

Reducció de l'adhesió i formació de biofilm bacterià sobre titani mitjançant immobilització d'un pèptid antibacterià

Maria Godoy-Gallardo⁽¹⁾, Carles Mas-Moruno⁽¹⁾, José M. Manero⁽¹⁾, Javier Gil, Daniel Rodríguez

*Escola Universitària d'Enginyeria Tècnica Industrial de Barcelona
Consorci Escola Industrial de Barcelona - Universitat Politècnica de Catalunya.
Dept. de Ciència de Materials i Enginyeria Metal·lúrgica. Urgell 187, 08036 Barcelona
Tel: +34 934137295 / Fax: +34 934016706
daniel.rodriguez.rius@upc.edu*

⁽¹⁾*ETSEIB-UPC, Dept. Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica.
Av. Diagonal 647, 08028-Barcelona*

Resum

L'ús d'implants de titani per a traumatologia i odontologia és una pràctica molt estesa actualment. El seu èxit, però, es veu afectat pels casos de infeccions que pateixen. En el cas concret dels implants dentals, el 14% dels implants pateixen infeccions bacterianes i entre el 5 i el 8% presenten infecció bacteriana que desenvolupa una peri-implantitis i una conseqüent pèrdua de l'implant. Per aquest motiu, en els darrers anys s'ha estudiat el desenvolupament de superfícies antibacterianes.

L'objectiu d'aquest estudi va ser desenvolupar un tractament de la superfície de titani per formar un recobriment antibacterià sobre titani basat en un pèptid antibacterià derivat de lactoferrina i comparar l'eficàcia dels mètodes emprats per immobilitzar el pèptid a la superfície del titani, i avaluar el seu efecte en l'activitat antibacteriana *in vitro*. S'han estudiat les característiques fisicoquímiques de la superfície que en resulta, la seva biocompatibilitat i capacitat per evitar l'adhesió de proteïnes i bacteris.

Paraules Clau: titani, antibacterià, biocompatibilitat.

Abstract

The use of titanium implants for orthopedic and dental practice is currently widespread. Its success, however, is affected by implant-related infections. In the case of dental implants, 14% of implants suffered bacterial infections and between 5 and 8% have a bacterial infection that develops peri-implantitis and consequent loss of the implant. For this reason, in the recent years the development of antibacterial surfaces has been thoroughly studied.

The aim of this study was to develop a surface treatment of titanium with an antibacterial coating based on an antibacterial peptide derived from lactoferrina, compare the effectiveness of methods used to immobilize the peptide on the surface of titanium, and evaluate their effect on the antibacterial activity *in vitro*. The physicochemical characteristics of the resulting surface have been studied, as well as its biocompatibility and its ability to prevent the adhesion of proteins and bacteria.

Keywords: titanium, antibacterial, biocompatibility.

1. Introducció

El fracàs a mig-llarg termini de l'implant dental de titani està associat, entre d'altres factors, a les infeccions de tipus peri-implantari lligades al biofilm bacterià bucal. Per tal de reduir la formació de biofilm, s'han desenvolupat diverses tècniques per crear recobriments antibacterians sobre titani a partir de diverses estratègies centrades en l'ús de pèptids antimicrobians (AMP)^{1,2}. Per immobilitzar covalentment aquestes molècules sobre substrats metàl·lics diverses tècniques s'han desenvolupat, incloent polímers ramificats³ i polímers preparats per transferència atòmica iniciada a la superfície per polimerització de radicals⁴.

L'objectiu d'aquest estudi va ser comparar l'eficàcia dels diferents mètodes estudiats per immobilitzar un pèptid antibacterià derivat de lactoferrina sobre titani, i avaluar el seu efecte en l'activitat antibacteriana in vitro.

2. Materials i mètodes

Mostres en forma de disc es van mecanitzar a partir de en forma de barra barres de titani de titani comercialment pur (cp) de grau 2 amb propietats químiques i mecàniques d'acord amb la norma ISO 5832-2. Les mostres cilíndriques de titani van ser polides fins a aconseguir una rugositat mitjana (R_a) per sota de 40 nm. Abans de qualsevol tractament, les mostres es van netejar ultrasònicament amb etanol, aigua destil·lada i acetona durant 15 minuts cadascun. Les mostres de titani van ser activades per atac alcalí amb hidròxid sòdic 5 M durant 24 h a 60 °C. Després d'aquest tractament, les mostres es netegen a fons per immersió en aigua destil·lada durant 30 minuts dues vegades, es van rentar amb acetona i es va assecar amb gas nitrogen.

