

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

**“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COLÁGENA  
TIPO I A PARTIR DE TENDÓN BOVINO”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIA**

**E INGENIERÍA DE MATERIALES**

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

**I. Q. KARLA KARINA GÓMEZ LIZÁRRAGA**

Tutor: Dra. María Cristina Piña Barba



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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**

A mis padres y hermanos por brindarme siempre su apoyo, cariño y ánimos para culminar todos mis proyectos de vida.

A la Dra. María Cristina Piña Barba por permitirme trabajar a su lado, apoyarme con sus observaciones, contactos y material para poder llevar a cabo este trabajo, pero especialmente muchas gracias por su confianza y amistad.

A todos mis compañeros del laboratorio de biomateriales: Rodrigo, Alejandro, Carolina Guzmán; a Caro Jr. por estar siempre al pie del cañón, muchísimas gracias. A Zulema, Gerardo, Ismael y Daniel por despejarme mis dudas académicas, pero sobre todo por escucharme en los momentos de tristezas y alegrías, por su complicidad, sincera amistad, confianza, paciencia y regalarme lo mejor de cada uno de ustedes, los quiero chicos.

A mi amiga Nayeli Rodríguez Fuentes por enseñarme, guiarme y siempre apoyarme, a pesar de sus múltiples ocupaciones en todo lo referente a la parte biológica de este estudio; así como a su infinita amistad y entusiasmo.

A mis amigos de la Facultad de Química “Ilusas” que sin estar al 100% en contacto, siempre los tengo presentes.

A mi gran amor Edgar, por ser quien es, por sus ánimos, comprensión, cariño y apoyo.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme una vez más concluir con una etapa de mis estudios y por permitirme disfrutar de experiencias gratificantes.

A los técnicos Omar Novelo Peralta y Esteban Fregoso Israel por su ayuda en la caracterización de mis muestras.

A todas las instituciones que fueron partícipes para que se llevará hasta su final este trabajo: Instituto Nacional de Rehabilitación- Dr. Fernando Edgar Kröttsch Gómez, al Hospital General “Dr. Manuel Gea González”- Dra. Mirza Romero y al Instituto de Fisiología- técnico-académico Marcela.

A CONACYT y al proyecto de DGAPA-PAPIIT IN104008 por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de maestría.

# ÍNDICE

Capítulo 1	
Introducción	1
Capítulo 2	
Marco Teórico	3
2.1 Biomateriales	3
2.2 Tendón	6
2.2.1 Organización de la estructura del tendón	6
2.3 Proteínas	7
2.3.1 Estructura de las proteínas	7
2.4 Colágena	9
2.4.1 Síntesis de la colágena	11
2.4.2 Estructura de la colágena	13
2.4.3 Estabilidad de la molécula de colágena	14
2.4.4 Entrecruzamiento de las moléculas de colágena	15
2.4.5 Formación de las fibras de la molécula de colágena	17
2.4.6 Niveles de estructura de la molécula de colágena	18
2.4.7 Solubilidad de la colágena	19
2.4.8 Colágena como biomaterial	21
2.4.9 Inmunogenicidad de la molécula de colágena	23
2.5 Técnicas de caracterización	24
2.5.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida	24
2.5.1.1 Equipo y Mecanismo de formación del gel	24
2.5.1.2 Tamaño de poro del gel de poliacrilamida	26
2.5.1.3 Condiciones de Electroforesis	27
2.5.1.4 Sistemas de electroforesis	28
2.5.2 Western Blot	29
2.5.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	31
2.5.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	34
2.5.5 Espectrofotometría de absorción en la región del visible	37

Capítulo 3	39
Método Experimental	
3.1 Objetivos	39
3.1.1 Objetivo General	39
3.1.2 Objetivos Particulares	39
3.2 Materia Prima y Reactivos	39
3.3 Metodología	39
3.3.1 Preparación del tendón	39
3.3.2 Extracción de la colágena	41
3.3.3 Purificación de colágena	42
3.3.4 Condiciones de trabajo	43
3.4 Cuantificación de colágena	44
3.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS ( SDS-PAGE)	45
3.6 Transferencia de proteínas	46
Capítulo 4	
Resultados y Discusión	48
4.1 Determinación del contenido de colágena	48
4.2 Caracterización de las muestras por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio	52
4.2.1 Patrón Electroforético en Variante I	53
4.2.1.1 Descripción del patrón electroforético	53
4.2.2 Patrón Electroforético en Variante II	54
4.3 Caracterización por Western Blot	58
4.4 Calorimetría Diferencial de Barrido	60
4.5 Microscopía Electrónica de Barrido	83
4.6 Discusión General	92
Capítulo 5	
Conclusiones	96
Perspectivas	97
Referencias	98

## LISTA DE ABREVIATURAS

Fe	Hierro
Cr	Cromo
Ni	Níquel
Mo	Molibdeno
Ti	Titanio
Al	Aluminio
PET	Polietilentereftalato
PP	Polipropileno
PVC	Policloruro de vinilo
PMM	Polimetilmetacrilato
PTFE	Politetrafluoroetileno
PS	Poliestireno
PA	Poliamida
PE	Polietileno
PU	Poliuretano
R	Cadena lateral
GAG	Glucosaminoglucanos
FACIT	Asociación de fibrillas de colágena con interrupción en la triple Hélice
MACIT	Asociación de membranas de colágena con interrupción en la triple hélice

P3H	Proil3-hidroxilasa
P4H	Proil4-hidroxilasa
LH	Lisilhidroxilasa
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ERR	Retículo endoplasmático rugoso
Gly	Glicina
Pro	Prolina
Hyp	Hidroxiprolina
pI	Punto isoelectrico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
CHAPS	(3-[(3-Colamidopropil)- dimetilamonio]-propano sulfonato)
DTT	Ditiotreitol
PEAD	Polietileno de alta densidad
NDGA	Ácido nordihidroguaiarético tetra-O-metilo
PLLA	Poli(ácido-L-láctico)
V	Movilidad
q	Carga neta
E	Campo eléctrico
f	Coefficiente de fricción
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida



TEMED	N,N,N'.N'-Tetrametiletilendianina
ND-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
PM	Masa molecular
Rf	Movilidad electroforética relativa
PVDF	Poli (fluoruro de vinilideno)
Ab	Anticuerpo
DAB	3,3' diaminobenzidina
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
Au	Oro
C	Carbono
Pt	Platino
Ag	Plata
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
T	Transmitancia
Po	Potencia radiante incidente
P	Potencia radiante absorbida
A	Absorbencia o factor preexponencial
$\epsilon$	Coefficiente de absorción molar
TIF	Rastro tipo Inspección Federal
NaCl	Cloruro de sodio
HCl	Ácido clorhídrico

RPM	Revoluciones por minuto
UV	Radiación ultravioleta
w/w	Porcentaje en masa
v/v	Porcentaje en volumen
PBS	Tampón fosfato salino
$T_d$	Temperatura de desnaturalización
$T_m$	Temperatura media
$C_p$	Capacidad calorífica
N	Estado nativo
U	Estado desnaturalizado final
D	Estado desnaturalizado
v	Velocidad de calentamiento
R	Constante de los gases
$E_A$	Energía de activación
K	Constante de equilibrio
k	Constante de velocidad

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**

### **RESUMEN**

El empleo de algunos materiales destinados para ciertas aplicaciones médicas se remonta a las antiguas civilizaciones. Sin embargo, el desarrollo de los biomateriales como una ciencia surge a mediados del siglo XX, como una consecuencia de la segunda guerra mundial.

La ciencia de los biomateriales, es interdisciplinaria y tiene como objetivo el estudio, investigación, desarrollo y caracterización de materiales que ayudan en la regeneración, completan, o aumentan tejidos biológicos y/o sus funciones. Los biomateriales se toleran en el organismo, y en el mejor de los casos, cuando la aceptación es del 100%, decimos que se comportan como químicamente inertes.

