctoral incluye tres capítulos. El Capítulo 1 corresponde a la parte experimental, abordando los materiales y métodos cuyos resultados se incluyen en los dos capítulos

siguientes. El Capítulo 2, se refiere a los resultados del proceso de adsorción-desorción de ALB y su correlación con la adhesión de *S. aureus* subsiguiente. El Capítulo 3, por su parte, incluye el estudio del proceso de adsorción-desorción de FBG y la consiguiente evaluación de la adhesión bacteriana.

## Referencias

- [1] A. Roosjen, W. Norde, H.C. Van Der Mei, H.J. Busscher, The use of positively charged or low surface free energy coatings versus polymer brushes in controlling biofilm formation, *Prog. Colloid Polym. Sci.* 132 (2006) 138–144. doi:10.1007/2882\_026.
- [2] P.Y. Chung, Y.S. Toh, Anti-biofilm agents: Recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*, *Pathog. Dis.* 70 (2014) 231–239. doi:10.1111/2049-632X.12141.
- [3] D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola, A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces, *Biomaterials.* 34 (2013) 8533–8554. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.07.089.
- [4] V.B. Damodaran, N.S. Murthy, Bio-inspired strategies for designing antifouling biomaterials, *Biomater. Res.* 20 (2016) 1–11. doi:10.1186/s40824-016-0064-4.
- [5] W. Norde, J. Buijs, H. Lyklema, Adsorption of globular proteins, in: J. Lyklema (Ed.), *Fundam. Interface Colloid Sci.*, 2005: p. 3.1-3.59.
- [6] W. Norde, Adsorption of (Bio)Polymers, with Special Emphasis on Globular Proteins, in: M. Dekker (Ed.), *Colloids Interfaces Life Sci.*, New York, 2003.
- [7] L.E. Valenti, P.A. Fiorito, C.D. García, C.E. Giacomelli, The adsorption-desorption process of bovine serum albumin on carbon nanotubes, *J. Colloid Interface Sci.* 307 (2007) 349–356. doi:10.1016/j.jcis.2006.11.046.
- [8] W. Norde, C.E. Giacomelli, BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states, in: *J. Biotechnol.*, 2000. doi:10.1016/S0168-1656(00)00242-X.
- [9] C.E. Giacomelli, M.J. Esplandiú, P.I. Ortiz, M.J. Avena, C.P. De Pauli, Ellipsometric Study of Bovine Serum Albumin Adsorbed onto Ti/TiO<sub>2</sub> Electrodes, *J. Colloid Interface Sci.* 218 (1999) 404–411. doi:10.1006/jcis.1999.6434.
- [10] P. Moazzam, A. Razmjou, M. Golabi, D. Shokri, A. Landarani-Isfahani, Investigating the BSA protein adsorption and bacterial adhesion of Al-alloy surfaces after creating a hierarchical (micro/nano) superhydrophobic structure, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 104 (2016) 2220–2233. doi:10.1002/jbm.a.35751.
- [11] H. Miorner, E. Myhre, L. Bjorck, G. Kronvall, Effect of specific binding of human albumin, fibrinogen, and immunoglobulin G on surface characteristics of bacterial strains as revealed by partition experiments in polymer phase systems, *Infect. Immun.* 29 (1980) 879–885. PMID: 7429636.
- [12] C.F. Wertz, M.M. Santore, Effect of Surface Hydrophobicity on Adsorption and Relaxation Kinetics of Albumin and Fibrinogen: Single-Species and Competitive Behavior, *Langmuir.* 17 (2001) 3006–3016. doi:10.1021/la001778l.
- [13] M. Mäkelä, Experimental design and response surface methodology in energy applications: A tutorial review, *Energy Convers. Manag.* 151 (2017) 630–640. doi:10.1016/j.enconman.2017.09.021.
- [14] P. Silva-Bermudez, S. Muhl, S.E. Rodil, A comparative study of fibrinogen adsorption onto

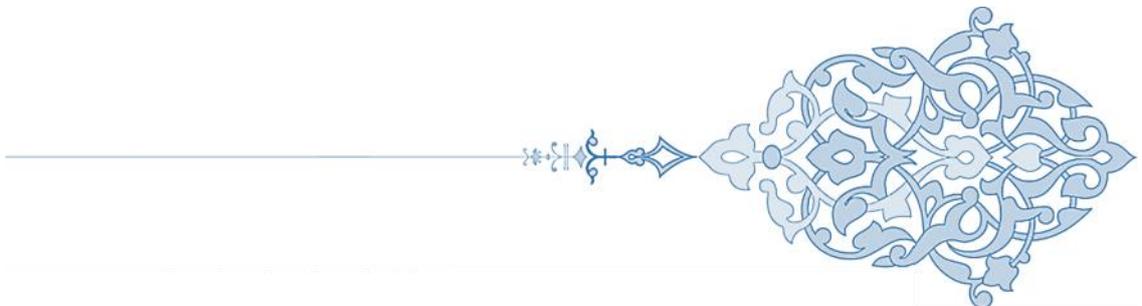
- metal oxide thin films, *Appl. Surf. Sci.* 282 (2013) 351–362. doi:10.1016/j.apsusc.2013.05.133.
- [15] M. Malmsten, Ellipsometry Studies of Protein Layers Adsorbed at Hydrophobic Surfaces, *J. Colloid Interface Sci.* 166 (1994) 333–342. doi:10.1006/jcis.1994.1303.
- [16] F. Höök, J. Vörös, M. Rodahl, R. Kurrat, P. Böni, J. Ramsden, M. Textor, N. Spencer, P. Tengvall, J. Gold, B. Kasemo, A comparative study of protein adsorption on titanium oxide surfaces using in situ ellipsometry, optical waveguide lightmode spectroscopy, and quartz crystal microbalance/dissipation, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 24 (2002) 155–170. doi:10.1016/S0927-7765(01)00236-3.
- [17] P. Żeliszewska, A. Bratek-Skicki, Z. Adamczyk, M. Cieśla, Human Fibrinogen Adsorption on Positively Charged Latex Particles, *Langmuir.* 30 (2014) 11165–11174. doi:10.1021/la5025668.
- [18] A. Toscano, M.M. Santore, Fibrinogen adsorption on three silica-based surfaces: Conformation and kinetics, *Langmuir.* 22 (2006) 2588–2597. doi:10.1021/la051641g.
- [19] K. Kubiak, Z. Adamczyk, M. Wasilewska, Mechanisms of fibrinogen adsorption at the silica substrate determined by QCM-D measurements, *J. Colloid Interface Sci.* 457 (2015) 378–387. doi:10.1016/j.jcis.2015.07.009.
- [20] A. Dolatshahi-Pirouz, S. Skeldal, M.B. Hovgaard, T. Jensen, M. Foss, J. Chevallier, F. Besenbacher, Influence of nanoroughness and detailed surface morphology on structural properties and water-coupling capabilities of surface-bound fibrinogen films, *J. Phys. Chem. C.* 113 (2009) 4406–4412. doi:10.1021/jp808488f.
- [21] Y. Chang, W.L. Chu, W.Y. Chen, J. Zheng, L. Liu, R.C. Ruaan, A. Higuchi, A systematic SPR study of human plasma protein adsorption behavior on the controlled surface packing of self-assembled poly(ethylene oxide) triblock copolymer surfaces, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 93 (2010) 400–408. doi:10.1002/jbm.a.32558.
- [22] M.M. Santore, C.F. Wertz, Protein spreading kinetics at liquid-solid interfaces via an adsorption probe method, *Langmuir.* 21 (2005) 10172–10178. doi:10.1021/la051059s.
- [23] K. Nakanishi, T. Sakiyama, K. Imamura, On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon, *J. Biosci. Bioeng.* 91 (2001) 233–244. doi:10.1016/S1389-1723(01)80127-4.
- [24] C.F. Wertz, M.M. Santore, Fibrinogen adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces: Geometrical and energetic aspects of interfacial relaxations, *Langmuir.* 18 (2002) 706–715. doi:10.1021/la011075z.
- [25] L. Valenti, Tesis Doctoral. Desde la optimización de la interacción enzima-superficie hacia la obtención de inmunoensayos en fase sólida, Universidad Nacional de Córdoba, 2008.
- [26] F. Kratz, B. Elsadek, Clinical impact of serum proteins on drug delivery, *J. Control. Release.* (2012) 429–445. doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.028.
- [27] L.E. Valenti, C.E. Giacomelli, Unaffected features of BSA stabilized Ag nanoparticles after storage and reconstitution in biological relevant media, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 132 (2015) 71–77. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.05.002.
- [28] J.W. Weisel, L. Medved, Fibrinogen and Fibrin, in: D.A.D. Parry, J.M. Squire (Eds.), *Adv. Protein Chem.*, 2005: pp. 247–299. doi:10.1016/S0065-3233(04)70008-X.

- [29] A. Henschen, J. Mcdonagh, Fibrinogen, fibrin and factor XIII, in: R.F.A. Zwaal, H.C. Hemker (Eds.), Blood Coagul., 1986: pp. 171–241. doi:10.1016/S0167-7306(08)60053-8.
- [30] A. Kumar, A. Alam, M. Rani, N.Z. Ehtesham, S.E. Hasnain, Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens, Int. J. Med. Microbiol. 307 (2017) 481–489. doi:10.1016/j.ijmm.2017.09.016.
- [31] F.M. Burke, A. Di Poto, P. Speziale, T.J. Foster, The A domain of fibronectin-binding protein B of *Staphylococcus aureus* contains a novel fibronectin binding site, FEBS J. 278 (2011) 2359–2371. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08159.x.
- [32] K. Hori, S. Matsumoto, Bacterial adhesion: From mechanism to control, Biochem. Eng. J. (2010) 424–434. doi:10.1016/j.bej.2009.11.014.
- [33] Y.P. Ko, M.J. Flick, Fibrinogen Is at the Interface of Host Defense and Pathogen Virulence in *Staphylococcus aureus* Infection, Semin. Thromb. Hemost. 42 (2016) 408–421. doi:10.1055/s-0036-1579635.
- [34] T.R. Garrett, M. Bhakoo, Z. Zhang, Bacterial adhesion and biofilms on surfaces, Prog. Nat. Sci. 18 (2008) 1049–1056. doi:10.1016/j.pnsc.2008.04.001.



# CAPÍTULO 1

## Parte experimental





---

## Capítulo 1: Parte experimental

### 1.1 Introducción

En este Capítulo, se presenta la parte experimental utilizada para desarrollar las temáticas relativas a la Parte 1 de este trabajo de Tesis Doctoral. En particular, corresponden a los materiales y métodos utilizados en el estudio del proceso de adsorción-desorción de ALB o de FBG sobre superficies de sílica y la evaluación de la adhesión bacteriana sobre estas superficies. Este estudio permitirá determinar en qué condiciones de adsorción de las proteínas plasmáticas evaluadas es posible inhibir la adhesión de *S. aureus*.

### 1.2 Materiales

#### 1.2.1 Reactivos

La ALB de suero bovino (fraccionada por precipitación con alcohol frío, fracción V, con un contenido de N<sub>2</sub> de 15,4% y de H<sub>2</sub>O de 2,1%) y el FBG de plasma humano (con un contenido aproximado de citrato de sodio de 15% y de cloruro de sodio de 25%) utilizados en este estudio fueron productos comerciales obtenidos de Sigma-Aldrich. La ALB bovina comparte un 76% de homología con la ALB humana [1].

Los reactivos y solventes glutaraldehído, cloroformo, NaCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, etanol, alcohol isopropílico, dextrosa y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> fueron obtenidos de J.T. Baker, acetona, diclorodimetilsilano y cristal violeta fueron obtenidos de Carlo Erba, peptona ácida de caseína, peptona de soja y agar fueron obtenidos de Britania, el aceite de montaje y la mezcla de colorantes que contiene SYTO 9 y yoduro de propidio forman parte del kit comercial “LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability” que fue adquirido a Invitrogen y 3-

aminopropiltrimetoxisilano y el colorante azul de Coomassie G-250 fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

Todos los reactivos son de grado analítico y fueron utilizados sin purificaciones previas. Las soluciones acuosas fueron preparadas en agua deionizada de resistencia 18 M $\Omega$ /cm (Sistema Milli Q, Millipore). A menos que se aclare previamente, todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C).

### 1.2.2 Superficies

Las superficies que se utilizaron en este trabajo consisten en superficies de sílica planas y reflejantes. En particular, constan de sustratos de silicio que fueron obtenidos en Silicon Valley Microelectronics, con una película de aproximadamente 100 nm de óxido de silicio que se generó por oxidación a 1000 °C durante 1 h. El espesor de la película de sílica fue determinado por Elipsometría. Como se detallará más adelante, dicho espesor es de extrema importancia para lograr una alta sensibilidad en los experimentos de Reflectometría [2]. Con el fin de ser utilizadas en Reflectometría, las superficies se cortaron en tiras de 1 cm x 4 cm siguiendo el plano cristalográfico del sustrato de silicio (100). Dichas superficies se lavaron con solución piraña (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3:1) a 100 °C durante 1 h, y posteriormente fueron enjuagadas con abundante cantidad de agua deionizada (precaución a tener en cuenta: la solución piraña constituye un poderoso agente oxidante que reacciona violentamente con compuestos orgánicos; debe ser manejada con extremo cuidado). Luego de cada experimento las superficies fueron reutilizadas; para ello, se realizó previamente el procedimiento de lavado recientemente descrito.

### 1.2.3 Cepa bacteriana, medios de cultivo y tinción

En este trabajo de Tesis Doctoral, se utilizó la cepa de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, la cual es una cepa perteneciente a la Colección Americana de cultivos, (American Type Culture Collection, ATCC) y fue provista gentilmente por la Dra. Claudia Sola (CIBICI-Dpto. de Bioquímica Clínica, FCQ-UNC).

En la siembra de las cepas de referencia se emplean medios de cultivo de enriquecimiento. En particular, los medios de cultivo que fueron utilizados están compuestos por digeridos enzimáticos de caseína y de soja, y fueron seleccionados por recomendación de la ATCC para esta cepa. Se utilizó el agar triptona soja (TSA) como medio de cultivo sólido y el caldo triptona soja (TSB) como medio de cultivo líquido. En la Tabla 1.1 se presenta la composición en g/l de ambos medios de acuerdo con una armonización de Farmacopeas (incluyendo la Farmacopea Europea, la de EEUU, y la de Japón), que es frecuentemente utilizada [3-5].

**Tabla 1.1** Medio agar triptona soja y caldo triptona soja

Compuesto	Concentración (g/l)	
	TSA	TSB
Agar	15,0	-
Peptona ácida de caseína	15,0	17,0
Peptona de soja	5,0	3,0
NaCl	5,0	5,0
D-glucosa	-	2,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	2,5

pH final= 7,3 ± 0,2

El medio utilizado para realizar los experimentos de adhesión bacteriana sobre las superficies de sílica fue una solución reguladora de pH

con una concentración 5 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 150 mM de NaCl (PBS). Se seleccionó este medio para minimizar la interferencia de la adsorción de componentes del medio de cultivo sobre las superficies durante la incubación con la bacteria.

Los medios de cultivo y el material de laboratorio empleado fueron previamente esterilizados por calor húmedo en autoclave a 121 °C durante 20 min a 1 atm de sobrepresión.

*S. aureus* es clasificada como Gram positiva, y como tal, presenta moléculas de ácido teicoico en su pared celular, que contienen grupos fosfodiéster fuertemente ácidos ( $\text{pK}_a = 1,5$ ) y que contribuyen a que la bacteria presente una carga neta negativa a pH fisiológico [6]. Se determinó el potencial zeta de suspensiones bacterianas en un analizador Delsa Nano C (Beckman Coulter). El potencial zeta resultó negativo en PBS a pH 7,3 ( $-19,8 \pm 0,3$  mV) y en TSB ( $-13,7 \pm 0,3$  mV).

Para visualizar a las bacterias adheridas sobre las superficies por Microscopía Confocal de Fluorescencia, se empleó una mezcla de dos colorantes que se fijan a los ácidos nucleicos de la célula bacteriana: el SYTO 9, que emite fluorescencia verde y el yoduro de propidio, que emite fluorescencia roja. El colorante SYTO 9 ingresa a todas las células, tanto a las que presentan la membrana plasmática intacta como dañada. Por el contrario, el yoduro de propidio sólo tiñe las células con membrana plasmática dañada, causando una reducción en la fluorescencia propia del SYTO 9 cuando ambos colorantes están presentes. De esta forma, al emplear una mezcla de ambos colorantes las células con membrana intacta o vivas se visualizan de color verde, mientras que las células con membrana dañada o muertas se visualizan de color rojo [7].

---

## 1.3 Métodos

### 1.3.1 Modificación química de las superficies

Se realizaron dos tipos de modificación química de las superficies de sílica: por un lado, se aumentó el grado de hidrofobicidad para evaluar el rol de las interacciones hidrofóbicas en el proceso de adsorción de ALB y, por el otro lado, se modificó la carga superficial para evaluar su efecto en la adhesión bacteriana. Para alcanzar estos propósitos, las superficies fueron modificadas en ambos casos con distintos grupos funcionales. Las superficies de sílica son hidrofílicas ya que poseen grupos hidroxilos superficiales [8,9]. Para aumentar la hidrofobicidad se utilizó diclorodimetilsilano, el cual reacciona con los grupos hidroxilo superficiales, formando especies superficiales bidentadas, que, mediante enlaces siloxano (Si-O-Si) insertan una monocapa de grupos metilo en las superficies modificadas [10–12]. Para ello, las superficies fueron previamente secadas con N<sub>2</sub> y sumergidas por 30 min en una solución de diclorodimetilsilano al 5% v/v en cloroformo [13]. Luego, fueron sumergidas en cloroformo para someterlas a un enjuague, fueron secadas al aire y se determinó el valor del ángulo de contacto.

Para incorporar cargas positivas a las superficies, se formó una monocapa autoensamblada (SAM) por silanización mediante 3-aminopropiltrimetoxisilano, que se une por enlaces covalentes a los grupos hidroxilo superficiales y se exponen así grupos amino hacia la solución [14–16]. El procedimiento consistió en secar las superficies con N<sub>2</sub> y tratarlas con plasma de aire en un “plasma cleaner” (Harrick Plasma) durante 20 min para aumentar la reactividad de los grupos hidroxilo superficiales [17]. Luego, las superficies fueron sumergidas por 2 horas en una solución al 1% v/v de 3-

aminopropiltrimetoxisilano en etanol [18] y, por último, fueron enjuagadas con etanol absoluto y PBS.

### 1.3.2 Ángulo de contacto

Para evaluar el grado de hidrofobicidad de las superficies de sílica logrado con la modificación con diclorodimetilsilano se midió el ángulo de contacto. Éste se define como el ángulo formado entre una gota de un líquido (generalmente agua) sobre un sustrato sólido. Aquellos sustratos hidrofílicos poseen ángulos de contacto cercanos a  $0^\circ$ , mientras que los hidrofóbicos tienen valores cercanos a  $90^\circ$ . Las determinaciones se realizaron por el método de la gota estática, que consiste en depositar una gota de agua sobre la superficie y dejar evolucionar la misma hasta que alcanza el equilibrio con la superficie en unos pocos segundos. Las superficies fueron secadas con  $N_2$  y se midió el ángulo de contacto de una gota de  $5 \mu\text{l}$  de agua deionizada depositada sobre la sílica. Para ello, se empleó un goniómetro de ángulo de contacto GBX Instrumentation Scientific acoplado a una cámara Nikon-PixeLINK. Los datos fueron procesados con los softwares “Amcap”, “Spanishdub” e “Image J” [19] con su complemento “Low Bond Axisymmetric Drop Shape Analysis” (LBADSA), que es un método de análisis de la forma de las gotas axisimétricas para gotas que están sólo bajo la fuerza de gravedad en un sustrato horizontal [20]. Las incertezas se expresaron con el intervalo de confianza del 95%.

### 1.3.3 Preparación de soluciones de proteínas

Se prepararon soluciones frescas de ALB o de FBG en PBS, previo a cada experimento. Al preparar las soluciones se tuvo especial cuidado en evitar la formación de espuma. Para la preparación de las soluciones de ALB, el sólido se esparció sobre la solución de PBS y se esperó por al menos una hora que se disuelva lentamente antes de enrasar. Para obtener las soluciones de FBG, también el sólido se esparció sobre la solución de PBS, pero la solución se sometió a calentamiento a 37 °C y agitación suave durante un par de horas para favorecer su disolución. Posteriormente, la suspensión de FBG se pasó a través de un filtro de 0,45 µm para eliminar los agregados, y se determinó la concentración de FBG mediante el método de Bradford. Este método ampliamente utilizado para la determinación de la concentración de proteínas, involucra la unión del azul de Coomassie G-250 a las proteínas en medio ácido. Este complejo es causante de un corrimiento en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm [21]. Para aumentar la exactitud y mejorar la sensibilidad del método de Bradford, no sólo se analizó la absorbancia del complejo formado, sino que se analizó la relación de absorbancias a 595 nm sobre 465 nm, la cual es estrictamente lineal con la concentración de proteína [22]. El reactivo de Bradford se preparó fresco previo a cada experimento según lo detallado en la Tabla 1.2 [21]. Luego, se pasó a través de un filtro de 0,45 µm para eliminar la fracción no solubilizada y se

**Tabla 1.2** Reactivo de Bradford

Compuesto	Concentración (%p/v)
Azul de Coomassie G-250	0,01
Etanol	4,70
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	8,50

guardó en oscuridad. Para la curva de calibración se utilizó ALB como estándar. Para ello, se prepararon seis concentraciones de ALB que variaron de 0,05 a 0,50 mg/ml de proteína en PBS a pH 7,3, con una concentración de 2-20 µg/ml en el volumen final por dilución con el reactivo [21].

### **1.3.4 Espectroscopía UV-Visible**

Los espectros UV-Visible de las soluciones de FBG luego de filtrar, se realizaron empleando un espectrofotómetro Shimadzu en el intervalo de longitudes de onda de 300-700 nm en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Como fue mencionado anteriormente, se analizó la relación de absorbancias a 590 nm sobre 450 nm, pertenecientes a la máxima absorción de cada forma del azul de Coomassie.

### **1.3.5 Reflectometría**

Para evaluar la cinética de adsorción-desorción de proteínas se utilizó la Reflectometría, ya que la misma permite medir la cantidad adsorbida sobre una superficie sólida reflejante en función del tiempo. Esta técnica óptica fue desarrollada a finales de los '80 en los Países Bajos por los laboratorios AKZO Nobel [23].

En la Figura 1.1 se muestra un esquema del reflectómetro. Un haz de luz linealmente polarizada incide sobre una superficie y se refleja. El haz reflejado se separa en sus componentes paralela y perpendicular (con respecto al plano de incidencia) cuyas intensidades se miden continuamente mediante un dispositivo electrónico. Las moléculas de proteína fluyen hacia la celda donde se encuentra la superficie. Cuando las moléculas se adsorben sobre la superficie, cambia la relación entre las intensidades de las componentes del

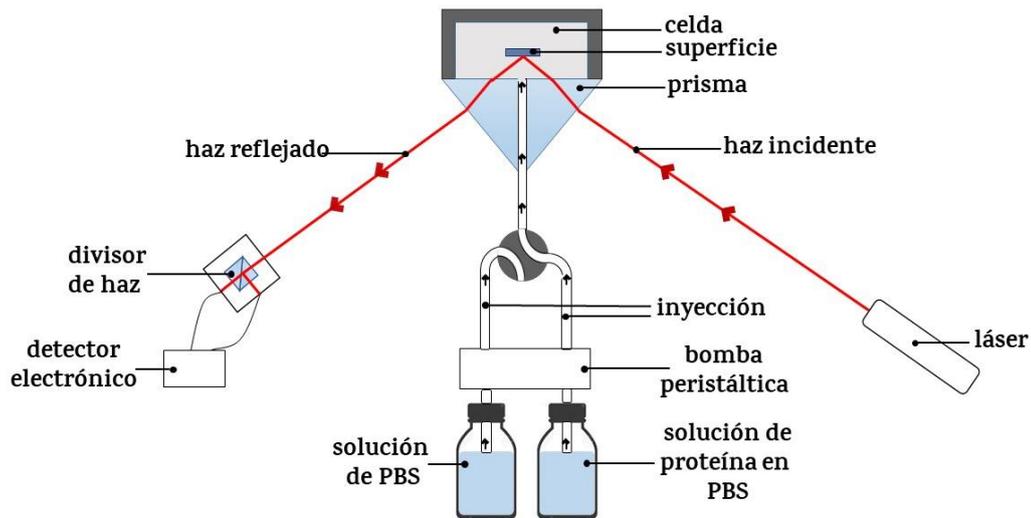


Figura 1.1 Esquema del reflectómetro

haz. De esta forma, es posible calcular la cantidad adsorbida utilizando un modelo óptico adecuado para la superficie. Este cambio puede medirse para macromoléculas, ya que ellas modifican sustancialmente el índice de refracción o espesor de la película adsorbida. Por ello, esta técnica ha sido empleada para estudiar la adsorción de proteínas [24–28], polímeros [8,29,30], surfactantes [31–33] y oligo-desoxirribonucleótidos [34] sobre superficies sólidas.

La señal medida a través de la Reflectometría no se ve afectada por el perfil de concentración de la película adsorbida, lo que podría considerarse una desventaja respecto de la Elipsometría. Sin embargo, la Reflectometría presenta como ventajas que es una técnica mucho más simple, económica y permite determinar la cantidad adsorbida de manera continua en escalas de tiempo cortas. La resolución en el tiempo está determinada por la respuesta en el tiempo de los detectores del haz de luz y de los procesadores electrónicos de la señal, y resulta por debajo de 1 s. Por esta razón, esta técnica es apta para estudiar la cinética de adsorción pudiendo determinar la cantidad adsorbida en una escala de tiempo de segundos a minutos. En particular, el transporte de una macromolécula desde el seno de la solución a la superficie ocurre en

estas escalas de tiempo, lo que permite el uso de esta técnica en el estudio de procesos que ocurren a escalas de tiempo tan cortas [2].

La alta sensibilidad de esta técnica está dada por el empleo de sustratos reflejantes que están cubiertos con una delgada película de un material de índice de refracción diferente al del sustrato y al medio acuoso. Ópticamente, esta película actúa como un espaciador, causando un corrimiento de fase favorable en el haz reflejado, lo que otorga mayor sensibilidad, para esto, el espesor óptimo de la película es de aproximadamente 20-200 nm. El sustrato más empleado es el silicio, ya que es muy versátil, está disponible comercialmente como sustratos altamente pulidos, y sobre el mismo se pueden depositar diferentes adsorbatos. Para alcanzar la sensibilidad adecuada sobre el sustrato de silicio, se deposita frecuentemente una película de sílica, de aproximadamente 100 nm. Sin embargo, se ha reportado en la bibliografía el empleo de otras películas sobre el sustrato de silicio, como poliestireno [35], celulosa [30,36], óxido de titanio [31,37,38], nanotubos de carbono [24] y óxido de indio y estaño [39,40]. Además, sobre la película formada de sílica se pueden modificar las propiedades químicas superficiales relativas a su hidrofobicidad y carga, o a la incorporación de grupos funcionales mediante la adsorción de películas de polímeros [41,42], polielectrolitos [27,43] o por la formación de monocapas autoensambladas [14,44]. En este sentido, la reflectometría constituye una técnica sumamente versátil para el estudio de la adsorción de macromoléculas sobre una amplia variedad de superficies.

La señal (S) medida por el reflectómetro se define como:

$$S = \frac{I_p}{I_s} = f \cdot \frac{R_p}{R_s} = f \cdot R \quad (1)$$

donde  $I_p$  e  $I_s$  son las intensidades de las componentes paralela y perpendicular de la luz reflejada, respectivamente,  $f$  es una constante del equipo y  $R_p$  y  $R_s$  son

las reflectancias teóricas de la superficie para las componentes paralela y perpendicular, respectivamente. Cuando una solución de electrolito o reguladora de pH fluye a través de la celda,  $S$  es constante con el tiempo ( $S_0$ ) y durante la adsorción la señal cambia en  $\Delta S$  ( $S-S_0$ ). En las condiciones adecuadas [2],  $\Delta S/S_0$  es proporcional a la cantidad adsorbida ( $\Gamma$ ) a través del factor de sensibilidad  $Q$ :

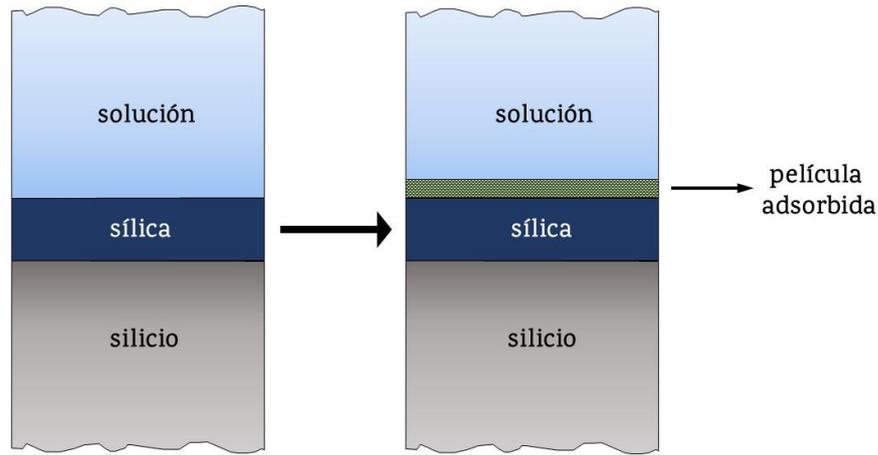
$$\Gamma = \frac{\Delta S}{S_0} \cdot Q \quad (2)$$

La ecuación (1) muestra que la señal del reflectómetro  $S$  es proporcional al valor de  $R$  teórico. En consecuencia,

$$\frac{\Delta S}{S_0} = \frac{\Delta R}{R_0} \quad (3)$$

De manera tal que el valor del factor  $Q$  se calcula utilizando un modelo óptico de la superficie. Los valores de  $R_p$  y  $R_s$  se calculan aplicando el formalismo de Abeles, tal como fue descrito por W.N. Hansen [45]. El modelo óptico de la superficie para el cálculo de  $R$  supone un sistema compuesto por varias películas homogéneas, cada una de las cuales está caracterizada por su espesor ( $d$ ), índice de refracción ( $n$ ) y coeficiente de extinción ( $k$ ). La Figura 1.2 muestra un esquema del modelo óptico empleado. El sustrato está compuesto por una película semi-infinita de silicio, seguida de una película de sílica del orden de 100 nm de espesor, y finalmente de la solución acuosa (silicio/sílica/solución). A partir de la adsorción, es necesario considerar una nueva película entre la de sílica y la solución acuosa formada por las moléculas adsorbidas (silicio/sílica/adsorbato/solución).

Para calcular los valores de  $\Delta R$  y  $R_0$  es necesario conocer los valores de  $n$  y  $k$  de todas las películas, y los valores de  $d$  de la película de sílica y de la película adsorbida. Generalmente, estos valores son conocidos, pero es



**Figura 1.2** Esquema del modelo óptico de las superficies silicio/sílica/solución y silicio/sílica/adsorbato/solución.

necesario realizar una estimación del valor del índice de refracción y del espesor de la película adsorbida. El índice de refracción de la película adsorbida,  $n_a$ , está relacionado a la  $\Gamma$  por:

$$n_a = n_s + \frac{\Gamma}{d_a} \left( \frac{dn}{dc} \right) \quad (4)$$

Donde  $n_s$  es el índice de refracción de la solución y  $dn/dc$  es el incremento en el índice de refracción del material adsorbente en solución con la concentración. La relación  $\Gamma/d_a$  se refiere a la concentración de la película adsorbida, donde  $d_a$  es el espesor de la película adsorbida. Los valores de  $\Gamma$  y  $d_a$  se estiman a partir de la conformación de las moléculas en la película adsorbida. El factor  $Q$  es independiente de pequeñas variaciones en estos parámetros, si se cumple que  $(n_a - n_s)d_a$  es constante. Con estos parámetros se calcula  $R_0$  y  $\Delta R$  utilizando el programa "Reflec" [46] y el factor  $Q$  se obtiene a partir de:

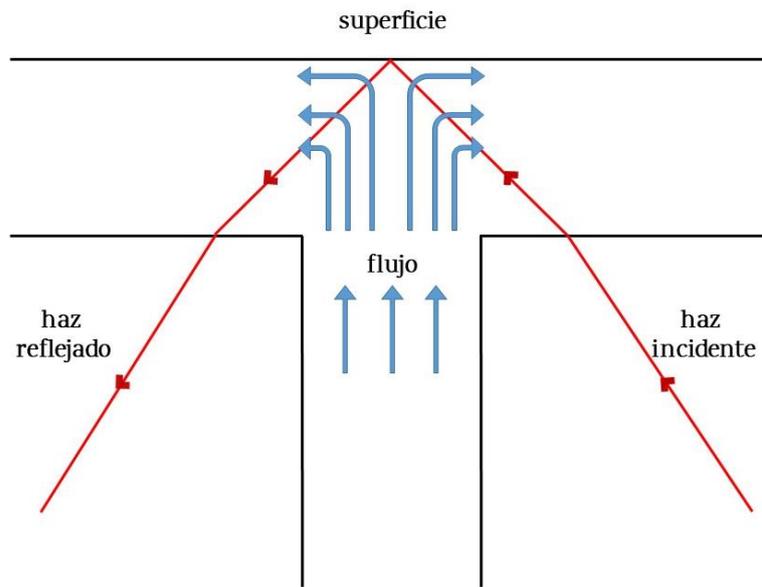
$$Q = \Gamma \cdot \frac{R_0}{\Delta R} \quad (5)$$

Para la adsorción de FBG deben considerarse las diferentes orientaciones posibles de la molécula de proteína al adsorberse, ya sea por la parte lateral o por la parte terminal [47]. Por lo tanto, para FBG se consideraron dos posibles espesores de la película adsorbida. De esta manera, para la adsorción de ALB o FBG sobre superficies de sílica, todos los valores de  $k$  son nulos (dada la longitud de onda del láser utilizado: 632,8 nm) y los valores del índice de refracción son 3,80 (silicio), 1,46 (sílica), 1,48 (película adsorbida de ALB), 1,39 (película adsorbida de FBG) y 1,33 (solución). Los espesores son 100 nm (sílica), 5 nm (película adsorbida de ALB, [48]), y 7 nm/40 nm (película adsorbida de FBG con orientación molecular lateral o terminal, respectivamente [49,50]). El  $dn/dc$  es de 0,18 cm<sup>3</sup>/g [48,51]. Con estos parámetros, el valor del factor  $Q$  calculado es de 38 mg/m<sup>2</sup> para ALB y de 32 mg/m<sup>2</sup> para FBG. Cabe destacar que la diferencia en el espesor de la película de FBG proporciona solo una desviación del 3% en el cálculo del factor  $Q$ .

El reflectómetro cuenta con una celda de flujo de punto estancado descrita por Dijt [52] y esquematizada en la Figura 1.3. El flujo en este punto resulta en un espesor constante de la película de difusión y, por lo tanto, el flujo de las moléculas de proteína hacia la superficie es proporcional a su concentración en solución. Las condiciones hidrodinámicas del flujo en el punto estancado fueron descritas por Dabros y van de Ven [53], las cuales permiten calcular la velocidad de transporte de las moléculas de proteína a la superficie,  $v_{tr}$ , mediante la siguiente ecuación:

$$v_{tr} = 0,53(D^2 \cdot \alpha \cdot v_f \cdot r^{-4})^{1/3} C_p = k_{tr} \cdot C_p \quad (6)$$

donde  $D$  es el coeficiente de difusión de la proteína (m<sup>2</sup>/s),  $\alpha$  un parámetro de intensidad de flujo adimensional que es constante para una dada geometría de celda y velocidad de flujo, y tiene un valor de 3,5 (para las condiciones



**Figura 1.3** Esquema de la celda de flujo de punto estancado del reflectómetro

---

experimentales utilizadas en este trabajo),  $v_f$  es la velocidad de flujo ( $\text{m}^3/\text{s}$ ) de las moléculas controlada por una bomba peristáltica (ver Figura 1.1),  $r$  es el radio del tubo por el cual la solución entra a la celda ( $9 \times 10^{-4} \text{ m}$ ) y  $C_p$  la concentración de proteína ( $\text{g}/\text{m}^3$ ). Por lo tanto, para una dada celda, el flujo de las moléculas hacia la superficie es igual a la concentración multiplicada por la constante de transporte ( $k_{tr}$ ). Los valores de  $k_{tr}$  fueron calculados a partir de un coeficiente de difusión de  $6,0 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  para ALB [24] y de  $1,9 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  para FBG [54–56], y se resumen en la Tabla 1.3. El empleo de esta celda de flujo permite entonces, comparar la velocidad de transporte calculada a partir de una dada concentración y velocidad de flujo, con la velocidad inicial de adsorción experimental o calculada a partir de un modelo de adsorción adecuado, para conocer cuál es la etapa determinante del proceso de adsorción.

Tabla 1.3 Valores calculados de la  $k_{tr}$ 

		$k_{tr}$ (m/s)	
		ALB	FBG
$v_f$ (ml/s)	0,02	$3,85 \times 10^{-6}$	$1,79 \times 10^{-6}$
	0,10	$6,59 \times 10^{-6}$	$3,06 \times 10^{-6}$

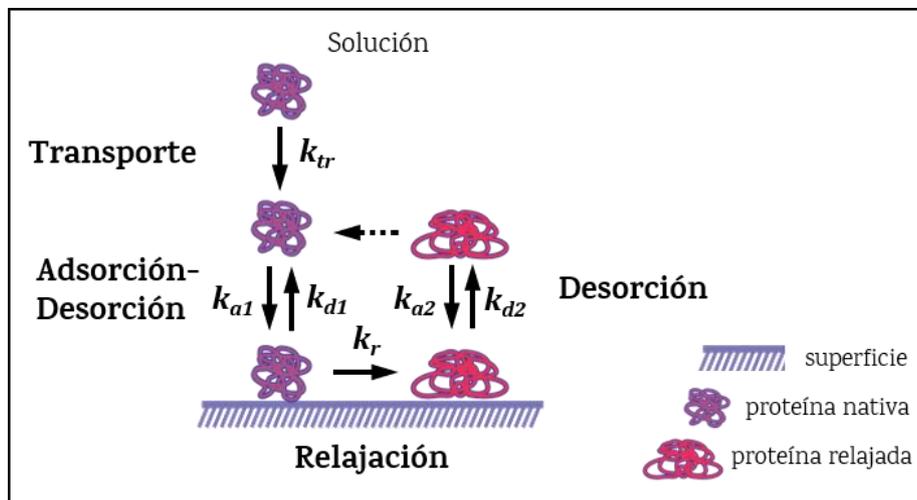
Para los experimentos de cinética de adsorción, se utilizó PBS como medio de ambas soluciones de proteínas, para ALB a pH 4,8 y pH 7,3, y para FBG a pH 7,3. Para cada curva de cinética de adsorción, se realizó una línea de base tras fluir PBS hacia la celda durante los primeros 200 s. Luego, se hizo circular soluciones de ALB o de FBG en PBS hacia la celda durante una cierta cantidad de tiempo y se registró  $\Delta S$  (ecuaciones 2-5) y, en consecuencia, la cantidad adsorbida en función del tiempo. El tiempo de adsorción fue definido como el tiempo durante el cual estuvieron en contacto la superficie con la solución de proteína. Para la adsorción de ALB los tiempos de adsorción que se dispusieron fueron de 50, 175 o 300 s, mientras que, para FBG fueron de 10, 20, 50 o 300 s, y tiempos más largos del orden de 2000 s para alcanzar el estado estacionario y, evaluar así, la cantidad adsorbida de saturación. Posteriormente, se volvió a hacer circular PBS por la celda por aproximadamente 300 s para estudiar la desorción frente al lavado. Además, sólo para una condición particular de adsorción de FBG en la cual no se evidenció desorción, se utilizó un tiempo de residencia adicional. Con este propósito, luego de la adsorción de FBG por el tiempo de adsorción apropiado, las superficies se retiraron de la celda del reflectómetro y se sumergieron en una solución de PBS por 2400 s.

Con la metodología descrita, se construye cada curva de cinética de adsorción-desorción a partir de la cual se puede obtener: la velocidad inicial de

adsorción ( $v_i$ ) a través de la pendiente de la curva en los primeros segundos, la cantidad adsorbida para ese tiempo de adsorción y, cuando corresponda, el porcentaje de desorción por dilución con PBS respecto a la  $\Gamma$  alcanzada.

### 1.3.5.1 Modelo del proceso de adsorción-desorción de proteínas

El proceso global de adsorción-desorción de proteínas comprende una serie de etapas, tal como fue presentado previamente en la Figura 2 de la Introducción general. Estas etapas son esquematizadas con mayor detalle en la Figura 1.4, incluyendo las constantes de velocidad asociadas a cada etapa del proceso. Las velocidades relativas de cada una de esas etapas determinan la cantidad adsorbida resultante y la conformación de las moléculas de proteína adsorbidas. Inicialmente, se encuentra el transporte de la molécula de proteína desde el seno de la solución hacia la zona próxima a la superficie.



**Figura 1.4** Esquema de las distintas etapas (transporte, adsorción, relajación y desorción) del proceso global de adsorción física de proteínas.  $k_{tr}$ : constante de transporte.  $k_{a1}$ : constante de adsorción en el estado nativo.  $k_{d1}$ : constante de desorción en el estado nativo.  $k_r$ : constante de relajación.  $k_{a2}$ : constante de adsorción en el estado relajado.  $k_{d2}$ : constante de desorción en el estado relajado.

---

Luego, en base a la forma más clásica de tratar el proceso de adsorción (modelo de Langmuir [57]), las proteínas interactúan sólo con la superficie a través del equilibrio de adsorción-desorción [58,59]. La  $v_i$  está determinada por la etapa de transporte ( $v_{tr}$ ) o por la interacción proteína-superficie (velocidad de cubrimiento superficial,  $v_c$ ). En el primer caso, para los experimentos realizados por Reflectometría, la etapa determinante de  $v_i$ , está dada por la ecuación (6). Para el segundo caso, si los valores de  $v_i$  son menores a  $v_{tr}$ , entonces la etapa determinante del proceso de adsorción es la interacción proteína-superficie; es decir el cubrimiento superficial. Por otra parte, a partir de la adsorción, las moléculas pueden optimizar la interacción con la superficie mediante un proceso de relajación. Este proceso ocasiona, en la mayoría de los casos, cambios estructurales en las moléculas de proteína adsorbidas, ya que implica un aumento en el área de contacto entre los grupos funcionales de la proteína y los sitios superficiales [16,60,61]. El grado de relajación de las moléculas adsorbidas depende de la relación entre la  $v_c$  y la velocidad de relajación ( $v_r$ ), ya que es necesario que las proteínas adsorbidas tengan tiempo y espacio para optimizar su interacción con la superficie. Además, las proteínas adsorbidas pueden experimentar desorción desde la superficie, tanto en su estado nativo, como en su estado relajado. Sin embargo, la desorción depende del grado de relajación, ya que una fuerte interacción proteína-superficie, causada por la etapa de optimización [58,59], produce en general, una baja o nula desorción. Luego de la desorción de la molécula de proteína en el estado relajado, la misma puede o no retornar al estado nativo, como así también volver a adsorberse sobre la superficie [58,60].

Se han informado en la bibliografía diversos modelos para interpretar los resultados experimentales de las cinéticas de adsorción-desorción [62–68]. En todos los casos, se utilizan suposiciones que implican hacer más sencillo el

esquema de la Figura 1.4. En particular, el modelo reportado por Snopok y Kostyukevich [69] considera un proceso de adsorción suponiendo que la desorción tanto de moléculas de proteína nativa como relajadas es despreciable, aspecto que permite resolver las ecuaciones cinéticas analíticamente. Aquellos modelos más complejos pueden ser resueltos numéricamente. El modelo de Snopok y Kostyukevich además considera que las moléculas de proteína adsorbidas se pueden relajar sobre la superficie, si disponen de sitios libres superficiales. De esta forma, las moléculas adsorbidas pueden encontrarse en dos estados: nativo o relajado (es decir, no considera estados intermedios). El modelado de los perfiles cinéticos fue realizado en colaboración con el Dr. Sergio Dassie (INFIQC-Dpto. de Fisicoquímica, FCQ-UNC).

La señal medida por Reflectometría puede ser correlacionada con el cambio en la unidad de masa adsorbida sobre un área superficial mediante la siguiente ecuación:

$$\Gamma = \frac{\Delta m_T}{S_T} = \frac{\Delta R}{R_o} \cdot Q \quad (7)$$

donde  $m_T$  es la masa total adsorbida y  $S_T$  es la superficie ocupada total.

Si el número de moléculas de proteína adsorbidas que mantienen su estructura nativa es  $n_N$  y el número de moléculas de proteína adsorbidas que se encuentran en el estado relajado es  $n_R$ , entonces el cambio de masa puede calcularse como:

$$\Delta m_T = m_p \cdot n_N + m_p \cdot n_R = m_p (n_N + n_R) \quad (8)$$

donde  $m_p$  es el peso molecular de la proteína.

Teniendo en cuenta que la cantidad de proteína adsorbida en los dos estados se determina por una comparación entre sus áreas, resulta

conveniente reescribir la ecuación (8) en función del grado de cubrimiento superficial de las proteínas en el estado nativo o relajado  $\theta_N$  y  $\theta_R$ , respectivamente ( $0 \leq \theta \leq 1$ ). Para ello, se define  $\theta_N$  y  $\theta_R$  en función del número de moléculas de proteína adsorbidas, la superficie ocupada por las proteínas en el estado nativo,  $S_N$ , y en el estado relajado,  $S_R$  y la superficie ocupada total,  $S_T$ :

$$\theta_N = \frac{n_N \cdot S_N}{S_T} \quad (9)$$

$$\theta_R = \frac{n_R \cdot S_R}{S_T} \quad (10)$$

Así, el cambio en la masa adsorbida (ecuación 8) puede ser reescrito de la siguiente manera:

$$\Delta m_T = \frac{m_p \cdot S_T}{S_N} \left( \theta_N + \frac{\theta_R}{\xi} \right) \quad (11)$$

donde  $\xi = S_R/S_N$ , ( $\xi \geq 1$ ) y corresponde a la relación entre las áreas de las moléculas adsorbidas en los dos estados. Así, se puede obtener la  $\Gamma$  (ecuación 7) de la siguiente forma:

$$\Gamma = \frac{\Delta m_T}{S_T} = \frac{m_p}{S_N} \left( \theta_N + \frac{\theta_R}{\xi} \right) \quad (12)$$

donde  $m_p$  y  $S_N$  son constantes y, en consecuencia, la  $\Gamma$  dependerá del grado de cubrimiento y de la relación entre las áreas de las moléculas de proteína en ambos estados. Por lo tanto, para obtener la  $\Gamma$  se debe conocer la evolución temporal del grado de cubrimiento de cada estado adsorbido: nativo y relajado. Las ecuaciones cinéticas que describen la evolución en el tiempo de  $\theta_N$  y  $\theta_R$  puede plantearse del modo siguiente:

$$\begin{cases} \frac{d\theta_N}{dt} = k_a (1 - \theta_N - \theta_R) C_p - k_r (1 - \theta_N - \theta_R) \theta_N \\ \frac{d\theta_R}{dt} = k_r (1 - \theta_N - \theta_R) \theta_N \end{cases} \quad (13)$$

La velocidad de adsorción o cubrimiento superficial está caracterizada por la constante de velocidad  $k_a$  y depende tanto de  $C_p$  como de los sitios superficiales libres ( $1 - \theta_N - \theta_R$ ). A su vez, las proteínas nativas adsorbidas pueden experimentar la relajación sobre la superficie, asociada a la constante  $k_r$ , al cubrimiento superficial de proteínas nativas ( $\theta_N$ ) y a la disponibilidad de área superficial. Estas ecuaciones cinéticas pueden resolverse analíticamente [69] o numéricamente (por ejemplo, por el método Runge-Kutta [70]), considerando las siguientes condiciones de contorno:

- ❧ Al tiempo inicial del experimento,  $\theta_N(0)$  y  $\theta_R(0)$  son iguales a cero.
- ❧ Para cualquier tiempo, el cubrimiento total de la superficie,  $\theta_T(t)$ , está determinado por  $\theta_N(t) + \theta_R(t)$ .

De acuerdo a la solución analítica propuesta por Snopok y Kostyukevich [69] para el sistema de ecuaciones diferenciales (ecuación 13):

$$\theta_N(t) = \gamma \left\{ 1 - \exp \left[ \frac{1}{\gamma} \exp(-k_a C_p t) \right] - \frac{1}{\gamma} \right\} \quad (14)$$

$$\theta_R(t) = 1 - \exp[-k_a C_p t] - \gamma \left\{ 1 - \exp \left[ \frac{1}{\gamma} \exp(-k_a C_p t) \right] - \frac{1}{\gamma} \right\} \quad (15)$$

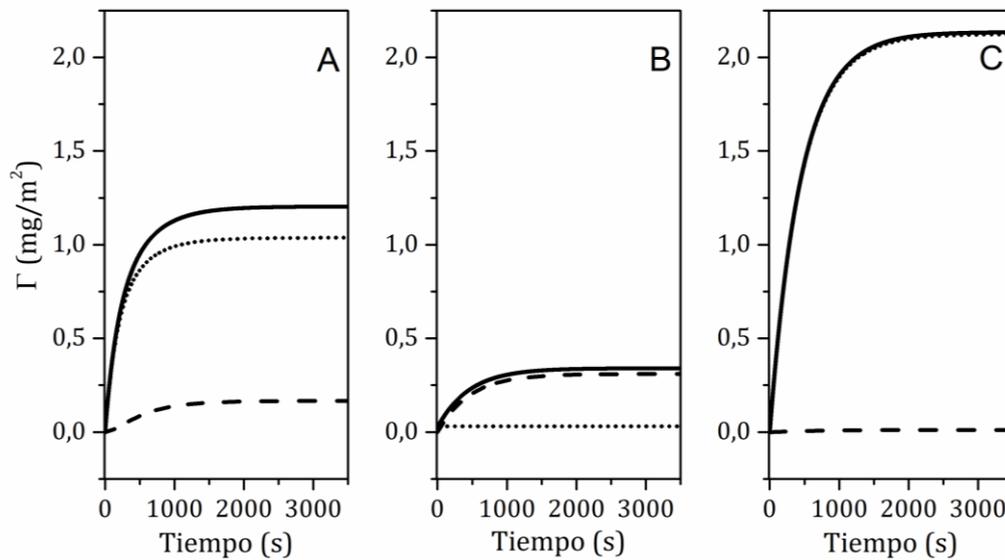
donde  $\gamma = k_a C_p (k_r)^{-1}$ . Según la ecuación (12), la  $\Gamma$  se puede calcular a partir de la evolución temporal de la fracción superficial cubierta por proteínas en el estado nativo o relajado ( $\theta_N$  y  $\theta_R$ ). De esta forma, es posible conocer la contribución de  $\Gamma$  de proteínas nativas ( $\Gamma_N$ ) y relajadas ( $\Gamma_R$ ) al valor de  $\Gamma$ :

$$\Gamma_N(t) = \left( \frac{m_p}{S_N} \right) \theta_N(t) \quad (16)$$

$$\Gamma_R(t) = \left( \frac{m_p}{S_R} \right) \theta_R(t) \quad (17)$$

En general, cuando las moléculas de proteína se relajan, aumenta la superficie ocupada [16,60,61], es decir  $S_R > S_N$ . Para comprender como afecta la relación entre  $v_c$  y  $v_r$  sobre la evolución de  $\Gamma$  con el tiempo, se simulieron distintas situaciones, tal como lo muestra la Figura 1.5 para  $\Gamma$  en función del

tiempo con sus respectivas contribuciones,  $\Gamma_N$  y  $\Gamma_R$ . La figura presenta las curvas de cinética de adsorción a la misma  $C_p$  para tres condiciones:  $k_a C_p = k_r$ ,  $k_a C_p < k_r$  y  $k_a C_p > k_r$ . Estas simulaciones muestran el fuerte impacto que tiene la relación entre  $v_c$  y  $v_r$  no sólo en el perfil cinético, sino también en la cantidad adsorbida en estado estacionario. Este comportamiento, es propio de macromoléculas en general y de proteínas en particular, para las cuales el proceso de relajación implica un aumento en el área de contacto. Es decir, el proceso de relajación de las proteínas adsorbidas ocasiona un aumento en el área de contacto proteína-superficie y disminuye la posibilidad de que nuevas moléculas de proteína encuentren un sitio disponible para adsorberse. En términos generales, si la adsorción ocurre más rápidamente que la relajación, las moléculas adsorbidas conservan la estructura tridimensional que presentan en solución (ver Figura 1.4, “proteína nativa”). Por otra parte, cuando



**Figura 1.5**  $\Gamma$  en función del tiempo ( $\xi=7$ ),  $\Gamma$  total (trazo continuo),  $\Gamma_N$  (trazo punteado) y  $\Gamma_R$  (trazo rayado), con diferentes relaciones entre velocidad de cubrimiento y relajación:  $k_a C_p = 4.10^{-3} \text{ mg/m}^2\text{s}$ ,  $k_r = 4.10^{-3} \text{ mg/m}^2\text{s}$  (A),  $k_a C_p = 4.10^{-3} \text{ mg/m}^2\text{s}$ ,  $k_r = 4.10^{-1} \text{ mg/m}^2\text{s}$  (B),  $k_a C_p = 4.10^{-3} \text{ mg/m}^2\text{s}$ ,  $k_r = 4.10^{-4} \text{ mg/m}^2\text{s}$  (C).

la relajación es más rápida o del mismo orden que la adsorción, las moléculas tienen tiempo y espacio para optimizar la interacción proteína-superficie, lo que causa rearrreglos estructurales (ver Figura 1.4, “proteína relajada”). Además, el tipo de proteína (nativa o relajada) sobre la superficie cambia drásticamente según se modifica la relación entre  $v_c$  y  $v_r$ ; desde una situación en la cual predominan moléculas nativas hasta la presencia mayoritaria de proteínas relajadas.

Dado que el proceso de adsorción-desorción de ALB ha sido extensamente estudiado [24,48,63,71-73], tanto experimentalmente como utilizando modelos, en este trabajo de Tesis Doctoral se realizará un análisis cualitativo de este modelo sencillo en combinación con un diseño factorial de experimentos. Por otro lado, la adsorción-desorción de FBG ha sido mucho menos explorada. Por lo tanto, los perfiles cinéticos del proceso de adsorción-desorción obtenidos por Reflectometría para esta proteína, se ajustaron utilizando la ecuación (12), mediante el ajuste de los cuatro parámetros,  $k_a$ ,  $k_r$ ,  $\xi$  y  $m_p/S_N$ .

### **1.3.5.2 Estudio del proceso de adsorción-desorción de ALB utilizando un diseño factorial de experimentos**

Para estudiar el proceso de adsorción-desorción de ALB sobre las superficies de sílica se planteó un diseño factorial de experimentos, en colaboración con la Dra. Valeria Pfaffen (INFIQC-Dpto. de Físicoquímica, FCQ-UNC), lo que permite evaluar simultáneamente el efecto de los distintos factores en el proceso con un número acotado de experimentos. El objetivo de este diseño fue optimizar las condiciones experimentales del proceso de adsorción de ALB que minimizan la adhesión bacteriana.

---

En un diseño experimental, se puede definir a un factor como la variable independiente o controlable por el experimentador. Cada factor puede tener dos o más niveles (valores que puede tomar el factor). La variable de interés sobre la cual se busca estudiar el efecto que ejercen los factores, o variable dependiente, se denomina variable de respuesta [74, 75].

Los factores estudiados con sus correspondientes niveles, así como las respuestas evaluadas, fueron elegidos en base a los trabajos previos en este sistema [24,59,71,76,77], y se resumen en la Tabla 1.4. De esta forma, se estudió el pH como factor con el fin de evaluar el efecto de las interacciones electrostáticas en el proceso de adsorción-desorción. Además, fueron seleccionados los factores  $v_f$  y  $C_p$  para variar la velocidad con que las moléculas de proteína arriban a la superficie y los sitios disponibles para la adsorción y la relajación (ver Figura 1.4). Además, combinando estos dos factores con el tiempo de adsorción se podrá determinar el efecto del transporte en el proceso de adsorción, y la relación entre los procesos de adsorción y de relajación. La elección de los niveles de cada factor se realizó en base a trabajos previos [24,59,71,76,77], a la sensibilidad del reflectómetro, y principalmente con el objeto de cubrir un amplio intervalo de cada uno de los factores. Todos ellos están relacionados con la cinética del proceso de adsorción-desorción, las interacciones proteína-superficie, la cantidad adsorbida resultante y el estado final de las moléculas de proteína adsorbida.

Los factores evaluados dependen de la hidrofiliidad de los sustratos. Así, para superficies de sílica hidrofílicas (sin modificación química previa) los factores evaluados fueron pH,  $v_f$ ,  $C_p$  y tiempo de adsorción. Se estudiaron dos niveles para cada factor, para el pH se eligió el valor de 4,8 que es el punto isoelectrico de la ALB [24,78] y de 7,3 que es el pH fisiológico de la sangre; para la  $v_f$  se escogieron los niveles 0,02 ml/s y 0,10 ml/s; para la  $C_p$  se seleccionó

**Tabla 1.4** Factores y variables de respuesta del diseño factorial de experimentos para la adsorción de ALB

Factores		Variables de respuesta		
		Velocidad inicial de adsorción ( $v_i$ )	Cantidad adsorbida ( $\Gamma$ )	Porcentaje de desorción
pH*		✓	✓	✓
4,8	7,3			
Velocidad de flujo ( $v_f$ )		✓	✓	✓
0,02 ml/s	0,10 ml/s			
Concentración de proteína ( $C_p$ )		✓	✓	✓
0,100 mg/ml	0,005 mg/ml			
Tiempo de adsorción		✗ <sup>♦</sup>	✓	✓
50 s	300 s			

(\* ) Para las superficies hidrofóbicas sólo fue estudiado el pH 7,3.

(♦ ) La  $v_i$  fue calculada a partir de los datos medidos previos a los 50 s de tiempo de adsorción. Por lo tanto, para esta respuesta no fue analizado el efecto del tiempo de adsorción.

0,100 y 0,005 mg/ml y para evaluar el tiempo de adsorción se utilizaron 50 y 300 s. Para las superficies de sílica hidrofóbicas (previamente tratadas con diclorodimetilsilano) los factores evaluados fueron los mismos, a excepción del pH que fue fijado a pH 7,3. En consecuencia, se empleó un diseño factorial  $2^4$  en el caso de superficies hidrofílicas, es decir con cuatro factores y dos niveles para cada factor, y un diseño  $2^3$  en el caso de superficies hidrofóbicas, es decir con tres factores y dos niveles para cada factor. Las variables de respuesta evaluadas fueron la  $v_i$ , la  $\Gamma$  y el porcentaje de desorción. Se incluyeron puntos centrales en el diseño para superficies hidrofílicas e hidrofóbicas para hacer

---

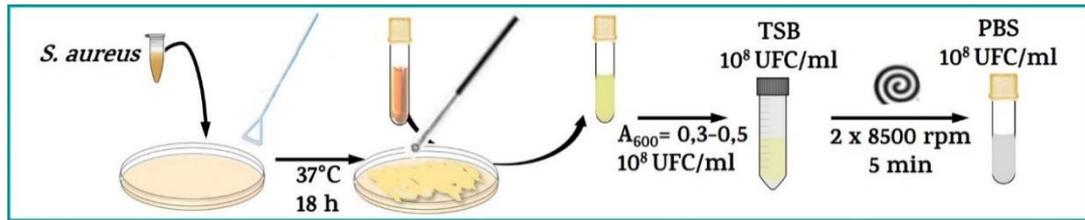
una estimación del error experimental y evaluar el ajuste a un modelo. Los valores de los factores para los puntos centrales fueron 0,0525 mg/ml de  $C_p$ , 0,06 ml/s de  $v_f$  y 175 s de tiempo de adsorción.

Se empleó el software “Statistica” para realizar la combinación aleatoria de los diferentes niveles en el diseño experimental y para encontrar cuales factores afectan significativamente a cada respuesta evaluada. Para este fin, se emplearon herramientas estadísticas muy utilizadas como el análisis de la varianza (ANOVA), los test de Fisher y de la t de Student. Se utilizó un nivel de significación de 0,05.

### 1.3.6 Preparación de la suspensión bacteriana

A continuación, se detalla el procedimiento que se empleó para preparar la suspensión de *S. aureus* para estudiar su adhesión sobre superficies de sílica con ALB o FBG adsorbidas previamente. Todos los procedimientos que involucren el manejo de bacterias fueron realizados en un área acondicionada bajo condiciones de esterilidad provistas por la proximidad a mecheros Bunsen.

La preparación de la suspensión bacteriana se esquematiza en la Figura 1.6. Para efectuar el cultivo del *S. aureus*, se realizó una siembra de una alícuota de un cultivo stock por diseminación en superficie, con una espátula de Drigalski estéril en una placa de Petri conteniendo el medio TSA. Se incubó en estufa a 37°C durante aproximadamente 18 h. Posteriormente, se colocaron 10,0 ml de TSB y se desprendieron suavemente las bacterias con un ansa estéril para ser suspendidas en este medio. Para alcanzar una concentración de bacterias del orden de  $10^8$  Unidades Formadoras de Colonias por mililitro



**Figura 1.6** Procedimiento experimental para la preparación de la suspensión bacteriana

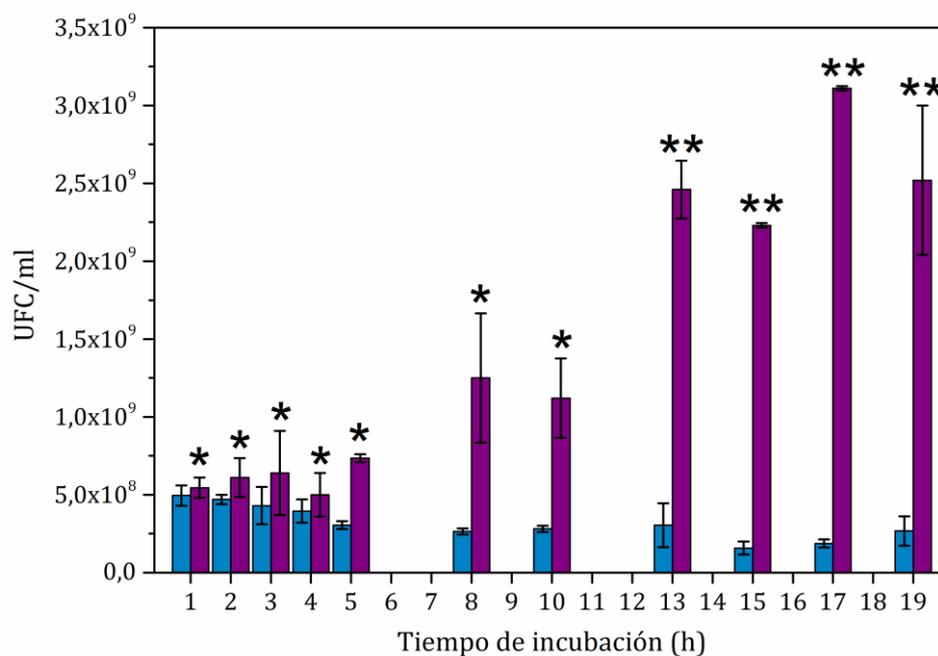
(UFC/ml) se ajustó la absorbancia de la suspensión bacteriana entre 0,3-0,5 a 600 nm con TSB [79–81]. Para ello, previamente se realizó una curva de calibración de la absorbancia obtenida a 600 nm para distintas concentraciones del inóculo bacteriano. Además, se controló la concentración del inóculo cada vez que se realizó un experimento, realizando diluciones seriadas de la suspensión de bacterias y posterior recuento en placa por diseminación en superficie. Para evitar la interferencia de los componentes del medio de cultivo en la ALB o el FBG adsorbidos previamente, la suspensión bacteriana se centrifugó y se re-suspendieron las bacterias en PBS [82]. El procedimiento consistió en dos ciclos de 8500 rpm por 5 min, y se realizó en una centrífuga Allegra 21 (Beckman Coulter).