(3-cloropropil) trietoxisilà (CPTES) i (3-aminopropil) trietoxisilà (APTES) es van obtenir de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La resina Rink Amide-ChemMatrix[®] va ser un regal del PCAS (Quebec, Canadà) i Fmoc i L-aminoàcids van ser adquirits d'Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Alemanya). Els reactius d'acoblament es van obtenir de Sigma-Aldrich, Medalchemy (Alacant, Espanya), Luxemburg Industries Ltd (Tel Aviv, Israel) i Alfa Aesar (Karlsruhe, Alemanya). Tots els altres productes químics i dissolvents van ser adquirits de Sigma-Aldrich, Alfa Aesar i SDS (Peypin, França) a la major puresa disponible i es van usar sense purificació addicional.

Les mostres de titani pretractades es van silanitzar ja sigui amb APTES (0,5%, v / v) o CPTES (2,0%, v / v) en toluè anhidre durant 1 h a 70 °C en atmosfera de nitrogen. La silanització amb CPTES es va realitzar en presència de 1% (v / v) de N, N-diisopropiletilamina (DIEA) per mantenir un entorn bàsic. Després de completar-se la reacció, els discos de titani es van netejar ultrasònicament amb aigua destil·lada durant 10 minuts. Després, les mostres es van rentar abundantment amb etanol, isopropanol, aigua destil·lada i acetona, i es van assecar amb nitrogen. Les mostres aminosilanitzades es van modificar de nou per reacció amb 5 mg / ml de l'àcid propiònic bifuncional reticulant 3-(maleimida) amb èster de N-hidroxisuccinimida en PBS (Gibco, Paisley, Regne Unit) durant 1 h a temperatura ambient. Aquestes mostres es van rentar finalment amb etanol, isopropanol, aigua destil·lada i acetona, i es van assecar amb nitrogen.

Es va realitzar cromatografia líquida d'alt rendiment analítica (HPLC) usant un sistema Waters Alliance 2695 cromatografia (Waters, MA, EUA), una fase inversa XBridge BEH130 columna C-18 (4,6 mm x 100 mm, 3,5 micres) i una matriu de fotodíodes com a detector (Waters 2998). El sistema es va fer funcionar a una velocitat de flux de 1,0 ml / min durant 8 min a temperatura ambient fent servir H₂O (0,045% de TFA, v / v) i MeCN (0,036% de TFA, v / v) com a dissolvents. Alternativament, la purificació per HPLC semi-preparativa es va dur a terme en un instrument Waters Delta 600 amb un detector d'absorbància dual λ (Waters 2487) utilitzant una columna de fase inversa Sunfire OBD C-18 (19mm x 100mm, 5,0 micres) a una velocitat de flux de 15 ml / min durant 12 min. Els espectres de masses es van registrar en un espectròmetre de MALDI-TOF Voyager DE RP (Applied Biosystems, Foster City, CA) usant àcid alfa-cià-4-hidroxicinàmic (ACH) com a matriu.

El pèptid derivat de la lactoferrina, que comprèn els residus 1 a 11 de la seqüència de la lactoferrina humana, tres unitats d'àcid 6-aminohexanoic (Ahx) com espaiador i àcid 3-mercaptopropiònic (MPA) com unitat d'ancoratge [MPA-Ahx-Ahx-Ahx-GRRRRSVQWCA-NH₂, Figura 1], es va sintetitzar manualment en fase sòlida seguint l'estratègia Fmoc / tBu i l'ús de la resina (0,4 g, càrrega de 0,48 mmol / g Rink Amide-ChemMatrix[®]) com a suport sòlid. El

grup Fmoc es va eliminar per tractament amb piperidina / N, N-dimetilformamida (DMF) (1: 4, v / v). Les reaccions d'acoblament es van dur a terme amb Fmoc L aminoàcids (4 equiv), OxymaPure (4 equiv) i N, N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) (4 equiv) en DMF durant 45 min. L'eficàcia de cada reacció es va monitoritzar utilitzant la prova de Kaiser i per anàlisi d'HPLC analític.

