

Caracterización Nanomecánica del Agrecano en Cartílago Mediante AFM: Análisis de Energía de Adhesión y Diagnóstico de Daño Cartilaginoso

Alonso Arriola Félix¹

¹ Tecnológico de Monterrey, Departamento de Ciencias.

27 de mayo de 2024

Resumen

En este reporte se analizan las fuerza de acercamiento y retracción entre dos muestras de agrecano obtenidas a partir de un análisis de fuerzas con AFM. Los resultados revelaron patrones distintos en las curvas de fuerza y una energía de adhesión por par de moléculas de $0.299aJ$ que sugiere interacciones a nivel molecular atractivas. Estos hallazgos son relevantes para el diagnóstico de problemas cartilaginosos, ya que proporcionan información sobre la nanomecánica del agrecano en el cartílago.

Palabras Clave: *AFM, cartílago, agrecano*

1. Introducción

La osteoartritis es un trastorno degenerativo del cartílago en donde la edad y el sobrepeso juegan un papel de riesgo. Entre el 15 – 85 % de la población de la tercera edad sufre problemas en las articulaciones, por lo que, es importante hacer énfasis en el papel que tiene el cartílago y su funcionamiento a nivel molecular.[1]

El cartílago tiene como función proporcionar movimiento prácticamente libre de fricción, soportando y distribuyendo las cargas que se transmiten entre las superficies; esta compuesto por células llamadas *chondrocytes*, las cuales producen la matriz extracelular (MEC). El cartílago carece de vasos sanguíneos, nervios y vasos linfáticos, lo que limita su capacidad de regeneración. Por lo tanto, las propiedades mecánicas y la integridad de su matriz extracelular son esenciales para su funcionamiento adecuado. Las *chondrocytes* sintetizan colágeno, proteoglicanos y otras moléculas esenciales para la estructura y función del cartílago. Dentro de los proteoglicanos se encuentra el agrecano, compuesto fundamental en el funcionamiento del cartílago y el principal estudio de este reporte.[2]

Con el fin de analizar el comportamiento del agrecano se obtuvo un conjunto de datos por medio de AFM en donde se registró la fuerza de acercamiento y de retracción de una muestra de agrecano con una punta del voladizo de esta misma molécula simulando la interacción que existe dentro de un organismo.

El fin de este reporte es realizar un análisis e interpretación de los datos obtenidos y buscar una relación entre los métodos utilizados en el ámbito de la medicina.

2. Metodología experimental y teórica

Por medio de un análisis AFM se obtuvo el conjunto de datos el cual se graficó en la figura 1, donde la curva azul muestra el comportamiento de la fuerza que sintió el voladizo al acercarse a la muestra en primera instancia y la naranja cuando el voladizo se estaba alejando de la muestra.

Se sabe que por las interacciones que existen a nivel molecular debido a distintas fuerzas como de Van der Waals, electrostáticas o de adhesión la fuerza que el voladizo presenciara será diferente cuando se acerca a la muestra a cuando se aleja, algo que primeramente es contra intuitivo si se sabe que se esta tomando la misma trayectoria. La relación y la diferencia entre ambos fenómenos será explorado más adelante.

Con el fin de medir la energía de adhesión que tendrá el voladizo al estar alejándose de la muestra (retracción) se utiliza la ecuación 1

$$U_{adh} = \int_0^L |F_{retracción}| dD \quad (1)$$

donde integramos sobre la curva de la fuerza de atracción con un diferencial de distancia.