### 1.3.7 Control de viabilidad en PBS

Para asegurar que las bacterias son viables en PBS se controló que en este medio sean capaces de crecer, reproducirse y mantener la concentración bacteriana del inóculo inicial (10<sup>8</sup> UFC/ml) en función del tiempo. A tal fin, se mantuvo a 37°C la suspensión bacteriana en PBS y se extrajeron alícuotas por duplicado a diferentes tiempos de incubación (0, 0,5, 1, 2, 3 y 6 h). Para cuantificar las bacterias viables, se realizaron las diluciones seriadas correspondientes y posterior recuento en placa.

Para una suspensión en PBS a pH 4,8, el inóculo resultó viable y capaz de mantener su concentración sólo durante 1 h de incubación. Mientras que, para las bacterias suspendidas en PBS a pH 7,3, se amplió el tiempo de incubación estudiado y se lo comparó con el crecimiento observado en el medio de cultivo líquido TSB.

La Figura 1.7 muestra las bacterias viables (UFC/ml) en función del tiempo de incubación de 1 a 19 h, en TSB y en PBS a pH 7,3. El análisis estadístico se realizó mediante el software “InfoStat” [83], con un ANOVA de una vía empleando un nivel de significación de 0,05. A partir del ANOVA para los datos en PBS a pH 7,3 se pudo concluir que no hay diferencias significativas en el conteo de bacterias viables en función del tiempo, es decir, la bacteria es capaz de mantener el inóculo del orden de  $10^8$  UFC/ml tras 19 h de incubación.



**Figura 1.7** Control de la viabilidad bacteriana en función del tiempo de incubación. Bacterias suspendidas en TSB (violeta) y en PBS a pH 7,3 (azul).

Las barras de error representan la desviación estándar de tres repeticiones. Condiciones con símbolo común no son significativamente diferentes.

Para los datos del control de viabilidad en TSB también se realizó un ANOVA, pero dado que este análisis indica que al menos una de las medias es diferente de las otras, además se realizó la prueba *a posteriori* de DGC, que indica cuáles son las medias que presentan diferencias significativas entre sí y cuáles no. En este caso, se encontraron diferencias a partir de las 13 h de incubación, donde comienza a aumentar el recuento bacteriano, el cual se mantiene hasta las 19 h de incubación. El comportamiento observado en la Figura 1.7 se explica considerando las fases del crecimiento bacteriano en cada medio. La suspensión bacteriana en PBS a pH 7,3 mantiene su viabilidad a través del tiempo, lo que es consistente con un modelo de crecimiento en fase estacionaria, donde las bacterias se adaptan al medio y la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes [84,85]. En cambio, en TSB se observa un comportamiento similar al inicio de la fase de crecimiento exponencial, ya que comienza a aumentar la población de células.

De esta forma, en PBS a pH 4,8 es posible evaluar la adhesión bacteriana inicial con un tiempo de incubación de 40 min sin comprometer la viabilidad celular. En PBS a pH 7,3, la adhesión bacteriana puede estudiarse hasta 19 h, ya sea a tiempos de incubación cortos para evaluar su etapa inicial, como a tiempos más largos para evaluar la formación del biofilm.

### **1.3.8 Evaluación de la capacidad de formar biofilm**

Se realizó el ensayo de la formación del biofilm en placas de microtitulación [86] para evaluar de forma cuantitativa si la cepa bacteriana de *S. aureus* es productora de biofilm tanto en TSB como en PBS a pH 7,3. Este método para el crecimiento y la cuantificación del biofilm se basa en la cuantificación por espectrofotometría de la cantidad del colorante cristal violeta unido a la matriz de sustancias poliméricas extracelulares del biofilm.

---

En primera instancia, se transfirieron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  del inóculo a los pocillos de una placa de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano estéril de distinta concentración ( $10^8$  y  $10^7$  UFC/ml) y en distinto medio (TSB o PBS a pH 7,3) y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por diferentes lapsos de tiempo (15 y 18 h) sin agitación (cultivo estático) [86,87]. Como control negativo (C-) se utilizó sólo el medio de cultivo TSB [88,89]. Luego, se descartaron las bacterias no adheridas por inversión, y se realizaron 3 lavados exhaustivos con agua deionizada estéril [86]. Se observaron membranas blanquecinas en el fondo de los pocillos correspondientes al biofilm formado por las bacterias adheridas, las cuales fueron teñidas con 125  $\mu\text{l}$  por pocillo de solución de cristal violeta al 0,06 % (p/v) [88]. Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, y se realizaron 3 lavados con agua deionizada estéril. Posteriormente, se invirtió la placa a  $45^\circ$  y se dejó secar sobre papel absorbente hasta el día siguiente [86]. Para solubilizar al cristal violeta se colocaron 125  $\mu\text{l}$  por pocillo de ácido acético al 30% (v/v) y se incubó a temperatura ambiente por 15 min [86]. Se transfirió el eluido a una nueva placa de 96 pocillos de fondo plano estéril y se midió la absorbancia a 595 nm [86,87,89] mediante un lector multimodo de microplaca (Biotek) perteneciente al CIQUIBIC-Dpto. de Química Biológica, FCQ-UNC. Cada condición experimental fue replicada en ocho pocillos.

Los valores obtenidos de absorbancia, así como las condiciones experimentales del ensayo de la formación del biofilm en placas de microtitulación, se resumen en la Tabla 1.5.

**Tabla 1.5** Condiciones experimentales y resultados del ensayo de la formación del biofilm en placas de microtitulación

	Medio								
	TSB		PBS pH 7,3		TSB		PBS pH 7,3		TSB (C-)
<b>Concentración (CFU/ml)</b>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	-						
<b>Tiempo de incubación (h)</b>	15	15	15	15	18	18	18	18	-
<b>Absorbancia a 595 nm</b>	4,1	5,9	0,31	0,13	4,5	4,2	0,5	0,14	0,060
<b>Desviación estándar</b>	0,3	1,3	0,08	0,03	0,8	0,9	0,1	0,04	0,002

El valor de corte que discriminó entre resultados positivos y negativos resultó en 0,066, y se estableció calculando tres desviaciones estándar por arriba de la media del control negativo. Por lo tanto, se considera un resultado positivo en la capacidad de formar biofilm cuando la medida de absorbancia de cada condición evaluada es mayor a 0,066 [88,90]. Los resultados para esta cepa de *S. aureus* en TSB son positivos para cada condición estudiada, ya sea al variar la concentración del inóculo o el tiempo de incubación. En cambio, en PBS a pH 7,3 los resultados son positivos, presentando diferencias según la concentración del inóculo. En este medio, las células bacterianas se encontrarían en etapas tempranas de la formación del biofilm. Esto puede explicarse porque la transición del estado planctónico al crecimiento en biofilm ocurre como consecuencia de cambios ambientales. Así, como respuesta ante una señal de estrés, las células planctónicas comenzarán la adhesión a una superficie, lo que conducirá a la formación de un biofilm que tiene una mayor capacidad para resistir los desafíos ambientales y permite la supervivencia bacteriana en condiciones adversas [84,91].

Este experimento demuestra que es posible evaluar el crecimiento en biofilm de esta cepa de *S. aureus* en TSB así como en PBS a pH 7,3. Para ello, fue elegido un tiempo de incubación de 18 h y una concentración del inóculo de  $10^7$  UFC/ml.

### 1.3.9 Diseño experimental para la adsorción de proteínas y la adhesión bacteriana

Para estudiar la relación entre el proceso de adsorción de ALB o de FBG sobre las superficies de sílica y la adhesión bacteriana, se planteó el diseño experimental esquematizado en la Figura 1.8 en cada una de sus etapas. Cada condición evaluada fue realizada por duplicado. En este diseño experimental, primero se obtuvo una suspensión bacteriana en TSB o PBS de determinada concentración como fue explicado en el apartado 1.3.6 “Preparación de la suspensión bacteriana” (Figura 1.6, Etapa 1).

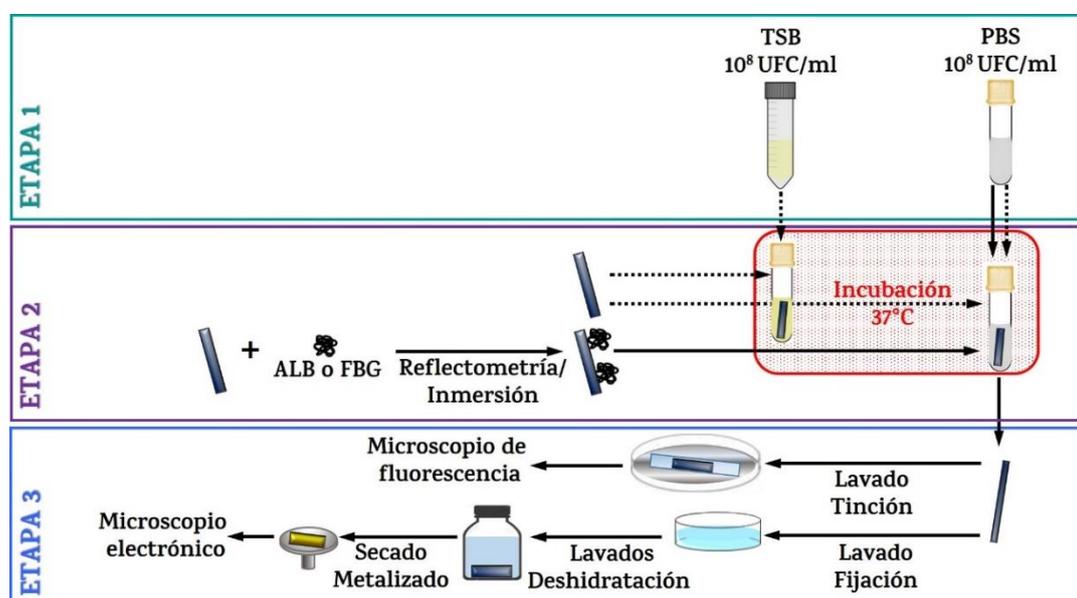


Figura 1.8 Diseño experimental para la adsorción de proteínas y la adhesión bacteriana

Posteriormente, en aquellos casos en los que se evalúa la formación del biofilm se ajustó la concentración del inóculo ( $10^7$  UFC/ml). Luego, se realizó la adsorción de ALB o FBG sobre las superficies de sílica en condiciones controladas (Reflectometría). En algunos casos, que serán explicitados en la presentación de los resultados correspondientes, la adsorción se realizó mediante la inmersión de las superficies en la solución de proteína. Inmediatamente fueron sumergidas verticalmente en la suspensión bacteriana en PBS preparada anteriormente, e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por un cierto tiempo de incubación (Etapa 2). En esta etapa, también se incluyen los controles que se realizaron con las superficies sin proteína adsorbida (flechas de línea punteada) que se incubaron tanto en la suspensión bacteriana en TSB como en PBS. Como se explicó anteriormente en el apartado 1.3.7 “Control de viabilidad en PBS”, el tiempo de incubación está limitado por la viabilidad en PBS a pH 4,8. Por lo tanto, el tiempo elegido para evaluar la adhesión bacteriana inicial en superficies con ALB o con FBG adsorbido es de 40 min a ambos valores de pH. Dado que a pH 7,3 la viabilidad se mantiene por 19 h, en particular para ALB se incluyeron los tiempos de 90 min y 5 h, y para evaluar la formación de biofilm con ALB o con FBG adsorbido previamente, se eligió un tiempo de incubación de 18 h. Luego de la incubación de las superficies, se realizó el lavado y preparación de las muestras para las técnicas microscópicas utilizadas (Microscopía de Fluorescencia o Electrónica, Etapa 3), que se abordan a continuación en los apartados correspondientes.

---

### 1.3.10 Microscopía Confocal de Fluorescencia

Con el fin de lograr una óptima discriminación entre bacterias vivas y muertas adheridas sobre las superficies mediante Microscopía Confocal de Fluorescencia, en primer lugar, se optimizaron las concentraciones de ambos colorantes. Para ello, se comparó la emisión de fluorescencia roja y verde sobre células bacterianas vivas y muertas mezcladas en diferentes proporciones y con distintas concentraciones de yoduro de propidio y SYTO 9 (respetando la relación entre ellos indicada por el fabricante). Para evaluar la fluorescencia roja, las células bacterianas fueron previamente tratadas con alcohol isopropílico al 70%. La concentración que resultó de esta optimización fue de 3,0  $\mu\text{M}$  de yoduro de propidio y de 0,6  $\mu\text{M}$  de SYTO 9.

Luego de la incubación con la suspensión bacteriana, el tratamiento de las superficies se realizó en un ambiente estéril (Etapa 3 de la Figura 1.8), e involucró un primer paso de lavado de las superficies para remover las bacterias no adheridas con una solución estéril 150 mM de NaCl [80]. Posteriormente, se realizó la tinción de las bacterias adheridas. Para ello, se colocaron 200  $\mu\text{l}$  de una solución que contiene ambos colorantes sobre la superficie y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente y protegidas de la luz [7]. Luego, se lavaron con agua deionizada estéril para remover el exceso de los colorantes [80], se secaron al aire y se montaron con aceite de montaje. Finalmente, se observaron al microscopio de inmediato.

Las imágenes fueron captadas mediante los Microscopios Confocales de Fluorescencia Olympus FV 300 y FV 1000 del Centro de Micro y Nanoscopía de Córdoba (CEMINCO, CIQUIBIC-Dpto. de Química Biológica, FCQ-UNC). Para visualizar las bacterias vivas de color verde, se utilizó un láser de argón y filtros de excitación a 488 nm y de emisión a 510-545 nm. Para visualizar las bacterias

muertas de color rojo, se empleó un láser de helio/neón y filtros de excitación a 543 nm y de emisión a 565-610 nm. Se tomaron al menos 8 imágenes de regiones diferentes seleccionadas al azar de cada uno de los duplicados, es decir, se obtuvieron un mínimo de 16 imágenes de cada condición analizada. Las imágenes se procesaron con los softwares “Image J” [19] y “Olympus Viewer FV 300 y FV 1000”.

Para evaluar la adhesión bacteriana inicial, se realizó una comparación cuantitativa de las imágenes captadas. Para ello, se cuantificaron la totalidad de células rojas (muertas) y verdes (vivas) de cada imagen adquirida. Las respuestas analizadas incluyen el número de bacterias totales/ $\mu\text{m}^2$  y el porcentaje de bacterias vivas correspondiente. Para calcular las bacterias totales/ $\mu\text{m}^2$ , se sumaron el número de bacterias muertas con el número de bacterias vivas y se expresó ese número total por área considerando la dimensión y la resolución de la imagen. Para calcular el porcentaje de bacterias vivas se refirió el porcentaje respecto del total de bacterias contadas. A su vez, para cada una de estas respuestas, se calculó la variación entre cada condición de adsorción de proteína a evaluar respecto a los controles, es decir, dichas respuestas se expresaron como un porcentaje de variación respecto a la media obtenida para superficies sin proteína adsorbida.

Para evaluar la formación del biofilm se realizó una comparación cualitativa de las imágenes y una evaluación cuantitativa cuya respuesta consiste en expresar el número de bacterias/ $\mu\text{m}^2$ , diferenciando las bacterias vivas de las muertas. Para ello, a partir del conteo de bacterias vivas y muertas, se realizó el cálculo por el área.

Las incertezas se expresaron con el intervalo de confianza del 95%. Se realizó un ANOVA de una vía con un nivel de significación de 0,05 con el test *a posteriori* DGC para efectuar comparaciones entre las diferentes condiciones

---

de adsorción de proteína evaluadas. Ambos test estadísticos fueron realizados con el software “InfoStat” [83].

### **1.3.11 Microscopía Electrónica de Barrido**

Para observar muestras biológicas por Microscopía Electrónica de Barrido, es necesario secar las muestras por punto crítico para evitar el encogimiento de las células por deshidratación. Este procedimiento consiste en sustituir el líquido presente en las células por CO<sub>2</sub> líquido, que luego se transforma en fluido supercrítico y se elimina lentamente preservando la morfología de las células, ya que en estas condiciones no hay tensión superficial sobre la muestra. Para el procesamiento de las superficies con células adheridas, las soluciones involucradas fueron filtradas previo a su esterilización. Los procesos que se muestran en la Etapa 3 de la Figura 1.8 incluyen: un lavado para remover las bacterias no adheridas (PBS a pH 7,3), una fijación para evitar la autólisis y preservar la morfología de las células bacterianas (glutaraldehído al 2,5% en PBS a pH 7,3, 1 h), un nuevo lavado (PBS de pH 7,3, 3 veces por 10 min cada uno [92]) y una deshidratación gradual, ya que el agua es poco miscible con el CO<sub>2</sub> líquido utilizado durante el secado posterior (baños por 10 min en soluciones de acetona al 25 %, 50 %, 75 % y 100 % 3 veces). Finalmente, se realizó el secado por punto crítico en un secador Bal-Tec CPD 030 en el Laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis por Rayos X (LAMARX) de la Facultad de Astronomía, Física y Matemática-UNC, donde también se realizó el metalizado y la adquisición de las imágenes mediante el microscopio electrónico de barrido Zeiss Sigma.



---

## Referencias

- [1] B.X. Huang, H.-Y. Kim, C. Dass, Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 1237–1247. doi:10.1016/j.jasms.2004.05.004.
- [2] J.C. Dijt, M.A.C. Stuart, G.J. Fler, Reflectometry as a tool for adsorption studies, *Adv. Colloid Interface Sci.* 50 (1994) 79–101. doi:10.1016/0001-8686(94)80026-X.
- [3] United States Pharmacopeial Convention, 2018. *The United States Pharmacopeia*, 41 st. ed, Rockville, EEUU.
- [4] The Ministry of Health, Labour and Welfare, 2018. *The Japanese Pharmacopoeia*, 17 st. ed, Tokio, Japón.
- [5] European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare of the Council of Europe (EDQM), 2018. *The European Pharmacopoeial*, 9 st. ed, Estrasburgo, Francia.
- [6] I.R. Poxton, Teichoic Acids, Lipoteichoic Acids and Other Secondary Cell Wall and Membrane Polysaccharides of Gram-Positive Bacteria, in: *Mol. Med. Microbiol.* Second Ed., Elsevier Ltd, 2014: pp. 91–103. doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00005-6.
- [7] Molecular Probes, 2004. LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits. Product Information. Molecular Probes, Inc.
- [8] W.M. De Vos, B. Cattoz, M.P. Avery, T. Cosgrove, S.W. Prescott, Adsorption and surfactant-mediated desorption of poly(vinylpyrrolidone) on plasma- and piranha-cleaned silica surfaces, *Langmuir.* 30 (2014) 8425–8431. doi:10.1021/la501877v.
- [9] E. Herrera, C.E. Giacomelli, Surface coverage dictates the surface bio-activity of d-amino acid oxidase, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 117 (2014) 296–302. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.02.050.
- [10] V. Troitsky, T. Berzina, D. Shchukin, G. Sukhorukov, V. Erokhin, M.P. Fontana, Simple method of hydrophilic/hydrophobic patterning of solid surfaces and its application to self-assembling of nanoengineered polymeric capsules, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 245 (2004) 163–168. doi:10.1016/j.colsurfa.2004.06.034.
- [11] K.K. Unger, Surface chemistry of porous silica, *J. Chromatogr. Libr.* 16 (1979) 57–146. doi:10.1016/S0301-4770(08)60807-6.
- [12] B.A. Morrow, Surface Groups on Oxides, *Stud. Surf. Sci. Catal.* 57 (1990) 161–224. doi:10.1016/S0167-2991(08)63996-8.
- [13] L. Chen, J. West, P. Aurox, A. Manz, P. Day, Ultrasensitive PCR and Real-Time Detection from Human Genomic Samples Using a Bidirectional Flow Microreactor, *Anal Chem.* 79 (2007) 9185–9190. doi:10.1021/ac701668k.
- [14] D.K. Aswal, S. Lenfant, D. Guerin, J. V. Yakhmi, D. Vuillaume, Self assembled monolayers on silicon for molecular electronics, *Anal. Chim. Acta.* 568 (2006) 84–108. doi:10.1016/j.aca.2005.10.027.
- [15] G. Demirel, G. Birlik, M. Çakmak, T. Çaykara, Ş. Ellialtıođlu, An ab initio study of 3-

- aminopropyltrimethoxysilane molecule on Si(1 1 1)-(  $\sqrt{3}\times\sqrt{3}$  ) surface, *Surf. Sci.* 601 (2007) 3740–3744. doi:10.1016/j.susc.2007.04.045.
- [16] E. Herrera, Tesis Doctoral. Diseño y desarrollo de superficies bio-funcionales para la determinación de D-aminoácidos, Universidad Nacional de Córdoba, 2013.
- [17] T.M. Mcintire, S.R. Smalley, J.T. Newberg, S. Lea, J.C. Hemminger, B.J. Finlayson-pitts, a S. Lea, Substrate Changes Associated with the Chemistry of Self-Assembled Monolayers on Silicon Substrate Changes Associated with the Chemistry of Self-Assembled Monolayers on Silicon, *Langmuir*. 22 (2006) 5617–5624. doi:10.1021/la060153l.
- [18] L.E. Valenti, V.L. Martins, E. Herrera, R.M. Torresi, C.E. Giacomelli, Ni(II)-modified solid substrates as a platform to adsorb His-tag proteins, *J. Mater. Chem. B*. 1 (2013) 4921–4931. doi:10.1039/C3TB20769B.
- [19] W. Rasband, Image J, National Institute of Mental Health, (2011) Bethesda, EEUU.
- [20] A.F. Stalder, T. Melchior, M. Müller, D. Sage, T. Blu, M. Unser, Low-bond axisymmetric drop shape analysis for surface tension and contact angle measurements of sessile drops, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 364 (2010) 72–81. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.04.040.
- [21] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [22] T. Zor, Z. Selinger, Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies, *Anal. Biochem.* 236 (1996) 302–308. doi:10.1006/abio.1996.0171.
- [23] AKZO, European Patent Application, N° 88200230.6, 1988.
- [24] L.E. Valenti, P.A. Fiorito, C.D. García, C.E. Giacomelli, The adsorption-desorption process of bovine serum albumin on carbon nanotubes, *J. Colloid Interface Sci.* 307 (2007) 349–356. doi:10.1016/j.jcis.2006.11.046.
- [25] L.E. Valenti, A.M. Smania, C.P. De Pauli, C.E. Giacomelli, Driving forces for the adsorption of a His-tag Chagas antigen. A rational approach to design bio-functional surfaces, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 112 (2013) 294–301. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.07.059.
- [26] M.N. Corstens, C.C. Berton-Carabin, A. Kester, R. Fokkink, J.M. van den Broek, R. de Vries, F.J. Troost, A.A.M. Masclee, K. Schroën, Destabilization of multilayered interfaces in digestive conditions limits their ability to prevent lipolysis in emulsions, *Food Struct.* 12 (2017) 54–63. doi:10.1016/j.foostr.2016.07.004.
- [27] B. Wu, G. Liu, G. Zhang, V.S.J. Craig, Stiff chains inhibit and flexible chains promote protein adsorption to polyelectrolyte multilayers, *Soft Matter*. 10 (2014) 3806–3816. doi:10.1039/c4sm00413b.
- [28] E. Herrera, J. Valdez Taubas, C.E. Giacomelli, D-Amino acid oxidase bio-functionalized platforms: Toward an enhanced enzymatic bio-activity, *Appl. Surf. Sci.* 356 (2015) 679–686. doi:10.1016/j.apsusc.2015.08.121.
- [29] T. Bensefelt, E.D. Cranston, S. Ondaral, E. Johansson, H. Brumer, M.W. Rutland, L.

- 
- Wågberg, Adsorption of Xyloglucan onto Cellulose Surfaces of Different Morphologies: An Entropy-Driven Process, *Biomacromolecules*. 17 (2016) 2801–2811. doi:10.1021/acs.biomac.6b00561.
- [30] T. Benselfelt, T. Pettersson, L. Wågberg, Influence of surface charge density and morphology on the formation of polyelectrolyte multilayers on smooth charged cellulose surfaces, *Langmuir*. 33 (2017) 968–979. doi:10.1021/acs.langmuir.6b04217.
- [31] R.B. Walsh, B. Wu, S.C. Howard, V.S.J. Craig, Surface forces between titanium dioxide surfaces in the presence of cationic surfactant as a function of surfactant concentration, electrolyte concentration, and pH, *Langmuir*. 30 (2014) 2789–2798. doi:10.1021/la500298u.
- [32] T. Wangchareansak, V.S.J. Craig, S.M. Notley, Adsorption isotherms and structure of cationic surfactants adsorbed on mineral oxide surfaces prepared by atomic layer deposition, *Langmuir*. 29 (2013) 14748–14755. doi:10.1021/la403439r.
- [33] C.S. Hodges, A. Lincoln, S. Biggs, Surfactants at the solid-liquid interface: Measurements at higher concentrations using optical reflectometry, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 434 (2013) 164–170. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.05.071.
- [34] M.L. Carot, R.M. Torresi, C.D. Garcia, M.J. Esplandiu, C.E. Giacomelli, Electrostatic and hydrophobic interactions involved in CNT biofunctionalization with short ss-DNA, *J Phys Chem*. 114 (2010) 4459–4465. doi:10.1021/jp9085359.
- [35] J.G. Göbel, N.A.M. Besseling, M.A. Cohen Stuart, C. Poncet, Adsorption of hydrophobically modified polyacrylic acid on a hydrophobic surface: Hysteresis caused by an electrostatic adsorption barrier, *J. Colloid Interface Sci.* 209 (1999) 129–135. doi:10.1006/jcis.1998.5853.
- [36] C. Geffroy, M.P. Labeau, K. Wong, B. Cabane, M.A. Cohen Stuart, Kinetics of adsorption of polyvinylamine onto cellulose, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 172 (2000) 47–56. doi:10.1016/S0927-7757(00)00499-4.
- [37] K. Bange, C.R.R. Ottermann, O. Anderson, U. Jeschkowski, M. Laube, R. Feile, Investigations of TiO<sub>2</sub> films deposited by different techniques, *Thin Solid Films*. 197 (1991) 279–285. doi:10.1016/0040-6090(91)90238-s.
- [38] K. Vorotilov, E. Orlova, V. Petrovsky, Sol-gel TiO<sub>2</sub> films on silicon substrates, *Thin Solid Films*. 207 (1992) 180–184. doi:10.1016/0040-6090(92)90120-Z.
- [39] R.W. Phillips, J.W. Dodds, Optical interference coatings prepared from solution., *Appl. Opt.* 20 (1981) 40–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20309064>.
- [40] B.E. Yoldas, T.W. O’Keeffe, Antireflective coatings applied from metal-organic derived liquid precursors, *Appl. Opt.* 18 (1979) 3133–3138. doi:10.1364/AO.18.003133.
- [41] B. Hofs, A. Brzozowska, A. de Keizer, W. Norde, M.A. Cohen Stuart, Reduction of protein adsorption to a solid surface by a coating composed of polymeric micelles with a glass-like core, *J. Colloid Interface Sci.* 325 (2008) 309–315. doi:10.1016/j.jcis.2008.06.006.
- [42] J. Iruthayaraj, E. Poptoshev, A. Vareikis, R. Makuška, A. Van Der Wal, P.M. Claesson, Adsorption of low charge density polyelectrolyte containing poly(ethylene oxide) side chains on silica: Effects of ionic strength and pH, *Macromolecules*. 38 (2005) 6152–6160. doi:10.1021/ma050851x.

- [43] N.G. Hoogeveen, M.A. Cohen Stuart, G.J. Fleer, Polyelectrolyte Adsorption on Oxides. I. Kinetics and Adsorbed Amounts, *J. Colloid Interface Sci.* 182 (1996) 133–145. doi:10.1006/jcis.1996.0444.
- [44] J. Buijs, P.A.W. Van Den Berg, J.W.T. Lichtenbelt, W. Norde, J. Lyklema, Adsorption Dynamics of IgG and Its F(ab')<sub>2</sub> and Fc Fragments Studied by Reflectometry, *J. Colloid Interface Sci.* 178 (1996) 594–605. doi:10.1006/jcis.1996.0156.
- [45] W.N. Hansen, Electric Fields Produced by the Propagation of Plane Coherent Electromagnetic Radiation in a Stratified Medium, *J. Opt. Soc. Am.* 58 (1968) 380–390. doi:10.1364/JOSA.58.000380.
- [46] Copyright by Simpolsoft, Wageningen Agricultural University. Wageningen, Holanda.
- [47] K. Kubiak, Z. Adamczyk, M. Wasilewska, Mechanisms of fibrinogen adsorption at the silica substrate determined by QCM-D measurements, *J. Colloid Interface Sci.* 457 (2015) 378–387. doi:10.1016/j.jcis.2015.07.009.
- [48] C.E. Giacomelli, M.J. Esplandiú, P.I. Ortiz, M.J. Avena, C.P. De Pauli, Ellipsometric Study of Bovine Serum Albumin Adsorbed onto Ti/TiO<sub>2</sub> Electrodes, *J. Colloid Interface Sci.* 218 (1999) 404–411. doi:10.1006/jcis.1999.6434.
- [49] M. Malmsten, Ellipsometry Studies of Protein Layers Adsorbed at Hydrophobic Surfaces, *J. Colloid Interface Sci.* 166 (1994) 333–342. doi:10.1006/jcis.1994.1303.
- [50] P. Silva-Bermudez, S. Muhl, S.E. Rodil, A comparative study of fibrinogen adsorption onto metal oxide thin films, *Appl. Surf. Sci.* 282 (2013) 351–362. doi:10.1016/j.apsusc.2013.05.133.
- [51] P. Schaaf, P. Dejardin, Structural Changes within an Adsorbed Fibrinogen Layer during the Adsorption Process : a Study by Scanning Angle Reflectometry, *Colloids and Surfaces.* 31 (1988) 89–103.
- [52] J.C. Dijt, M.A.C. Stuart, J.E. Hofman, G.J. Fleer, Kinetics of polymer adsorption in stagnation point flow, *Colloids and Surfaces.* 51 (1990) 141–158. doi:10.1016/0166-6622(90)80138-T.
- [53] T. Dabroś, T.G.M. van de Ven, A direct method for studying particle deposition onto solid surfaces, *Colloid Polym. Sci.* 261 (1983) 694–707. doi:10.1007/BF01415042.
- [54] U. Larsson, B. Blombäck, R. Rigler, Fibrinogen and the early stages of polymerization to fibrin as studied by dynamic laser light scattering, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* 915 (1987) 172–179. doi:10.1016/0167-4838(87)90297-4.
- [55] A. Henschen, J. McDonagh, Fibrinogen, fibrin and factor XIII, in: R.F.A. Zwaal, H.C. Hemker (Eds.), *Blood Coagul.*, 1986: pp. 171–241. doi:10.1016/S0167-7306(08)60053-8.
- [56] J.W. Weisel, L. Medved, Fibrinogen and Fibrin, in: D.A.D. Parry, J.M. Squire (Eds.), *Adv. Protein Chem.*, 2005: pp. 247–299. doi:10.1016/S0065-3233(04)70008-X.
- [57] I. Langmuir, The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids (Part I), *J. Am. Chem. Soc.* 38 (1916) 2221–2295. doi:10.1021/ja02268a002.
- [58] W. Norde, Adsorption of (Bio)Polymers, with Special Emphasis on Globular Proteins, in: M. Dekker (Ed.), *Colloids Interfaces Life Sci.*, New York, 2003. doi:10.1201/9780203912157.ch15.
- [59] W. Norde, J. Buijs, H. Lyklema, Adsorption of globular proteins, in: J. Lyklema (Ed.),

- 
- Fundam. Interface Colloid Sci., Elsevier, 2005: pp. 3.1-3.59. doi:10.1016/S1874-5679(05)80007-8.
- [60] L. Valenti, Tesis Doctoral. Desde la optimización de la interacción enzima-superficie hacia la obtención de inmunoensayos en fase sólida, Universidad Nacional de Córdoba, 2008.
- [61] W. Norde, C.E. Giacomelli, Conformational changes in proteins at interfaces: From solution to the interface, and back, *Macromol. Symp.* 145 (1999) 125-136. doi:10.1002/masy.19991450114.
- [62] I. Lundström, H. Elwing, Simple kinetic models for protein exchange reactions on solid surfaces, *J. Colloid Interface Sci.* 136 (1990) 68-84. doi:10.1016/0021-9797(90)90079-4.
- [63] C.F. Wertz, M.M. Santore, Effect of Surface Hydrophobicity on Adsorption and Relaxation Kinetics of Albumin and Fibrinogen: Single-Species and Competitive Behavior, *Langmuir.* 17 (2001) 3006-3016. doi:10.1021/la0017781.
- [64] W. Mientus, E. Knippel, Theoretical modelling of plasma protein adsorption/ desorption processes onto solid surfaces, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 7 (1995) 401-414. doi:10.1163/156856295X00418.
- [65] V. Krisdhasima, P. Vinaraphong, J. McGuire, Adsorption kinetics and elutability of  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -Casein,  $\beta$ -Lactoglobulin, and bovine serum albumin at hydrophobic and hydrophilic interfaces, *J. Colloid Interface Sci.* 161 (1993) 325-334. doi:10.1006/jcis.1993.1474.
- [66] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces, *Adv. Colloid Interface Sci.* 162 (2011) 87-106. doi:10.1016/j.cis.2010.12.007.
- [67] P. Żeliszewska, A. Bratek-Skicki, Z. Adamczyk, M. Cieśla, Human Fibrinogen Adsorption on Positively Charged Latex Particles, *Langmuir.* 30 (2014) 11165-11174. doi:10.1021/la5025668.
- [68] H. Min, E. Freeman, W. Zhang, C. Ashraf, D. Allara, A.C.T. Van Duin, S. Tadigadapa, Modified Random Sequential Adsorption Model for Understanding Kinetics of Proteins Adsorption at a Liquid-Solid Interface, *Langmuir.* 33 (2017) 7215-7224. doi:10.1021/acs.langmuir.7b00523.
- [69] B.A. Snopok, E. V. Kostyukevich, Kinetic studies of protein-surface interactions: A two-stage model of surface-induced protein transitions in adsorbed biofilms, *Anal. Biochem.* 348 (2006) 222-231. doi:10.1016/j.ab.2005.11.009.
- [70] S.E. Koonin, D.C. Meredith, Ordinary Differential Equations, in: *Comput. Physics, Fortran Version*, Westview Press, Boulder, EEUU, 1998: pp. 25-51. doi:10.1201/9780429494024.
- [71] W. Norde, C.E. Giacomelli, BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states, *J. Biotechnol.* 79 (2000) 259-268. doi:10.1016/S0168-1656(00)00242-X.
- [72] P. Moazzam, A. Razmjou, M. Golabi, D. Shokri, A. Landarani-Isfahani, Investigating the BSA protein adsorption and bacterial adhesion of Al-alloy surfaces after creating a hierarchical (micro/nano) superhydrophobic structure, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 104 (2016) 2220-2233. doi:10.1002/jbm.a.35751.
- [73] H. Miorner, E. Myhre, L. Bjorck, G. Kronvall, Effect of specific binding of human albumin, fibrinogen, and immunoglobulin G on surface characteristics of bacterial strains as revealed by partition experiments in polymer phase systems, *Infect. Immun.* 29 (1980)

- 879–885. PMID: 7429636.
- [74] D.H. McBurney, W.T. L. True Experiments Part I, Single Factor Designs, in: Res. Methods, Wadsworth, Belmont, EEUU, 2009: pp. 271–291. ISBN: 9781111840624.
- [75] S.M. Callegari-Jacques, Regressiio linear simples, in: Bioestatística.Princípios e Apl., Artmed, Porto Alegre, Brasil, 2009: pp. 94–105. ISBN: 9788536311449.
- [76] M. van der Veen, M.C. Stuart, W. Norde, Spreading of proteins and its effect on adsorption and desorption kinetics, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 54 (2007) 136–142. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.08.017.
- [77] C.E. Giacomelli, W. Norde, The Adsorption–Desorption Cycle. Reversibility of the BSA–Silica System, J. Colloid Interface Sci. 233 (2001) 234–240. doi:10.1006/jcis.2000.7219.
- [78] C.E. Giacomelli, M.J. Avena, C.P. De Pauli, Adsorption of Bovine Serum Albumin onto TiO<sub>2</sub> Particles, J. Colloid Interface Sci. 188 (1997) 387–395. doi:10.1006/jcis.1996.4750.
- [79] Y. Cai, M. Strømme, K. Welch, Bacteria viability assessment after photocatalytic treatment, 3 Biotech. 4 (2014) 149–157. doi:10.1007/s13205-013-0137-1.
- [80] C.Y. Flores, A.G. Miñán, C.A. Grillo, R.C. Salvarezza, C. Vericat, P.L. Schilardi, Citrate-capped silver nanoparticles showing good bactericidal effect against both planktonic and sessile bacteria and a low cytotoxicity to osteoblastic cells, ACS Appl. Mater. Interfaces. (2013). doi:10.1021/am400044e.
- [81] M.L. Pinel-Marie, R. Brielle, B. Felden, Dual Toxic-Peptide-Coding *Staphylococcus aureus* RNA under Antisense Regulation Targets Host Cells and Bacterial Rivals Unequally, Cell Rep. 7 (2014) 424–435. doi:10.1016/j.celrep.2014.03.012.
- [82] B. Fang, S. Gon, M. Park, K.N. Kumar, V.M. Rotello, K. Nusslein, M.M. Santore, Bacterial adhesion on hybrid cationic nanoparticle-polymer brush surfaces: Ionic strength tunes capture from monovalent to multivalent binding, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 87 (2011) 109–115. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.05.010.
- [83] J.A. Di Rienzo, F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, C.W. Robledo, InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba (2011) Córdoba, Argentina.
- [84] T.R. Garrett, M. Bhakoo, Z. Zhang, Bacterial adhesion and biofilms on surfaces, Prog. Nat. Sci. 18 (2008) 1049–1056. doi:10.1016/j.pnsc.2008.04.001.
- [85] G.J. Tortora, B.R. Funke, C.L. Case, Introducción a la microbiología, 9th ed., Médica Panamericana, Buenos Aires, 2007.
- [86] G.A. O’Toole, Microtiter Dish Biofilm Formation Assay, J. Vis. Exp. (2011) 10–11. doi:10.3791/2437.
- [87] S.M. Kwasny, T.J. Opperman, Static Biofilm Cultures of Gram Positive, in: Curr. Protoc. Pharmacol., 2010: pp. 1–27. doi:10.1002/0471141755.ph13a08s50.Static.
- [88] S. Stepanović, D. Vuković, I. Dakić, B. Savić, M. Švabić-Vlahović, A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, J. Microbiol. Methods. 40 (2000) 175–179. doi:10.1016/S0167-7012(00)00122-6.
- [89] J.H. Merritt, D.E. Kadouri, G.A. O’Toole, Growing and analyzing static biofilms, Curr. Protoc.

---

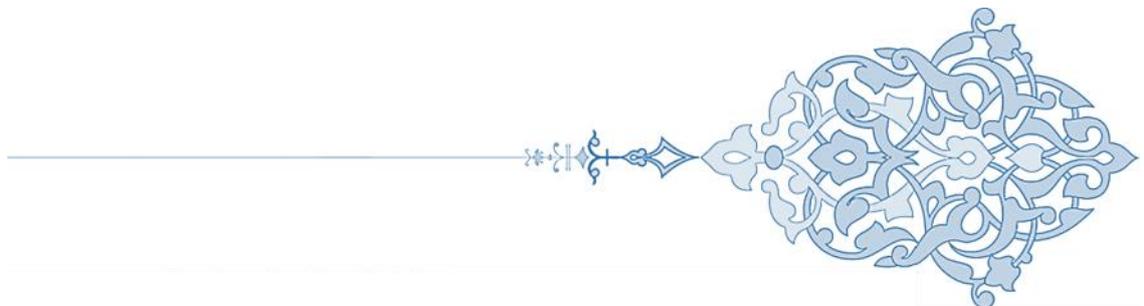
Microbiol. (2011) 1–18. doi:10.1002/9780471729259.mc01b01s22.

- [90] L. Ghellai, H. Hassaine, N. Klouche, A. Khadir, N. Aissaoui, F. Nas, W. Zingg, Detection of biofilm formation of a collection of fifty strains of *Staphylococcus aureus* isolated in Algeria at the University Hospital of Tlemcen, J. Bacteriol. Res. 6 (2014) 1–6. doi:10.5897/JBR2013.0122.
- [91] C. De la Fuente-Núñez, F. Reffuveille, L. Fernández, R.E.W. Hancock, Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies, Curr. Opin. Microbiol. 16 (2013) 580–589. doi:10.1016/j.mib.2013.06.013.
- [92] J. Bruzard, J. Tarrade, A. Coudreuse, A. Canette, J.M. Herry, E. Taffin de Givenchy, T. Darmanin, F. Guittard, M. Guilbaud, M.-N. Bellon-Fontaine, Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 131 (2015) 59–66. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.04.036.



# CAPÍTULO 2

## Adsorción de albúmina y adhesión bacteriana





---

## Capítulo 2: Adsorción de albúmina y adhesión bacteriana

### 2.1 Introducción

En el presente Capítulo, se discutirán los resultados relacionados al objetivo de comprender el proceso de adsorción-desorción de ALB sobre superficies de sílica, para optimizar las condiciones de adsorción capaces de inhibir la adhesión de *S. aureus*. En primer lugar, se presentarán los resultados concernientes al diseño factorial de experimentos del proceso de adsorción-desorción de ALB sobre superficies de sílica estudiado mediante Reflectometría. A partir de los resultados de este diseño experimental, se evaluará la relación entre la adhesión bacteriana en superficies con ALB adsorbida. En este sentido, en segundo lugar, se estudiará la adhesión de *S. aureus* sobre las superficies con ALB adsorbida, empleando Microscopía Confocal de Fluorescencia y Microscopía Electrónica de Barrido, abordando la adhesión bacteriana inicial y la formación del biofilm.

### 2.2 Resultados y Discusión

#### 2.2.1 Diseño factorial de experimentos en el proceso de adsorción-desorción de albúmina

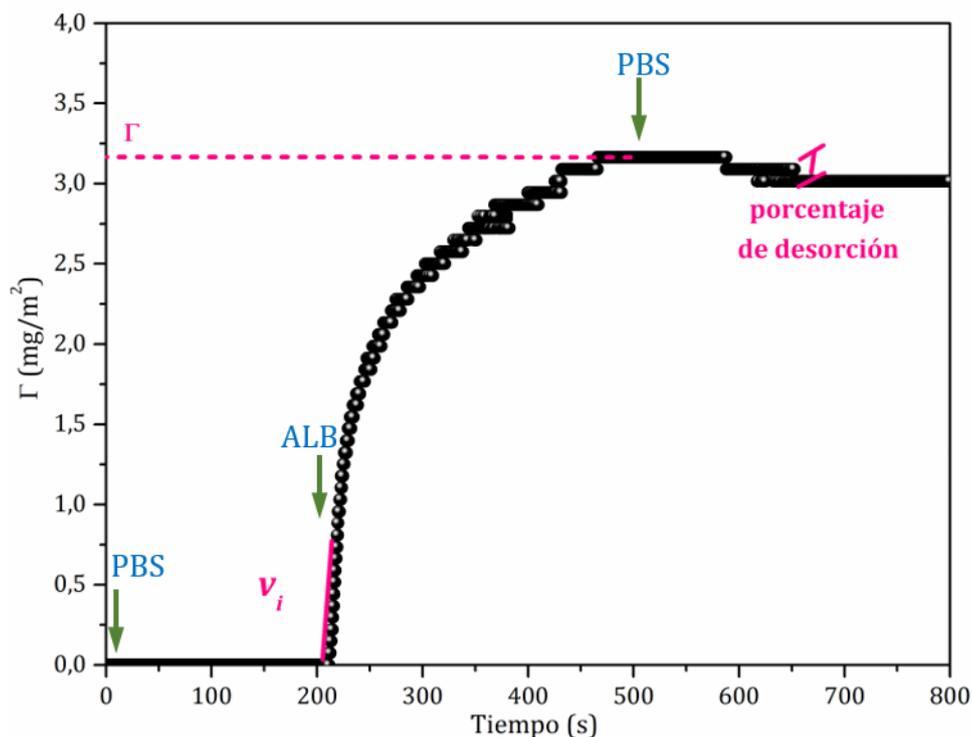
El proceso de adsorción-desorción de proteínas comprende diferentes etapas (ver Figura 1.4, Capítulo 1) que dependen tanto de las propiedades superficiales del sustrato (principalmente carga e hidrofobicidad), como de la naturaleza de la biomolécula [1,2]. Las velocidades relativas de cada una de estas etapas determinan la cantidad adsorbida resultante y la conformación de las proteínas en la interfaz en el estado final del proceso (ver Figura 1.5, Capítulo 1). De esta manera, el estado final de las proteínas adsorbidas puede

estar controlado de manera cinética o termodinámica. En este trabajo, se seleccionaron diferentes factores como pH,  $v_f$ ,  $C_p$  y tiempo de adsorción para poder optimizar el proceso de adsorción-desorción de ALB sobre superficies de sílica. Estos factores están relacionados con la cinética del proceso, la fuerza y el tipo de las interacciones proteína-sustrato y el grado de cubrimiento de la superficie. De manera similar, las variables de respuesta elegidas para determinar las características de este proceso de adsorción-desorción incluyen la  $v_i$ , la  $\Gamma$  y el porcentaje de desorción, para evaluar la desorción frente al lavado con PBS. Los factores y respuestas del diseño se resumen en el Capítulo 1, Tabla 1.4.

Para evaluar simultáneamente el efecto de los factores mencionados en el control del proceso de adsorción-desorción de ALB sobre superficies de sílica, se utilizó un diseño factorial de experimentos. Cada factor se evaluó a dos niveles: para los valores de pH se emplearon los niveles 4,8 y 7,3; para la  $v_f$ , 0,02 ml/s y 0,10 ml/s; para la  $C_p$ , 0,100 mg/ml y 0,005 mg/ml y para el tiempo de adsorción, 50 y 300 s. Al valor de pH de 7,3, la carga neta en la molécula de ALB es negativa al estar por arriba del pIE (4,8). Las superficies de sílica, cuyo punto de carga cero (PZC) es aproximadamente 2 [3], tienen una carga neta superficial negativa a los dos valores de pH estudiados. Por lo tanto, la elección de los valores de pH se realizó con el fin de evaluar el efecto de las interacciones electrostáticas en el proceso de adsorción-desorción simulando los procesos fisiológicos que tienen lugar en entornos biológicos. Por otra parte, se realizó la modificación de las superficies con diclorodimetilsilano (ver apartado 1.3.1, Capítulo 1) y se midió el ángulo de contacto de las superficies (ver apartado 1.3.2, Capítulo 1) previa y posteriormente a las modificaciones. Las superficies modificadas con diclorodimetilsilano resultaron más hidrofóbicas que las superficies sin modificar (ángulo de contacto de  $94^\circ \pm 2^\circ$  y

$43^\circ \pm 8^\circ$ , respectivamente). De aquí en adelante, las superficies de sílica previamente modificadas con diclorodimetilsilano se designarán como “superficies hidrofóbicas”, mientras que se utilizará la expresión “superficies hidrofílicas” para aludir a superficies sin modificar. Como ya fue expuesto en el Capítulo 1, con las superficies hidrofóbicas se busca evaluar el efecto de las interacciones hidrofóbicas en el proceso de adsorción-desorción, por lo cual, se utilizó un diseño sin variar el factor pH y se lo fijó al valor de 7,3.

A modo de ejemplo, la Figura 2.1 muestra una curva de cinética de adsorción-desorción obtenida por Reflectometría para una condición experimental en particular. Esto implica representar la  $\Gamma$  en función del tiempo para ALB. En la figura se destaca el ingreso de las distintas soluciones



**Figura 2.1** Valores de  $\Gamma$  en función del tiempo para ALB adsorbida sobre superficies de sílica hidrofílica a pH 4,8:  $C_p = 0,100$  mg/ml,  $v_f = 0,02$  ml/s y tiempo de adsorción = 300 s. En la figura se señala el modo de obtención de las respuestas  $v_i$ ,  $\Gamma$  y porcentaje de desorción. Las flechas indican el ingreso de soluciones de ALB o PBS a la celda del reflectómetro.

(ALB o PBS) a la celda del reflectómetro para evaluar distintos procesos: adsorción y desorción frente al lavado. En la figura se señalan, además, las variables de respuesta analizadas: la  $v_i$  se obtiene a partir de la pendiente de la curva cinética en los primeros segundos, la  $\Gamma$  alcanzada luego de un cierto tiempo de adsorción, y el porcentaje de desorción frente al lavado con PBS se calcula teniendo en cuenta la  $\Gamma$  obtenida. Las curvas de cinética de adsorción-desorción para cada condición experimental fueron analizadas de esta manera, pero, dada la gran cantidad de resultados experimentales obtenidos, éstos se consignan en tablas o gráficos de forma separada para cada variable de respuesta:  $v_i$ ,  $\Gamma$  y porcentaje de desorción.

Para el proceso de adsorción-desorción de ALB no fue realizado el ajuste de las curvas de cinética de adsorción-desorción con el modelo presentado en el capítulo anterior por diversos motivos. En primer lugar, este sistema ha sido extensamente estudiado tanto experimentalmente como a través del uso de modelos [4-11]. Por esta razón, es posible realizar un diseño de experimentos seleccionando adecuadamente los factores y las variables de respuesta. En segundo lugar, se evaluaron tiempos cortos de adsorción (hasta 300 s), en los cuales no se alcanza la  $\Gamma$  de saturación para la mayoría de las condiciones experimentales evaluadas. Tal como se mencionó anteriormente, la elección del diseño factorial se basa en la necesidad de optimizar el proceso de adsorción-desorción de ALB para minimizar la adhesión bacteriana.

### **2.2.1.1 Velocidad inicial de adsorción**

Como ya fue expuesto en el Capítulo 1, comparando la  $v_i$  con la  $v_{tr}$ , es posible determinar cuál es la etapa determinante de la velocidad del proceso de adsorción: a) transporte desde la solución hacia la superficie (todas las

moléculas que llegan a la superficie se adsorben, y la  $v_i$  resulta igual a la  $v_{tr}$ ); b) interacción proteína-superficie (la  $v_i$  es mucho menor a la  $v_{tr}$ ).

La Tabla 2.1 compara los valores de  $v_{tr}$  y  $v_i$  en función de la combinación de los factores  $C_p$  y  $v_f$  evaluados para el proceso de adsorción-desorción de ALB sobre superficies hidrofílicas e hidrofóbicas. Los valores de  $v_{tr}$  fueron calculados a partir de la ecuación (6) del Capítulo 1 y los valores de  $v_i$  fueron calculados entre los 15 y 40 s iniciales a partir de la pendiente inicial de las curvas de cinética de adsorción (Figura 2.1). Las velocidades iniciales de adsorción son menores que la velocidad de transporte para todas las combinaciones de factores evaluadas. En consecuencia, la interacción entre las moléculas de ALB y las superficies, tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, controla la velocidad del proceso de adsorción y este resultado se encuentra

**Tabla 2.1** Valores de  $v_{tr}$  y  $v_i$  en función de la combinación de los factores  $C_p$  y  $v_f$  evaluados para el proceso de adsorción-desorción de ALB

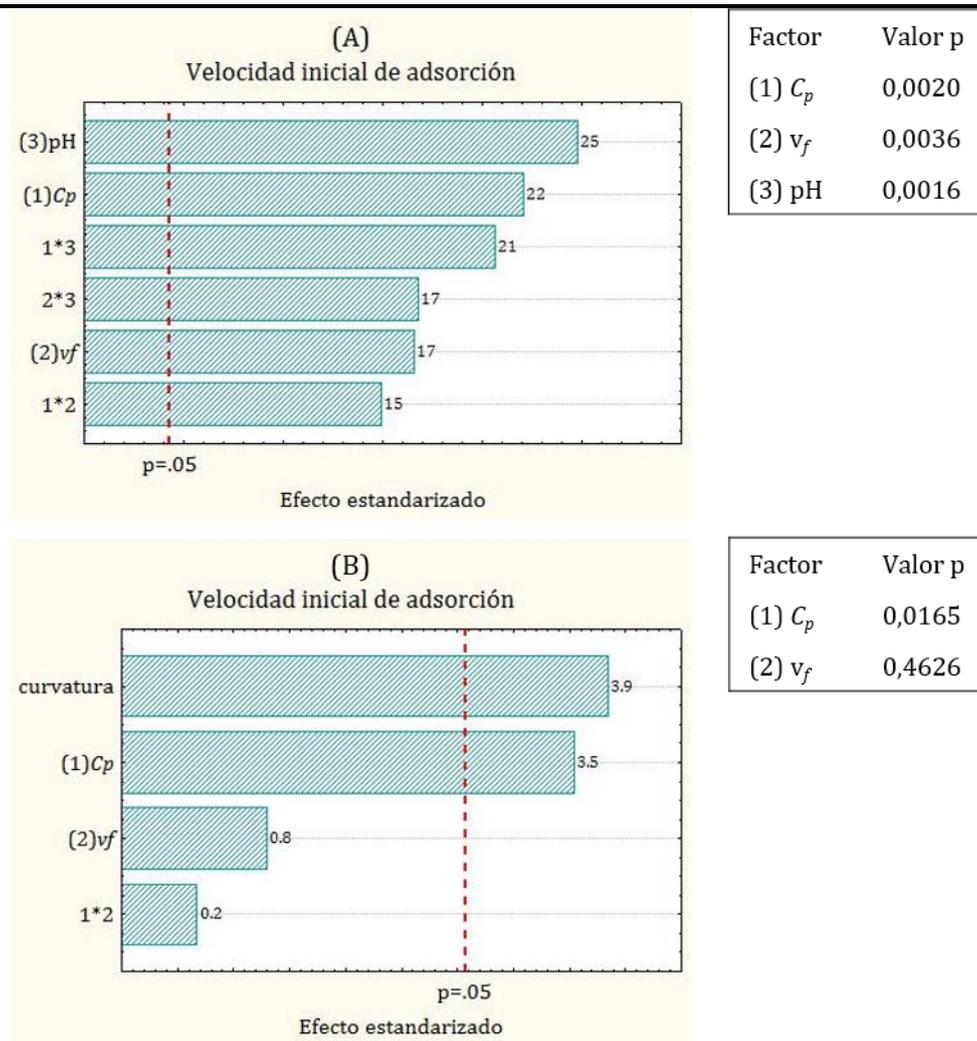
	$v_{tr}$ (mg/m <sup>2</sup> s)	$v_i$ (mg/m <sup>2</sup> s) *		
		Superficies hidrofílicas pH 7,3	Superficies hidrofóbicas pH 7,3	Superficies hidrofílicas pH 4,8
$C_p = 0,005$ mg/ml $v_f = 0,02$ ml/s	$19 \times 10^{-3}$	$(1,3 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	$(13 \pm 2) \times 10^{-3}$	$(6 \pm 2) \times 10^{-3}$
$C_p = 0,005$ mg/ml $v_f = 0,10$ ml/s	$33 \times 10^{-3}$	$(3 \pm 1) \times 10^{-3}$	$(24 \pm 5) \times 10^{-3}$	$(19 \pm 3) \times 10^{-3}$
$C_p = 0,100$ mg/ml $v_f = 0,02$ ml/s	$39 \times 10^{-2}$	$(0,9 \pm 0,1) \times 10^{-2}$	$(6 \pm 1) \times 10^{-2}$	$(6 \pm 2) \times 10^{-2}$
$C_p = 0,100$ mg/ml $v_f = 0,10$ ml/s	$66 \times 10^{-2}$	$(0,61 \pm 0,07) \times 10^{-2}$	$(6 \pm 2) \times 10^{-2}$	$(28 \pm 7) \times 10^{-2}$

(\*) Para la  $v_i$ , se muestran los resultados clasificados por la hidrofiliicidad de las superficies y el pH. El error representa la desviación estándar de cuadruplicados para cada combinación de factores.

acorde a la bibliografía [12]. Esto implica que existe un retardo para la adsorción, ya que las moléculas de proteína al llegar a la superficie deben sobrepasar una barrera de energía antes de que puedan adsorberse, por ejemplo, debido a repulsión electrostática o a efectos provocados por la deshidratación superficial (de la proteína y/o de la superficie) [1,2,13,14]. Por el contrario, un ejemplo en el cual la velocidad de transporte controla la velocidad del proceso de adsorción sobre superficies de sílica lo constituye la adsorción de polivinilpiridina cuaternizada (PVP<sup>+</sup>), donde la interacción principal es de origen no electrostático [3].

Para cada variable de respuesta del diseño factorial de experimentos del proceso de adsorción-desorción se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significación de 0,05 (estimación con un 95% de confianza) para evaluar cuales son los factores que resultan significativos en el proceso. Para la velocidad inicial, los resultados de dicho análisis se muestran en la Figura 2.2, donde se presentan los diagramas de Pareto de efectos estandarizados para evaluar el efecto que ejercen los factores sobre la  $v_i$  en superficies hidrofílicas (A) e hidrofóbicas (B). Además, se muestra el valor  $p$  que resultó del ANOVA para cada factor evaluado. El diagrama de Pareto muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados para los factores evaluados en cada diseño factorial ( $2^4$  para superficies hidrofílicas y  $2^3$  para superficies hidrofóbicas) y para las interacciones posibles entre dichos factores. El efecto estima la magnitud de una relación sin hacer ninguna declaración acerca de si la relación aparente entre los datos refleja una verdadera relación en la población. De esta forma, se complementa el análisis mediante la estadística inferencial, comparando los valores  $p$  para un nivel de significación de 0,05. Aquellos factores con efecto estandarizado que se encuentran por arriba de la línea de referencia en el diagrama de Pareto indican que su efecto es

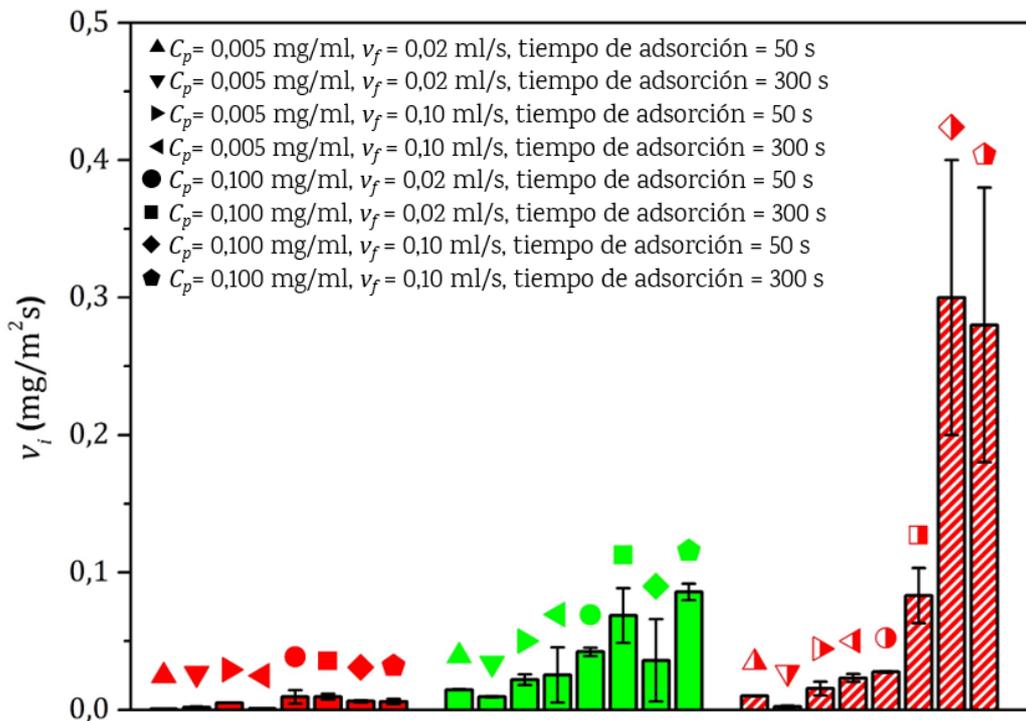
significativo con un nivel de confianza del 95%. Por lo tanto, a partir del análisis de los efectos estandarizados y del valor p, se puede concluir que todos los factores evaluados ( $C_p$ ,  $v_f$  y pH) resultan estadísticamente significativos para la  $v_i$  en superficies hidrofílicas, mientras que sólo la  $C_p$  resulta significativa para la  $v_i$  en superficies hidrofóbicas. Además, en superficies hidrofílicas el efecto de las interacciones entre los factores es significativo, indicando que los factores no son independientes entre ellos, de ahí la importancia de



**Figura 2.2** Diagramas de Pareto de efectos estandarizados para  $v_i$ : efecto que ejercen los factores en superficies hidrofílicas (A) e hidrofóbicas (B), incluyendo los valores p asociados.

considerarlos a todos en un análisis multivariado. La curvatura significativa indica que hay un efecto no lineal en la respuesta en superficies hidrofóbicas, es decir, que alguno de los factores (o varios) podría contribuir mediante un término cuadrático en la respuesta.

En la Figura 2.3 se muestra la variable de respuesta  $v_i$  para todas las combinaciones de factores experimentales evaluados en el proceso de



**Figura 2.3** Valores de  $v_i$  para todas las combinaciones de factores evaluados en el proceso de adsorción-desorción de ALB: símbolos de color rojo para superficies hidrofílicas a pH 7,3 (lisos) y a pH 4,8 (rayados), y símbolos verdes para superficies hidrofóbicas a pH 7,3. La forma de los símbolos representa la combinación de los factores estudiados,  $C_p$ ,  $v_f$  y tiempo de adsorción, respectivamente: (▲) 0,005 mg/ml-0,02 ml/s-50 s, (▼) 0,005 mg/ml-0,02 ml/s-300 s, (►) 0,005 mg/ml-0,10 ml/s-50 s, (◄) 0,005 mg/ml-0,10 ml/s-300 s, (●) 0,100 mg/ml-0,02 ml/s-50 s, (■) 0,100 mg/ml-0,02 ml/s-300 s, (◆) 0,100 mg/ml-0,10 ml/s-50 s, (◆) 0,100 mg/ml-0,10 ml/s-300 s. Las barras de error representan la desviación estándar calculada a partir de duplicados para cada combinación de los factores.

---

adsorción-desorción de ALB, representados por: símbolos de color rojo para superficies hidrofílicas a pH 7,3 (lisos) y a pH 4,8 (rayados), y símbolos verdes para superficies hidrofóbicas a pH 7,3. Todos los valores de  $v_i$  fueron obtenidos a los dos niveles de  $C_p$ ,  $v_f$  y tiempo de adsorción. Como fue expuesto anteriormente, la velocidad del proceso de adsorción está controlada por la interacción entre las moléculas de ALB y las superficies tanto hidrofílicas como hidrofóbicas. Para evaluar la contribución de las interacciones electrostáticas en el proceso de adsorción sobre superficies hidrofílicas, se seleccionaron los valores de pH 4,8 y 7,3. A pH 7,3 tanto la carga neta superficial como la carga neta en la proteína es negativa, mientras que, a pH 4,8 la carga neta superficial es negativa y la carga neta en la proteína es nula con grupos funcionales cargados positiva y negativamente. Los valores de  $v_i$  para la adsorción a pH 4,8 sobre superficies hidrofílicas son mayores que a pH 7,3, y esta diferencia se acentúa a mayor  $C_p$ . Es decir, tal como se esperaba, la adsorción de la proteína ocurre más rápido cuando la repulsión electrostática entre las moléculas de proteína y la superficie es menor y, a su vez, este comportamiento se ve afectado por la concentración de proteína. Este hecho destaca la importancia de la contribución electrostática en la interacción proteína-superficie. Esta interacción, evidentemente, depende de las características propias de la proteína, de la superficie y del pH de la solución. A modo de ejemplo, la interacción de ALB con otras superficies como montmorillonita o mica con propiedades superficiales diferentes a las de sílica, también está controlada por la contribución electrostática [15,16].

