

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

**OBTENCIÓN DE ESPONJAS DE COLÁGENO A  
PARTIR DE HUESO BOVINO**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE  
MATERIALES**

**P R E S E N T A:**

**I. Q. ARIANA LABASTIDA POLITO**

TUTORA: DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA



**MÉXICO, D.F.**

**2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a mi familia, en especial a Martha y Gustavo.

A mí querido y adorado Manuel

A la familia Islas Martínez, por brindarme su amistad.

A la doctora Ma. Cristina Piña Barba por su guía, por las enseñanzas impartidas y por su amistad. Gracias por enseñarme a luchar contra las adversidades.

Claudia Pérez por ser la primera en ofrecerme su amistad en el comienzo de esta aventura que es el conocimiento. A la Dra Gretchen Lapidus, Inés, Francis, Rosa Iris, Iris Natzielly, Erik y Carlos, por todo su apoyo y su amistad. A Grecia, Elva, Mery y Carmen, ya que aunque pasen los años y nos encontremos a distancia, siempre están presentes para apoyarme.

A Adriana, Carolina, Karla y Marina del laboratorio de Biomateriales, por ofrecerme su amistad y apoyo. A Silvia, por tu amistad desde el comienzo de este trayecto en común.

A Greciela, Nelson, Wendi, Yazmín, Baldemar, Ulises, Rosario Santibáñez, Dr. Jaime Santoyo, Sra. Sharita y Gris.

A M. en C. Mirza G. Valdovinos, al Dr. Salvador R. Tello Solís y a M. en C. Eduardo Villareal, por su apoyo brindado en este trabajo.

A Leticia Baños López, José Guzmán Mendoza, Carlos Flores Morales, Esteban Fragoso, Raúl Reyes Ortiz y Miguel Ángel Canseco Martínez, por el apoyo técnico brindado en este trabajo.

Al Dr. Abel Moreno Cárcamo, Dr. Heriberto Pfeiffer Perea, Dr. Lauro Bucio Galindo y Dr. Mario Enrique Rodríguez García, por sus sugerencias y discusiones que enriquecieron este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por las facilidades y los apoyos en el estudio del posgrado.

**"La verdad os hará libres."**



**"This is not the end. It is no even the beginning of the end. But it is, perhaps, the end of the beginning."**

Sir Winston Churchill, 1942

# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
OBJETIVOS	i
1.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS	1
1.1.1 ANDAMIOS PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS	3
1.1.2 FACTORES DE CRECIMIENTO PARA REPARACIÓN ÓSEA	6
1.2 HUESO	7
1.2.1 COLÁGENO	12
1.2.2 PROTEOGLUCANO	21
1.2.3 LIPIDOS	23
1.2.4 PROTEÍNAS MORFOGENETICAS OSEAS	25
1.3 CARACTERIZACIÓN	26
1.3.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS X	26
1.3.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS TÉRMICOS	29
1.3.2.1 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO	29
1.3.2.2 CALORIMETRIA DE BARRIDO DIFERENCIAL	31
1.3.3 MICROSCOPIA	33
1.3.3.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	33
1.3.3.2 MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA	36
1.3.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR MÉTODO DE LOWRY	38
1.3.5 SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	41
<b>2. MATERIALES Y MÉTODO</b>	<b>44</b>
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>48</b>
3.1 PRESENTACIONES DE LOS IMPLANTES	48
3.2 DIFRACCIÓN DE RAYOS X	49
3.3 ANÁLISIS TÉRMICOS	50
3.3.1 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO	50
3.3.2 CALORIMETRIA DE BARRIDO DIFERENCIAL	52
3.4 MICROSCOPIA	54
3.4.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	54
3.4.2 MICROSCOPIA DE FUERZA ATOMICA	61
3.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE LOWRY	65
3.6 ELECTROFORESIS EN GEL	66
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>67</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>69</b>
<b>6. REFERENCIAS</b>	<b>70</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS

Ingeniería de Tejidos es una ciencia interdisciplinaria de bioquímica, biología celular y molecular, genética, ciencia de los materiales, ingeniería biomédica y medicina para producir compuestos tridimensionales que tienen propiedades estructurales y funcionales que pueden ser utilizados para reemplazar, corregir o mejorar componentes de pobre funcionalidad en el cuerpo humano [1].



**Figura 1.** Aplicaciones de ingeniería de tejidos.

Generación de tejido por transplante de células o tejido autólogo, es una de las técnicas más prometedoras en cirugía ortopédica e ingeniería biomédica. Estas técnicas tienen la ventaja de eliminar problemas como escasez de donador, rechazo inmunológico y transferencia patógena. Las células son obtenidas del paciente, para después ser expandidas y sembradas sobre un soporte biocompatible para que las células proliferen hasta que el nuevo tejido sea formado [2].

Existen muchos materiales para soporte como son los metálicos, cerámicos y polímeros. Sin embargo la condición de biodegradabilidad excluye a los materiales metálicos y parte de los cerámicos. Los materiales cerámicos a base de fosfato tricálcico y corales marinos han tenido resultados aceptables, pero las condiciones de procesamiento son complejas y difíciles. Sin embargo existen polímeros que pueden procesarse y moldearse con relativa facilidad, con excelente biocompatibilidad y buen resultado en aplicaciones biomédicas [3].

Los materiales poliméricos naturales ofrecen la ventaja de ser similares a las sustancias macromoleculares que el medio biológico es capaz de reconocer y metabolizar. La velocidad de degradación del material implantado puede controlarse mediante modificaciones químicas o entrecruzamiento, permitiendo el diseño de implantes con determinado grado de duración [4].

Dispositivos basados en colágena han tenido gran impacto en el campo de reparación de tejido. En los últimos diez años, muchos dispositivos han sido aprobados, y unos pocos han tenido un éxito comercial [5], ver tabla 1.

**Tabla 1.** Aplicaciones de dispositivos médicos comerciales basados en colágeno.

ESPECIALIDAD MÉDICA	APLICACIÓN
Cirugía General	Hemostasis
Dermatología	Aumento de tejido suave
Odontología	Heridas orales Unión de ligamento periodontal
Oftalmología	Escudos de córnea
Cardiovascular	Catéter antiinfeccioso Reparación arterial
Cirugía Plástica y Reconstructiva	Revestimiento de heridas Piel artificial
Ortopedia	Reparación ósea
Urología	Agentes de incontinencia
Liberación de Fármacos	Factores de crecimiento Terapia contra cáncer

### 1.1.2 ANDAMIOS PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS

La generación de hueso y cartílago por transplante de células o tejido autólogo es una de las técnicas más prometedoras en cirugía ortopédica e ingeniería de tejidos. Esta técnica elimina problemas como escasez de sitio donador, rechazo inmune y transferencia de agentes patógenos. Osteoblastos, condrocitos y células mesenquimales obtenidas de tejidos del paciente pueden ser expandidas en un cultivo y sembradas sobre un andamio (scaffold) que puede ser degradado lentamente y resorbido por el cuerpo. El andamio o estructura tridimensional provee el soporte necesario para que las células proliferen y mantengan su función, además esta arquitectura define la forma del hueso o del cartilago formado.

Un andamio biológicamente activo es un material altamente poroso basado en una matriz extracelular que induce la regeneración de tejido y órganos. Su actividad ha consistido en la inducción de procesos sintéticos, típico en sitios anatómicos donde una masa de un tejido u órgano ha sido removido debido a un trauma o intervención quirúrgica.

Andamios basados en matrices extracelulares, ver figura 2, son caracterizados por poseer un porcentaje de volumen de poro típico de 0.90 a 0.95 y de un diámetro de poro promedio en el rango de 5 a 500  $\mu\text{m}$ . Su composición química usualmente consisten de colágeno tipo I y tipo II principalmente [6].

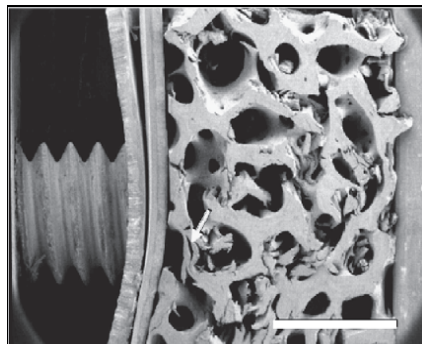
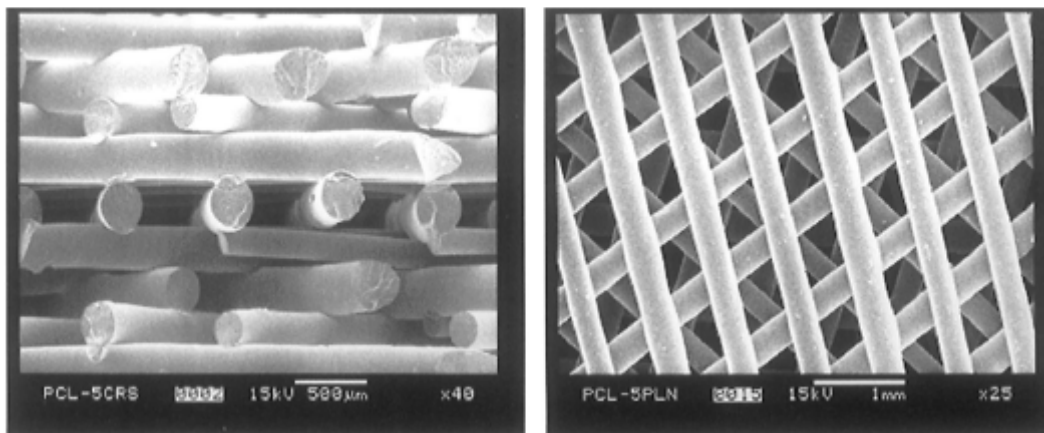


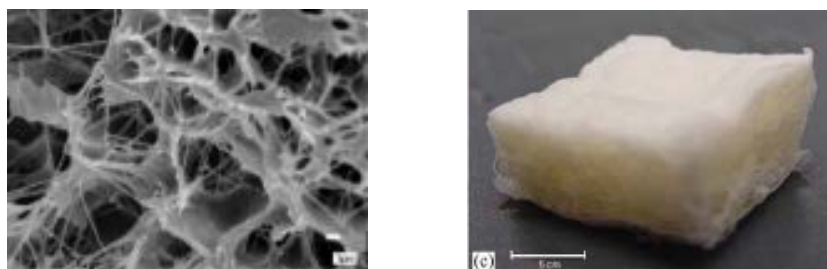
Figura 2. Porosidad característica de hueso [7].

Son muy importantes las características microestructurales de los sustitutos óseos ya que estas emulan la función del hueso garantizando así la unión con el tejido nativo. La naturaleza del enlace depende del tamaño de poro del material sustituto. Se ha demostrado que la respuesta del hueso en implantes porosos depende del tamaño de poro. Se ha observado crecimiento de hueso cuando el implante tiene poros mayores a  $40\ \mu\text{m}$ , sin considerar si el implante es cerámico o metálico [8]. Sistemas Haversianos se desarrollan en tamaños de poros  $>75\ \mu\text{m}$  [8]. Ver figura 3 y 4.



**Figura 3.** Porosidades de materiales poliméricos sintéticos [9].

Muchos materiales para andamio han sido investigados para ingeniería de tejidos óseos incluyendo hidroxapatita (HA), poli( $\alpha$ -hidroxiésteres) y polímeros naturales como colágena y quitina [8].

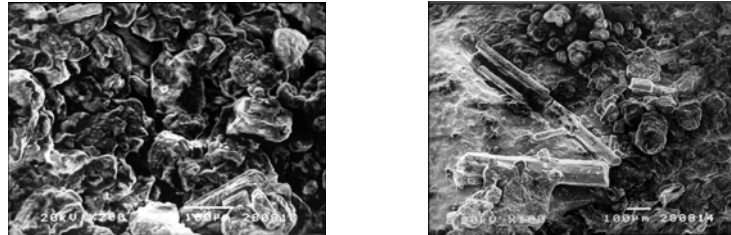


**Figura 4.** Andamios hechos por polímeros naturales.

Se ha demostrado que los andamios a base de colágeno muestran características osteoinductivas, además, aloinjertos y xenoinjertos basados en colágeno han sido usados clínicamente como biomateriales para numerosas aplicaciones biomédicas [10].

La experiencia con dispositivos basados en colágeno en la reparación ósea han demostrado que la respuesta inmune a componentes colágenos no causa secuelas clínicas adversas. Muchos estudios de literatura dental han mostrado que el colágeno provee un andamio para el crecimiento de hueso [10].

El tejido óseo es el resultado de un depósito de minerales de fosfato de calcio sobre una matriz orgánica de colágeno. Esta matriz provee un andamio para el depósito ordenado de cristales de hidroxiapatita en su fase mineral [10] y es esto lo que buscamos en este trabajo.



**Figura 5.** Remineralización de matriz orgánica después de 3 y 5 días [10].

La solubilización ácida de la fase mineral al desmineralizar el hueso puede alterar la matriz orgánica a través de hidrólisis, debilitándola. Sin embargo al desmineralizar el hueso con ácido clorhídrico se conserva la capacidad osteoinductiva in vivo, ya que preserva proteínas no colágenas que participan como nucleadores de cristales en tejido biológico [10]. Además las proteínas asociadas a la matriz sirven como reguladores del tamaño y la forma de estos cristales [11]. Ver figura 5.

### **1.1.2 FACTORES DE CRECIMIENTO PARA REPARACIÓN ÓSEA**

El tejido óseo tiene la capacidad de autoreconstrucción, la reparación ósea consiste en una serie de eventos biológicos complejos regulados por células específicas, la matriz extracelular y distintos factores de crecimiento. Las familias de factores de crecimiento más importantes para la reparación ósea son las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factor  $\beta$  de crecimiento de transformación (TGF- $\beta$ ), factores de crecimiento parecido a insulina ((IGF), factor de crecimiento de fibroblasto (FGF), factor de crecimiento paquetario (PDGF) y factor de crecimiento vascular endotelial [12].

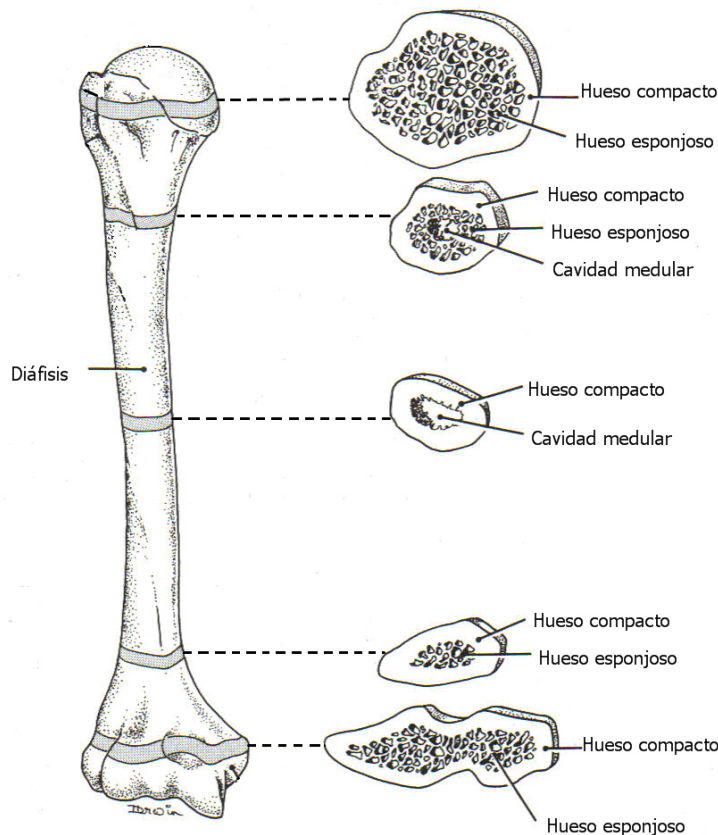
Los factores de crecimiento y proteínas de unión son liberados de depósitos fisiológicos de la matriz ósea y actúan como reguladores locales de función celular.



## 1.2 HUESO

El hueso es un tejido conjuntivo especializado, forma la mayor parte del sistema óseo y es el principal soporte del cuerpo y se compone de 205 huesos.

Existen dos tipos de hueso, el hueso esponjoso y el hueso compacto (denso), estos dependen de la cantidad relativa de materia sólida y del número tamaño de sus espacios. Todos los huesos tienen una envoltura externa de hueso compacto que rodea a la masa central de hueso esponjoso, excepto en lugares donde este último esté sustituido por la médula o cavidad medular o por un espacio aéreo, ver figura 6.



**Figura 6.** Secciones transversales del húmero o hueso del brazo. Observe que el cuerpo (diáfisis) es un tubo de hueso compacto. En vida, la médula o cavidad medular contiene médula amarilla o roja o una combinación de ambas [13].

Los huesos se clasifican como axiales (cráneo, vértebras, costillas y esternón) o apendiculares (miembros). Así mismo se clasifican por según su morfología.

1. Huesos largos tienen una forma tubular y poseen una diáfisis y dos extremos, que pueden ser cóncavos o convexos. En general, la diáfisis es hueca. La longitud de los huesos largos es mayor que su anchura, aunque algunos de ellos son cortos. Los extremos de los huesos largos se ensanchan para articularse y así unirse con otros huesos.
2. Huesos cortos tienen forma cuboidal y solo se encuentran en el pie y en la muñeca.
3. Huesos planos o escamosos suelen ejercer funciones protectoras o de refuerzo. Constan de dos láminas de hueso compacto de entre las que se interpone hueso esponjoso y médula. La mayoría de los huesos planos forman las paredes de las cavidades, por eso, algunos se curvan suavemente, como las costillas.

El tejido óseo es uno de los más resistentes y rígidos del cuerpo humano. Es el constituyente principal del esqueleto, sirve de soporte a las partes blandas y protege órganos vitales (cráneo, tórax y columna vertebral). Proporciona apoyo a los músculos. Además es el depósito de calcio, fosfato y otros iones, almacenados y liberados para mantener constante su concentración en líquidos orgánicos.

La estructura del hueso varía según su función. Los huesos largos están destinados a aportar rigidez, soportar el peso del cuerpo; la cantidad de hueso compacto es relativamente mayor en la proximidad del tercio medio, por donde son más vulnerables a la fractura. Los huesos largos muestran elevaciones (líneas, rodetes, crestas, tubérculos y tuberosidades) que sirven de refuerzo para la inserción de potentes músculos y ligamentos. Los huesos vivos poseen cierta elasticidad (flexibilidad) y una gran rigidez (dureza).