Després de la terminació de la síntesi, el pèptid s'escindeix del suport sòlid amb la desprotecció concomitant de la cadena lateral dels grups protectors. Amb aquesta finalitat, la resina es va rentar amb diclorometà (DCM), es va assecar, i es va tractar amb àcid trifluoroacètic (TFA) / H₂O / triisopropilsilà (TIS) (85: 10: 5) durant 3 h en presència de petites quantitats de ditiotreitòl (DTT) per evitar tior de l'oxidació durant el procés. TFA es va retirar a continuació per evaporació amb nitrogen i el pèptid es va precipitar amb èter dietílic fred, es va centrifugar i es va rentar dues vegades amb èter dietílic. Aquest pèptid brut es va dissoldre en H₂O / MeCN (1: 1, v / v) i es liofilitzà. La purificació del pèptid es va aconseguir per HPLC semi-preparativa utilitzant un gradient lineal de 10 a 35% de MeCN durant 12 min.

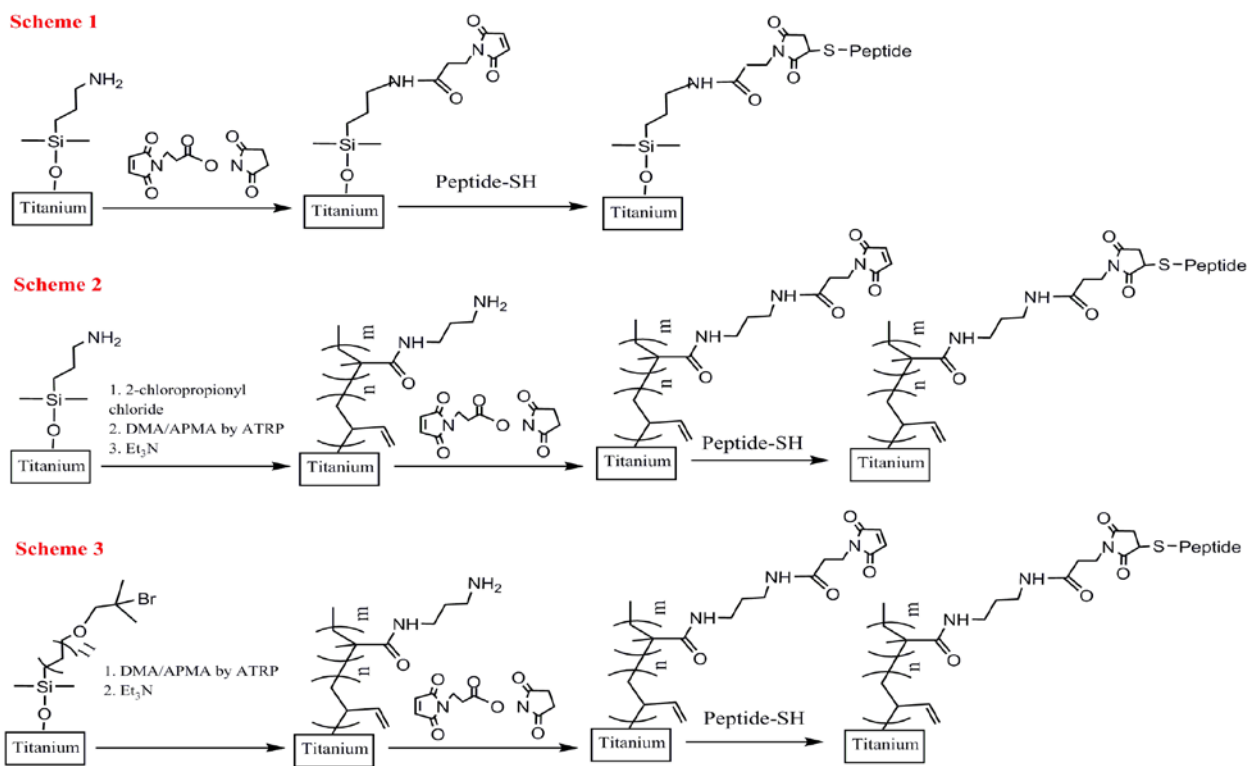


Figura 1. Mecanismes de silanització, formació de polímer ramificat i conjugació del pèptid.