Por otra parte, para evaluar el efecto de las interacciones hidrofóbicas en la adsorción de ALB, se comparan los valores de  $v_i$  entre superficies hidrofílicas e hidrofóbicas a pH 7,3. Los valores de  $v_i$  son mayores para la adsorción sobre superficies hidrofóbicas. Esto indica que hay otro tipo de

interacciones involucradas en el proceso de adsorción de ALB sobre superficies hidrofóbicas y que dichas interacciones producen una adsorción más rápida de la proteína, que la interacción electrostática proteína-superficie hidrofílica. Las interacciones presentes en la adsorción de proteína sobre superficies hidrofóbicas incluyen las interacciones hidrofóbicas proteína-superficie y la deshidratación superficial (de la proteína y/o de la superficie). Esta deshidratación es acompañada de una importante ganancia entrópica, ya que una gran cantidad de moléculas de agua dejan de estar “unidas” a la superficie o a la proteína, y dado el carácter hidrofóbico de las superficies juega un rol importante en facilitar la adsorción de la proteína [17]. Es por esto, que una tendencia general descrita en la bibliografía es que las proteínas presentan mayor afinidad por las superficies hidrofóbicas que por las hidrofílicas, incluso bajo condiciones electrostáticas desfavorables, como en este caso [13,18]. A modo de comparación, se puede mencionar, por un lado, un trabajo que postula la facilidad con la que ALB se adsorbe a superficies hidrofóbicas de poliestireno [19]. Sin embargo, en otro trabajo no se observa efecto sobre la velocidad de adsorción de ALB al variar la hidrofobicidad superficial [6]. De acuerdo con el ANOVA, la  $C_p$  tiene un efecto significativo en la  $v_i$  sobre superficies hidrofóbicas y para las combinaciones de factores con mayor  $C_p$  se presentan mayores valores de  $v_i$ . Esta dependencia de la concentración de proteína con la etapa inicial del proceso de adsorción refuerza la premisa que la interacción entre las moléculas de ALB y las superficies controla la velocidad del proceso de adsorción, ya sea por medio de interacciones electrostáticas o hidrofóbicas.

---

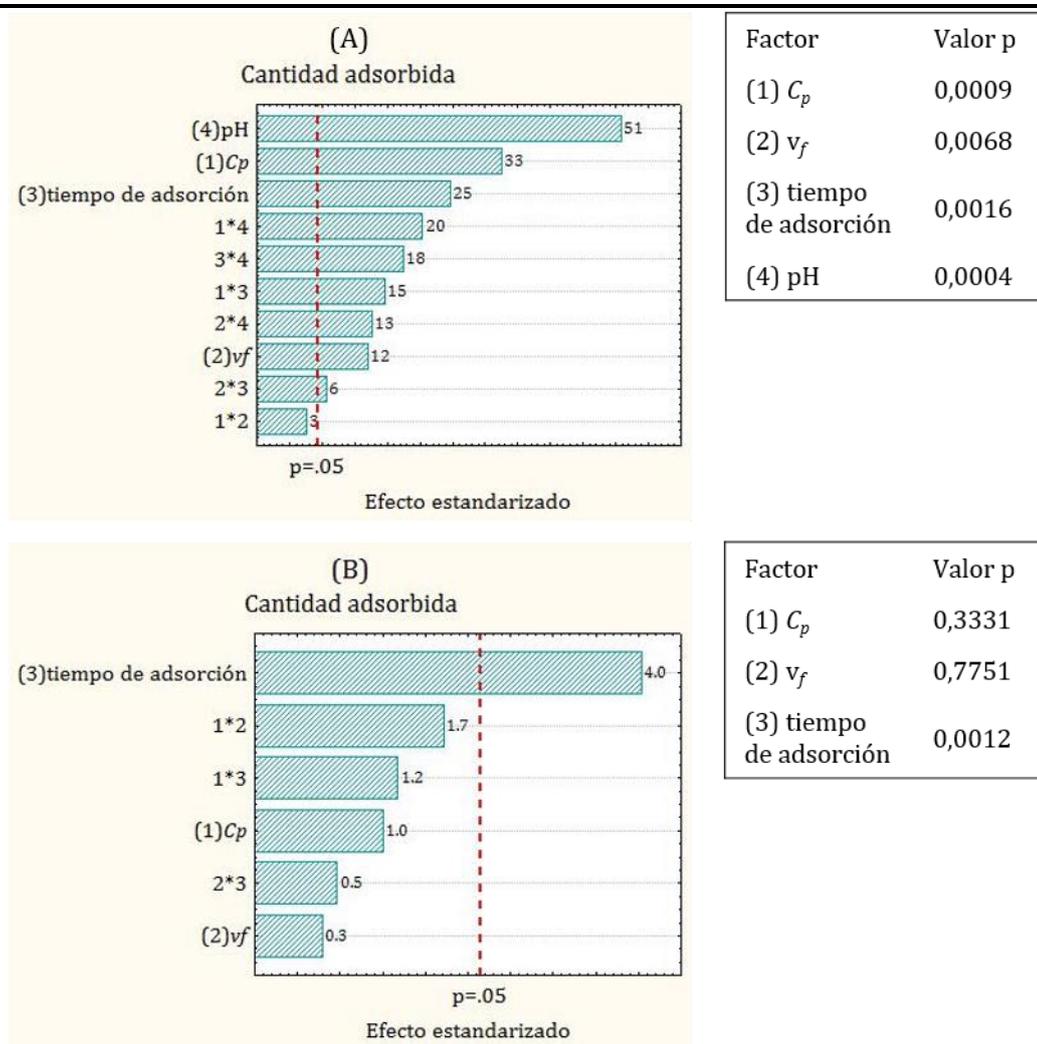
### 2.2.1.2 Cantidad adsorbida

A partir de numerosos estudios de adsorción de ALB sobre superficies de sílica en condiciones de estado estacionario, se puede afirmar que la ALB se adsorbe sobre estas superficies formando una monocapa, con una alta afinidad incluso bajo condiciones electrostáticas repulsivas. La fuerza impulsora del proceso de adsorción se relaciona con cambios en la hidratación de la superficie y de la proteína, que ocasionan alteraciones estructurales en las moléculas de ALB adsorbida [20–26]. Generalmente, en la etapa inicial de la adsorción, las moléculas se encuentran distribuidas al azar sobre la superficie. Luego, la molécula de proteína que arriba a la superficie debe encontrar sitios superficiales libres para adsorberse, es decir, hay un efecto limitante superficial [12]. Este efecto se vuelve importante, en particular, cuando las interacciones electrostáticas dominan el proceso de adsorción. En este caso, dichas interacciones junto con la densidad de carga superficial a un dado pH, limitan la cantidad adsorbida de proteína [12].

En este trabajo, se evalúa la  $\Gamma$  obtenida para cada condición experimental (Figura 2.1), sin alcanzar condiciones de estado estacionario. Los valores obtenidos de cantidad adsorbida luego de un cierto tiempo de adsorción, resultan del balance entre los sitios superficiales disponibles para la adsorción, el área efectiva que ocupa cada molécula adsorbida (ver ecuación (12), Capítulo 1) y la interacción entre las moléculas de proteína adsorbida [12,27]. Tal como fue mencionado en el Capítulo 1, el área ocupada depende del grado de relajación de las moléculas de proteína adsorbidas, y en general es mayor para las proteínas en el estado relajado respecto del nativo ( $S_R > S_N$ ). Por lo tanto, el proceso de relajación de las proteínas adsorbidas

disminuye la probabilidad de que nuevas moléculas de proteína encuentren un sitio disponible para adsorberse (ver Figura 1.5, Capítulo 1).

En la Figura 2.4 se muestran los resultados del ANOVA, donde se presentan los diagramas de Pareto de efectos estandarizados para evaluar el efecto que ejercen los factores experimentales en la  $\Gamma$  sobre superficies hidrofílicas (A) e hidrofóbicas (B) incluyendo los valores p para cada factor evaluado. A partir del análisis de aquellos efectos estandarizados que superan a la línea de referencia y de aquellos factores cuyo valor p es menor a 0,05, se



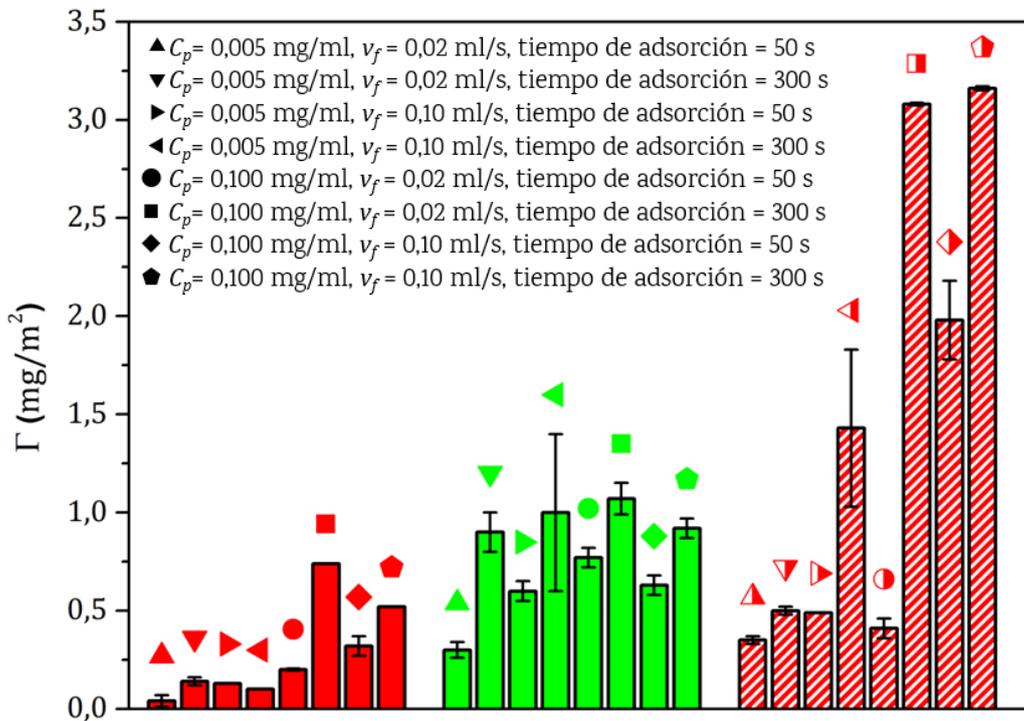
**Figura 2.4** Diagramas de Pareto de efectos estandarizados para  $\Gamma$ : efecto que ejercen los factores en superficies hidrofílicas (A) e hidrofóbicas (B), incluyendo los valores p asociados.

---

puede concluir que todos los factores evaluados (pH,  $C_p$ , tiempo de adsorción, y  $v_f$ ) resultan estadísticamente significativos para la  $\Gamma$  sobre superficies hidrofílicas, mientras que sólo el tiempo de adsorción resulta significativo para la  $\Gamma$  sobre superficies hidrofóbicas. Además, las interacciones entre los factores sobre superficies hidrofílicas resultaron significativas, indicando que los factores no son independientes entre sí.

En la Figura 2.5 se muestra la variable de respuesta  $\Gamma$  para todas las combinaciones de factores experimentales evaluados en el proceso de adsorción-desorción de ALB, representados por: símbolos de color rojo para superficies hidrofílicas a pH 7,3 (lisos) y a pH 4,8 (rayados), y símbolos verdes para superficies hidrofóbicas a pH 7,3, medidos a los dos niveles de  $C_p$ ,  $v_f$  y tiempo de adsorción. En todas las combinaciones de factores evaluados en la adsorción (tanto para superficies hidrofóbicas e hidrofílicas a ambos valores de pH), al variar el tiempo de adsorción se modifica la  $\Gamma$ , esto indica la dependencia de la cantidad adsorbida con el tiempo de adsorción, como ya fue mencionado a partir de los resultados del ANOVA. El hecho que el tiempo de adsorción sea el único factor significativo para la adsorción en superficies hidrofóbicas, indica que, a pesar de encontrarse un mayor número de moléculas de proteína disponibles para adsorberse (ya sea por un aumento en la  $C_p$  o en la  $v_f$ ) es necesario un aumento en el tiempo de contacto para lograr un incremento en la  $\Gamma$ . Por esta misma razón, la  $v_f$  es un factor menos significativo que el tiempo de adsorción en superficies hidrofílicas. Es decir, luego de la adsorción de las primeras moléculas hay una etapa más lenta para la adsorción de las siguientes moléculas de proteína. Este comportamiento puede explicarse por un aumento del área de contacto de las moléculas de proteína adsorbida, ocasionado por la relajación de las moléculas adsorbidas,

ya sea por interacciones hidrofóbicas o electrostáticas [1,24]. Como consecuencia, se disminuye la probabilidad de que las proteínas que llegan a la superficie encuentren sitios disponibles para adsorberse. Los mayores valores de cantidad adsorbida de ALB se observan sobre superficies hidrofílicas a pH 4,8 debido a que en el pIE de la proteína las moléculas se adsorben formando una monocapa más compacta [28], y las interacciones electrostáticas



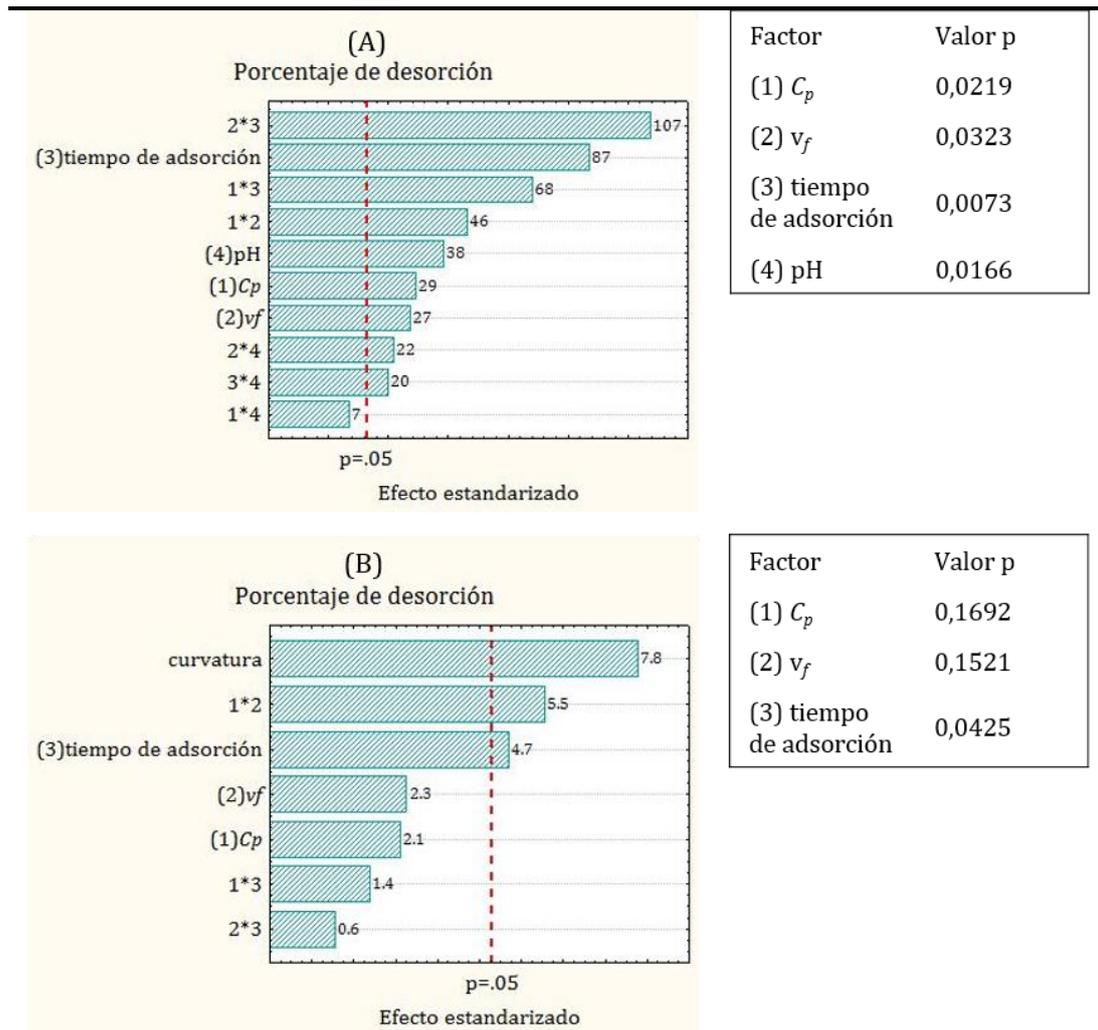
**Figura 2.5** Valores de  $\Gamma$  para todas las combinaciones de factores evaluados en el proceso de adsorción-desorción de ALB: símbolos de color rojo para superficies hidrofílicas a pH 7,3 (lisos) y a pH 4,8 (rayados), y símbolos verdes para superficies hidrofóbicas a pH 7,3. La forma de los símbolos representa la combinación de los factores estudiados,  $C_p$ ,  $v_f$  y tiempo de adsorción, respectivamente: ( $\blacktriangle$ ) 0,005 mg/ml-0,02 ml/s-50 s, ( $\blacktriangledown$ ) 0,005 mg/ml-0,02 ml/s-300 s, ( $\blacktriangleright$ ) 0,005 mg/ml-0,10 ml/s-50 s, ( $\blacktriangleleft$ ) 0,005 mg/ml-0,10 ml/s-300 s, ( $\bullet$ ) 0,100 mg/ml-0,02 ml/s-50 s, ( $\blacksquare$ ) 0,100 mg/ml-0,02 ml/s-300 s, ( $\blacklozenge$ ) 0,100 mg/ml-0,10 ml/s-50 s, ( $\blacklozenge$ ) 0,100 mg/ml-0,10 ml/s-300 s. Las barras de error representan la desviación estándar calculada a partir de duplicados para cada combinación de los factores.

repulsivas son despreciables. Por otra parte, se presenta un resultado particular a este valor de pH al comparar el mayor nivel de  $C_p$  y el menor nivel de tiempo de adsorción, donde la cantidad adsorbida depende de la  $v_f$  (● y ◆), mientras que esta dependencia no se observa si se compara la misma condición al mayor nivel de tiempo de adsorción (■ y ◆). El efecto de este factor sobre la variable de respuesta sugiere que se requieren tiempos largos de residencia sobre la superficie para optimizar los puntos de contacto entre la ALB y las superficies hidrofílicas bajo condiciones electrostáticas favorables. Es decir, al disponer de mayor tiempo para la adsorción, la proteína puede orientar sus grupos cargados positivamente hacia la superficie por estar en el pIE y así, adsorberse en mayor medida.

### 2.2.1.3 Porcentaje de desorción

En la forma más clásica de tratar el proceso de adsorción (modelo de Langmuir, presentado en el Capítulo 1), se considera que el adsorbato interactúa con el adsorbente sin desarrollar interacciones laterales [29]. En particular, el comportamiento de las proteínas dista mucho de estas consideraciones, de hecho, son moléculas asimétricas y complejas que pueden establecer además interacciones entre sí y/o con las moléculas de solvente. Por lo cual, las moléculas de proteína se pueden desorber (es decir, abandonar la superficie) frente al cambio de ciertas condiciones como temperatura, pH, presión, concentración de proteína, entre otras [30]. Como fue mencionado en el Capítulo 1, durante el proceso de relajación de las proteínas sobre la superficie, las moléculas resultan adsorbidas con una mayor fuerza de interacción, lo que ocasiona una disminución en el porcentaje de desorción [1,2,31]. En consecuencia, para comprender el proceso global de adsorción es necesario evaluar la desorción frente a la dilución.

En este trabajo, se evaluó el porcentaje de desorción frente a la dilución con PBS respecto a la  $\Gamma$  obtenida para cada condición experimental del diseño factorial. En la Figura 2.6 se muestran los resultados del ANOVA mediante los diagramas de Pareto de efectos estandarizados para superficies hidrofílicas (A) e hidrofóbicas (B) incluyendo los valores p para cada factor evaluado sobre el porcentaje de desorción. Todos los factores resultan

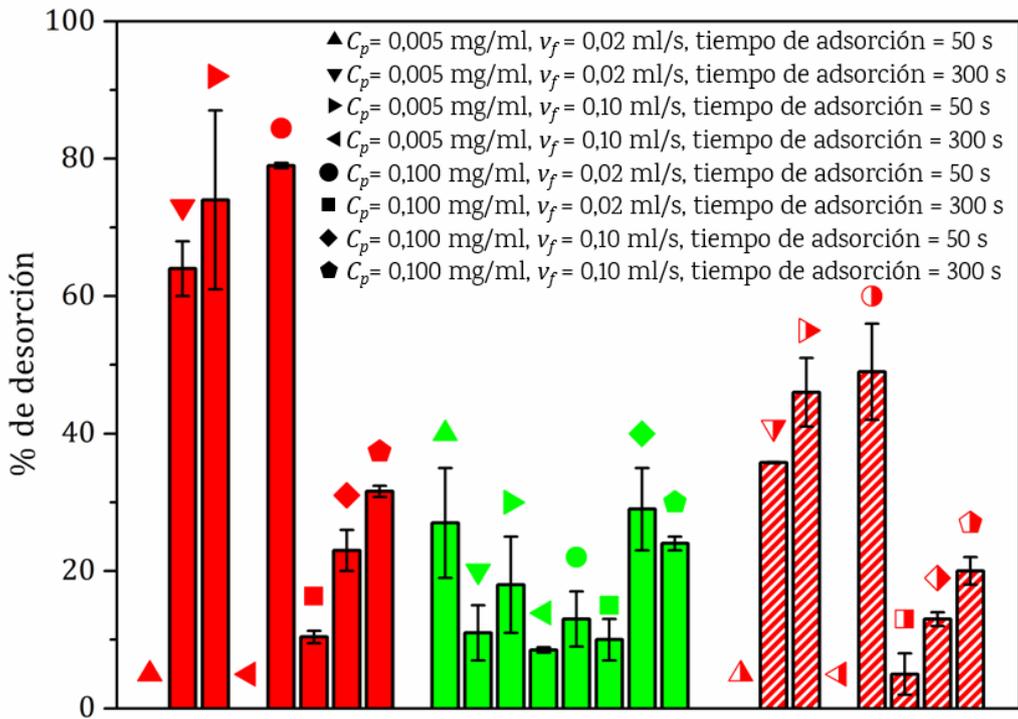


**Figura 2.6** Diagramas de Pareto de efectos estandarizados para porcentaje de desorción: efecto que ejercen los factores en superficies hidrofílicas (A) e hidrofóbicas (B), incluyendo los valores p asociados.

estadísticamente significativos sobre el porcentaje de desorción en superficies hidrofílicas, si bien, el tiempo de adsorción es el factor que más afecta a esta variable de respuesta. De hecho, este factor es el único que resulta estadísticamente significativo para el porcentaje de desorción en superficies hidrofóbicas. La dependencia de esta respuesta con el tiempo de adsorción implica que el proceso de adsorción y el de relajación ocurren en la misma escala de tiempo (ver Figura 1.5 A, Capítulo 1), tanto en superficies hidrofílicas como hidrofóbicas. Cuando esto sucede, la relajación de las proteínas adsorbidas se ve condicionada por el espacio disponible, es decir, depende del grado de cubrimiento superficial (ver ecuaciones 12,16,17, Capítulo 1) [6].

En la Figura 2.7 se muestra la variable de respuesta porcentaje de desorción para todas las combinaciones de factores experimentales evaluados en el proceso de adsorción-desorción de ALB, representados por: símbolos de color rojo para superficies hidrofílicas a pH 7,3 (lisos) y a pH 4,8 (rayados), y símbolos verdes para superficies hidrofóbicas a pH 7,3, medidos a los dos niveles de  $C_p$ ,  $v_f$  y tiempo de adsorción. Para superficies hidrofóbicas, se observa que, para cada combinación de factores experimentales, al aumentar el tiempo de adsorción, disminuye el porcentaje de desorción. Esto se debe a que la interacción con la superficie induce la exposición del interior hidrofóbico de la proteína hacia la superficie hidrofóbica para evitar la hidratación [1,2]. Por otra parte, existe una disminución en el porcentaje de desorción para superficies hidrofílicas a ambos pH con el aumento en el tiempo de adsorción en aquellas combinaciones de factores correspondientes al mayor nivel de  $C_p$ , y menor nivel de  $v_f$  (●/■ y ●/□), o por el contrario al mayor nivel de  $v_f$ , y menor nivel de  $C_p$  (▶/◀ y ▶/◁). Esto indica que la relajación sobre superficies hidrofílicas depende del espacio disponible, y que se observa una compensación entre los factores  $v_f$  y  $C_p$  para que las moléculas de proteína

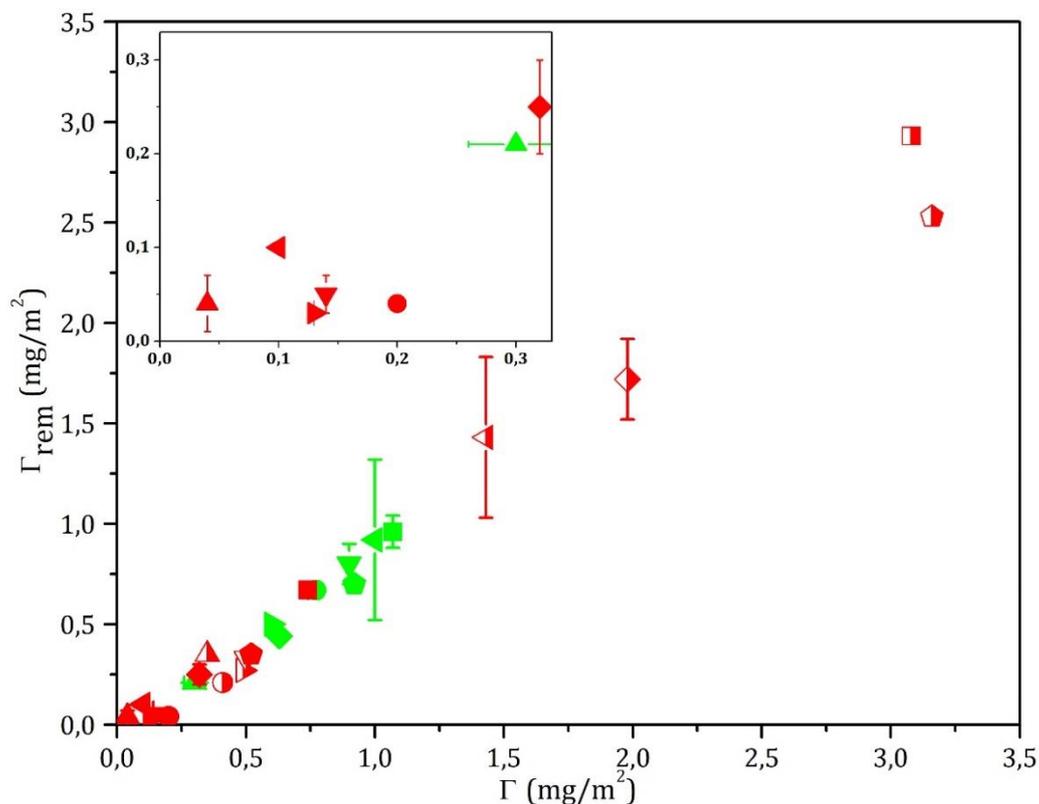
cuenten con el espacio que requieren para poder relajarse. En consecuencia, a bajo grado de cubrimiento superficial, el estado de relajación de las moléculas adsorbidas es mayor.



**Figura 2.7** Valores del porcentaje de desorción para todas las combinaciones de factores evaluados en el proceso de adsorción-desorción de ALB: símbolos de color rojo para superficies hidrofílicas a pH 7,3 (lisos) y a pH 4,8 (rayados), y símbolos verdes para superficies hidrofóbicas a pH 7,3. La forma de los símbolos representa la combinación de los factores estudiados,  $C_p$ ,  $v_f$  y tiempo de adsorción, respectivamente: (▲) 0,005 mg/ml-0,02 ml/s-50 s, (▼) 0,005 mg/ml-0,02 ml/s-300 s, (►) 0,005 mg/ml-0,10 ml/s-50 s, (◄) 0,005 mg/ml-0,10 ml/s-300 s, (●) 0,100 mg/ml-0,02 ml/s-50 s, (■) 0,100 mg/ml-0,02 ml/s-300 s, (◆) 0,100 mg/ml-0,10 ml/s-50 s, (◆) 0,100 mg/ml-0,10 ml/s-300 s. Las barras de error representan la desviación estándar calculada a partir de duplicados para cada combinación de los factores.

A partir de los análisis realizados para cada variable de respuesta surge la necesidad de conocer la cantidad de ALB que permanece adsorbida luego de

la desorción por dilución, y analizar el proceso de relajación de las proteínas adsorbidas. La Figura 2.8 muestra la cantidad adsorbida remanente luego de la desorción por dilución ( $\Gamma_{rem}$ ) en función de la cantidad adsorbida ( $\Gamma$ ) correspondiente a todas las condiciones experimentales, representados por: símbolos de color rojo para superficies hidrofílicas a pH 7,3 (lisos) y a pH 4,8 (rayados), y símbolos verdes para superficies hidrofóbicas a pH 7,3, medidos a



**Figura 2.8** Valores de  $\Gamma_{rem}$  en función de la  $\Gamma$  para todas las combinaciones de factores evaluados en el proceso de adsorción-desorción de ALB: símbolos de color rojo para superficies hidrofílicas a pH 7,3 (lisos) y a pH 4,8 (rayados), y símbolos verdes para superficies hidrofóbicas a pH 7,3. La forma de los símbolos representa la combinación de los factores estudiados,  $C_p$ ,  $v_f$  y tiempo de adsorción, respectivamente: ( $\blacktriangle$ ) 0,005 mg/ml-0,02 ml/s-50 s, ( $\blacktriangledown$ ) 0,005 mg/ml-0,02 ml/s-300 s, ( $\blacktriangleright$ ) 0,005 mg/ml-0,10 ml/s-50 s, ( $\blacktriangleleft$ ) 0,005 mg/ml-0,10 ml/s-300 s, ( $\bullet$ ) 0,100 mg/ml-0,02 ml/s-50 s, ( $\blacksquare$ ) 0,100 mg/ml-0,02 ml/s-300 s, ( $\blacklozenge$ ) 0,100 mg/ml-0,10 ml/s-50 s, ( $\blacklozenge$ ) 0,100 mg/ml-0,10 ml/s-300 s. Las barras de error representan la desviación estándar calculada a partir de duplicados para cada combinación de los factores (en aquellos símbolos sin barra de error el tamaño del símbolo representa la incerteza).

los dos niveles de  $C_p$ ,  $v_f$  y tiempo de adsorción. Se pueden distinguir dos zonas: una zona en la que  $\Gamma_{rem}$  es constante e igual a  $0,04 \text{ mg/m}^2$  para  $\Gamma$  de hasta  $0,20 \text{ mg/m}^2$  aproximadamente, seguida de una relación lineal entre las variables estudiadas, con una pendiente de  $0,91$  ( $R^2=0,98$ ). La primera zona se observa para la mayoría de las combinaciones factoriales de adsorción sobre superficies hidrofílicas a pH  $7,3$ , donde a pesar de los diferentes valores de  $\Gamma$  alcanzada, sólo se mantiene  $0,04 \text{ mg/m}^2$  sobre la superficie luego de la desorción por dilución. Esto indica que por lo menos se presentan dos poblaciones de proteínas adsorbidas, una unida débilmente que se remueve por dilución y otra fuertemente adsorbida que corresponde a una  $\Gamma_{rem}$  igual a  $0,04 \text{ mg/m}^2$ . Obviamente, estas moléculas que permanecen adsorbidas con una fuerte interacción son consecuencia de moléculas de ALB relajadas que optimizan la interacción aumentando los puntos de unión con la superficie. Esta situación fue ejemplificada en la Figura 1.5 A del Capítulo 1, donde la  $v_c$  es del mismo orden que la  $v_r$ , y, por lo tanto, existen dos poblaciones de proteínas adsorbidas: nativas y relajadas ( $\Gamma_N$  y  $\Gamma_R$ ). De acuerdo con estas simulaciones,  $\Gamma_{rem}$  podría relacionarse con  $\Gamma_R$ . La segunda zona indica que el proceso de desorción estuvo prácticamente ausente en la mayoría de las combinaciones de factores experimentales. Este hecho se relaciona a la fuerza de la interacción proteína-superficie como resultado de interacciones electrostáticas o hidrofóbicas y/o interacciones laterales entre las moléculas de proteína adsorbida. Estas últimas podrían prevalecer para la adsorción a pH  $4,8$ , cuando la repulsión electrostática es menor y el grado de cubrimiento superficial es mayor, por lo tanto, la distancia de separación entre las moléculas adsorbidas es menor [1,2].

---

En resumen, en el proceso de adsorción-desorción de ALB sobre superficies de sílica, la interacción entre la superficie y las moléculas de proteína controla la velocidad del proceso de adsorción. Estas interacciones varían según la hidrofobicidad superficial y el pH del medio:

a) Para la adsorción sobre superficies hidrofóbicas están involucradas interacciones de tipo hidrofóbico, donde juega un papel importante la deshidratación superficial (de las moléculas de proteína y de la superficie). Estas interacciones se ven condicionadas por el tiempo que la proteína reside sobre la superficie.

b) Por otra parte, en la adsorción sobre superficies hidrofílicas a pH 4,8, se evidencia un proceso rápido con una interacción entre la superficie y la proteína de tipo electrostática de carácter muy fuerte, además de posibles interacciones laterales entre las moléculas adsorbidas. El rol de las interacciones laterales ha sido descrito para otros sistemas, por ejemplo, lisozima-sílica, en el cual son responsables de estabilizar la estructura de la proteína adsorbida, e incluso influyen en la actividad biológica superficial [32]. Además, en estas condiciones, se obtienen las mayores cantidades de proteína adsorbidas, incluso frente a la desorción por dilución, lo que concuerda con otros resultados publicados en la bibliografía para la adsorción de ALB en su pIE [11,12,22,28].

c) Por último, a pH 7,3 sobre superficies hidrofílicas, a pesar de presentarse repulsión electrostática entre las moléculas de proteína y la superficie, se observa adsorción de ALB. Como consecuencia, se obtienen los valores de  $\Gamma_{rem}$  más bajos, con una fuerte interacción condicionada por el espacio disponible, como resultado de la optimización de la interacción con la superficie. Se pueden mencionar diversos ejemplos indicados en la bibliografía, en los cuales la optimización de la interacción proteína-superficie provoca cambios

estructurales en las moléculas adsorbidas que, a su vez, están relacionados con una disminución de la actividad biológica superficial [13,31]. Tal es el caso, de ALB adsorbida sobre dióxido de titanio, que sufre la alteración de la estructura secundaria, de ALB sobre óxido de grafeno que, tras el cambio en la estructura secundaria y terciaria, se altera la actividad biológica, o de tripsina cuya actividad se reduce al 9% al adsorberse sobre sílica [33-36]. Por el contrario, algunas proteínas son capaces de conservar su estructura, por lo que mantienen su actividad biológica al adsorberse [13]. Así, se pueden citar los ejemplos de lisozima sobre espuma de sílice o de  $\beta$ -glucanasa sobre sílica [37,38].

### 2.2.2 Adhesión bacteriana

Se utilizó el diseño factorial de experimentos para evaluar de forma simultánea el efecto que diferentes factores tienen en la optimización del proceso de adsorción-desorción de ALB, para minimizar la adhesión de *Staphylococcus aureus* sobre las superficies de sílica. Con este propósito, se eligieron algunas condiciones de adsorción de ALB de la amplia variedad de combinaciones de factores experimentales que resultan en diferente  $\Gamma_{rem}$ . Este parámetro provee una buena relación entre la ALB adsorbida y el proceso de adhesión, ya que, además de representar la cantidad de ALB adsorbida que queda luego de la desorción por dilución, es un buen indicador del proceso de relajación de las proteínas adsorbidas. Se exploraron tiempos de incubación cortos, para evaluar el efecto de la adsorción de proteína sobre la adhesión bacteriana inicial, y largos, para evaluar su influencia sobre la formación del biofilm. El diseño experimental correspondiente a la adsorción de proteínas con la subsecuente evaluación de la adhesión bacteriana y la formación del

---

biofilm, así como los controles realizados sin proteína adsorbida, fue detallado en el Capítulo 1 (ver apartado 1.3.9). Con el fin de estudiar la adhesión bacteriana inicial y la formación del biofilm, se realizó una evaluación cuantitativa mediante el conteo de las bacterias vivas adheridas por Microscopía Confocal de Fluorescencia para las distintas condiciones de adsorción de ALB. Por otra parte, la morfología de las bacterias adheridas fue estudiada por Microscopía Electrónica de Barrido.

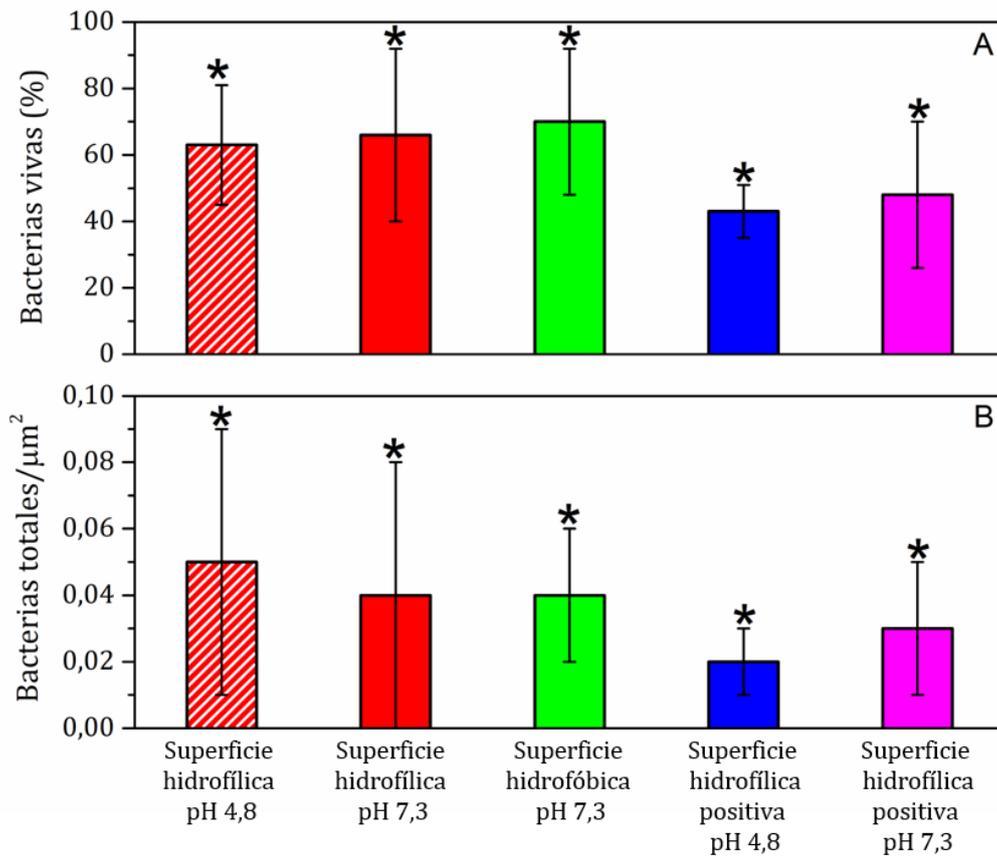
En primer lugar, se evaluó la influencia de las propiedades fisicoquímicas superficiales (carga e hidrofobicidad) en la adhesión bacteriana inicial sobre superficies sin proteína adsorbida previamente. En segundo lugar, se estudió el efecto de la adsorción de ALB sobre la adhesión inicial y, posteriormente, sobre la formación del biofilm de *S. aureus*.

### **2.2.2.1 Adhesión bacteriana inicial sobre superficies sin proteína adsorbida**

Las interacciones físicas asociadas a la adhesión bacteriana entre una célula y una superficie plana incluyen las fuerzas de van der Waals, las interacciones estéricas y las interacciones electrostáticas, conocidas colectivamente como las fuerzas de DVLO (Derjaguin, Verwey, Landau y Overbeek) [39,40]. Hay evidencia que la adhesión bacteriana se puede controlar variando las propiedades superficiales como hidrofobicidad y carga [39–42]. En particular, una superficie cargada positivamente puede potenciar la adhesión bacteriana [40,42], así como el carácter hidrofóbico puede potenciar o inhibir la adhesión bacteriana dependiendo de la hidrofobicidad de la pared bacteriana [39,41]. En base a estos estudios, se propuso estudiar el efecto que presentan dichas propiedades fisicoquímicas en las superficies de sílica sobre la adhesión de *S. aureus*. Para ello, las superficies de sílica fueron modificadas

químicamente (ver apartado 1.3.1, Capítulo 1). Por un lado, con diclorodimetilsilano, utilizando la misma estrategia de modificación superficial para aumentar la hidrofobicidad que se empleó para evaluar la adsorción de ALB sobre superficies hidrofóbicas. Por otro lado, se formó una SAM por silanización de las superficies para conferirles cargas positivas. Se utilizaron los dos valores de pH estudiados en el diseño factorial de experimentos para la adsorción de ALB (4,8 y 7,3) para evaluar la adhesión bacteriana en las mismas condiciones que luego se estudiarán con ALB previamente adsorbida. Las superficies de sílica sin modificar presentan una carga neta superficial negativa a los dos valores de pH empleados [3]. El potencial zeta de *S. aureus* suspendido en PBS y en TSB resultó ser negativo (ver apartado 1.2.3, Capítulo 1).

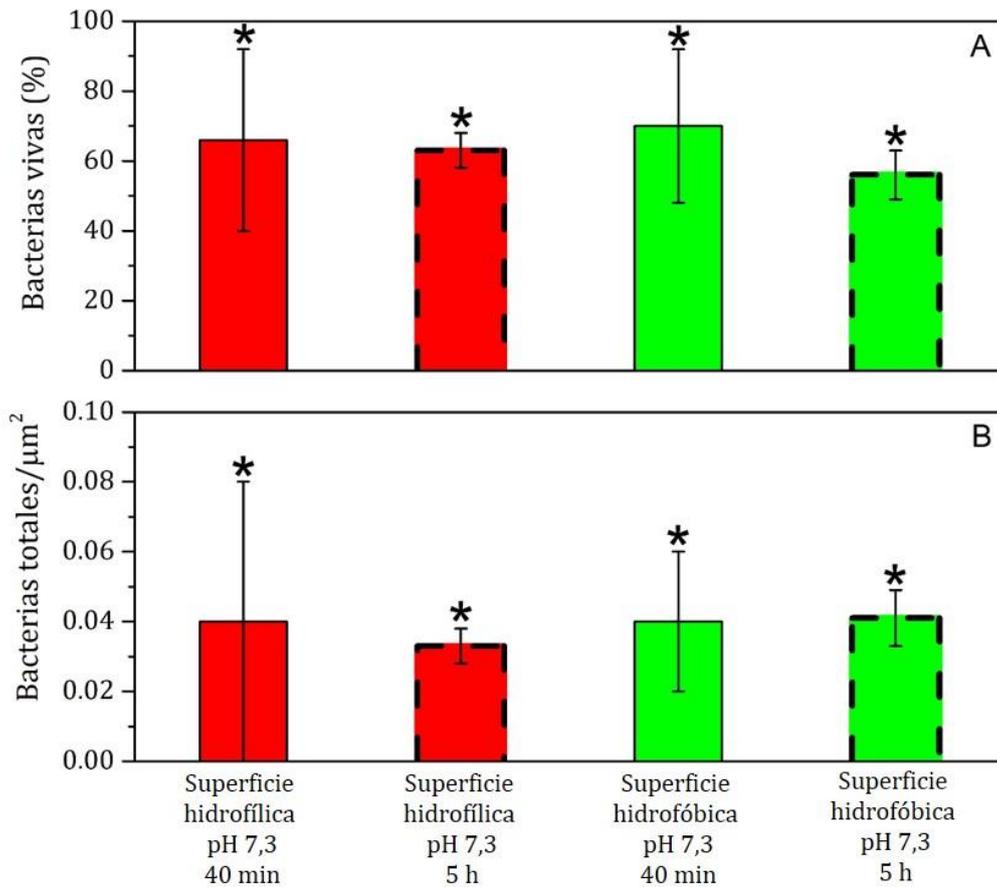
La Figura 2.9 muestra la adhesión bacteriana expresada como porcentaje de bacterias vivas (A) y bacterias totales/ $\mu\text{m}^2$  (B) en función de la carga e hidrofobicidad superficial. El análisis estadístico realizado para cada variable (ANOVA y prueba *a posteriori* de DGC), demuestra que las propiedades superficiales no tienen un efecto significativo en el proceso de adhesión de *S. aureus* en los estadios iniciales. Este hecho sugiere que las interacciones involucradas en el proceso de adhesión de bacterias a una superficie son de distinta naturaleza (van der Waals, electrostáticas, hidrofóbicas [43,44]), de tal forma que la adhesión de *S. aureus* sobre superficies de sílica no puede ser controlada teniendo en cuenta un solo tipo de propiedad superficial (carga o hidrofobicidad).



**Figura 2.9** Porcentaje de bacterias vivas (A) y bacterias totales/ $\mu\text{m}^2$  (B) para *S. aureus* adherida sobre superficies de sílica sin proteína adsorbida, con diferentes propiedades superficiales tras 40 min de adhesión: superficies hidrofílicas (rojo) a pH 4,8 (rayado) y 7,3 (liso), superficies hidrofóbicas a pH 7,3 (verde), superficies hidrofílicas con carga positiva a pH 4,8 (azul) y pH 7,3 (fucsia). Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% y (\*) representa a condiciones con valores  $p > 0,05$ .

Por otra parte, se propuso evaluar el efecto del grado de hidrofobicidad superficial en la adhesión de *S. aureus* a diferentes tiempos de incubación. La Figura 2.10 muestra el porcentaje de bacterias vivas (A) y bacterias totales/ $\mu\text{m}^2$  (B) para la adhesión de *S. aureus* con un tiempo de incubación de 40 min y 5 h sobre superficies hidrofílicas e hidrofóbicas. De igual manera que en el caso anterior, no se evidenciaron diferencias significativas para la cantidad de bacterias vivas, ni para la cantidad de bacterias totales. Esto

refuerza la premisa que las interacciones entre *S. aureus* y las superficies sólidas sin proteína previamente adsorbida son de distinta naturaleza y no sólo dependen de la hidrofobicidad, inclusive a tiempos mayores de incubación. Los valores medios obtenidos para las distintas condiciones evaluadas (0,04 de bacterias totales por  $\mu\text{m}^2$  y 62% de bacterias vivas) se

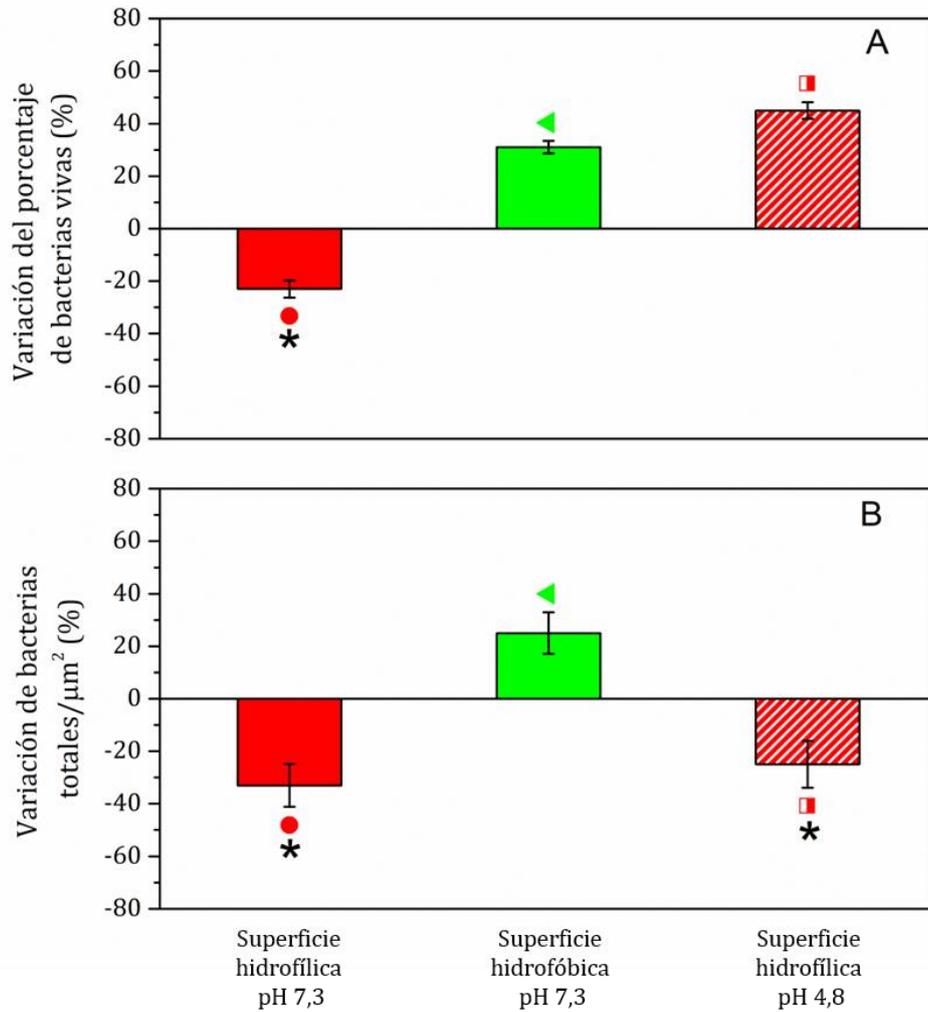


**Figura 2.10** Porcentaje de bacterias vivas (A) y bacterias totales/ $\mu\text{m}^2$ (B) para *S. aureus* adherida sobre superficies de sílica sin proteína adsorbida, con diferentes propiedades superficiales y tiempos de incubación: superficies hidrofílicas a pH 7,3 (rojo) tras 40 min adhesión (borde de trazo liso), tras 5 h de adhesión (borde de trazo rayado) y superficies hidrofóbicas a pH 7,3 (verde) tras 40 min adhesión (borde de trazo liso), con 5 h de adhesión (borde de trazo rayado). Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% y (\*) representa a condiciones con valores  $p > 0,05$ .

emplearán en adelante como valores de referencia para calcular la variación en la adhesión sobre superficies con diferentes condiciones de proteínas adsorbidas.

### 2.2.2.2 Adhesión bacteriana inicial

Para estudiar el efecto de ALB adsorbida sobre la adhesión de *S. aureus*, se seleccionaron tres condiciones experimentales de la gran cantidad de combinaciones de factores en los experimentos de adsorción-desorción de ALB que fueron exploradas en la primera parte del trabajo. Estas condiciones elegidas resultan en valores muy diferentes de  $\Gamma_{\text{rem}}$ : cantidad adsorbida remanente baja (●), intermedia (◀) y alta (■). Esta selección representa tanto a superficies hidrofílicas como hidrofóbicas y abarca todos los factores experimentales explorados. Por lo tanto,  $\Gamma_{\text{rem}}$  baja ( $0,04 \pm 0,02 \text{ mg/m}^2$ ) fue elegida de la superficie hidrofílica a pH 7,3 ( $C_p = 0,100 \text{ mg/ml}$ -  $v_f = 0,02 \text{ ml/s}$ - tiempo de adsorción = 50 s),  $\Gamma_{\text{rem}}$  intermedia ( $0,92 \pm 0,09 \text{ mg/m}^2$ ) fue elegida de la superficie hidrofóbica ( $C_p = 0,005 \text{ mg/ml}$ -  $v_f = 0,10 \text{ ml/s}$ - tiempo de adsorción = 300 s) y  $\Gamma_{\text{rem}}$  alta ( $2,93 \pm 0,01 \text{ mg/m}^2$ ) de la superficie hidrofílica a pH 4,8 ( $C_p = 0,100 \text{ mg/ml}$ -  $v_f = 0,02 \text{ ml/s}$ - tiempo de adsorción = 300 s). La Figura 2.11 muestra la variación del porcentaje de bacterias vivas (A) y de bacterias totales/ $\mu\text{m}^2$  (B) para la adhesión de *S. aureus* sobre superficies con ALB adsorbida en estas tres condiciones respecto a superficies sin proteína adsorbida. Por lo tanto, los resultados positivos indican un aumento en el número de bacterias vivas adheridas a las superficies con ALB adsorbida previamente en comparación con las superficies sin proteína adsorbida, mientras que, los resultados negativos indican una inhibición en la adhesión de bacterias vivas de *S. aureus*. La condición experimental que conduce a una



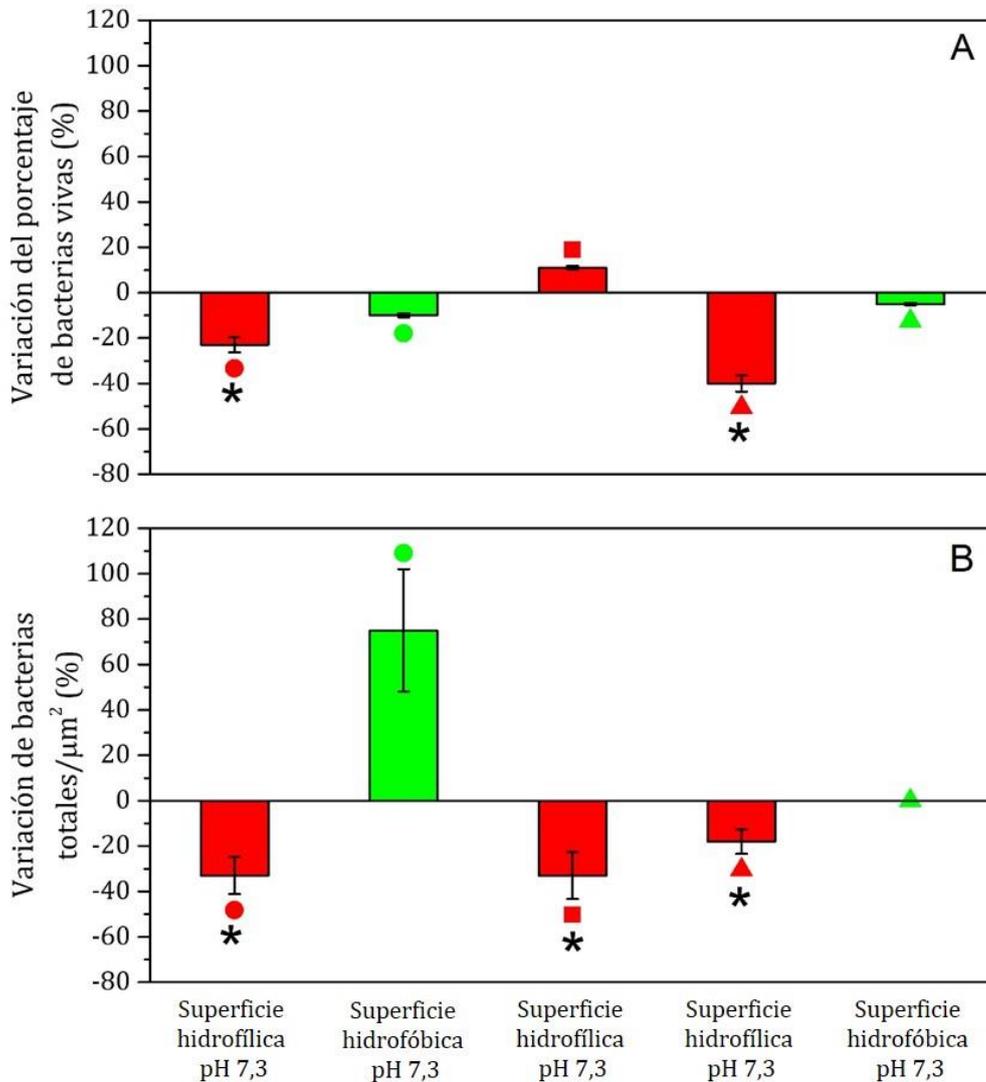
**Figura 2.11** Variación del porcentaje de bacterias vivas (A) y de bacterias totales/ $\mu\text{m}^2$  (B) para *S. aureus* adherida sobre superficies con ALB adsorbida (respecto a superficies sin ALB adsorbida) tras 40 min de adhesión: superficies hidrofílicas (rojo) a pH 4,8 (rayado) y 7,3 (liso) y superficies hidrofóbicas a pH 7,3 (verde). La forma de los símbolos representa la combinación de los factores estudiados,  $C_p$ ,  $v_f$  y tiempo de adsorción, respectivamente: (●) 0,100 mg/ml-0,02 ml/s-50 s, (◄) 0,005 mg/ml-0,10 ml/s-300 s, (■) 0,100 mg/ml-0,02 ml/s-300 s. Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% y (\*) representa a condiciones con valores  $p > 0,05$ .

$\Gamma_{\text{rem}}$  menor ( $0,04 \pm 0,02 \text{ mg/m}^2$ ) constituye la única condición que ocasiona una disminución, tanto en la proporción de bacterias vivas como en las bacterias totales adheridas. Las diferencias observadas en las diferentes superficies denotan la influencia de la cantidad adsorbida y del estado de relajación de la

proteína en la adhesión bacteriana. Estos resultados indican claramente que la adhesión bacteriana puede ser minimizada al variar las características de la película adsorbida de proteína.

Considerando como referencia a la combinación factorial que logró minimizar la adhesión bacteriana correspondiente a una menor  $\Gamma_{rem}$ , se estudiaron ligeras variaciones en las condiciones experimentales de adsorción con el fin de explorar si es posible minimizar aún más la respuesta hacia la adhesión de *S. aureus*. La Figura 2.12 muestra la variación del porcentaje de bacterias vivas (A) y de bacterias totales/ $\mu\text{m}^2$  (B) para la adhesión de *S. aureus* sobre superficies con ALB adsorbida en diferentes condiciones respecto a superficies sin proteína adsorbida. Tomando como referencia a la condición de adsorción de la superficie hidrofílica a pH 7,3 con la que se obtuvo la mejor respuesta bacteriana ( $C_p = 0,100 \text{ mg/ml}$ - $v_f = 0,02 \text{ ml/s}$ -tiempo de adsorción = 50 s) fueron definidas las otras condiciones con ALB adsorbida: la misma combinación factorial cambiando por una superficie hidrofóbica (●), utilizando un tiempo de adsorción mayor (■), reproduciendo una  $\Gamma_{rem}$  baja mediante la reducción en la  $C_p$  (▲) y además, esta última combinación factorial fue evaluada sobre una superficie hidrofóbica (▲). Ninguna de las condiciones de adsorción de ALB evaluadas logra alcanzar un menor número de bacterias totales adheridas o de proporción de bacterias vivas respecto a la primera condición de la figura (●), que corresponde a la menor  $\Gamma_{rem}$ . Sin embargo, una condición de adsorción logra igualar los resultados en ambas variables de adhesión (▲) según el análisis estadístico y, coincidentemente, corresponde a un valor de  $\Gamma_{rem}$  de  $0,04 \text{ mg/m}^2 (\pm 0,02 \text{ mg/m}^2)$ . Los valores de  $\Gamma_{rem}$  resultantes de las restantes condiciones de adsorción evaluadas son mayores, aproximadamente  $0,7 \text{ mg/m}^2$  (● y ■), y  $0,21 \text{ mg/m}^2 (\pm 0,02 \text{ mg/m}^2)$ ,

▲). Estos resultados indican que la  $\Gamma_{rem}$  es un parámetro adecuado para relacionar el proceso de adsorción de ALB y la adhesión de *S. aureus*. En

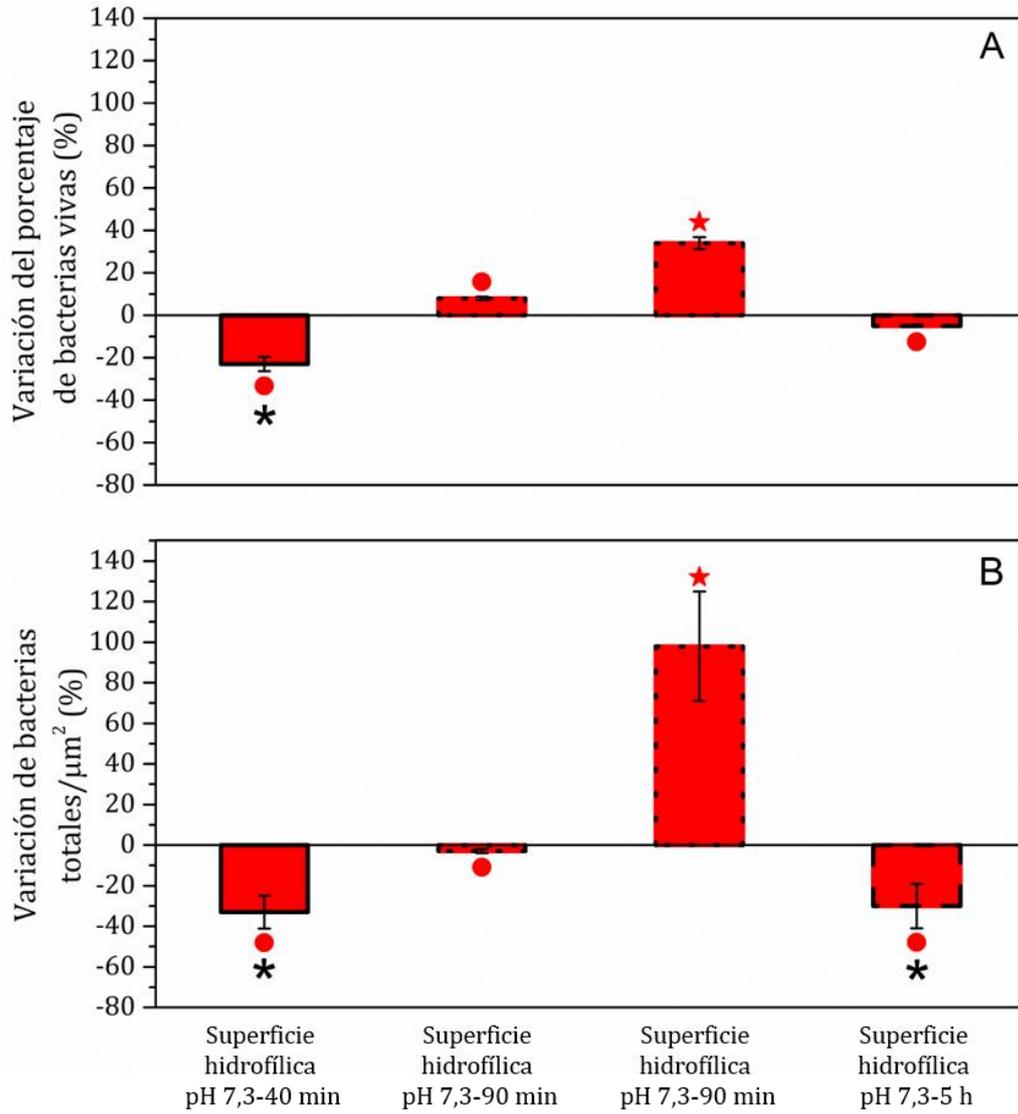


**Figura 2.12** Variación del porcentaje de bacterias vivas (A) y de bacterias totales/μm<sup>2</sup> (B) para *S. aureus* adherida sobre superficies con ALB adsorbida (respecto a superficies sin ALB adsorbida) tras 40 min de adhesión: superficies hidrofílicas a pH 7,3 (rojo) y superficies hidrofóbicas a pH 7,3 (verde). La forma de los símbolos representa la combinación de los factores estudiados,  $C_p$ ,  $v_f$  y tiempo de adsorción, respectivamente: (●) 0,100 mg/ml-0,02 ml/s-50 s, (■) 0,100 mg/ml-0,02 ml/s-300 s, (▲) 0,005 mg/ml-0,02 ml/s-50 s. Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% y (\*) representa a condiciones con valores  $p > 0,05$ .

---

consecuencia, es posible minimizar la adhesión inicial de *S. aureus* en situaciones particulares de adsorción de ALB, y esta menor adhesión bacteriana puede deberse al estado de relajación alcanzado por la población de proteína que no se puede desorber por dilución. Este hecho sugiere una relación entre el estado de relajación de las moléculas de ALB en la superficie y la cantidad de bacterias vivas adheridas.