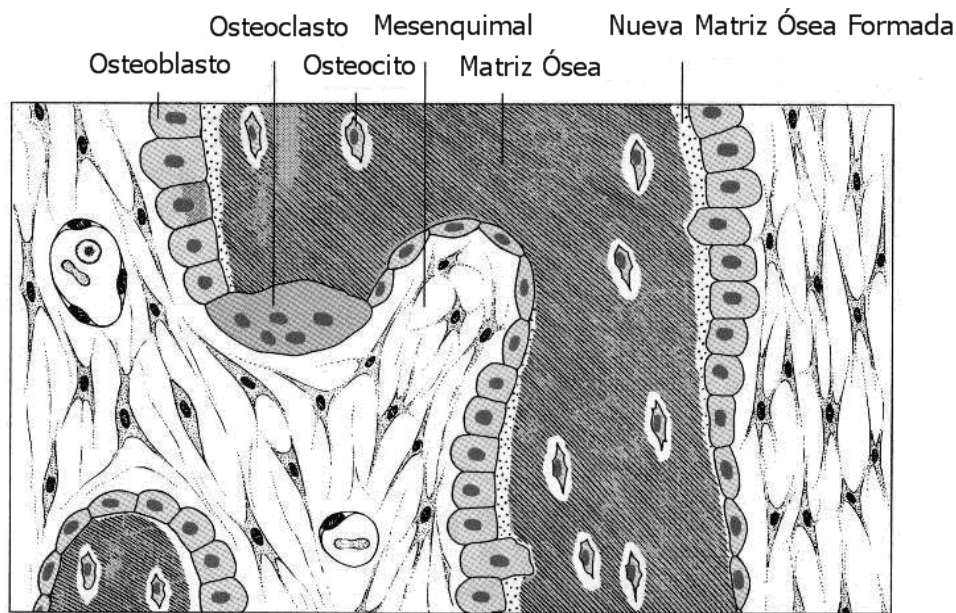
Las cinco funciones principales del hueso consisten en:

1. Protección de estructuras vitales creando paredes rígidas de cavidades que contienen órganos vitales (por ejemplo costillas de la pared torácica protegen el corazón y los pulmones).
2. Soporte del cuerpo, por ejemplo la columna vertebral forma el soporte fundamental del tronco.
3. Base mecánica del movimiento permitiendo la inserción de músculos y la posibilidad de movimiento de apalancamiento de otros huesos (por ejemplo las apófisis transversales y espinosas de las vértebras).
4. Células de la sangre, en la médula ósea roja es donde se forman los glóbulos rojos de la sangre, algunos linfocitos, los glóbulos blancos y las plaquetas de la sangre.
5. Depósito de sales de calcio, fósforo y magnesio de los huesos representan un reservorio mineral del organismo [13].

El tejido óseo es un tejido especializado, está formado por células y una matriz constituida por una parte inorgánica y una orgánica.

Las células presentes más importantes son:

- a) Osteoclastos: Su función es reabsorber el tejido óseo, remodelando así los huesos a través de secreción de enzimas que atacan la matriz ósea.
- b) Osteoblastos: Producen la parte orgánica de la matriz, tienen la capacidad de generar cristales de hidroxapatita, participando en la mineralización de la matriz [14]. A medida que esto ocurre, los osteoblastos se quedan atrapados en la matriz ósea y se diferencian en osteocitos [15].
- c) Osteocitos: Son esenciales para el mantenimiento de la matriz ósea, se encuentran en su interior, ocupando lagunas de las que parten conductos que interconectan a osteocitos adyacentes. Con estas uniones intercelulares fluyen iones y hormonas. Su muerte está asociada a la reabsorción de la matriz ósea [16], ver figura 7.



**Figura 7.** Ilustración esquemática de las principales células presentes en hueso membranoso [15].

El periostio es un tejido que cubre la superficie externa del hueso, tiene células que se transforman fácilmente en osteoblastos y además está interconectado por vasos sanguíneos que penetran hasta la matriz ósea; mientras que el endostio cubre la superficie interna, está formado por una capa de células generadoras de hueso. Estos recubrimientos son esenciales para el mantenimiento del tejido [14].

La matriz ósea se divide a su vez en:

1. Inorgánica: Representa el 50% del peso de la matriz ósea. Los iones más abundantes son el fosfato y el calcio, existiendo en menor abundancia bicarbonato, magnesio, potasio, sodio, fluoruro y citrato. Los iones de calcio y fosfato son empleados por el organismo para formar cristales de hidroxapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Estos cristales se disponen a lo largo de las fibrillas de colágeno.

2. Orgánica: Está conformada del 90 al 95% del colágeno fibrilar tipo I y del 10 al 5% por colágeno tipo V y proteínas no colágenas [15], ver tabla 2.

**Tabla 2.** Principales proteínas encontradas en el hueso [13].

Proteínas		Comentarios
Colágenas	Colágeno tipo I	Aproximadamente el 90% proteína total del hueso.
	Colágeno tipo V	Componente menor.
No Colágenas	Proteínas Plasmáticas	Mezcla de varias proteínas plasmáticas.
	Proteoglicanos CS-PG I (biglicano)	Contiene dos cadenas GAG, encontrada en otros tejidos.
	CS-PG II (decorina)	Contiene una cadena GAG, encontrada en otros tejidos.
	CS-PG III	Hueso específico.
	Proteína Ósea SPARC (Osteonectina)	No hueso específico.
	Osteocalcina (Proteína Ósea Gla)	Contiene $\gamma$ -Carboxiglutamato residuo que se encuentran asociado a hidroxipatita. Hueso específico.
	Osteopontina	No hueso específico. Glucosilado y Fosforilado.
	Sialoproteína Ósea	Hueso específico. Altamente glucosilado y sulfatado en tirosina.
Proteínas Óseas Morfogenéticas	Una familia (ocho o más) de proteínas secretadas con una variedad de acciones en hueso. Algunas inducen el crecimiento óseo ectópico.	

CS-PG = Sulfato de Condroitina- Proteoglicano  
 SPARC= Proteína Acidica Secretada Rica en Cisterna

### 1.2.1 COLÁGENO

El colágeno es la proteína más abundante del cuerpo humano, se encuentra en todo el organismo y constituye una tercera parte de la masa proteica [17]. Los tipos y organizaciones dependen de la función estructural que desempeña en un órgano o tejido en particular [18]. El colágeno forma parte de una matriz extracelular, se encuentra fuera de las células entre el epitelio y el endotelio [17].

#### TIPOS DE COLÁGENO

El colágeno es una gran familia de constituida por 20 tipos de proteínas, ver tabla 3.

Los tipos I, II y III son las colágenas fibrilares o formadores de fibrillas y tienen la estructura de barra. Al ser observado al microscopio electrónico de transmisión estos polímeros de fibrillas lineales tienen patrones de bandas característicos que reflejan el empacamiento escalonado regular de las moléculas individuales de colágena.

El tipo IV forma una redcilla tridimensional más que fibrillas definidas [18].

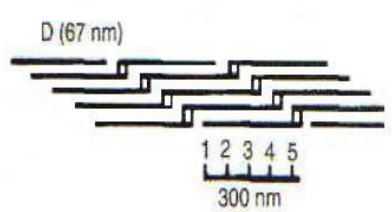
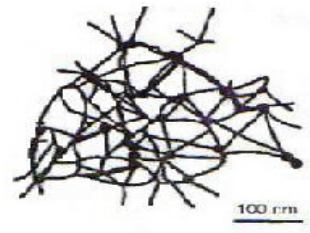
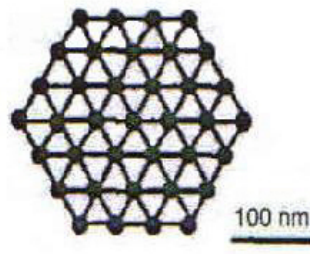

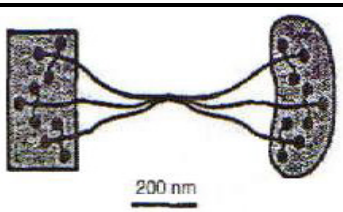
Los tipos VIII y X son formadoras de redes hexagonales [17].

Los Tipo VI forman filamentos que se conforman en una red en la interfase de células y colágeno tipo I [17].

Los tipos de colágeno se asocian a fibrillas: Estos se fijan a la superficie de las fibrillas de colágena y las unen entre sí, así con otros componentes de la matriz extracelular [18].

Existen otros tipos de colágeno que se desconoce su función [17], solo se han determinado a nivel de cDNA. Los productos de traducción, contendrían tres dominios helicoidales.

**Tabla 3.** Tipos más abundantes de colágeno.

TIPO	DISTRIBUCIÓN TISULAR	Forma
FORMADORES DE FIBRILLAS		
I	Piel, hueso, tendón, vasos sanguíneos, cornea	 <p>D (67 nm)</p> <p>1 2 3 4 5</p> <p>300 nm</p>
II	Cartílago, disco intervertebral, cuerpo vítreo	
III	Vasos sanguíneos, piel fetal	
V	Acompaña a tipo I	
XI	Acompaña a tipo II	
FORMADORES DE REDES		
IV	Membrana basal	 <p>100 nm</p>
CADENA		
VIII	Por debajo del epitelio escamoso estratificado	 <p>100 nm</p>
X	Cartílago hipertrófico	
FORMADORA DE FILAMENTOS		
VI	Interactúan con fibrillas y células	 <p>100 nm</p>
DE ANCLAJE		
VII	Membranas de Descemet	 <p>200 nm</p>

Continuación de tabla 3

ASOCIADOS A FIBRILLAS		
X	Cartilago	
XII	Tendón, ligamento, otros tejidos	
XIV	Piel fetal y tendón	
FUNCIÓN DESCONOCIDA		
XIII	Célula endotelial	

Texto [17] y [18], Ilustraciones [19].

La colágena ósea o tipo I consiste en fibras que se distribuyen formando ángulos entre sí a fin de resistir la fuerza mecánica proveniente de cualquier dirección. El colágeno tipo I es una colágena formadora de fibrillas

#### MOLÉCULA DE COLÁGENO TIPO I

Una molécula de colágeno es similar a una barra o cilindro rígido. Está conformada por tres cadenas polipeptídicas llamadas alfa, estas se enrollan formando una súper hélice con giro a la derecha. Las tres cadenas alfa están unidas entre sí por enlaces o puentes de hidrógeno, ver figura 8.

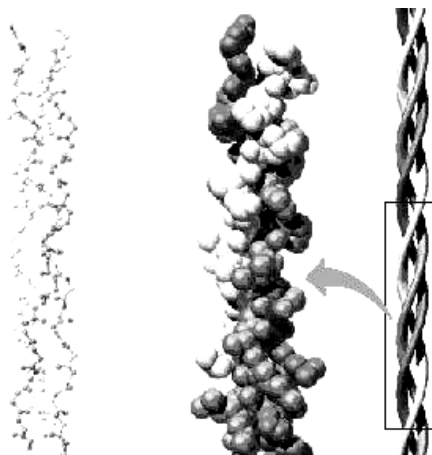


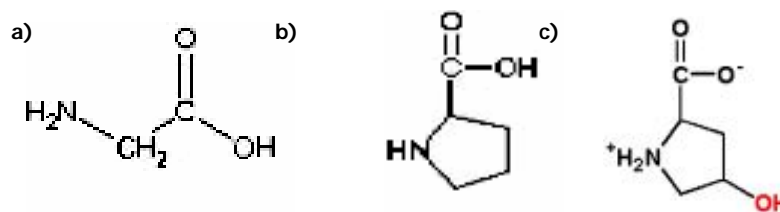
Figura 8. Esquema de molécula de colágeno tipo I.



Las moléculas de colágeno tipo I (también llamada tropocolágeno) están constituidas por tres cadenas helicoidales con giro a la izquierda, dos tipo  $\alpha 1(I)$  y una tipo  $\alpha 2(I)$ . Una cadena  $\alpha$  está formada por tripletes de aminoácidos: glicina, prolina e hidroxiprolina, y también pueden estar presentes hidroxilisina y lisina.

La cadena  $\alpha$  de colágeno tipo I sigue la siguiente secuencia  $(\text{Gly-X})_n$  donde cada tercer aminoácido es glicina, las posiciones X frecuentemente están ocupadas por prolina y las Y por hidroxiprolina, ver figura 9.

El 23% de los aminoácidos en una cadena  $\alpha$  es prolina mientras que del 9 al 23% es hidroxiprolina. Y en proporción del 0.5 al 2% es hidroxilisina, la cual participa en el entrecruzamiento covalente de las moléculas [20].

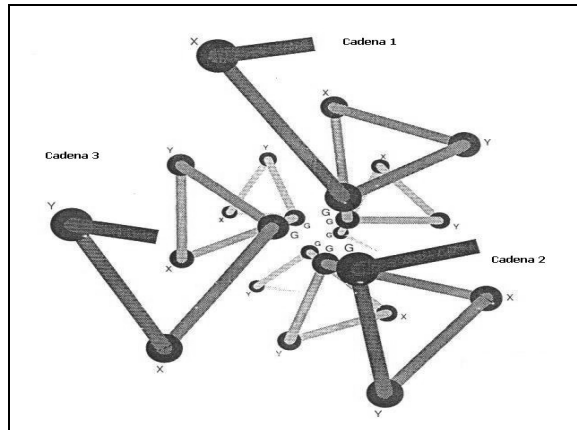


**Figura 9.** Principales proteínas que se encuentran presentes en una molécula de colágeno tipo I a) glicina, b) prolina y c) hidroxiprolina.

## ESTABILIDAD DE LA HÉLICE.

**Glicina:** Es un aminoácido pequeño que se ajusta dentro de los espacios restringidos en los que se unen entre sí las tres cadenas de la estructura espiral [18], ver figura 10.

**Prolina:** Contribuye a la estabilidad y dirección de la hélice, facilitando la formación de la espiral de cada cadena alfa porque su estructura anular produce rizados en la cadena [18].



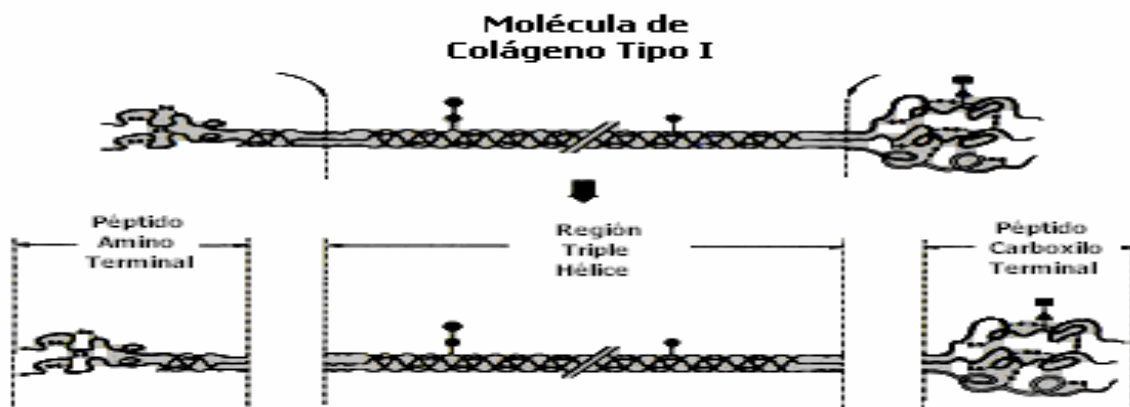
G = Glicina

**Figura 10.** Glicina ocupa el espacio central dentro de la triple hélice de colágeno. [21]

Hidroxi prolina: Contribuye con puentes de hidrógeno entre cadenas [20]. Los anillos de prolina e hidroxiprolina se orientan hacia el exterior, impidiendo la libre rotación de las cadenas.

### CADENAS ALFA

El 95% de las cadenas de aminoácidos tiene una secuencia  $(\text{Gly-X})_n$  y forma hélices.



**Figura 11.** Representación de una cadena alfa.

El 5% restante no tiene secuencia y no es helicoidal; son los extremos finales de la cadena de colágeno (ver figura 11), residuos N- terminales y C- terminales o también llamados telopeptidos [1]. En estas regiones ocurre el entrecruzamiento, ver tabla 4.

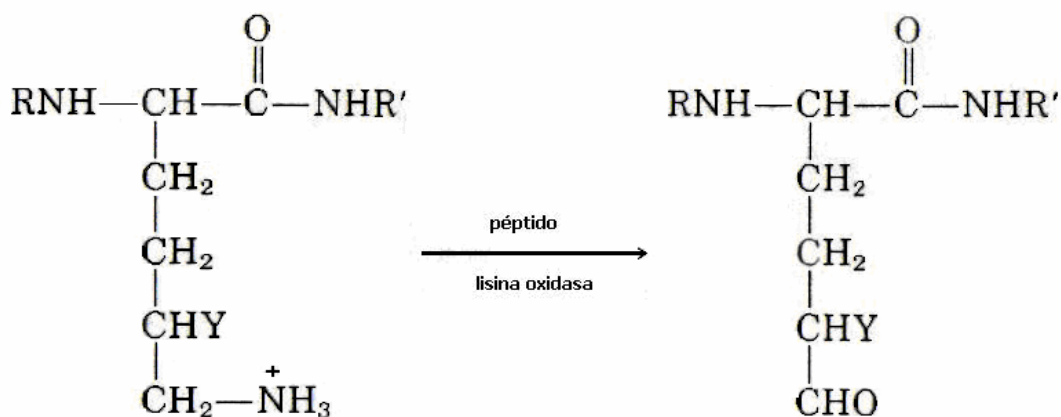
**Tabla 4.** Composición de residuos en una molécula de colágeno [20].

Tipo	N- terminal	C- terminal	Hélice	Total
$\alpha 1(I)$	16	26	1014	1056
$\alpha 2(I)$	9	15	1014	1038

## ENTRECRUZAMIENTO

El tejido de colágeno no puede ser solubilizado sin degradar esto se debe a que las moléculas se encuentran entrecruzadas de forma covalente. Por esta razón la fuerza del tejido de colágeno [20].

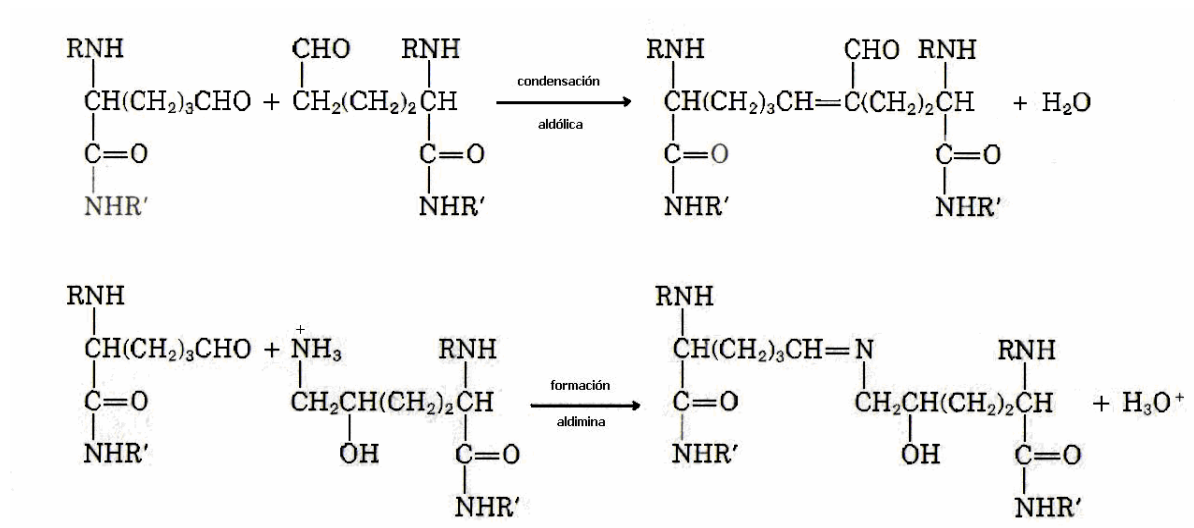
El primer paso para el entrecruzamiento es una conversión enzimática de lisina o hidroxilisina que se encuentra en telopeptido [20]. La reacción 1 produce alisina aldehído o hidroxialisina.



R y R' = cadenas de polipéptidos, Y = H (lisina o allisina) o OH (hidroxilisina y hidroxialisina)

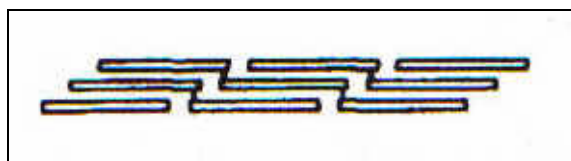
**Reacción 1.** Hidroxilisina. [22]

En la formación de la fibrilla (ver figura 12), moléculas de colágena se asocian cuando los residuos de alisina aldehído y hidroxialisina se condensan espontáneamente (reacción 2) o cuando reaccionan con los grupos amino de residuos de lisinas o hidroxilisinas [20].