Per mostres tractades amb el silà APTES, el pèptid es va dissoldre en solució salina tamponada amb fosfat (PBS) a diferents concentracions (50, 100 i 200 mM), i 100 l d'aquestes solucions es diposità sobre les mostres de titani durant una nit a temperatura ambient. Es van utilitzar les mateixes condicions per adsorbir físicament el pèptid en el titani control. Per a les mostres funcionalitzades amb silà CPTES, es van preparar solucions de pèptids en les mateixes concentracions que de APTES (50, 100 i 200 m), amb 0,5 mg / ml de Na₂CO₃ per neutralitzar el clorur d'hidrogen (HCl) generat durant la reacció de recobriment. Després de la incubació del pèptid, les mostres es van rentar suaument amb PBS i es van assecar amb nitrogen.

Les superfícies es van caracteritzar per mesures d'angle de contacte, la interferometria de llum blanca, el·lipsometria i l'espectroscòpia de fotoelectrons de raigs X (XPS). A més, es va estudiar l'estabilitat mecànica dels revestiments sota ultrasons. El pèptid purificat es va caracteritzar mitjançant HPLC analítica i MALDI-TOF SIMS.

La viabilitat cel·lular i la proliferació es van estudiar mitjançant l'assaig de LDH amb fibroblasts humans. Les propietats antibacterianes in vitro de les superfícies modificades es van assajar amb dues soques orals (*Streptococcus sanguinis* i *Lactobacillus salivarius*) per mitjà d'assaig d'adhesió bacteriana a les 2 h i l'evolució de la formació de biofilms després de 24 h.

3. Resultats i Discussió

En comparació amb la silanització, els tractaments de formació de polímers ramificats sobre la superfície de titani augmenten de la densitat de punts d'ancoratge per a la fixació de pèptids, segons el estimat per GPC i el·lipsometria. Les anàlisis de XPS confirmen que les dues estratègies permeten una unió covalent amb èxit del pèptid sobre el titani. La rugositat de la superfície no es va veure afectada per aquests tractaments.

La viabilitat cel·lular i la proliferació en els assaigs de LDH no es van veure afectats tampoc per la presència de pèptids. Totes les superfícies biofuncionalitzades amb el pèptid hLf1-11 van presentar un efecte antibacterià significatiu. La immobilització del pèptid hLf1-11 a través de tècniques de formació de polímers ramificats mostra una reducció estadísticament significativa de l'adhesió bacteriana respecte a l'ús de silanització. No obstant això, ambdós mètodes van tenir un efecte similar a la inhibició de la formació de biofilms.

Després de 2 h de sonicació la adhesió bacteriana i la formació de biofilm bacterià va augmentar lleugerament per a tots els tractaments, el que indica cert grau d'inestabilitat mecànica dels recobriments.