Con el objetivo de analizar la inhibición en la adhesión bacteriana a tiempos más largos de incubación (90 min y 5 h), se evaluó la condición experimental que logra una mayor inhibición a tiempos cortos (superficie hidrofílica a pH 7,3,  $C_p = 0,100$  mg/ml- $v_f = 0,02$  ml/s-tiempo de adsorción = 50 s, ●). Asimismo, se estudió el efecto del modo de obtención de la película de ALB adsorbida (condiciones cinéticas controladas vs. inmersión de la superficie en solución de ALB  $C_p = 0,100$  mg/ml durante 50 s) sobre la adhesión bacteriana. La Figura 2.13 muestra la variación del porcentaje de bacterias vivas (A) y de bacterias totales/ $\mu\text{m}^2$  (B) respecto a superficies sin proteína adsorbida, para la adhesión de *S. aureus* sobre superficies con ALB adsorbida en estas condiciones, tomando en consideración a la condición que produce inhibición en la adhesión con un tiempo de incubación de 40 min. Cuando la adsorción se produce por inmersión de la superficie en solución de ALB, aumenta considerablemente la adhesión de bacterias totales, así como la fracción de bacterias vivas. Esto indica que es necesario controlar la cinética del proceso de adsorción de la proteína para inhibir la adhesión de *S. aureus* sobre la superficie, posiblemente debido a que la cantidad adsorbida y la conformación de las proteínas adsorbidas en ambas condiciones son diferentes. De hecho, las condiciones hidrodinámicas controladas implican que es posible controlar la velocidad de llenado de la superficie y "condicionar" la relajación superficial. Al comparar la condición en la cual la ALB se adsorbe



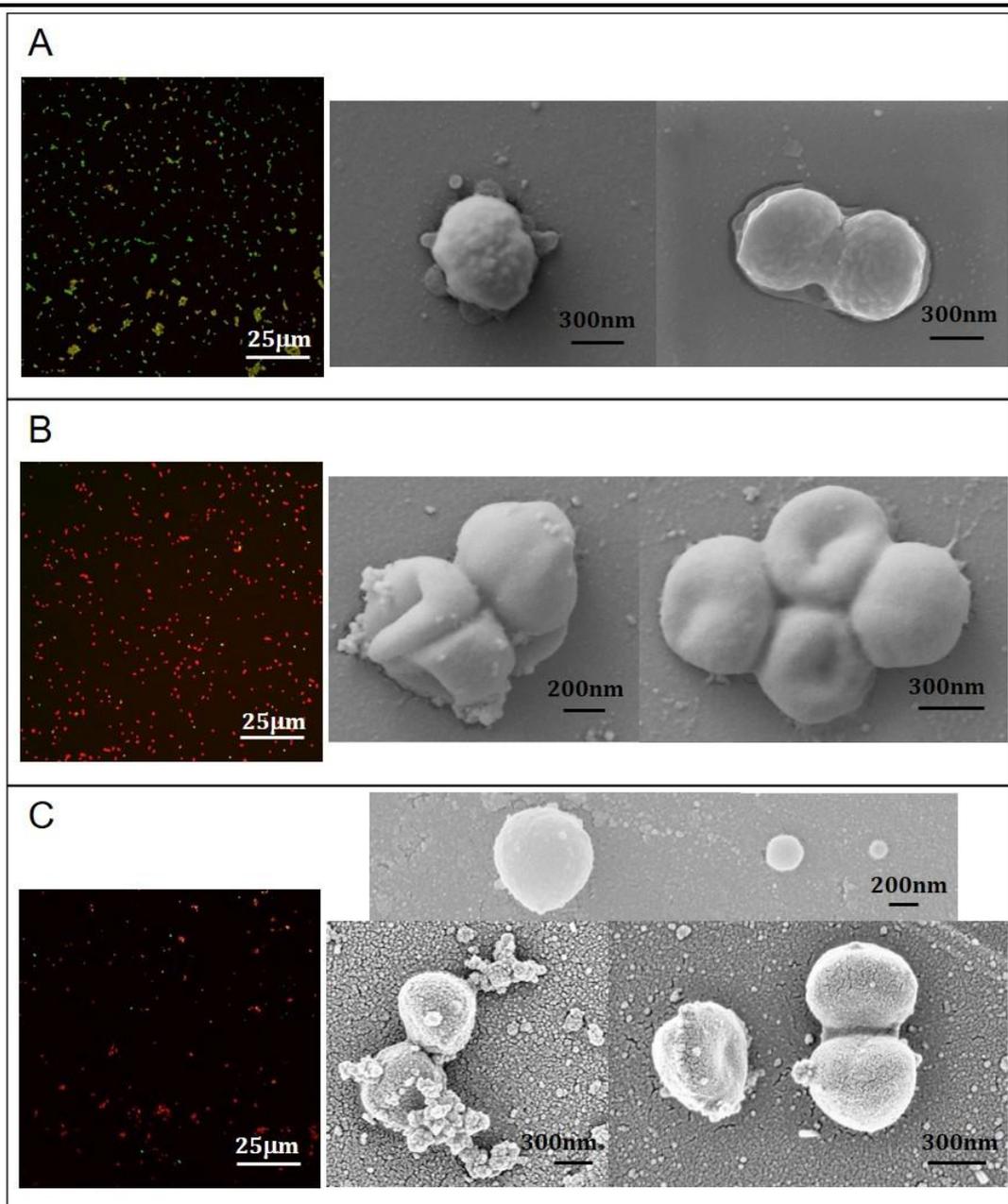
---

en condiciones cinéticas controladas en función del tiempo de incubación, se observa una menor inhibición en la adhesión bacteriana al aumentar el tiempo de incubación con *S. aureus*, con la misma cantidad de bacterias totales adheridas, pero mayor proporción de bacterias vivas. Esto puede deberse a que, en virtud de la naturaleza de las interacciones inespecíficas involucradas en los estadios iniciales de la adhesión bacteriana, puede ocurrir el desprendimiento de células bacterianas de la superficie [39,41,45]. En particular, se desprenderán con mayor facilidad las bacterias muertas, ya que pueden experimentar menor fuerza de adhesión con la superficie [45]. En consecuencia, la variación en la fuerza de adhesión sería la responsable de las diferencias observadas en la adhesión bacteriana con el tiempo de incubación.

Para estudiar la morfología de las bacterias adheridas sobre las superficies con ALB adsorbida en las condiciones que inhiben la adhesión bacteriana, así como la diferencia entre la morfología de las bacterias adheridas vivas y muertas, se utilizó la Microscopía Electrónica de Barrido. Para este propósito, luego de la incubación de las superficies con ALB adsorbida con la suspensión de *S. aureus*, las muestras se prepararon según lo detallado en el apartado 1.3.11 del Capítulo 1 para visualizarlas bajo esta microscopía. Como un control positivo de la morfología de las bacterias vivas se empleó una condición de adsorción de ALB en la cual se adhiere una alta proporción de bacterias vivas (83±5%) tras 90 min de adhesión. En particular, la adsorción de ALB se realizó mediante la inmersión de las superficies en la solución de proteína ( $C_p = 0,100$  mg/ml-inmersión en la solución de ALB-tiempo de adsorción = 50 s). Por otra parte, como un control negativo de la morfología de las bacterias vivas se empleó la misma condición de adsorción, pero, tras 90 min de incubación con la suspensión bacteriana, se realizó una incubación en PBS a temperatura ambiente toda la noche. De esta manera, el

tiempo adicional de incubación en PBS induce la muerte bacteriana. Este hecho fue comprobado por Microscopía Confocal de Fluorescencia.

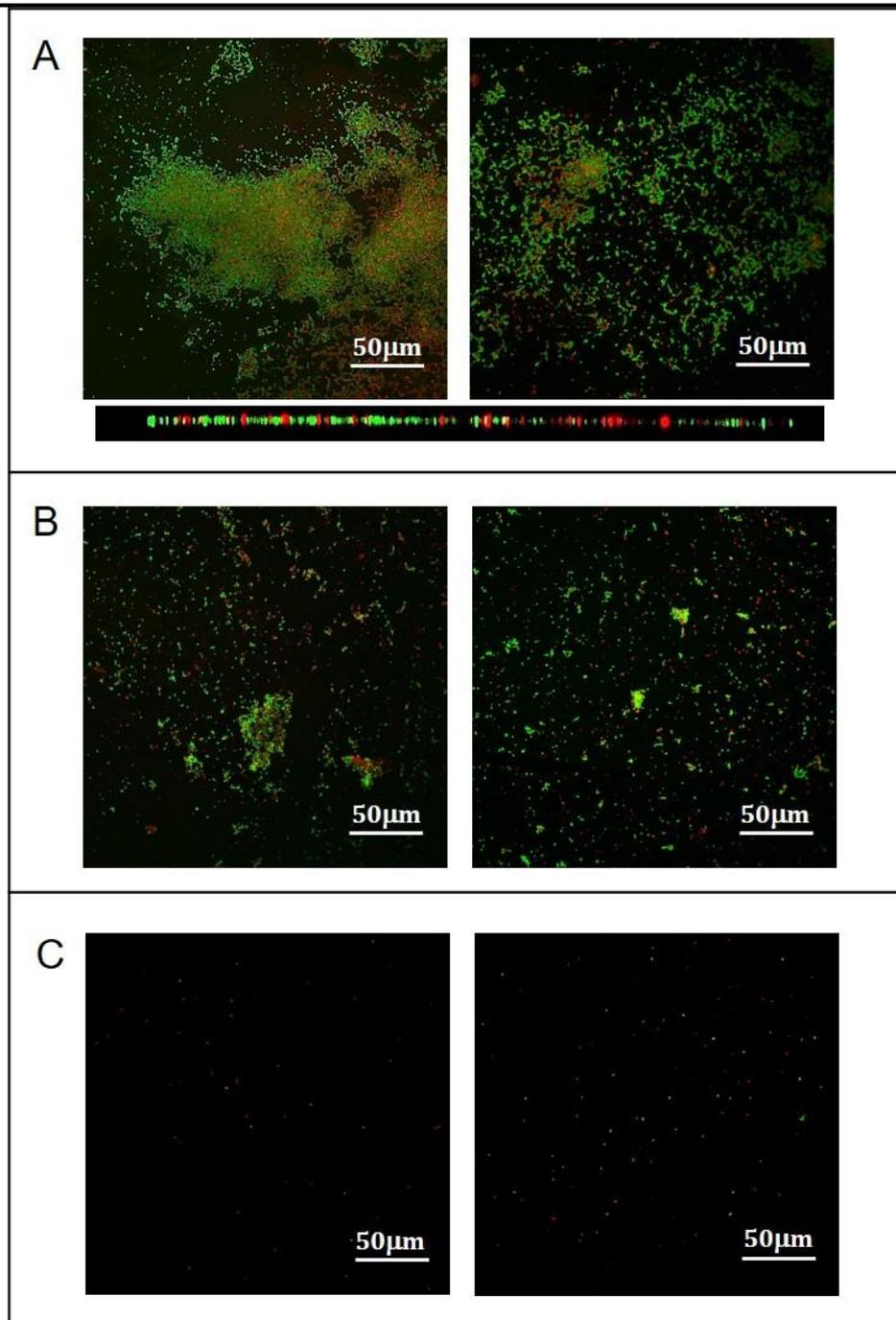
La Figura 2.14 presenta las imágenes de Microscopía Confocal de Fluorescencia y de Microscopía Electrónica de Barrido de *S. aureus* adherida sobre superficies hidrofílicas a pH 7,3 con ALB adsorbida. El panel A corresponde al control positivo de la viabilidad bacteriana, el panel B al control negativo y, por último, el panel C a la condición de adsorción que produjo inhibición de la adhesión bacteriana a 40 min de incubación ( $C_p = 0,100 \text{ mg/ml}$ -  $v_f = 0,02 \text{ ml/s}$ -tiempo de adsorción=50 s). En el panel A, las imágenes de Microscopía Electrónica muestran células simétricas de morfología conservada y pared celular intacta y uniforme, acorde con la imagen de Microscopía Confocal de Fluorescencia. En el panel B, se evidencian bacterias de morfología asimétrica con pared celular irregular con perturbaciones, lo que sugiere la pérdida del contenido citoplasmático en acuerdo con la pérdida de integridad celular y acorde a la imagen obtenida por Microscopía Confocal de Fluorescencia. Esto demuestra la diferente morfología de las bacterias vivas adheridas respecto de las muertas. Finalmente, en el panel C, para la condición de adsorción de ALB que minimiza la adhesión bacteriana, se observan células adheridas con cierta asimetría, además de restos de contenido celular y gran heterogeneidad en el tamaño celular (de 100 a 600 nm). De esta manera, se observa que la mayoría de las células presenta una morfología similar a la de las células muertas adheridas sobre la superficie.



**Figura 2.14** Imágenes de Microscopía Confocal de Fluorescencia y de Microscopía Electrónica de Barrido de *S. aureus* sobre superficies hidrofílicas a pH 7,3 con ALB adsorbida. (A) Control positivo (B) Control negativo (C) Condición de adsorción:  $C_p = 0,100$  mg/ml-  $v_f = 0,02$  ml/s-tiempo de adsorción=50 s

### 2.2.2.3 Formación del biofilm

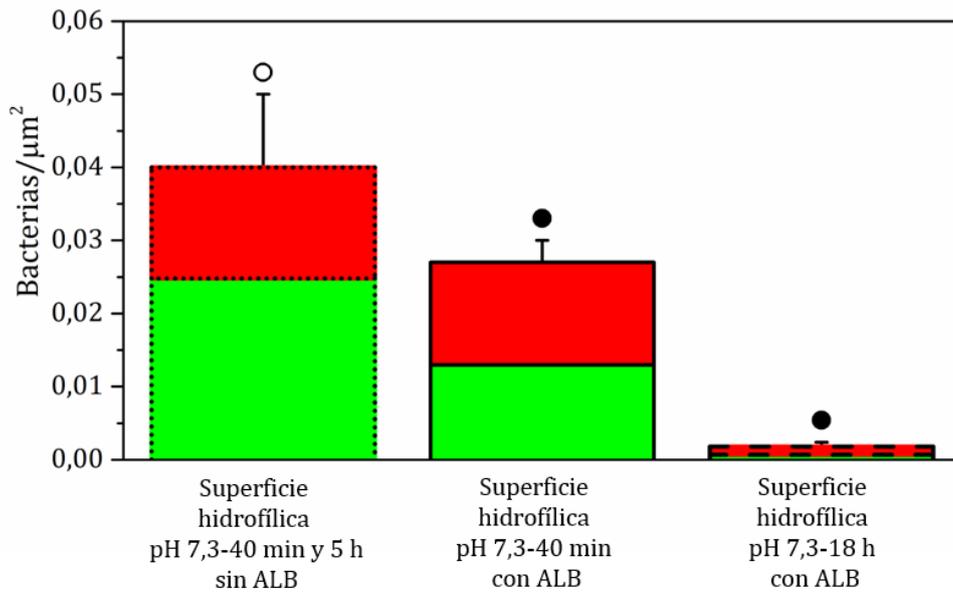
Esta cepa bacteriana de *S. aureus* es capaz de formar biofilm sobre las superficies de sílica, tanto en caldo triptona soja (TSB), como en PBS de a 7,3 como fue demostrado en el apartado 1.3.8 del Capítulo 1. Para evaluar si la adsorción de ALB que resulta en un  $\Gamma_{rem} = 0,04 \text{ mg/m}^2$  y que logra minimizar la adhesión bacteriana inicial es también efectiva inhibiendo la formación del biofilm de *S. aureus*, se estudió la adhesión de esta bacteria a tiempos de incubación más largos mediante Microscopía Confocal de Fluorescencia (ver apartado 1.3.8, Capítulo 1). La Figura 2.15 muestra las imágenes obtenidas para *S. aureus* adherida sobre superficies hidrofílicas a pH 7,3 en medio de cultivo TSB (A), en PBS (B), y en PBS previa adsorción de ALB en las condiciones de adsorción:  $C_p = 0,100 \text{ mg/ml}$ -  $v_f = 0,02 \text{ ml/s}$ - tiempo de adsorción=50 s (C). En el panel A se evidencia crecimiento en biofilm para la bacteria en caldo de cultivo, con crecimiento en forma de césped. Para evaluar si hubo crecimiento bacteriano en multicapas, se tomó una imagen mediante un corte transversal próximo a la superficie y no se encontró más de una capa de células sobre la superficie, lo que indica que el biofilm formado es plano. En el panel B, pueden apreciarse microcolonias de *S. aureus*, las cuales corresponden a la etapa previa a la formación de un biofilm maduro. Este comportamiento concuerda con el ensayo realizado para evaluar la formación del biofilm (ver apartado 1.3.8, Capítulo 1) en donde se afirmó que en PBS a pH 7,3 las células se encontrarían en etapas tempranas de formación del biofilm. Por último, para las superficies con ALB adsorbida en condiciones cinéticas controladas, sólo se observan algunas células adheridas, demostrando la inhibición en la formación del biofilm de esta bacteria sobre la superficie.



**Figura 2.15** Imágenes de Microscopía Confocal de Fluorescencia de *S. aureus* sobre superficies hidrofílicas a pH 7,3 en condiciones capaces de formar biofilm: (A) en TSB (B) en PBS (C) en PBS con ALB adsorbida:  $C_p = 0,100$  mg/ml-  $v_f = 0,02$  ml/s-tiempo de adsorción=50 s

Por otra parte, se evaluó de forma cuantitativa la inhibición en la adhesión bacteriana en función del tiempo de incubación para la condición

experimental que logra minimizar la adhesión bacteriana inicial y la formación del biofilm ( $C_p = 0,100$  mg/ml-  $v_f = 0,02$  ml/s-tiempo de adsorción=50 s). La Figura 2.16 muestra el número de bacterias/ $\mu\text{m}^2$ , diferenciando bacterias muertas (rojas) de vivas (verdes), para la adhesión de *S. aureus* con un tiempo de incubación de 40 min y 18 h sobre superficies hidrofílicas con ALB adsorbida en esta condición. En la figura también se incluyen los datos de referencia para superficies sin proteína adsorbida con tiempos de incubación de 40 min y 5 h (ver Figura 2.10). Al aumentar el tiempo de incubación en la adhesión bacteriana sobre superficies con ALB adsorbida, disminuye considerablemente el número de bacterias adheridas. Esto implica que la



**Figura 2.16** Bacterias vivas/ $\mu\text{m}^2$  (verdes) y muertas/ $\mu\text{m}^2$  (rojas) para *S. aureus* adherida sobre superficies hidrofílicas a pH 7,3 tras 40 min adhesión (borde de trazo liso), tras 40 min y 5 h de adhesión (borde punteado) y tras 18 h de adhesión (borde de trazo rayado). La forma de los símbolos representa la combinación de los factores estudiados,  $C_p$ ,  $v_f$  y tiempo de adsorción respectivamente, si corresponde: (○) superficies sin ALB adsorbida (●) superficies con ALB adsorbida: 0,100 mg/ml-0,02 ml/s-50 s. Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95%.

---

inhibición en la adhesión inicial provocada por la proteína adsorbida en estado relajado se mantiene en el tiempo, de manera tal que se minimiza aún más la adhesión. Estos resultados demuestran que la colonización superficial de *S. aureus* puede controlarse mediante la adsorción de ALB en condiciones tales en que se promueva la conformación relajada de la proteína sobre la superficie. Además, estos resultados, en consonancia con los resultados de adhesión bacteriana inicial para diferentes tiempos de incubación, demuestran que la adhesión bacteriana involucrada en superficies con ALB adsorbida está mediada por interacciones fisicoquímicas no específicas que pueden dar lugar al desprendimiento de las células bacterianas.

### 2.3 Conclusiones

Se establece una relación entre el proceso de adsorción-desorción de ALB sobre superficies de sílica con la adhesión de *S. aureus* mediante el empleo de un diseño factorial de experimentos, con el fin de optimizar el proceso de adsorción para minimizar la adhesión bacteriana. La velocidad del proceso de adsorción de ALB sobre superficies de sílica es controlada por la interacción proteína-superficie, ya sea por medio de interacciones electrostáticas o hidrofóbicas. A su vez, las interacciones de las moléculas de ALB sobre superficies hidrofóbicas producen una adsorción más rápida que sobre superficies hidrofílicas. Por otra parte, el comportamiento observado a partir de la evaluación de la cantidad adsorbida se explica mediante un aumento del área de contacto de las primeras moléculas de ALB adsorbida, ocasionado por su relajación, ya sea por interacciones hidrofóbicas o electrostáticas. A su vez, el proceso de relajación depende del espacio disponible, es decir, del cubrimiento superficial. En consecuencia, a bajo grado de cubrimiento, el estado relajado de las moléculas adsorbidas es mayor.

Por otra parte, como resultado de la optimización del proceso de adsorción respecto a minimizar la adhesión bacteriana se observa que el proceso de adhesión de *S. aureus* presenta una fuerte dependencia con la presencia de moléculas de ALB adsorbida sobre la superficie, con las cuales establece interacciones inespecíficas. De hecho, se observa una clara relación entre el estado relajado de las moléculas de ALB adsorbidas sobre la superficie y la cantidad de bacterias vivas adheridas. Los cambios estructurales que sufre la molécula de ALB durante la relajación superficial dependen de las propiedades fisicoquímicas superficiales y del control cinético del proceso de adsorción tendiente a lograr la menor  $\Gamma_{rem}$ . Estos cambios conducen a minimizar la adhesión bacteriana, tanto en su etapa inicial como en la formación del biofilm. Los resultados de este capítulo, sientan las bases para proponer estrategias de biofuncionalización superficial para inhibir la adhesión de *S. aureus*, donde las condiciones de biofuncionalización deben tener en cuenta, en particular, el estado superficial de ALB, vinculado con la relajación y la estructura de las moléculas de proteína.

---

## Referencias

- [1] W. Norde, J. Buijs, H. Lyklema, Adsorption of globular proteins, in: J. Lyklema (Ed.), *Fundam. Interface Colloid Sci.*, Elsevier, 2005: p. 3.1–3.59. doi:10.1016/S1874-5679(05)80007-8.
- [2] W. Norde, Adsorption of (Bio)Polymers, with Special Emphasis on Globular Proteins, in: *Colloids Interfaces Life Sci.*, Marcel Dekker, New York, EEUU, 2003: p. 15.1–15.7. doi:10.1201/9780203912157.ch15.
- [3] N.G. Hoogeveen, M.A. Cohen Stuart, G.J. Fleer, Polyelectrolyte Adsorption on Oxides. I. Kinetics and Adsorbed Amounts, *J. Colloid Interface Sci.* 182 (1996) 133–145. doi:10.1006/jcis.1996.0444.
- [4] V. Krisdhasima, P. Vinaraphong, J. McGuire, Adsorption kinetics and elutability of  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -Casein,  $\beta$ -Lactoglobulin, and bovine serum albumin at hydrophobic and hydrophilic interfaces, *J. Colloid Interface Sci.* 161 (1993) 325–334. doi:10.1006/jcis.1993.1474.
- [5] W. Mientus, E. Knippel, Theoretical modelling of plasma protein adsorption/ desorption processes onto solid surfaces, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 7 (1995) 401–414. doi:10.1163/156856295X00418.
- [6] C.F. Wertz, M.M. Santore, Effect of Surface Hydrophobicity on Adsorption and Relaxation Kinetics of Albumin and Fibrinogen: Single-Species and Competitive Behavior, *Langmuir* 17 (2001) 3006–3016. doi:10.1021/la0017781.
- [7] J. Rodríguez-Sánchez, A.M. Gallardo-Moreno, J.M. Bruque, M.L. González-Martín, Adsorption of human fibrinogen and albumin onto hydrophobic and hydrophilic Ti6Al4V powder, *Appl. Surf. Sci.* 376 (2016) 269–275. doi:10.1016/j.apsusc.2016.03.014.
- [8] P. Moazzam, A. Razmjou, M. Golabi, D. Shokri, A. Landarani-Isfahani, Investigating the BSA protein adsorption and bacterial adhesion of Al-alloy surfaces after creating a hierarchical (micro/nano) superhydrophobic structure, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 104 (2016) 2220–2233. doi:10.1002/jbm.a.35751.
- [9] H. Miorner, E. Myhre, L. Bjorck, G. Kronvall, Effect of specific binding of human albumin, fibrinogen, and immunoglobulin G on surface characteristics of bacterial strains as revealed by partition experiments in polymer phase systems, *Infect. Immun.* 29 (1980) 879–885. PMID: 7429636.
- [10] M. Kumari, U.K. Singh, A.B. Khan, M.A. Malik, R. Patel, Effect of bovine serum albumin on the surface properties of ionic liquid-type Gemini surfactant, *J. Dispers. Sci. Technol.* 39 (2018) 1462–1468. doi:10.1080/01932691.2017.1417132.
- [11] J. Shan, C. Kim, Z. Zhang, L. Wang, T. Sun, Adsorption of BSA on Carbon-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Microspheres Activated with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- Carbodiimide Hydrochloride, *J. Wuhan Univ. Technol. Sci. Ed.* 33 (2018) 1–8. doi:10.1007/s11595-018-1777-0.
- [12] L.E. Valenti, P.A. Fiorito, C.D. García, C.E. Giacomelli, The adsorption-desorption process of bovine serum albumin on carbon nanotubes, *J. Colloid Interface Sci.* 307 (2007) 349–356. doi:10.1016/j.jcis.2006.11.046.
- [13] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces, *Adv. Colloid Interface Sci.* 162 (2011) 87–106. doi:10.1016/j.jcis.2010.12.007.

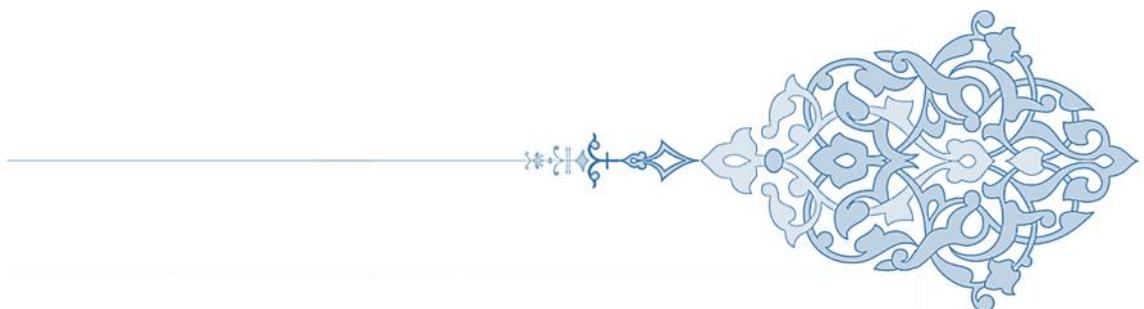
- [14] M. Wahlgren, T. Arnebrant, Protein adsorption to solid surfaces, Trends Biotechnol. 9 (1991) 201–208. doi:10.1016/0167-7799(91)90064-O.
- [15] H. Quiquampoix, R.G. Ratcliffe, A  $^{31}\text{P}$  NMR study of the adsorption of bovine serum albumin on montmorillonite using phosphate and the paramagnetic cation  $\text{Mn}^{2+}$ : modification of conformation with pH, J. Colloid Interface Sci. 148 (1992) 343–352. doi:10.1016/0021-9797(92)90173-J.
- [16] M. Dabgowska, Z. Adamczyk, M. Kujda, Mechanism of HSA adsorption on mica determined by streaming potential, AFM and XPS measurements, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 101 (2013) 442–449. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.07.007.
- [17] C.E. Giacomelli, Tesis doctoral. Propiedades adsorptivas de las interfaces sólidos coloidales-solución acuosa, Universidad Nacional de Córdoba, 1997.
- [18] W. Norde, My voyage of discovery to proteins in flatland... and beyond, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 61 (2008) 1–9. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.09.029.
- [19] W. Norde, J. Lyklema, The Adsorption of Human Plasma Albumin and Bovine Pancreas Ribonuclease at Negatively Charged Polystyrene Surfaces: V Microcalorimetry, J. Colloid Interface Sci. 66 (1978) 285–294. doi:10.1016/0021-9797(78)90303-X.
- [20] Y.I. Tarasevich, L.I. Monakhova, Interaction between Globular Proteins and Silica Surfaces, Colloid J. 64 (2002) 482–487. doi:10.1023/A:101682832.
- [21] Z. Ma, J. Bai, Y. Wang, X. Jiang, Impact of shape and pore size of mesoporous silica nanoparticles on serum protein adsorption and RBCs hemolysis, ACS Appl. Mater. Interfaces. 6 (2014) 2431–2438. doi:10.1021/am404860q.
- [22] T.J. Su, J.R. Lu, R.K. Thomas, Z.F. Cui, Effect of pH on the Adsorption of Bovine Serum Albumin at the Silica/Water Interface Studied by Neutron Reflection, J. Phys. Chem. B. 103 (1999) 3727–3736. doi:10.1021/jp983580j.
- [23] C.E. Giacomelli, W. Norde, The Adsorption–Desorption Cycle. Reversibility of the BSA–Silica System, J. Colloid Interface Sci. 233 (2001) 234–240. doi:10.1006/jcis.2000.7219.
- [24] M.L. Martín, V. Pfaffen, L.E. Valenti, C.E. Giacomelli, Albumin biofunctionalization to minimize the *Staphylococcus aureus* adhesion on solid substrates, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 167 (2018) 156–164. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.04.006.
- [25] L. Valenti, Tesis doctoral. Desde la optimización de la interacción enzima-superficie hacia la obtención de inmunoensayos en fase sólida, Universidad Nacional de Córdoba, 2008.
- [26] W. Norde, C.E. Giacomelli, BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states, J. Biotechnol. 79 (2000) 259–268. doi:10.1016/S0168-1656(00)00242-X.
- [27] E. Herrera, Tesis Doctoral. Diseño y desarrollo de superficies bio-funcionales para la determinación de D-aminoácidos, Universidad Nacional de Córdoba, 2013.
- [28] C.E. Giacomelli, M.J. Avena, C.P. De Pauli, Adsorption of Bovine Serum Albumin onto  $\text{TiO}_2$  Particles, J. Colloid Interface Sci. 188 (1997) 387–395. doi:10.1006/jcis.1996.4750.
- [29] I. Langmuir, The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids (Part I),

- 
- J. Am. Chem. Soc. 38 (1916) 2221–2295. doi:10.1021/ja02268a002.
- [30] W. Norde, Adsorption, in: *Colloids Interfaces Life Sci.*, Marcel Dekker, New York, EEUU, 2003; p. 14.1–14.5. doi:10.1201/9780203912157.ch14.
- [31] W. Norde, C.E. Giacomelli, Conformational changes in proteins at interfaces: From solution to the interface, and back, *Macromol. Symp.* 145 (1999) 125–136. doi:10.1002/masy.19991450114.
- [32] Y. Wei, A.A. Thyparambil, R.A. Latour, Quantification of the influence of protein-protein interactions on adsorbed protein structure and bioactivity, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 110 (2013) 363–371. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.04.018.
- [33] C.E. Giacomelli, M.J. Esplandiú, P.I. Ortiz, M.J. Avena, C.P. De Pauli, Ellipsometric Study of Bovine Serum Albumin Adsorbed onto Ti/TiO<sub>2</sub> Electrodes, *J. Colloid Interface Sci.* 218 (1999) 404–411. doi:10.1006/jcis.1999.6434.
- [34] S. Thakur, N. Hashim, S. Neogi, A.K. Ray, Size-dependent adsorption and conformational changes induced in bovine serum albumin (BSA) on exposure to titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles, *Sep. Sci. Technol.* 52 (2017) 421–434. doi:10.1080/01496395.2016.1257639.
- [35] H. Zhang, Z. Zhu, W. Wang, Z. Fei, J. Cao, Changing the Activities and Structures of Bovine Serum Albumin Bound to Graphene Oxide, *Appl. Surf. Sci.* 427 (2017) 1019–1029. doi:10.1016/j.apsusc.2017.08.130.
- [36] S. Koutsopoulos, K. Patzsch, W.T.E. Bosker, W. Norde, Adsorption of trypsin on hydrophilic and hydrophobic surfaces, *Langmuir*. 23 (2007) 2000–2006. doi:10.1021/la062238s.
- [37] S. Lu, J. He, Z. Liu, Tuning interfacial non-covalent interactions through biomimetic functionalization of inorganic surface: The case of lysozyme and mesocellular silica foam hybrids, *Chem. Eng. J.* 146 (2009) 503–514. doi:10.1016/j.cej.2008.10.032.
- [38] S. Koutsopoulos, A.M. Tjeerdsma, J.F.T. Lieshout, J. van der Oost, W. Norde, In situ structure and activity studies of an enzyme adsorbed on spectroscopically undetectable particles, *Biomacromolecules*. 6 (2005) 1176–1184. doi:10.1021/bm049471u.
- [39] T.R. Garrett, M. Bhakoo, Z. Zhang, Bacterial adhesion and biofilms on surfaces, *Prog. Nat. Sci.* 18 (2008) 1049–1056. doi:10.1016/j.pnsc.2008.04.001.
- [40] K. Hori, S. Matsumoto, Bacterial adhesion: From mechanism to control, *Biochem. Eng. J.* (2010) 424–434. doi:10.1016/j.bej.2009.11.014.
- [41] J.D. Patel, M. Ebert, R. Ward, J.M. Anderson, *S. epidermidis* biofilm formation: Effects of biomaterial surface chemistry and serum proteins, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 80 (2007) 742–751. doi:10.1002/jbm.a.31103.
- [42] B. Fang, S. Gon, M. Park, K.N. Kumar, V.M. Rotello, K. Nusslein, M.M. Santore, Bacterial adhesion on hybrid cationic nanoparticle-polymer brush surfaces: Ionic strength tunes capture from monovalent to multivalent binding, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 87 (2011) 109–115. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.05.010.
- [43] R. Bos, H.C. Van Der Mei, H.J. Busscher, Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - Its mechanisms and methods for study, *FEMS Microbiol. Rev.* (1999) 179–230. doi:10.1016/S0168-6445(99)00004-2.

- [44] A. Roosjen, W. Norde, H.C. Van Der Mei, H.J. Busscher, The use of positively charged or low surface free energy coatings versus polymer brushes in controlling biofilm formation, *Prog. Colloid Polym. Sci.* 132 (2006) 138–144. doi:10.1007/2882\_026.
- [45] Y. Liu, J. Strauss, T.A. Camesano, Adhesion forces between *Staphylococcus epidermidis* and surfaces bearing self-assembled monolayers in the presence of model proteins, *Biomaterials.* 29 (2008) 4374–4382. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.07.044.

# CAPÍTULO 3

## Adsorción de fibrinógeno y adhesión bacteriana





---

## Capítulo 3: Adsorción de fibrinógeno y adhesión bacteriana

### 3.1 Introducción

En el presente Capítulo, se discutirán los resultados concernientes al objetivo de comprender el proceso de adsorción-desorción de FBG sobre superficies de sílica, para optimizar las condiciones de adsorción capaces de inhibir la adhesión de *S. aureus*. En primer lugar, se presentarán los resultados del proceso de adsorción-desorción de FBG sobre superficies de sílica estudiado mediante Reflectometría. El abordaje metodológico difiere del Capítulo anterior en cuanto a que no se utilizó un diseño factorial de experimentos, sino que se realizó una evaluación exhaustiva del proceso de adsorción de FBG, dado que dicho proceso ha sido menos explorado que el de ALB. Para ello, el estudio incluyó una combinación de los resultados experimentales con el modelo presentado en el Capítulo 1. De esta manera, es posible comprender las distintas etapas involucradas en el mecanismo de adsorción de FBG sobre superficies de sílica. A partir de los resultados de este proceso, se evaluará la relación entre la adhesión bacteriana en superficies con FBG adsorbido. En este sentido, en segundo lugar, se estudiará la adhesión de *S. aureus* sobre las superficies con FBG adsorbido empleando Microscopía Confocal de Fluorescencia y Microscopía Electrónica de Barrido, abordando la adhesión bacteriana inicial y la formación del biofilm.

### 3.2 Resultados y Discusión

#### 3.2.1 Estudio del proceso de adsorción de fibrinógeno

Tal como se detalló previamente, el proceso de adsorción de proteínas comprende una serie de etapas, las cuales fueron esquematizadas en la Figura

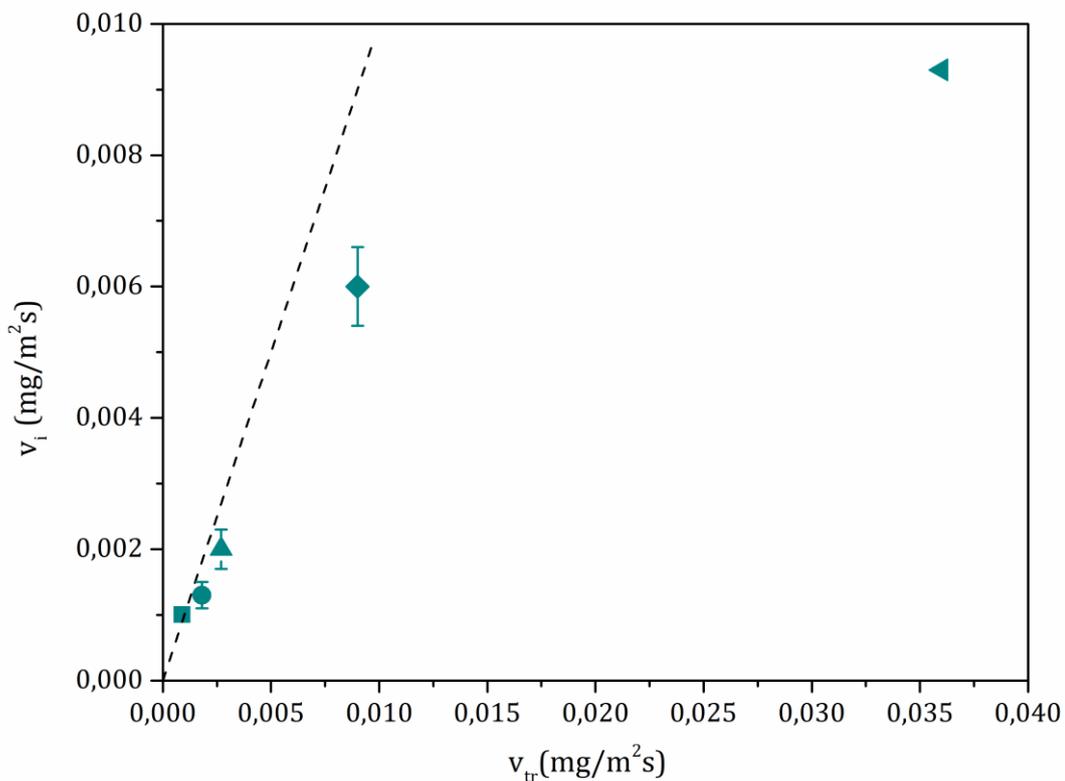
1.4 (Capítulo 1): el transporte desde el seno de la solución hacia la zona próxima a la superficie [1], la interacción con la superficie a través del equilibrio adsorción-desorción [2,3], y la posterior relajación que puede sufrir la molécula una vez adsorbida, para optimizar la interacción con la superficie. La Reflectometría permite estudiar las distintas etapas del proceso de adsorción-desorción de proteínas, ya que permite conocer las contribuciones relativas de cada una de las etapas en el proceso global de adsorción. Para ello, es necesario por un lado evaluar la etapa inicial de adsorción comprendida por el transporte y la interacción con la superficie y, por otro lado, la relación entre el cubrimiento superficial y la relajación de las moléculas. Ambos estudios se abordan a continuación.

Los experimentos se llevaron a cabo tal como fue detallado en el Capítulo 1 y de manera similar a lo realizado para el estudio de adsorción-desorción de ALB en el Capítulo 2. En particular para este sistema, el tiempo de adsorción utilizado fue el necesario para alcanzar el estado estacionario y poder evaluar así la cantidad adsorbida en condiciones de saturación ( $\Gamma_{\text{sat}}$ ). Además, se realizaron experimentos cortos de 300 s de adsorción. Luego, para evaluar la desorción por dilución en PBS, se hizo fluir PBS hacia la celda y no se observó desorción de FBG para ninguno de los casos experimentales estudiados. Al valor de pH 7,3, la molécula de FBG presenta carga neta negativa por estar por arriba de su pI, que tiene un valor de 5,8 [4]. La distribución de carga a este pH es heterogénea, con la carga negativa principalmente localizada en la parte central de la molécula de FBG y la carga positiva a cada extremo de la molécula [4]. La superficie de sílica posee carga neta negativa a dicho valor de pH, dado que su valor de PZC es aproximadamente 2 [5]. Se exploraron diferentes concentraciones de proteína, mientras que la  $v_f$  se mantuvo constante a un valor de 0,02 ml/s. Se analizó la  $v_i$  del FBG, que se

obtiene a partir de la pendiente de la cinética en los primeros segundos y del ajuste de las cinéticas con el modelo propuesto en el Capítulo 1 ( $v_c$ ), y la  $\Gamma$  alcanzada luego de un cierto tiempo de adsorción, para la condición experimental a evaluar.

Como ya fue expuesto en el Capítulo 1, la  $v_i$  está determinada por la etapa de transporte de las moléculas de proteína ( $v_i = v_{tr}$ ) o por la interacción proteína-superficie, es decir el cubrimiento superficial,  $v_c$  ( $v_i < v_{tr}$ ).

La Figura 3.1 muestra la  $v_i$  en función de la  $v_{tr}$ . Los valores de  $v_i$  fueron determinados experimentalmente a partir de la pendiente inicial de las

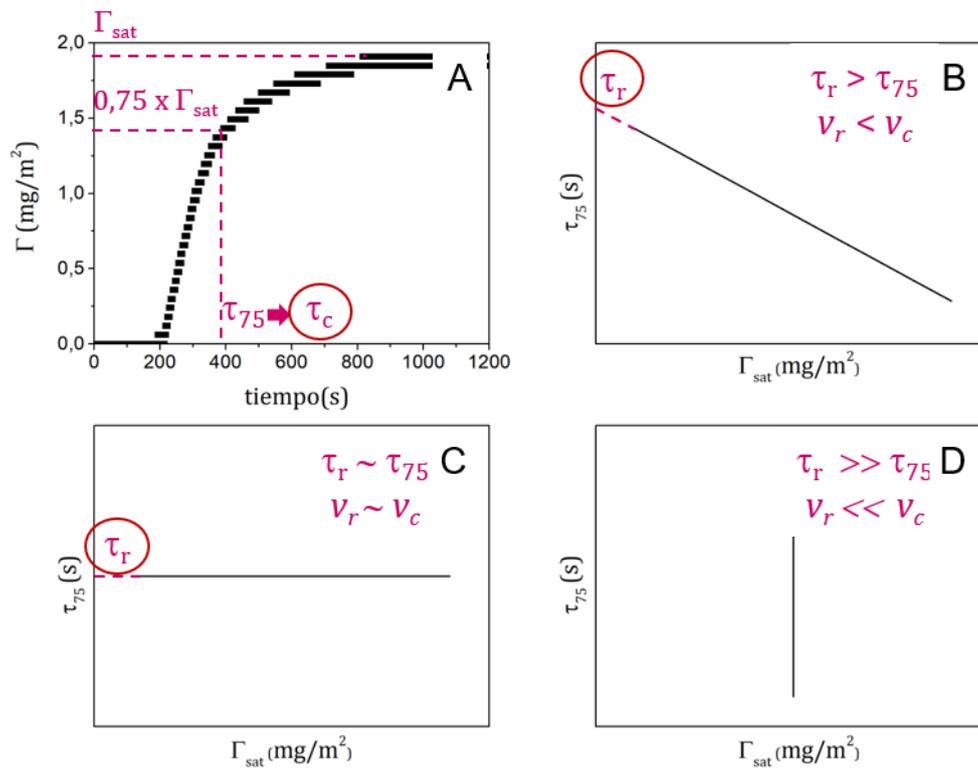


**Figura 3.1** Valores de  $v_i$  en función de la  $v_{tr}$  al variar  $C_p$  en el proceso de adsorción de FBG. La forma de los símbolos representa el valor de  $C_p$  (mg/ml): (■) 0,0005 (●) 0,0010 (▲) 0,0015 (◆) 0,0050 (◄) 0,0200. Las barras de error o el tamaño de los símbolos representan la desviación estándar calculada a partir de duplicados de cada concentración. La línea punteada tiene una pendiente de 1.

curvas de cinética de adsorción de FBG a distinta  $C_p$ , dentro de los 50 s iniciales (según el mejor ajuste lineal) y la  $v_{tr}$  fue calculada a partir de la ecuación (6) del Capítulo 1. En la figura se incluye una recta de pendiente 1 en línea punteada. Los resultados obtenidos pueden clasificarse en dos regímenes: para aquellas  $C_p$  menores a 0,0050 mg/ml  $v_{tr}$  es igual a  $v_i$  y sólo para la  $C_p$  correspondiente a 0,0020 mg/ml  $v_i$  es menor a  $v_{tr}$ . Por lo tanto, la adsorción está controlada por el transporte de las moléculas de FBG a las menores concentraciones, mientras que, la cinética de adsorción se encuentra limitada por un efecto de saturación superficial para la mayor  $C_p$  evaluada.

La optimización de la interacción proteína-superficie puede ocasionar cambios conformacionales desde el estado nativo al estado relajado [2]. El grado de relajación de la biomolécula luego de la adsorción depende de la cohesión interna de la molécula de proteína y de las propiedades químicas del sistema adsorbente/proteína [3]. Con el objetivo de evaluar la contribución del cubrimiento superficial y del proceso de relajación en el proceso global, se puede estudiar la cinética de adsorción a diferente velocidad de flujo [6] o concentración de proteína [7]. El análisis de estos resultados experimentales, puede realizarse cualitativamente o cuantitativamente utilizando un modelo del proceso de adsorción adecuado [3,8,9]. El primer tipo de análisis se puede realizar a partir de la estimación de los tiempos característicos para el cubrimiento y la relajación: tiempo característico de cubrimiento superficial ( $\tau_c$ ) y de relajación ( $\tau_r$ ). Estos parámetros se pueden calcular a partir de las curvas de cinética de adsorción [10]. La Figura 3.2 muestra como estimar  $\tau_c$  (A) y  $\tau_r$  (B, C y D). El panel A muestra como estimar  $\tau_c$  a partir de una curva de cinética de adsorción. En este caso, para evaluar el cubrimiento se eligió el grado de cubrimiento superficial al 75%. De tal manera, se utilizó el tiempo requerido para alcanzar el 75% de la cantidad adsorbida de saturación ( $0,75 \times$

$\Gamma_{sat}$ ), el cual se denomina  $\tau_{75}$  [6], como el modo de estimar el  $\tau_c$  (ver Figura 3.2 A). La relación entre  $\tau_c$  y  $v_c$  es de tal manera que, a menor tiempo de cubrimiento, mayor velocidad de cubrimiento [8]. Por otra parte, en los paneles B, C y D se observa cómo estimar el orden de magnitud de  $\tau_r$ , extrapolando  $\tau_{75}$  para  $\Gamma_{sat} \rightarrow 0$  (condición en la cual las moléculas tienen suficiente espacio para la relajación) a partir del gráfico  $\tau_{75}$  en función de la  $\Gamma_{sat}$  [6,11]. La relación entre  $\tau_r$  y  $v_r$  resulta de tal manera que, a menor tiempo de relajación, mayor velocidad para este proceso [8]. De esta forma, se puede obtener información acerca del grado de relajación mediante la comparación entre  $v_r$  y  $v_c$  por la comparación de sus tiempos característicos  $\tau_r$  y  $\tau_{75}$  presentándose diversas alternativas. Puede ocurrir que, el  $\tau_r$  resulte mayor que  $\tau_{75}$  (ver Figura 3.2 B), es decir, que el proceso de adsorción sea más



**Figura 3.2** Cinética de adsorción en condiciones de estado estacionario (A)  $\tau_{75}$  en función de la  $\Gamma_{sat}$  para distintos sistemas adsorbato/superficie (B, D y E).

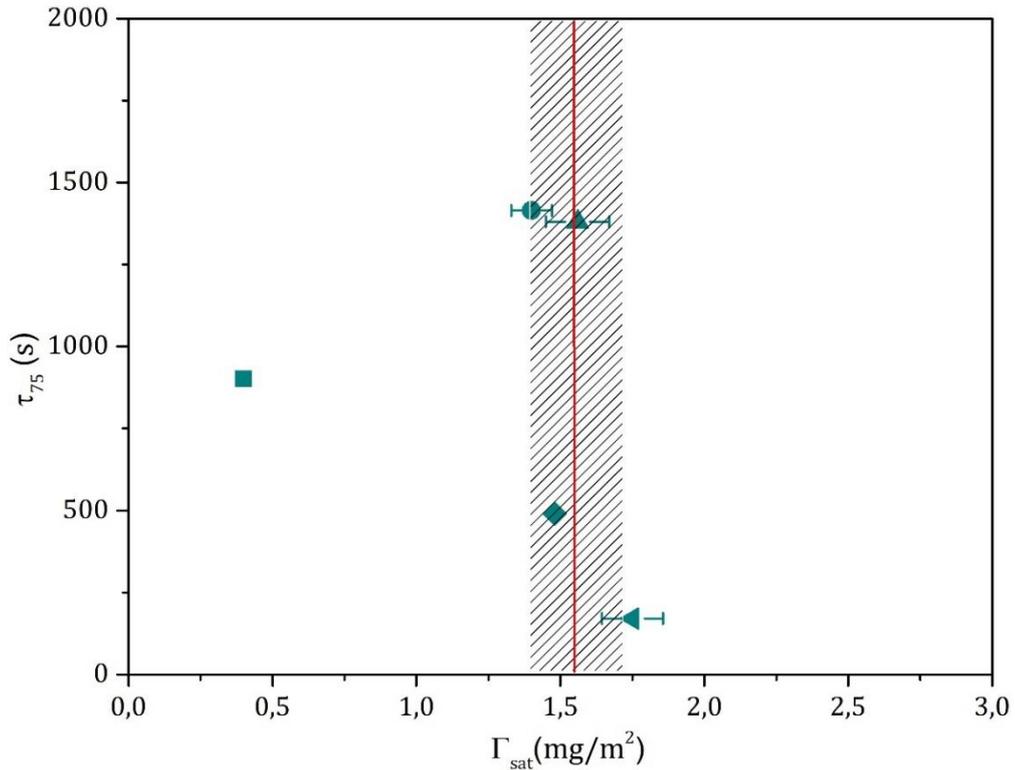
rápido que el de relajación ( $v_c > v_r$ ), y como consecuencia las moléculas adsorbidas conservan la estructura tridimensional que presentan en solución [8]. En este caso, el cubrimiento de la superficie ocurre tan rápido que previene la relajación de las proteínas y el grado de cubrimiento superficial es independiente de la  $v_c$  [11,12]. Por ejemplo, este es el comportamiento que se puede observar para la adsorción de la enzima D-aminoácido oxidasa (DAAO) sobre superficies de sílica a pH=7 [12], y para la adsorción de la proteína H49 involucrada en la patogenia del Chagas, sobre superficies de sílica modificadas con Ni(II) [11].

Otra alternativa es que  $\tau_r$  y  $\tau_{75}$  resulten del mismo orden y por ende, los procesos de adsorción y relajación ocurran en la misma escala de tiempo (ver Figura 3.2 C), por lo cual las moléculas se adsorben a la vez que sufren rearrreglos estructurales propios del proceso de relajación. En este caso, el grado de relajación depende del cubrimiento superficial porque la relajación determina la disponibilidad de sitios superficiales [6,8,9,11]. En consecuencia, la  $\Gamma_{\text{sat}}$  está fuertemente condicionada por factores cinéticos (relaciones entre las velocidades de las etapas del mecanismo de adsorción), en lugar de aspectos termodinámicos como la interacción adsorbato-adsorbente. De esta manera se comporta la adsorción de ALB sobre sílica a pH cercanos a 7 [13], tal como fue discutido para los resultados presentados en el Capítulo anterior. Mientras que, a valores de pH menores o iguales al pIE de ALB el grado de cubrimiento debe ser bajo ( $0 \leq \theta \leq 0,8$ ) para obedecer a esta tendencia, ya que de lo contrario la baja disponibilidad de sitios superficiales condiciona el grado de relajación [13,14].

Por último, puede ocurrir que  $\tau_r$  resulte mucho mayor a  $\tau_{75}$ , es decir, que  $v_r$  sea mucho menor a  $v_c$  (ver Figura 3.2 D). En este caso, el tiempo requerido

para que la molécula adsorbida cambie su conformación sobre la superficie es muy grande [11]. Un ejemplo de este comportamiento lo representa la ALB sobre superficies de sílica recubiertas con nanotubos de carbono, donde, a un valor de pH menor al pIE el  $\tau_r$  tiende a infinito [15]. En el caso opuesto al recientemente descrito, puede ocurrir que  $\tau_c$  sea mucho mayor a  $\tau_r$ . En este caso, todas las moléculas tendrían la misma conformación relajada en el estado estacionario, ya que ocurriría una relajación rápida y el grado de cubrimiento superficial no dependería de la velocidad de cubrimiento porque la relajación incidiría fuertemente en la conformación de la proteína adsorbida [11,16]. En estas condiciones, la  $\Gamma_{\text{sat}}$  está controlada por el área ocupada por las moléculas de proteína relajadas.

La Figura 3.3 muestra un gráfico de  $\tau_{75}$  en función de la  $\Gamma_{\text{sat}}$  para estimar  $\tau_r$  y evaluar la relación entre los procesos de adsorción y relajación del FBG sobre superficies de sílica. Para la estimación de  $\tau_r$  es necesario extrapolar a cero la  $\Gamma_{\text{sat}}$ . Por un lado, el  $\tau_{75}$  depende de  $C_p$ . Por otro lado, exceptuando a la menor  $C_p$  (0,0005 mg/ml), no hay diferencias estadísticamente significativas para la  $\Gamma_{\text{sat}}$  con la  $C_p$  (mediante ANOVA de una vía). Es decir, las diferentes concentraciones de proteína (para las cuales no se encontraron diferencias en  $\Gamma_{\text{sat}}$ ) permiten alcanzar un valor medio de  $\Gamma_{\text{sat}}$  de  $(1,6 \pm 0,2)$  mg/m<sup>2</sup>. En la figura, la línea roja representa el valor medio y la zona destacada con rayas, el intervalo de confianza del 95% correspondiente. La extrapolación a cero del valor de la media de  $\Gamma_{\text{sat}}$  llevaría al hecho que el valor estimado de  $\tau_r$  es mucho mayor a  $\tau_c$ . Esto indica que la velocidad de relajación de la molécula de FBG es mucho menor a la velocidad de cubrimiento sobre las superficies de sílica ( $v_r \ll v_c$ ), exceptuando a la menor  $C_p$  explorada. Es decir, la relajación de las moléculas adsorbidas requeriría de un tiempo mucho mayor al involucrado



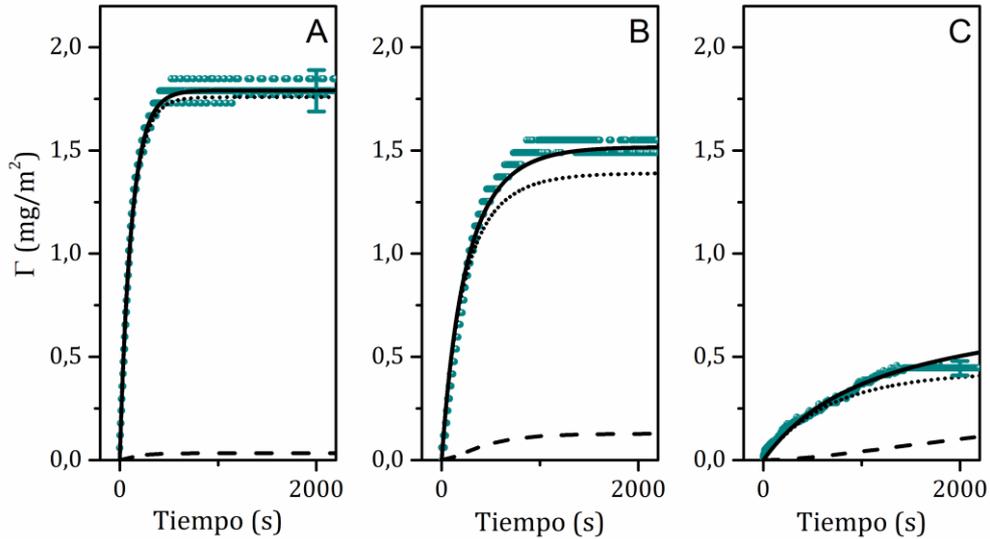
**Figura 3.3** Valores de  $\tau_{75}$  en función de la  $\Gamma_{sat}$  para distintas  $C_p$  evaluadas en el proceso de adsorción de FBG. La forma de los símbolos representa el valor de  $C_p$  (mg/ml): (■) 0,0005 (●) 0,0010 (▲) 0,0015 (◆) 0,0050 (◄) 0,0200. Las barras de error o el tamaño de los símbolos representan la desviación estándar calculada a partir de duplicados de cada concentración. La línea roja representa el valor de la media de  $\Gamma_{sat}$  calculada para aquellos valores para los cuales el ANOVA no encontró diferencias significativas, y la zona rayada representa el intervalo de confianza del 95%.

en la adsorción de la molécula de proteína. Claramente, la menor  $C_p$  (0,0005 mg/ml) queda fuera de la tendencia general descrita y se podría postular que a bajas concentraciones se presenta un comportamiento diferente en donde los procesos de adsorción y relajación ocurren en la misma escala de tiempo. Para comprender de donde proviene esta observación, al extrapolar a 0 la curva de  $\tau_{75}$  vs  $\Gamma_{sat}$  a bajas concentraciones, se encuentra en ese caso que  $\tau_{75}$  es del mismo orden de magnitud que  $\tau_r$  ( $\tau_c \sim \tau_r$ ). Considerando ambos regímenes, uno a baja concentración donde relajación y cubrimiento ocurren en la

---

misma escala de tiempo, y otro a concentraciones intermedias y altas donde la relajación es mucho más lenta que el cubrimiento, se puede afirmar que el FBG adsorbido adopta una conformación relajada sobre la superficie a concentraciones iguales o menores a 0,0005 mg/ml, mientras que presenta una estructura nativa a concentraciones más altas que este valor. Además, dada la alta afinidad del FBG por la superficie de sílica, que ocasiona que a concentraciones relativamente bajas como 0,0010 mg/ml se alcance la máxima cantidad adsorbida, la presencia de moléculas vecinas impide la relajación. Asimismo, la ausencia de desorción por dilución da cuenta de la fuerte y estable interacción proteína-superficie.

Para comprender mejor la relación entre los procesos de adsorción y relajación, se utilizó el modelo presentado en el Capítulo 1 para ajustar los perfiles cinéticos experimentales, minimizando los cuatro parámetros  $k_a$ ,  $k_r$ ,  $\xi$  y  $m_p/S_N$  (utilizando el método Simplex). Es importante notar en este punto que la suposición del modelo respecto a considerar despreciable la desorción se cumple perfectamente en este caso. De esta forma, los perfiles cinéticos del proceso de adsorción de FBG obtenidos por Reflectometría se ajustaron utilizando la ecuación (12) del Capítulo 1. De acuerdo a esta ecuación, es posible conocer la contribución de  $\Gamma$  de proteínas nativas ( $\Gamma_N$ ) y relajadas ( $\Gamma_R$ ) al valor de  $\Gamma$  (ecuaciones 16 y 17, Capítulo 1). La Figura 3.4 compara los datos experimentales con los resultados calculados y muestra las contribuciones de las moléculas de FBG nativas y relajadas a tres valores de  $C_p$  (0,0200, 0,0050 y 0,0005 mg/ml), mientras que la Tabla 3.1 muestra los valores promedio para cada parámetro ajustado (calculados a partir del ajuste independiente de los perfiles cinéticos a diferentes valores de  $C_p$ ).



**Figura 3.4** Curvas de cinética de adsorción de FBG sobre sílica, experimentales (verde) y calculadas (negro) a distintas  $C_p$  (mg/ml): 0,0200 (A), 0,0050 (B) y 0,0005 (C).  $\Gamma$  total (trazo continuo),  $\Gamma_N$  (trazo punteado) y  $\Gamma_R$  (trazo rayado). Las barras de error o el tamaño de los símbolos representan la desviación estándar calculada a partir de duplicados de cada concentración.

**Tabla 3.1** Valores del ajuste de los parámetros:  $k_a$ ,  $k_r$ ,  $\xi$  y  $m_p/S_N$ .

$C_p^*$ (mg/ml)	$k_a C_p^*$ (mg/m <sup>2</sup> s)	$k_a$ (m/s)	$k_r$ (mg/m <sup>2</sup> s)	$\xi$	$m_p/S_N$ (mg/m <sup>2</sup> )
0,0005	$(4,5 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	$(9 \pm 1) \times 10^{-7}$	$(3 \pm 1) \times 10^{-3}$	$7 \pm 1$	$2 \pm 1$
0,0050	$(4,5 \pm 0,5) \times 10^{-3}$				
0,0200	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-2}$				

(\*) Se incluye el valor de  $k_a C_p$  correspondiente a las distintas  $C_p$  para poder comparar iguales magnitudes ( $k_a C_p$  frente a  $k_r$ ).

La curva cinética para la  $C_p$  igual a 0,0005 mg/ml presenta una mayor contribución de  $\Gamma_R$  a la  $\Gamma$  total, similar a la situación ejemplificada en la Figura 1.5 A (Capítulo 1). Además, los resultados derivados del ajuste también corroboran el análisis efectuado mediante la comparación entre  $\tau_r$  y  $\tau_{75}$ , resultando del mismo orden  $v_c$  y  $v_r$  para concentraciones de FBG menores o

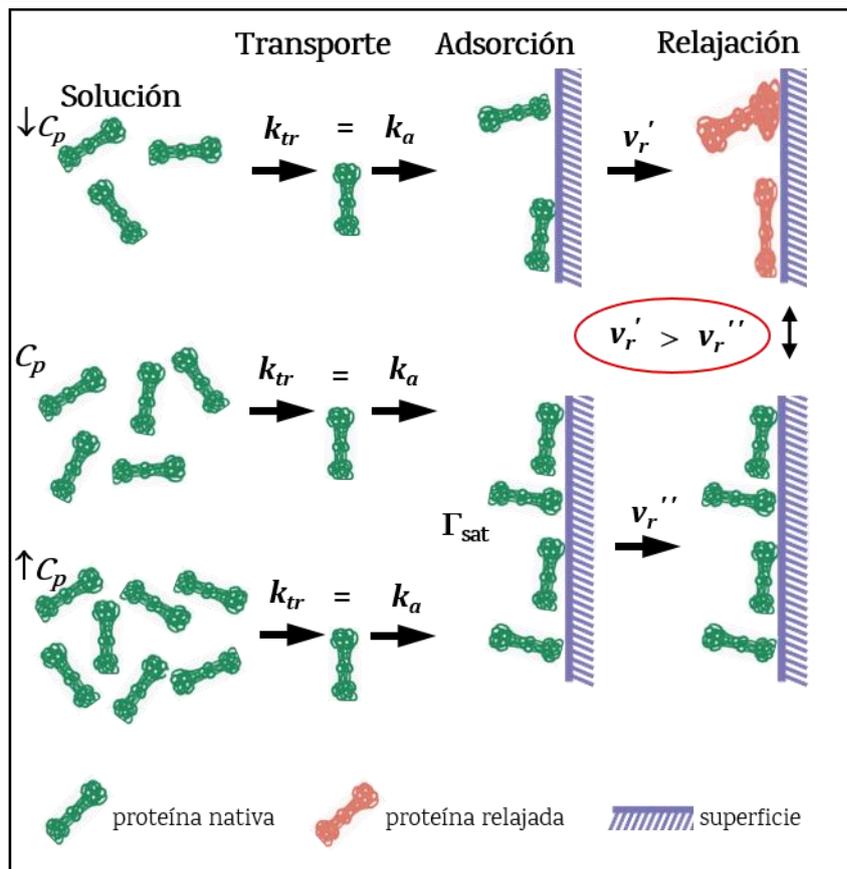
iguales a 0,0005 mg/ml. Otro aspecto a tener en cuenta es que el valor resultante del ajuste de  $\xi$  demuestra un aumento en el área de contacto proteína-superficie a consecuencia del proceso de relajación. Por otro lado, si se efectúa una comparación entre la  $k_{tr}$  ( $1,79 \times 10^{-6}$  m/s, Tabla 1.3 del Capítulo 1) con la  $k_a$  derivada del ajuste, resultan del mismo orden, por lo cual, el proceso de adsorción de FBG está controlado por la etapa de transporte de las moléculas de proteína para todas las condiciones experimentales. De esta forma, la diferencia observada entre  $v_i$  y  $v_{tr}$  para la mayor  $C_p$  (Figura 3.1) es simplemente el resultado de un efecto limitante superficial a consecuencia de la saturación de la superficie. Es decir, este efecto es provocado por la disminución en la disponibilidad de sitios libres superficiales como consecuencia de una mayor  $C_p$ .

De esta manera, se puede afirmar que el proceso de adsorción de FBG está controlado por el transporte de las moléculas de proteína y presenta dos regímenes dependientes de la  $C_p$ :

- a) Uno donde la adsorción y relajación son procesos competitivos a la menor  $C_p$  (0,0005 mg/ml) y
- b) Otro donde la relajación es mucho más lenta que el cubrimiento, a  $C_p$  intermedias y altas.