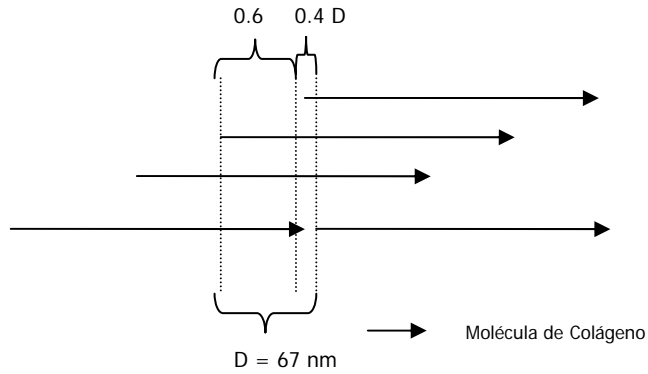
R y R' = cadenas polipeptídicas

**Reacción 2.** Reacciones de entrecruzamiento de fibras.



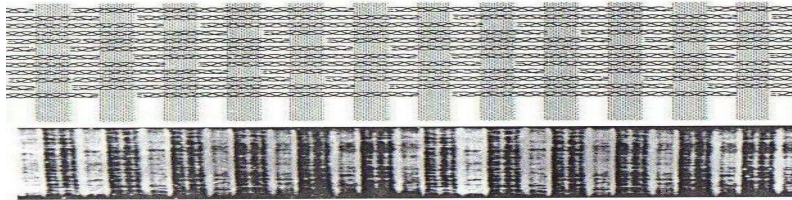
**Figura 12.** Representación de fibrillas de colágeno entrecruzadas.

La molécula de colágeno mide 300 nm de longitud y 1.1 nm de diámetro. A temperatura corporal el colágeno no existe en forma aislada, se asocian con otras moléculas en un arreglo de fibrillas escalonadas. Una molécula de colágeno está unida a otra desfasada por una distancia D (67 nm), así sucesivamente desfasadas hasta por 4 D. La separación entre dos moléculas adyacentes es de 0.4 D en la misma capa, mientras que el traslape de varias moléculas es de 0.6 D. Figura 7.



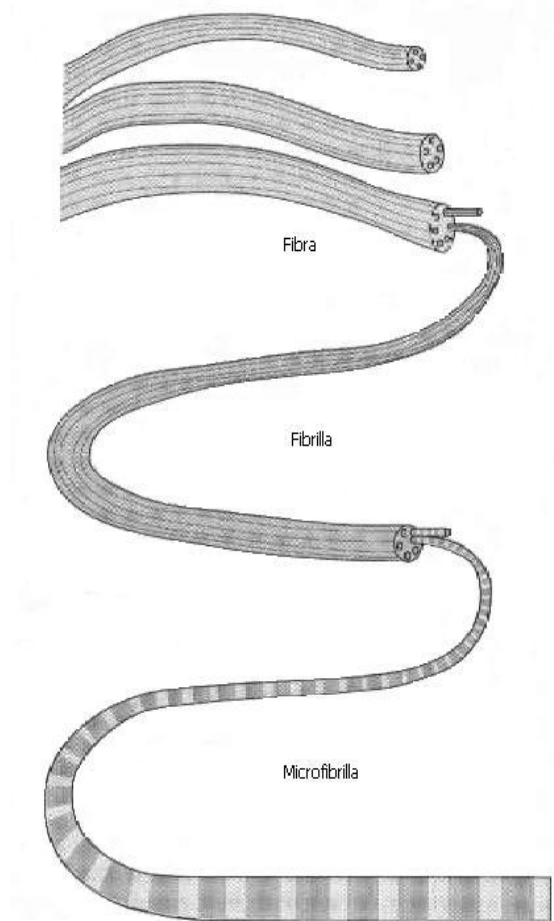
**Figura 13.** Esquema de arreglo entre moléculas de colágeno [17].

En el microscopio electrónico de transmisión estos polímeros de fibrillas lineales tienen patrones de banda característicos de que reflejan el espaciado escalonado regular de las moléculas individuales de colágeno que componen la fibrilla. Ver la figura 14.



**Figura 14.** Patrón de banda característico de colágeno tipo I [21].

Las moléculas de colágeno se asocian en microfibrillas para después ligarse en fibrillas de colágeno. Así mismo las fibrillas se vinculan en fibras de colágeno, ver figura 15.



**Figura 15.** Asociación de moléculas de colágeno [23].

### 1.2.2 PROTEOGLUCANO

Los glucosaminoglucanos (GAG) son grandes complejos de cadena heteropolisacáridas con carga negativa. Están unidas de manera covalente a proteínas, con las que forma monómeros de proteoglicanos.

El monómero de proteoglicano está conformado por una proteína central a la que se enlazan de forma covalente cadenas lineales de GAG o monosacáridos. El monómero puede tener más de 100 cadenas lineales de monosacárido que están separadas por repulsión de carga entre ellas, formando así un escobillón como se muestra en la figura 16.

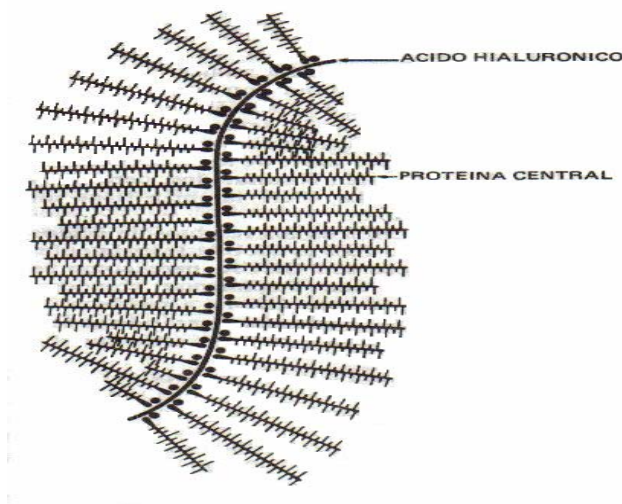


Figura 16. Esquema de monómero de proteoglicano.

Cada monómero de proteoglicano se agrega a un ácido hialurónico por un enlace del tipo iónico [24], ver figura 17.

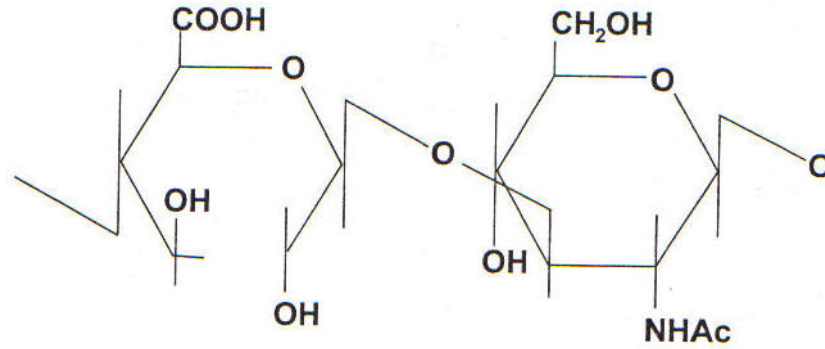


Figura 17. Ácido hialurónico

Las glucoproteínas son proteínas en las que están enlazados oligosacáridos de manera covalente. Difieren de los proteoglicanos (que podrían considerarse glucoproteínas especiales) en que la longitud de la cadena de carbohidratos glucoproteínico es relativamente corta (por lo general de dos a 10 residuos de azúcar pero pueden medir más), en tanto que en los glucosaminoglucanos pueden ser muy largas. A menudo participan como componentes en la matriz extracelular, sirve como lubricante y amortiguador en el tejido conjuntivo [25].



### 1.2.3 LIPIDOS

Los lípidos son compuestos que existen en forma natural en organismos vivos y son importantes en muchos procesos biológicos. Las grasas, aceites, ceras, esteroides, prostaglandinas y vitaminas pertenecen a la familia de los lípidos [26].

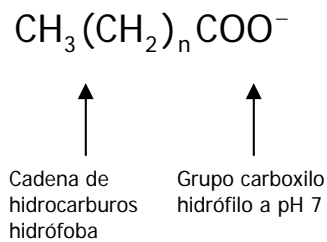
Los lípidos están divididos en dos familias:

1. Lípidos simples: No se hidrolizan fácilmente por ácidos o bases. Se dividen en tres familias importantes esteroides, prostaglandinas y terpenos.
2. Lípidos complejos: Los cuales se pueden hidrolizar fácilmente en constituyentes más simples. Muchos lípidos complejos son ésteres de cadena larga llamados ácidos grasos. Los lípidos complejos a su vez se dividen en glicéridos y ceras. Los glicéridos son ésteres de glicerol. Las ceras son ésteres de cadena larga [27].

#### Glicéridos

Las grasas y los aceites son triglicéridos. La principal diferencia es que una grasa es sólida a temperatura ambiente, mientras que un aceite es líquido en las mismas condiciones. Generalmente las grasas provienen de los animales y los aceites suelen obtenerse a partir de plantas y granos.

Un ácido graso está constituido por una cadena de hidrocarburos hidrófobos con un grupo carboxilo terminal que tiene una  $pK_a$  cerca de 4.8. El grupo carboxilo terminal,  $-COOH$ , se ioniza a pH fisiológico y se convierte en  $-COO^-$ . Este grupo tiene la afinidad por el agua, lo que le confiere al ácido graso su naturaleza anfipática (pues cuenta con una región hidrófila y una hidrófoba), ver la figura 18. Sin embargo, en el caso de ácidos grasos de cadena larga predomina la porción hidrófoba. Estas moléculas son altamente insolubles en agua [28].



**Figura 18.** Estructura de un ácido graso.

Las cadenas de ácidos grasos pueden no contener dobles enlaces (es decir, estar saturadas) o contener uno o más (es decir, ser monoinsaturadas o poliinsaturadas). Cuando la cadena contiene dobles enlaces éstos se encuentran en la configuración cis y no en la configuración trans [29].

Efecto de la polaridad en solubilidad.

Las fuerzas intermoleculares determinan las propiedades de solubilidad de compuestos orgánicos. Sustancias polares se disuelven en solventes polares y sustancias no polares se disuelven en solventes no polares. Un ácido graso se disuelve en solventes orgánicos que no permiten que lípidos se agreguen por interacciones hidrófobas. Se utilizan mezclas extractivas de metanol, cloroformo y agua. Los lípidos permanecen en la parte orgánica y moléculas polares como lípidos y azúcares permanecen en la parte metanol/cloroformo [28].

## 1.2.4 PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS

En 1965, Marshall Urist descubrió la capacidad osteoinductiva de la matriz ósea desmineralizada [30]. No fue sino hasta finales de los ochenta que las proteínas morfogenéticas óseas (BMP por sus siglas en inglés) fueron aisladas y secuenciadas, ver tabla 5

**Tabla 5.** Fenotipos óseos presentes en BMP [31]

GENES	FENOTIPOS	AÑO
<b>BMP3</b>	Incremento de masa ósea	2001
<b>BMP4</b>	Desarrollo de defectos	2004
<b>BMP4/2</b>	Desarrollo de defectos	2004
<b>BMP5</b>	Disminución de masa	1994 / 1995
<b>BMP7</b>	Defectos secundarios	1995
<b>GDF5</b>	Branchypodism/condrodisplacia	1994 / 1995 / 1997
<b>NOGGIN</b>	Osteopenia/osteoporosis	2003
<b>SOSTA</b>	Aumento de masa / Osteopenia	2001 / 2003
<b>BMPR1a</b>	Incremento de masa	2003
<b>BMPR1b</b>	Osteopenia Branchypodism/chondrodysplasia	2000 2002 / 2003 / 2005
<b>SMAD1</b>	Osteopenia	2003
<b>TOB1</b>	Incremento de masa	2000 / 2002
<b>SMURF1</b>	Osteopenia Incremento de masa	2004 2005

## **1.3 CARACTERIZACIÓN**

### **1.3.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS X**

#### **GENERACIÓN DE RAYOS X**

Cuando un átomo se excita por la extracción de un electrón de una capa interna, generalmente regresa a su estado de mínima energía transfiriendo un electrón de una capa externa a la interna, con la consiguiente emisión de energía en forma de rayos X (de 4 a 40 keV). Esto es, de radiación de alta energía y longitudes de onda cortas, del orden de décimos de Å. El ión que se ha formado llega a capturar un electrón alcanzando su estado basal.

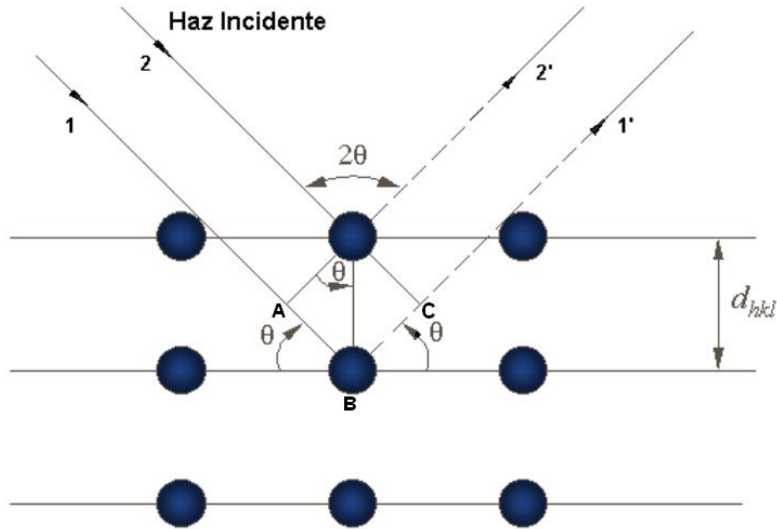
#### **DIFRACCIÓN DE RAYOS X**

El método de difracción de rayos X consiste en hacer incidir un haz de rayos X en un cristal. Un cristal es una disposición regular de átomos. La longitud de onda de un haz de rayos X es menor que la distancia entre los planos de átomos del cristal [32].

Cuando los rayos X se reflejan en un cristal, hay interferencia (constructiva y destructiva) de los haces reflejados cuando las distancias entre los átomos de un cristal son del orden de magnitud de la longitud de onda de la radiación incidente. Para que haya difracción se debe cumplir con la condición de que los haces reflejados interfieran constructivamente.

Si suponemos que 1 y 2 son dos haces que inciden en átomos de diferentes planos en un cristal y que son reflejados especularmente, el ángulo  $\theta$  que forman los haces de incidencia es igual al ángulo de reflexión de los haces 1' y 2'. El recorrido de 2 + 2' es mayor que el recorrido 1 + 1', la diferencia de los

recorridos es  $AB + BC$  ver figura 19. Para que la interferencia sea constructiva los haces deben estar en fase y deben de cumplir la condición de que la distancia extra es igual un número entero ( $n$ ) de longitudes de onda ( $\lambda$ ).



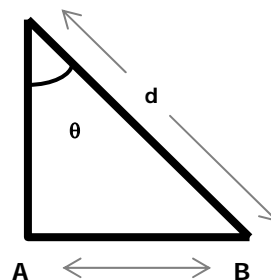
**Figura 19.** Reflexión de rayos X en átomos de un cristal [37].

Por construcción sabemos que la diferencia de la trayectoria  $AB$  es igual a la trayectoria  $BC$  y se requiere que  $AB + BC$  sea igual a un número entero de longitudes de onda.

$$AB + BC = n\lambda$$

De la geometría, ver figura 20, se aprecia que

$$AB = d \sin \theta$$



**Figura 20.** Geometría de la trayectoria del segmento  $AB$ .

Por lo tanto

$$AB + BC = 2d \sin \theta$$

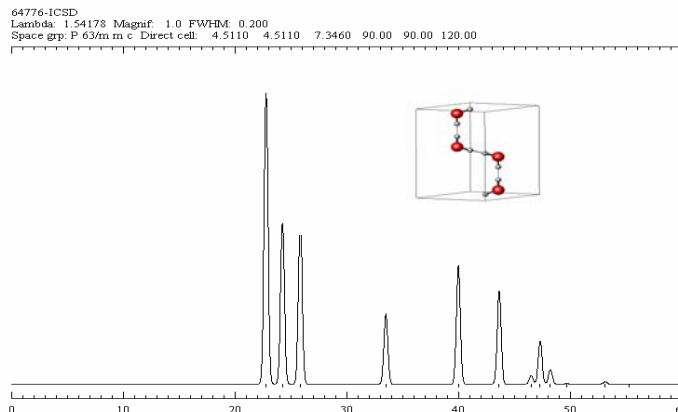
Y la condición para que ocurra una interferencia constructiva

$$2d \sin \theta = n\lambda, \quad n = 1, 2, 3$$

La ecuación es conocida como la ley de Bragg y representa la condición para que la difracción tenga lugar en un material.

El hecho de que algunos planos tienen una densidad de átomos mayor que otros produce una variación de intensidad de los haces difractados. De la ecuación de Bragg podemos calcular la distancia interplanar de material cristalino que se quiera estudiar.

La técnica más comúnmente utilizada en la actualidad para caracterizar éste tipo de muestras, es la de difracción de rayos X por el método de polvos. En esta técnica se utiliza una muestra cristalina pulverizada a fin que se produzca una orientación al azar de todos los planos del cristal simultáneamente [33]. De modo que el difractograma, ver figura 21, obtenido brinda información requerida de la geometría y la estructura cristalina de la muestra [32].



**Figura 21.** Patrón típico de difracción de rayos X de un cristal de hielo, el cual posee estructura hexagonal.

### 1.3.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS TÉRMICOS

Los métodos de análisis térmicos se basan en la medida de la relación dinámica entre la temperatura y alguna otra propiedad de un sistema, como la masa, el calor de reacción y volumen.

#### 1.3.2.1 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO

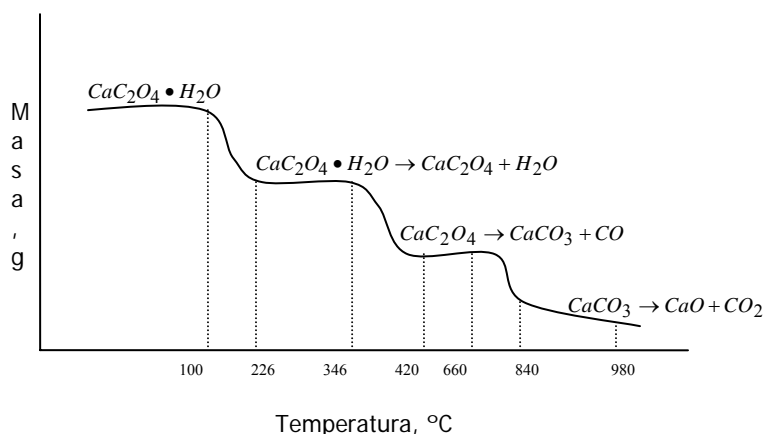
El análisis termogravimétrico (ATG) es una técnica que registra en forma continua los cambios de masa de una muestra en función de la temperatura desde temperatura ambiente hasta valores tan altos como 1500 °C, proporciona información tanto cuantitativa como cualitativa.

Termograma

Un termograma registra los cambios de masa en función de la temperatura. Inicialmente se tiene una muestra con un peso inicial  $w_i$  y una temperatura  $T_i$ . Durante un lapso de tiempo la temperatura va aumentando a cierta velocidad hasta una temperatura final es  $T_f$  y el peso final es  $w_f$ . La diferencia entre los pesos,  $\Delta w$ , se debe al cambios físicos y/o químicos durante el calentamiento.