Los materiales utilizados como biomateriales pueden dividirse en dos clases, sintéticos y naturales. Uno de los biomateriales de origen natural más empleado es la colágena y específicamente la colágena tipo I, debido a que es un constituyente principal del tejido conectivo en los mamíferos, por lo que al introducirse en el organismo es fácilmente aceptado. En este trabajo, nos referiremos a la colágena tipo I simplemente como colágena.

El punto de partida para la innovación de los métodos de extracción de la colágena tipo I es el conocimiento de su estructura y por ende de sus propiedades físicas, químicas, mecánicas y biológicas.

Las principales fuentes de colágena tipo I a nivel industrial son la piel y huesos de cerdos y bovinos [1], esto se debe a que la colágena tipo I de estas especies es equivalente a la colágena tipo I de los humanos, sólo en la región telopéptida prevalecen las diferencias. Sin embargo, investigaciones recientes de científicos japoneses han reportado una fuente alterna para la obtención de colágena tipo I a partir de organismos marinos. Mizuta, Hwang & Yoshinaka 2002; Kittiphattanabawon, Benjaku,

Visessanguan, Nagai & Tanaka 2005 [2, 3] hicieron uso de ciertas especies de peces para la extracción de colágena tipo I.

Para la extracción de colágena, la mayor parte de los métodos involucra la solubilización de esta, aproximadamente el 2% de la colágena de un tejido es solubilizable en solventes ácidos y salinos [4]. El 98% remanente se denomina colágena insoluble.

La colágena una vez aislada y purificada puede ser procesada en una gran variedad de formas para su uso, tales como membranas, tubos, esponjas, polvo, disoluciones inyectables, en materiales compuestos, entre otras. Actualmente se lleva a cabo el estudio de la colágena tipo I para utilizarla como andamio y como medio de transporte en sistemas de liberación de fármacos [5]. De lo anterior se desprende el gran interés en la colágena tipo I, ya que posee excelentes atributos y el potencial para ser explotada al máximo como un biomaterial de alta calidad.

Es así, que en este trabajo se propone un método para aislar y extraer colágena tipo I a partir de tendón de bovino, soluble en medio ácido y mediante el uso de pepsina para un mayor rendimiento en su concentración, así como modificar la concentración de sales durante el proceso de purificación y el uso de dos disolventes en el paso final para su disolución. Con el fin de analizar las propiedades de cada disolución obtenida durante los seis procesos elaborados, se realizó un estudio de caracterización para poder determinar algunas propiedades como son temperatura de desnaturalización, grado de entrecruzamiento, pureza y morfología de cada muestra sólida.

[1] Torres Arreola W., Pacheco Aguilar R., Sotelo Mundo R.R, Rouzaud Sáñez O., Ezquerro Brauer J.M. Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Ciencia y Tecnología Alimentaria* **6** (2008): 101-108.

[2] Mizuta S., Hwang J.H., Yoshinaka R. Molecular species of collagen from wing muscle of skate (*Raja kenosjei*). *Food Chemistry* **76** (2002): 53-58.

[3] Kittiphattanabawon P., Benjakul S. Visessanguan W., Nagai T., Tanaka M. Characterization of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chem.* **89** (2005): 363-372.

[4] Gross Jerome, Hightberger John H., Schmitt Francis O. Extraction of collagen from connective tissue by neutral salt solutions. *Biochemistry* **41** (1955): 1-7.

[5] Hsiu-O Ho, Lun-Huei Lin, Ming-Thau Sheu. Characterization of collagen isolation and application of collagen gel as a drug carrier. *Journal of Controlled Release* **44** (1997):103-112

## **CAPÍTULO 2**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Biomateriales**

Anteriormente las medidas tomadas para poder salvar la vida de una persona, se puede decir que eran dramáticas, ya que en caso de ser necesaria se realizaba la amputación de alguna extremidad o la extracción de algún órgano ó tejido. En la actualidad aún se realiza ésta práctica, aunque ahora con menor frecuencia y como última opción para la recuperación del individuo. Esto es debido a la contribución de nuevos materiales y medicamentos que han permitido un gran avance en el tratamiento de ciertas enfermedades, mejorando así la calidad de vida de las personas.

El campo de la ciencia de los biomateriales data de siglos atrás en la antigua Grecia y China, así como en Egipto, donde usaron materiales como la madera para el uso de prótesis [6], la tripa de gato como material de sutura, entre otros. Sin embargo, ha sido hasta mediados el siglo XX que el diseño y uso de dispositivos médicos a base de materiales sintéticos y naturales es que avanzó rápidamente.

Los biomateriales se pueden definir como materiales destinados a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo humano [7]. Un biomaterial debe cumplir ciertas condiciones, esto es, ser biodegradable, biocompatible.

La biocompatibilidad, que de acuerdo con el consenso realizado por la Sociedad Europea de Biomateriales llevada a cabo en 1986 en Chester, UK, se define como la capacidad de un determinado material para dar una respuesta apropiada a una situación específica. Sin embargo, la introducción de cualquier material al organismo provoca una respuesta, la cual en gran medida depende de la naturaleza, composición, morfología, tamaño, geometría y propiedades superficiales del implante.

La biodegradabilidad es la descomposición de un material mediada por un sistema biológico, es decir, es la respuesta pasiva del material a las condiciones fisicoquímicas

encontradas en el organismo, tales condiciones están dadas por la temperatura, pH, y el ataque de enzimas. Dependiendo del uso que se le quiera impartir al biomaterial, se puede calificar de buena o mala a esta propiedad, es decir, cuando se coloca una prótesis ortopédica se desea que el tiempo de vida útil de ésta sea prolongado y funcione de manera eficiente, sin embargo, cuando se utiliza un biomaterial para encapsular un fármaco, lo indispensable es que este se degrade a cierto tiempo para que vaya liberando de forma controlada a la sustancia activa, es decir, debe desintegrarse apropiadamente por mencionar alguna característica.

Dentro de los materiales empleados como biomateriales se tienen: a los metales, cerámicas, polímeros y materiales compuestos, como por ejemplo cemento reforzado con fibras de polímero.

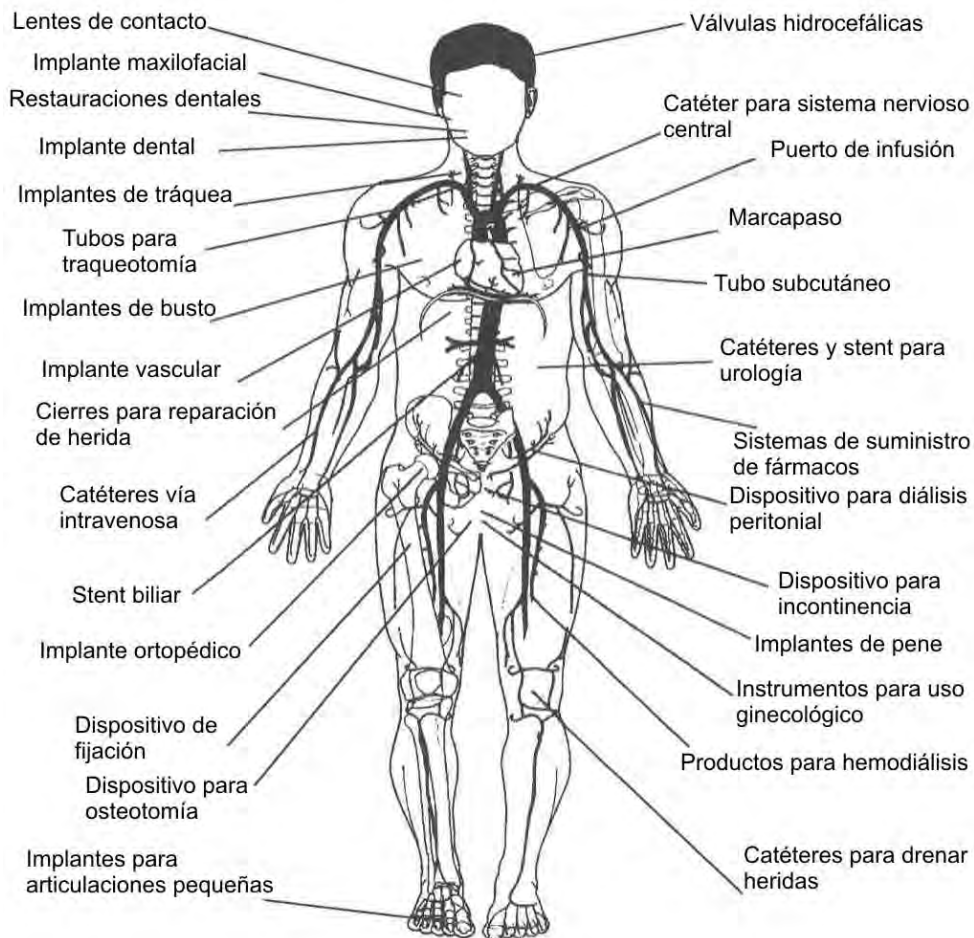
Con respecto a los metales, los más utilizados son: el acero inoxidable 316L (Fe, 16-18% Cr, 10-14 % Ni y del 2 al 3 % de Mo), aleaciones cromo-cobalto, titanio puro y sus respectivas aleaciones siendo las más importante la aleación Ti-6Al-4V. Ya que todos estos muestran buenas propiedades mecánicas, como son resistencia a la corrosión, tracción, dureza y biocompatibilidad, generalmente se usan para aplicaciones estructurales, como son las prótesis, tornillos o implantes dentales.