Por todo lo expuesto previamente, se puede afirmar que las distintas etapas involucradas en la adsorción de FBG presentan una dependencia con la concentración de proteína, la cual se esquematiza en la Figura 3.5. No hay diferencias entre las constantes de adsorción y de transporte con la  $C_p$ . Si bien el modo de alcanzar el cubrimiento depende de la  $C_p$ , la  $\Gamma_{sat}$  alcanzada es independiente de la  $C_p$  (excepto a la menor  $C_p$ ). Esto demuestra el efecto limitante superficial frente a un aumento en la  $C_p$ . Por último, la  $C_p$  también condiciona a la relajación de las moléculas adsorbidas, ya que, exceptuando la

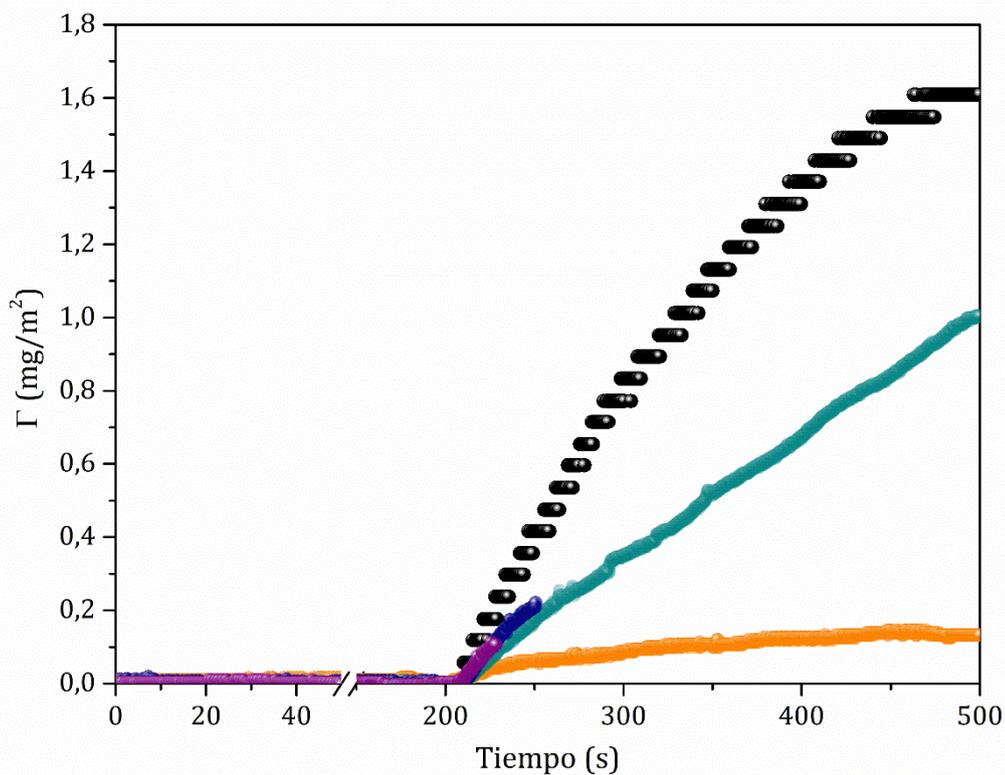
menor  $C_p$ , el proceso de relajación es mucho más lento que la adsorción. Sólo en el caso de la menor  $C_p$  evaluada, el cubrimiento y la relajación ocurren en escalas similares de tiempo. En consecuencia, el estado relajado sólo se puede alcanzar a bajas  $C_p$  y, para favorecer las condiciones en que la relajación ocurre, es necesario un tiempo extra de residencia de la proteína adsorbida sobre la superficie.



**Figura 3.5** Esquema de las distintas etapas del proceso global de adsorción física de FBG a distintas  $C_p$ : transporte, adsorción y relajación.  $k_{tr}$ : constante de transporte.  $k_a$ : constante de adsorción.  $\Gamma_{sat}$ : cantidad adsorbida de saturación.  $v_r'$ : velocidad de relajación a baja  $C_p$ .  $v_r''$ : velocidad de relajación a  $C_p$  intermedia y alta.

Con el objeto de explorar condiciones cinéticas de adsorción de FBG que permitan lograr diferente cubrimiento superficial, se evaluaron diferentes condiciones experimentales. La Figura 3.6 muestra las cinéticas de adsorción

de FBG correspondientes a diferentes valores de  $C_p$  y tiempo de adsorción. Como se mencionó previamente, si la  $v_i$  está determinada por la etapa de transporte de las moléculas de proteína, resulta igual a la  $v_{tr}$ . A su vez, la  $v_{tr}$  es proporcional a la  $C_p$  y a la  $v_f$  (ecuación 6, Capítulo 1). Las curvas cinéticas de color verde, azul y violeta tienen similar pendiente inicial ( $v_i$ ), ya que corresponden a cinéticas con igual  $C_p$  y  $v_f$ . Mientras que la curva de color negro, tiene mayor  $v_i$  por ser la de mayor  $C_p$  y lo opuesto ocurre con la curva de color naranja, de menor  $v_i$ . Por otra parte, al disminuir la  $C_p$  disminuye la  $\Gamma$  alcanzada. Asimismo, al disminuir el tiempo de adsorción disminuye la  $\Gamma$  alcanzada ( $C_p=0,0050$  mg/ml). En términos generales, puede considerarse que las condiciones evaluadas ocasionan un cubrimiento superficial alto ( $\Gamma=1,6$



**Figura 3.6** Cinéticas de adsorción de FBG sobre sílica variando los valores de  $C_p$  y tiempo de adsorción, respectivamente: 0,0200 mg/ml-300 s (negro) 0,0050 mg/ml-300 s (verde) 0,0050 mg/ml-50 s (azul) 0,0050 mg/ml-20 s (violeta) 0,0005 mg/ml-300 s (naranja).

mg/m<sup>2</sup>), medio ( $\Gamma=1,0$  mg/m<sup>2</sup>) y bajo ( $\Gamma=0,2$  mg/m<sup>2</sup>). Estos valores de  $\Gamma$  son lo suficientemente diferentes entre sí como para ser empleados en la evaluación de la adhesión bacteriana en función del cubrimiento superficial.

### **3.2.2 Adhesión bacteriana**

Para estudiar la relación entre el proceso de adsorción de FBG y la adhesión bacteriana se emplearon distintas condiciones de adsorción con control cinético. En primer lugar, se evaluó el efecto que la variación de la cantidad adsorbida de FBG sobre las superficies de sílica ejerce sobre la adhesión de *Staphylococcus aureus*. Teniendo en cuenta los resultados expuestos en el capítulo anterior, donde los cambios estructurales de las moléculas de ALB adsorbida en el proceso de relajación son los responsables de inhibir la adhesión bacteriana se propuso, además, evaluar el efecto de los cambios en la estructura de las moléculas de FBG adsorbido en la adhesión bacteriana.

Como se discutió en el apartado anterior, el tiempo característico de relajación de las moléculas de FBG es mucho mayor al de adsorción ( $\tau_r \gg \tau_c$ ), y  $k_a C_p$  es del orden o mayor a  $k_r$ , a excepción de la menor  $C_p$  evaluada para la cual  $v_c$  y  $v_r$  son del mismo orden. En consecuencia, el estado relajado sólo se puede alcanzar a bajas  $C_p$ , con un tiempo extra de residencia de la proteína adsorbida sobre la superficie. Por lo cual, sólo para la condición de adsorción de FBG que corresponde a la  $C_p$  más baja, se evaluó un tiempo de residencia adicional de la proteína sobre la superficie para inducir la relajación de las moléculas adsorbidas. Finalmente, para evaluar el efecto de la adsorción de FBG sobre la adhesión bacteriana inicial y sobre la formación del biofilm, se

---

estudiaron tiempos de incubación cortos (40 minutos) y largos (18 h), respectivamente.

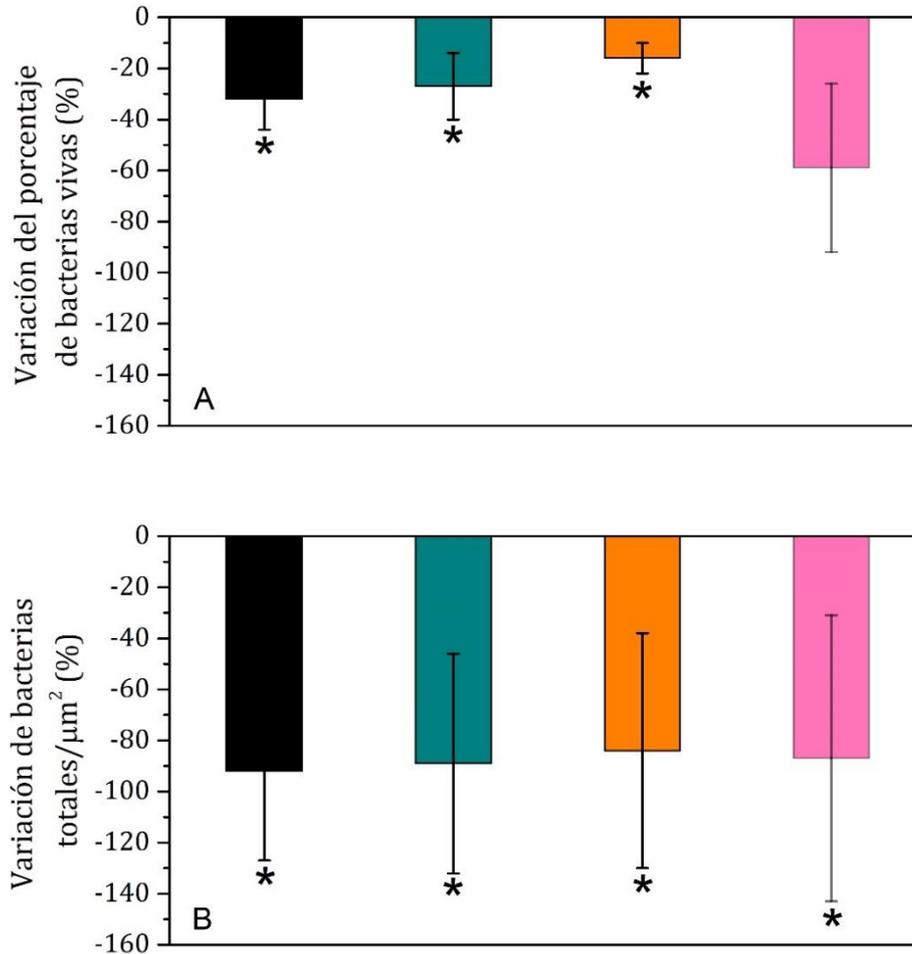
El diseño experimental correspondiente a la adsorción de proteínas con la subsecuente incubación de las superficies para evaluar la adhesión bacteriana, así como los controles realizados sin proteína adsorbida fue detallado en el Capítulo 1 (apartado 1.3.9), y los resultados de la adhesión bacteriana inicial sobre estos controles sin proteína adsorbida fueron presentados en el Capítulo 2 (apartado 2.2.2.1). Con el fin de estudiar la adhesión bacteriana inicial y la formación del biofilm, al igual que en el Capítulo 2, se realizó una comparación cuantitativa de las condiciones de adsorción de FBG evaluadas mediante el conteo de las bacterias vivas adheridas por Microscopía Confocal de Fluorescencia.

### 3.2.2.1 Adhesión bacteriana inicial

En el capítulo anterior se discutió cómo la cantidad adsorbida remanente de ALB luego de la desorción ( $\Gamma_{\text{rem}}$ ) determina la adhesión de *S. aureus*, inhibiendo tanto la adhesión bacteriana inicial como la formación del biofilm. Se encontró que este comportamiento se vincula al grado de relajación alcanzado por la población de proteína que no se puede desorber por dilución. De hecho, el estado superficial de las moléculas de ALB adsorbidas vinculado con la relajación y la estructura de las moléculas de proteína sería el causante de la inhibición de la adhesión inicial y del desarrollo del biofilm de *S. aureus*.

La Figura 3.7 muestra la adhesión inicial (evaluada empleando un tiempo de incubación de 40 min, tal como fue indicado en el Capítulo 1) de *S. aureus* a través de la variación del porcentaje de bacterias vivas (A) y de

bacterias totales/ $\mu\text{m}^2$  (B) en superficies con FBG adsorbido previamente respecto a superficies sin proteína adsorbida, en las condiciones experimentales que se detallan a continuación. Las tres primeras condiciones



**Figura 3.7** Variación del porcentaje de bacterias vivas (A) y de bacterias totales/ $\mu\text{m}^2$  (B) para *S. aureus* sobre superficies con FBG adsorbido (respecto a superficies sin ALB adsorbida) tras 40 min de adhesión:  $C_p=0,0200$  mg/ml- $\Gamma=1,6$  mg/ $\text{m}^2$  (color negro),  $C_p=0,0050$  mg/ml- $\Gamma=1,0$  mg/ $\text{m}^2$  (color verde),  $C_p=0,0005$  mg/ml- $\Gamma=0,2$  mg/ $\text{m}^2$  (color naranja),  $C_p=0,0005$  mg/ml- $\Gamma=0,2$  mg/ $\text{m}^2$  con un tiempo de residencia adicional de 2400 s (color rosa). Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% y (\*) representa a condiciones con valores  $p > 0,05$ .

---

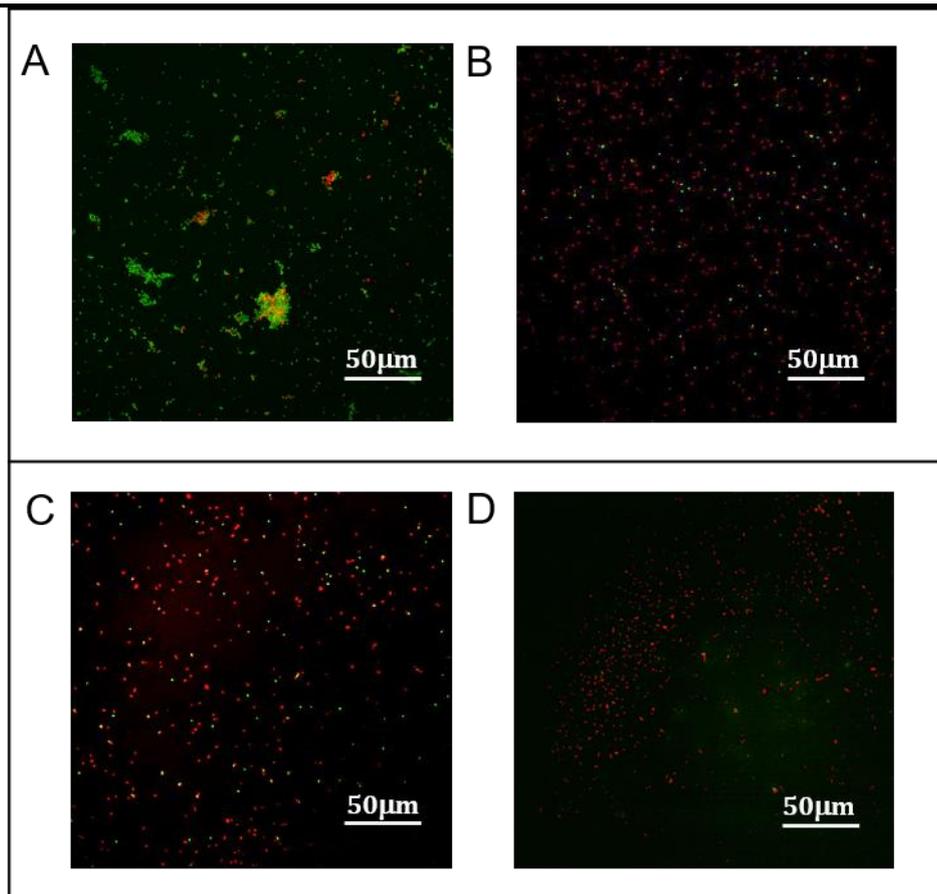
seleccionadas corresponden a diferentes concentraciones de FGB y cantidad adsorbida, cuyas cinéticas de adsorción fueron presentadas en la Figura 3.6. En esta figura se mantuvieron los colores que las identifican: color negro ( $C_p=0,0200$  mg/ml- $\Gamma=1,6$  mg/m<sup>2</sup>) color verde ( $C_p=0,0050$  mg/ml- $\Gamma=1,0$  mg/m<sup>2</sup>) y color naranja ( $C_p=0,0005$  mg/ml- $\Gamma=0,2$  mg/m<sup>2</sup>). Además, teniendo en cuenta que para inducir la relajación superficial de las moléculas de FGB se requiere un tiempo extra de residencia del FGB adsorbido a  $C_p$  menores o iguales a 0,0005 mg/ml, la cuarta condición seleccionada para evaluar la adhesión bacteriana, corresponde a la condición de adsorción representada en color naranja ( $C_p=0,0005$  mg/ml- $\Gamma=0,2$  mg/m<sup>2</sup>) con un tiempo de residencia adicional de la proteína sobre la superficie (esta condición se representa con color rosa). El tiempo de residencia adicional induciría cambios estructurales en las moléculas adsorbidas. Con este propósito, luego de la adsorción de FGB por un tiempo de adsorción de 300 s, las superficies se sumergieron en una solución de PBS a pH 7,3 por 2400 s. Ambas variables correspondientes a la adhesión bacteriana (porcentaje de bacterias vivas y bacterias totales/ $\mu\text{m}$ ) en todas las superficies con FGB adsorbido previamente muestran una reducción significativa. Además, la condición experimental que incluye un tiempo de residencia adicional sobre la superficie provocó una disminución aún mayor que las otras condiciones de FGB exploradas para el porcentaje de bacterias vivas, según el análisis estadístico realizado (ANOVA y prueba *a posteriori* de DGC). La razón de este comportamiento es que la conformación del FGB adsorbido tras un tiempo de residencia adicional podría ser diferente a la conformación que resulta en las otras condiciones de adsorción. Por lo tanto, la relajación de moléculas de ALB adsorbidas inducida por la superficie, puede ser alcanzada para moléculas de FGB adsorbidas con un tiempo de residencia

adicional sobre la superficie, y es precisamente este proceso de relajación el responsable de reducir la adhesión inicial de *S. aureus*.

### 3.2.2.2 Formación del biofilm

Con el propósito de evaluar si la relajación superficial de las moléculas de FBG adsorbidas inducida durante el tiempo de residencia adicional es también capaz de inhibir la formación del biofilm, se estudió la adhesión de esta bacteria a tiempos de incubación más largos (ver apartado 1.3.8, Capítulo 1) mediante Microscopía Confocal de Fluorescencia.

La Figura 3.8 muestra las imágenes obtenidas para evaluar la formación del biofilm de *S. aureus* sobre superficies (A) sin FBG adsorbido y previa adsorción de FBG en las condiciones de adsorción: (B)  $C_p=0,0200$  mg/ml- $\Gamma=1,6$  mg/m<sup>2</sup>, (C)  $C_p=0,0005$  mg/ml- $\Gamma=0,2$  mg/m<sup>2</sup> y (D)  $C_p=0,0005$  mg/ml- $\Gamma=0,2$  mg/m<sup>2</sup> con un tiempo de residencia adicional de 2400 s. En el panel A, donde no hay proteína adsorbida, se pueden observar microcolonias de *S. aureus*, las cuales corresponden a la etapa previa a la formación de un biofilm maduro, involucrando una gran cantidad de bacterias vivas adheridas. Por otra parte, en los paneles B y C se observan tendencias similares que corresponden a un aumento de bacterias muertas adheridas, pero se conserva una cantidad considerable de bacterias vivas adheridas. Es decir, dichas condiciones de adsorción de FBG no resultan eficaces en la inhibición del desarrollo bacteriano, y este hecho está vinculado a que las moléculas de FBG adsorbido se encuentran con su estructura nativa. La condición de adsorción que pertenece a la  $C_p$  intermedia ( $0,0050$  mg/ml- $\Gamma=1,0$  mg/m<sup>2</sup>) produce la misma repuesta en la adhesión bacteriana que las condiciones de adsorción B y C

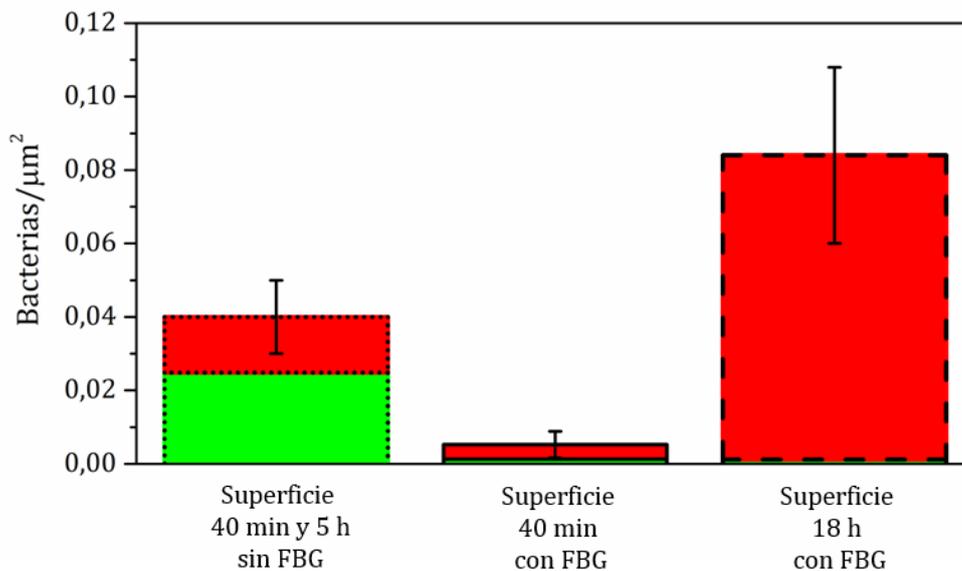


**Figura 3.8** Imágenes de Microscopía Confocal de Fluorescencia de *S. aureus* sobre superficies con 18 h de incubación en condiciones capaces de formar biofilm: (A) superficies sin FBG adsorbido en PBS (B) FBG adsorbido:  $C_p=0,0200$  mg/ml- $\Gamma=1,6$  mg/m<sup>2</sup> (C) FBG adsorbido:  $C_p=0,0005$  mg/ml- $\Gamma=0,2$  mg/m<sup>2</sup> (D) FBG adsorbido:  $C_p=0,0005$  mg/ml- $\Gamma=0,2$  mg/m<sup>2</sup> con un tiempo de residencia adicional de 2400 s.

(resultados no incorporados en la figura). Por último, en la condición experimental que incluye un tiempo de residencia adicional del FBG antes de la incubación con *S. aureus*, se pueden apreciar bacterias adheridas que están muertas casi en su totalidad. Por lo tanto, se puede afirmar que este tiempo adicional es eficiente en inducir un cambio conformacional de la proteína adsorbida hacia una conformación relajada, que permite inhibir la formación del biofilm de esta bacteria. Así, es posible minimizar la colonización de *S.*

*aureus* sobre las superficies adsorbiendo FBG en condiciones en las cuales se promueva la conformación relajada de la proteína sobre la superficie.

Por otra parte, se evaluó de forma cuantitativa la inhibición en la adhesión bacteriana en función del tiempo de incubación para la condición experimental que logra minimizar la adhesión bacteriana inicial y la formación del biofilm ( $C_p=0,0005$  mg/ml- $\Gamma=0,2$  mg/m<sup>2</sup> con un tiempo de residencia adicional de 2400 s). La Figura 3.9 muestra el número de bacterias/ $\mu\text{m}^2$ , diferenciando bacterias muertas (rojas) y vivas (verdes) para la adhesión de *S. aureus* con un tiempo de incubación de 40 min y 18 h sobre superficies con FBG adsorbido en esta condición. Para esta cuantificación, se tomó como referencia a superficies sin proteína adsorbida con un tiempo de incubación de 40 min y 5 h (ver Figura 2.10, Capítulo 2). La adhesión bacteriana



**Figura 3.9** Bacterias vivas/ $\mu\text{m}^2$  (verdes) y muertas/ $\mu\text{m}^2$  (rojas) para *S. aureus* sobre superficies con 40 min adhesión (borde de trazo liso), con 40 min y 5 h de adhesión (borde punteado) y con 18 h de adhesión (borde de trazo rayado). Condiciones de adsorción de FBG: 0,0005 mg/ml con un tiempo de residencia adicional de 2400 s. Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95%.

---

inicial, tras 40 minutos de incubación, disminuye con respecto a la superficie sin FBG adsorbido. Sin embargo, al aumentar el tiempo de incubación aumenta considerablemente el número de bacterias adheridas, y en su gran mayoría, están muertas. Es decir, se inhibe la formación del biofilm, aunque el número de bacterias adheridas resulta mayor que las adheridas sobre superficies sin FBG adsorbido (40 min-5 h de incubación). Como se mencionó anteriormente, han sido reportadas interacciones específicas entre la molécula de FBG y el *S. aureus* [17]. La estructura de la molécula de FBG comprende tres pares de cadenas polipeptídicas,  $A\alpha$ ,  $B\beta$ , y  $\gamma$ ,  $(A\alpha B\beta\gamma)_2$ , formando dos subunidades idénticas [18,19]. Tanto las subunidades como las cadenas están unidas por puentes disulfuro para formar una estructura trinodular simétrica [18,20]. Las interacciones FBG- *S. aureus* se desarrollan a partir de proteínas ancladas a la pared celular de la bacteria cuyos sitios de unión incluyen las regiones del C-terminal de la cadena  $\gamma$  y el C-terminal de la cadena  $\alpha$  de la molécula de FBG y son capaces de establecerse aún si las células de *S. aureus* están muertas [21-23]. El aumento en el número de bacterias adheridas en función del tiempo de incubación indica que en este sistema experimental están presentes interacciones específicas entre FBG y *S. aureus* que se mantienen a través del tiempo. Por otra parte, esta tendencia es opuesta a la observada para las superficies con ALB adsorbida (ver Figura 2.16, Capítulo 2) donde al aumentar el tiempo de incubación disminuye considerablemente el número de bacterias adheridas. Esto se debe a que la interacción ALB-*S. aureus* está mediada por interacciones fisicoquímicas no específicas que pueden dar lugar al desprendimiento de las células bacterianas.

### 3.3 Conclusiones

Se establece una relación entre el proceso de adsorción-desorción de FBG sobre superficies de sílica con la adhesión de *S. aureus*, con el fin de optimizar las condiciones de adsorción capaces de minimizar la adhesión bacteriana. La velocidad inicial del proceso de adsorción está determinada por el transporte de las moléculas de FBG hacia la superficie. Además, se observa un efecto limitante superficial frente a un aumento en la concentración de proteína. En este sistema, la relajación en lugar de ser inducida por una  $\Gamma_{rem}$  baja como en el caso de la ALB, es inducida por un aumento en el tiempo de residencia del FBG adsorbido, y solo puede alcanzarse a concentración inicial baja de proteína, donde el cubrimiento y la relajación ocurren en escalas similares de tiempo.

Por otro lado, como resultado de la optimización del proceso de adsorción respecto a minimizar la adhesión bacteriana se observa que la adhesión de *S. aureus* presenta una fuerte dependencia con la presencia de moléculas de FBG adsorbido sobre la superficie, con las cuales establece interacciones específicas. De hecho, de forma similar al comportamiento observado para ALB, se puede inhibir la adhesión de *S. aureus* mediante el control cinético de la adsorción de FBG sobre las superficies de sílica. Existe una relación entre el estado relajado de las moléculas de FBG adsorbido y la cantidad de bacterias vivas adheridas. Los cambios estructurales que sufre la molécula de FBG durante la relajación superficial dependen del control cinético del proceso de adsorción y del tiempo de residencia de la proteína sobre la superficie y conducen a minimizar la adhesión de *S. aureus* tanto en su etapa inicial como en la formación del biofilm. De esta forma, conocer las variables que determinan la relación entre adsorción y relajación, y que condicionan la adhesión

---

bacteriana posterior, permite sentar las bases para diseñar estrategias de biofuncionalización superficial eficientes en inhibir la adhesión de *S. aureus*.

## Referencias

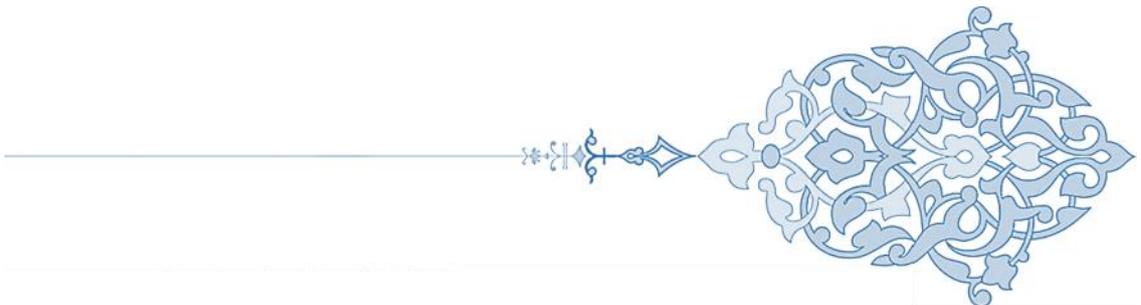
- [1] I. Langmuir, The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids (Part I), *J. Am. Chem. Soc.* 38 (1916) 2221–2295. doi:10.1021/ja02268a002.
- [2] W. Norde, Adsorption of (Bio)Polymers, with Special Emphasis on Globular Proteins, in: *Colloids Interfaces Life Sci.*, Marcel Dekker, New York, EEUU, 2003: p. 15.1-15.7. doi:10.1201/9780203912157.ch15.
- [3] W. Norde, J. Buijs, H. Lyklema, Adsorption of globular proteins, in: J. Lyklema (Ed.), *Fundam. Interface Colloid Sci.*, Elsevier, 2005: p. 3.1-3.59. doi:10.1016/S1874-5679(05)80007-8.
- [4] P. Żeliszewska, A. Bratek-Skicki, Z. Adamczyk, M. Cieśla, Human Fibrinogen Adsorption on Positively Charged Latex Particles, *Langmuir*. 30 (2014) 11165–11174. doi:10.1021/la5025668.
- [5] N.G. Hoogeveen, M.A. Cohen Stuart, G.J. Fleer, Polyelectrolyte Adsorption on Oxides. I. Kinetics and Adsorbed Amounts, *J. Colloid Interface Sci.* 182 (1996) 133–145. doi:10.1006/jcis.1996.0444.
- [6] C.F. Wertz, M.M. Santore, Effect of Surface Hydrophobicity on Adsorption and Relaxation Kinetics of Albumin and Fibrinogen: Single-Species and Competitive Behavior, *Langmuir*. 17 (2001) 3006–3016. doi:10.1021/la0017781.
- [7] M. van der Veen, M.C. Stuart, W. Norde, Spreading of proteins and its effect on adsorption and desorption kinetics, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 54 (2007) 136–142. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.08.017.
- [8] L. Valenti, Tesis doctoral. Desde la optimización de la interacción enzima-superficie hacia la obtención de inmunoensayos en fase sólida, Universidad Nacional de Córdoba, 2008.
- [9] W. Norde, C.E. Giacomelli, Conformational changes in proteins at interfaces: From solution to the interface, and back, *Macromol. Symp.* 145 (1999) 125–136. doi:10.1002/masy.19991450114.
- [10] E. Herrera, Tesis Doctoral. Diseño y desarrollo de superficies bio-funcionales para la determinación de D-aminoácidos, Universidad Nacional de Córdoba, 2013.
- [11] L.E. Valenti, A.M. Smania, C.P. De Pauli, C.E. Giacomelli, Driving forces for the adsorption of a His-tag Chagas antigen. A rational approach to design bio-functional surfaces, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 112 (2013) 294–301. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.07.059.
- [12] E. Herrera, C.E. Giacomelli, Surface coverage dictates the surface bio-activity of d-amino acid oxidase, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 117 (2014) 296–302. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.02.050.
- [13] C.E. Giacomelli, W. Norde, The Adsorption–Desorption Cycle. Reversibility of the BSA–Silica System, *J. Colloid Interface Sci.* 233 (2001) 234–240. doi:10.1006/jcis.2000.7219.
- [14] W. Norde, C.E. Giacomelli, BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states, *J. Biotechnol.* 79 (2000) 259–268. doi:10.1016/S0168-1656(00)00242-X.
- [15] L.E. Valenti, P.A. Fiorito, C.D. García, C.E. Giacomelli, The adsorption-desorption process of bovine serum albumin on carbon nanotubes, *J. Colloid Interface Sci.* 307 (2007) 349–356.

- 
- doi:10.1016/j.jcis.2006.11.046.
- [16] E. Herrera, C.E. Giacomelli, Surface coverage dictates the surface bio-activity of d-amino acid oxidase, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 117 (2014) 296–302. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.02.050.
- [17] H. Miorner, E. Myhre, L. Bjorck, G. Kronvall, Effect of specific binding of human albumin, fibrinogen, and immunoglobulin G on surface characteristics of bacterial strains as revealed by partition experiments in polymer phase systems, *Infect. Immun.* 29 (1980) 879–885. PMID: 7429636.
- [18] A. Henschen, J. McDonagh, Fibrinogen, fibrin and factor XIII, in: R.F.A. Zwaal, H.C. Hemker (Eds.), *Blood Coagulation*, 1986: pp. 171–241. doi:10.1016/S0167-7306(08)60053-8.
- [19] J.W. Weisel, L. Medved, Fibrinogen and Fibrin, in: D.A.D. Parry, J.M. Squire (Eds.), *Adv. Protein Chem.*, 2005: pp. 247–299. doi:10.1016/S0065-3233(04)70008-X.
- [20] Y. Chen, H. Mao, X. Zhang, Y. Gong, N. Zhao, Thermal conformational changes of bovine fibrinogen by differential scanning calorimetry and circular dichroism, *Int. J. Biol. Macromol.* 26 (1999) 129–134. doi:10.1016/S0141-8130(99)00073-2.
- [21] F.M. Burke, A. Di Poto, P. Speziale, T.J. Foster, The A domain of fibronectin-binding protein B of *Staphylococcus aureus* contains a novel fibronectin binding site, *FEBS J.* 278 (2011) 2359–2371. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08159.x.
- [22] Y.P. Ko, M.J. Flick, Fibrinogen Is at the Interface of Host Defense and Pathogen Virulence in *Staphylococcus aureus* Infection, *Semin. Thromb. Hemost.* 42 (2016) 408–421. doi:10.1055/s-0036-1579635.
- [23] M.K. Boden, J.I. Flock, Fibrinogen-binding protein/clumping factor from *Staphylococcus aureus*, *Infect. Immun.* 57 (1989) 2358–2363. doi:10.1007/978-1-4471-3454-1\_7.



## **PARTE 2**

### **Biofuncionalización con proteínas y adhesión bacteriana**





## Parte 2: Biofuncionalización con proteínas y adhesión bacteriana

### Introducción

Como resultado de la primera parte de este trabajo de Tesis Doctoral, surgieron las condiciones óptimas en las cuales las proteínas adsorbidas (ALB o FBG), minimizan la adhesión de *S. aureus* a tiempos cortos y frente a la formación del biofilm. En particular, los resultados de la Parte 1 indican que se puede inhibir la adhesión bacteriana mediante el control cinético del proceso de adsorción de ALB o FBG que, en definitiva, determina la velocidad relativa de la relajación superficial de las proteínas. Concretamente, los rearrreglos estructurales de las proteínas adsorbidas inducidos por el proceso de relajación superficial ( $\Gamma_{rem}$  bajo para ALB o tiempo de residencia alto para FBG) son los responsables de minimizar la adhesión bacteriana inicial y la formación del biofilm de *S. aureus*. Sobre la base de estos resultados, se propone en esta segunda parte, modificar la estructura de ALB y FBG deliberadamente para implementar una estrategia de biofuncionalización superficial con estas proteínas parcialmente desnaturalizadas. De hecho, algunos trabajos postulan una relación entre la estructura secundaria de las proteínas y la adhesión celular [1-3], aunque, en general, este cambio estructural no es controlado.

En este trabajo de Tesis Doctoral, se propone modificar ex profeso la estructura secundaria de las proteínas utilizadas en la biofuncionalización y evaluar el efecto sobre la adhesión de *S. aureus*. Con este propósito, se eligió el tratamiento térmico como método de perturbación estructural, ya que es sencillo, reproducible y no implica el uso de agentes químicos desnaturalizantes. Además, para el caso de ALB este proceso ha sido muy explorado en la literatura [4-7]. Sin embargo, ocurre lo contrario respecto a FBG. Es por ello que se estudió la desnaturalización térmica del FBG para

optimizar las condiciones del tratamiento térmico mediante Calorimetría Diferencial de Barrido. Asimismo, para estudiar el cambio en la estructura secundaria inducido por el tratamiento térmico de soluciones de ALB y FBG se utilizó Dicroísmo Circular. La estrategia de biofuncionalización superficial incluye la adsorción de ALB o FGB parcialmente desnaturalizadas mediante la inmersión de las superficies en la solución de cada una de estas proteínas.

Al igual que en la primera parte de este trabajo, la adhesión bacteriana se dividió para su estudio en dos etapas: adhesión bacteriana inicial y formación del biofilm. Del mismo modo, se utilizó Microscopía Confocal de Fluorescencia para evaluar la adhesión bacteriana de forma cualitativa y cuantitativa y Microscopía Electrónica de Barrido para evaluar la morfología de las células adheridas. Sin embargo, es importante remarcar en este punto que, hasta esta instancia del trabajo de Tesis Doctoral, los estudios de adhesión bacteriana se realizaron en PBS para evitar la interferencia de los componentes del medio de cultivo en las propiedades superficiales y eventualmente competir con la adsorción de ALB y FBG. Con el objeto de evaluar el efecto de la biofuncionalización superficial en la formación del biofilm en un medio de relevancia fisiológica, se utilizó PBS suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Esta elección, se sustenta en que el SFB en dicha proporción es ampliamente utilizado en el cultivo de células eucariotas y en ensayos clínicos, debido a que promueve el crecimiento celular [8–13].

En resumen, la segunda parte de este trabajo de Tesis Doctoral incluye los Capítulos 4 y 5. En el primero, se describe la parte experimental y a continuación, los resultados relativos a la biofuncionalización con ALB o FBG y la evaluación de la adhesión bacteriana.

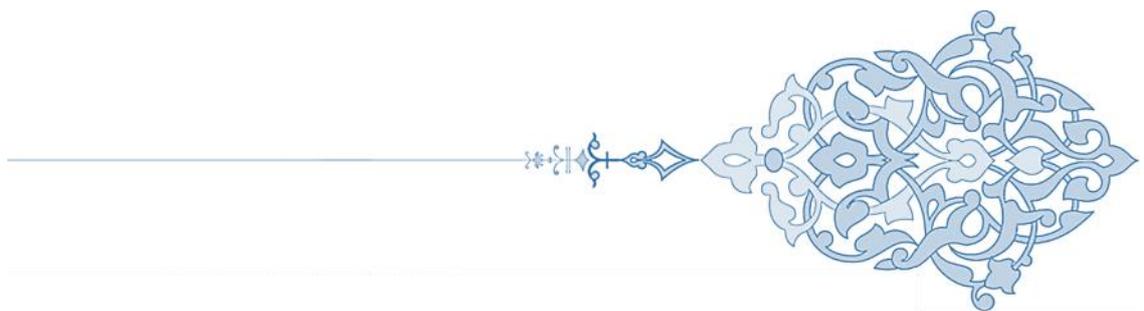
## Referencias

- [1] A. Hasan, S.K. Pattanayek, L.M. Pandey, The Effect of Functional Groups of Self-Assembled Monolayers on Protein Adsorption and Initial Cell Adhesion, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (2018) 3224–3233. doi:10.1021/acsbiomaterials.8b00795.
- [2] S. Bisht, K.S. Singh, R. Choudhary, S. Kumar, S. Grover, A.K. Mohanty, V. Pande, J.K. Kaushik, Expression of fibronectin-binding protein of *L. acidophilus* NCFM and in vitro refolding to adhesion capable native-like protein from inclusion bodies, *Protein Expr. Purif.* 145 (2018) 7–13. doi:10.1016/j.pep.2017.11.007.
- [3] R.G. Moody, M.P. Williamson, Structure and function of a bacterial Fasciclin I Domain Protein elucidates function of related cell adhesion proteins such as TGFBIp and periostin, *FEBS Open Bio.* 3 (2013) 71–77. doi:10.1016/j.fob.2013.01.001.
- [4] Y. Moriyama, Y. Kawasaka, K. Takeda, Protective effect of small amounts of sodium dodecyl sulfate on the helical structure of bovine serum albumin in thermal denaturation, *J. Colloid Interface Sci.* 257 (2003) 41–46. doi:10.1016/S0021-9797(02)00017-6.
- [5] G. Navarra, C. Peres, M. Contardi, P. Picone, P.L. San Biagio, M. Di Carlo, D. Giacomazza, V. Militello, Heat- and pH-induced BSA conformational changes, hydrogel formation and application as 3D cell scaffold, *Arch. Biochem. Biophys.* 606 (2016) 134–142. doi:10.1016/j.abb.2016.07.020.
- [6] C.E. Giacomelli, W. Norde, The Adsorption–Desorption Cycle. Reversibility of the BSA–Silica System, *J. Colloid Interface Sci.* 233 (2001) 234–240. doi:10.1006/jcis.2000.7219.
- [7] W. Norde, C.E. Giacomelli, BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states, *J. Biotechnol.* 79 (2000) 259–268. doi:10.1016/S0168-1656(00)00242-X.
- [8] P. Gil-Loyzaga, Cultivo de células animales y humanas: Aplicaciones en medicina regenerativa. Universidad Complutense de Madrid., Vision Libros, Madrid, 2011.
- [9] H. Hemeda, B. Giebel, W. Wagner, Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells, *Cytotherapy.* 16 (2014) 170–180. doi:10.1016/j.jcyt.2013.11.004.
- [10] S. Yousefi, J. Soleimanirad, K. Hamdi, L. Farzadi, A. Ghasemzadeh, M. Kazemi, M. Mahdipour, R. Rahbarghazi, M. Nouri, Distinct effect of fetal bovine serum versus follicular fluid on multipotentiality of human granulosa cells in in vitro condition, *Biologicals.* 52 (2018) 44–48. doi:10.1016/j.biologicals.2018.01.002.
- [11] S.W. Malm, E.A. Amouzougan, W.T. Klimecki, Fetal bovine serum induces sustained, but reversible, epithelial-mesenchymal transition in the BEAS-2B cell line, *Toxicol. Vitro.* 50 (2018) 383–390. doi:10.1016/j.tiv.2018.04.008.
- [12] F.J. Tian, C.M. Qin, X.C. Li, F. Wu, X.R. Liu, W.M. Xu, Y. Lin, Decreased Stathmin-1 Expression Inhibits Trophoblast Proliferation and Invasion and Is Associated with Recurrent Miscarriage, *Am. J. Pathol.* 185 (2015) 2709–2721. doi:10.1016/j.ajpath.2015.06.010.
- [13] K. Reyes-Gordillo, R. Shah, A. Popratiloff, S. Fu, A. Hindle, F. Brody, M. Rojkind, Thymosin- $\beta$ 4 (T $\beta$ 4) blunts PDGF-dependent phosphorylation and binding of AKT to actin in hepatic

stellate cells, *Am. J. Pathol.* 178 (2011) 2100–2108. doi:10.1016/j.ajpath.2011.01.025.

# CAPÍTULO 4

## Parte experimental





---

## Capítulo 4: Parte experimental

### 4.1 Introducción

En este Capítulo, se presenta la parte experimental utilizada para desarrollar las temáticas relativas a la Parte 2 de este trabajo de Tesis Doctoral. En particular, corresponden a los materiales y métodos utilizados en la biofuncionalización superficial con ALB o FBG, y la evaluación de la adhesión bacteriana. Este estudio permitirá optimizar el desarrollo de una estrategia de biofuncionalización superficial con las proteínas plasmáticas evaluadas que sea capaz de inhibir la formación del biofilm de *S. aureus*.

### 4.2 Materiales

#### 4.2.1 Reactivos

Las proteínas empleadas son las mismas que las utilizadas en la Parte 1 de este trabajo de Tesis Doctoral (ver apartado 1.2.1, Capítulo 1), e incluyen los productos comerciales: ALB de suero bovino y FBG de plasma humano, ambos de Sigma-Aldrich.

Los reactivos glutaraldehído, NaCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, etanol, dextrosa, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fueron obtenidos de J.T. Baker, peptona ácida de caseína, peptona de soja y agar de Laboratorios Britania, el aceite de montaje y los colorantes SYTO 9 y yoduro de propidio forman parte del kit comercial “LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability” que fue adquirido a Invitrogen, el colorante azul de Coomassie G-250 fue obtenido de Sigma-Aldrich, la acetona fue obtenida de Carlo Erba, y el SFB fue adquirido de Laboratorios Natocor.

Todos los reactivos son de grado analítico y fueron utilizados sin purificaciones previas. Las soluciones acuosas fueron preparadas en agua

deionizada de resistencia 18 M $\Omega$ /cm (Sistema Milli Q, Millipore). A menos que se aclare previamente, todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C).

### 4.2.2 Superficies

Las superficies que se utilizaron consisten en sustratos sólidos de silicio que fueron obtenidos en Silicon Valley Microelectronics, con una película de sílica de aproximadamente 100 nm de espesor, que se generó por oxidación a 1000 °C durante 1 h, al igual que las utilizadas en la Parte 1 (ver apartado 1.2.2, Capítulo 1).

Dichas superficies fueron reutilizadas luego de cada experimento. Para ello, se realizó un procedimiento de lavado con solución piraña (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3:1) a 100 °C durante 1 h y posteriormente fueron enjuagadas con abundante cantidad de agua deionizada.

### 4.2.3 Ceba bacteriana, medios de cultivo y tinción

Para estudiar la adhesión bacteriana se empleó la misma cepa bacteriana, medios de cultivo y tinción que los que fueron utilizados en la Parte 1 (ver apartado 1.2.3, Capítulo 1). Brevemente, la cepa bacteriana utilizada fue *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, los medios de cultivo incluyen agar y caldo triptona soja (TSA y TSB, respectivamente), y la tinción para visualizar a las bacterias por Microscopía de Fluorescencia consiste en una mezcla de colorantes compuesta por SYTO 9 (verde) y yoduro de propidio (rojo) que difieren en su habilidad para penetrar células bacterianas con membrana intacta [1]. Así, las células con membrana intacta o vivas se observan de color verde y las células con membrana dañada o muertas se visualizan de color

---

rojo. Los experimentos de adhesión bacteriana sobre las superficies de sílica se realizaron en PBS a pH 7,3, y en PBS a pH 7,3 suplementado con 10% de SFB.

Los medios de cultivo y el material de laboratorio empleado fueron esterilizados por calor húmedo en autoclave a 121 °C durante 20 min a 1 atm de sobrepresión.

## 4.3 Métodos

### 4.3.1 Preparación de soluciones de proteínas

Previo a cada experimento, se prepararon soluciones frescas ya sea de ALB o de FBG en PBS a pH 7,3, tal como fue detallado en el apartado 1.3.3 del Capítulo 1. La concentración de FBG fue determinada mediante el método de Bradford [2]. Para ello, se analizó la relación entre la absorbancia a 595 nm (complejo colorante-proteína) y la absorbancia a 465 nm (colorante libre), la cual es estrictamente lineal con la concentración de proteína [3].

Para inducir la desnaturalización de ALB y FBG, se procedió a optimizar un tratamiento térmico de las soluciones de proteína. Para ello, se estudió la desnaturalización térmica del FBG mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Con este fin, la muestra compuesta por solución de FBG en PBS fue exhaustivamente desgasificada antes de ser inyectada en la celda calorimétrica para evitar la formación de burbujas de aire. La estructura secundaria de ambas proteínas fue estudiada por Dicroísmo Circular (CD). Con el propósito de que la solución reguladora no absorba en el rango de longitudes de onda empleado, y teniendo en cuenta que el Cl<sup>-</sup> absorbe fuertemente en la región de estudio, el NaCl del PBS fue reemplazado por Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM para mantener la fuerza iónica en condiciones fisiológicas [4,5].

### 4.3.2 Calorimetría Diferencial de Barrido

La Calorimetría Diferencial de Barrido ha sido el método más ampliamente usado de todos los métodos térmicos de análisis [6]. Este método consiste en medir la diferencia en la cantidad de calor aportado a una sustancia y a una sustancia de referencia en función de la temperatura de la muestra, cuando las dos están sometidas a un programa de temperatura controlado [7]. Los resultados se pueden expresar como capacidad calorífica en función de la temperatura y, a partir de las transiciones que sufre el compuesto, se puede calcular la temperatura de fusión o de transición característica, así como los cambios de entalpía implicados en dicha transición [7].

Las medidas calorimétricas de la solución de FBG se realizaron en un calorímetro modelo VP-DSC de MicroCal en el laboratorio del Dr. Guillermo Montich (CIQUIBIC-Dpto. de Química Biológica, FCQ-UNC). Se utilizó una velocidad de calentamiento de 30 °C/h, y el rango de temperatura analizado fue entre 20 y 95 °C. Se utilizó PBS en la celda de referencia y una solución de FBG de concentración 1,5000 mg/ml en la celda de la muestra. Una presión de 25 p.s.i. fue aplicada a ambas celdas [8].

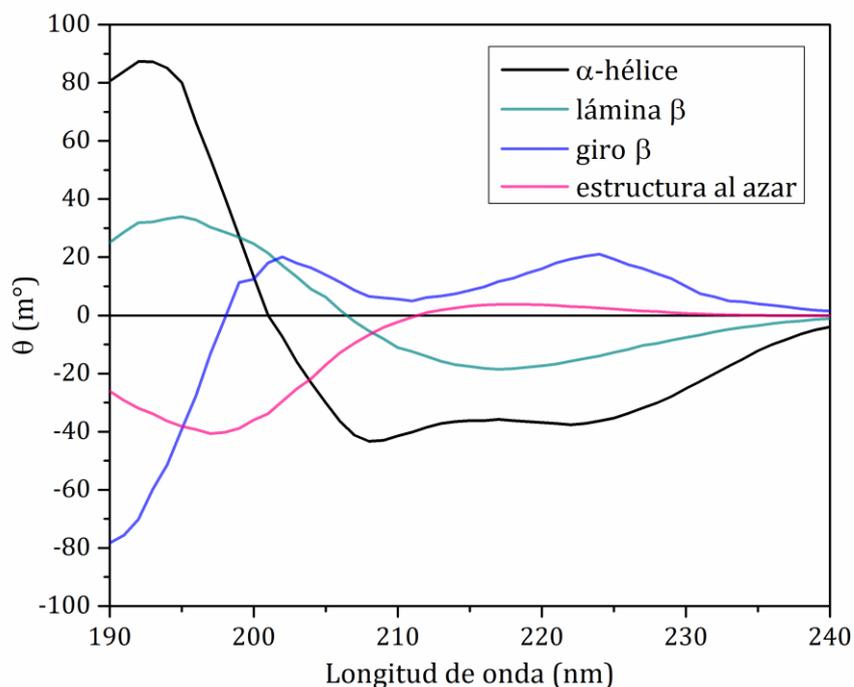
### 4.3.3 Dicroísmo Circular

Se estudió el efecto del tratamiento térmico en la estructura secundaria de ALB y de FBG nativas en solución, mediante Dicroísmo Circular. Ésta, se trata de una herramienta versátil que permite estudiar la estructura de proteínas en solución acuosa en una variedad de condiciones (tales como pH, fuerza iónica, temperatura, presencia de agentes desnaturizantes o

---

entrecruzantes, entre otros) [4]. La luz linealmente polarizada puede describirse como la superposición de dos componentes opuestos de luz polarizada circular de igual amplitud y fase, uno que gira en sentido anti horario y otro que gira en sentido horario [4,9]. Cuando la luz atraviesa una muestra ópticamente activa, puede haber una absorción diferencial de esos dos componentes, de tal forma que si son adsorbidos en distinta extensión la radiación resultante va a tener una polarización elíptica [4,9]. Así, el Dicroísmo Circular es una técnica de espectroscopia de absorción que se refiere a la absorción diferencial de los componentes de la luz linealmente polarizada en muestras con cromóforos quirales [4]. Los espectros de CD consisten en el registro de la elipticidad ( $\theta$ ) en función de la longitud de onda.

La Espectroscopia de CD es una técnica valiosa para analizar la estructura secundaria y terciaria de proteínas en solución. Los principales grupos ópticamente activos de las proteínas incluyen el enlace peptídico y las cadenas aromáticas laterales. En las proteínas, estos cromóforos se encuentran altamente ordenados dentro de matrices (tales como las estructuras  $\alpha$ -hélice o láminas  $\beta$ ), y generan múltiples transiciones ópticas en diferentes regiones del espectro y de variadas intensidades [10]. Estas señales medidas en función de la longitud de onda en la región del UV lejano (190 a 240 nm) proporcionan espectros de CD característicos de cada tipo de estructura secundaria (Figura 4.1), tales como  $\alpha$ -hélice, láminas  $\beta$  ( $\beta$ -sheet), giros  $\beta$  y estructura al azar (random coil). Por lo tanto, analizando el espectro de CD en la región del UV lejano se pueden conocer las contribuciones de los distintos elementos de estructura secundaria a la estructura global de la proteína en estudio. Para que este análisis sea cuantitativo, se utilizan algoritmos que, a partir del procesamiento de estos datos, permiten estimar la composición de la



**Figura 4.1** Espectros de CD de polipéptidos en conformaciones  $\alpha$ -hélice, lámina  $\beta$ , giro  $\beta$  y estructura al azar.

estructura secundaria de las proteínas. Entre ellos se pueden mencionar: SELCON (self-consistent) [11], VARSLC (variable selection) [12], CDSSTR [10], K2d y CONTIN [13]. Estos algoritmos emplean una base de datos de proteínas cuya estructura secundaria ha sido determinada por cristalografía de rayos X. El servidor web DICHROWEB [4] permite utilizar todos estos algoritmos y obtener la composición de la estructura secundaria a partir de la deconvolución de los espectros experimentales. La confiabilidad del ajuste que realiza cada algoritmo se puede estimar teniendo en cuenta el valor del parámetro “raíz de la desviación cuadrática media normalizada” (NRMSD). Ésta, es una medida de la desviación entre el valor calculado y el experimental, de tal forma que se define como:

$$NRMSD = \left[ \frac{\sum(\theta_{exp} - \theta_{cal})^2}{\sum(\theta_{exp})^2} \right]^{1/2} \quad (1)$$

---

y va desde 0 (ajuste perfecto) a 1 (no ajusta en absoluto). Para considerar que el programa realizó un buen ajuste, el NRMSD debe ser menor que 0,25 [4,14]. En la práctica, el objetivo es obtener valores menores a 0,1 o idealmente menores o iguales a 0,05. Un valor bajo de NRMSD ( $< 0,1$ ) es una condición necesaria, pero no suficiente para determinar con precisión la estructura secundaria [4]. Sin embargo, un valor elevado es una certeza de que el análisis es malo o que la base de datos de referencia no es apropiada para las características de la proteína que se está analizando [15].

Se emplearon diferentes tratamientos térmicos de las soluciones de ALB: 58 °C durante 15 min, 1, 2 y 18 h y 65 °C durante 1 y 18 h. Para evaluar la diferencia en la estructura secundaria de la ALB nativa respecto de la tratada térmicamente, se realizó un análisis cuantitativo mediante el servidor DICHROWEB utilizando el algoritmo CDSSTR. Para FBG, los tratamientos térmicos de las soluciones incluyeron: 60 °C y 65 °C durante 1 y 18 h para cada una de las temperaturas mencionadas. El estudio de la estructura secundaria de FBG tratado térmicamente no pudo analizarse de manera cuantitativa, ya que no se obtuvo un ajuste confiable con las bases de datos de proteínas existentes en este servidor web. Por lo tanto, se realizó un análisis cualitativo evaluando la diferencia respecto al espectro de la proteína nativa.

Los espectros de CD fueron realizados en la región del UV lejano comprendida entre los 190 y 260 nm, con una celda de cuarzo de 0,1 cm de paso óptico. El espectropolarímetro utilizado fue marca Jasco, modelo J-810. Las determinaciones se realizaron a una concentración de 0,1000 mg/ml de ALB o de FBG en PBS a temperatura ambiente. Para el espectro del blanco, fue utilizada esta solución de PBS. Para todas las mediciones, se utilizó un ancho de banda de 1 nm, una resolución de paso de 0,2 nm y una velocidad de barrido de 100 nm/min. Cada espectro se registró con 32 barridos.

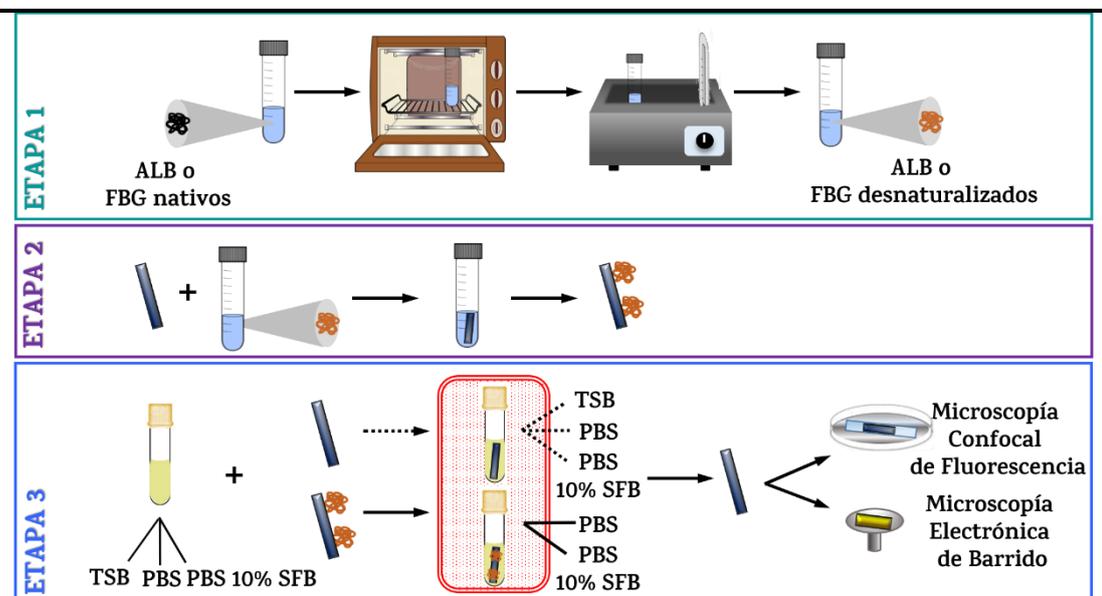
#### 4.3.4 Preparación de la suspensión bacteriana

El procedimiento que se empleó para preparar la suspensión de *S. aureus* para estudiar su adhesión sobre superficies de sílica biofuncionalizadas con ALB o FBG es el mismo que el que se utilizó para desarrollar la Parte 1 (detallado en el apartado 1.3.6 del Capítulo 1). En síntesis, los primeros pasos de dicho procedimiento consisten en el crecimiento de colonias en medio de cultivo sólido (TSA) para inocular posteriormente un medio de cultivo líquido como TSB, y allí ajustar la concentración del inóculo mediante Espectroscopía UV-Visible. La concentración del inóculo bacteriano utilizado fue de  $10^8$  o  $10^7$  UFC/ml, según el tiempo de incubación con la superficie utilizado, 40 min o 18 h, respectivamente. Luego, para evitar la interferencia de los componentes del medio de cultivo en la biofuncionalización con ALB o FBG, la suspensión bacteriana fue centrifugada y las bacterias fueron re-suspendidas en PBS [16].

En particular para la Parte 2, se incluye el estudio de la adhesión bacteriana en superficies biofuncionalizadas con ALB o FBG en un medio de relevancia fisiológica, es decir, que se asemeja al medio biológico real con el cual estará en contacto el biomaterial. Para ello, se estudió la adhesión bacteriana en PBS con 10% de SFB. En estos experimentos, el SFB fue filtrado con filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  previamente a ser utilizado. En este caso, la suspensión bacteriana se centrifugó, se re-suspendió en PBS con 10% de SFB y se incubó con las superficies biofuncionalizadas durante un tiempo de incubación de 18 h.

### 4.3.5 Diseño experimental para la biofuncionalización superficial y la adhesión bacteriana

Para estudiar el efecto de la biofuncionalización superficial sobre la adhesión bacteriana, se planteó el diseño experimental esquematizado en la Figura 4.2 en cada una de sus etapas. Cada condición experimental fue evaluada por duplicado. Cabe destacar que las soluciones y el material empleado en todas las etapas fue esterilizado previo a su uso, y las actividades correspondientes a cada etapa fueron realizadas en ambiente estéril siempre que el procedimiento lo permita, para evitar introducir contaminación bacteriana a la muestra. En este diseño experimental, en primer lugar se realiza el tratamiento térmico de la solución de ALB o de FBG (Figura 4.2, Etapa 1). Para ello, se somete la solución de proteína a un calentamiento a temperatura y tiempo determinados: para ALB se exploró la temperatura de 65 °C con una duración de 1 y 18 h; y para FBG, 60 °C durante 1 h. Posterior al tratamiento térmico, se realiza el enfriamiento controlado sumergiendo las



**Figura 4.2** Diseño experimental para la biofuncionalización superficial y la adhesión bacteriana.

## Parte experimental

---

soluciones en un baño de agua a 30°C por 1 h. Las  $C_p$  utilizadas en la biofuncionalización variaron en función del tiempo de incubación con la bacteria. Para evaluar la adhesión bacteriana inicial se utilizó ALB 0,1000 mg/ml y FBG 0,0500 mg/ml (correspondiente al sobrenadante obtenido posterior al tratamiento térmico). Para evaluar la formación del biofilm en PBS fueron exploradas para ALB las  $C_p$  de 0,1000 mg/ml y 0,0050 (la dilución se realizó luego del tratamiento térmico), y para FBG la  $C_p$  de 0,0500 mg/ml. Para la formación del biofilm en PBS con 10% de SFB fueron empleadas concentraciones de 0,1000 mg/ml para ambas proteínas. La siguiente etapa incluye la biofuncionalización superficial, que comprende la inmersión de las superficies en solución de ALB o FBG con estructura parcialmente desnaturalizada durante 1 h a temperatura ambiente (Etapa 2). Posteriormente, las superficies fueron sumergidas en la suspensión bacteriana en posición vertical e incubadas a 37 °C por un cierto tiempo de incubación; 40 min para evaluar la adhesión bacteriana inicial o 18 h para evaluar la formación del biofilm (Etapa 3). La suspensión bacteriana fue preparada tal como fue detallado previamente en el apartado 4.3.4, cuyo medio consiste en PBS o PBS con 10% SFB, en el caso de superficies biofuncionalizadas y TSB, PBS o PBS con 10% SFB, en el caso de los controles (superficies sin biofuncionalización). Para visualizar las bacterias adheridas, se realizó posteriormente la preparación de las muestras para las técnicas microscópicas utilizadas (Microscopia Confocal de Fluorescencia y Microscopía Electrónica de Barrido).

### 4.3.6 Microscopía Confocal de Fluorescencia

El procedimiento que se empleó para preparar las superficies para ser analizadas por Microscopía Confocal de Fluorescencia es el mismo que el que se utilizó para desarrollar la Parte 1, y que fue detallado en el apartado 1.3.10 del Capítulo 1. En síntesis, el primer paso incluye el lavado de las superficies para remover las bacterias no adheridas con una solución estéril 150 mM de NaCl [17]. Posteriormente, se realiza la tinción de las muestras, depositando la mezcla de colorantes SYTO 9 y yoduro de propidio sobre las superficies e incubándolas a temperatura ambiente protegidas de la luz por 15 min [1]. Luego, se lavan con agua deionizada estéril, se secan al aire, se montan con aceite de montaje y se observan al microscopio de inmediato.