La figura 22 representa un registro termográfico obtenido al aumentar la temperatura de una muestra de oxalato de calcio monohidratado ( $CaC_2O_4 \cdot H_2O$ ) puro a una velocidad de 5 °C/min. Las regiones horizontales bien definidas corresponden a los intervalos de temperatura en los cuales los compuestos de calcio son estables. En el intervalo de temperatura que comienza desde temperatura ambiente hasta 100°C, se indica la presencia de una especie estable  $CaC_2O_4 \cdot H_2O$ , el primer cambio en el peso indica una pérdida de 1 mol de agua, obteniendo oxalato de calcio anhídrido ( $CaC_2O_4$ ), en un intervalo de estabilidad de

esta especie de 226 a 346°C. El segundo cambio de peso indica la formación de un mol de monóxido de carbono gaseoso y la especie se convierte en carbonato de calcio ( $CaCO_3$ ), el intervalo de temperatura de estabilidad de esta especie es de 420 a 660°C. El último cambio de masa indica la pérdida de masa debida a la formación de un mol de dióxido de carbono ( $CO_2$ ), el intervalo de estabilidad es de 840 a 980°C y la nueva especie formada es óxido de calcio ( $CaO$ ) [34].



**Figura 22.** Termograma correspondiente a la descomposición del  $CaC_2O_4 \cdot H_2O$

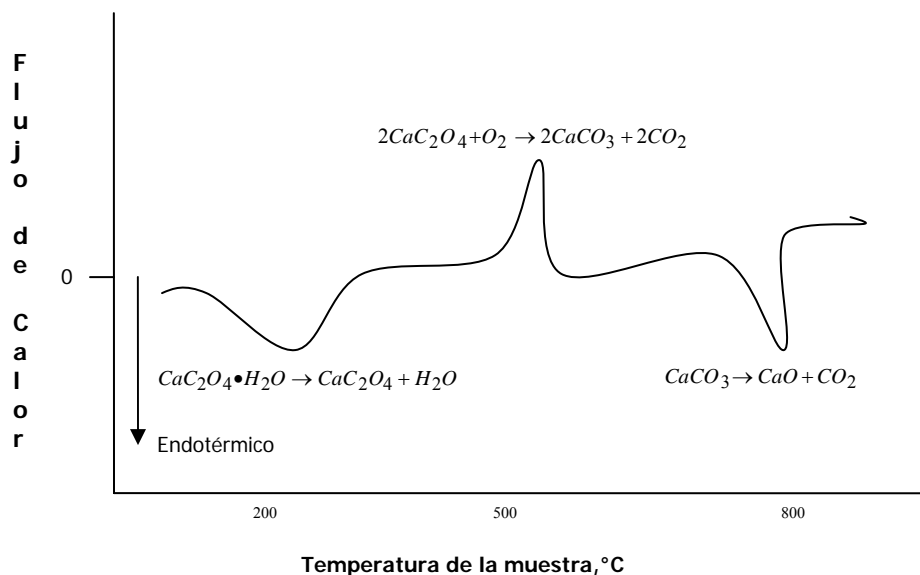
El analizador tiene la opción de operar con atmósfera controlada, esta puede ser inerte, reductora u oxidante según sea el caso. Este flujo de gas arrastra los productos de las distintas reacciones que presenta la muestra debido al tratamiento térmico al que es sometida. El flujo de gas al pasar por la vecindad del depósito no debe provocar movimiento y afectar las mediciones. Este fenómeno es compensado por un flujo de gas constante y bajo, el cual sirve también para evitar que los productos reaccionen con el depósito o se impregnen en las paredes del equipo [35].



### 1.3.2.2 CALORIMETRIA DE BARRIDO DIFERENCIAL

En la técnica de calorimetría de barrido diferencial se requiere de una referencia y la muestra a analizar, ambas se someten a una curva de calentamiento la temperatura aumenta en forma continua; se agrega calor a la muestra y a la referencia a fin de mantenerlas a una temperatura idéntica. El calor agregado que se registra, compensa el que se pierde o se gana como consecuencia de reacciones endotérmicas o exotérmicas que tienen lugar en la muestra.

En la figura 23, se muestra un termograma de barrido diferencial obtenido calentando oxalato de calcio monohidratado en una corriente de aire. Los dos mínimos indican que la muestra se enfría más que el material de referencia, como consecuencia de la absorción de calor por dos procesos endotérmicos, las reacciones de descomposición se muestran debajo de los mínimos. Por el contrario, el pico máximo indica que la reacción que produce carbonato de calcio y bióxido de carbono es exotérmica. Es interesante hacer notar que cuando se obtiene un termograma diferencial en una atmósfera inerte, las tres reacciones son endotérmicas y el máximo es reemplazado por un mínimo. En este caso el producto de la reacción de descomposición del oxalato de calcio es monóxido y no bióxido de carbono.



**Figura 23.** Termograma diferencial de  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  en presencia de  $\text{O}_2$ , la temperatura se incrementó a una velocidad de  $8^\circ\text{C}/\text{min}$ .

Los máximos y mínimos, como los observados en la figura 23, se denominan picos. Los que aparecen por encima de cero en la escala ordinaria son consecuencia de procesos exotérmicos; aquellos que se encuentran por debajo de cero, corresponden a procesos endotérmicos. Cambios térmicos de fenómenos físicos endotérmicos, incluyen la fusión, la ebullición, la sublimación y la desorción. Las reacciones químicas también producen picos diferenciales; son posibles tanto en procesos exotérmicos como endotérmicos [34].

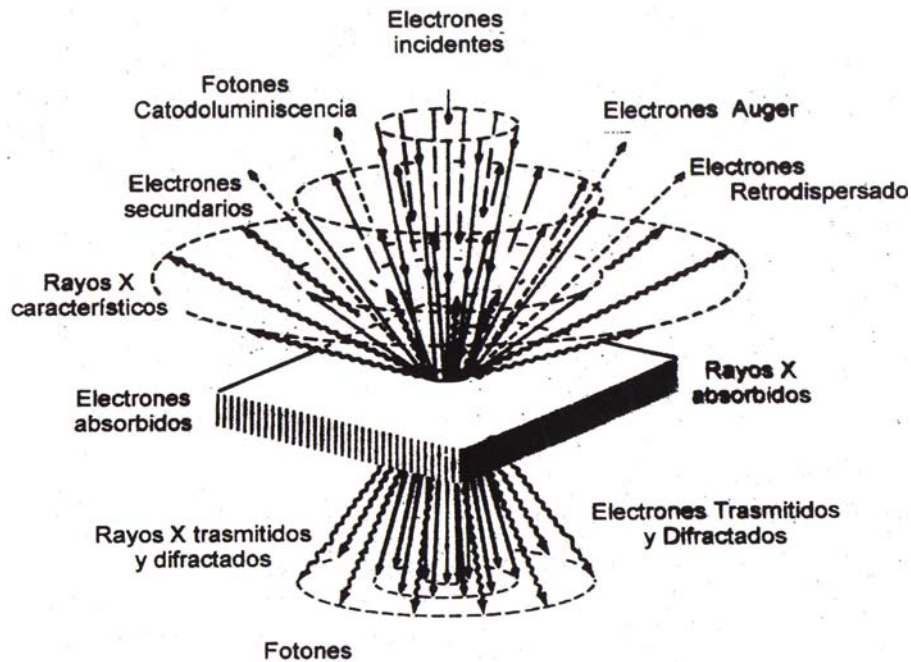
### **1.3.3 MICROSCOPIA**

#### **1.3.3.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO**

El microscopio electrónico de barrido fue desarrollado entre 1960 y 1970. La técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB) provee información topográfica del espécimen con una resolución nanométrica. Una ventaja del uso del MEB es que puede captar imágenes de superficies complejas y tortuosas

Para la iluminación de la muestra se requiere de un haz brillante y angosto de electrones. Los equipos de MEB convencionales generan electrones por calentamiento de un filamento de tungsteno. El haz iluminador de electrones es enfocado a la muestra por medio de unos lentes magnéticos, concentrado por lentes concentradores y finalmente el haz angosto es enfocado por unos lentes objeto. Unas bobinas son utilizadas para desviar el haz estrecho de lado a lado a través del espécimen para barrer la superficie estudiada. Las señales que se detectaron en cada punto barrido son compiladas en una imagen digital.

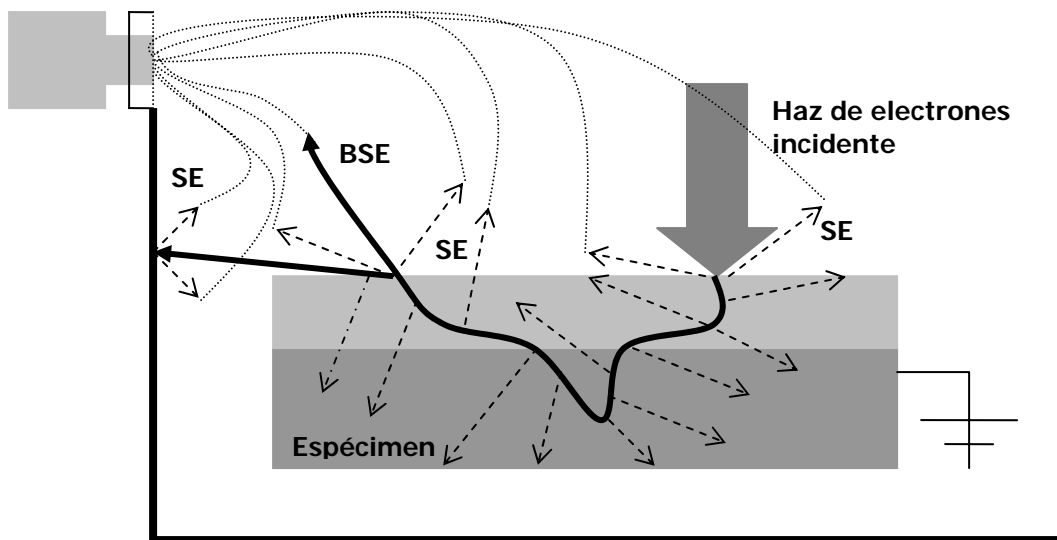
El haz dirigido a la muestra entra, choca e interacciona con un volumen de la muestra, generando diferentes señales, ver figura 24.



**Figura 24.** Interacciones generadas en una muestra al incidir un haz de electrones de alta energía.

Los electrones con mayor energía entran, recorren y chocan con las especies de capas subterráneas de la muestra antes de regresar a la superficie y escapar de la muestra. Estos electrones elásticamente dispersados son detectados como electrones retrodispersados (BSE), figura 25. Dependiendo de las energías y de la naturaleza del espécimen, estos electrones pueden viajar tan profundo como 1 a 10  $\mu\text{m}$  dentro de la muestra y emerger tan lejos como 1 ó 2  $\mu\text{m}$  fuera del punto donde el haz de electrones entró.

Los electrones de los átomos de la muestra que se liberan cuando el haz incide sobre esta, se les conocen como electrones secundarios (SE). Poseen una energía de unas pocas decenas de electrón volts y sólo los electrones secundarios generados cerca de la superficie de la muestra pueden ser detectados, cuando provienen de una profundidad de 5 a 10 nm.



**Figura 25.** Generación de señal de SEM. Haz de electrones incide sobre la muestra, choca con átomos de la muestra, y eventualmente sale de la muestra como electrones retro dispersados (BSE). Se generan electrones secundarios (SE) y pueden escapar de la muestra si son generados suficientemente cerca de la superficie.

A su vez los BSE chocan a través del espécimen, y generan electrones secundarios (SE) débiles. Si estos electrones secundarios son generados suficientemente cerca de la superficie pueden escapar y la señal puede ser detectada. Los SE pueden ser generados donde el haz incidente entró y también pueden ser generados donde los BSE salieron.

Los BSE que escaparon de la muestra y chocan con las paredes de la cámara del MEB y también pueden generar SE, y esta señal también es contada [36].

Cuando los materiales no son conductores, como los materiales cerámicos, poliméricos y compuestos, se necesitan recubrir con una delgada capa de un material conductor. En nuestro caso la delgada capa fue de oro metálico (aproximadamente  $> 200 \text{ \AA}$ ), con el fin de minimizar la acumulación de carga negativa.

### 1.3.3.2 MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

El microscopio de fuerza atómica, MFA, es un equipo utilizado para estudiar superficies de materiales. En el MFA se pueden analizar materiales como son los cerámicos, metales, polímeros y materiales compuestos en los cuales se pueden observar detalles de la superficie con resolución atómica y tiene la ventaja de que no requiere de preparación especial previa alguna.

Las superficie de una muestra es analizada con una punta hecha normalmente de Hidruro de Silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) o Silicio Metálico (Si) con una longitud de varias micras y un diámetro menor a  $100\text{\AA}$ . La punta se fija en el extremo libre de un cantilever cuya longitud es de 100 a  $200\mu\text{m}$ , figura 26.

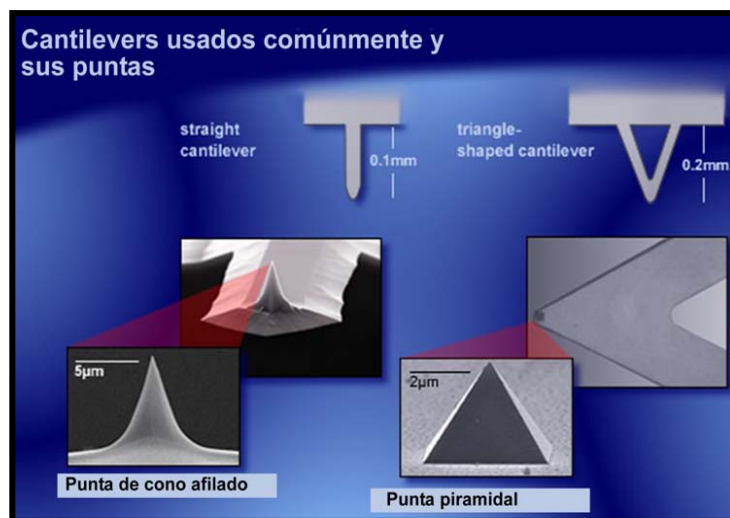
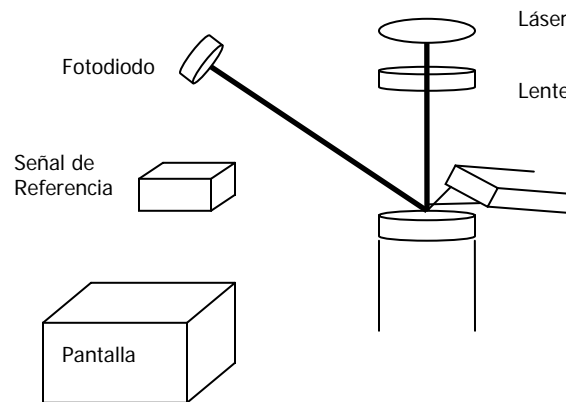


Figura 26. Dimensiones de las puntas y cantilevers [37].

La punta realiza el barrido de sobre el área de la superficie a través de un sistema de control por mecanismos de retroalimentación que están disponibles en un scanner piezoeléctrico que además, permiten mantener la fuerza constante y la altura de la punta sobre la superficie de la muestra. El sistema de funcionamiento de un MFA emplea un sistema de detección óptica, el cual permite obtener información reflejada por el cantilever. Un diodo láser se enfoca sobre la parte

brillante del cantilever, conforme la punta barre la muestra, el cantilever se mueve hacia arriba y hacia abajo con el contorno de la superficie, el haz de láser es entonces difractado del cantilever a un fotodiodo, figura 27.



**Figura 27.** Esquema de un Microscopio de Fuerza Atómica (MFA)

El fotodiodo mide la diferencia de intensidades de luz entre las partes más bajas y las más altas, y las convierte en voltaje. Las fuerzas entre la punta y la superficie de la muestra causan que el cantilever se flexione. Un sensor piezoeléctrico mide la deflexión del cantilever conforme la punta realiza el barrido. Finalmente, las señales de las deflexiones y del fotodiodo que pasan por el sistema de retroalimentación permiten a una computadora generar una imagen de la superficie de la cual, se puede analizar su topografía, perfil, tamaño de partícula, rugosidad, fronteras de grano, impurezas, cambios de fase y dominios magnéticos. Así como visualizar las superficies en tercera dimensión.

Varias fuerzas contribuyen a la deflexión de un cantilever en AFM. Las fuerzas interatómicas de Van der Waals y fuerzas de atracción repulsión entre el átomo del ápice de la punta y un átomo de la superficie de la muestra [36].

### 1.3.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR MÉTODO DE LOWRY

Los métodos más utilizados para la cuantificación de proteínas son de Lowry, Biuret y Bradford; los cuales se emplean según las necesidades del investigador, para determinar la cantidad de proteína presente en soluciones biológicas.

El método de Lowry (1951), empleado en este trabajo, consiste en formar un complejo coloreado entre el  $\text{Cu}^{2+}$  y el nitrógeno de los enlaces peptídico de la proteína en un medio alcalino, estos complejos tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose así los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción [38].

Para resaltar y aumentar el color formado se reduce el reactivo de Folin-Ciocalteu, en medio básico, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, ver figura 28.

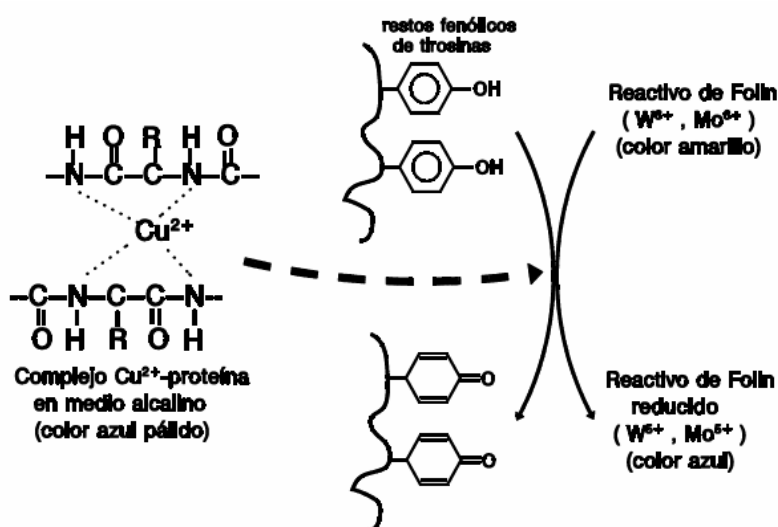


Figura 28. Reacciones implicadas en el método de Lowry.



## ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN DE REGIONES DE LUZ VISIBLE Y ULTRAVIOLETA

La absorción del espectro de las regiones de 200 a 400 nm para luz ultravioleta y de 400 a 700 nm para luz visible, involucra transformaciones de las moléculas en sus electrones externos o de valencia, pasando de un estado fundamental a estados excitados. Esta técnica se aplica fundamentalmente a especies en solución y se mide la radiación transmitida por las mismas.

Si una luz monocromática atraviesa una solución (contenida en una celda de cuarzo) se denomina  $I_0$  a la intensidad de la luz incidente e  $I$  a la intensidad de la luz transmitida por la muestra. La relación  $I_0/I$  se denomina transmitancia,  $T$ . Al logaritmo decimal del inverso de la transmitancia se denomina absorbancia,  $A$ .

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I}$$

La ley de Beer, establece que la absorbancia presentada por una sustancia es:

$$A = abc$$

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I} = abc$$

Donde  $a$  es una constante de proporcionalidad característica del sistema absorbente,  $b$  es el espesor o longitud de paso óptico de la celda, y  $c$  es la concentración de la solución. De esta manera se asocia la intensidad del color la cual es directamente proporcional a la concentración de proteína presente.

### Tratamiento de la muestra

Para determinar la concentración de proteínas de la muestra se construye una curva patrón o de calibrado. La concentración que tiene la muestra se determina por interpolación de los valores de absorbancia en la curva patrón.

El punto 0 de la curva patrón, que sólo contiene agua destilada y los reactivos, sirve de blanco para el ajuste del espectrofotómetro a cero de absorbancia [39].

### 1.3.5 SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La técnica de electroforesis consiste en la migración de iones en solución al aplicarle un campo eléctrico. Ya que al aplicarle un voltaje, las diferentes especies en la muestra se mueven a través de una matriz: Las especies separadas son detectadas como bandas a diferentes posiciones en la matriz, ver figura 29.