Las biocerámicas se utilizan en la reparación y reconstrucción de tejidos. Se dividen en tres clases, (1) bioinertes: no reaccionan con el medio fisiológico, ej. Alúmina ( $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) y zirconia ( $\text{ZrO}_2$ ); (2) bioactivas las cuales forman una unión química con el tejido que las rodea, entre ellas están la hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; (3) y las reabsorbibles, que después de cierto tiempo de ser implantadas se disuelven y gradualmente son reemplazados por el tejido, un ejemplo es el fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  o TCP).

Los materiales poliméricos representan el grupo más amplio y variado de biomateriales debido a su gran versatilidad, y es que debido al método empleado para su síntesis, se pueden obtener un gran abanico de propiedades. Los polímeros se dividen en dos grupos, por un lado están los polímeros sintéticos, como el PET, PP, PVC, PMM, PTFE, PS, PA, PE, PU y siliconas; y los polímeros de origen natural que tienen la

ventaja de que el organismo los reconoce y metaboliza con mayor facilidad que los anteriores materiales, por ejemplo: colágena, quitosán, celulosa, etc. [8].

La aplicación de los biomateriales anteriormente mencionados es muy extensa, debido a que abarcan gran parte del campo médico. Se utilizan como implantes dentales, prótesis, biosensores, apósitos, materiales para liberación de fármacos, stent, válvulas, catéteres, lentes de contacto, implantes de mama, materiales de relleno, etc. Ver Fig. 2.1.



**Figura 2.1.** Zonas de aplicación de biomateriales en el cuerpo humano

Actualmente se ha iniciado una nueva etapa en el desarrollo de los biomateriales, con lo que nace la ingeniería de tejidos, esto es la regeneración de tejidos a partir de cultivos celulares “in vitro” y su posterior implantación en el organismo. Así como el desarrollo de andamios, los cuales son un soporte que contiene los factores de crecimiento necesarios para estimular la regeneración tisular “in situ”.

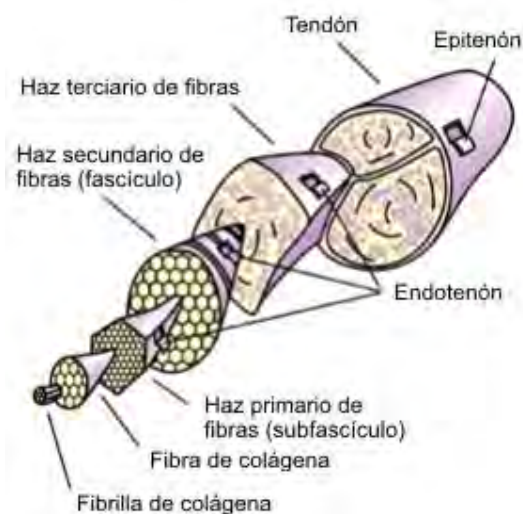
Es por ello que la ciencia de los biomateriales es multidisciplinaria, ya que requiere de los esfuerzos y conocimientos de varios profesionistas, como son médicos, ingenieros, biólogos y químicos para poder desarrollar nuevos materiales que sean menos invasivos dentro del organismo.

## 2.2 Tendón

En su totalidad el mayor constituyente del tendón es la colágena tipo I (~ 85% en masa seca) y agua (~ 55% de la masa húmeda) embebidas en una matriz de proteoglicanos. Otro tipo de moléculas de colágena encontradas en el tendón en menor proporción son colágena tipo III, V, VI y XI [9].

### 2.2.1. Organización de la estructura del tendón

- 1) Las moléculas de colágena tipo I se reúnen en un racimo de fibrillas de cierta periodicidad denominada D correspondiente a 67 nm formando así una fibra, la cual es la unidad básica del tendón.
- 2) Una fina membrana llamada endotenón reviste cada fibra de colágena y las mantiene unidas.
- 3) Un grupo de fibras forma un manajo primario de fibras denominado subfascículo.
- 4) Y un grupo de subfascículos forma un manajo secundario de fibras, fascículo.
- 5) A su vez el fascículo forma un manajo terciario de fibras, las cuales están cubiertas por una capa llamada epitenon. Ver Figura 2.2.



**Figura 2.2.** Estructura del tendón



Un fascículo tiene de 3 a 4 subfascículos y Kastelic y colaboradores en 1978 [10] reportaron que los fascículos del tendón tendrían un poco más de 10-12 subfascículos. Aunque esto varía de tendón en tendón incluso a veces dentro del mismo tendón.

El principal tipo de células existentes son los fibroblastos, responsables de la producción y mantenimiento de los constituyentes del tendón.

## **2.3 Proteínas**

La palabra proteína proviene del griego *protos*, que significa primero o más importante, de ahí que ellas son las macromoléculas biológicas más abundantes, estando presentes en todas las células. Las proteínas desempeñan una amplia variedad de funciones esenciales en los mamíferos. Estas funciones se pueden agrupar en dos clases: dinámicas y estructurales.

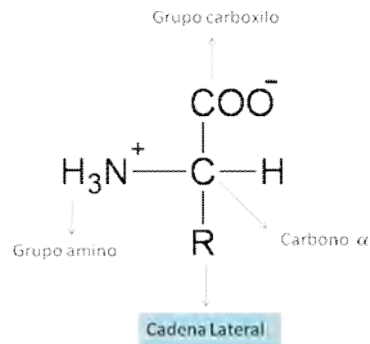
Entre las funciones dinámicas se encuentran el *transporte*, como es el caso de la hemoglobina y mioglobina, que transportan oxígeno en la sangre y en el músculo, respectivamente; la *contracción*, ejemplos de estas proteínas son la miosina y actina ; *catálisis enzimática*, la cual determina las características de las transformaciones químicas en los sistemas biológicos; *protección inmune*, como son los anticuerpos, ejemplo de estas proteínas son la inmunoglobulina y el interferón; *generación y transmisión de los impulsos nerviosos*, siendo la rodopsina un receptor proteico; *control metabólico* [11].

Las funciones estructurales proporcionan la matriz para los tejidos óseos y conjuntivo que dan soporte y forma a los organismos vertebrados. Ejemplo de estas son la colágena, elastina y queratina.