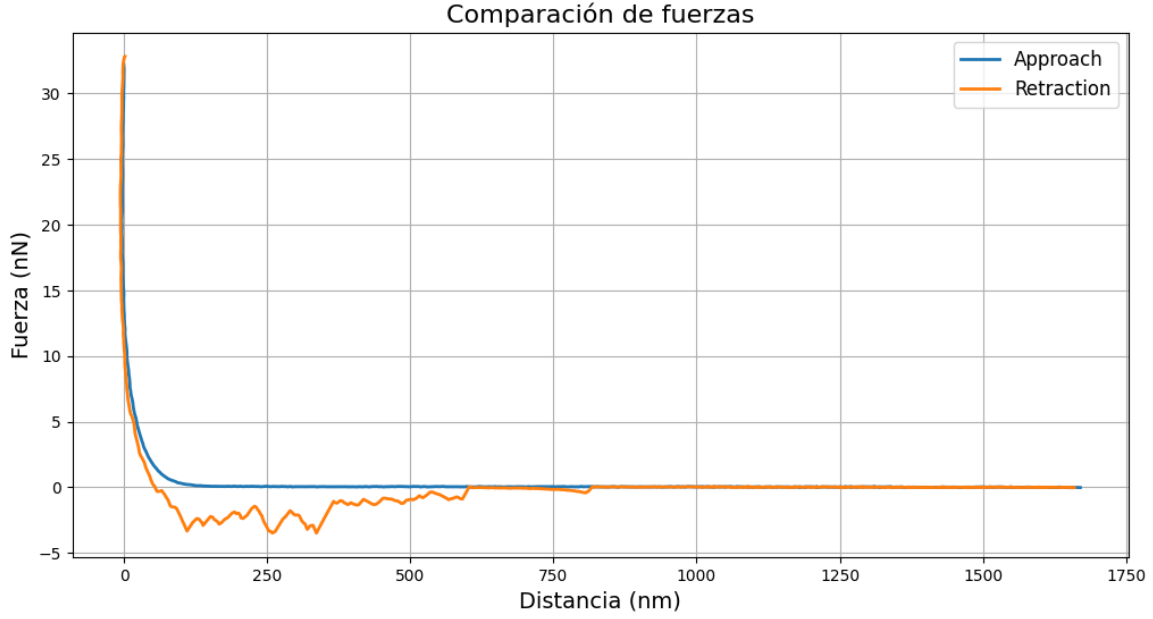


Figura 1: Comportamiento de la fuerza de acercamiento (azul) y retracción (naranja) a lo largo de una distancia manométrica.

El voladizo del AFM, al interactuar con la muestra comprimirá un cierto número de moléculas, ecuación 2, que posteriormente nos será útil conocer para determinar la energía promedio de adhesión por par de partículas de agregano, ecuación 3.

$$N = \frac{A^s}{\rho} = \frac{\pi r_{tip}^2}{\rho} = \frac{\pi (L \tan(\theta))^2}{\rho} \quad (2)$$

$$U_{par} = \frac{U_{adh}}{N} \quad (3)$$

En la figura 2 se muestra un diagrama donde se representa este escenario. La punta del cantilever se encuentra en forma triangular con una punta que esta comprimiendo una muestra (polímero) con cierto espesor L que alcanza una indentación máxima a una cierta distancia. Este planteamiento nos servirá para determinar el número de moléculas que se encuentran por debajo del voladizo.

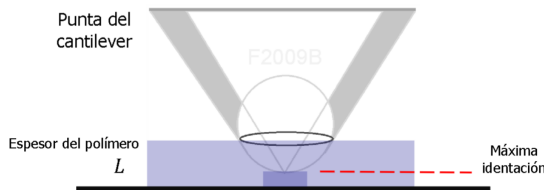


Figura 2: Diagrama de problema de cantidad de moléculas.

3. Discusión y resultados

Como se mencionó con anterioridad la fuerza que el voladizo experimentará será distinta en ambos recorridos (figura 1) debido a la existencia de una

fuerza de adhesión al retraer la punta del cantilever. Integrando numéricamente con el método de trapezio utilizando la ecuación 1 se obtuvo una energía de adhesión de $U_{adh} = 0.885 fJ$ (femto Joules). Esto significa que las moléculas tienen una fuerte interacción atractiva, y se necesita energía externa para separar la muestra de agregano de la punta del voladizo con la misma molécula, indicando que, en efecto, el recorrido de retracción tendrá un comportamiento diferente. Esta energía se puede visualizar en la figura 3.

En cuanto al número de moléculas que se encuentran debajo del cantilever se utiliza la ecuación 2 con valores de $\theta = 0.006\pi$ rad, $L = 410 nm$ y $\rho = \frac{625 nm^2}{mol}$, donde resultó que habían aproximadamente 2958.50 moléculas por debajo de la punta del cantilever.

Una vez conociendo la cantidad de moléculas N se puede obtener la energía de adhesión promedio por par de moléculas haciendo uso de la ecuación 3 utilizando los valores obtenidos de U_{adh} y N , obteniendo así una energía de adhesión promedio $U_{par} = 0.299 aJ$ (atto Joules). Es decir, la energía de adhesión durante la interacción por cada par de moléculas de agregano es de dicha cantidad.