Las imágenes fueron captadas con los microscopios confocales de fluorescencia Olympus FV 300 y FV 1000 del Centro de Micro y Nanoscopía de Córdoba (CEMINCO, CIQUIBIC-Dpto. de Química Biológica, FCQ-UNC). Se tomaron al menos 8 imágenes de diferentes regiones seleccionadas al azar de cada uno de los duplicados. Es decir, se obtuvieron un mínimo de 16 imágenes de cada condición analizada. Las imágenes se procesaron con los softwares “Image J” [18] y “Olympus Viewer FV 300 y FV 1000”. Para estudiar la adhesión bacteriana inicial, se realizó una comparación cuantitativa de las imágenes, para lo cual se cuantificaron la totalidad de células rojas (muertas) y verdes (vivas) de cada imagen adquirida. Las respuestas analizadas incluyen: el porcentaje de variación del porcentaje de bacterias vivas y de las bacterias totales/ $\mu\text{m}^2$  respecto a la media obtenida para superficies sin biofuncionalizar. El porcentaje de bacterias vivas se expresa respecto del total de bacterias contadas. Las bacterias totales/ $\mu\text{m}^2$ , requiere sumar el número de bacterias

vivas y muertas, y expresar el número total por área considerando la dimensión y la resolución de la imagen. Para cada una de estas respuestas, se calculó la variación entre la condición de biofuncionalización a evaluar respecto a los controles. Es decir, dichas respuestas se expresaron como un porcentaje de variación respecto a la media obtenida para superficies sin biofuncionalización. Para evaluar la formación del biofilm, se realizó una comparación cualitativa de las imágenes y una evaluación cuantitativa cuya respuesta consiste en expresar el número de bacterias/ $\mu\text{m}^2$ , diferenciando las bacterias vivas de las muertas. Para ello, a partir del conteo de bacterias vivas y muertas, se realizó el cálculo por el área. Las incertezas se expresaron con el intervalo de confianza del 95%. Se realizó un ANOVA de una vía con un nivel de significación de 0,05 con el test *a posteriori* DGC para efectuar comparaciones entre las diferentes condiciones de adsorción de proteína evaluadas. Ambos test estadísticos fueron realizados con el software “InfoStat” [19].

### 4.3.7 Microscopía Electrónica de Barrido

El procedimiento que se empleó para preparar las superficies para ser analizadas por Microscopía Electrónica de Barrido, es el mismo que se utilizó para desarrollar la Parte 1, y que fue detallado en el apartado 1.3.11 del Capítulo 1. El secado por punto crítico se realizó en un secador Bal-Tec CPD 030 y la adquisición de las imágenes se llevó a cabo con un microscopio electrónico de barrido Zeiss Sigma, ambos equipos pertenecientes al Laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis por Rayos X (LAMARX) de la Facultad de Astronomía, Física y Matemática-UNC.

---

## Referencias

- [1] Molecular Probes, 2004. LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits. Product Information. Molecular Probes, Inc.
- [2] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [3] T. Zor, Z. Selinger, Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies, *Anal. Biochem.* 236 (1996) 302–308. doi:10.1006/abio.1996.0171.
- [4] S.M. Kelly, T.J. Jess, N.C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1751 (2005) 119–139. doi:10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
- [5] N.J. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 2876–2890. doi:10.1038/nprot.2006.202.
- [6] L.D. Hansen, R.M. Hart, The art of calorimetry, *Thermochim. Acta.* 417 (2004) 257–273. doi:10.1016/j.tca.2003.07.023.
- [7] M.J. Richardson, Quantitative aspects of differential scanning calorimetry, *Thermochim. Acta.* 300 (1997) 15–28. doi:10.1016/S0040-6031(97)00188-3.
- [8] M.B. Decca, M. Perduca, H.L. Monaco, G.G. Montich, Conformational changes of chicken liver bile acid-binding protein bound to anionic lipid membrane are coupled to the lipid phase transitions, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1768 (2007) 1583–1591. doi:10.1016/j.bbamem.2007.03.018.
- [9] A.J. Miles, B.A. Wallace, Circular Dichroism Spectroscopy for Protein Characterization: Biopharmaceutical Applications, *Biophys. Charact. Proteins Dev. Biopharm.* (2014) 109–137. doi:10.1016/B978-0-444-59573-7.00006-3.
- [10] W.C. Johnson, Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 35 (1999) 307–312. doi:10.1002/(SICI)1097-0134(19990515)35:3<307::AID-PROT4>3.0.CO;2-3.
- [11] N. Sreerama, R.W. Woody, A Self-Consistent Method for the Analysis of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism, *Anal. Biochem.* 209 (1993) 32–44. doi:10.1006/abio.1993.1079.
- [12] P. Manavalan, W.C. Johnson, Variable Selection Method Improves the Prediction of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra, 85 (1987) 76–85.
- [13] S.W. Provencher, J. Glöckner, Estimation of Globular Protein Secondary Structure from Circular Dichroism, *Biochemistry.* 20 (1981) 33–37. doi:10.1021/bi00504a006.
- [14] N. Sreerama, S.Y. Venyaminov, R.W. Woody, Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Inclusion of Denatured Proteins with Native Proteins in the Analysis, 251 (2000) 243–251. doi:10.1006/abio.2000.4879.
- [15] L. Whitmore, B.A. Wallace, Protein secondary structure analyses from circular dichroism

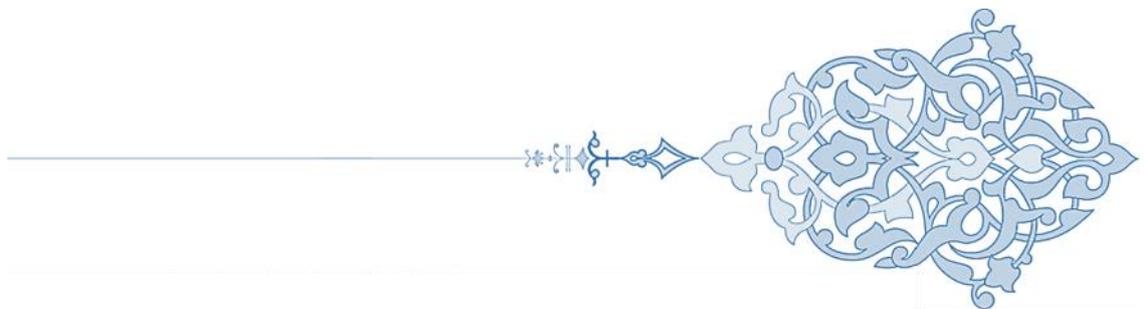
## Parte experimental

---

- spectroscopy: Methods and reference databases, *Biopolymers*. 89 (2008) 392–400. doi:10.1002/bip.20853.
- [16] B. Fang, S. Gon, M. Park, K.N. Kumar, V.M. Rotello, K. Nusslein, M.M. Santore, Bacterial adhesion on hybrid cationic nanoparticle-polymer brush surfaces: Ionic strength tunes capture from monovalent to multivalent binding, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 87 (2011) 109–115. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.05.010.
- [17] C.Y. Flores, A.G. Miñán, C.A. Grillo, R.C. Salvarezza, C. Vericat, P.L. Schilardi, Citrate-capped silver nanoparticles showing good bactericidal effect against both planktonic and sessile bacteria and a low cytotoxicity to osteoblastic cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 5 (2013) 3149–3159. doi:10.1021/am400044e.
- [18] (National Institute of Mental Health) Rasband, Wayne, *Image J*, (2011).
- [19] J.A. Di Rienzo, F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, C.W. Robledo, *InfoStat*, (2011).

# CAPÍTULO 5

## Biofuncionalización con albúmina o fibrinógeno y adhesión bacteriana





---

## Capítulo 5: Biofuncionalización con albúmina o fibrinógeno y adhesión bacteriana

### 5.1 Introducción

En el presente Capítulo, se discutirán los resultados relacionados al desarrollo de una estrategia de biofuncionalización superficial con ALB o FBG que sea capaz de inhibir la formación del biofilm de *S. aureus*. Con este propósito, se pretende imitar la perturbación estructural ejercida por la superficie sobre las proteínas adsorbidas, que surgió a partir de los resultados de la Parte 1. Este capítulo incluye, en primer lugar, el estudio de la desnaturalización de FBG por Calorimetría Diferencial de Barrido y de la estructura secundaria de soluciones de ALB y de FBG mediante Dicroísmo Circular. En segundo lugar, se estudia la adhesión de *S. aureus* sobre las superficies biofuncionalizadas con ALB y con FBG para evaluar la adhesión bacteriana inicial y la formación del biofilm mediante Microscopía Confocal de Fluorescencia y Microscopía Electrónica de Barrido. Por último, se incluye el estudio de la adhesión bacteriana en condiciones capaces de formar biofilm en un medio de relevancia fisiológica.

### 5.2 Resultados y Discusión

#### 5.2.1 Biofuncionalización con albúmina o fibrinógeno

##### 5.2.1.1 Desnaturalización térmica

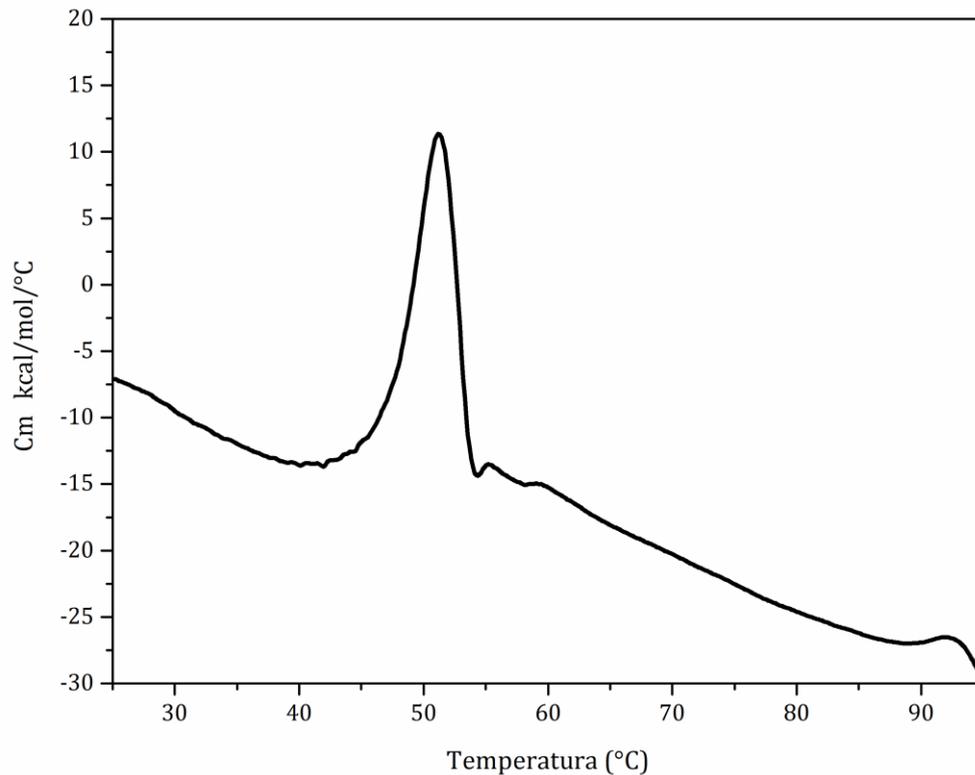
Como modo de alterar la estructura de ALB o de FBG, se eligió la desnaturalización térmica de la proteína en solución. Esta elección se basa en evitar la introducción de un componente ajeno al sistema como agente

desnaturalizante. Posteriormente, las soluciones tratadas térmicamente se emplearon para biofuncionalizar las superficies de sílica.

La desnaturalización térmica de ALB ha sido ampliamente estudiada en la literatura [1-4]. Se conoce que la estructura secundaria de ALB se compone principalmente de  $\alpha$ -hélice, la cual disminuye considerablemente con el aumento de la temperatura por encima de los 30 °C [1,4]. La temperatura de transición hacia una estructura perturbada se encuentra en torno a los 57°C [3]. Por ello, se eligió explorar su desnaturalización con tratamientos térmicos a 58 °C y a 65 °C por diferentes periodos de tiempo.

La desnaturalización térmica de FBG ha sido menos explorada en la literatura [5,6] y por ello, se realizó un análisis térmico de una solución de FBG mediante Calorimetría Diferencial de Barrido con el fin de optimizar las condiciones del tratamiento térmico. Como ya fue expuesto en el Capítulo 3, la estructura del FBG puede describirse en términos de cadenas polipeptídicas  $(A\alpha B\beta\gamma)_2$ , o en términos de fragmentos [7,8]. Cuando se produce la degradación del FBG por plasmina, ocurre la lisis en las hélices superenrolladas, de tal forma que se recuperan dos fragmentos principales: el fragmento E y el fragmento D. El fragmento E corresponde a parte del dominio central y a la hélice superenrollada, y el fragmento D incluye todo el dominio distal y una porción de la hélice superenrollada [5,7-9]. Los sitios de unión de las proteínas de la pared celular de *S. aureus* incluyen las regiones del C-terminal de la cadena  $\gamma$  y del C-terminal de la cadena  $\alpha$  de la molécula de FBG, los cuales pertenecen al fragmento D [10,11].

La Figura 5.1 muestra el termograma de una solución de FBG. Se observan dos transiciones endotérmicas principales situadas a 51 y 93 °C, que concuerdan con los resultados reportados por Donovan y Mihalyi [12] y por



**Figura 5.1** Termograma de una solución 1,5000 mg/ml de FBG.

Privalov [13]. La transición correspondiente a la menor temperatura se asigna al despliegue de tres regiones termolábiles cooperativas del fragmento D, una de las cuales es el C-terminal de la cadena  $\gamma$  [14]. Además, a 55 °C se observa una transición pequeña que es asignada al C-terminal de la cadena  $\alpha$  [14]. La transición observada a mayor temperatura, se atribuye a la desnaturalización del fragmento central E y de la porción de la hélice superenrollada que corresponde al fragmento D [5,6]. Debido a que los sitios de unión de *S. aureus* comprenden las regiones del C-terminal de la cadena  $\gamma$  y del C-terminal de la cadena  $\alpha$ , se espera que si la temperatura se aumenta por arriba de 55 °C se alteren estos sitios de unión. Tal como fue discutido en el Capítulo 3, se desarrollan interacciones específicas entre *S. aureus* y el FBG en este sistema, por lo cual, se espera que al alterar el sitio de unión se vea disminuida considerablemente la adhesión bacteriana. Se seleccionó la temperatura de

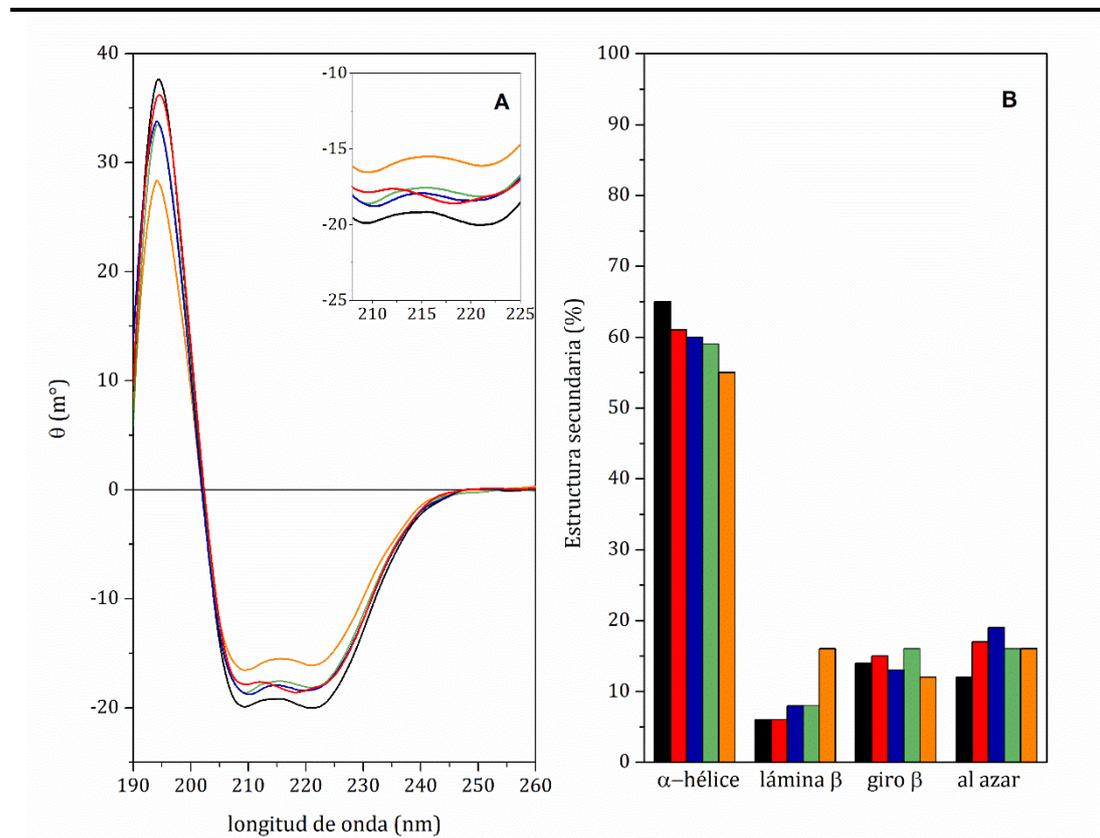
60 °C para realizar el tratamiento térmico de soluciones de FBG por diferentes periodos de incubación. Así, el estudio de la adhesión en estas condiciones puede aportar evidencia sobre las interacciones específicas entre FBG y *S. aureus*.

### 5.2.1.2 Estructura secundaria

Se utilizó la técnica de Dicroísmo Circular para estudiar los cambios de la estructura secundaria de ALB o de FBG provocados por el tratamiento térmico. Para ello, a partir de los espectros obtenidos se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo. Las soluciones de ALB o de FBG fueron sometidas a un tratamiento térmico según fue detallado en el Capítulo 4 (Etapa 1, Figura 4.2).

Se exploraron distintas condiciones de tratamiento térmico: 58 °C (durante 15 min, 1 , 2 y 18 h) y 65 °C (durante 1 y 18 horas). La Figura 5.2 muestra el espectro de CD para ALB tratada a 58 °C durante diferentes periodos de tiempo (A) y el porcentaje de estructura secundaria (B). El porcentaje de cada tipo de estructura secundaria fue obtenido mediante la deconvolución de los espectros utilizando el servidor web DICHROWEB con el algoritmo CDSSTR. Para todas las condiciones estudiadas, la raíz de la desviación cuadrática media normalizada (NRMSD) fue menor a 0,05, garantizando un buen ajuste de los datos experimentales. En todos los espectros, predomina el tipo de estructura  $\alpha$ -hélice, el cual exhibe bandas negativas en torno a 208 y 222 nm y una banda positiva por debajo de 195 nm [3,15,16]. No se observan diferencias considerables en la estructura secundaria con los diferentes periodos de tiempos empleados a esta temperatura. Sólo el mayor tiempo del tratamiento térmico (18 h), provocó un cambio notorio en

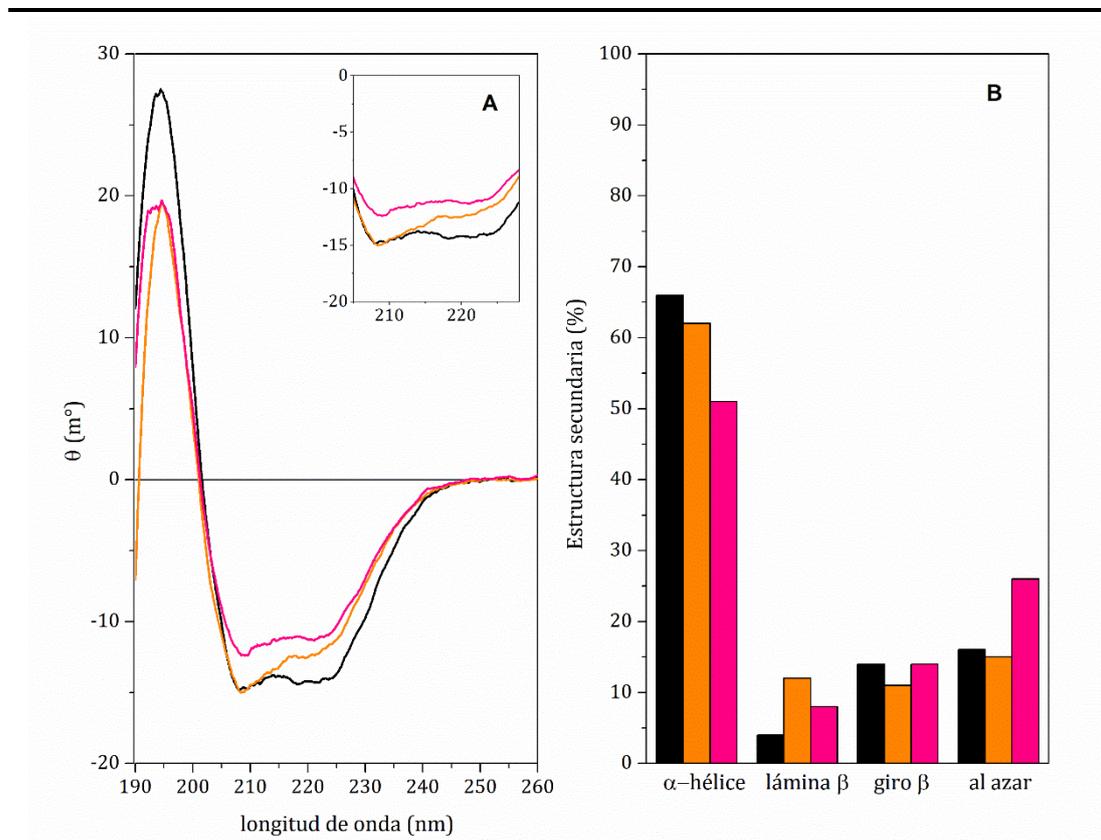
la elipticidad, dando lugar a un aumento de la estructura lámina  $\beta$  (de un 6% para ALB sin tratamiento térmico, a un 16%). Es por esto que se decidió explorar el cambio en la estructura secundaria de ALB a una mayor temperatura.



**Figura 5.2** Espectro de CD para ALB 0,100 mg/ml (A) y porcentaje de estructura secundaria (B): sin tratamiento térmico (negro) con tratamiento térmico a 58 °C por 15 min (rojo), por 1 h (azul), por 2 h (verde) y por 18 h (naranja).

La Figura 5.3 muestra el espectro de CD para ALB tratada térmicamente a 65°C durante diferentes periodos de tiempo (A) y el porcentaje de estructura secundaria (B). Al igual que en el caso anterior se utilizó el algoritmo CDSSTR y para todas las condiciones, la NRMSD fue menor a 0,05. La estructura secundaria muestra cierta pérdida en el contenido de  $\alpha$ -hélice a juzgar por los cambios en las bandas a 195 y 222 nm. El tratamiento térmico

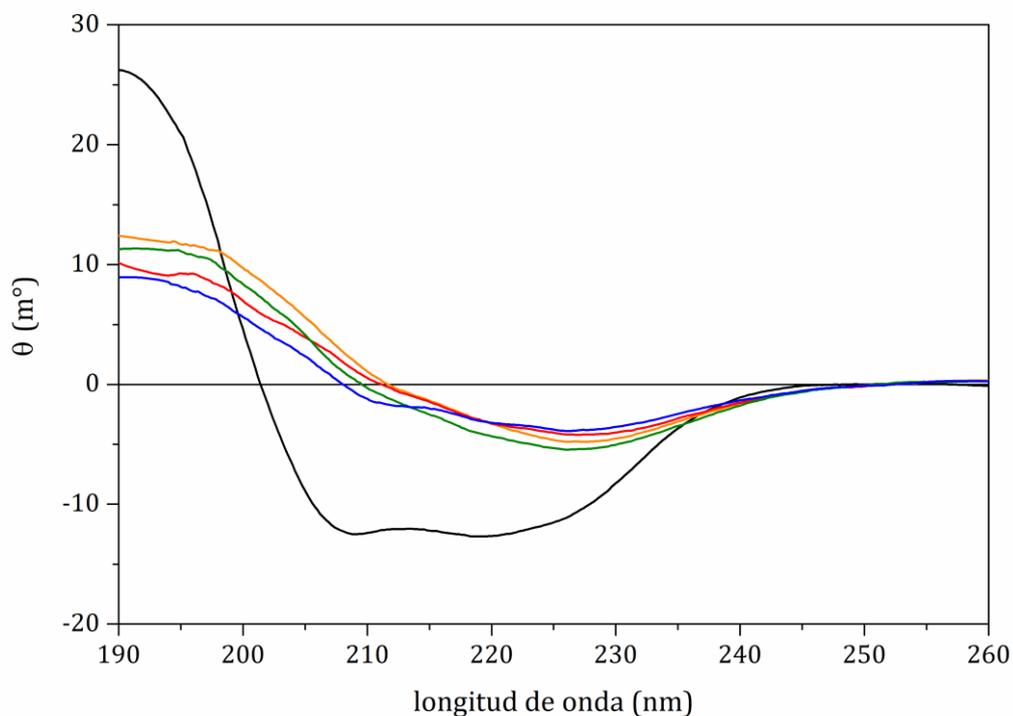
por 1 h conduce a un aumento en la estructura lámina  $\beta$  (de un 4% para ALB sin tratamiento térmico, a un 12%), mientras que el tratamiento por 18 h muestra una marcada pérdida de estructura secundaria junto con el surgimiento de estructura al azar (de un 16% para ALB sin tratamiento térmico, aumenta a un 26%). Sin embargo, no hay una pérdida completa de la estructura secundaria de ALB, sino que sufre una desnaturalización parcial. El tratamiento térmico de ALB a 65 °C por 1 h y por 18 h fue seleccionado para la biofuncionalización superficial.



**Figura 5.3** Espectro de CD para ALB 0,100 mg/ml (A) y porcentaje de estructura secundaria (B): sin tratamiento térmico (negro) con tratamiento térmico a 65 °C por 1 h (naranja) y por 18 h (fucsia).

La Figura 5.4 muestra el espectro de CD para FBG tratado térmicamente a 60 °C y a 65 °C durante diferentes periodos de tiempo. El

espectro de FBG sin tratamiento térmico corresponde a un alto contenido de  $\alpha$ -hélice de acuerdo con las bandas características a 208, 222, y 195 nm. Además, un análisis cuantitativo realizado mediante la deconvolución con el servidor DICHROWEB por el algoritmo CDSSTR respalda esta premisa (NRMSD<0,05). Dicho análisis indicó que la estructura secundaria consiste en  $\alpha$ -hélice en un 46%, lámina  $\beta$  en un 13%, giro  $\beta$  en un 15%, y estructura al azar en un 25%, lo que se encuentra en concordancia con los resultados publicados en la literatura [17]. Las diferentes condiciones de tratamiento térmico de FBG provocan grandes cambios espectrales respecto al FBG sin tratamiento. Sin embargo, estos cambios no pudieron analizarse cuantitativamente debido a la falta de ajuste con cualquier base de datos, incluidos los recomendados para proteínas fibrilares o desplegadas. De todas formas, es evidente que los



**Figura 5.4** Espectro de CD para FBG 0,100 mg/ml: sin tratamiento térmico (negro) con tratamiento térmico a 60 °C por 1 h (naranja), a 60 °C por 18 h (rojo), a 65 °C por 1 h (verde) y a 65 °C por 18 h (azul).

diferentes tratamientos térmicos conducen a alteraciones similares en la estructura secundaria dando lugar a una estructura de FBG parcialmente desnaturalizada. Por lo tanto, se seleccionó para la biofuncionalización superficial el tratamiento térmico que incluye menor temperatura (60 °C) y menor tiempo de tratamiento (1 h).

### **5.2.1.3 Biofuncionalización superficial**

La estrategia de biofuncionalización superficial incluye la adsorción de ALB o FGB parcialmente desnaturalizados sobre las superficies para inhibir la adhesión bacteriana. Para ello, luego del tratamiento térmico de ALB o FBG en solución las superficies se sumergen durante 1 h a temperatura ambiente tal como fue detallado en el Capítulo 4 (Etapa 2, Figura 4.2).

Para la biofuncionalización con ALB se emplearon dos condiciones de tratamiento térmico, 65 °C durante 1 h y 18 h, ya que se pretende evaluar el efecto que el tipo de estructura secundaria inducida por el tratamiento térmico tiene en la adhesión bacteriana (lámina  $\beta$  y estructura al azar, respectivamente). En cambio, en la biofuncionalización con FBG se empleó un único tratamiento térmico de 60 °C durante 1 h.

### **5.2.2 Adhesión bacteriana**

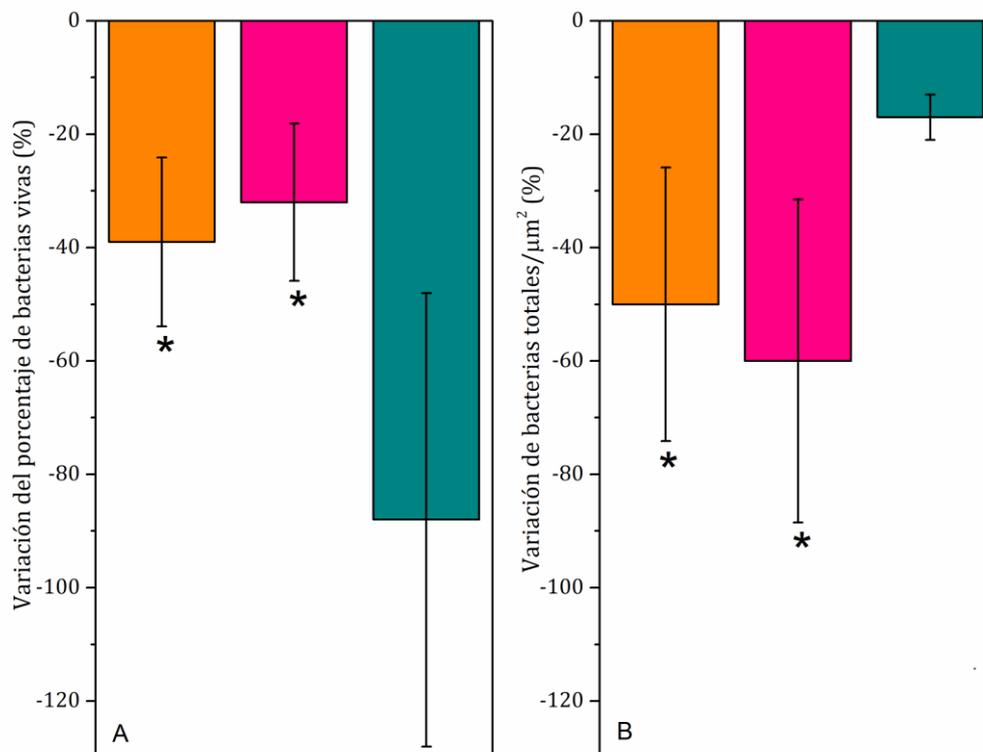
Los resultados desarrollados en la Parte 1 de este trabajo apuntan a una relación entre la conformación de la proteína adsorbida y la inhibición de la adhesión de *S. aureus*. En particular, se encontró una relación entre el grado de relajación de ALB o FBG adsorbidos y la adhesión bacteriana en su etapa inicial, y también en etapas posteriores (formación del biofilm). Concretamente, esta relación indica que en las condiciones en que se favorece

---

la relajación de la proteína adsorbida, se observa una menor adhesión bacteriana en todas sus etapas. En base a estos resultados, se planteó una estrategia de biofuncionalización que incluya la adsorción de proteínas de estructura alterada. Para evaluar la eficacia de dicha estrategia, se estudió la adhesión bacteriana sobre las superficies biofuncionalizadas. El diseño experimental fue detallado en el Capítulo 4 (Etapa 3, Figura 4.2). Brevemente, de forma inmediata a la biofuncionalización superficial, las superficies se incubaron en la suspensión bacteriana variando el medio y el tiempo de incubación. El medio de la suspensión bacteriana consistió en PBS a pH 7,3. En particular, para estudiar la adhesión bacteriana en un medio de relevancia fisiológica, se utilizó PBS con 10% SFB, tal como se describe en el Capítulo 4. Así, el medio de la suspensión bacteriana incluyó: PBS o PBS con 10% SFB en el caso de superficies biofuncionalizadas y medio de cultivo líquido TSB, PBS o PBS con 10% SFB en el caso de las superficies sin biofuncionalizar empleadas como referencia. El tiempo de incubación fue de 40 min para evaluar la adhesión bacteriana inicial, o de 18 h para evaluar la formación del biofilm. La adhesión bacteriana se estudió mediante Microscopía Confocal de Fluorescencia (Capítulo 4, apartado 4.3.6) y Microscopía Electrónica de Barrido (Capítulo 4, apartado 4.3.7). Con el fin de estudiar la adhesión bacteriana inicial se realizó una comparación cuantitativa de las condiciones de biofuncionalización de ALB o de FBG mediante el conteo de las bacterias vivas adheridas por Microscopía Confocal de Fluorescencia. Mientras que, para aquellas condiciones de biofuncionalización de ALB o FBG donde se pretende evaluar la formación del biofilm se efectuó una comparación cuali-cuantitativa de las imágenes captadas. Además, la morfología de las bacterias adheridas fue estudiada mediante Microscopía Electrónica de Barrido.

### 5.2.2.1 Adhesión bacteriana inicial

La Figura 5.5 muestra la variación del porcentaje de bacterias vivas (A) y de bacterias totales/ $\mu\text{m}^2$  (B) respecto a superficies sin biofuncionalización para la adhesión de *S. aureus* sobre superficies biofuncionalizadas con ALB o FBG. Se observa una inhibición en la adhesión bacteriana para la biofuncionalización con ambas proteínas respecto a las superficies sin biofuncionalizar. Además, no se evidenciaron diferencias significativas para la cantidad de bacterias vivas, ni para la cantidad de bacterias totales para



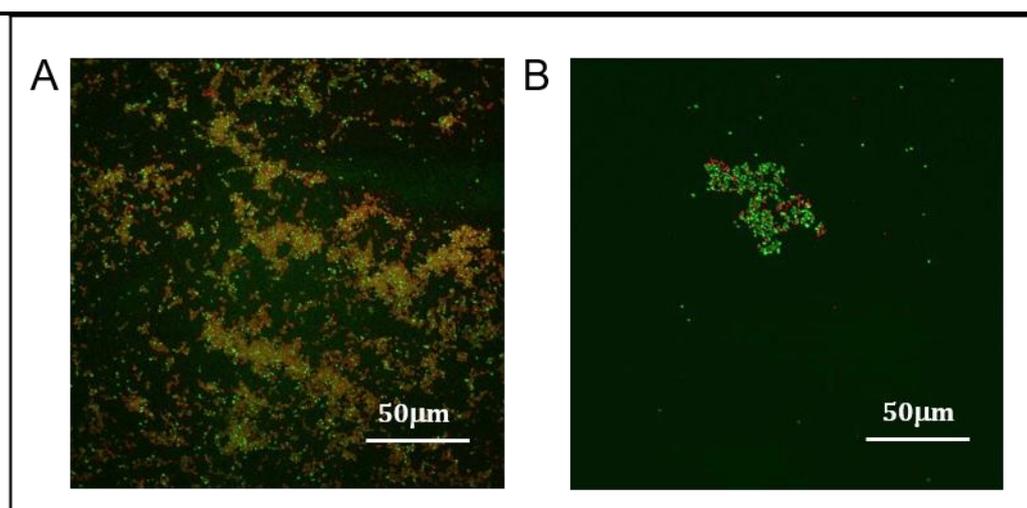
**Figura 5.5** Variación del porcentaje de bacterias vivas (A) y de bacterias totales/ $\mu\text{m}^2$  (B) para *S. aureus* adherida sobre superficies biofuncionalizadas con ALB o FBG, respecto a superficies sin biofuncionalizar para 40 min de adhesión. Las condiciones de biofuncionalización incluyen inmersión por 1 h en: ALB 0,1000 mg/ml tratada térmicamente a 65 °C por 1 h (naranja), por 18 h (fucsia), FBG 0,0500 mg/ml tratado térmicamente a 60 °C por 1 h (verde).

Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% y (\*) representa a condiciones con valores  $p > 0,05$ .

ambas condiciones de biofuncionalización con ALB (ANOVA y prueba *a posteriori* DGC). Es decir, el tipo de estructura secundaria de ALB (lámina  $\beta$  y estructura al azar) provoca el mismo grado de inhibición en la adhesión bacteriana en su etapa inicial. Por otra parte, la biofuncionalización con FBG resulta en la muerte de la mayoría de las bacterias adheridas. En consecuencia, la inhibición en la adhesión de *S. aureus* se debe a la biofuncionalización con ALB o FBG de estructura diferente a la nativa.

### 5.2.2.2 Formación del biofilm

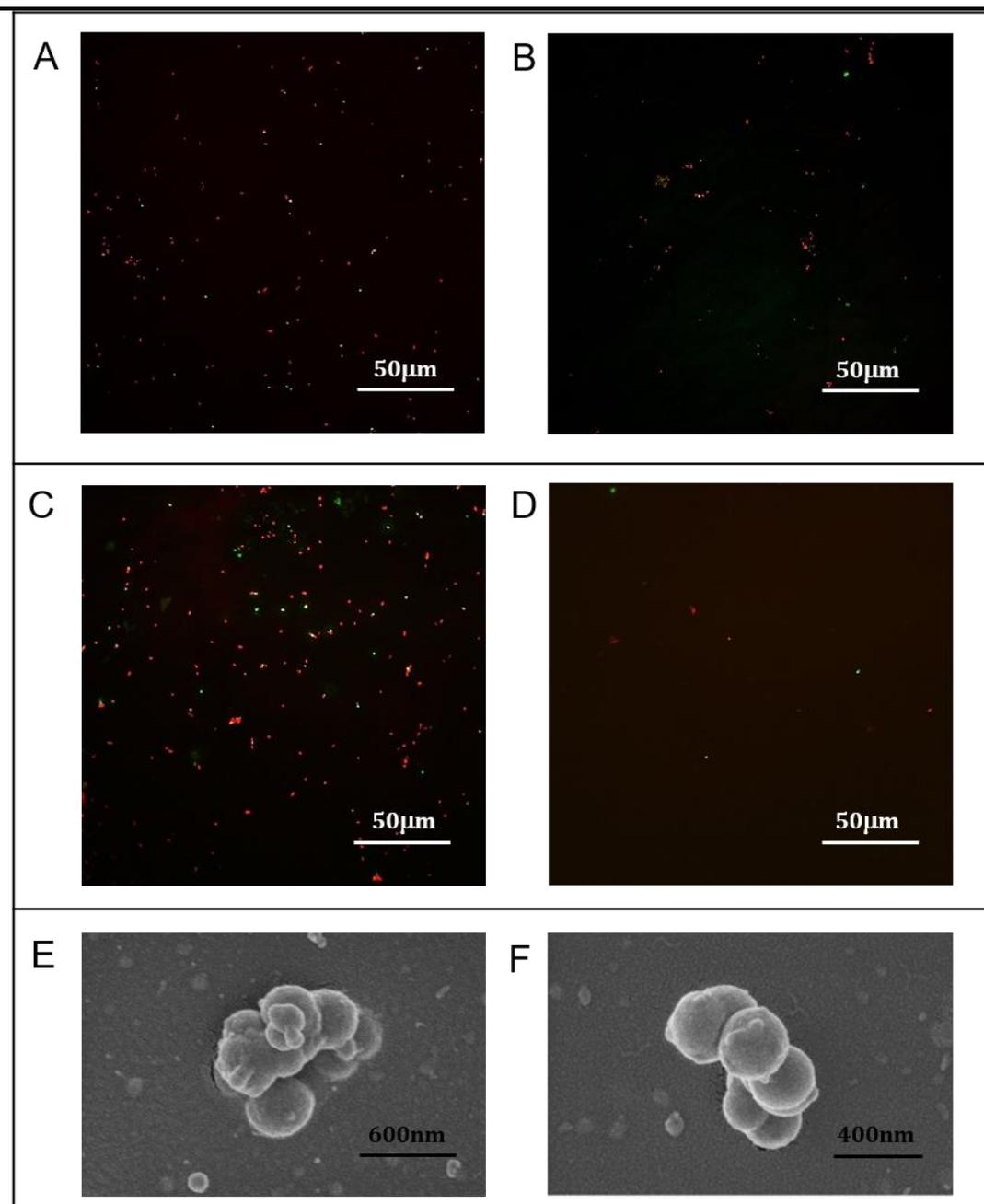
Con el propósito de evaluar si la biofuncionalización superficial con ALB y FBG parcialmente desnaturalizados es capaz de inhibir también la formación del biofilm, se estudió la adhesión de *S. aureus* a tiempos de incubación más largos (18 h). En estas condiciones, esta bacteria es capaz de formar biofilm en medio de cultivo TSB y en PBS a pH 7,3 (ver apartado 1.3.8, Capítulo 1). La Figura 5.6 muestra imágenes de Microscopía Confocal de Fluorescencia para evaluar la formación del biofilm de *S. aureus* sobre



**Figura 5.6** Imágenes de Microscopía Confocal de Fluorescencia de *S. aureus* sobre superficies a pH 7,3 en condiciones capaces de formar biofilm: (A) en TSB y (B) en PBS.

superficies sin biofuncionalización en TSB (A) y en PBS (B). Cabe aclarar que, estos controles fueron mostrados previamente en el Capítulo 2 (Figura 2.15) pero se repiten en el presente capítulo para mayor claridad. En el panel A es posible observar el crecimiento en forma de césped característico del biofilm. En el panel B, se observan microcolonias consistentes con la etapa previa a la formación de un biofilm maduro.

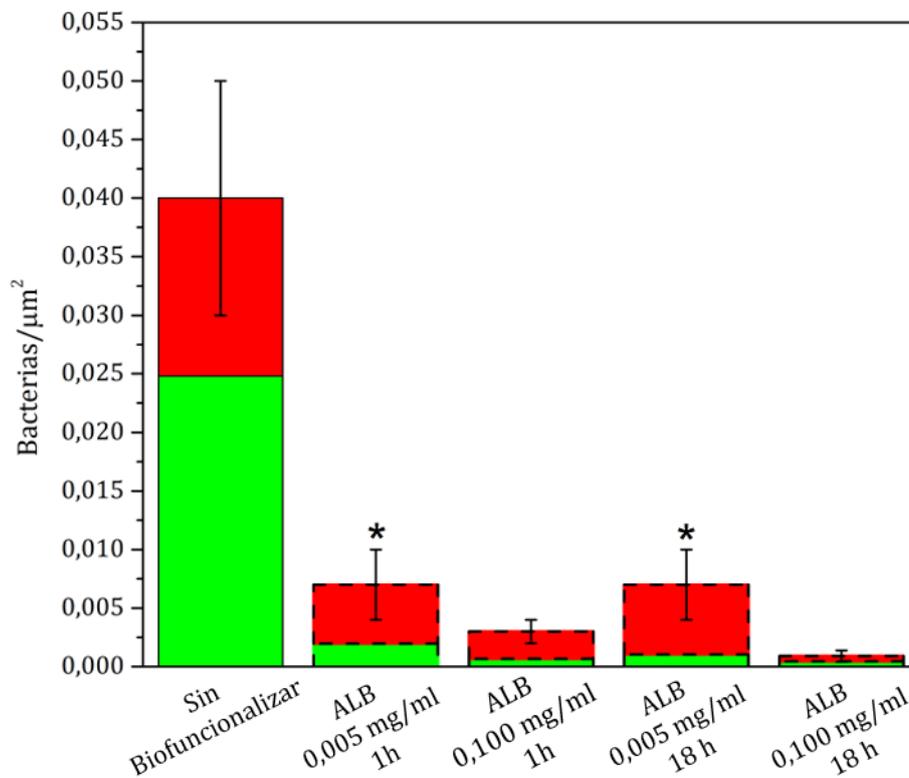
Para la biofuncionalización superficial con ALB, además de estudiar el efecto de los diferentes tipos de estructura secundaria, se incluyó el estudio de diferentes concentraciones de proteína. La Figura 5.7 muestra imágenes de *S. aureus* adherida sobre superficies biofuncionalizadas con ALB obtenidas por Microscopía Confocal de Fluorescencia y por Microscopía Electrónica de Barrido. El panel A corresponde a la condición de biofuncionalización de menor  $C_p$  (0,005 mg/ml), cuyo tratamiento térmico induce un aumento de lámina  $\beta$  (65 °C durante 1 h). Los paneles B, E y F representan a la misma condición de tratamiento térmico (65 °C durante 1 h) con mayor  $C_p$  (0,1000 mg/ml). El panel C corresponde a la condición de biofuncionalización con tratamiento térmico asociado a un aumento de estructura al azar (65 °C durante 18 h) de menor  $C_p$  (0,0050 mg/ml), y el panel D a la de mayor  $C_p$  (0,1000 mg/ml). Todas las condiciones de biofuncionalización inhiben la formación del biofilm, solo se observan algunas células adheridas. Esta inhibición se debe a la estructura secundaria de ALB perturbada respecto a la proteína nativa. En particular el tipo de estructura secundaria de ALB no es determinante en dicha inhibición. Por el contrario, al aumentar la concentración de ALB se observa una mayor inhibición en la formación del biofilm. Las bacterias adheridas presentan una distribución heterogénea del tamaño celular y se observan perturbaciones en la pared celular que corresponden a células bacterianas muertas.



**Figura 5.7** Imágenes de Microscopía Confocal de Fluorescencia y de Microscopía Electrónica de Barrido de *S. aureus* sobre superficies biofuncionalizadas con ALB en condiciones capaces de formar biofilm. Biofuncionalización con ALB: (A) 0,0050 y (B, E-F) 0,1000 mg/ml tratada térmicamente a 65 °C por 1 h y (C) 0,0050 y (D) 0,1000 mg/ml tratada térmicamente a 65 °C por 18 h.

Se cuantificó la inhibición de la formación del biofilm mediante el análisis de la adhesión bacteriana sobre las superficies biofuncionalizadas con

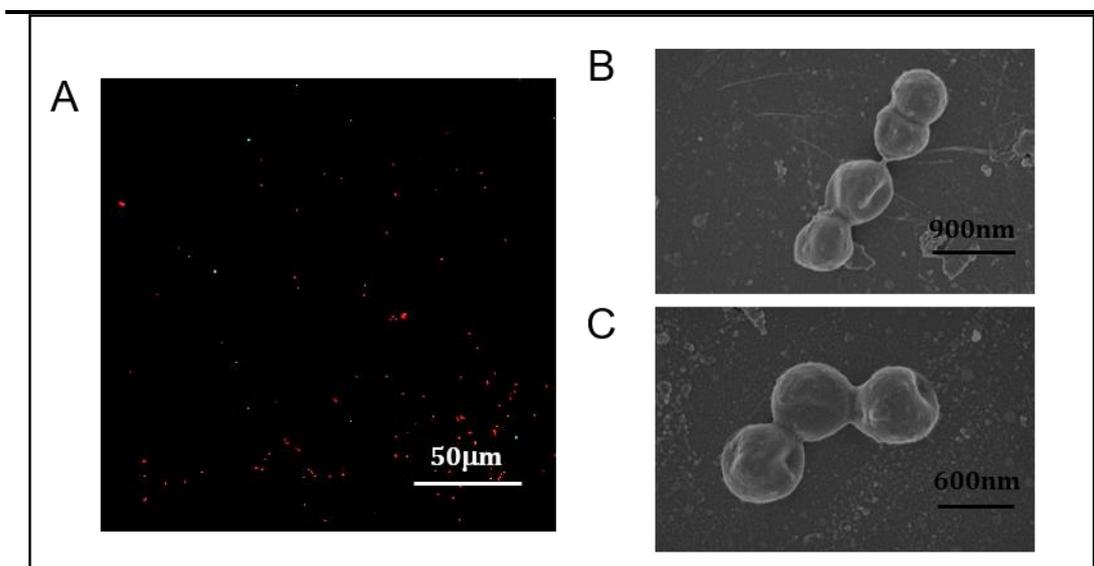
ALB. Para ello, se utilizó como referencia las superficies sin biofuncionalizar con un tiempo de incubación tal que refleja la etapa de adhesión bacteriana inicial (40 min). La Figura 5.8 muestra bacterias/ $\mu\text{m}^2$ , discriminando bacterias muertas (rojas) de vivas (verdes) para la adhesión de *S. aureus* sobre superficies biofuncionalizadas con ALB en un tiempo de incubación de 18 h. Se incluyeron ambos tratamientos térmicos (65 °C por 1 h y por 18 h) y ambas  $C_p$  para cada uno de ellos (0,0050 y 0,1000 mg/ml). Todas las condiciones de biofuncionalización con ALB minimizan la adhesión de bacterias respecto a



**Figura 5.8** Bacterias vivas/ $\mu\text{m}^2$  (verdes) y muertas/ $\mu\text{m}^2$  (rojas) para *S. aureus* adherida sobre superficies en ausencia y presencia de biofuncionalización con ALB con 40 min adhesión (borde de trazo liso) y con 18 h de adhesión (borde de trazo rayado). Las condiciones de biofuncionalización incluyen inmersión por 1 h en: ALB 0,0050 y 0,1000 mg/ml tratada térmicamente a 65 °C por 1 h y por 18 h. Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% y (\*) representa a condiciones con valores  $p > 0,05$ .

superficies sin biofuncionalizar. Se observa el efecto de la  $C_p$ , la cual aumenta la inhibición en la adhesión bacteriana. No se observó efecto del tipo de estructura secundaria inducida por el tratamiento térmico de la solución de ALB (ANOVA y prueba *a posteriori* DGC). La biofuncionalización superficial con ALB parcialmente desnaturalizada produce una inhibición en la adhesión bacteriana inicial, que es mantenida en el tiempo de forma tal, que inhibe la formación del biofilm.

Se evaluó la capacidad de inhibir la formación de biofilm de *S. aureus* por superficies biofuncionalizadas con FBG parcialmente desnaturalizado. Para ello, las soluciones de FBG fueron sometidas a tratamiento térmico a 60 °C durante 1 h. La Figura 5.9 muestra imágenes de *S. aureus* adherida sobre superficies biofuncionalizadas con FBG obtenidas por Microscopía Confocal de Fluorescencia (A) y por Microscopía Electrónica de Barrido (B y C). El panel A

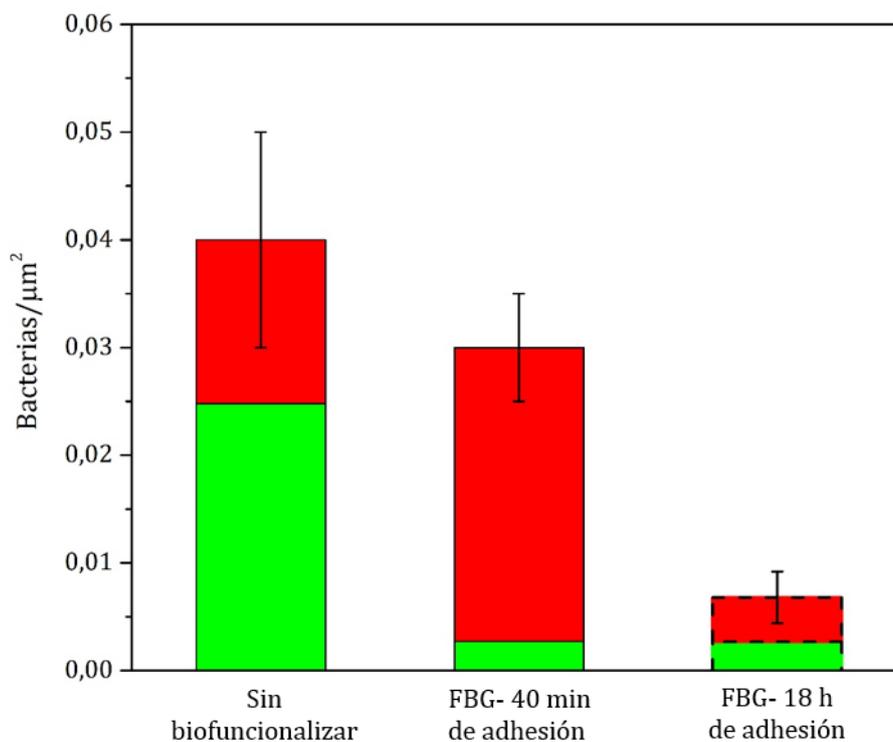


**Figura 5.9** Imágenes de Microscopía Confocal de Fluorescencia (A) y de Microscopía Electrónica de Barrido (B-C) de *S. aureus* sobre superficies biofuncionalizadas con FBG en condiciones capaces de formar biofilm. Biofuncionalización con 0,0500 mg/ml de FBG tratado térmicamente a 60 °C por 1 h.

muestra sólo algunas células adheridas, indicando que la formación del biofilm fue completamente inhibida en 18 h de incubación. Conforme a este resultado, las imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (paneles B y C) muestran bacterias con perturbaciones en la pared celular, que indican la pérdida del contenido citoplasmático en consonancia con células muertas.

Al igual que para la biofuncionalización con ALB, se evaluó de forma cuantitativa la inhibición de la formación de biofilm mediante el análisis de la adhesión bacteriana sobre las superficies biofuncionalizadas con FBG. A modo de comparación, se utilizaron superficies en ausencia y presencia de biofuncionalización con FBG, empleando un tiempo de incubación de 40 min. La Figura 5.10 muestra el número de bacterias/ $\mu\text{m}^2$ , discriminando bacterias muertas (rojas) de vivas (verdes) para la adhesión de *S. aureus* sobre superficies biofuncionalizadas con FBG. Para la biofuncionalización con FBG a los dos tiempos de incubación explorados, se observa una disminución de la cantidad de bacterias respecto a superficies sin biofuncionalizar. Además, la biofuncionalización luego de 18 h de incubación contribuye a acrecentar esta reducción en la adhesión bacteriana. Esta disminución acentuada con el tiempo de incubación es similar a la observada para superficies con ALB adsorbida en condiciones cinéticas controladas (Figura 2.16, Capítulo 2), donde las interacciones bacteria-proteína son inespecíficas. En este caso, estas interacciones dan lugar al desprendimiento de las células bacterianas que se ve reflejado en el menor número de bacterias adheridas en función del tiempo de incubación. De forma opuesta, las interacciones entre FBG y *S. aureus* son de tipo específicas (Figura 3.9, Capítulo 3). Estas interacciones se desarrollan mediante sitios de unión de la bacteria que involucran el C-terminal de la cadena  $\gamma$  y el C-terminal de la cadena  $\alpha$  de la molécula de FBG, los cuales se alteran por encima de los 55 °C. La perturbación de la estructura del FBG por

tratamiento térmico a 60 °C causa la alteración estructural de los sitios de unión a la bacteria. De esta forma, en estas condiciones, las interacciones FBG parcialmente desnaturado-*S. aureus* son inespecíficas, dando lugar a una cantidad de bacterias adheridas cada vez menor a medida que transcurre el tiempo. Otro hecho que refuerza esta observación surge de la comparación de la adhesión bacteriana sobre superficies con FBG adsorbido en condiciones cinéticas controladas y superficies biofuncionalizadas con FBG parcialmente desnaturado. La relación entre la cantidad de bacterias totales/ $\mu\text{m}^2$  sobre superficies con FBG adsorbido en condiciones cinéticas controladas fue 12



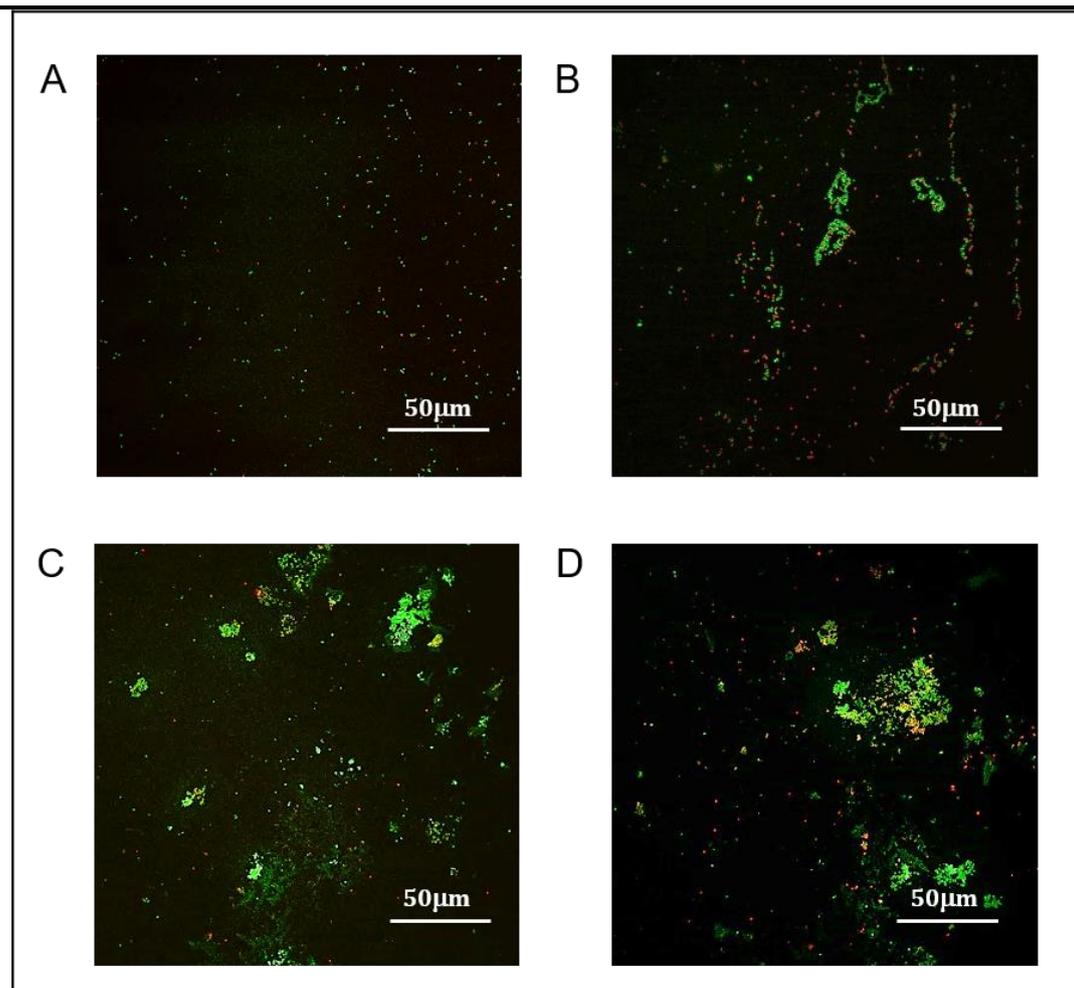
**Figura 5.10** Bacterias vivas/ $\mu\text{m}^2$  (verdes) y muertas/ $\mu\text{m}^2$  (rojas) para *S. aureus* adherida sobre superficies en ausencia y presencia de biofuncionalización con FBG con 40 min adhesión (borde de trazo liso) y con 18 h de adhesión (borde de trazo rayado). Las condiciones de biofuncionalización incluyen inmersión por 1 h en: FBG 0,0500 mg/ml tratado térmicamente a 60 °C por 1 h. Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95%.

veces mayor ( $0,084 \pm 0,024$ , Figura 3.9, Capítulo 3) que sobre superficies con FBG parcialmente desnaturizado (Figura 5.10). Es decir, el tipo de interacción entre *S. aureus* y FBG es dependiente de la estructura de FBG involucrado en dicha interacción.

Por otra parte, se extendió el estudio de la inhibición de la formación del biofilm mediante la biofuncionalización con proteínas parcialmente desnaturizadas en un medio de relevancia fisiológica. Para ello, se utilizó PBS con 10% de SFB como medio de la suspensión bacteriana. Esta elección se basa en que el suplemento con SFB (en dicha proporción) es ampliamente utilizado en el cultivo de células eucariotas en investigación y en ensayos clínicos debido a que promueve el crecimiento celular mediante la provisión de nutrientes y factores de crecimiento [18–23].

La Figura 5.11 muestra imágenes de *S. aureus* adherida sobre superficies sin biofuncionalización, en PBS y en PBS con 10% de SFB obtenidas por Microscopía Confocal de Fluorescencia. A modo de comparación, primero se incluye la adhesión en PBS representada en los paneles A y B, donde se observan gran cantidad de bacterias vivas adheridas y algunas microcolonias. En cambio, en los paneles C y D, que corresponden a la adhesión en PBS con 10% de SFB, se ve potenciada la formación de microcolonias como etapa previa al establecimiento de un biofilm maduro. Es decir, la presencia de suero en el medio favorece la formación del biofilm.

Se evaluó la capacidad de inhibir la formación del biofilm de *S. aureus* en PBS con 10% de SFB por superficies biofuncionalizadas con ALB parcialmente desnaturizada. Teniendo en cuenta los resultados previos (Figura 5.8), que indicaron que el tipo de estructura secundaria inducida por la diferente duración del tratamiento térmico (1 o 18 h) de la solución de ALB no tiene efecto en la inhibición de la adhesión bacteriana, fue elegido el

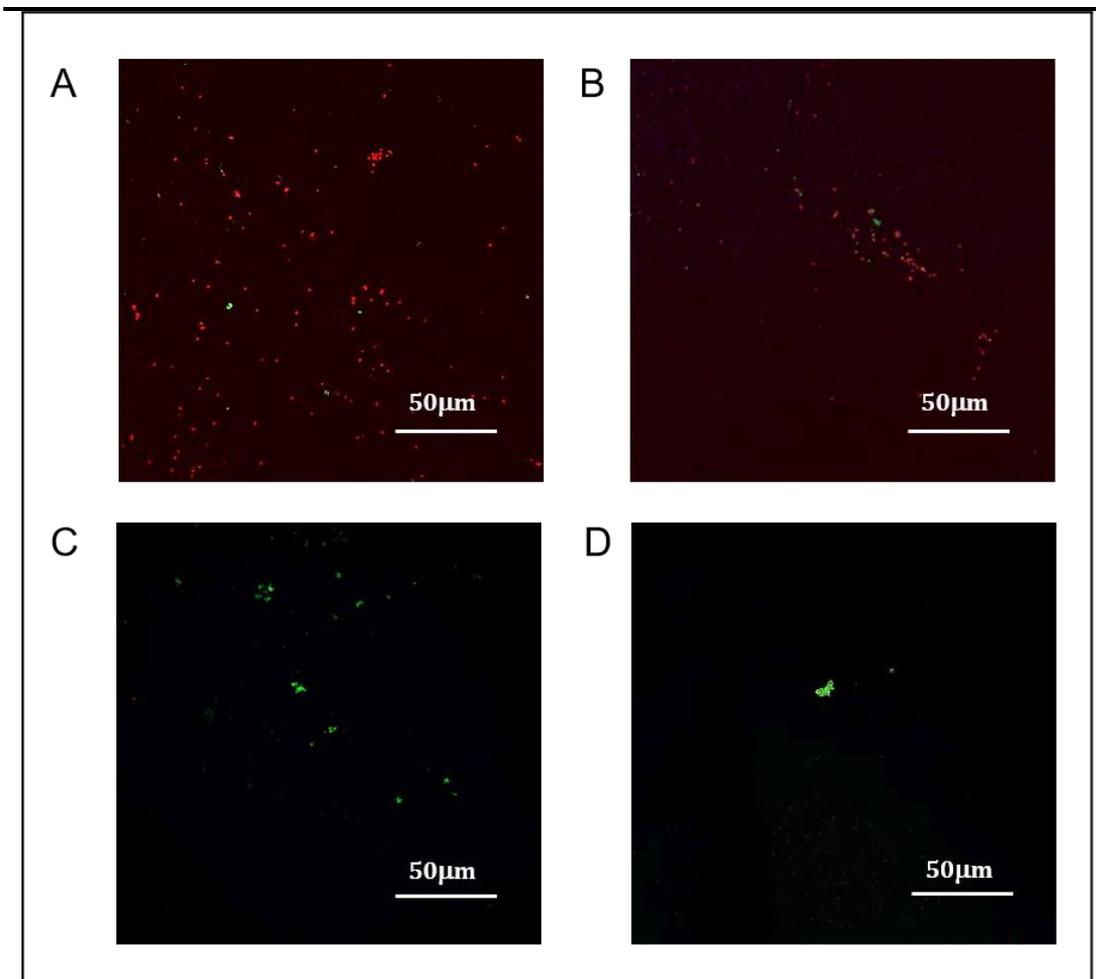


**Figura 5.11** Imágenes de Microscopía Confocal de Fluorescencia de *S. aureus* sobre superficies sin biofuncionalización en condiciones capaces de formar biofilm: (A-B) en PBS (C-D) y en PBS con 10% SFB.

tratamiento térmico de menor duración (1 h). Por otra parte, ya que la  $C_p$  sí es determinante en dicha inhibición, se utilizó la mayor  $C_p$  (0,1000 mg/ml). Así, soluciones de 0,1000 mg/ml de ALB fueron sometidas a tratamiento térmico a 65 °C durante 1 h. La Figura 5.12 muestra imágenes de *S. aureus* adherida sobre superficies biofuncionalizadas con ALB en PBS (A y B) y en PBS con 10% de SFB (C y D). Se observa inhibición de la formación del biofilm para la biofuncionalización con ALB en ambos medios, solo hay algunas bacterias adheridas. La perturbación de la estructura secundaria de ALB respecto a la proteína nativa es capaz de inhibir la formación del biofilm de *S. aureus*,

incluso en un medio que favorece el crecimiento celular y que es más cercano al entorno fisiológico en el cual se utilizan los biomateriales.