### **2.3.1 Estructura de las proteínas**

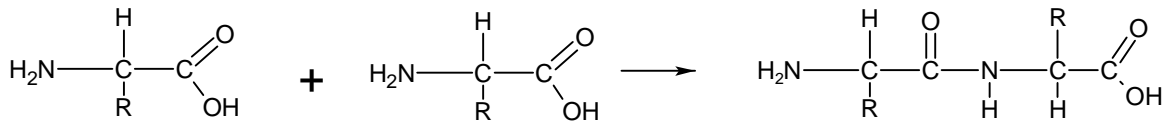
Las proteínas están formadas por un gran número de residuos de aminoácido, los cuales están constituidos por un átomo de carbono central (alfa) al que están unidos covalentemente un grupo carboxilo, un grupo amino, un átomo de hidrógeno y un grupo químico específico, denominado cadena lateral R que es diferente para cada uno

de los 20 aminoácido existentes que son agrupados en 5 clases: apolares alifáticos, aromáticos, polares sin carga, ácidos y básicos. (Ver Figura 2.3)



**Figura 2.3.** Estructura de aminoácido

Estos aminoácidos se unen entre sí para formar cadenas más grandes por medio de enlaces peptídicos (también llamado enlace amídico), que se crean cuando el grupo carboxilo de un aminoácido se une al grupo amino de otro aminoácido, eliminándose una molécula de agua, es decir, a través de una reacción de condensación, con lo que se forma un dipéptido, como se muestra en la siguiente reacción:



**Figura 2.4.** Reacción de condensación mediante la cual se forma el enlace peptídico

De manera similar, si se toma este dipéptido (Fig. 2.4) y un tercer aminoácido y se hacen reaccionar se tendría un tripéptido y se observaría un segundo enlace peptídico, De tal forma que cuando se unen algunos aminoácidos más, el producto sería un oligopéptido o péptido, y de tener unidos muchísimos aminoácidos se tendría un polipéptido o proteína [12].

## 2.4 Colágena

La colágena forma parte de una gran familia de proteínas fibrosas que se encuentran en todos los animales pluricelulares. Es sintetizada por células que se encuentran dispersas en el tejido conjuntivo como son fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, e inmersas en una matriz extracelular compuesta de polisacáridos (GAG).

La colágena es el componente más abundante en la piel, tendón y hueso, por lo que constituye el 25% de la masa total de proteína en los mamíferos.

La familia de proteínas de colágena en los humanos consiste de 27 tipos conocidos hasta ahora. Cada uno de ellos denominado por un número romano y comprendiendo cierta cantidad de cadenas polipeptídica  $\alpha$ . Esta familia se subdivide en diferentes clases de acuerdo a su estructura molecular, como se muestra a continuación:

1. Colágenas fibrilares (tipos I\*, II, III, V\*, XI\*, XXIV y XXVII)
2. Colágenas de membrana basal o formadores de mallas ( IV\*, VIII\* y X)
3. Asociación de fibrillas de colágena con interrupción en su triple hélice, FACIT (tipos IX\*, XII, XIV, XVI, XIX, XX y XXI)
4. Asociación de membranas con interrupción en la triple hélice, MACIT ( tipos XII, XVII, XXIII y XXV)
5. Otro tipo de colágenas como de anclaje ( VII, XV, XVIII y VI\*)

Los tipos de colágena marcados con asterisco corresponden a moléculas heterotrímeros, es decir, tienen dos o tres distintas cadenas polipeptídicas. La colágena tipo IV posee seis diferentes cadenas polipeptídicas que al unirse entre sí, forman tres distintas moléculas [13].

Todas las diferentes clases de colágena forman una triple hélice, sin embargo la longitud de la hélice, así como la naturaleza y tamaño de la porción no helicoidal de la molécula es lo que varía de tipo en tipo.

La distribución en el organismo de algunos de los anteriores tipos de colágena se muestra en la Tabla 2.1 [13].

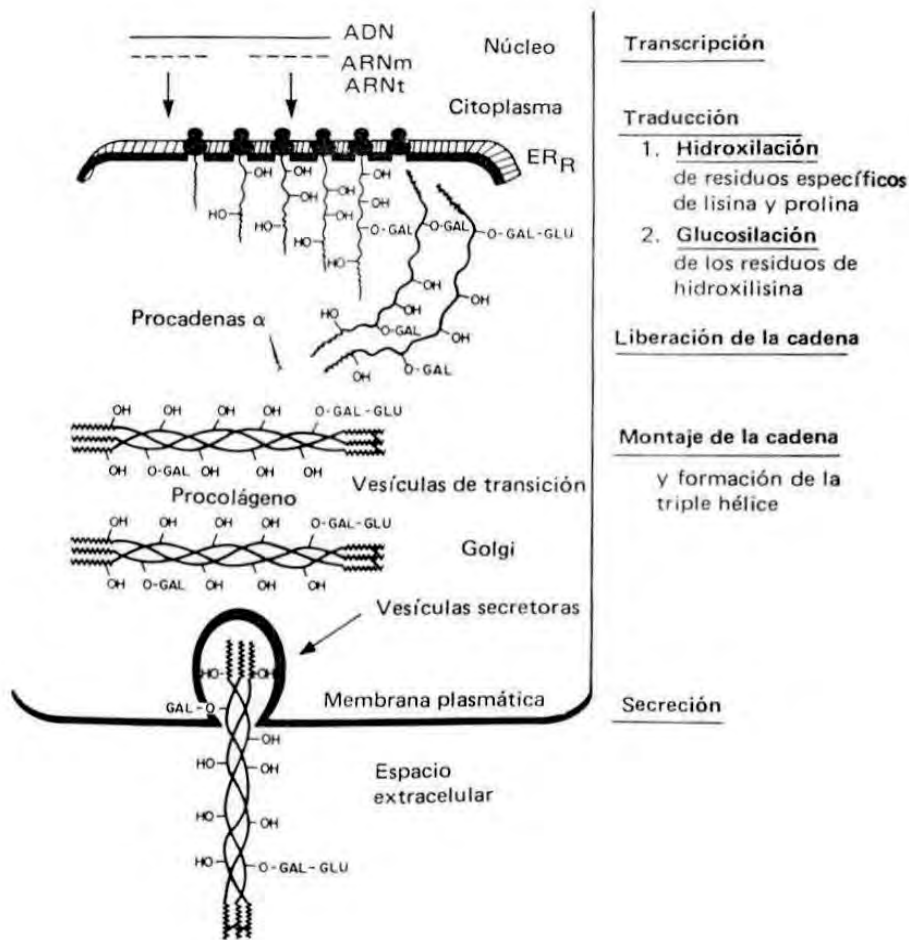
**Tabla 2.1.** Distribución de los diferentes tipos de colágena en el organismo [13].

Tipo	Composición de la cadena	Moléculas	Distribución en los tejidos
I	$\alpha 1(\text{I}), \alpha 2(\text{I})$	$[\alpha 1(\text{I})]_2 \alpha 2(\text{I})$	Piel, hueso, tendón, ligamentos, córnea
II	$\alpha 1(\text{II})$	$[\alpha 1(\text{II})]_3$	Cartílago
III	$\alpha 1(\text{III})$	$[\alpha 1(\text{III})]_3$	Piel, pared de vasos sanguíneos, intestinos, útero
IV	$\alpha 1(\text{IV}), \alpha 2(\text{IV})$ $\alpha 3(\text{IV}), \alpha 4(\text{IV})$ $\alpha 5(\text{IV}), \alpha 6(\text{IV})$	$[\alpha 1(\text{IV})]_2 \alpha 2(\text{IV});$ $\alpha 3(\text{IV})\alpha 4(\text{IV})\alpha 5(\text{IV});$ $[\alpha 5(\text{IV})]_2 \alpha 6(\text{IV})$	Membranas basales
V	$\alpha 1(\text{V}), \alpha 2(\text{V}),$ $\alpha 3(\text{V})$	$[\alpha 1(\text{V})]_2 \alpha 2(\text{V});$ $[\alpha 1(\text{V})]_3;$ $\alpha 1(\text{V}) \alpha 2(\text{V}) \alpha 3(\text{V})$	Hueso, piel, córnea, placenta
VI	$\alpha 1(\text{VI}), \alpha 2(\text{VI}),$ $\alpha 3(\text{VI})$	$\alpha 1(\text{VI})\alpha 2(\text{VI}) \alpha 3(\text{VI})$	Hueso, cartílago, piel, vasos sanguíneos
VII	$\alpha 1(\text{VII})$	$[\alpha 1(\text{VII})]_3$	Piel, mucosa oral, cordón umbilical
VIII	$\alpha 1(\text{VIII}),$ $\alpha 2(\text{VIII})$	$[\alpha 1(\text{VIII})]_2 \alpha 2(\text{VIII})$ $[\alpha 1(\text{VIII})]_3$ $[\alpha 2(\text{VIII})]_3$	Cerebro, corazón, riñón, cartílago
IX	$\alpha 1(\text{IX}), \alpha 2(\text{IX}), \alpha 3(\text{IX})$	$\alpha 1(\text{IX})\alpha 2(\text{IX}) \alpha 3(\text{IX})$	Cartílago, córnea
X	$\alpha 1(\text{X})$	$[\alpha 1(\text{X})]_3$	Cartílago hipertrófico

### 2.4.1 Síntesis de la colágena en el organismo

La síntesis de la molécula de colágena en el organismo se da en una serie de pasos, la cual comienza a nivel intracelular en el retículo endoplasmático y el ribosoma en donde en un principio cada cadena  $\alpha$  es denominada procadena  $\alpha$ .