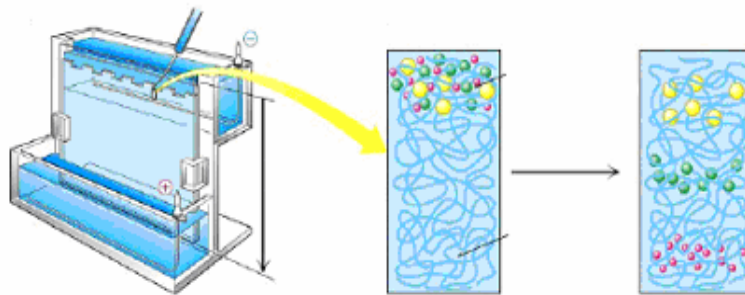
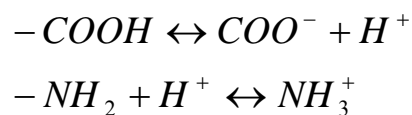


Figura 29. Esquema del proceso de electroforesis.

Las moléculas poseen cargas eléctricas y en presencia de un campo eléctrico poseen la propiedad de movilidad. La velocidad con que se mueven depende de la carga, forma y tamaño de la molécula. Las proteínas son compuestos anfóteros y tienen carga tanto positiva como negativa por que contienen residuos y básicos.



Para cada especie de proteína, existe un pH al cual la molécula no tiene carga neta. Este pH es llamado punto isoelectrico o Pi. En una solución con un pH arriba del Pi, hay proteínas de carga negativa que migran hacia el electrodo positivo (ánodo) en presencia de un campo eléctrico. Si la solución tiene un pH debajo del Pi, la proteína tendrá carga positiva y migrará hacia el electrodo negativo (cátodo).

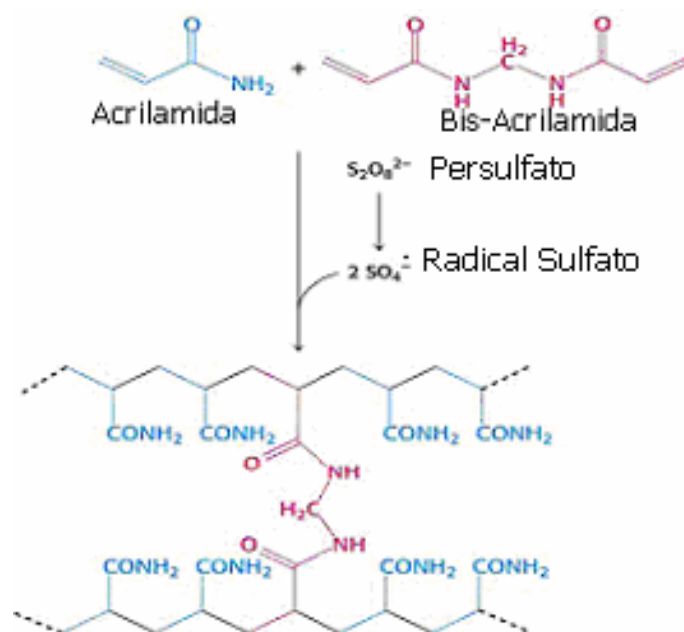
La electroforesis se basa en la movilidad de las diferentes especies, el pH de la solución debe permanecer constante para mantener la polaridad de la carga, y así la movilidad de la proteína. La electrólisis del agua genera  $H^+$  en el ánodo y  $OH^-$  en el cátodo, por lo cual las soluciones usadas deben ser amortiguadoras.

La separación de las proteínas se verá condicionada sólo por su tamaño y no por su carga. Previamente, las proteínas son desnaturalizadas, luego se usa un detergente (SDS, ver figura 30), el cual las despliega quedando pegado a sus superficies confiriéndoles una carga negativa. Esa carga negativa enmascara las cargas intrínsecas de las proteínas presentando todas, la misma carga, de modo que la migración será debida solamente a la masa molecular de la proteína.



**Figura 30.** Representación de molécula de SDS.

Electroforesis en gel es una técnica muy conveniente para separar macromoléculas. El gel proporciona una matriz que estabiliza la solución. La matriz es requerida por que la corriente eléctrica que pasa a través de la solución genera calor y causa difusión y convección, mezclando las bandas. El gel de poliacrilamida funciona como separador selectivo al tamaño de las proteínas. Los polímeros utilizados para la formación del gel son la acrilamida y la bis-acrilamida, los cuales se polimerizan mediante la adición de catalizadores (persulfato amónico, TEMED). El gel de poliacrilamida (ver figura 31) es entrecruzado y tiene una estructura parecida a una esponja. El tamaño de poro es similar al de una proteína. La proteína atraviesa el gel cuando se le aplica un voltaje: Las moléculas grandes se retardan en el gel más que las moléculas pequeñas. Las matrices deben ser eléctricamente neutras para no retardar el paso de las proteínas.



**Figura 31.** Reacciones de polimerización de poliacrilamida.

## **Objetivo**

Obtener esponjas de colágeno a partir de hueso bovino para ser utilizadas en la regeneración de tejido.

## **Objetivos particulares**

Proponer un proceso para la obtención de las esponjas de colágeno.

Caracterizar la proteína por métodos fisicoquímicos el colágeno tipo I.

## 2. MATERIALES Y MÉTODO

### MATERIAL

Hueso esponjoso bovino fresco cortado en cubos de  $1\text{ cm}^3$  provenientes de abastecedora local de carne de bovino.

Embudo de vidrio.

Barra magnética de agitación.

Pipetas graduadas de 1, 5, 10 mL.

Frascos de vidrio con tapa de plástico.

Matraz aforado de 25 mL.

Propipeta de plástico.

### REACTIVOS

Cloroformo [ $\text{CHCl}_3$ ] PM 119.38 marca J. T. Baker

Metanol Absoluto [ $\text{CH}_3\text{OH}$ ] PM 32.04 marca J. T. Baker

Ácido Cítrico [ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ], PM 210.14 marca J. T. Baker

Ácido Clorhídrico [ $\text{HCl}$ ] fumante 37%, PM 36.5 marca Merk

Urea [ $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ], PM 60.06 marca J. T. Baker

Fosfato de sodio dibásico [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ], PM 141.96 marca J. T. Baker

Fosfato de sodio monobásico [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ], PM 137 marca J. T. Baker

Solución Amortiguadora pH 4 marca Hycel de México S.A. de C.V

Solución Amortiguadora pH 7 marca Hycel de México S.A. de C.V

Colágeno tipo I comercial Sigma CAS 9007-34-5

## EQUIPO

pHmetro HANNA Instruments. HI 223.

Sierra de disco de diamante de South Bay 650. Technology Inc.

Disco de diamante.

Parrilla de agitación y calentamiento Nuova Stirplate.

Microscopio de Barrido Electrónico, LEICA Cambridge LTD. Stereoscan 440.

Equipo de Análisis Termogravimétrico, Hi Res DSC-TGA. TA Instruments 2950.

Equipment TA Instruments DSC Q-100

Difractómetro de Rayos X. Bruker axs, D8 ADVANCE

JOEL Scanning Probe Microscope JSPM-4210, Punta de no contacto NSC12.



## **METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

La metodología desarrollada en este trabajo fue propuesta, y se desarrolló con el financiamiento del proyecto IN101606 del PAPITT UNAM.

### **PROCESO LEDE**

#### **LAVADO DE HUESO.**

El hueso fresco se lavó con agua desionizada, y mecánicamente se despojó de la materia orgánica que lo recubre.

El material obtenido se cortó en cubos de 1 cm<sup>3</sup> con una sierra de diamante. Posteriormente lavaron los cubos con agua desionizada para despojarlos de residuos del corte.

#### **EXTRACCIÓN DE GRASAS POR SOLVENTES**

En un frasco de vidrio con tapa se colocan 10 cubos de hueso fresco limpio.

Se agregaron 25 ml de una solución 1:1 de cloroformo y metanol en agitación constante, hasta que la solución se tornara turbia. Se decantó el líquido y se agregaron 25 ml de solución. Este procedimiento se repite hasta que observe transparente el líquido.

Después de la extracción los cubos se lavaron con solución amortiguadora de fosfato a pH 7.4.

#### **DESMINERALIZACIÓN POR MEDIO ÁCIDO.**

Los cubos sin grasa se colocaron en un frasco de vidrio con tapa. Se agregaron 50 ml de una solución 0.6N de ácido clorhídrico con agitación constante. La solución de ácido clorhídrico se cambió diariamente por 6 días.

Ya desmineralizados los cubos se lavaron con una solución amortiguadora de fosfato a pH 7.4.

## ELIMINACIÓN DE PROTEOGLUCANOS

Los cubos desmineralizados se colocaron en un frasco de vidrio con tapa. Se agregaron 50 ml de una solución 2M de urea con agitación constante, hasta que la solución se tornara turbia.

Se decantó el líquido y se agregaron 50 ml de solución. Este procedimiento se repite hasta que observe transparente el líquido.

Se lavaron los cubos con una solución amortiguadora de fosfato a pH 7.4.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 PRESENTACIONES DE LOS ANDAMIOS

##### OBTENCIÓN DE CUBOS DE COLÁGENO Y MEMBRANAS.

Con el proceso LEDE se obtuvieron matrices de colágena de diferentes presentaciones, una en forma cúbica y otra de membrana, ver figuras 32 y 33.



**Figura 32.** Matrices de colágeno obtenidas por el proceso LEDE en presentación cúbica.



**Figura 33.** Matrices de colágeno obtenidas por el proceso LEDE en presentación de membranas.

## 3.2 DIFRACCIÓN DE RAYOS X

### HUESO DESMINERALIZADO

En el patrón de difracción de rayos X (DRX) de la muestra de colágena (figura 34), se observa una señal mayormente amorfa, lo que era de esperarse, pueden notarse señales debidas a una fase cristalina existente en la muestra correspondiente a fosfatos de calcio o bien a fosfatos ácidos. En la figura se muestran los picos correspondientes a la HA. La identificación de la fase mineral se realizó por comparación de los archivos JCPDS: 24-0033 y 09-0432 (HA). Para que ocurra la difracción de rayos X de fases minerales, estas deben de estar presentes en más de 5% en volumen de la muestra.

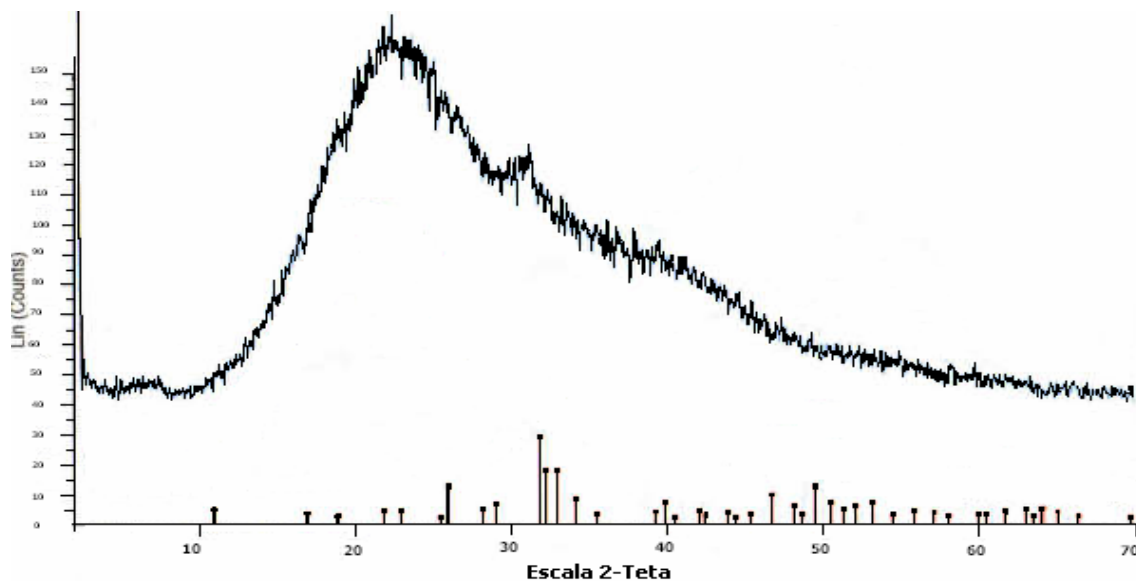


Figura 34. Difractograma de hueso desmineralizado.

### 3.3.1 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO

El termograma de colágeno a partir de hueso se muestra en la figura 35; donde la línea continua (a) corresponde a la colágena obtenida en este trabajo, se puede observar una transición entre 50-170°C que corresponde a la pérdida de agua. La segunda transición se observa entre 200-500°C correspondiente a las temperaturas de descomposición de la materia orgánica. A la temperatura de 1000°C se tienen 12.68% de residuos minerales.

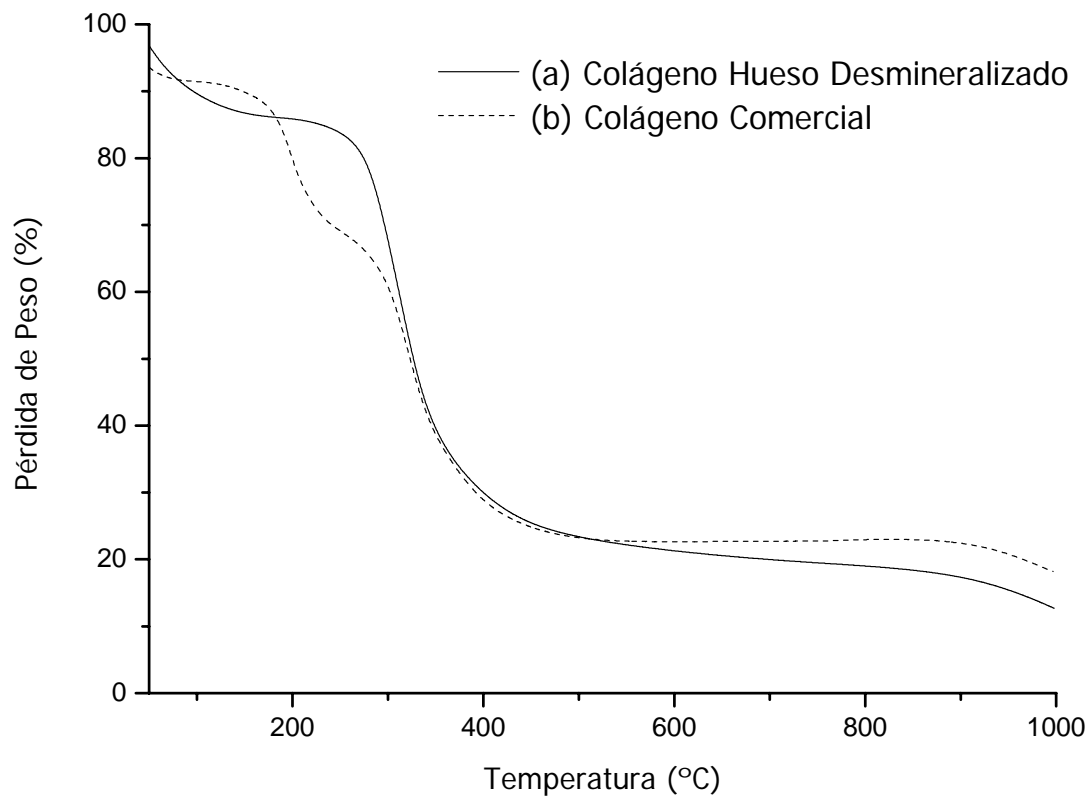


Figura 35. Termograma de a) colágeno de hueso y b) de colágeno comercial.

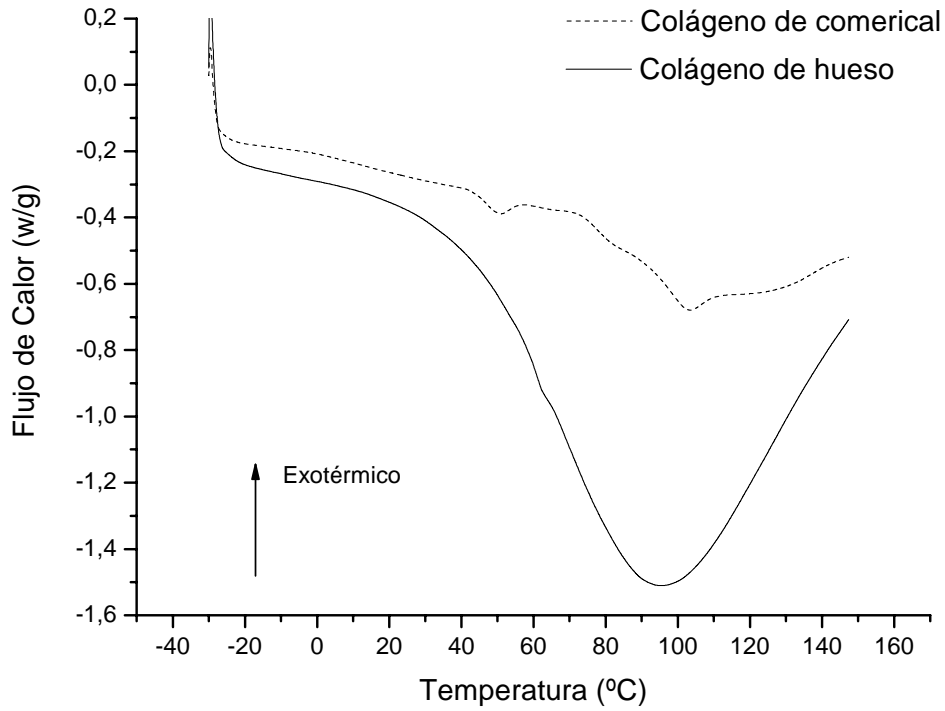
El termograma de colágeno tipo I comercial se expone en la figura 32 correspondiendo a la línea punteada (b). Se puede observar una transición característica entre 50-170°C que corresponde a la pérdida de agua. Otras dos transiciones se observan entre 170°C y 500°C correspondientes a la descomposición de materia orgánica. Finalmente, a la temperatura de 1000°C se tiene aproximadamente 18.11% en peso de residuos minerales.

### 3.3.2 CALORIMETRIA DE BARRIDO DIFERENCIAL

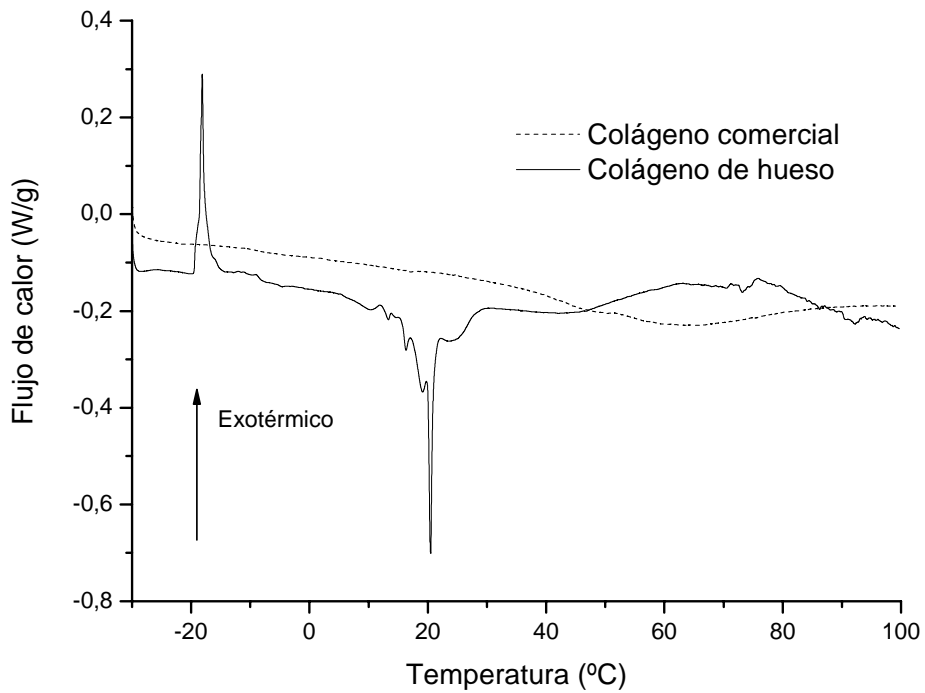
Se analizaron las muestras de colágeno de hueso y de colágena comercial. Los estudios se realizaron en una atmósfera de  $N_2$  y a dos velocidades de calentamiento, de 10 y  $1^\circ C/min$  respectivamente, con el fin de mejorar la resolución del termograma.