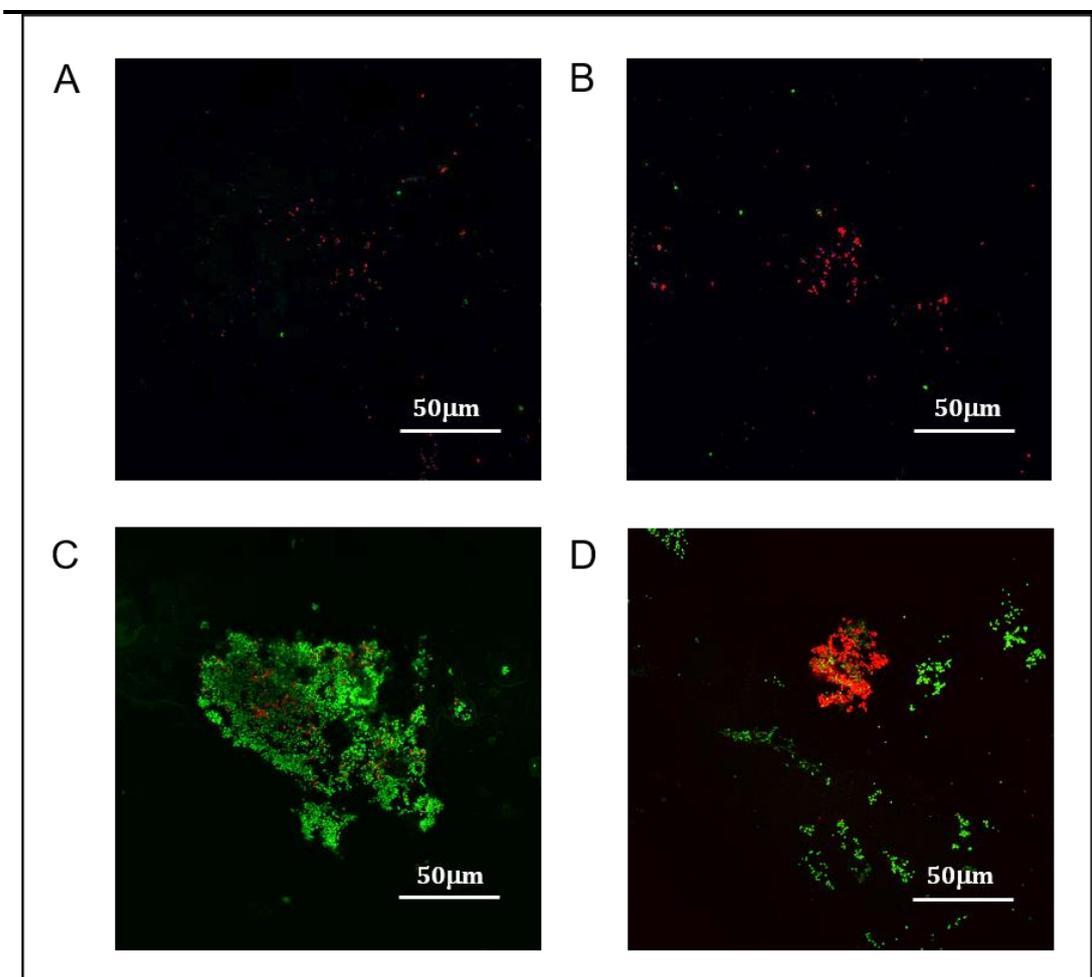
De manera similar, se evaluó la capacidad de inhibir la formación del biofilm de *S. aureus* en PBS con 10% de SFB por superficies biofuncionalizadas con FBG parcialmente desnaturado. Para ello, las soluciones de FBG fueron sometidas a tratamiento térmico a 60 °C durante 1 h. La Figura 5.13 muestra imágenes de *S. aureus* adherida sobre superficies biofuncionalizadas con FBG en PBS (A y B) y en PBS con 10% de SFB (B y C). Sobre superficies



**Figura 5.12** Imágenes de Microscopía Confocal de Fluorescencia de *S. aureus* sobre superficies biofuncionalizadas con ALB en condiciones capaces de formar biofilm: (A-B) en PBS y (C-D) en PBS con 10% SFB. Las condiciones de biofuncionalización incluyen inmersión por 1 h en: ALB 0,1000 mg/ml tratada térmicamente a 65 °C por 1 h.

---

biofuncionalizadas en presencia de PBS, se observan sólo algunas bacterias adheridas. Sin embargo, en presencia de PBS con 10% de SFB, se observan microcolonias y crecimiento en forma de césped característico del biofilm. Es decir, la capacidad de inhibición en la formación del biofilm por la biofuncionalización con FBG en PBS, no se mantiene cuando este medio es suplementado con suero. Del análisis de la bibliografía se puede inferir que el FBG utilizado en la biofuncionalización podría ser sustrato de factores y proteínas asociados a la cascada de la coagulación, que están presentes en



**Figura 5.13** Imágenes de Microscopía Confocal de Fluorescencia de *S. aureus* sobre superficies biofuncionalizadas con FBG en condiciones capaces de formar biofilm: (A-B) en PBS y (C-D) en PBS con 10% SFB. Las condiciones de biofuncionalización incluyen inmersión por 1 h en: FBG 0,1000 mg/ml tratado térmicamente a 60 °C por 1 h.

el SFB empleado en particular en este trabajo de Tesis Doctoral [7,9,24]. Es decir, este proceso podría alterar la biofuncionalización con FBG y, por lo tanto, el comportamiento de la adhesión bacteriana en presencia de SFB.

### 5.3 Conclusiones

El tratamiento térmico de las soluciones de ALB y de FBG provoca un cambio notorio en la estructura secundaria de ambas proteínas. La biofuncionalización con ALB y FBG parcialmente desnaturalizadas por tratamiento térmico, provoca una inhibición en la adhesión de *S. aureus* en su etapa inicial, que es mantenida en el tiempo de forma tal que inhibe la formación del biofilm. La inhibición en superficies biofuncionalizadas con ALB depende de la concentración de ALB, pero es independiente del tipo de estructura secundaria inducida con el tratamiento térmico. Las interacciones FBG parcialmente desnaturalizado-*S. aureus* son inespecíficas, al encontrarse alterado el sitio de unión a la bacteria. Comparando la biofuncionalización con ALB y FBG parcialmente desnaturalizado, la biofuncionalización con ALB resulta más eficaz, ya que es capaz de inhibir la formación del biofilm incluso en un medio similar al entorno fisiológico real de un biomaterial.

---

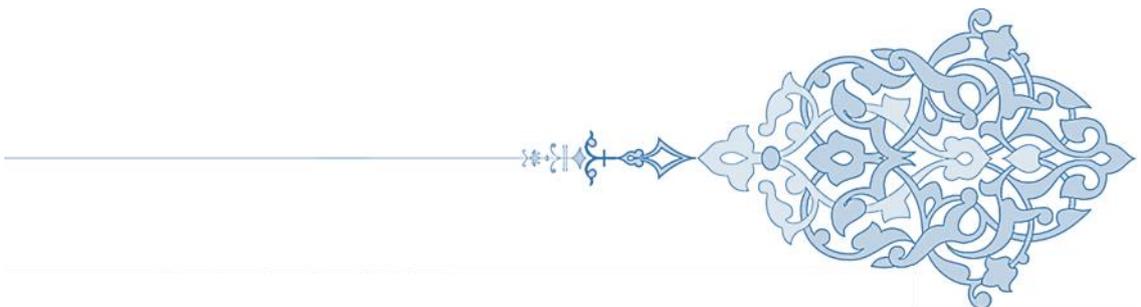
## Referencias

- [1] Y. Moriyama, Y. Kawasaka, K. Takeda, Protective effect of small amounts of sodium dodecyl sulfate on the helical structure of bovine serum albumin in thermal denaturation, *J. Colloid Interface Sci.* (2003) 41–46. doi:10.1016/S0021-9797(02)00017-6.
- [2] G. Navarra, C. Peres, M. Contardi, P. Picone, P.L. San Biagio, M. Di Carlo, D. Giacomazza, V. Militello, Heat- and pH-induced BSA conformational changes, hydrogel formation and application as 3D cell scaffold, *Arch. Biochem. Biophys.* 606 (2016) 134–142. doi:10.1016/j.abb.2016.07.020.
- [3] C.E. Giacomelli, W. Norde, The Adsorption–Desorption Cycle. Reversibility of the BSA–Silica System, *J. Colloid Interface Sci.* 233 (2001) 234–240. doi:10.1006/jcis.2000.7219.
- [4] W. Norde, C.E. Giacomelli, BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states, *J. Biotechnol.* 79 (2000) 259–268. doi:10.1016/S0168-1656(00)00242-X.
- [5] Y. Chen, H. Mao, X. Zhang, Y. Gong, N. Zhao, Thermal conformational changes of bovine fibrinogen by differential scanning calorimetry and circular dichroism, *Int. J. Biol. Macromol.* 26 (1999) 129–134. doi:10.1016/S0141-8130(99)00073-2.
- [6] A.S. Zhao, S. Zhou, Y. Wang, J. Chen, C.R. Ye, N. Huang, Molecular interaction of fibrinogen with thermally modified titanium dioxide nanoparticles, *RSC Adv.* 4 (2014) 40428–40434. doi:10.1039/C4RA07803A.
- [7] A. Henschen, J. McDonagh, Fibrinogen, fibrin and factor XIII, in: R.F.A. Zwaal, H.C. Hemker (Eds.), *Blood Coagul.*, 1986: pp. 171–241. doi:10.1016/S0167-7306(08)60053-8.
- [8] J.W. Weisel, L. Medved, Fibrinogen and Fibrin, in: D.A.D. Parry, J.M. Squire (Eds.), *Adv. Protein Chem.*, 2005: pp. 247–299. doi:10.1016/S0065-3233(04)70008-X.
- [9] C. Fuss, J.C. Palmaz, E.A. Sprague, Fibrinogen: Structure, Function, and Surface Interactions, *J. Vasc. Interv. Radiol.* 12 (2001) 677–682. doi:10.1016/S1051-0443(07)61437-7.
- [10] F.M. Burke, A. Di Poto, P. Speziale, T.J. Foster, The A domain of fibronectin-binding protein B of *Staphylococcus aureus* contains a novel fibronectin binding site, *FEBS J.* 278 (2011) 2359–2371. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08159.x.
- [11] Y.P. Ko, M.J. Flick, Fibrinogen Is at the Interface of Host Defense and Pathogen Virulence in *Staphylococcus aureus* Infection, *Semin. Thromb. Hemost.* 42 (2016) 408–421. doi:10.1055/s-0036-1579635.
- [12] J.W. Donovan, E. Mihalyi, Conformation of Fibrinogen: Calorimetric Evidence for a Three-Nodular Structure, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71 (1974) 4125–4128.
- [13] L. V. Medved', S. V. Litvinovich, P.L. Privalov, Domain organization of the terminal parts in the fibrinogen molecule, *FEBS Lett.* 202 (1986) 298–302. doi:10.1016/0014-5793(86)80705-0.
- [14] P.L. Privalov, L. V. Medved', Domains in the fibrinogen molecule, *J. Mol. Biol.* 159 (1982) 665–683. doi:10.1016/0022-2836(82)90107-3.
- [15] P. Manavalan, W.C. Johnson, Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure

- class, *Nature*. 305 (1983) 831–832. doi:10.1038/305831a0.
- [16] S.M. Kelly, T.J. Jess, N.C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 1751 (2005) 119–139. doi:10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
- [17] N. Ohta, T. Yotsuyanagi, Alteration of Fibrinogen Secondary Structure by cis-Diamminedichloroplatinum(II) and Calcium Protection., *Biol. Pharm. Bull.* 16 (1993) 631–634. doi:10.1248/bpb.16.631.
- [18] P. Gil-Loyzaga, Cultivo de células animales y humanas: Aplicaciones en medicina regenerativa. Universidad Complutense de Madrid., Vision Libros, Madrid, 2011.
- [19] H. Hemeda, B. Giebel, W. Wagner, Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells, *Cytotherapy*. 16 (2014) 170–180. doi:10.1016/j.jcyt.2013.11.004.
- [20] S. Yousefi, J. Soleimanirad, K. Hamdi, L. Farzadi, A. Ghasemzadeh, M. Kazemi, M. Mahdipour, R. Rahbarghazi, M. Nouri, Distinct effect of fetal bovine serum versus follicular fluid on multipotentiality of human granulosa cells in in vitro condition, *Biologicals*. 52 (2018) 44–48. doi:10.1016/j.biologicals.2018.01.002.
- [21] S.W. Malm, E.A. Amouzougan, W.T. Klimecki, Fetal bovine serum induces sustained, but reversible, epithelial-mesenchymal transition in the BEAS-2B cell line, *Toxicol. Vitro*. 50 (2018) 383–390. doi:10.1016/j.tiv.2018.04.008.
- [22] F.J. Tian, C.M. Qin, X.C. Li, F. Wu, X.R. Liu, W.M. Xu, Y. Lin, Decreased Stathmin-1 Expression Inhibits Trophoblast Proliferation and Invasion and Is Associated with Recurrent Miscarriage, *Am. J. Pathol.* 185 (2015) 2709–2721. doi:10.1016/j.ajpath.2015.06.010.
- [23] K. Reyes-Gordillo, R. Shah, A. Popratiloff, S. Fu, A. Hindle, F. Brody, M. Rojkind, Thymosin- $\beta$ 4 (T $\beta$ 4) blunts PDGF-dependent phosphorylation and binding of AKT to actin in hepatic stellate cells, *Am. J. Pathol.* 178 (2011) 2100–2108. doi:10.1016/j.ajpath.2011.01.025.
- [24] C. Vasti, L. V. Bonnet, M.R. Galiano, R. Rojas, C.E. Giacomelli, Relevance of protein–protein interactions on the biological identity of nanoparticles, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 166 (2018) 330–338. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.03.032.

## **PARTE 3**

### **Biofuncionalización con proteínas y activación de macrófagos**





## **Parte 3: Biofuncionalización con proteínas y activación de macrófagos**

### **Introducción**

Como resultado de la segunda parte de este trabajo de Tesis Doctoral surgieron las condiciones óptimas de biofuncionalización con ALB y FBG, tal que minimizan la adhesión bacteriana. En particular, los resultados de la Parte 2 indican que se puede inhibir la adhesión de *S. aureus* mediante el cambio en la estructura secundaria de las moléculas adsorbidas de ALB o FBG. Un problema de esta estrategia sencilla podría estar asociado a una respuesta inumune desfavorable. Existe evidencia de que los cambios en la estructura de las proteínas pueden activar la respuesta inmune, debido a la función que ejercen las células inmunitarias para mantener la homeostásis [1-4]. Por lo tanto, se planteó la necesidad de evaluar la posible activación de macrófagos frente a las superficies biofuncionalizadas en la tercera parte de este trabajo de Tesis Doctoral.

La mayoría de los biomateriales de interés clínico suelen provocar la reacción por cuerpo extraño (FBR), una forma especial de inflamación no específica [5]. Las células más prominentes en la FBR son los macrófagos, que intentan fagocitar el material [5]. Los macrófagos, son la primera línea de defensa contra los patógenos, de tal forma que del proceso de interacción con un biomaterial pueden activarse para cumplir con sus funciones [5-7]. Los macrófagos activados pueden clasificarse a lo largo de un espectro fenotípico como macrófagos activados clásicamente (M1), que asisten a la actividad microbicida y son proinflamatorios, o como macrófagos activados alternativamente (M2), que no son competentes para eliminar patógenos, sino que intervienen en procesos de regulación/homeostásis [5-7]. Como resultado de la activación clásica de los macrófagos, se pueden nombrar tres tipos de

mecanismos efectores: expresión de marcadores en su superficie celular, secreción de óxido nítrico (NO) y producción de citocinas. Dentro de las funciones de los marcadores de activación, se puede nombrar su participación en la interacción con los linfocitos T, de tal manera que éstos desarrollen acciones en contra de los antígenos [8-11]. Por otra parte, el óxido nítrico interviene en los procesos inflamatorios mediante la vasodilatación y destrucción de microorganismos ejerciendo su acción mediante la formación de especies reactivas del oxígeno [12-14]. Por último, las citocinas proinflamatorias cumplen funciones muy diversas, amplificando la respuesta inflamatoria por medio de la secreción de diversos mediadores o de la expresión de receptores celulares [8,15-17]. En base a estas premisas, en este trabajo de Tesis Doctoral, se propuso evaluar la activación clásica de los macrófagos frente a la biofuncionalización planteada, mediante técnicas complementarias capaces de abordar los distintos mecanismos de activación. Se analizó la expresión de marcadores celulares mediante Citometría de Flujo, la producción de NO mediante la reacción de Griess y la producción de una citocina proinflamatoria mediante la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) sándwich. En particular, se estudió la expresión de los marcadores de activación: complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II), CD80 y CD86, la producción de NO mediante la cuantificación de iones nitrito y la producción de la citocina: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Para evaluar la respuesta de macrófagos en el mismo medio utilizado que en la adhesión bacteriana frente a la biofuncionalización superficial, se utilizó medio de cultivo suplementado con 10% de SFB. Por otra parte, teniendo en cuenta que los componentes del SFB podrían enmascarar la biofuncionalización frente a los macrófagos, también se realizó el estudio en medio de cultivo sin suplementar.

En resumen, la tercera parte de este trabajo de Tesis Doctoral incluye el Capítulo 6 y 7. En el primero, se describe la parte experimental, y a continuación se discuten los resultados relacionados con la evaluación de la activación de macrófagos frente a la biofuncionalización con ALB o FBG.

## Referencias

- [1] N. Lacetera, Metabolic Stress, Heat Shock Proteins, and Innate Immune Response, in: *Innate Immune Response to Non-Infectious Stress*. Hum. Anim. Model., Elsevier Inc., Viterbo, Italia, 2016; pp. 107–131. doi:10.1016/B978-0-12-801968-9.00005-2.
- [2] S. Franz, S. Rammelt, D. Scharnweber, J.C. Simon, Immune responses to implants - A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials, *Biomaterials*. 32 (2011) 6692–6709. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.078.
- [3] F. Barbero, L. Russo, M. Vitali, J. Piella, I. Salvo, M.L. Borrajo, M. Busquets-Fité, R. Grandori, N.G. Bastús, E. Casals, V. Puentes, Formation of the Protein Corona: The Interface between Nanoparticles and the Immune System, *Semin. Immunol.* 34 (2017) 52–60. doi:10.1016/j.smim.2017.10.001.
- [4] I. Yannas, Classes of Materials Used in Medicine, in: *Biomater. Sci. An Introd. to Mater. Med.*, Elsevier Inc., California, EEUU, 2004; pp. 127–136. doi:10.1016/b978-0-08-050014-0.50007-9.
- [5] F.J. Schoen, Host Reaction to Biomaterials and their evaluation, in: *Biomater. Sci. An Introd. to Mater. Third Ed.*, Third Edit, Elsevier, 2013; pp. 499–503. doi:10.1016/B978-0-08-087780-8.00043-7.
- [6] S. Goerdts, C.E. Orfanos, B. Franklin, Other Functions, Other Genes: Alternative Activation of Antigen-Presenting Cells, *Immunity*. 10 (1999) 137–142. doi:10.1016/S1074-7613(00)80014-x.
- [7] M.A. Duque Correa, M.R. López, Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente, *Inmunología*. 26 (2007) 73–86. doi:10.1016/S0213-9626(07)70077-x.
- [8] A.K. Abbas, A.W. Lichtman, S. Pillai, *Inmunología Celular y Molecular*, 6th ed., Elsevier, Barcelona, España, 2008.
- [9] G. Bakdash, P. Simone, T. Van Dijk, C.G. Figdor, I.J.M. De Vries, The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II, *Front. Immunol.* 4 (2013) 1–18. doi:10.3389/fimmu.2013.00053.
- [10] M.K. Crow, Modification of accessory molecule signaling, *Springer Semin. Immunopathol.* 27 (2006) 409–424. doi:10.1007/s00281-006-0018-3.
- [11] A.S. Zhao, S. Zhou, Y. Wang, J. Chen, C.R. Ye, N. Huang, Molecular interaction of fibrinogen with thermally modified titanium dioxide nanoparticles, *RSC Adv.* 4 (2014) 40428–40434. doi:10.1039/C4RA07803A.
- [12] C.D. Mills, Anatomy of a discovery : M1 and M2 macrophages, *Front. Immunol.* 6 (2015) 1–12. doi:10.3389/fimmu.2015.00212.
- [13] P. Picón-Pagès, J. Garcia-Buendia, F.J. Muñoz, Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* (2018). doi:10.1016/j.bbadis.2018.11.007.
- [14] E.E.H. van Faassen, A.F. Vanin, Nitric Oxide, *Encycl. Anal. Sci.* (2005) 183–191. doi:10.1016/B0-12-369397-7/00745-7.
- [15] R. Solís-martínez, G. Hernández-flores, F.J. Ochoa-carrillo, P. Ortiz-lazareno, *Macrófagos*

asociados a tumores contribuyen a la progresión del cáncer de próstata, *Gac. Mex. Oncol.* 14 (2015) 97–102. doi:10.1016/j.gamo.2015.03.001.

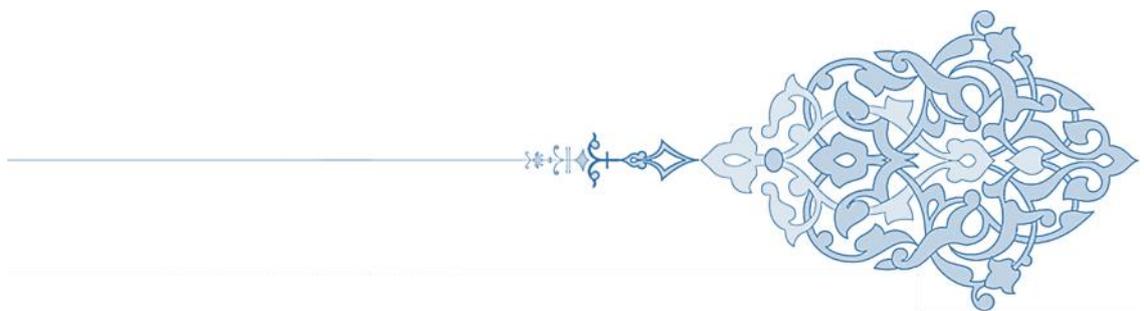
[16] G. Beck, Cytokines , Evolutionary Aspects and Functions, *Ref. Modul. Biomed. Res.* (2014) 604–608. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.04045-9.

[17] J.J. O´Shea, M. Gadina, R.M. Siegel, Cytoquines and Cytoquine Receptors, in: *Clin. Immunol.*, Fifth Edit, Elsevier Ltd, 2019: pp. 127–155. doi:10.1016/B978-0-7020-6896-6.00009-0.



# CAPÍTULO 6

## Parte experimental





---

## Capítulo 6: Parte experimental

### 6.1 Introducción

En este capítulo, se presenta la parte experimental utilizada para desarrollar las temáticas relativas a la Parte 3 de este trabajo de Tesis Doctoral. En particular, corresponden a los materiales y métodos utilizados en el estudio de la respuesta inmune mediante la activación de macrófagos frente a la biofuncionalización superficial con ALB y FBG.

### 6.2 Materiales

#### 6.2.1 Reactivos

Las proteínas que fueron empleadas son las mismas que las utilizadas en la Parte 1 y 2 de este trabajo de Tesis Doctoral (ver apartado 1.2.1, Capítulo 1), e incluyen los productos comerciales: ALB de suero bovino y FBG de plasma humano de Sigma-Aldrich.

Los reactivos NaCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y etanol fueron obtenidos de J.T. Baker. Por otra parte, fueron adquiridos de Thermofisher los reactivos: medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), glutamina, anticuerpos para Citometría: anti-MHC-II conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), kit para ELISA: factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) de ratón. Los anticuerpos para Citometría: anti-CD80 conjugado con ficoeritrina (PE), anti-CD86 conjugado con ficoeritrina-cianina 7 (PE-Cy7) y la tinción de viabilidad celular (FVS780) fueron provistos por Becton Dickinson (BD). Además, NaNO<sub>2</sub> fue obtenido de Riedel de Haën, azul de tripán, azul de Coomassie G-250, y el reactivo de Griess fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) fue obtenido de Carlo Erba, polisorbato

20 (Tween 20) de Biopack y SFB fue adquirido de Laboratorios Natocor. El lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* fue provisto gentilmente por la Dra. Claudia Sotomayor (CIBICI-Dpto. de Bioquímica Clínica, FCQ-UNC).

Todos los reactivos son de grado analítico y fueron utilizados sin purificaciones previas. Las soluciones acuosas fueron preparadas en agua deionizada de resistencia 18 MΩ/cm (Sistema Milli Q, Millipore). A menos que se aclare previamente, todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C).

### 6.2.2 Superficies

Las superficies que fueron utilizadas consisten en sustratos sólidos de silicio que fueron obtenidos en Silicon Valley Microelectronics, con una película de sílica de aproximadamente 100 nm de espesor, que se generó por oxidación a 1000 °C durante 1 h, al igual que las utilizadas en la Parte 1 de la presente Tesis Doctoral (ver apartado 1.2.2, Capítulo 1).

Dichas superficies fueron reutilizadas luego de cada experimento. Para ello, se realizó un procedimiento de lavado con solución piraña ( $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$  3:1) a 100 °C durante 1 h y posteriormente fueron enjuagadas con abundante cantidad de agua deionizada.

### 6.2.3 Líneas celulares y medios de cultivo

Se utilizó la línea celular Raw 264.7, la cual corresponde a macrófagos murinos. Además, se emplearon macrófagos derivados del peritoneo de ratones. Para ello, se sacrificaron ratones, y se extrajo el contenido celular del peritoneo.

El medio de cultivo utilizado fue “Dulbecco's Modified Eagle's Medium” (DMEM) el cual consta de vitaminas, aminoácidos, sales inorgánicas e hidratos de carbono. Es un medio basal que no contiene proteínas o agentes que promuevan el crecimiento celular [1,2]. Su composición en mg/l se presenta en la Tabla 6.1. A su vez, éste fue suplementado con 10% de SFB. El suero fetal bovino se utiliza para propiciar el crecimiento de células en cultivo y sirve como fuente de aminoácidos, proteínas, vitaminas, carbohidratos, lípidos, hormonas, factores de crecimiento, minerales y oligoelementos [1,3–6].

Tanto los medios de cultivo como el material de laboratorio empleado fueron esterilizados por calor húmedo en autoclave a 121 °C durante 20 min a 1 atm de sobrepresión.

**Tabla 6.1** Medio “Dulbecco's Modified Eagle's Medium” (DMEM)

Compuesto	Concentración (mg/l)
Glicina	30,0
L-arginina	84,0
L-cistina	63,0
L-histidina	42,0
L-iso-leucina	105,0
L-leucina	105,0
L-lisina	146,0
L-metionina	30,0
L-fenilalanina	66,0
L-serina	42,0
L-treonina	95,0
L-triptófano	16,0
L-tirosina	104,0
L-valina	94,0
Colina	4,0

---

<b>Pantotenato de calcio</b>	4,0
<b>Ácido fólico</b>	4,0
<b>Niacinamida</b>	4,0
<b>Piridoxina</b>	4,0
<b>Riboflavina</b>	0,4
<b>Tiamina</b>	4,0
<b>I-inositol</b>	7,2
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	200,0
<b>Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O</b>	0,1
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	97,7
<b>KCl</b>	400,0
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	3700,0
<b>NaCl</b>	6400,0
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O</b>	125,0
<b>D-glucosa</b>	4500,0

---

---

## 6.3 Métodos

### 6.3.1 Preparación de soluciones de proteínas

Se prepararon soluciones frescas, ya sea de ALB o de FBG en PBS a pH 7,3 previo a cada experimento, tal como fue detallado en el apartado 1.3.3 del Capítulo 1, incluyendo la determinación de la concentración de FBG por colorimetría mediante el método de Bradford [7]. Para ello, se analizó la relación entre la absorbancia a 595 nm (complejo colorante-proteína) y la absorbancia a 465 nm (colorante libre), la cual es estrictamente lineal con la concentración de proteína [8]. La concentración de ALB y de FBG de estructura nativa y parcialmente desnaturalizada fue de 0,1000 mg/ml.

### 6.3.2 Preparación de la suspensión celular

La etapa experimental correspondiente a la preparación u obtención de la suspensión celular fue realizada en el laboratorio de cultivo celular del CIBICI-Dpto. de Bioquímica Clínica FCQ-UNC, en colaboración con el Dr. Rubén Motrich y su grupo de trabajo.

Las células pertenecientes a la línea celular Raw fueron cultivadas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y humedad cercana a la saturación en medio DMEM suplementado con 10% SFB para favorecer su crecimiento, hasta contar con la cantidad de células requerida para cada experimento.

Para la obtención de macrófagos peritoneales de ratón, se utilizaron ratones hembras de la cepa C57BL/6, de entre 6 y 8 semanas de edad, pertenecientes al bioterio del CIBICI-Dpto. de Bioquímica Clínica, FCQ-UNC (Número de seguro: A5802-01). Los ratones utilizados para este trabajo fueron mantenidos en condiciones de higiene y salubridad provistas por dicho bioterio. La temperatura fue mantenida a 21 °C, con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad. Los ratones fueron alimentados con alimento balanceado LabDiet 5008 (Purina) *ad libitum*. El procedimiento experimental relacionado al empleo de ratones lo realizó el Dr. Rubén Motrich, de acuerdo con las recomendaciones del “Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación” publicado por el Consejo Canadiense de Protección de los Animales (CCPA). Luego de ser sacrificados por dislocación cervical, se realizó un corte abdominal y se realizaron lavados peritoneales con solución fisiológica para obtener la suspensión celular (que naturalmente es rica en una alta proporción de macrófagos). Posteriormente, cuando se realizó el cultivo con las superficies biofuncionalizadas, se utilizaron las células

adherentes que se corresponden a poblaciones celulares macrofágicas, descartando aquellas que permanecen en suspensión en el sobrenadante.

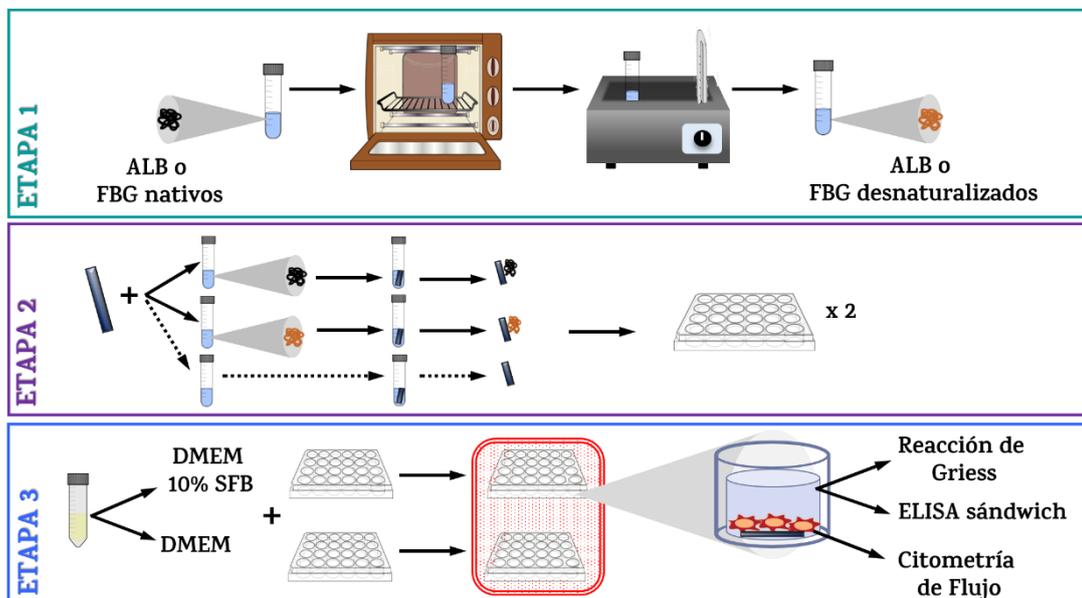
La cuantificación de los dos tipos de células empleadas se realizó mediante la determinación del número de células viables utilizando la cámara de Neubauer y la tinción azul de tripán. La cámara de Neubauer o hemocitómetro consiste en un portaobjetos que contiene un fondo marcado con una cuadrícula de dimensiones conocidas para facilitar el recuento. El azul de tripán es un colorante supravital que se emplea para evaluar la viabilidad celular por exclusión [9], ya que no puede penetrar y teñir a las células viables con membranas integrales. De esta forma, frente al microscopio las células muertas se observan de color azul, mientras que las células viables no presentan coloración. En un primer paso, la suspensión celular se sometió a centrifugación a 2000 rpm durante 10 min y se re-suspendió en PBS para aumentar su concentración. Se mezclaron 900 µl de suspensión celular con 100 µl de solución de azul de tripán al 0,4% e inmediatamente la mezcla fue transferida a la cámara de Neubauer y cubierta con un cubreobjetos. En un microscopio se realizó el recuento de las células que no captaron el colorante y según el factor de dilución se calculó la densidad de células viables.

### **6.3.3 Diseño experimental para la biofuncionalización superficial y la activación de macrófagos**

Para estudiar el efecto de la biofuncionalización superficial sobre la activación de macrófagos, se planteó el diseño experimental esquematizado en la Figura 6.1 en cada una de sus etapas. Cada condición experimental fue evaluada por triplicado. Cabe destacar que las soluciones y el material empleado en todas las etapas fue esterilizado previo a su uso y que las actividades correspondientes a cada etapa fueron realizadas en ambiente

estéril. Las etapas 1 y 2 fueron desarrolladas en el Capítulo 4 (etapas 1 y 2, Figura 4.2) y en el capítulo actual se presentan con ligeras modificaciones. La Etapa 3 fue realizada en el CIBICI-Dpto. de Bioquímica Clínica FCQ-UNC, en el laboratorio de cultivo celular.

En este diseño experimental, primero se realizó el tratamiento térmico de la solución de ALB o de FBG (Figura 6.1, Etapa 1). Para ello, a la solución de proteína se la sometió a un tratamiento térmico por 1 h a una temperatura de 65 °C para ALB y de 60 °C para FBG. Posteriormente, se realizó un enfriamiento controlado de las soluciones sumergiéndolas en un baño de agua a 30 °C por 1 h. La etapa siguiente incluye la estrategia de biofuncionalización superficial, que comprendió la inmersión de las superficies en la solución de ALB o de FBG con estructura parcialmente desnaturalizada durante 1 h a temperatura ambiente (Etapa 2). A su vez, se incluyó la inmersión de las superficies en solución de ALB o FBG de estructura nativa y en solución de PBS como blanco de la biofuncionalización. Luego de sucesivos lavados con PBS, las superficies se



**Figura 6.1** Diseño experimental para la biofuncionalización superficial y la activación de macrófagos.

## Parte experimental

---

transfirieron a dos placas de 26 pocillos con PBS. Una placa se utilizó para estudiar la activación de macrófagos en medio DMEM, y otra en medio DMEM con 10% de SFB. En cada placa, cada condición experimental se realizó por triplicado: blanco, ALB nativa, ALB parcialmente desnaturalizada, FBG nativo y FBG parcialmente desnaturalizado. La Etapa 3 incluye el cultivo de las células con las superficies biofuncionalizadas. La suspensión celular se centrifugó y re-suspendió en DMEM suplementado con 10% de SFB (células cultivadas en presencia de SFB) o en DMEM sin suplementar (células cultivadas en ausencia de SFB). Se colocaron 500 µl por pocillo de la suspensión celular. La densidad celular utilizada por pocillo fue: 75.000 células Raw y 1.000.000 macrófagos peritoneales. Luego, se incubaron ambas placas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y humedad cercana a la saturación, durante un tiempo de incubación de 48 h. Se incluyó como control de activación un estímulo de las células con LPS de concentración final 100 ng/ml durante 24 h (24 h después de iniciado el tiempo de incubación). Otro control consistió en células solas o cultivadas sin superficie (basales). Para analizar la activación de macrófagos se estudió, por un lado, la expresión de marcadores celulares por Citometría de Flujo y por otro, la producción de óxido nítrico por la reacción de Griess y la producción de citocinas por un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) sándwich. Por lo que, luego de la incubación de las superficies, se congelaron a -80 °C los sobrenadantes para determinar posteriormente NO y citocinas, y se realizó la preparación de las células cultivadas para ser analizadas por citometría de inmediato. El procesamiento de las muestras para estas tres técnicas se abordará a continuación en los apartados correspondientes.

---

### 6.3.4 Análisis de la expresión de marcadores celulares mediante Citometría de Flujo

La Citometría de Flujo (CMF) constituye una técnica de avanzada, automatizada y altamente sensible, muy útil para el estudio fenotípico de células, entendiéndose como fenotipo al conjunto de moléculas de superficie que posee un determinado tipo celular y que lo diferencia de otros tipos celulares [10,11]. Esta técnica permite realizar análisis multiparamétricos del componente celular en suspensión de una manera individual, célula a célula, a través de sus características estructurales (morfología y complejidad citoplasmática) e identificar la expresión de proteínas celulares [10]. Entre sus funciones se encuentran: la determinación de la estirpe tisular, la etapa madurativa o el estado de activación que presenta una célula, analizando la expresión de diferentes moléculas, en su superficie o en el interior [12]. Para el análisis fenotípico se utilizan anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos, que reconocen de manera específica las moléculas de la superficie de las células de interés [11,13]. Los anticuerpos unidos a los fluorocromos son detectados por fluorescencia y visualizados mediante un sistema informático apropiado y de forma rápida, el cual permite analizar un elevado número de partículas en suspensión en un corto periodo (5000 partículas/s). Este análisis permite múltiples aplicaciones: obtener información simultánea de varios parámetros celulares, identificar paralelamente antígenos de superficie y citoplasmáticos, cuantificar la intensidad antigénica por medio de los canales medios de fluorescencia y emplear múltiples marcaciones para detectar la coexpresión de antígenos sobre la misma célula [10]. Además del análisis fenotípico, la CMF tiene otras aplicaciones, entre ellas: el estudio de marcadores intracitoplasmáticos, el análisis de determinados parámetros funcionales (estudio de fagocitosis por

## Parte experimental

---

granulocitos y monocitos), el estudio del ciclo celular y el análisis de la viabilidad celular, entre otras [11].

Un citómetro de flujo es un instrumento capaz de detectar la fluorescencia procedente de las células a medida que pasan de una en una a través de una corriente de un fluido y se intersectan con una fuente de luz [11,12,14]. La luz dispersada caracteriza el tamaño celular y la complejidad o granularidad citoplasmática permitiendo distinguir poblaciones celulares [14]. Las suspensiones celulares se incuban con sondas que llevan marcadores fluorescentes, para determinar así el número de células que expresan la molécula a la que se encuentra unida la sonda fluorescente [11,12]. Lo más habitual es que las sondas fluorescentes sean anticuerpos específicos frente a una molécula de la superficie celular y estén conjugados con fluorocromos [12]. Además, las moléculas presentes en el citoplasma también pueden teñirse, mediante una permeabilización transitoria de las células, lo que ofrece las condiciones apropiadas para que los anticuerpos marcados atraviesen la membrana plasmática [12]. Así, el citómetro consta básicamente de un láser que emite luz a una determinada longitud de onda y que posee tres tipos distintos de detectores: un detector para el tamaño de la célula (reflexión), un detector para la morfología (complejidad) de la célula (refracción), y uno o más detectores de luz que recogen la luz emitida por los fluoróforos [11]. Las proporciones relativas de una molécula concreta en las diversas poblaciones celulares pueden compararse entre sí mediante la tinción de cada una con la misma sonda y la determinación del grado de fluorescencia emitido [12].

En cuanto a la preparación de la suspensión de macrófagos para ser analizada bajo esta técnica, se procedió como se describe a continuación. Luego de transcurrido el tiempo de incubación apropiado, las células se desprendieron mecánicamente de las superficies y/o del fondo del pocillo con

---

la ayuda de un émbolo de jeringa estéril. Se realizó una centrifugación por 5 min a 2000 rpm y se descartó el sobrenadante. A continuación, para los macrófagos peritoneales, se colocó la tinción de viabilidad celular. Este colorante fluorescente se une covalentemente a grupos amino intercelulares. Por lo cual, las células dañadas con membrana permeable (por ejemplo células necróticas), permiten la difusión intracelular del colorante dando como resultado células vivas no teñidas y células dañadas fluorescentes [15,16]. Este colorante fue titulado previamente para determinar la concentración óptima del mismo según su aplicación. Se incubó por 20 min a temperatura ambiente protegido de la luz. A continuación, luego de otro paso de centrifugación, se realizó la inmunomarcación de los marcadores de activación de macrófagos con anticuerpos monoclonales: anti-MHC-II conjugado con FITC, anti-CD80 conjugado con PE, y anti-CD86 conjugado con PE-Cy7. Luego, se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Se repitió un paso de centrifugado para eliminar el medio con anticuerpos y se re-suspendió en una solución de PBS con 1% de SFB y 5mM de EDTA. Se procesó de inmediato por el citómetro de flujo, modelo FACS CANTO II (Becton Dickinson, BD) del CIBICI-Dpto. de Bioquímica Clínica, FCQ-UNC. El procesamiento de los datos se realizó con el software FlowJo. Para cada marcador celular se analizó el porcentaje de eventos (células) positivos y la intensidad media de fluorescencia por célula. Para cada una de estas variables se calculó la incerteza como el intervalo de confianza del 95%. Se realizó un ANOVA de una vía con un nivel de significación de 0,05 con el test *a posteriori* DGC para efectuar comparaciones entre las diferentes condiciones de biofuncionalización evaluadas. Ambos test estadísticos fueron realizados con el software “InfoStat” [17].

### 6.3.5 Cuantificación de iones nitrito en sobrenadantes de cultivo mediante la reacción de Griess

La activación clásica de macrófagos puede ser provocada por: patrones moleculares asociados a patógenos, interleucina (IL) 12, interferón  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) y TNF- $\alpha$  [18,19]. Esta activa la función citotóxica y antimicrobiana de los macrófagos, basada principalmente en su capacidad para secretar óxido nítrico [19]. Se determinó la concentración de NO (como iones nitrito) en los sobrenadantes del cultivo de los macrófagos peritoneales de ratón luego de 48 h de incubación con las superficies biofuncionalizadas, utilizando un método colorimétrico mediante el reactivo de Griess. El reactivo de Griess consta de: sulfanilamida 1,5% en HCl 1M (reactivo A) y N-(1-naftil) etilendiamina 5,5 mM (reactivo B). En condiciones ácidas los nitritos reaccionan con el grupo amino de la sulfanilamida para formar un catión diazonio, el cual se acopla a la amina aromática de N-(1-naftil)etilendiamina para formar un colorante de color rojo-violeta ( $\lambda_{\text{máx}} = 540 \text{ nm}$ ) [20].

El primer paso para determinar iones nitrito por este método consiste en la preparación del reactivo de Griess al abrigo de la luz, mezclando volúmenes iguales del reactivo A y B [21,22]. Se preparó una curva de calibración a partir de diluciones seriadas de soluciones de  $\text{NaNO}_2$ . Se colocaron 100  $\mu\text{l}$  de los sobrenadantes en una placa de 96 pocillos de fondo plano [21]. Cada condición experimental se midió por triplicado. Se agregaron 100  $\mu\text{l}$  del reactivo de Griess a cada reservorio de la curva estándar y de las muestras. Se incubó por 15 min en oscuridad a temperatura ambiente y se procedió a determinar las absorbancias a 540 nm en un espectrofotómetro de microplacas modelo 680 (Bio-Rad) del CIBICI-Dpto. de Bioquímica Clínica, FCQ-UNC. Se calculó la media de la densidad óptica de cada condición

---

experimental, y a partir de la curva de calibración se procedió a cuantificar la concentración de iones nitrito con las incertezas calculadas como el intervalo de confianza del 95%. Se realizó un ANOVA de una vía con un nivel de significación de 0,05 con el test *a posteriori* DGC para efectuar comparaciones entre las diferentes condiciones de biofuncionalización evaluadas con el software “InfoStat” [17].

### **6.3.6 Determinación de citocinas en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA sándwich**

Dentro de los mediadores de la inflamación que secretan los macrófagos activados para cumplir funciones proinflamatorias se pueden nombrar al NO y citocinas, tales como la IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 y TNF- $\alpha$  [18,19,23,24]. Los niveles de citocinas se miden en el sobrenadante de células de cultivo mediante técnicas de enzimoimmunoensayos. En este trabajo de Tesis Doctoral, se empleó el ensayo de ELISA sándwich para determinar la relación entre la secreción de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  y las distintas condiciones de biofuncionalización evaluadas frente a macrófagos peritoneales de ratón.

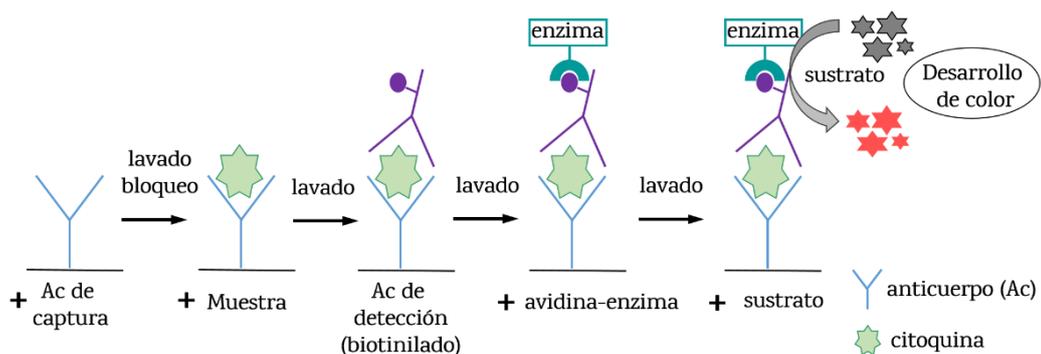
En el ensayo de ELISA sándwich el antígeno se encuentra entre dos anticuerpos monoclonales que unen diferentes epítomos del mismo antígeno [13]. En la Figura 6.2 se esquematizan las etapas experimentales en un ELISA sándwich. Como primer paso, se realiza la unión de un anticuerpo (anticuerpo de captura) a la superficie de los reservorios de una placa de 96 pocillos de fondo plano [14]. Este anticuerpo es específico para la citocina que se requiere detectar. Luego, se realiza un bloqueo de los sitios libres de unión mediante la adsorción de proteínas al fondo del pocillo. A continuación, se introduce la muestra al reservorio, y así se produce la unión del anticuerpo a la citocina de

## Parte experimental

---

interés [14]. Se realizan lavados para que el único compuesto remanente en el pocillo sea la citocina de interés. Luego, se introduce un anticuerpo secundario específico, que suele estar biotinilado, que reconoce la citocina de interés (anticuerpo de detección) [13,14]. Posteriormente, se agrega un complejo avidina-enzima que se une al anticuerpo de detección biotinilado [13]. Finalmente, se agrega a los pocillos el reactivo sustrato de la enzima-cromógeno:  $H_2O_2$ /tetrametilbenzidina (TMB) [21]. La cuantificación relativa puede ser medida por simples cambios de color en los pocillos del ensayo: cuanto más intenso sea el cambio de color, más alta es la concentración del antígeno en la muestra.

---



**Figura 6.2** Esquema de las etapas experimentales de un ELISA sándwich.

---

A continuación, se describe el diseño experimental para la determinación de  $TNF-\alpha$  en los sobrenadantes de cultivo de macrófagos peritoneales. Se agregaron 30  $\mu$ l de solución del anticuerpo de captura (anticuerpo de ratón anti- $TNF-\alpha$ ) en PBS a cada reservorio de una placa de ELISA de 96 reservorios de medio volumen. La placa fue colocada en cámara húmeda a 4 °C hasta el día siguiente [21]. Se realizaron 3 lavados con una solución de PBS y 0,05% de Tween 20. Se realizó un bloqueo de los sitios de unión colocando 60  $\mu$ l de PBS con 3% de ALB por pocillo y se incubó a 37 °C

---

durante 2 h. Luego, se realizaron 4 lavados con PBS-Tween 20 y se agregaron 30  $\mu\text{l}$  por pocillo de los sobrenadantes de los macrófagos enfrentados a las distintas condiciones de biofuncionalización. Cada condición se realizó por triplicado, y se incluyó un blanco de la técnica que consiste en solución de PBS con 3% de ALB. La placa fue colocada en cámara húmeda a 4 °C hasta el día siguiente. Se realizaron 5 lavados con solución de PBS-Tween 20. Se colocaron 30  $\mu\text{l}$  por pocillo del anticuerpo de detección (anticuerpo de ratón anti-TNF- $\alpha$  conjugado con biotina). Luego, se incubó a 37 °C durante 2 h. Cumplido ese periodo, se realizaron 6 lavados con PBS-Tween 20. Posteriormente, se adicionaron 30  $\mu\text{l}$  por pocillo del complejo avidina-peroxidasa de rábano (HRP). Se incubó a temperatura ambiente por 30 min al abrigo de la luz. Luego, se realizaron 7 lavados con PBS-Tween 20 y se agregaron 30  $\mu\text{l}$  por pocillo de la solución conteniendo el sustrato de la enzima/cromógeno:  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TMB}$ . Tras aguardar unos minutos a temperatura ambiente al abrigo de la luz, se observó una coloración azul y se detuvo la reacción adicionando 15  $\mu\text{l}$  por pocillo de ácido sulfúrico 2 M. Se procedió a determinar la densidad óptica a 450 nm en un espectrofotómetro de microplacas modelo 680 (Bio-Rad) del CIBICI-Dpto. de Bioquímica Clínica, FCQ-UNC. Se calculó la media de la densidad óptica de cada condición experimental con las incertezas calculadas como el intervalo de confianza del 95%. Se realizó un ANOVA de una vía con un nivel de significación de 0,05 con el test *a posteriori* DGC para efectuar comparaciones entre las diferentes condiciones de biofuncionalización evaluadas con el software “InfoStat” [17].

## Referencias

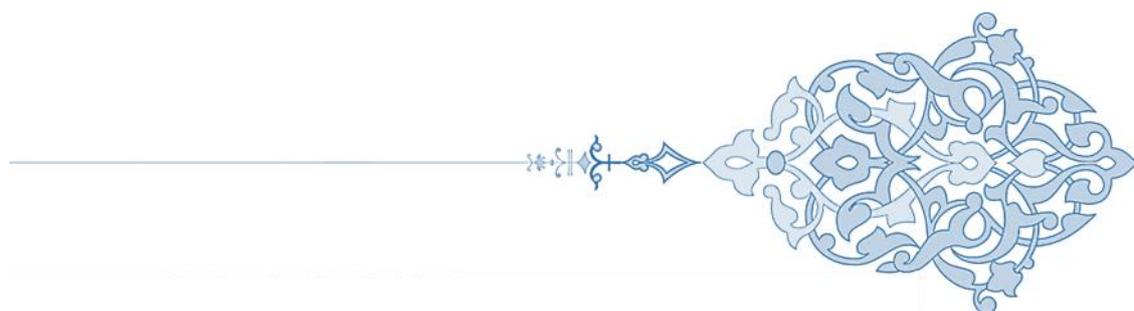
- [1] M. Arora, Cell Culture Media: A Review, *Mater. Methods.* 3 (2013) 175–204. doi:10.13070/mm.en.3.175.
- [2] R.I. Freshney, *Culture of Animal Cells. A manual of basic technique*, Wiley-Liss, New York, 2005. doi:10.1002/9780471747598.
- [3] P. Gil-Loyzaga, *Cultivo de células animales y humanas: Aplicaciones en medicina regenerativa*. Universidad Complutense de Madrid., Vision Libros, Madrid, 2011.
- [4] H. Hemeda, B. Giebel, W. Wagner, Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells, *Cytotherapy.* 16 (2014) 170–180. doi:10.1016/j.jcyt.2013.11.004.
- [5] S. Yousefi, J. Soleimanirad, K. Hamdi, L. Farzadi, A. Ghasemzadeh, M. Kazemi, M. Mahdipour, R. Rahbarghazi, M. Nouri, Distinct effect of fetal bovine serum versus follicular fluid on multipotentiality of human granulosa cells in in vitro condition, *Biologicals.* 52 (2018) 44–48. doi:10.1016/j.biologicals.2018.01.002.
- [6] S.W. Malm, E.A. Amouzougan, W.T. Klimecki, Fetal bovine serum induces sustained, but reversible, epithelial-mesenchymal transition in the BEAS-2B cell line, *Toxicol. Vitr.* 50 (2018) 383–390. doi:10.1016/j.tiv.2018.04.008.
- [7] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [8] T. Zor, Z. Selinger, Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies, *Anal. Biochem.* 236 (1996) 302–308. doi:10.1006/abio.1996.0171.
- [9] H.J. Phillips, *Dye Exclusion Tests for Cell Viability*, ACADEMIC PRESS, INC., New York, 1973. doi:10.1016/B978-0-12-427150-0.50101-7.
- [10] D. Vianed, M. Suárez, L. Lázaro, O. Del Valle Pérez, L. Gabriela, D. Domínguez, D. Consuelo, M. Abraham, *Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas*, 31 (2015) 242–253. doi:10.1111/j.1469-7998.2012.00949.x.
- [11] J. Arnaiz Villena, J.R. Regueiro, C. López Larrea, *Citofluorometría de Flujo*, in: *Inmunología*, Editorial Complutense, Madrid, 1995: pp. 281–285.
- [12] A.K. Abbas, A.W. Lichtman, S. Pillai, *Inmunología Celular y Molecular*, 6th ed., Elsevier, Barcelona, España, 2008.
- [13] J. Oliver, *Antibody Applications*, *Mater Methods.* 3 (2013) 182–195. doi:10.13070/mm.en.3.182.
- [14] B. Detrick, R. Hamilton, J. Folds, *Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology*, Washington, 2007.
- [15] BD Horizon™ Fixable Viability Stain (FVS) Reagents. Product information, BD Biosciences, 2015., (n.d.). <https://curve.carleton.ca/406e93ed-e29b-4d92-a847-f1d88298b3c8>.

- 
- [16] S.P. Perfetto, P.K. Chattopadhyay, L. Lamoreaux, R. Nguyen, D. Ambrozak, R.A. Koup, M. Roederer, Amine-reactive dyes for dead cell discrimination in fixed samples, *Curr. Protoc. Cytom.* (2010) 1–14. doi:10.1002/0471142956.cy0934s53.
- [17] J.A. Di Rienzo, F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, C.W. Robledo, *InfoStat*, (2011).
- [18] R. Solís-martínez, G. Hernández-flores, F.J. Ochoa-carrillo, P. Ortiz-lazareno, Macrófagos asociados a tumores contribuyen a la progresión del cáncer de próstata, *Gac. Mex. Oncol.* 14 (2015) 97–102. doi:10.1016/j.gamo.2015.03.001.
- [19] S. Goerdts, C.E. Orfanos, B. Franklin, Other Functions, Other Genes: Alternative Activation of Antigen-Presenting Cells, *Immunity*. 10 (1999) 137–142. doi:10.1016/s1074-7613(00)80014-x.
- [20] D. Tsikas, Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 851 (2007) 51–70. doi:10.1016/j.jchromb.2006.07.054.
- [21] R.D. Motrich, C.C. Stempin, Guía de Trabajos Prácticos. Curso de Especialización: Cultivo celular. Fundamentos teóricos y aplicaciones diagnósticas., (2017).
- [22] C.C. Motrán, F. López Díaz, A. Gruppi, D. Slavin, B. Chatton, J.L. Bocco, Human pregnancy-specific glycoprotein 1a (PSG1a) induces alternative activation in human and mouse monocytes and suppresses the accessory cell-dependent T cell proliferation, *J. Leukoc. Biol.* 72 (2002) 512–521. doi:10.1002/eji.200323993.
- [23] M.A. Duque Correa, M.R. López, Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente, *Inmunología*. 26 (2007) 73–86. doi:10.1016/s0213-9626(07)70077-x.
- [24] C.D. Mills, Anatomy of a discovery : M1 and M2 macrophages, *Front. Immunol.* 6 (2015) 1–12. doi:10.3389/fimmu.2015.00212.



## **CAPÍTULO 7**

### **Biofuncionalización con albúmina o fibrinógeno y activación de macrófagos**





---

## Capítulo 7: Biofuncionalización con albúmina o fibrinógeno y activación de macrófagos

### 7.1 Introducción

En el presente Capítulo, se discutirán los resultados relacionados al objetivo de evaluar el proceso de activación de macrófagos sobre superficies biofuncionalizadas con ALB o FBG que minimizan la adhesión de *S. aureus*. En primer lugar, se presentarán los resultados concernientes a la expresión de marcadores celulares de activación mediante Citometría de Flujo. En segundo lugar, se abordará el estudio de mediadores de la inflamación liberados durante la interacción de los macrófagos con las superficies biofuncionalizadas mediante técnicas complementarias: la reacción de Griess para evaluar la capacidad de secretar óxido nítrico, determinando la concentración de iones nitrito, y el ensayo de Elisa sándwich para evaluar la producción TNF- $\alpha$ .

### 7.2 Resultados y Discusión

#### 7.2.2 Diseño experimental para la biofuncionalización superficial y la activación de macrófagos

El diseño experimental para la evaluación de la activación de macrófagos sobre superficies biofuncionalizadas con ALB o FBG fue abordado en el capítulo anterior (ver Figura 6.1, Capítulo 6). En síntesis, en un primer paso las soluciones de ALB o FBG fueron sometidas a un tratamiento térmico para alterar su estructura. Posteriormente, se realizó la biofuncionalización superficial mediante la inmersión de las superficies en estas soluciones durante 1 h. También se incluyó la inmersión de las superficies en solución de

ALB o FBG de estructura nativa para comparar el efecto de la estructura de la proteína. Se incluyó como blanco de la biofuncionalización la inmersión de las superficies en PBS. Se estudió la activación en medio de cultivo DMEM, y en DMEM suplementado con SFB al 10%. Por un lado, se pretende evaluar la activación de macrófagos en un medio suplementado con SFB porque, además de propiciar el crecimiento de células en cultivo [1-5], constituye un medio de relevancia fisiológica, ya que es un medio similar al entorno biológico real que circunda a un biomaterial. De esta forma, se puede relacionar la respuesta de *S. aureus* con la respuesta de los macrófagos en este medio ante la biofuncionalización superficial planteada. Por otro lado, el SFB es una fuente de proteínas, factores de crecimiento, hormonas, carbohidratos, lípidos, entre otros [1,2]. Es decir, el SFB posee componentes que pueden actuar como interferentes y enmascarar la biofuncionalización superficial ante los macrófagos. Por lo tanto, el propósito de emplear medio sin suplemento de SFB es evaluar el efecto de la biofuncionalización superficial sobre la activación de macrófagos en un medio libre de interferentes. Se realizó el cultivo de los macrófagos (Raw y peritoneales de ratón) durante 48 h con las diferentes condiciones de biofuncionalización, por un lado en DMEM suplementado con 10% de SFB y, por otro, en DMEM sin suplementar. Se incluyeron como controles las células cultivadas sin superficie (basales) y células estimuladas con lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*. Cada condición experimental fue evaluada por triplicado. Luego de transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron procesadas por Citometría de Flujo (ver apartado 6.3.4, Capítulo 6) y los sobrenadantes de cultivo se estudiaron mediante la reacción de Griess (ver apartado 6.3.5, Capítulo 6) y el ensayo de ELISA sándwich (ver apartado 6.3.6, Capítulo 6). De esta forma, las condiciones

---

experimentales se realizaron por triplicado y quedan conformadas de la siguiente manera: células cultivadas sin superficies (basal), células sin superficies estimuladas con LPS (LPS), células con superficies sin biofuncionalización (blanco), células con superficies biofuncionalizadas con solución de: ALB (ALB nativa), ALB con tratamiento térmico (ALB desnaturalizada), FBG (FBG nativo) y FBG con tratamiento térmico (FBG desnaturalizado).

### **7.2.2 Análisis de la expresión de marcadores celulares mediante Citometría de Flujo**

La expresión de marcadores y las características fenotípicas de los macrófagos tisulares son muy heterogéneas y están determinados por metabolitos del ambiente local y citocinas [6]. Cuando se produce la activación clásica de los macrófagos por patrones moleculares asociados a patógenos o citocinas [7,8], se aumenta la expresión de marcadores en su superficie celular como el del MHC-II [6,7,9,10], CD80 y CD86 [9–12].

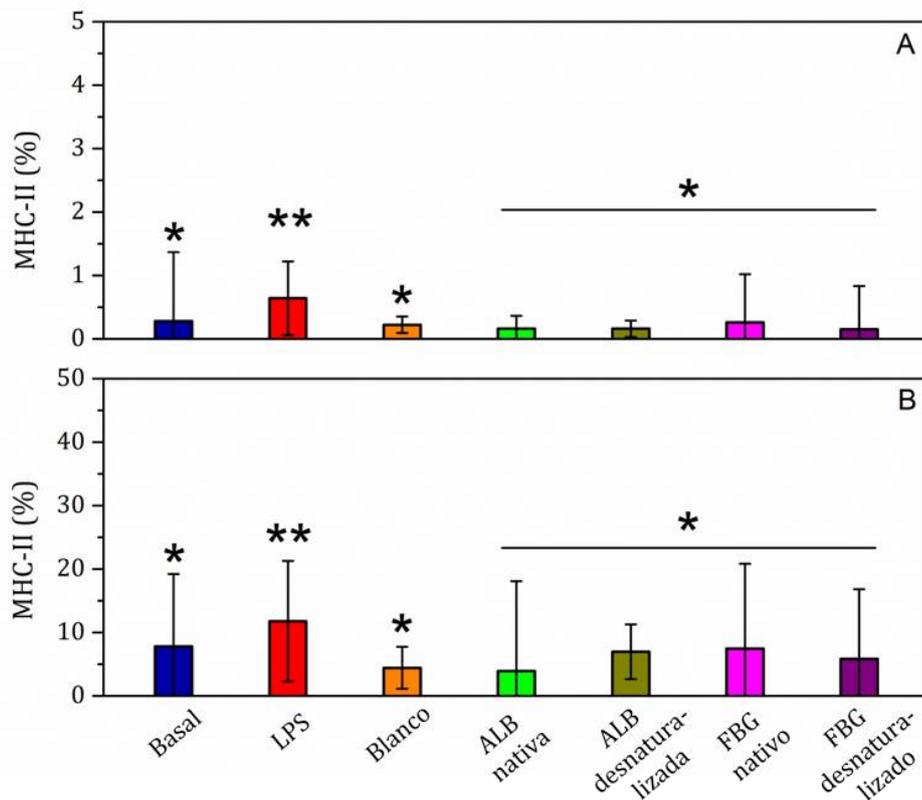
La función del marcador MHC-II es la de unirse a proteínas de antígenos extracelulares para ser reconocidos por linfocitos T y que éstos produzcan mecanismos efectores, es decir sean capaces de ejecutar una respuesta, en contra de los antígenos [9,13,14]. Los marcadores CD80 y CD86 son moléculas co-estimuladoras que se unen a moléculas en la superficie de los linfocitos T para también activar estos mecanismos en contra de los antígenos [9,12–14].

### 7.2.2.1 Macrófagos murinos Raw

Para evaluar la activación de macrófagos murinos Raw, se estudió la expresión de los marcadores celulares MHC-II y CD86. Para ello, las células se caracterizaron con un panel de anticuerpos monoclonales que consistieron en: anti-CD86 conjugado con PE-Cy7 y anti-MHC-II conjugado con FITC, y se procesaron de inmediato por el citómetro de flujo. Para cada marcador celular se analizaron si hay diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones de biofuncionalización en el porcentaje de eventos (células) positivos. Es decir, en el porcentaje de células que expresan ese marcador en particular. Por otra parte, se analizó si existen diferencias estadísticamente significativas en la intensidad media de fluorescencia por célula, que es proporcional al número de marcadores por célula. Además, se incluyeron los histogramas para cada condición evaluada, que constituyen los gráficos de distribución de frecuencia que permiten calcular la intensidad media de fluorescencia por célula. Los histogramas permiten visualizar el número de células en función de la intensidad de fluorescencia. Un desplazamiento hacia la derecha de la distribución en el eje de las abscisas indica un aumento en el número de marcadores por célula para esa condición experimental en particular.