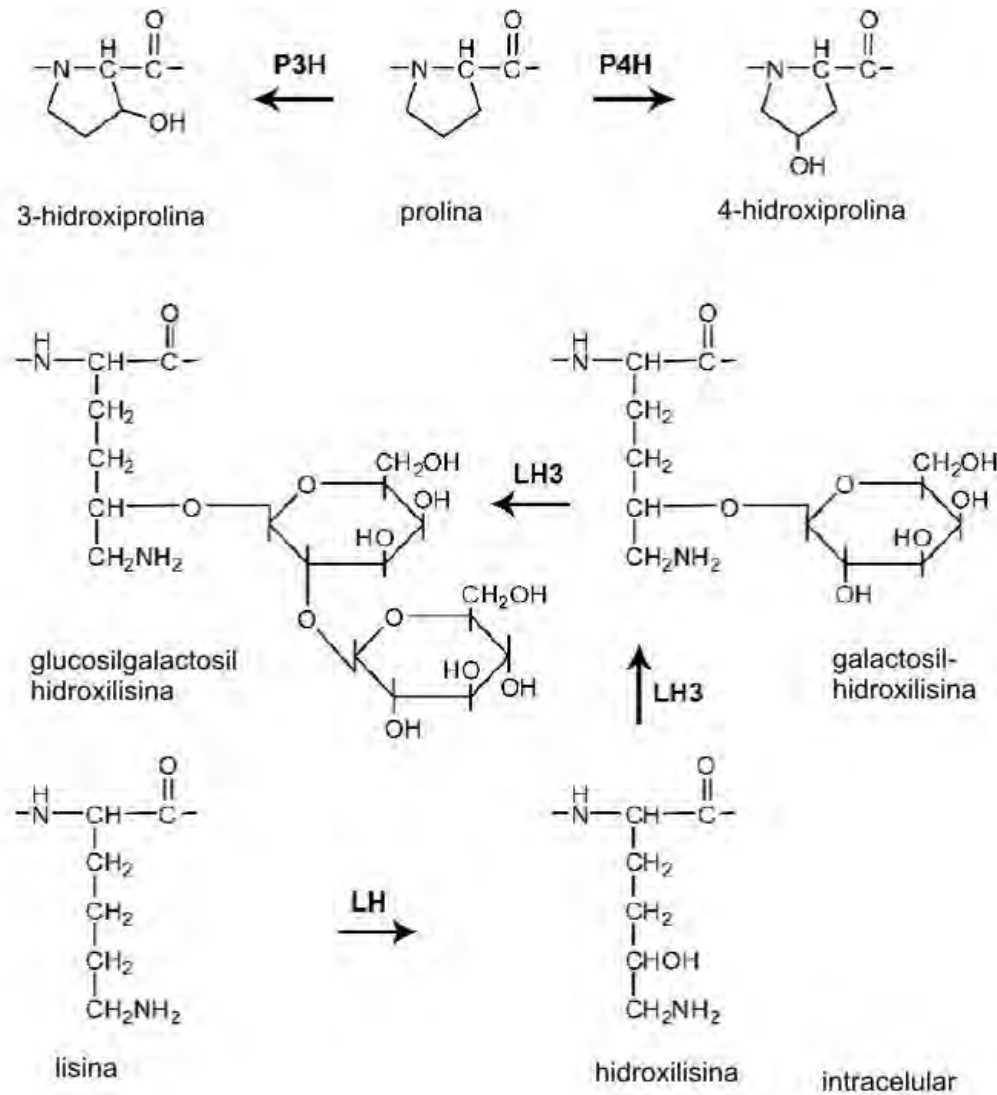
El primer paso es la transcripción del ADN en ARNm, el cual viaja hasta el retículo endoplasmático rugoso (ERR), donde ocurre la traducción mediante el ARNt, proceso por el cual una molécula de ARN mensajero (ARNm) se transforma en una secuencia de aminoácidos (proteínas/enzimas).



**Figura 2.5.** Proceso de síntesis intracelular y extracelular de la colágena

El siguiente paso es la hidroxilación de determinados residuos de prolina y lisina para formar hidroxiprolina e hidroxilisina respectivamente. En ambas hidroxilaciones se requiere de las enzimas prolilhidroxilasa (P3H y P4H) y lisilhidroxilasa (LH), oxígeno,

el sustrato  $\alpha$ -cetoglutarato y como agente reductor ácido ascórbico (Vitamina C) y ascorbato en el caso de la lisina (Figura 2.6) [14].



**Figura 2.6.** Hidroxilación de los residuos de prolina y lisina, así como la glucosilación.

P3H = prolil 3-hidroxilasa; P4H = prolil 4-hidroxilasa; LH = lisilhidroxilasa

El tercer paso es la glucosilación de algunos residuos de hidroxilisina. Usualmente se encuentra un disacárido formado por glucosa y galactosa, estos azúcares se insertan por acción consecutiva de la galactosiltransferasa y la glucosiltransferasa (Figura 2.5).

Estas enzimas glucosilantes son específicas para los residuos de hidroxilisina de la colágena naciente. El número de unidades de azúcares incorporados por unidad de

molécula de colágena dependen del tejido, en el caso del tendón en el cual las moléculas se encuentran en una disposición fibrilar se tienen pocos azúcares, aproximadamente de 6 unidades.

El cuarto paso es la combinación de las procadenas (2 pro- $\alpha$ 1 (I) y pro- $\alpha$ 2 (I)) para formar la molécula helicoidal, denominada procolágena, correspondiente a la etapa de montaje de la cadena de acuerdo con la figura 2.5.

Los propéptidos amino-terminales de ambas procadenas se caracterizan por tener puentes disulfuro intracatenarios, mientras que en los extremos carboxilo-terminales se forman enlaces intercatenarios a través de puentes disulfuros, los cuales no existen en una molécula de colágena.

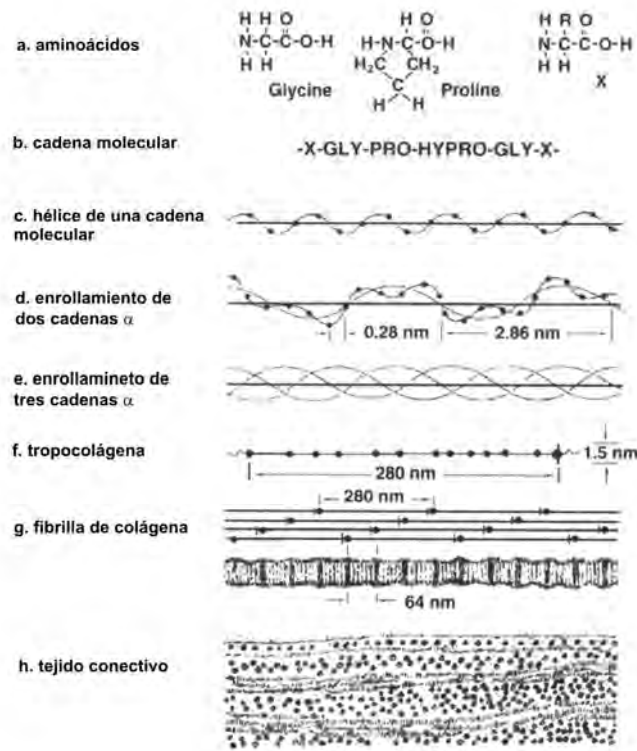
Las procolágenas son empaquetadas por el aparato de Golgi. El quinto paso es la secreción de la procolágena al espacio extracelular y la escisión de los propéptidos a través de proteasas específicas, llamadas procolágena peptidasas.