El termograma diferencial a  $10^\circ C/min$  de colágeno de hueso, figura 36 correspondiente en línea continua, se aprecian dos picos endotérmicos a  $61.65^\circ C$  y otro a  $95.58^\circ C$ . El primer pico corresponde a la temperatura de desnaturalización del colágeno tipo I y el segundo pico corresponde a la pérdida de agua. En el termograma de colágeno comercial, ver figura 36 correspondiendo en línea punteada, se aprecian tres picos endotérmicos en  $51.52^\circ C$ ,  $80^\circ C$  y  $103^\circ C$ . El primer y el segundo pico correspondientes a las temperaturas de desnaturalización del colágeno tipo I que se lleva a cabo presumiblemente en dos etapas. El tercer pico corresponde a la eliminación de agua.

Al cambiar la velocidad de calentamiento a  $1^\circ C/min$ , como se puede apreciar en la figura 37 correspondiendo en línea continua al termograma de colágeno de hueso. Se pueden observar 7 picos en las temperaturas  $-18.2^\circ C$ , correspondiente a la cristalización de la proteína congelada en la muestra, mientras que las  $9.7^\circ C$ ,  $13.8^\circ C$ ,  $16.2^\circ C$ ,  $19^\circ C$ ,  $20^\circ C$  y  $25^\circ C$  corresponden a componentes asociados al procedimiento de extracción de colágeno y a la desnaturalización de la colágena la cual probablemente se lleva a cabo en varias etapas y de las cuales, la principal corresponde a la temperatura de  $20^\circ C$ . En la figura 37 correspondiendo a una línea punteada, se muestra el termograma del colágeno tipo I comercial, donde se aprecian dos temperaturas de desnaturalización a  $49^\circ C$  y a  $64^\circ C$ , presumiblemente asociado a un proceso en dos etapas.



**Figura 36.** Termograma diferencial de barrido de colágeno comercial y de hueso a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.



**Figura 37.** Termograma diferencial de barrido de colágeno comercial y de hueso a una velocidad de calentamiento de 1°C/min.

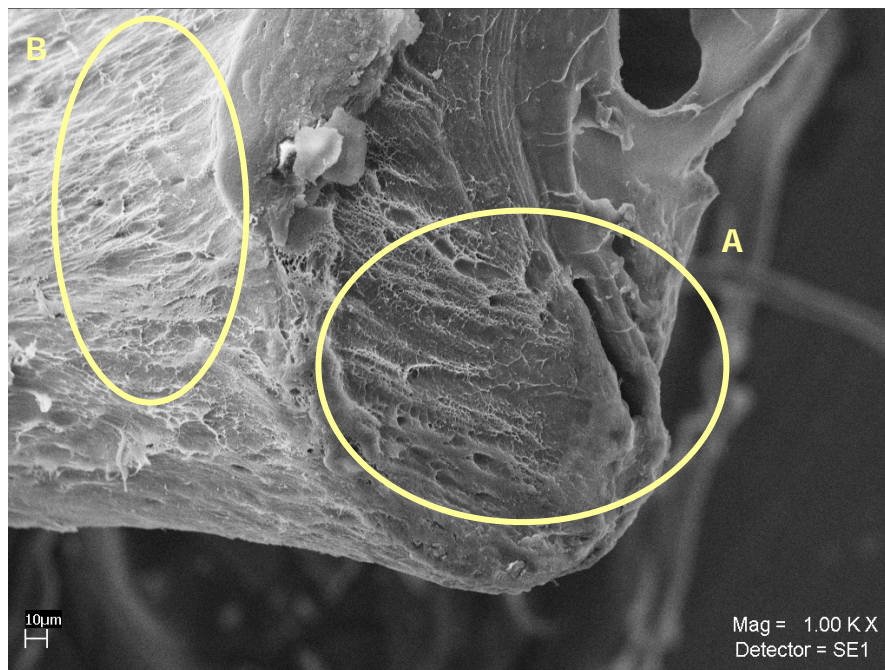


### 3.4 MICROSCOPIA

#### 3.4.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

##### COLÁGENA DE HUESO DESMINERALIZADO

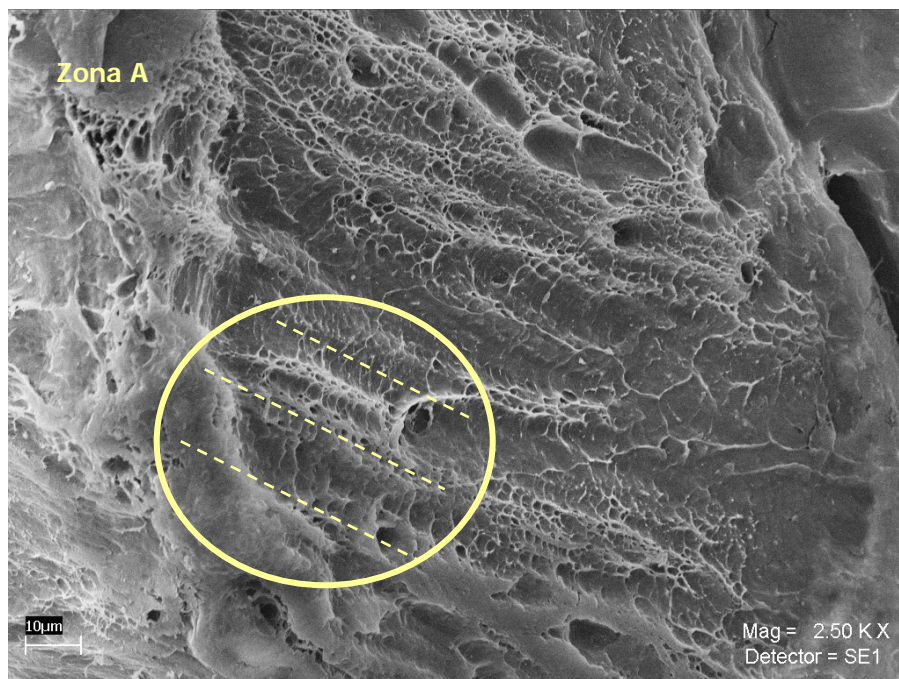
En la figura 38, se muestra la periferia de la estructura de una matriz tridimensional con una superficie de fibrosa, la cual fue obtenida a partir de hueso desmineralizado, se pueden apreciar diferentes tipos de ordenamiento de las fibras. El estudio se realizó en dos zonas, denominadas A y B. El aumento del microscopio es de 1 KX.



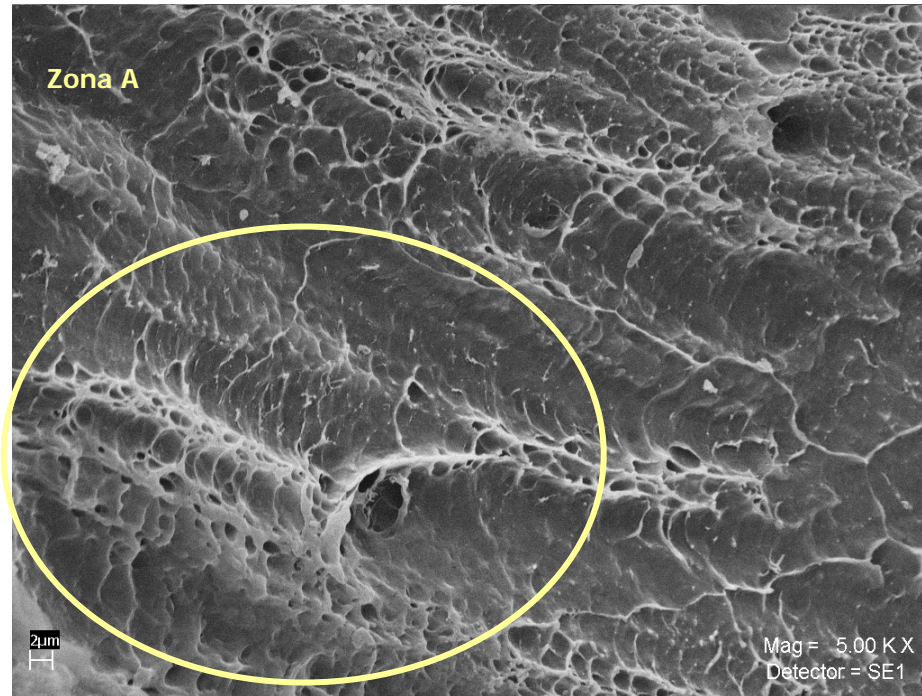
**Figura 38.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de matriz de hueso desmineralizado. Se puede observar una superficie fibrosa, los círculos indican las zonas estudiadas con diferente arreglo estructural, el aumento es de 100 KX.

## Zona A

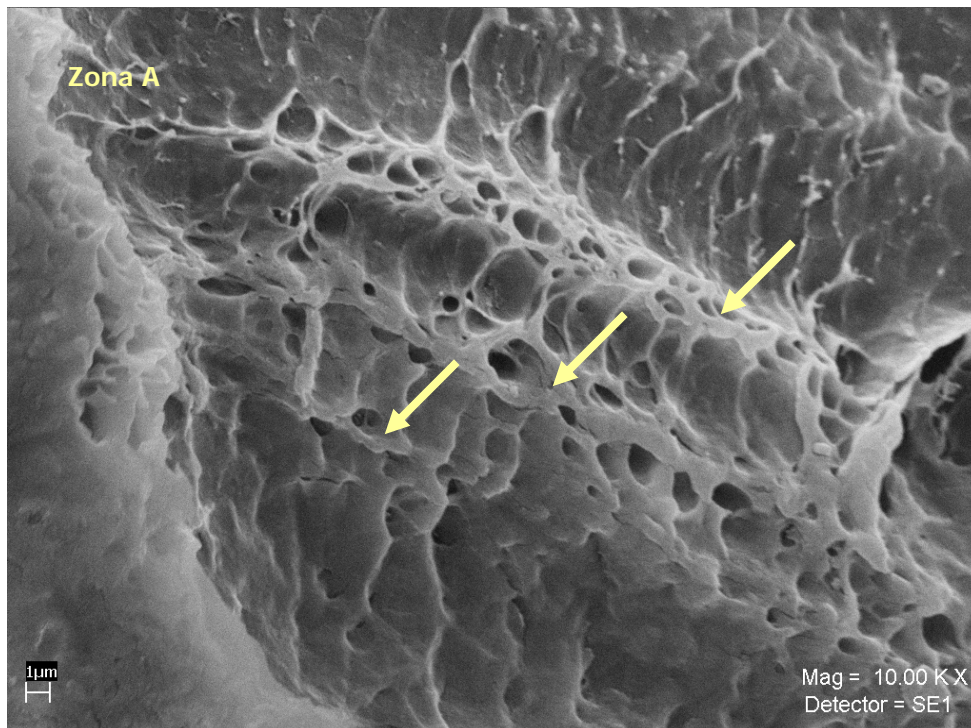
Aumentando a 2.5 KX, se obtiene la imagen de la figura 39. Se aprecian estructuras de aglomerados de fibras gruesas, las líneas punteadas indican el arreglo en paralelo de los aglomerados. Al aumentar a 5 KX, en la figura 40, se observa que los aglomerados son tramos de fibras en forma de red. Con segmentos de fibras paralelas y unidas de forma perpendicular a ellas por fibras más angostas, como una forma de "escalera". Entre algunos de los peldaños de la escalera se encuentran poros. La imagen en la figura 41, obtenida al aumentando a 10 KX, se aprecian que el arreglo es repetitivo de las fibras, y se puede apreciar la porosidad de las mismas.



**Figura 39.** Imagen de MEB sobre muestra de matriz de hueso desmineralizado, con un aumento de 2.5 KX. Se aprecia un arreglo paralelo de aglomerados de fibras.



**Figura 40.** Imagen de MEB sobre muestra de matrices de hueso desmineralizado, con un aumento de 5 KX. Se puede observar una estructura de red.

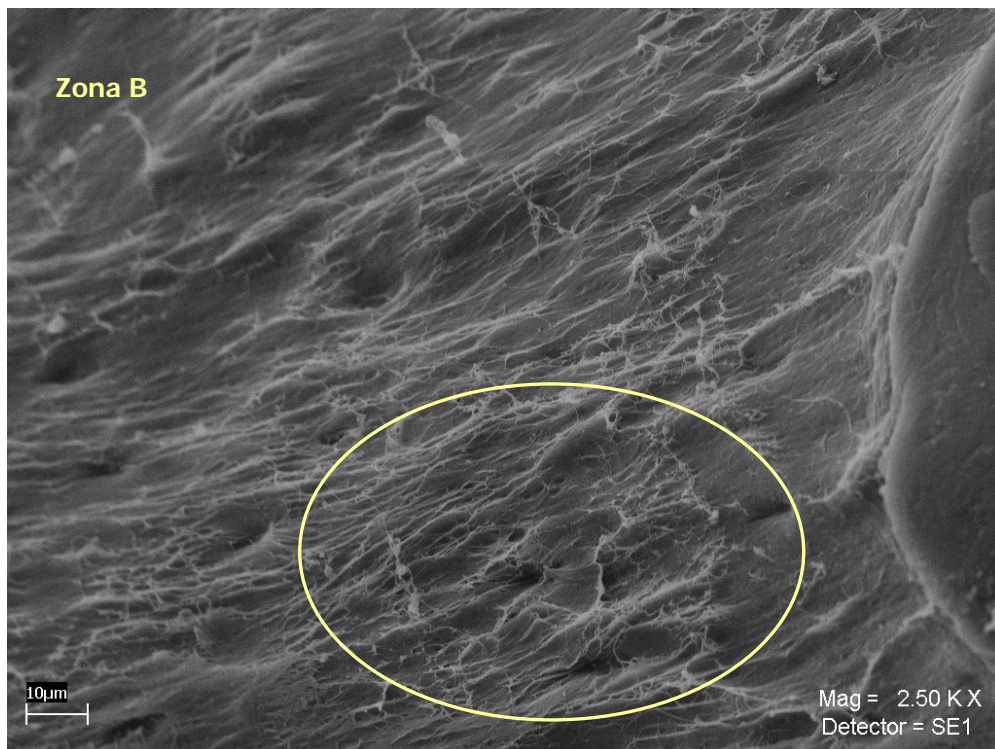


**Figura 41.** Imagen de MEB sobre muestra de hueso desmineralizado. Se aumenta la resolución a 10 KX. Las flechas indican el arreglo repetitivo de las redes de fibras.

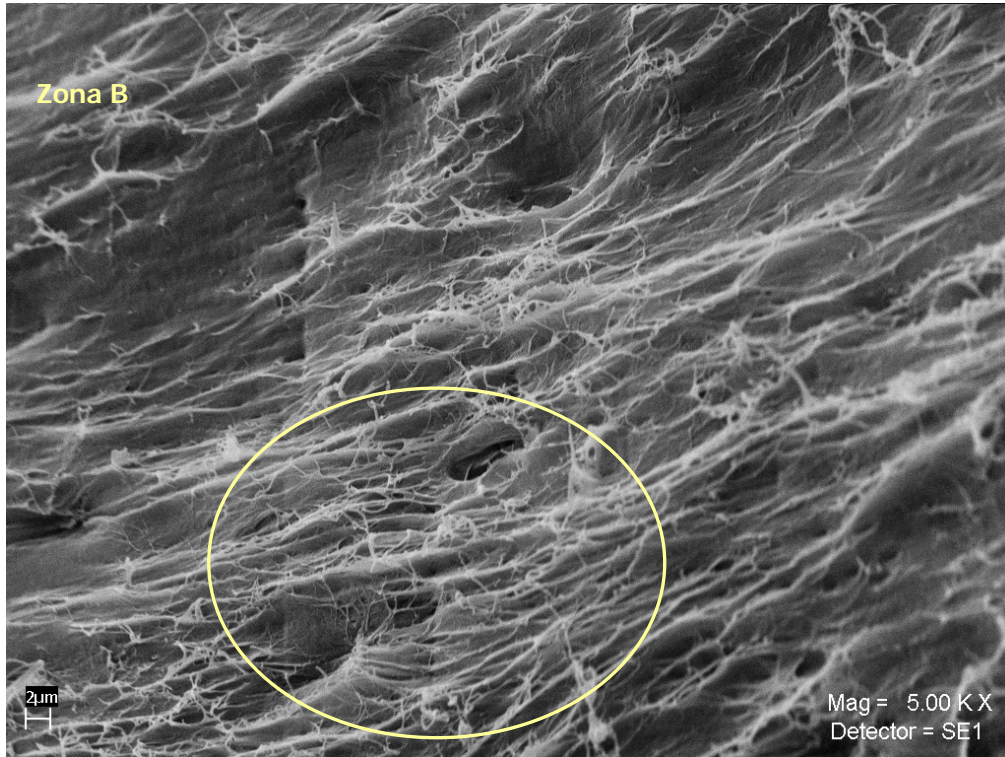


## Zona B

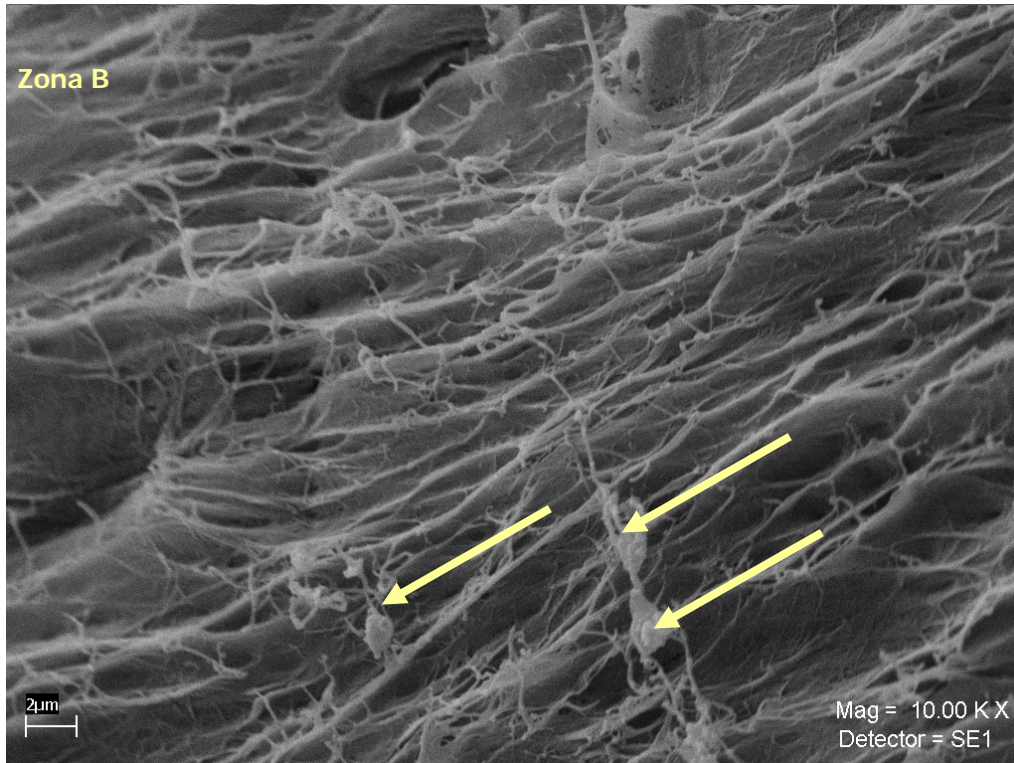
La figura 42 muestra la zona B con una aumento de 2.5 KX, se aprecia una estructura tridimensional de unas fibras angostas que se encuentran adheridas a una matriz de colágeno y sobresalen de la superficie. Al aumentar a 5KX, ver figura 43, se observan las fibras se encuentran entrecruzadas. Al aumentar a 10 KX, ver figura 44; se observa que las fibras están colocadas de forma paralela saliendo de la superficie. También se aprecia que existen fibras principales y de ellas salen fibras secundarias, así como, la existencia de aglomerados de fibras.