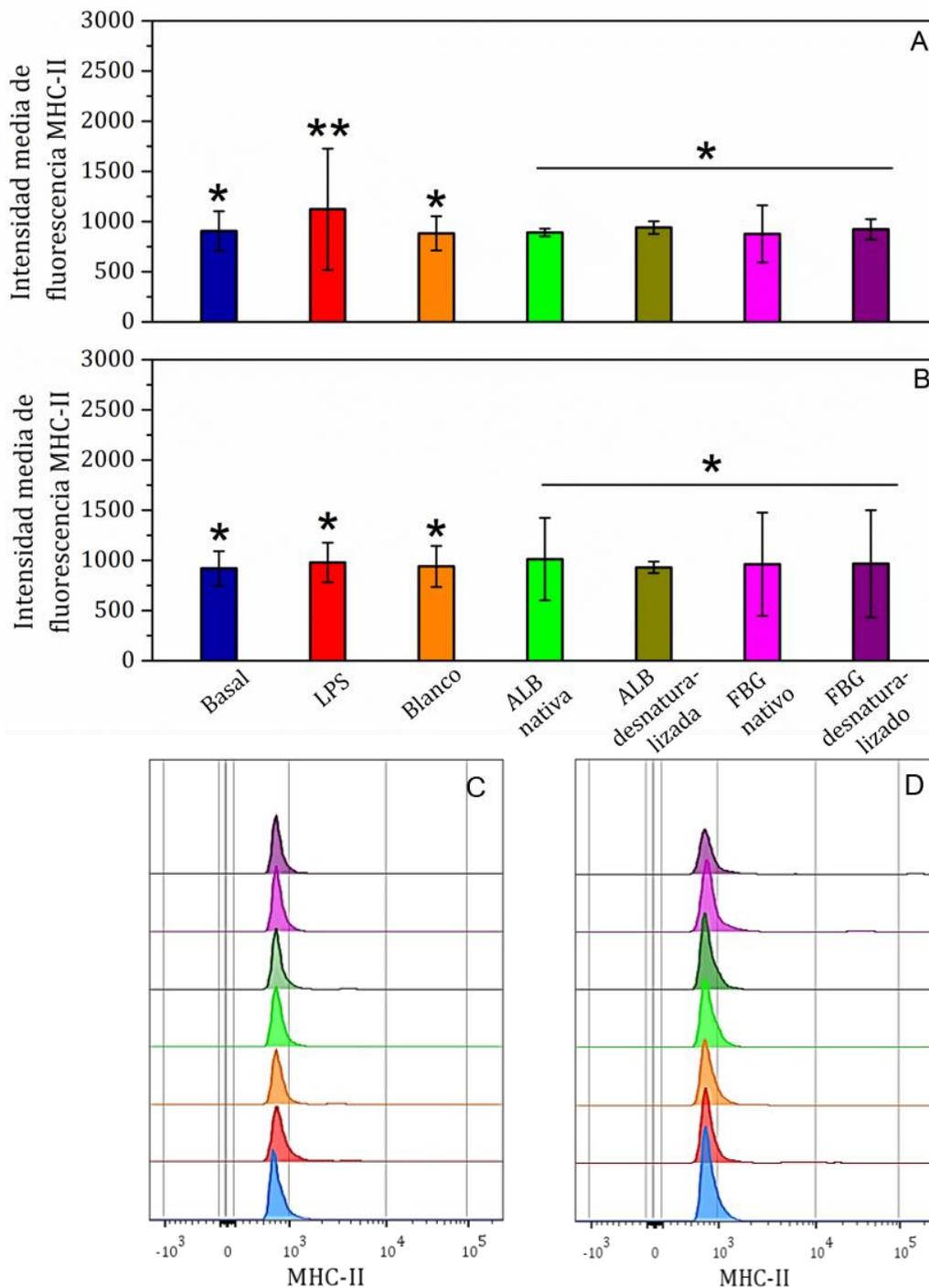
La Figura 7.1 muestra el porcentaje de células que expresan MHC-II en las distintas condiciones experimentales evaluadas, en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B). En ambos medios evaluados, las distintas condiciones de biofuncionalización presentan diferencias estadísticamente significativas sólo con la condición experimental que corresponde a las células estimuladas con LPS. Sin embargo, no presentan diferencias significativas con el blanco de biofuncionalización ni con la condición basal. La

biofuncionalización con ALB o con FBG nativos o desnaturalizados no induce un aumento en el porcentaje de células que expresan el marcador MHC-II, como sí lo produce la estimulación con LPS.



**Figura 7.1** Porcentaje de células que expresan MHC-II en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B) en las condiciones experimentales: basal (azul), LPS (rojo), blanco (naranja), ALB nativa (verde claro), ALB desnaturalizada (verde oscuro), FBG nativo (rosa), FBG desnaturalizado (violeta). Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% y las condiciones indicadas con símbolo común no son significativamente diferentes (valores  $p > 0,05$ ).

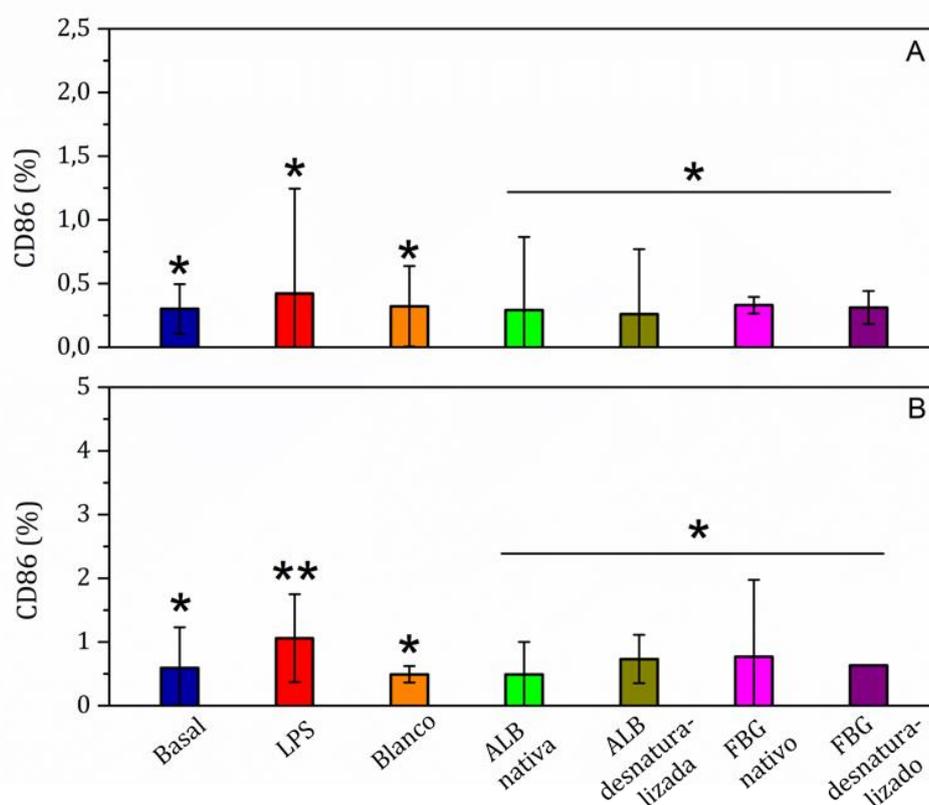
Por otra parte, la Figura 7.2 muestra la intensidad media de fluorescencia para MHC-II por célula en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B), y los histogramas respectivos en medio en ausencia de SFB (C) y suplementado con SFB (D). Las células estimuladas con LPS muestran un mayor número de MHC-II por célula que el resto de las condiciones experimentales en el medio en ausencia de SFB. No se observaron



**Figura 7.2** Intensidad de fluorescencia media para MHC-II en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B), y distribución de intensidad de fluorescencia en función del número de células en medio en ausencia de SFB (C) y suplementado con SFB (D) en las condiciones experimentales: basal (azul), LPS (rojo), blanco (naranja), ALB nativa (verde claro), ALB desnaturalizada (verde oscuro), FBG nativo (rosa), FBG desnaturalizado (violeta). Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% y las condiciones indicadas con símbolo común no son significativamente diferentes (valores  $p > 0,05$ ).

diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales en el medio suplementado con SFB. Las condiciones de biofuncionalización no presentan diferencias con el blanco ni con la condición basal en ningún medio, indicando que no aumentan la expresión del número de MHC-II por célula.

El porcentaje de células que expresan el marcador CD86 en las distintas condiciones experimentales evaluadas se puede apreciar en la Figura 7.3, en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B). No se observan diferencias significativas para las distintas condiciones evaluadas en

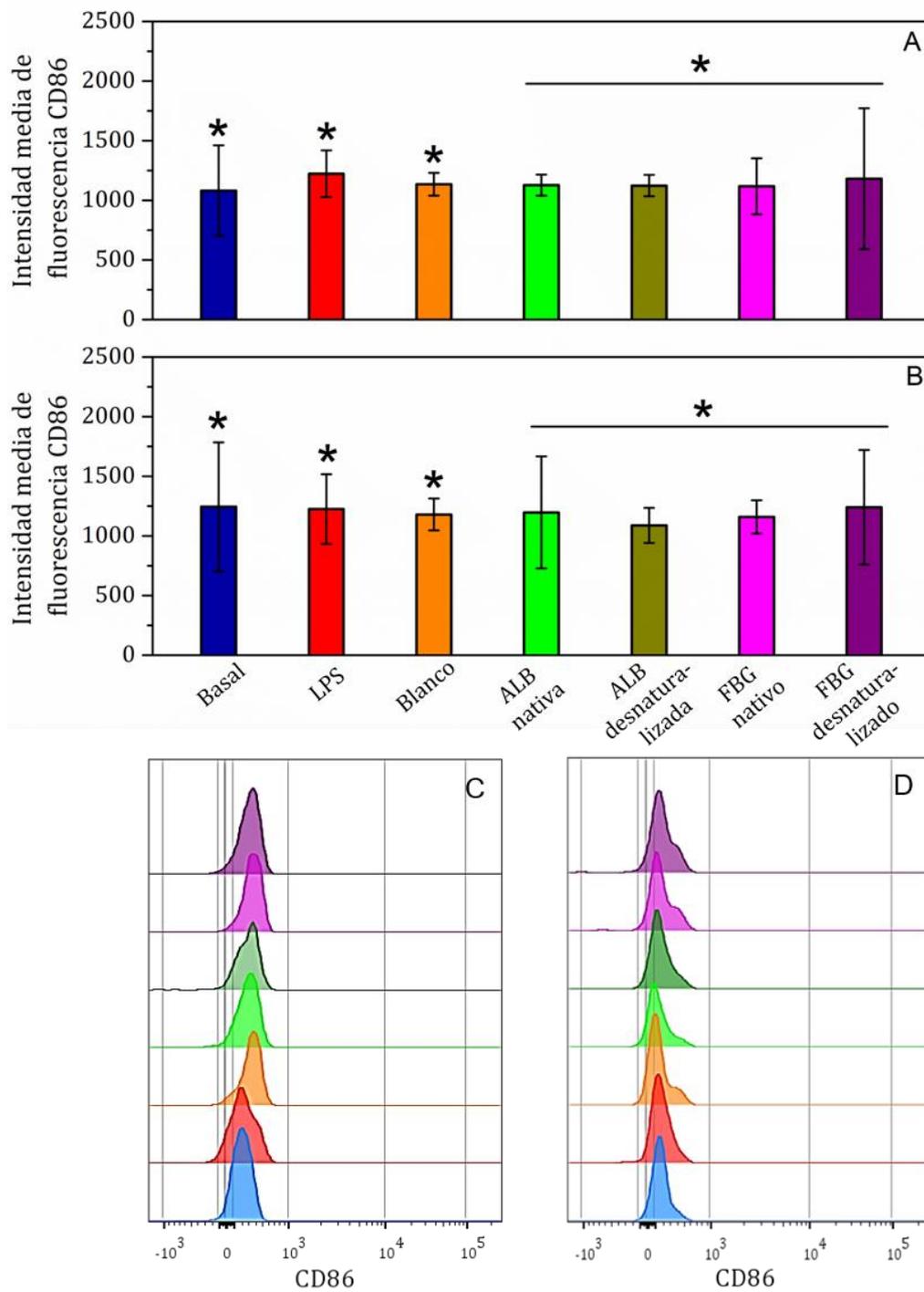


**Figura 7.3** Porcentaje de células que expresan CD86 en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B) en las condiciones experimentales: basal (azul), LPS (rojo), blanco (naranja), ALB nativa (verde claro), ALB desnaturada (verde oscuro), FBG nativo (rosa), FBG desnaturado (violeta). Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% y las condiciones indicadas con símbolo común no son significativamente diferentes (valores  $p > 0,05$ ).

el medio en ausencia de SFB. La condición experimental que corresponde a las células estimuladas con LPS es la única que ocasiona un mayor porcentaje de células que expresan CD86 en el medio suplementado con SFB. Es decir, las condiciones de biofuncionalización no producen aumento en el porcentaje de células que expresan este marcador respecto al blanco o a la condición basal.

La Figura 7.4 muestra la intensidad media de fluorescencia para CD86 por célula en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B), y los histogramas respectivos en medio en ausencia de SFB (C) y suplementado con SFB (D). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ningún medio para ninguna condición experimental. Esto indica que la biofuncionalización con ALB o FBG nativo o desnaturalizado no produce diferencia en el número de marcadores CD86 por célula respecto del blanco o de la condición basal.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos para los macrófagos murinos Raw, se puede afirmar que la biofuncionalización superficial con ALB o FBG desnaturalizados no produce activación en esta línea celular en ninguno de los medios explorados. De hecho, ambas condiciones de biofuncionalización provocan no sólo igual respuesta celular que la biofuncionalización con ALB y FBG nativos, sino que con el blanco de biofuncionalización y con las células sin superficie. Ninguna condición de biofuncionalización induce un aumento en el porcentaje de células que expresan MHC-II o CD86, ni en el número de dichos marcadores por célula. De manera general, el estímulo con LPS provoca una mayor activación de estos macrófagos que el resto de las condiciones experimentales. Esta mayor activación quedó evidenciada mediante un aumento en el porcentaje de células que expresan MHC-II, en el número de MHC-II por célula (en medio en ausencia de SFB) y en el porcentaje de CD86



**Figura 7.4** Intensidad de fluorescencia media para CD86 en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B), y distribución de intensidad de fluorescencia en función del número de células en medio en ausencia de SFB (C) y suplementado con SFB (D) en las condiciones experimentales: basal (azul), LPS (rojo), blanco (naranja), ALB nativa (verde claro), ALB desnaturada (verde oscuro), FBG nativo (rosa), FBG desnaturado (violeta). Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% y las condiciones indicadas con símbolo común no son significativamente diferentes (valores  $p > 0,05$ ).

por célula (en medio suplementado con SFB).

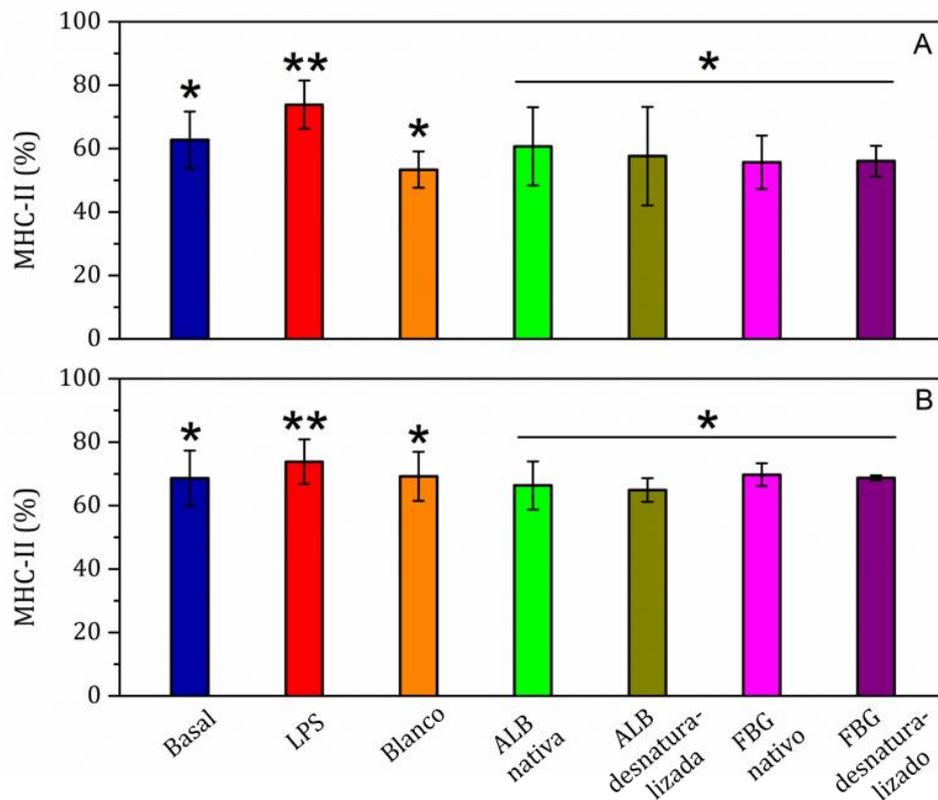
### **7.2.2.2 Macrófagos peritoneales de ratón**

Para evaluar la activación de macrófagos peritoneales de ratón se estudió la expresión de los marcadores celulares MHC-II y CD80. Para ello, los macrófagos se caracterizaron con un panel de anticuerpos monoclonales que consisten en: anti-MHC-II conjugado con FITC y anti-CD80 conjugado con ficoeritrina (PE), y se procesaron de inmediato por el citómetro de flujo. De la misma manera que para los macrófagos Raw, para cada marcador celular se analizó si existen diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células que expresan ese marcador en particular, y en la intensidad media de fluorescencia por célula. También se incluyeron los histogramas obtenidos para cada condición experimental.

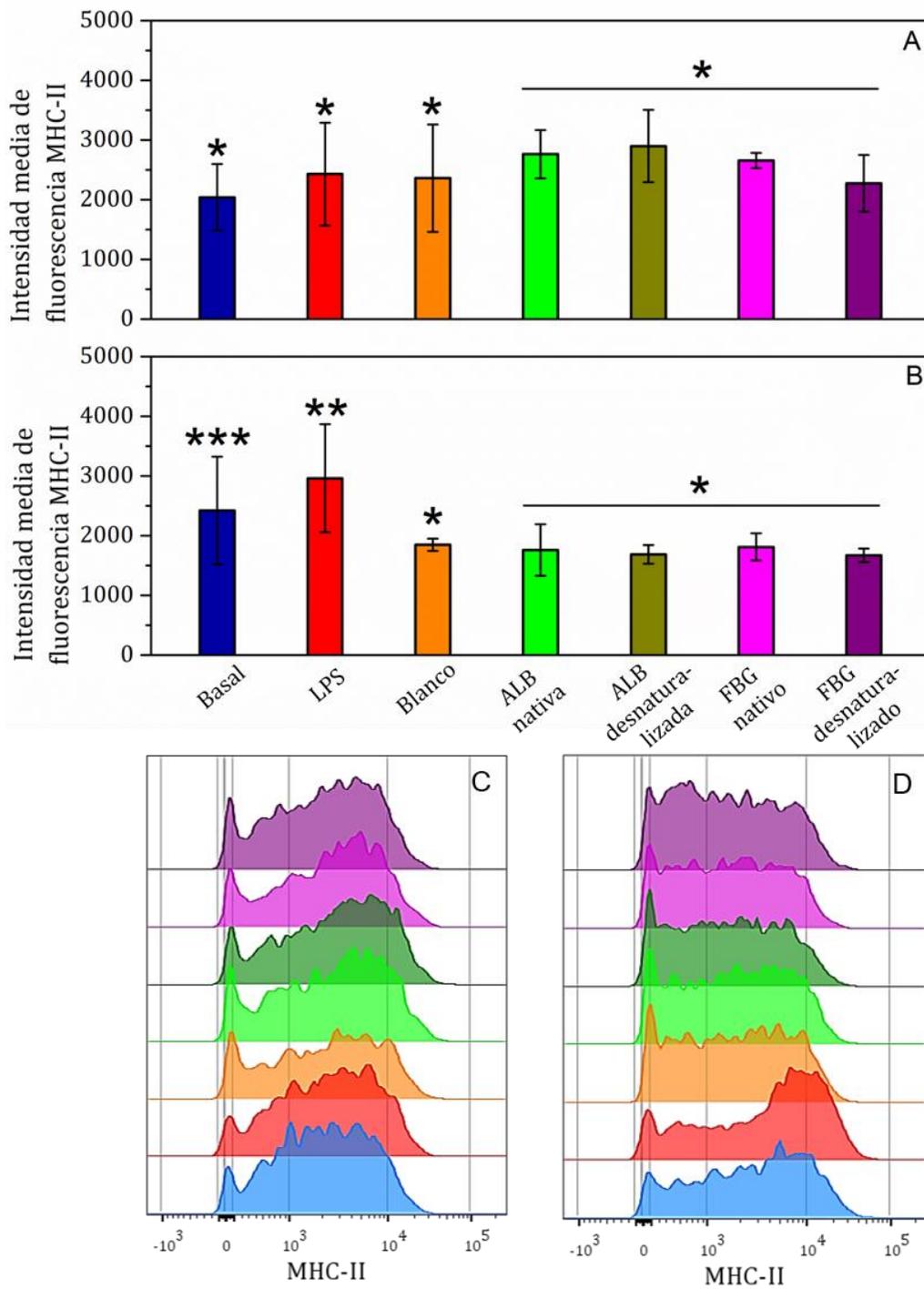
El porcentaje de células que expresan el marcador MHC-II en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B) se muestran en la Figura 7.5. En ambos medios, el LPS arroja un mayor porcentaje de células que expresan MHC-II. Además, las distintas condiciones de biofuncionalización no presentan diferencias para la expresión de este marcador respecto del blanco, ni de la condición basal en ambos medios evaluados.

La Figura 7.6 muestra la intensidad media de fluorescencia para MHC-II por célula en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B), y los histogramas respectivos en medio en ausencia de SFB (C) y suplementado con SFB (D). En el medio en ausencia de SFB, no se observaron diferencias significativas entre las condiciones experimentales. En el medio suplementado con SFB, las condiciones de biofuncionalización provocaron el menor número de MHC-II por célula, junto con el blanco de biofuncionalización. La condición

basal y el LPS presentaron diferencias significativas con las condiciones de biofuncionalización, evidenciando un aumento en el número de MHC-II por célula.

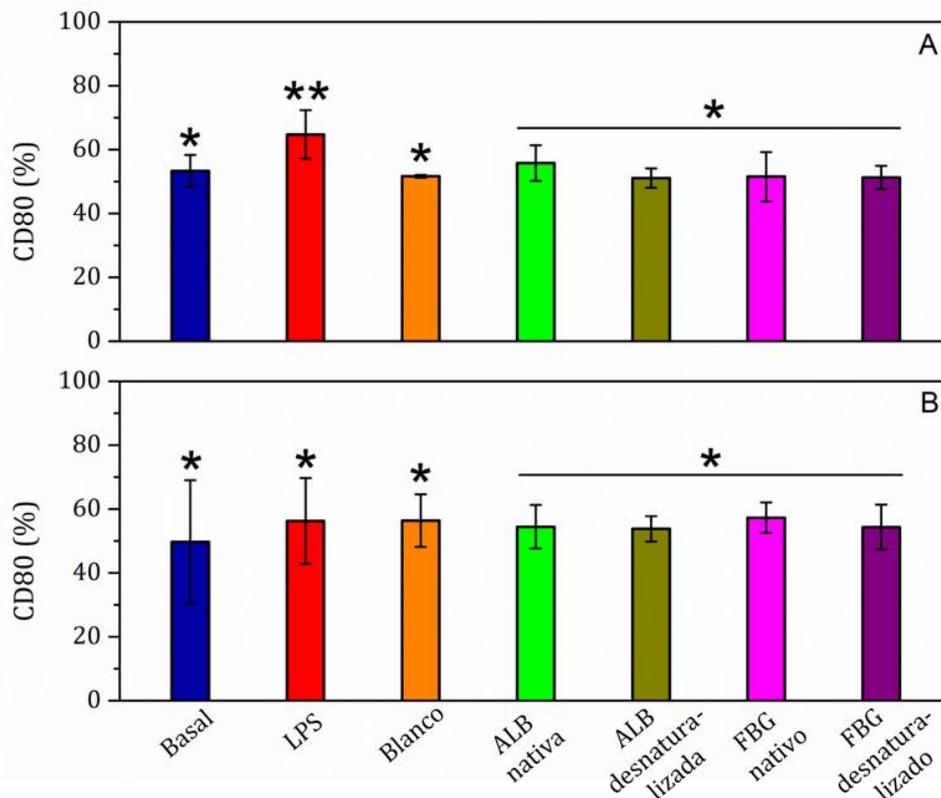


**Figura 7.5** Porcentaje de células que expresan MHC-II en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B) en las condiciones experimentales: basal (azul), LPS (rojo), blanco (naranja), ALB nativa (verde claro), ALB desnaturalizada (verde oscuro), FBG nativo (rosa), FBG desnaturalizado (violeta). Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% y las condiciones indicadas con símbolo común no son significativamente diferentes (valores  $p > 0,05$ ).



**Figura 7.6** Intensidad de fluorescencia media para MHC-II en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B), y distribución de intensidad de fluorescencia en función del número de células en medio en ausencia de SFB (C) y suplementado con SFB (D) en las condiciones experimentales: basal (azul), LPS (rojo), blanco (naranja), ALB nativa (verde claro), ALB desnaturalizada (verde oscuro), FBG nativo (rosa), FBG desnaturalizado (violeta). Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% y las condiciones indicadas con símbolo común no son significativamente diferentes (valores  $p > 0,05$ ).

La Figura 7.7 muestra el porcentaje de células que expresan CD80 en las distintas condiciones experimentales evaluadas, en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B). La condición experimental que corresponde a las células estimuladas con LPS es la única que ocasiona un mayor porcentaje de células que expresan CD80 en el medio en ausencia de SFB. No se observaron diferencias significativas para las distintas condiciones evaluadas en el medio suplementado con SFB. Es decir, las condiciones de biofuncionalización no provocaron un aumento en el porcentaje de células que expresan CD80, respecto del blanco, ni de la condición basal en ambos

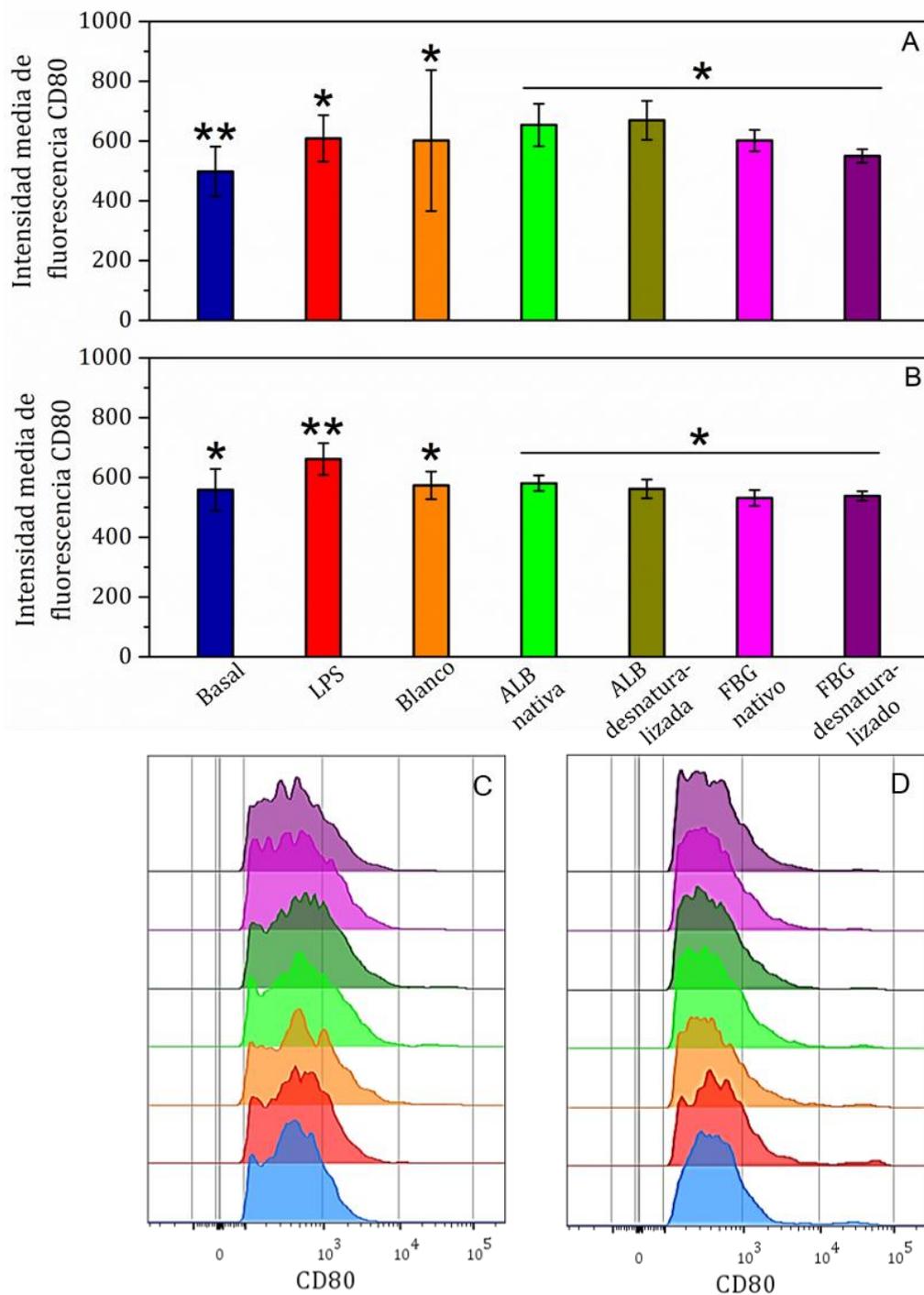


**Figura 7.7** Porcentaje de células que expresan CD80 en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B) en las condiciones experimentales: basal (azul), LPS (rojo), blanco (naranja), ALB nativa (verde claro), ALB desnaturada (verde oscuro), FBG nativo (rosa), FBG desnaturado (violeta). Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% y las condiciones indicadas con símbolo común no son significativamente diferentes (valores  $p > 0,05$ ).

medios evaluados.

La Figura 7.8 muestra la intensidad media de fluorescencia para CD80 por célula en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B), y los histogramas respectivos en medio en ausencia de SFB (C) y suplementado con SFB (D). En el medio en ausencia de SFB, las condiciones de biofuncionalización resultaron estadísticamente diferentes a la condición basal, la cual produjo un menor número de CD80 por célula. Por otra parte, en el medio suplementado con SFB las células estimuladas con LPS son las que presentaron mayor número de CD80 por célula. En este medio, las condiciones de biofuncionalización no presentaron diferencias para la expresión de este marcador por célula respecto al blanco o a la condición basal.

De acuerdo con los resultados exhibidos para la expresión de los diferentes marcadores celulares en macrófagos peritoneales de ratón, se puede afirmar que la biofuncionalización superficial con ALB o FBG desnaturalizados o nativos no produce aumento del porcentaje de células que expresan MHC-II o CD80, ni del número de dichos marcadores por célula en comparación al blanco de biofuncionalización en ninguno de los medios explorados. De hecho, en general, las condiciones de biofuncionalización tampoco provocaron diferencias en la expresión de los marcadores respecto a la condición basal. Además, dado que el estímulo con LPS se utiliza como control positivo, induce una mayor activación de estos macrófagos que el resto de las condiciones experimentales, mediante un aumento en el porcentaje de células que expresan MHC-II y en el número de MHC-II por célula (en medio suplementado con SFB), en el porcentaje de células que expresan CD80 (en medio en ausencia de SFB) y en el número de CD80 por célula (en medio suplementado con SFB).



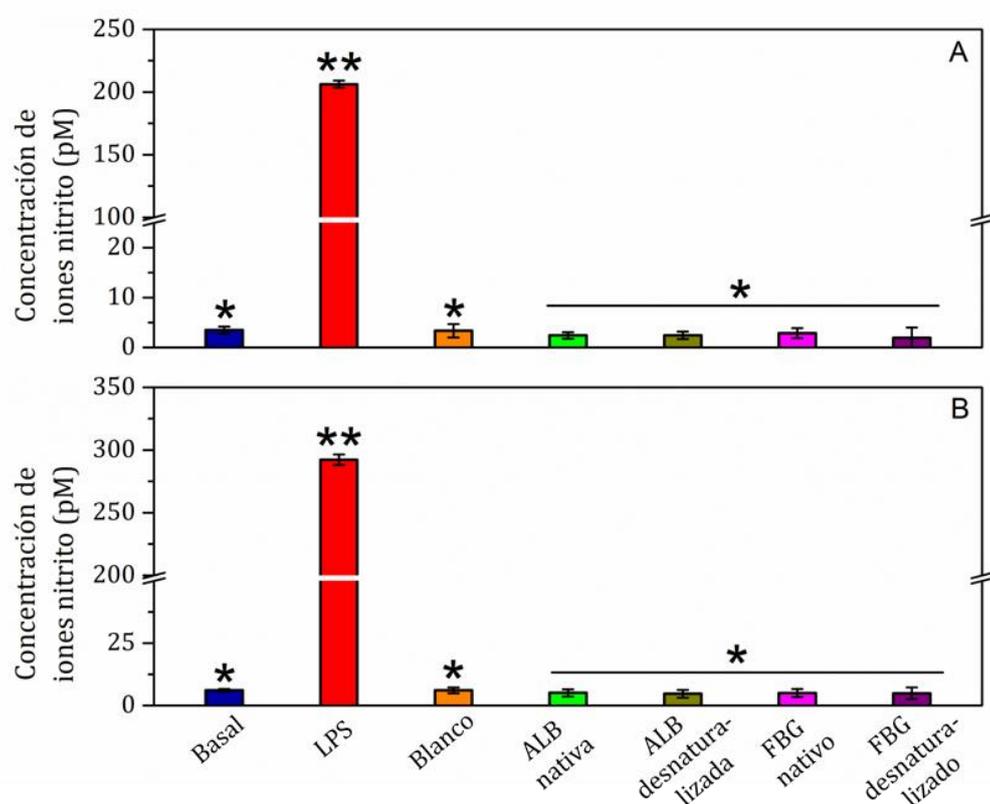
**Figura 7.8** Intensidad de fluorescencia media para CD80 en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B), y distribución de intensidad de fluorescencia en función del número de células en medio en ausencia de SFB (C) y suplementado con SFB (D) en las condiciones experimentales: basal (azul), LPS (rojo), blanco (naranja), ALB nativa (verde claro), ALB desnaturalizada (verde oscuro), FBG nativo (rosa), FBG desnaturalizado (violeta). Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% y las condiciones indicadas con símbolo común no son significativamente diferentes (valores  $p > 0,05$ ).

### **7.2.3 Cuantificación de iones nitrito en sobrenadantes de cultivo mediante la reacción de Griess**

La activación clásica de macrófagos activa la función citotóxica y antimicrobiana de los macrófagos, basada principalmente en su capacidad para secretar óxido nítrico [8,15,16]. La función del NO en los procesos inflamatorios comprende la vasodilatación y destrucción de microorganismos ejerciendo su acción mediante la formación de especies reactivas del oxígeno [11,17–19].

Con el objeto de evaluar la activación de macrófagos en cuanto a su capacidad de producir NO como iones nitrito, los sobrenadantes correspondientes al cultivo de macrófagos peritoneales de ratón enfrentados a las condiciones de biofuncionalización detalladas previamente, se procesaron con la reacción colorimétrica de Griess. A partir de una curva de calibración con  $\text{NaNO}_2$ , se determinó la concentración de iones nitrito para cada condición experimental, que fue evaluada por triplicado.

La Figura 7.9 muestra la concentración de iones nitrito para las distintas condiciones experimentales en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B). En ambos medios, las condiciones de biofuncionalización no presentaron diferencias significativas respecto al blanco de biofuncionalización, ni a la condición basal. Es decir, no indujeron un aumento en la secreción de NO. Sin embargo, se evidenciaron diferencias respecto al estímulo con LPS en ambos medios. Este produjo activación de los macrófagos, por medio de un aumento significativo en la secreción de NO.



**Figura 7.9** Concentración de iones nitrito en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B) en las condiciones experimentales: basal (azul), LPS (rojo), blanco (naranja), ALB nativa (verde claro), ALB desnaturalizada (verde oscuro), FBG nativo (rosa), FBG desnaturalizado (violeta). Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% y las condiciones indicadas con símbolo común no son significativamente diferentes (valores  $p > 0,05$ ).

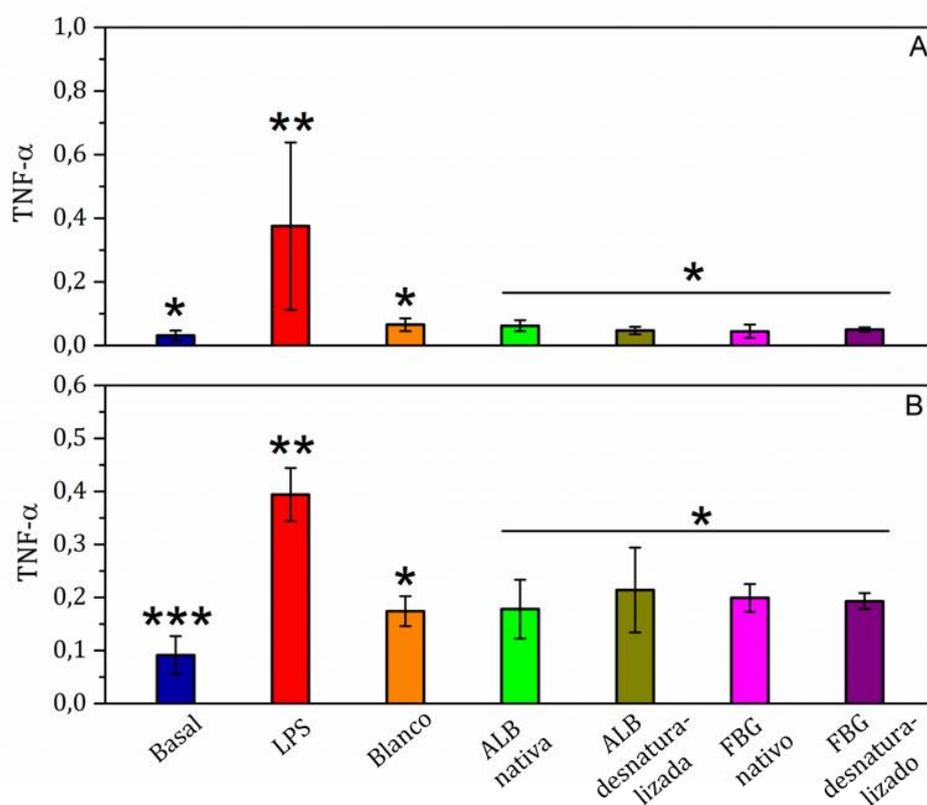
#### 7.2.4 Determinación de citocinas en sobrenadantes de cultivo mediante Elisa sándwich

Las citocinas proinflamatorias constituyen otros mediadores de la inflamación que secretan los macrófagos activados, además del NO [8,9,20]. Entre ellas, se puede nombrar a interleucinas como la IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 y al TNF- $\alpha$  [7,8,11,20]. Estas citocinas cumplen funciones muy diversas, tendientes a amplificar la respuesta inflamatoria por medio de la secreción de otros mediadores de la inflamación o la expresión de receptores celulares [7,13].

El TNF- $\alpha$  desempeña un papel clave en el proceso inflamatorio, ejerciendo una acción tanto por sí mismo, como a través de la regulación de otros mediadores [21,22]. De hecho, de acuerdo a la bibliografía, está involucrado en la respuesta inflamatoria que se genera frente a biomateriales implantados [23,24]. Es por esto que solo se midió la secreción de esta citocina como indicador de la activación de macrófagos.

Los sobrenadantes correspondientes al cultivo de macrófagos peritoneales de ratón enfrentados a las condiciones de biofuncionalización detalladas previamente, se procesaron paralelamente con esta técnica de enzimoimmunoensayo para determinar el nivel de TNF- $\alpha$ , mediante anticuerpos específicos para esta citocina. Estos anticuerpos están ligados a una enzima que posee un sustrato colorimétrico [25,26]. Por lo cual, se utilizó el ensayo de ELISA sándwich con fines cualitativos, donde la densidad óptica es proporcional al nivel de la citocina evaluada [25,26].

La Figura 7.10 muestra los niveles de TNF- $\alpha$  en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B). En medio sin suplemento de SFB, la condición experimental que corresponde al estímulo con LPS es la única que se diferencia del resto de las condiciones ensayadas, provocando un mayor nivel de TNF- $\alpha$ . Las condiciones de biofuncionalización no presentaron diferencias estadísticamente significativas con el blanco, ni con la condición basal para la secreción de esta citocina. En medio suplementado con SFB, también el estímulo con LPS ocasiona la producción de TNF- $\alpha$  en mayor medida. Por otra parte, las condiciones de biofuncionalización presentaron diferencias significativas con la condición basal, la cual produjo menor nivel de TNF- $\alpha$ , pero no presentaron diferencias con el blanco de biofuncionalización.



**Figura 7.10** Nivel de TNF- $\alpha$  en medio en ausencia de SFB (A) y suplementado con SFB (B) en las condiciones experimentales: basal (azul), LPS (rojo), blanco (naranja), ALB nativa (verde claro), ALB desnaturada (verde oscuro), FBG nativo (rosa), FBG desnaturado (violeta). Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% y las condiciones indicadas con símbolo común no son significativamente diferentes (valores  $p > 0,05$ ).

En resumen, el estímulo de los macrófagos con LPS potenció la secreción de TNF- $\alpha$  al medio. En ambos medios, no se observaron diferencias para la producción de TNF- $\alpha$  entre la biofuncionalización con ALB y FBG de estructura desnaturada respecto de la biofuncionalización con ALB y FBG de estructura nativa, ni de la condición que representa al blanco de biofuncionalización.

### 7.3 Conclusiones

Se emplearon distintas técnicas con el fin de evaluar de forma integral la activación de macrófagos mediante el estudio de la expresión de marcadores celulares, producción de especies reactivas del oxígeno (NO) y citocinas proinflamatorias. El abordaje de las mismas permitió arribar a las mismas conclusiones. En primer lugar, cabe destacar que no se observa efecto del suplemento de SFB en el medio, por lo que se puede afirmar que los componentes del SFB no enmascaran la biofuncionalización ante la interacción con macrófagos. La biofuncionalización con ALB o con FBG parcialmente desnaturalizados ocasionan la misma respuesta en los macrófagos. Esta, de hecho, también coincide con la inducida por la biofuncionalización con ALB y FBG nativos, por el blanco de biofuncionalización, y en general por las células cultivadas sin superficie. A su vez, esta respuesta celular fue menor al estímulo con LPS, la cual fue capaz de inducir la activación de los macrófagos. Es decir, los cambios estructurales que experimentan las moléculas de ALB y de FBG durante el tratamiento térmico previo a la biofuncionalización superficial, no inducen la activación de macrófagos en un medio de relevancia fisiológica. Esto permite inferir que la biofuncionalización con proteínas parcialmente desnaturalizadas podría emplearse para inhibir la adhesión de *S. aureus* en contacto con fluidos biológicos, ya que no activa la respuesta inmune innata.

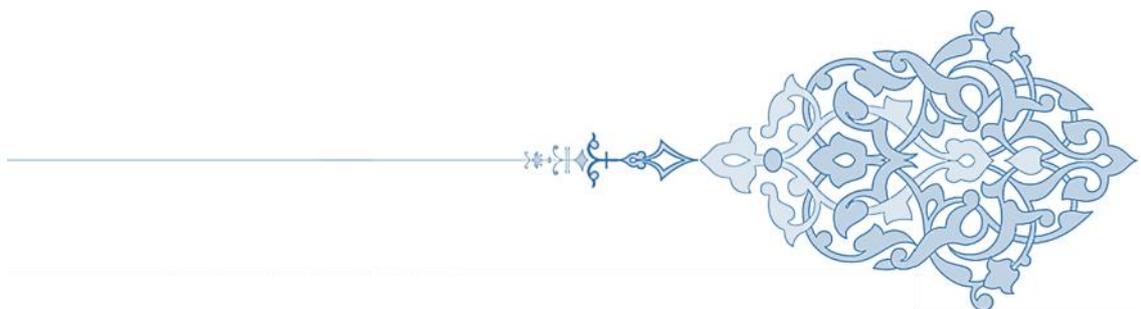
---

## Referencias

- [1] M. Arora, Cell Culture Media: A Review, *Mater. Methods.* 3 (2013) 175–204. doi:10.13070/mm.en.3.175.
- [2] P. Gil-Loyzaga, Cultivo de células animales y humanas: Aplicaciones en medicina regenerativa. Universidad Complutense de Madrid., Vision Libros, Madrid, 2011.
- [3] H. Hemedá, B. Giebel, W. Wagner, Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells, *Cytotherapy.* 16 (2014) 170–180. doi:10.1016/j.jcyt.2013.11.004.
- [4] S. Yousefi, J. Soleimanirad, K. Hamdi, L. Farzadi, A. Ghasemzadeh, M. Kazemi, M. Mahdipour, R. Rahbarghazi, M. Nouri, Distinct effect of fetal bovine serum versus follicular fluid on multipotentiality of human granulosa cells in in vitro condition, *Biologicals.* 52 (2018) 44–48. doi:10.1016/j.biologicals.2018.01.002.
- [5] S.W. Malm, E.A. Amouzougan, W.T. Klimecki, Fetal bovine serum induces sustained, but reversible, epithelial-mesenchymal transition in the BEAS-2B cell line, *Toxicol. Vitr.* 50 (2018) 383–390. doi:10.1016/j.tiv.2018.04.008.
- [6] G. Di Di Conza, P. Ho, Metabolic adaptation of macrophages in chronic diseases, *Cancer Lett.* 414 (2018) 250–256. doi:10.1016/j.canlet.2017.11.023.
- [7] R. Solís-martínez, G. Hernández-flores, F.J. Ochoa-carrillo, P. Ortiz-lazareno, Macrófagos asociados a tumores contribuyen a la progresión del cáncer de próstata, *Gac. Mex. Oncol.* 14 (2015) 97–102. doi:10.1016/j.gamo.2015.03.001.
- [8] S. Goerdts, C.E. Orfanos, B. Franklin, Other Functions, Other Genes: Alternative Activation of Antigen-Presenting Cells, *Immunity.* 10 (1999) 137–142. doi:10.1016/s1074-7613(00)80014-x.
- [9] M.K. Crow, Modification of accessory molecule signaling, *Spinger Semin. Immunopathol.* 27 (2006) 409–424. doi:10.1007/s00281-006-0018-3.
- [10] N. Harris, F. Ronchese, The role of B7 costimulation in T-cell immunity, *Immunol. Cell Biol.* 77 (1999) 304–311.
- [11] C.D. Mills, Anatomy of a discovery : M1 and M2 macrophages, *Front. Immunol.* 6 (2015) 1–12. doi:10.3389/fimmu.2015.00212.
- [12] A.S. Zhao, S. Zhou, Y. Wang, J. Chen, C.R. Ye, N. Huang, Molecular interaction of fibrinogen with thermally modified titanium dioxide nanoparticles, *RSC Adv.* 4 (2014) 40428–40434. doi:10.1039/C4RA07803A.
- [13] A.K. Abbas, A.W. Lichtman, S. Pillai, *Inmunología Celular y Molecular*, 6th ed., Elsevier, Barcelona, España, 2008.
- [14] G. Bakdash, P. Simone, T. Van Dijk, C.G. Figdor, I.J.M. De Vries, The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II, *Front. Immunol.* 4 (2013) 1–18. doi:10.3389/fimmu.2013.00053.
- [15] D. Tsikas, Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess

- reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 851 (2007) 51–70. doi:10.1016/j.jchromb.2006.07.054.
- [16] C.N. Paiva, E. Medei, M.T. Bozza, ROS and Trypanosoma cruzi : Fuel to infection, poison to the heart, *Plos Pathog.* 14 (2018) 1–19.
- [17] R.M. Díaz, S.J. Medrano Mejía, O.J. Huerta de Mora, E.A. Huerta Acha, Óxido nítrico: la diversidad de sus efectos sistémicos, *SCEM.* 12 (2009) 35–38. doi:10.1157/13087917.
- [18] P. Picón-Pagès, J. Garcia-Buendia, F.J. Muñoz, Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* (2018). doi:10.1016/j.bbadis.2018.11.007.
- [19] E.E.H. van Faassen, A.F. Vanin, Nitric Oxide, *Encycl. Anal. Sci.* (2005) 183–191. doi:10.1016/B0-12-369397-7/00745-7.
- [20] M.A. Duque Correa, M.R. López, Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente, *Inmunología.* 26 (2007) 73–86. doi:10.1016/s0213-9626(07)70077-x.
- [21] J.J. O´Shea, M. Gadina, R.M. Siegel, *Cytoquines and Cytoquine Receptors*, in: *Clin. Immunol.*, Fifth Edit, Elsevier Ltd, 2019: pp. 127–155. doi:10.1016/B978-0-7020-6896-6.00009-0.
- [22] G. Beck, *Cytokines , Evolutionary Aspects and Functions*, *Ref. Modul. Biomed. Res.* (2014) 604–608. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.04045-9.
- [23] R. Biran, D.C. Martin, P.A. Tresco, Neuronal cell loss accompanies the brain tissue response to chronically implanted silicon microelectrode arrays, *Exp. Neurol.* 195 (2005) 115–126. doi:10.1016/j.expneurol.2005.04.020.
- [24] K.G. Battiston, R.S. Labow, J.P. Santerre, Protein binding mediation of biomaterial-dependent monocyte activation on a degradable polar hydrophobic ionic polyurethane, *Biomaterials.* 33 (2012) 8316–8328. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.08.014.
- [25] B. Detrick, R. Hamilton, J. Folds, *Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology*, Washington, 2007.
- [26] J. Oliver, *Antibody Applications, Mater Methods.* 3 (2013) 182–195. doi:10.13070/mm.en.3.182.

## Conclusiones generales y Proyecciones





## Conclusiones generales

En este trabajo de Tesis Doctoral, se propone una estrategia de biofuncionalización superficial con proteínas plasmáticas (albúmina y fibrinógeno) que inhibe la adhesión bacteriana y no activa la respuesta inmune innata. En pocas palabras, esta estrategia se basa en utilizar albúmina o fibrinógeno parcialmente desnaturizado para inhibir la adhesión de *S. aureus* desde su estadio inicial, eliminando la posibilidad de formar biofilm. Se trata de una estrategia novedosa, simple y asequible, que, además, puede implementarse sobre la superficie de distintos biomateriales utilizados en dispositivos médicos. En consecuencia, representa una primera aproximación hacia la optimización de las propiedades superficiales de materiales utilizados con fines terapéuticos con capacidad de inhibir los estadios iniciales de la adhesión bacteria y, en consecuencia, el desarrollo de infecciones.

Atendiendo a la diversidad de aspectos abordados en esta Tesis Doctoral, el trabajo se organizó en tres partes consecutivas con el objeto de incluir desde los aspectos fundamentales sobre los cuales se sientan las bases de la estrategia de biofuncionalización superficial, hasta la respuesta inmune innata. En la Parte 1, se estudió el proceso de adsorción-desorción de albúmina (ALB) y fibrinógeno (FBG) en condiciones cinéticas controladas, para optimizar las condiciones de biofuncionalización que permiten minimizar la adhesión de *S. aureus*. En particular, en el Capítulo 2 se abordó el estudio del proceso de adsorción-desorción de ALB mediante un diseño factorial de experimentos y en el Capítulo 3, se presentó el estudio del proceso de adsorción-desorción de FBG mediante un modelo del proceso de adsorción-desorción. En ambos casos, se relacionó el proceso de adsorción con la adhesión bacteriana. El diseño

factorial de experimentos permitió conocer el efecto simultáneo que poseen varios factores en la optimización del proceso de adsorción de ALB con un número limitado de experimentos. De hecho, a partir de la optimización del proceso de adsorción relativo a la adhesión bacteriana, surgió la importancia de la relajación superficial sobre la estructura de las moléculas de proteína adsorbidas. Concretamente, se observó que la relajación de las proteínas adsorbidas inhibe la adhesión de bacterias vivas. En general, para que las proteínas alcancen una estructura relajada se requiere de espacio disponible sobre la superficie, y de un proceso competitivo entre el llenado superficial y la etapa de relajación. En el caso de ALB, esta condición se alcanza cuando la cantidad adsorbida remanente luego de la desorción es baja. Por otro lado, el proceso de adsorción de FBG es más rápido que el de ALB, y el estado relajado sólo se alcanza a bajas concentraciones iniciales de la proteína y se requiere un tiempo de residencia adicional sobre la superficie. La adhesión bacteriana se dividió para su estudio según el tiempo de incubación, con el objeto de evaluar la adhesión de *S. aureus* en su etapa inicial y en la formación del biofilm. El estado relajado de las moléculas adsorbidas de ALB o de FBG es capaz de inhibir ambos estadios. Por otra parte, se pudo concluir que las interacciones entre *S. aureus* y la ALB son de tipo inespecíficas, mientras que entre dicha bacteria y el FBG son específicas. Este resultado no es sorprendente ya que el FBG posee sitios de unión específica para proteínas ancladas en la pared celular de *S. aureus*.

Los resultados de la Parte 1 de este trabajo permitieron iniciar el desarrollo de la estrategia de biofuncionalización superficial en la Parte 2, en la cual la estructura de las proteínas juega un rol fundamental. En esencia, el desafío de esta parte fue encontrar el modo de mimetizar la relajación superficial observada en condiciones cinéticas controladas de adsorción. En

este sentido, se mimetizó el cambio conformacional inducido por la superficie en condiciones cinéticas controladas, mediante un tratamiento térmico de las soluciones de proteína previo a la biofuncionalización superficial. El tratamiento térmico provocó una desnaturalización parcial de las proteínas nativas, observado mediante cambios en la estructura secundaria de las moléculas de ALB y de FBG. Luego, se planteó una estrategia de biofuncionalización sencilla, que consistió en la inmersión de las superficies en las soluciones de proteína de estructura parcialmente desnaturalizada. Al evaluar la respuesta bacteriana frente a la biofuncionalización superficial con ALB o con FBG se obtuvo una inhibición en la adhesión inicial y en la formación del biofilm de *S. aureus*. Tanto con ALB como con FBG las interacciones proteína-bacteria son inespecíficas ya que se seleccionaron condiciones de tratamiento térmico para alterar el sitio de unión específica de FBG a *S. aureus*. Además, la biofuncionalización con ALB mantiene su capacidad para la inhibición de la formación del biofilm incluso en medios de interés fisiológico. En consecuencia, la biofuncionalización con ALB es más robusta y promisoría que la desarrollada con FBG.

A partir de la necesidad de utilizar proteínas parcialmente desnaturalizadas para la biofuncionalización que pueden activar al sistema inmune hacia los biomateriales, surgió el interrogante respecto al comportamiento de la respuesta inmune innata. En particular, en la Parte 3 se estudió la respuesta de macrófagos frente a las superficies biofuncionalizadas con ALB y FBG de estructura nativa y parcialmente desnaturalizada. Los resultados mostraron que en ninguno de los casos se indujo activación de macrófagos, aun en un medio suplementado con suero, por lo que podría emplearse la biofuncionalización con ALB y FBG de estructura parcialmente desnaturalizada en contacto con fluidos biológicos.

## Proyecciones

Si bien este trabajo de Tesis Doctoral es de investigación fundamental\*, se contempla en toda su extensión las condiciones fisiológicas que enfrentan los biomateriales, para aproximarse así a un uso potencial en la práctica sanitaria. Las superficies de sílica empleadas en este trabajo son sistemas modelo que permiten modificar de manera sencilla y reproducible en la escala de laboratorio las propiedades superficiales. De esta manera, es posible realizar una correlación racional entre las propiedades superficiales con la adsorción de proteínas y con la adhesión bacteriana. Esta superficie modelo ha sido ampliamente estudiada y su comportamiento puede ser extendido fácilmente hacia otros biomateriales, como el óxido de titanio, el óxido de zinc, la hidroxiapatita o los hidróxidos dobles de magnesio y aluminio. Por otra parte, en los últimos años está surgiendo como objeto de estudio la sílica para ser empleada en biomateriales y en la industria alimenticia [1-8]. De manera que este material considerado modelo para una diversidad de estudios, podría dejar el terreno de la investigación fundamental para ser utilizado en desarrollos industriales.

La estrategia de biofuncionalización planteada permite sentar las bases para el diseño y desarrollo de biomateriales que se encuentren en contacto con fluidos biológicos y requieran prevenir el desarrollo de infecciones. En este sentido, se podría extender el estudio de la biofuncionalización sobre

---

\* Se utiliza el término investigación "fundamental" en el mismo sentido que lo hace el documento "Lineamientos para una política en investigación fundamental" (Argentina innovadora 2020), ya que se refiere a "lo que sirve de fundamento o es lo principal en algo" (Diccionario de la Real Academia Española), y define con precisión la ubicación y los alcances de esta actividad.

biomateriales para construir una gran diversidad de dispositivos médicos. Podría emplearse *per se* como método de prevención de infecciones bacterianas, o utilizarse conjuntamente con otros recubrimientos que posean un fin terapéutico en estas patologías. Así, se ayudaría a disminuir la morbilidad asociada a infecciones bacterianas en las intervenciones sanitarias.

## Referencias

- [1] R. Brady, B. Woonton, M.L. Gee, A.J. O'Connor, Hierarchical mesoporous silica materials for separation of functional food ingredients - A review, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9 (2008) 243–248. doi:10.1016/j.ifset.2007.10.002.
- [2] R. Ishii, T. Itoh, T. Yokoyama, S.I. Matsuura, T. Tsunoda, S. Hamakawa, F. Mizukami, T.A. Hanaoka, Preparation of mesoporous silicas using food grade emulsifiers and its application for enzyme supports, *J. Non. Cryst. Solids.* 358 (2012) 1673–1680. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2012.04.032.
- [3] M. Kariminejad, E. Sadeghi, M. Rouhi, R. Mohammadi, F. Askari, M. Taghizadeh, S. Moradi, The effect of nano-SiO<sub>2</sub> on the physicochemical and structural properties of gelatin-polyvinyl alcohol composite films, *J. Food Process Eng.* 41 (2018) 1–9. doi:10.1111/jfpe.12817.
- [4] S. Wang, X. Wang, F.G. Draenert, O. Albert, H.C. Schröder, V. Mailänder, G. Mitov, W.E.G. Müller, Bioactive and biodegradable silica biomaterial for bone regeneration, *Bone.* 67 (2014) 292–304. doi:10.1016/j.bone.2014.07.025.
- [5] R.K. Perumal, A. Gopinath, R. Thangam, S. Perumal, D. Masilamani, S.K. Ramadass, B. Madhan, Collagen-silica bio-composite enriched with *Cynodon dactylon* extract for tissue repair and regeneration, *Mater. Sci. Eng. C.* 92 (2018) 297–306. doi:10.1016/j.msec.2018.06.050.
- [6] S. Rangaraj, R. Venkatachalam, In vitro and in vivo characteristics of biogenic high surface silica nanoparticles in A549 lung cancer cell lines and Danio rerio model systems for inorganic biomaterials development, *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 46 (2018) 1415–1424. doi:10.1080/21691401.2017.1369427.
- [7] D. Arcos, M. Vallet-regí, Sol – gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration, *Acta Biomater.* 6 (2010) 2874–2888. doi:10.1016/j.actbio.2010.02.012.
- [8] M.I.A. Echazú, M.V. Tuttolomondo, M.L. Foglia, A.M. Mebert, G.S. Alvarez, M.F. Desimone, Advances in collagen, chitosan and silica biomaterials for oral tissue regeneration: From basics to clinical trials, *J. Mater. Chem. B.* 4 (2016) 6913–6929. doi:10.1039/c6tb02108e.

# LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$\alpha$	Parámetro de intensidad de flujo para la celda de punto estancado
$\beta$	Factor de retardo
$\gamma$	$k_a C_p (k_r)^{-1}$
$\theta$	Grado de cubrimiento superficial (Capítulo 1)-Elipticidad (Capítulo 4 y 5)
$\theta_N$	Grado de cubrimiento superficial de las proteínas en el estado nativo
$\theta_R$	Grado de cubrimiento superficial de las proteínas en el estado relajado
$\theta_T$	Grado de cubrimiento superficial total
$\xi$	$S_R/S_N$
$\Gamma$	Cantidad adsorbida
$\Gamma_N$	Cantidad adsorbida de proteínas nativas
$\Gamma_R$	Cantidad adsorbida de proteínas relajadas
$\Gamma_{rem}$	Cantidad adsorbida remanente luego de la desorción por dilución
$\Gamma_{sat}$	Cantidad adsorbida de saturación
$\tau_{75}$	Tiempo característico de cubrimiento superficial requerido para alcanzar el 75% de la cantidad adsorbida de saturación
$\tau_c$	Tiempo característico de cubrimiento superficial
$\tau_r$	Tiempo característico de relajación
C-	Control negativo
$C_p$	Concentración de proteína
$d$	Espesor
$d_a$	Espesor de la película adsorbida
$D$	Coefficiente de difusión de las moléculas
$f$	Constante del reflectómetro
$I_p$	Intensidad de la componente paralela de la luz reflejada
$I_s$	Intensidad de la componente perpendicular de la luz reflejada
$k$	Coefficiente de extinción
$k_{a1}$	Constante de adsorción en el estado nativo
$k_{a2}$	Constante de adsorción en el estado relajado
$k_{d1}$	Constante de desorción en el estado nativo
$k_{d2}$	Constante de desorción en el estado relajado
$k_r$	Constante de relajación
$k_{tr}$	Constante de transporte

$m_p$	Peso molecular de la proteína
$m_T$	Masa total adsorbida
$n$	Índice de refracción
$n_a$	Índice de refracción de la película adsorbida
$n_N$	Número de moléculas de proteína adsorbidas en el estado nativo
$n_R$	Número de moléculas de proteína adsorbidas en el estado relajado
$n_s$	Índice de refracción de la solución
$Q$	Factor de sensibilidad
$r$	Radio del tubo por el cual la solución entra a la celda
$R$	$R_p / R_s$
$R_p$	Reflectancia teórica de la superficie para la componente paralela
$R_s$	Reflectancia teórica de la superficie para la componente perpendicular
$S$	Señal del reflectómetro
$S_N$	Superficie ocupada por la proteína en el estado nativo
$S_0$	Señal del reflectómetro constante con el tiempo
$S_R$	Superficie ocupada por la proteína en el estado relajado
$S_T$	Superficie ocupada total
$v_c$	Velocidad de cubrimiento superficial
$v_i$	Velocidad inicial de adsorción
$v_f$	Velocidad de flujo
$v_r$	Velocidad de relajación
$v_{tr}$	Velocidad de transporte de las moléculas de adsorbato a la superficie

ALB	Albúmina
ANOVA	Análisis de la Varianza
ATCC	American Type Culture Collection
CD	Dicroísmo Circular
CMF	Citometría de Flujo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
ELISA	Enzimoimmunoensayo
FBG	Fibrinógeno
FBR	Reacción por cuerpo extraño
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

HRP	Complejo avidina-peroxidasa de rábano
IL	Interleucina
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
NRMSD	Raíz de la desviación cuadrática media normalizada
PBS	Solución reguladora de pH de concentración 5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> y 150 mM NaCl
PE	Ficoeritrina
PE-Cy7	Ficoeritrina-cianina 7
pIE	Punto isoelectrico
PZC	Punto de carga cero
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAMs	Monocapas autoensambladas
SFB	Suero fetal bovino
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TSA	Agar triptona soja
TSB	Caldo triptona soja
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