El sexto paso consiste en que una vez ya formadas las moléculas de colágena en el espacio extracelular se asocien entre sí para formar fibrillas y posteriormente fibras [15].

#### **2.4.2 Estructura de la colágena**

La estructura general de la molécula de colágena está formada por tres cadenas polipeptídicas denominadas cadenas  $\alpha$ . Las tres cadenas alfas que originan a la molécula de colágena (tropocolágena) se enrollan sobre si mismas formando una superhélice dextrógira, esta estructura se divide en dos segmentos: la parte central (helicoidal) y la parte no helicoidal conocida como telopéptido correspondiente a los extremos terminales de la cadena (N-terminal y C-terminal respectivamente). La colágena de interés para este trabajo es la colágena tipo I, formada por dos cadenas idénticas designadas como  $\alpha$ 1 (I) y una cadena diferente  $\alpha$ 2 (I). La tropocolágena posee una longitud de 300 nm, un diámetro de 1.5 nm y una masa molecular aproximada de 300kD (Ver figura 2.7). Las primeras dos cadenas están conformadas por una secuencia de 1052 aminoácidos de los cuales 1011 corresponden a la parte

central, 16 al extremo N-terminal y 25 al extremo C-terminal. Y la tercera cadena está formada por 1029 residuos aminoácidos, de los cuales 1005 pertenecen a la parte helicoidal, 9 al extremo N-terminal y 15 al extremo C-terminal [16].



**Figura 2.7.** Estructura de la tropocolágena

La molécula de colágena está conformada principalmente por glicina aproximadamente 33%, prolina 12 %, hidroxiprolina 9 %, así como por lisina e hidroxilisina, es por ello que la secuencia de esta proteína está formada principalmente por la unidad repetitiva de Gly-Pro-Y y Gly-X-Hyp, donde X y Y son cualquiera aminoácidos [17].

### 2.4.3 Estabilidad de la molécula de colágena

La glicina es un aminoácido muy importante dentro de la molécula de colágena ya que se encuentra en cada tercer posición en la secuencia de aminoácidos, y además por ser el aminoácido más pequeño favorece el denso empaquetamiento de la molécula, los dos residuos de aminoácidos a cada lado de la glicina quedan situados en el exterior de la molécula, donde los anillos voluminosos de los residuos de prolina e hidroxiprolina puedan acomodarse fácilmente.



La estabilidad de la estructura helicoidal es debida en gran parte a los puentes de hidrógeno que se forman entre las cadenas  $\alpha$  que componen la triple hélice, en donde el grupo amino del residuo de glicina es dador de hidrógeno y los aceptores de hidrógeno son los grupos carboxilos de los residuos de otras cadenas. La dirección de estos puentes de hidrógeno es transversal respecto al eje de la molécula de colágena. Además también participan en estos puentes de hidrógeno los grupos hidroxilos de los residuos de hidroxiprolina.

#### **2.4.4 Entrecruzamiento de las moléculas de colágena**

El entrecruzamiento es mediado por la enzima lisiloxidasa durante la formación de fibras. La actividad enzimática está limitada a la región no helicoidal, es decir, a los telopéptidos, permitiendo la conversión de ciertos residuos de lisina e hidroxilisina en sus correspondientes aldehídos, alisina e hidroxialisina respectivamente, los cuales son altamente reactivos (Figura 2.8).

Los enlaces intramoleculares se forman entre dos cadenas alfa en la sección no helicoidal de la misma molécula por condensación aldólica de dos aldehídos. El entrecruzamiento intermolecular se lleva a cabo entre la región telopéptida de una molécula de colágena y la región helicoidal de una molécula adyacente. Ésta unión formada entre dos moléculas de colágena resulta a partir de la formación de una aldimina [18].

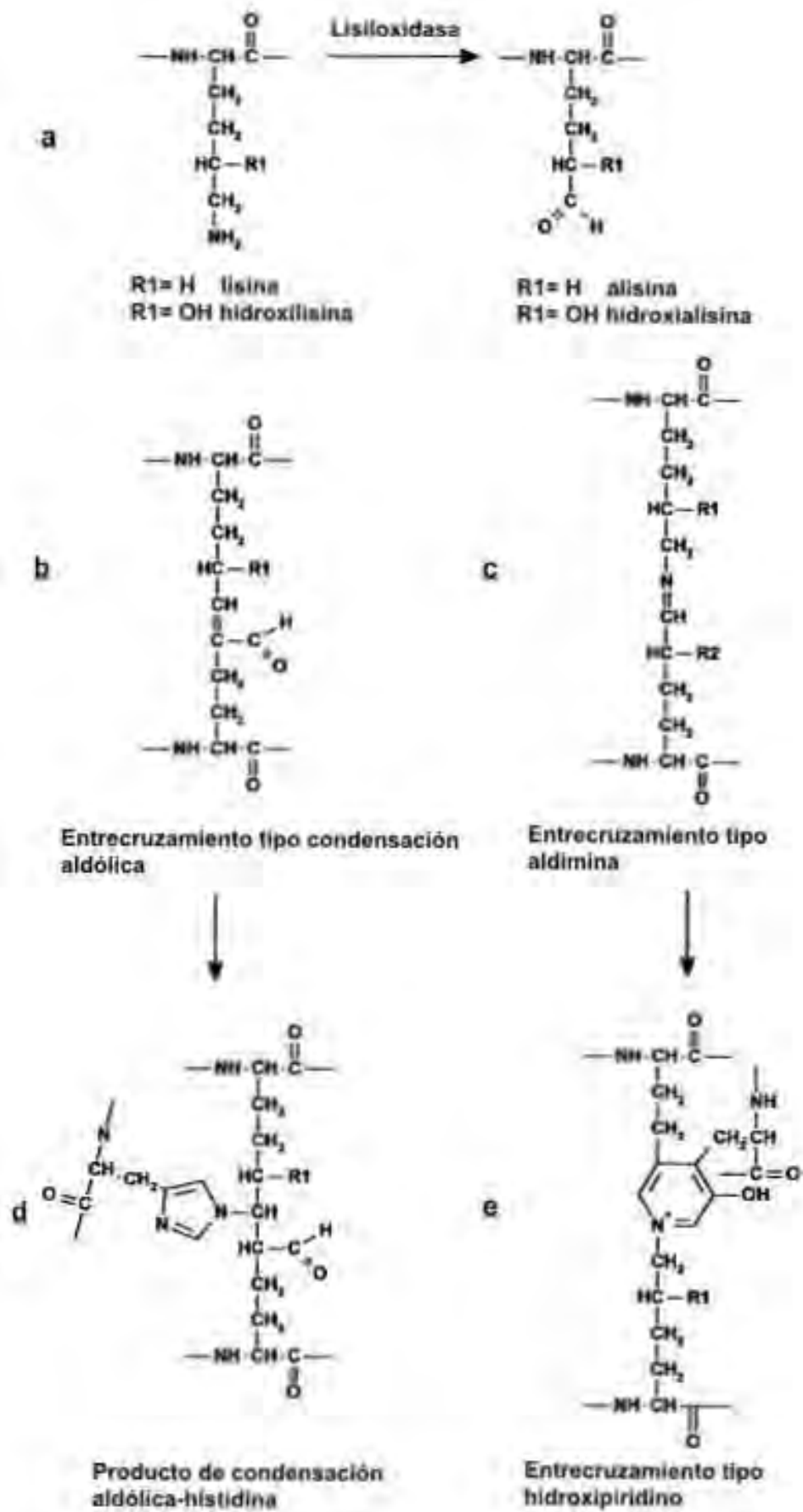


Figura 2.8. Entrecruzamientos en la región no helicoidal de la tropocolágena

Este proceso sigue a lo largo del tiempo, y los entrecruzamientos que se acumulan hacen que la colágena sea cada vez menos elástica y más quebradiza. Como consecuencia, los huesos y los tendones de las personas mayores pueden romperse con mayor facilidad y la piel pierde gran parte de su elasticidad.