De esta manera podemos interpretar la diferencia de las curvas en la figura 2 donde la curva azul representa la fuerza que siente la punta del voladizo conforme se está acercando. A una distancia grande la curva no siente ninguna interacción, por lo que, no existe deformación en la gráfica, este comportamiento se repite hasta que se acerca lo suficiente al 0 (donde se encuentra la muestra) y la curva se dispara. Este punto es donde el voladizo ya interactuó

con la muestra y ya hay fuerzas de Van der Waals o fuerzas electrostáticas. Después de alcanzar el punto máximo de fuerza el cantilever toma el camino de regreso (curva naranja). En esta trayectoria la curva de fuerza de retracción difiere de la de aproximación debido a la fuerza de adhesión que existe entre el voladizo y la muestra generando histéresis. [3]

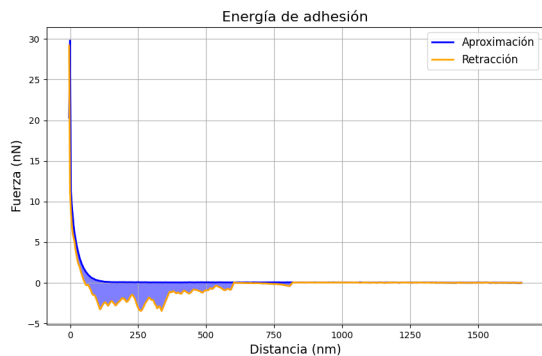


Figura 3: Energía de adhesión $U_{adh} = 0.885 fJ$ (área azul entre las curvas).

A nivel molecular el agrecano reaccionará de cierta forma con los compuestos presentes que podrían contribuir a la adhesión consigo mismo. Esta fuerza de adhesión se presenta debido a la presencia de iones de Ca^{+2} que generan puentes iónicos que contribuyen a la adhesión del agrecano, de igual manera, esta adhesión es ocasionada por la ruptura secuencial de enlaces individuales entre las moléculas de agrecano. [4]

Actualmente para detectar daño en el cartílago se utiliza resonancia magnética; que proporciona imágenes detalladas del tejido blando permitiendo llevar un seguimiento del desarrollo del cartílago, la artroscopia; que permite la visualización directa del interior de una articulación mediante un artroscopio, facilitando la evaluación y reparación del cartílago dañado, de igual manera se utiliza en algunos casos radiografías o microscopías, como el estudiado en este reporte. [5].

Referencias

- [1] Keith Sinusas. «Osteoarthritis: Diagnosis and Treatment». En: *American Family Physician* 85.1 (2012), págs. 49-56.
- [2] Kiani Chris et al. «Structure and function of aggrecan». En: *Cell Research* 12 (2002), págs. 19-32.
- [3] Butt Hans-Jurgen, Capella Brunero y Micheal Kappl. «Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications». En: *Surface Science Reports* 59 (2005), págs. 1-152.
- [4] Han Lin y Cristine Ortiz. «Nanomechanics of the Cartilage Extracellular Matrix». En: *Annual Review of Materials Research* 41 (2011), págs. 133-168.
- [5] Novakofski Kira, Pownder Sarah y Koff Mathew. «High-Resolution Methods for Diagnosing Cartilage Damage In Vivo». En: *Cartilage* 7 (2016), págs. 7-115.

Con el fin de evaluar la rentabilidad del AFM para el estudio del cartílago se analizarán las pros y las contras del método en comparación con los implementados comúnmente. Entre los pros, se encuentra la precisión a nivel molecular, permitiendo el estudio minucioso de las propiedades mecánicas y adhesivas del cartílago. Además, ofrece información detallada sobre las interacciones moleculares, lo cual es esencial para comprender la degradación cartilaginosa en enfermedades como la osteoartritis. Sin embargo, este método experimental también presenta algunas limitaciones. En primer lugar, su complejidad y costos son significativos, ya que la implementación de técnicas como el AFM requiere equipos especializados y personal altamente capacitado. Además, aunque proporciona información detallada a nivel molecular, su aplicabilidad directa en entornos clínicos es limitada en comparación con métodos de imagen más tradicionales y ampliamente disponibles, como la resonancia magnética.

4. Conclusiones

En este informe se examinó la caracterización nanomecánica del agrecano en el cartílago mediante AFM, con un enfoque en el análisis de energía de adhesión y su relación con el diagnóstico de daño cartilaginoso.

Se resaltó la importancia del agrecano en el cartílago y cómo el AFM proporciona datos sobre las fuerzas de acercamiento y retracción entre el agrecano y la punta del voladizo. Se demostró que la energía de adhesión entre ellos fue significativa, causando diferencias en las curvas de fuerza.

Los cálculos revelaron una energía de adhesión promedio por par de moléculas de agrecano, lo que profundizó la comprensión de las interacciones moleculares. Se concluyó que las diferencias en las curvas de fuerza se deben a fuerzas de adhesión, posiblemente relacionadas con la interacción de iones Ca^{+2} y la ruptura de enlaces entre las moléculas de agrecano.