**Figura 42.** Imagen de MEB sobre muestra de hueso desmineralizado. Se aumenta a 2.5 KX.



**Figura 43.** Imagen de MEB sobre muestra de hueso desmineralizado. Se aumenta a 5 KX.



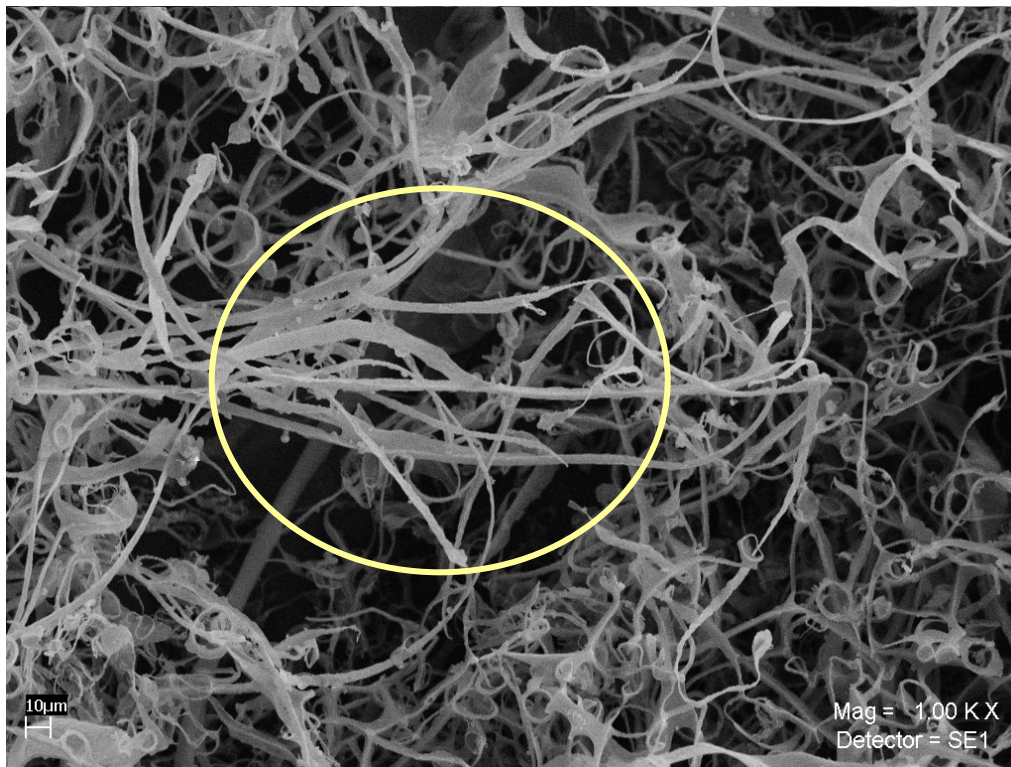
**Figura 44.** Imagen de MEB sobre muestra de hueso desmineralizado. Se aumenta a 10 KX. Las flechas indican los aglomerados de fibras.



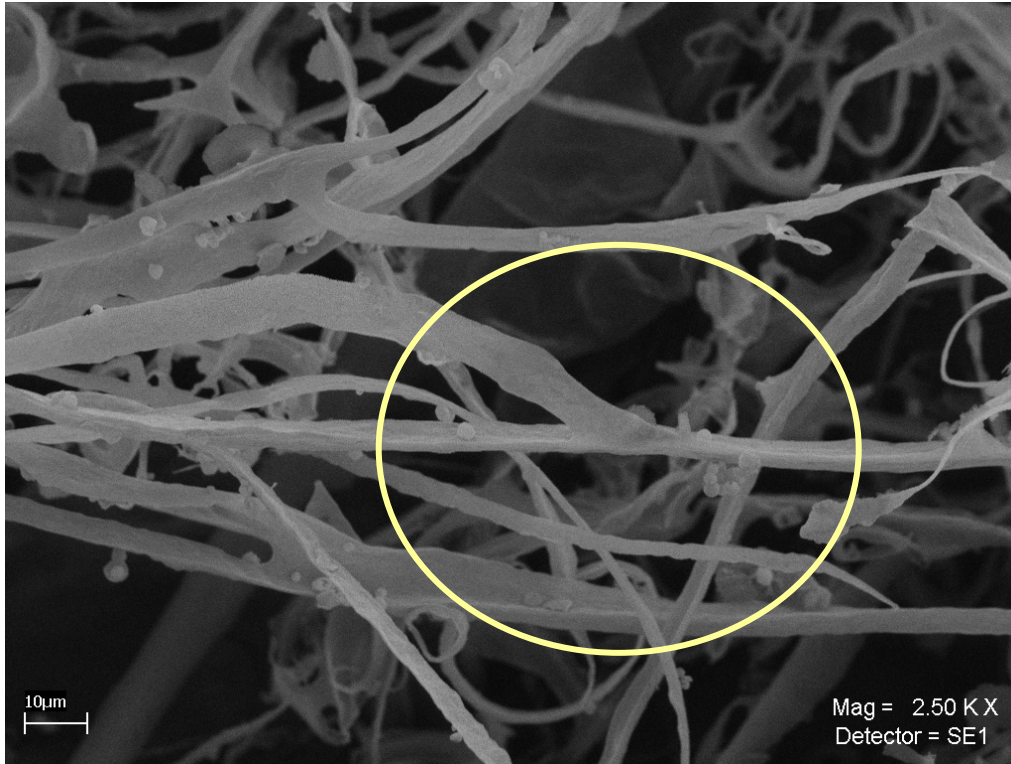
## COLÁGENO COMERCIAL

En la figura 45 se aprecia una estructura tridimensional de una muestra de colágeno comercial con un aumento de 1KX, la cual proviene de piel de bovino, se pueden apreciar una red de fibras gruesas interconectadas de forma aleatoria.

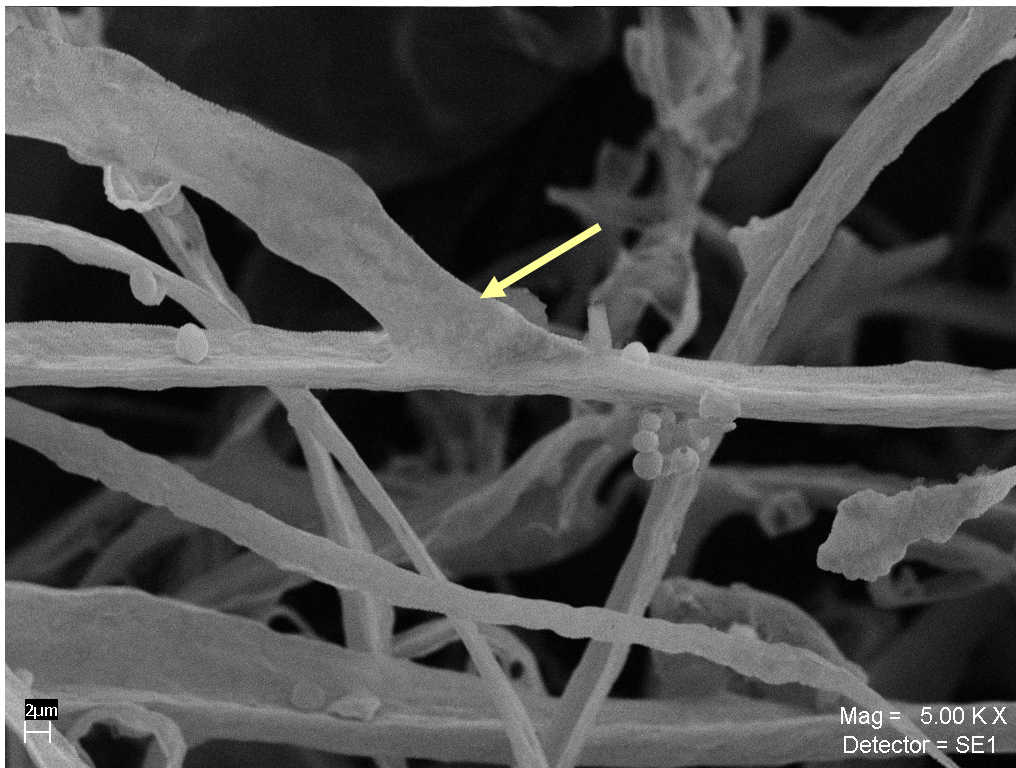
Cuando se aumenta a 2.5 KX, se puede apreciar en la figura 46, una serie de fibras principales y de ellas se ramifican fibras secundarias. En la figura 47 al aumentar a 5 KX de la sección de interés, se pueden apreciar las fibras que forman una intersección, donde las fibras tienen una superficie rugosa.



**Figura 45.** Imagen de MEB sobre muestra de colágena comercial. Aumento de 1 KX



**Figura 46.** Imagen de MEB sobre muestra de colágena comercial. Aumento de 2.5 KX



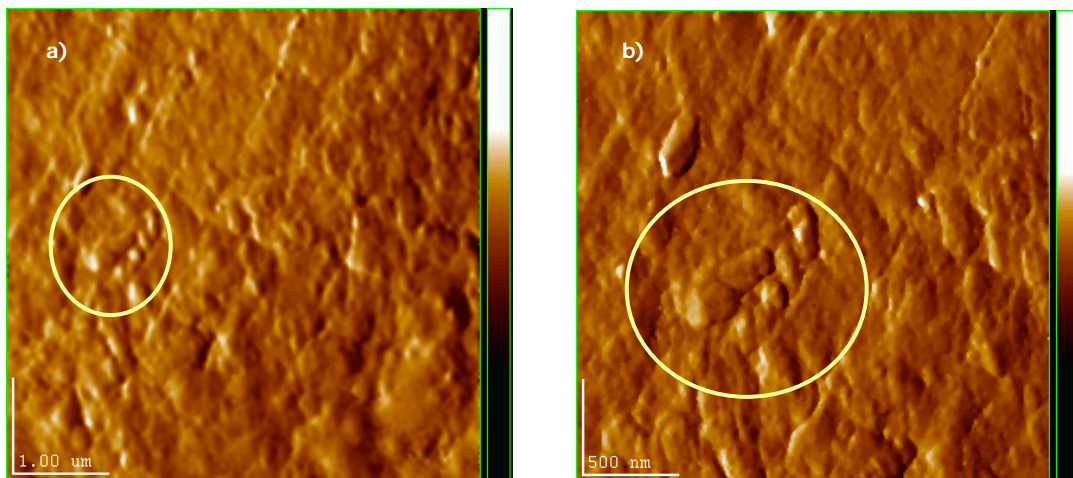
**Figura 47.** Imagen de MEB sobre muestra de colágena comercial a un aumento de 5 KX. La flecha sólida muestra la intersección de las fibras.

### 3.4.2 MICROSCOPIA DE FUERZA ATOMICA

#### HUESO DESMINERALIZADO

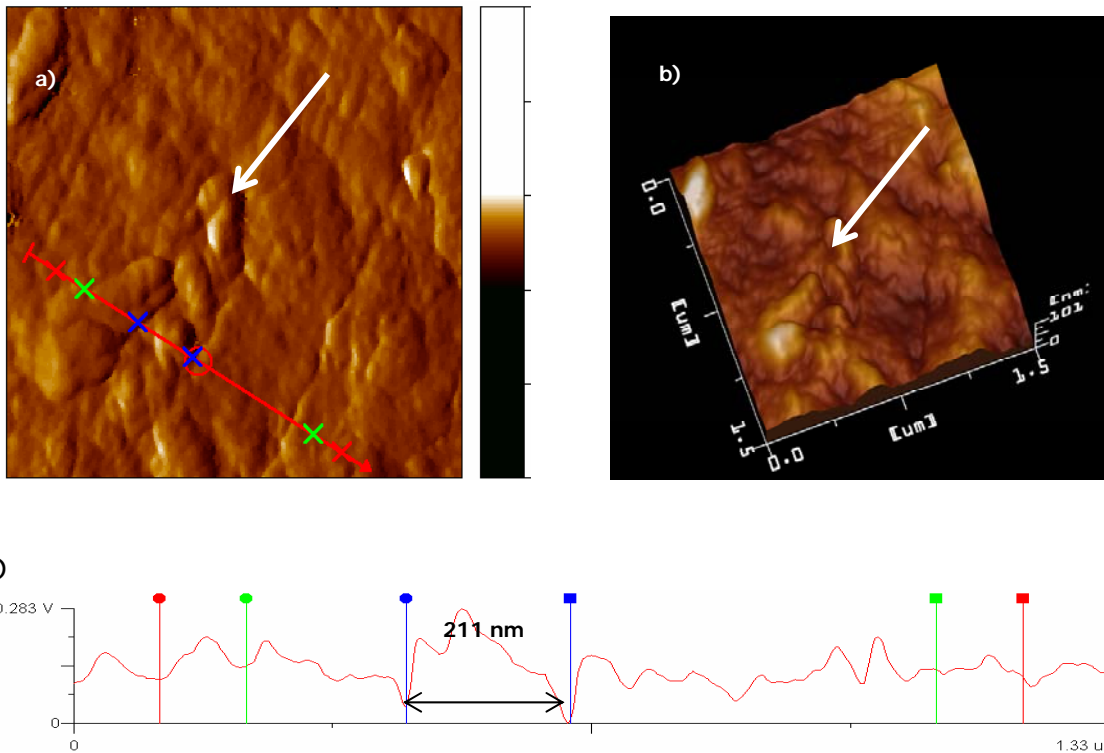
Las muestras de hueso desmineralizado fueron tratadas térmicamente para eliminar el agua superficial a 35°C por un intervalo de 2 h. Antes de ser utilizadas en microscopía de fuerza atómica (AFM).

En la figura 48 a), se puede apreciar una geometría rugosa, el círculo indica una agregado al cual se amplió la resolución para su estudio. En la figura 48b), se aprecia una geometría similar a la de un cable de enrollado emergiendo de la superficie. En la siguiente figura se aprecia el agregado de fibras las cuales se encuentran paralelas entre sí.



**Figura 48.** a) Micrografía de MFA de muestra de hueso desmineralizado, escala 1μm y b) Nanografía a escala 500 nm.



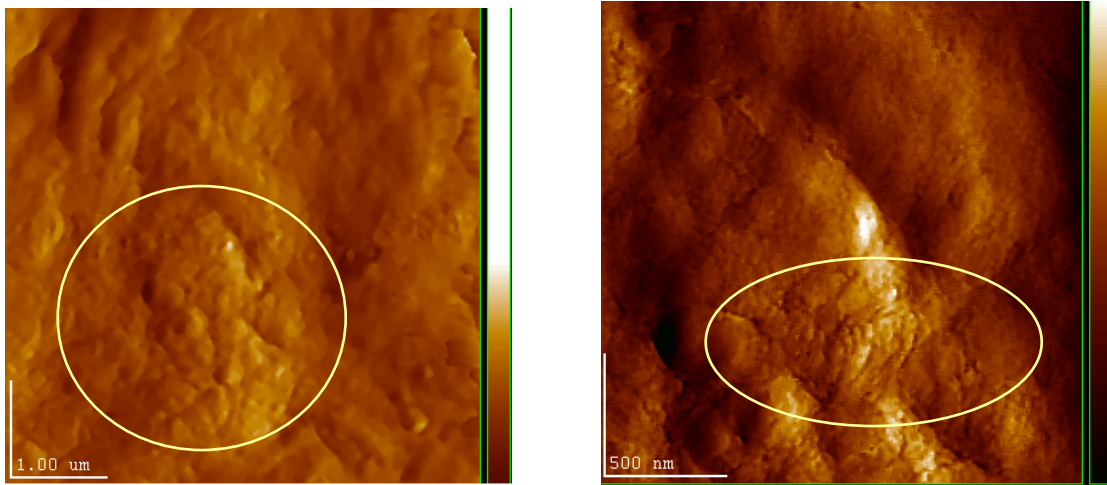


**Figura 49.** Micrografía de MFA de muestra de hueso desmineralizado a) Fibra de colágeno indicando el diámetro de la misma. b) Imagen en proyección 3D. c) sección longitudinal de la fibrilla con diámetro de 211 nm. Las flechas indican el diámetro la fibrilla estudiada.

En la figura 49 b) se muestra una proyección 3D de la figura 49 a) en donde se muestra la topografía de la longitud estudiada y se percibe una geometría estriada y accidentada. Se muestra la sección longitudinal marcada por  $\times \rightarrow \times$  en la figura 49 c) cuyo diámetro es de 211 nm.

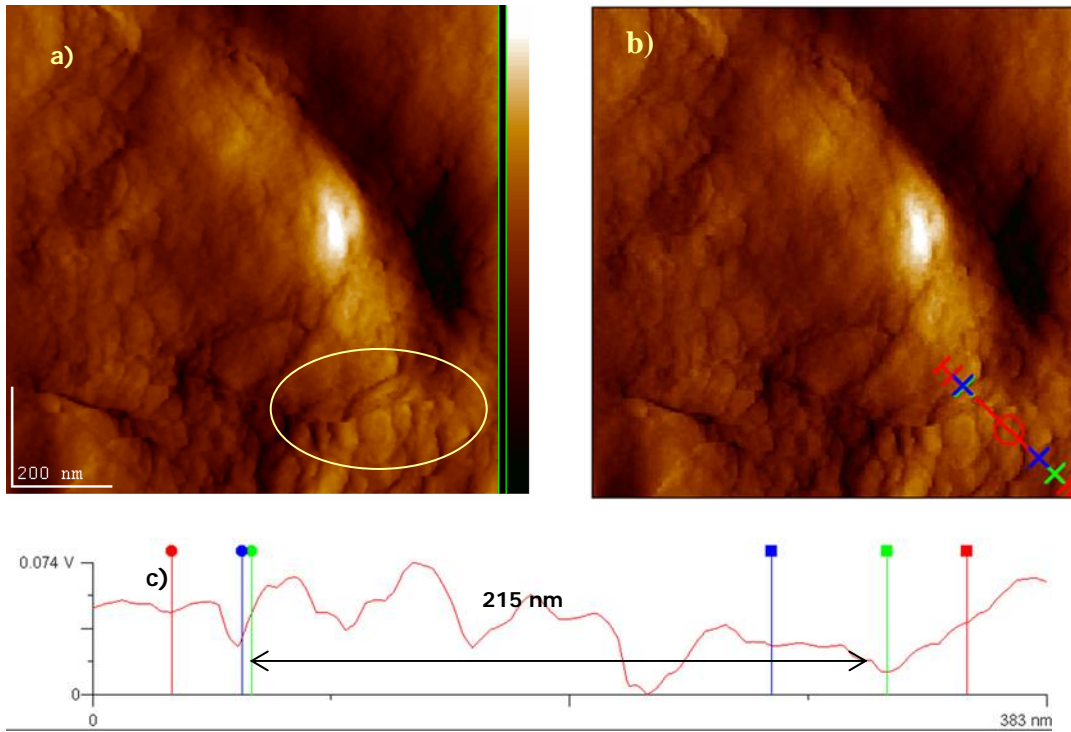
## COLÁGENO TIPO I COMERCIAL

En la figura 50 a), se muestra una superficie rugosa, donde se pueden apreciar agregados tipo estructuras de cilindros de fibras. En la figura 50 b) se muestra una ampliación de la sección elegida donde se aprecian con mayor definición, estas estructuras están compuestas por otras más pequeñas de agregados rugosos.