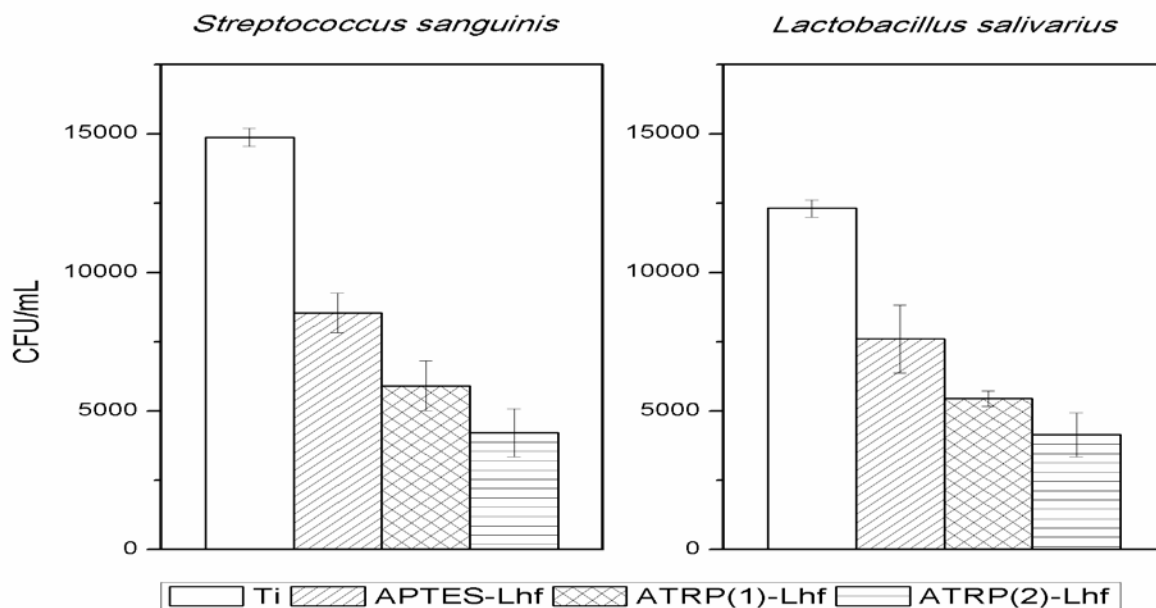


Figura 2. Efecte de les modificacions superficials a l'adhesió bacteriana.

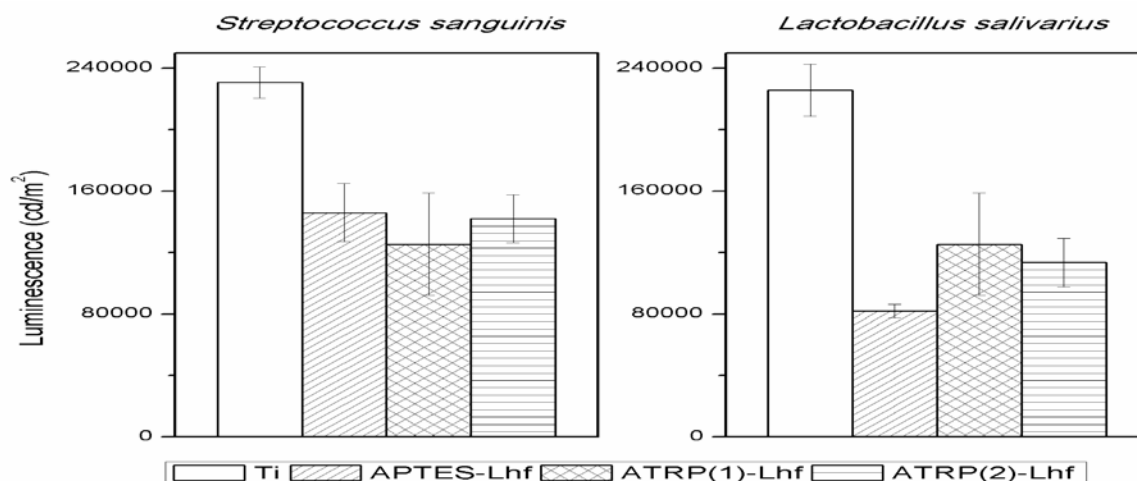


Figura 3. Formació de biofilm en 24h per a les diferents superfícies.

4. Conclusions

Es va aconseguir una disminució en la adhesió i formació de biofilm bacterià sobre superfícies de titani tractades amb pèptid antibacterià.

Es va observar una major disminució de la adhesió bacteriana quan les mostres es van modificar amb polímers ramificats en comparació amb la silanització. Aquest és l'efecte és probablement a causa de la capacitat per immobilitzar més pèptid en les superfícies per la major densitat de punts d'unió al polímer ramificat i la naturalesa hidròfila del mateix.

5. Referències

1. Acta Biomater. 1:1431-1440, 2011.
2. J. Biomed Mater Res B Appl Biomater. 91(B):470-480, 2009.
3. Prog Mater Sci. 58:261-326, 2013.
4. Biomacromolecules. 12:3715-27, 20