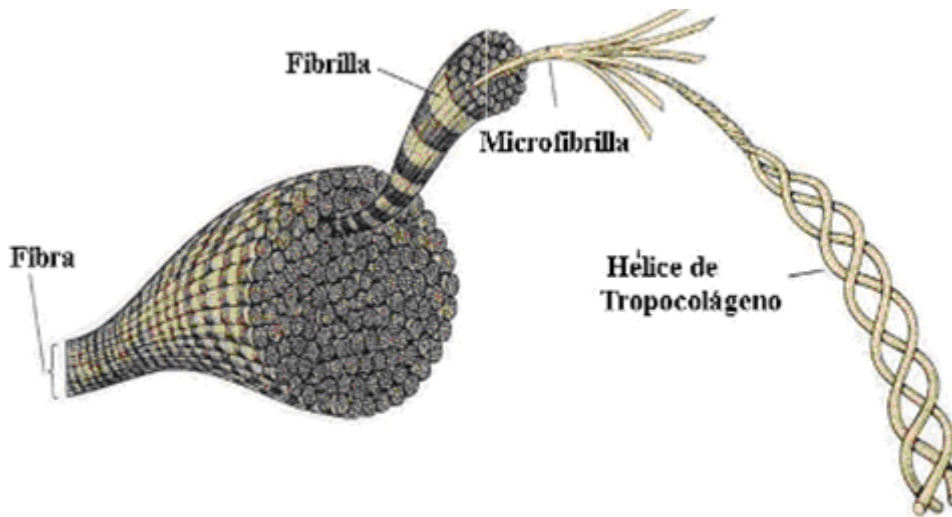
#### **2.4.5 Formación de las fibras de colágena**

La formación de fibrillas en el espacio extracelular es un proceso de ensamblaje controlado y estabilizado por los entrecruzamientos antes mencionados. La estructura fibrilar más pequeña es la microfibrilla, la cual se puede observar a través de un microscopio electrónico como un filamento delgado con un diámetro del orden de 4 nm.

De acuerdo con el modelo propuesto por Smith [19] la microfibrilla consiste en 4 o 5 filas de moléculas de colágena, en donde cada molécula se encuentra alineada de forma escalonada respecto a sus vecinas, la interacción entre estas moléculas es fuerte y ocurre cuando ellas están desplazadas una de la otra por una distancia de 67 nm.

Al microscopio electrónico, las fibrillas de colágena presentan estrías transversales características cada 67 nm (ver Figura 2.7), que reflejan el empaquetamiento escalonado y periódico de moléculas de colágena individuales en la fibrilla. También se observa un espacio entre dos moléculas de colágena consecutivas de la misma fila de aproximadamente 40 nm, el cual es de gran relevancia, ya que permite a la colágena establecer la formación de enlaces covalentes entre residuos de la lisina, así como un lugar para la deposición de cristales de hidroxiapatita para la formación de hueso.

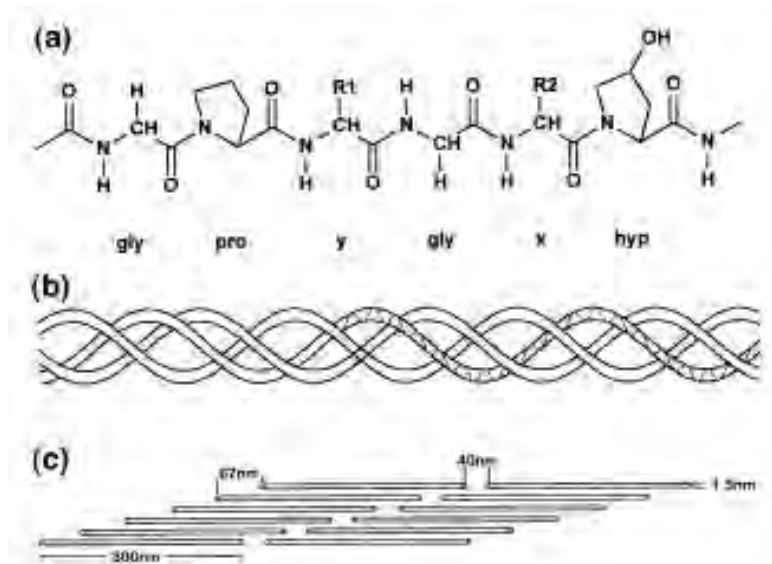
El proceso de formación de fibrillas a partir de las microfibrillas está dirigido en parte por la tendencia que presentan las moléculas de colágena a ensamblarse, de ahí que un gran grupo de fibrillas terminen formando una fibra de colágena, la cual es muy resistente a la tracción, ver la Figura 2.9.



**Figura 2.9.** Constitución de Fibras de Colágena

#### 2.4.6 Niveles de estructura de la molécula de colágena

- a) **Estructura Primaria.** Se refiere a la secuencia de aminoácidos que conforman a la proteína, la cual es determinante para definir su estructura tridimensional. Recordemos que en la colágena la secuencia de aminoácidos esta principalmente constituida por la unidad repetitiva Gly-X-Y.
  - b) **Estructura secundaria.** Se refiere al plegamiento tridimensional local de la cadena polipeptídica, los grupos laterales no se incluyen en este nivel de estructura. En el caso de la molécula de colágena, la estructura secundaria es única y denominada cadena  $\alpha$ , levógira y con 3.3 aminoácidos por vuelta.
  - c) **Estructura terciaria.** Es la estructura tridimensional del polipéptido. Incluye distribuciones en el espacio de los grupos laterales de las cadenas y relaciona regiones distantes de la cadena polipeptídica. Es decir, es la unión de tres cadenas  $\alpha$  enrolladas sobre si mismas conformando una superhélice dextrógira y con un diámetro de 1.5 nm, esta estructura recibe por nombre tropocolágena.
- Estructura cuaternaria.** Es el acomodo entre las distintas subunidades en un arreglo específico. La estructura cuaternaria de la colágena es la formación escalonada de varias moléculas desplazadas unas respecto a las otras a una distancia D (67 nm). Figura 2.10.



**Figura 2.10.** Niveles de organización de la colágena tipo I. (a) estructura primaria, (b) estructura secundaria y terciaria de giro levógiro y dextrógiro respectivamente y (c) estructura cuaternaria

En los niveles de organización estructural de la colágena reside la función de ésta.

### 2.4.7 Solubilidad de la colágena

La solubilidad de una proteína tiene su mayor impacto en su purificación. La mayoría de los métodos de separación requiere de un material que de partida sea soluble.

La solubilidad de las proteínas difiere considerablemente. Algunas son muy solubles en soluciones acuosas, lo que simplifica su extracción y purificación. Mientras que otras son menos solubles y requieren de un tratamiento especial para poder obtenerlas en solución.

Entre estos dos extremos existe un amplio intervalo en los niveles de solubilidad. La solubilidad de la proteína esta influenciada por la presencia o ausencia de grupos de azúcar unidos a la proteína, ya que estos grupos son hidrofílicos y por lo tanto incrementan la solubilidad de la proteína.

Otra propiedad que está directamente relacionada con la solubilidad de las proteínas es el punto isoeléctrico (pI), esto es el pH donde la carga neta de la proteína es cero, con lo que se desaparece cualquier fuerza de repulsión-atracción (debido a un menor número de grupos ionizados), disminuyendo así la solubilidad de la proteína y por lo tanto se precipita. De lo anterior se puede concluir que en el pI la solubilidad de las proteínas es nula.