**Figura 50.** a) Micrografía de MFA de colágeno comercial, donde se aprecia una superficie rugosa flecha intermitente muestra agregados de fibras paralelas, escala 1  $\mu\text{m}$  y b) Nanografía que muestra agregados de fibras, escala 500 nm.

En la figura 51 a), se observan los agregados a una escala de 200 nm, los agregados conservan su acomodo de cable enrollado. En la figura 51 b) se selecciona un agregado y en la figura 51 c) se muestra la sección longitudinal marcada por \*—————\* cuyo diámetro de 215 nm.



**Figura 51.** Nanografía de MFA de colágeno comercial a) flecha indica los agregados de colágeno, escala 200 nm. b) diámetros de agregados de fibras. c) sección longitudinal de agregados de fibras diámetro de 76 nm.

### 3.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE LOWRY

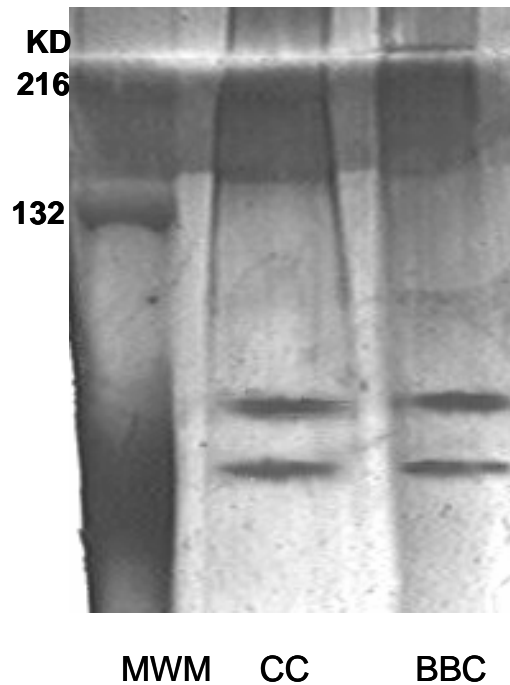
La esponja de colágeno humedecida en la solución amortiguadora pH 7.4, se trituró en un mortero de vidrio. Posteriormente se disolvió en una solución de ácido cítrico 1N por un lapso de 15 días. A la solución madre se concentra en un tubo de centricon 3000 y después se filtra en una columna empacada de shepacryl 5300-HR.

La concentración de colágeno en la solución madre fue de 13  $\mu\text{g/ml}$  mientras que al filtrarlo, la concentración fue de 4.5  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.6 ELECTROFORESIS EN GEL

Colágeno de hueso bovino extraído con ácido cítrico y colágeno comercial fueron analizados por electroforesis en gel de SDS/10% poliacrilamida.

El patrón de colágeno de hueso de bovino obtenido en este trabajo y el patrón de colágeno comercial fueron indistinguibles, como se puede observar en la figura 51. Ya que se presentan dos bandas presentes en la molécula de colágeno. Y no se detecta otro tipo de proteína.



**Figura 52.** Gel de poliacrilamida teñido con plata, donde MWM es el marcador de pesos moleculares (Biorad), CC es el colágeno comercial y BBC es el colágeno de hueso de bovino.

## 4. DISCUSIÓN

Con el objeto de identificar fases de mineral existentes en la muestra desmineralizada del hueso de bovino, se empleó la técnica de difracción de rayos X. Se observó una señal pequeña de material cristalino, la cual corresponde a nanocristales de fosfatos de calcio presentes en la esponja de colágeno.

De los resultados de difracción de rayos X y análisis termogravimétrico, se tiene una componente inorgánica en las muestras de colágeno de hueso ya que a 1000°C subsiste un residuo de 12.68%. En las muestras de colágeno comercial el residuo es de 18.11%, por lo que podemos decir que el colágeno de hueso tiene menor cantidad de residuo que el colágeno comercial.

Las diferentes morfologías de las muestras influyen en la temperatura de desnaturalización [40]. Como puede apreciarse entre las muestras de colágeno de hueso y de colágeno comercial, ya que la primera fueron pedazos pequeños de esponjas de colágeno y la segunda un entramado de fibras, similar al algodón. La diferencia en la densidad entre el colágeno comercial y el colágeno de hueso influye en las curvas de calorimetría diferencial de barrido.

La temperatura de desnaturalización del colágeno cambia según el origen del cual se obtiene [41] y de la velocidad de calentamiento, es además directamente proporcional al logaritmo de la velocidad de calentamiento [41].

En la literatura se ha reportado para el colágeno tipo I una morfología descrita como "cable enrollado" correspondiente a la molécula de colágeno la cual se presenta en el colágeno de diferentes fuentes [42] y [43]. Para esta morfología se han reportado valores para el diámetro del cable del orden de 210 a 215 nm [42], lo cual concuerda con lo observado con microscopía de fuerza atómica en colágeno de hueso y comercial.

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido para colágeno de hueso muestran las diferencias en la microestructura de la esponja. En los casos de colágeno de hueso y el colágeno comercial poseen un arreglo fibrilar y superficie estriada.

La cuantificación de proteína por el método de Lowry comprueba que al estar expuesta en ácido cítrico la proteína de colágeno de hueso se solubiliza. Las concentraciones fueron suficientes para utilizarlas en electroforesis.

Con la técnica de electroforesis se logró separar las cadenas  $\alpha 1(I)$  y  $\alpha 2(I)$  que conforman el colágeno tipo I y de esta manera se corrobora que utilizando el método LEDE, se preserva la proteína en cuestión.

## 4. DISCUSIÓN

Con el objeto de identificar fases de mineral existentes en la muestra desmineralizada del hueso de bovino, se empleó la técnica de difracción de rayos X. Se observó una señal pequeña de material cristalino, la cual corresponde a nanocristales de fosfatos de calcio presentes en la esponja de colágeno.

De los resultados de difracción de rayos X y análisis termogravimétrico, se tiene una componente inorgánica en las muestras de colágeno de hueso ya que a 1000°C subsiste un residuo de 12.68%. En las muestras de colágeno comercial el residuo es de 18.11%, por lo que podemos decir que el colágeno de hueso tiene menor cantidad de residuo que el colágeno comercial.

Las diferentes morfologías de las muestras influyen en la temperatura de desnaturalización [40]. Como puede apreciarse entre las muestras de colágeno de hueso y de colágeno comercial, ya que la primera fueron pedazos pequeños de esponjas de colágeno y la segunda un entramado de fibras, similar al algodón. La diferencia en la densidad entre el colágeno comercial y el colágeno de hueso influye en las curvas de calorimetría diferencial de barrido.

La temperatura de desnaturalización del colágeno cambia según el origen del cual se obtiene [41] y de la velocidad de calentamiento, es además directamente proporcional al logaritmo de la velocidad de calentamiento [41].

En la literatura se ha reportado para el colágeno tipo I una morfología descrita como "cable enrollado" correspondiente a la molécula de colágeno la cual se presenta en el colágeno de diferentes fuentes [42] y [43]. Para esta morfología se han reportado valores para el diámetro del cable del orden de 210 a 215 nm [42], lo cual concuerda con lo observado con microscopía de fuerza atómica en colágeno de hueso y comercial.



Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido para colágeno de hueso muestran las diferencias en la microestructura de la esponja. En los casos de colágeno de hueso y el colágeno comercial poseen un arreglo fibrilar y superficie estriada.

La cuantificación de proteína por el método de Lowry comprueba que al estar expuesta en ácido cítrico la proteína de colágeno de hueso se solubiliza. Las concentraciones fueron suficientes para utilizarlas en electroforesis.

Con la técnica de electroforesis se logró separar las cadenas  $\alpha 1(I)$  y  $\alpha 2(I)$  que conforman el colágeno tipo I y de esta manera se corrobora que utilizando el método LEDE, se preserva la proteína en cuestión.

## 5. CONCLUSIONES

El proceso LEDE propuesto en esta tesis da buenos resultados ya que la fase mineral residual es menor que la existente en colágeno de hueso de piel.

El proceso LEDE para obtener colágeno a partir de hueso conserva las fibras, la estructura de cable enrollado y la superficie estriada características de la proteína.

La temperatura de desnaturalización depende de las condiciones en las que se determine, ya que influyen: la velocidad de calentamiento, la fuente de donde proviene el colágeno y la morfología del mismo.

La solubilización con ácido cítrico resultó adecuada por que sólo en 15 días se obtuvo concentración suficiente para realizar posteriores estudios de biología molecular.

Con el proceso LEDE se preserva el colágeno tipo I proveniente de hueso de bovino, ya que no existe diferencia entre el colágeno comercial y el que proviene de hueso. Además de que no se presentan otras proteínas.

La obtención de matrices de colágeno representa un primer paso para el desarrollo de andamios para ingeniería de tejidos ya que sus características microestructurales son fundamentales para la siguiente etapa, conformada por el cultivo y crecimiento de células. Además, si sumamos a estas la ventaja de su capacidad autoinductora de tejido óseo resulta ser una buena opción para hacer andamios celulares.

## 6. REFERENCIAS

- [1] Shu-Tung Li. Biologic Biomaterials. Tissue-Derived Biomaterials (Collagen). Biomaterials principles and applications. CRC Press (Boca Ratón, Florida), 2003: 117-139.
- [2] Hutmacher DW. Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage. Biomaterials, 2000; 21: 2529-2543.
- [3] Gomes ME, Salgado A, Reis RL. Ingeniería de Tejidos: Principios Básicos, Soportes y Células Madre. Biomateriales. Ed. Faenza Iberica (Italia), 2004: 473-487.
- [4] Abraham GA, Cauich JV, Peniche C, Gallardo A. Biopolímeros de Origen Natural. Biomateriales. Ed. Faenza Iberica (Italia), 2004: 109 - 117.
- [5] Pachence JM. Collagen-Based Devices for Soft Tissue Repair. Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials), 1996;33:35-40.
- [6] Yannas IV. Biologically Active Scaffolds Based on Collagen-GAG Copolymers. Scaffolding in Tissue Engineering. CRC Press (Boca Ratón, Florida), 2006: 3-12.
- [7] Fanter GE. et al. Influence of the degradation of the organic matrix on the microscopic fracture behavior of trabecular bone. Bone, 2004; 35: 1013– 1022.
- [8] TenHuisen K.S. et. al. Formation and properties of a synthetic bone composite: Hidroxiapatite-collagen. J. of Biomedical Materials Research, 1995; 29: 803-810.
- [9] Hutmacher D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials. 21 (2000) 2529-2543.
- [10] Walsh W.R. Christiansen D.L. Demineralized bone matrix as a template for mineral-organic composites. Biomaterials, 1995;16: 1363-1371.
- [11] Jayaraman M. Subramanian MV. Preparation and characterization of two new composites: collagen-brushite and collagen octa-calcium phosphate. Med Sci Monit, 2002; 8 (11): BR481-BR487.

- [12] Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP. Localized delivery of growth factors for bone repair. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2004; 58: 197-208.
- [13] Moore KL. Generalidades anatómicas. *Anatomía con orientación clínica*. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana S. A (Buenos Aires, Argentina), 1999: 14-17.
- [14] Junqueira LC, Carneiro J. Tejido Óseo. *Histología Básica*. 4ta ed. Masson S.A (Barcelona), 1996.
- [15] Murray RK, Keeley FW. The extracellular matrix. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26<sup>th</sup> ed. McGraw Hill Companies (New York), 2003.
- [16] Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology: Text & Atlas*, 10<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill (New York), 2003.
- [17] Pardo A. La matriz extracelular y los diferentes tipos de colágena. *Rev. Nal. Enf. Resp. Méx*, 1993; 6 (3):156-164.
- [18] Champe PC., Harvey RA. y Ferrier DR. *Proteínas Fibrosas*. Bioquímica. 3er ed. McGraw Hill (México), 2006: 49 – 60.
- [19] Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.*, 1995; 64: 403-434.
- [20] Piez K. History of Extracellular Matrix: A personal View. *Matrix Biology*, 1997; 16: 85-92.
- [21] Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J*, 1991; 5: 2814-2823.
- [22] Shu – Tung Li. *Biologic Biomaterials: Tissue-Derived Biomaterials (Collagen)*. *Biomaterials: Principles and Applications*. CRC Press (Boca Raton, Florida), 2003: 117-139.
- [23] Geneser F. Tejido Conjuntivo. *Histología* 3er ed. Editorial Médica Panamericana (Buenos Aires), 2000: 197-225.
- [24] Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. *Glucosaminoglucanos y glucoproteínas*. Bioquímica. 3er edición. Ed. McGraw Hill Companies (México), 2005: 181-197.

- [25] Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Estructura de los oligosacáridos glucoproteínicos. Bioquímica. 3er edición. Ed. McGraw Hill Companies (México), 2005: 181-197.
- [26] Wingrove AS. Caret RL. Lípidos: Grasas y Aceites. Química Orgánica. Ed. Harla S. A. de C. V (México). 1984: 1245 – 1260.
- [27] Wade. Lipids. Organic Chemistry. 5th Edition. Ed. Pearson Education Inc. (New Jersey), 2004: 1162 – 1169.
- [28] Champe PC., Harvey RA., Ferrier DR. Metabolismo de los lípidos. Bioquímica. 3er edición. Ed. McGraw Hill Companies (México), 2005: 199 - 230.
- [29] Wade. Structure and Properties of Organic Molecules. Organic Chemistry. 5th Edition. Ed. Pearson Education Inc. (New Jersey), 2004: 64 – 66.
- [30] Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. Science, 1965 ;150: 893-899.
- [31] Xu Cao, Di Chen. The BMP signaling and in vivo bone formation. Gene, 2005; 357: 1 – 8.
- [32] Sibilia JP. X ray analysis. A guide to materials characterization and chemical analysis. VCH Publishers Inc. (New York), 1988: 115 -119.
- [33] Smith W. Estructuras y geometrías cristalinas. Fundamentos de la ciencia e ingeniería de materiales. 2ª ed McGraw Hill (México), 1993: 107-113.
- [34] Skoog DA, West DM. Métodos Térmicos. Análisis Instrumental. 1ª edición. Mc.Graw Hill (México), 1992: 683-690.
- [35] Willard H.H. Análisis Térmico. Métodos Instrumentales de Análisis. 1ª edición. Compañía Editorial Continental S.A. de C.V. (México), 1986: 629-649.
- [36] Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Biomaterials Science an Introduccton to Materials in Medicine. Microscopy for Biomaterials Science. 2<sup>nd</sup> Edición. Elsevier Academic Press (Estados Unidos), 2004: 40-59.

- [37] Comunicación personal con Dr. Jaime Santoyo S. Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM. 05 de diciembre de 2006.
- [38] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951; 193: 265-275.
- [39] Burriel F. Métodos Ópticos. Química Analítica Cuantitativa. 14va Edición. Ed. Paraninfo (México), 1992: 340-356.
- [40] Bucio L. et al. Thermal analysis study of human bone. *Journal of Materials Science*, 2003; 38: 4777 – 4782.
- [41] Leikina E, Merts MV, Kuznetsova N, Leikin S. Type I collagen is thermally unstable at body temperature. *PNAS*, 2002; 99(3): 1314-1318.
- [42] Venturoni M, Gutschmann T, Fantner GE, Kindt JH, Hansma PK. Investigations into the polymorphism of rat tail tendon fibrils using atomic force microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Comm.*, 2003; 303: 508-513.
- [43] Thalhammer S, Heckl WM. Atomic Force Microscopy for High Resolution Imaging of Collagen Fibrils- A New Technique to Investigate Collagen Structure in Historic Bone Tissue. *Journal of Archaeological Science*, 2001; 28: 1061-1068.

## **NOMENCLATURA**

Con el fin de homogenizar el vocabulario especializado utilizado en la ciencia de los biomateriales a continuación se agregan las siguientes definiciones.

### **BIOABSORBIBLE**

Condición de ciertos biomateriales que, luego de ser implantados en un tejido del organismo, experimentan fenómenos de disolución en los fluidos corporales.

### **BIOACTIVIDAD**

Capacidad de un material para inducir, estimular, provocar o modular una acción biológica definida en el tejido receptor. Así, un material bioactivo es aquel que posibilita una respuesta biológica específica en su interfaz con los tejidos, favoreciendo el enlace de ambos.

### **BIOCOMPATIBILIDAD**

Tolerancia biológica local de cualquier biomaterial, caracterizada por la ausencia de una respuesta inflamatoria aguda o crónica durante su implantación e incorporación, así como por la carencia de efectos nocivos sobre tejidos distantes. Este término es poco preciso, pues ningún material es totalmente biocompatible. De esta forma, la biocompatibilidad se puede denominar más correctamente como Aceptabilidad Biológica, que corresponde a la interacción de los biomateriales con los tejidos susceptibles de estar en contacto con ellos.

### **BIODEGRADACIÓN**

Descomposición, rotura o lisis de un material mediada por un sistema biológico, que se produce como consecuencia de la actividad celular, enzimática, bacteriana o viral, concluyendo con su desaparición.

### **BIOMATERIAL**

Sustancia natural o sintética, o combinación de sustancias, que puede implantarse en el organismo para tratar, restituir, sustituir o aumentar un tejido, órgano o función <sup>3,34</sup>.

### **BIORREABSORBIBLE**

Condición que poseen algunos biomateriales de degradarse en componentes de menor peso molecular, ya sea a través de las vías metabólicas u otras rutas alternativas del organismo.

### **IMPLANTE**

Producto diseñado para ser implantado totalmente en el cuerpo humano, o para sustituir una superficie epitelial o la superficie ocular mediante intervención quirúrgica y destinado a permanecer allí después de la intervención o por un periodo de al menos treinta días.

### **INJERTO**

Tejido u órgano que luego de ser separado de su origen se inserta en un lugar del organismo, ya sea en el propio, en el de otro o en el de otra especie. Se caracteriza por que una vez implantado se puede rehabilitar y se mantiene vital gracias a los tejidos vivos del receptor.

### **OSTEOCONDUCCIÓN**

Propiedad pasiva de un material o tejido de recibir y guiar el crecimiento óseo, por medio de la invasión vascular y celular proveniente del tejido óseo vivo del receptor.

### **OSTEOINDUCCIÓN**

Capacidad de un material para promover la diferenciación celular hacia la síntesis de matriz ósea mineralizada, mediada por los factores locales de crecimiento.

### **SOPORTE BIOMECÁNICO**

Función física de mantenimiento y sostén, otorgado por una estructura anatómica.

### **SUSTITUTIVO**

Material o segmento tisular capaz de desempeñar las funciones de otro tejido del organismo. De acuerdo con esto, solamente los biomateriales que poseen propiedades de osteoconducción y osteointegración pueden considerarse verdaderos sustitutivos óseos.



## **TRASPLANTE**

Implante de un tejido u órgano que requiere de una anastomosis vascular para mantener su viabilidad celular. El más representativo para la reparación ósea es el hueso autólogo vascularizado que se denomina, comúnmente, injerto óseo vascularizado.

## **AUTOINJERTO**

Corresponde al injerto óseo obtenido del propio individuo, siendo considerado como el sustituto óseo que posee las mejores características biológicas.

## **ALOINJERTO**

Injerto extraído de un donante que se implanta en un receptor perteneciente a la misma especie, pero con distinto genotipo.

## **XENOINJERTO O HETEROINJERTO**

Injertos que se implantan entre individuos de especies diferentes.