También la hidrofobicidad impide que en solución acuosa, los grupos cargados interactúen con las moléculas de agua ya que intrínsecamente las proteínas son hidrofóbicas. Un bajo número de grupos cargados y un alto número de grupos alifáticos y aromáticos disminuyen la solubilidad en agua de la proteína. Es decir, que en gran parte la solubilidad de la proteína depende del tipo de cadena lateral que conforma a los aminoácidos y por ende a la molécula de la proteína.

Otro problema relacionado con la solubilidad de la proteína es la formación de enlaces disulfuro. Los cuales brindan estabilidad a la estructura de la proteína, mientras la hacen menos soluble en solución acuosa.

Melander y Horvath (1977) [20] describieron la solubilidad de las proteínas en términos de la combinación de los efectos “salting in” (electrostático) y “salting out” (hidrofóbico).

Por lo tanto para poder solubilizar a una proteína se tiene como mecanismo la adición de un agente, existen tres tipos de agentes:

- 1) Detergentes. Se dividen en 3 subclases: (1) aniónicos como son SDS y desoxicolato de sodio; (2) zwitteriones ejemplo de esto es CHAPS; y (3) no iónicos, como tween 80, Tritón X-100, Lubrol. Todos ellos ayudan en la formación de micelas atrapando la región hidrofóbica de la proteína en el interior de estas y quedando la parte polar del lado de la solución acuosa.
- 2) Agentes reductores. Como es el 2-βmercaptoetanol, ditiotreitól (DTT). Que favorecen la ruptura de los enlaces disulfuro.

- 3) Agentes caotrópicos. La solubilización de las proteínas se basa en una serie de aniones:  $\text{CBr}_3\text{COO}^- > \text{CCl}_3\text{COO}^- > \text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{CF}_3\text{COO}^- \gg \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Citrato} > \text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-}$ , y cationes: hidrocloreto de guanidina  $> \text{Ca}^{2+} > \text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$ . Ellos tienden a interrumpir el orden de las moléculas de agua que rodean a la proteína, disminuyendo así la aversión de la proteína por el agua.

Muchas de las técnicas para la solubilización destruyen las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína. Esta desnaturalización puede resultar en la pérdida de actividad biológica, es por ello que el reto no sólo consiste en solubilizar la proteína para su purificación, sino en poder replegar o renaturalizar a la proteína.

La colágena es una proteína poco soluble debido a la gran cantidad de entrecruzamientos presentes en la zona no helicoidal, lo que permite la unión intermolecular entre moléculas de colágena, lo cual brinda una alta resistencia a la tracción, característica de esta proteína. Para su solubilización se requiere del uso de soluciones ácidas y en ocasiones la adición de enzimas.

#### **2.4.8 Colágena como Biomaterial**

El atractivo de la colágena como biomaterial reside en gran medida en que es un material de origen natural, propiamente un biopolímero, y que posee una baja inmunogenicidad, por lo que es visto como un constituyente propio del organismo, más que como un ente extraño.

La colágena puede ser procesada en diferentes formas, tales como, hojas, tubos, esponjas, espuma, matrices, polvo, soluciones inyectable y dispersiones, todas ellas han encontrado una aplicación en el campo de la medicina. Además de las anteriores se han realizado estudios sobre el uso de la colágena como vehículo para la liberación de fármacos en las distintas áreas de la medicina como por ejemplo, oftalmología, ingeniería de tejidos, etc.

Tres de las principales características que hacen de la colágena un excelente biomaterial son:

1. Físicamente posee una alta resistencia a la tracción, esto debido a su naturaleza fibrilar, lo cual promueve la orientación y entramado deseado del biomaterial.
2. Con respecto a sus propiedades fisicoquímicas, el aspecto más importante de la molécula de colágena, es la habilidad para reticularse con una variedad de agentes para proporcionar cambios controlados y predecibles de su solubilidad, hinchamiento y de su velocidad de degradación.
3. Biológicamente debido a su capacidad para interactuar con un gran número de células y otras macromoléculas promueve el crecimiento celular.

La colágena comercial se puede encontrar en forma de colágena soluble nativa, colágena enzimáticamente procesada y en colágena hidrolizada. A continuación en la Tabla 2.2 se muestran algunas de las aplicaciones médicas de la colágena.

**Tabla 2.2** Formas físicas de colágena y sus aplicaciones clínicas

<b>Forma de la colágena</b>	<b>Aplicación</b>
Solución	Expansor de plasma, vehículo para la liberación de fármacos
Gel	Cosméticos, cuerpo vítreo
Polvo, fibras	Agente hemostático, material de sutura, prótesis
Membrana	Reemplazamiento de córnea, hemodiálisis, apósitos, parches
Esponja	Cicatrización de heridas, sustituto en la unión de hueso-cartílago, tampones quirúrgicos, contenedor de fármacos
Tubo	Prótesis de vasos sanguíneos, en la reconstrucción de órganos huecos, como esófago y tráquea



También existen compuestos de colágena, estos son colágena con polietileno de alta densidad (PEAD) [21], ácido nordihidroguaiarético tretra-O-metilo (NDGA) [22], polimetilmetacrilto, hidroxiapatita, quitosano [23], con polietilenglicol para crear una cera antiséptica bioabsorbible, mallas recubiertas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) como soporte en ingeniería de tejidos y micropartículas de colágena y poli(ácido-L-láctico) (PLLA) para la liberación controlada de gentamicina.

#### **2.4.9 Inmunogenicidad de la colágena**

La inmunogenicidad esta relacionada con la capacidad del material para provocar una producción de anticuerpos ya sea en animales y en humanos.

De todos los tipos de colágena que han sido caracterizadas, los tipos I, III y V son los más deseables para aplicaciones biomédicas, debido a su gran biocompatibilidad y baja inmunogenicidad.

La inmunología de la colágena es importante debido a que a veces el uso de colágenas provenientes de animales es usado en humanos y por lo tanto es necesario entender las consecuencias potenciales inmunológicas.

En general, las proteínas muestran dos tipos de determinantes antigénicos, secuenciales y conformacionales. Los determinantes secuenciales dependen sólo del reconocimiento de la secuencia de aminoácidos de entre 5 a 10 aminoácidos, generalmente en la región telopéptida. Y los determinantes conformacionales dependen de la estructura tridimensional, es por ello que la antigenicidad se pierde cuando la proteína es desnaturalizada debido a que ciertas regiones contribuyen al sitio antigénico.

## 2.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

Una vez obtenida y purificada la colágena tipo I, se procede a caracterizar cada una de las muestras, de esta forma se determinaron ciertas propiedades físicas, como son la temperatura de desnaturalización, morfología y pureza, es por ello que es necesaria el uso de técnicas específicas. A continuación se detalla cada una de las técnicas a utilizar en este trabajo.

### 2.5.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida

El término *electroforesis* fue introducido por primera vez en 1907 por Michaelis [24] para definir el fenómeno por el cual una molécula que posee carga neta se desplaza en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico. Es una técnica comúnmente utilizada para la identificación y caracterización de moléculas biológicas (ADN, proteínas, polisacáridos, péptidos). La velocidad de migración o movilidad ( $V$ ) de la partícula a través del campo eléctrico dependerá de varios factores como son: la fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se están moviendo; así como de la intensidad de dicho campo ( $E$ ); la carga neta ( $q$ ), tamaño y forma de las moléculas (coeficiente de fricción,  $f$ ).

$$V = \frac{qE}{f} \quad (1)$$

El campo eléctrico aplicado no se puede incrementar indiscriminadamente, ya que se generaría un excesivo calor, y tampoco puede ser bajo, ya que puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por tiempo prolongado de la corrida electroforética. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas.

#### 2.5.1.1 Equipo y Mecanismo de formación del Gel

El equipo y material utilizado en la realización de esta técnica es una cámara de electroforesis, la cual puede ser horizontal o vertical, que consta de dos electrodos (cátodo y ánodo) y dos recipientes que contienen al amortiguador de corrida (superior e

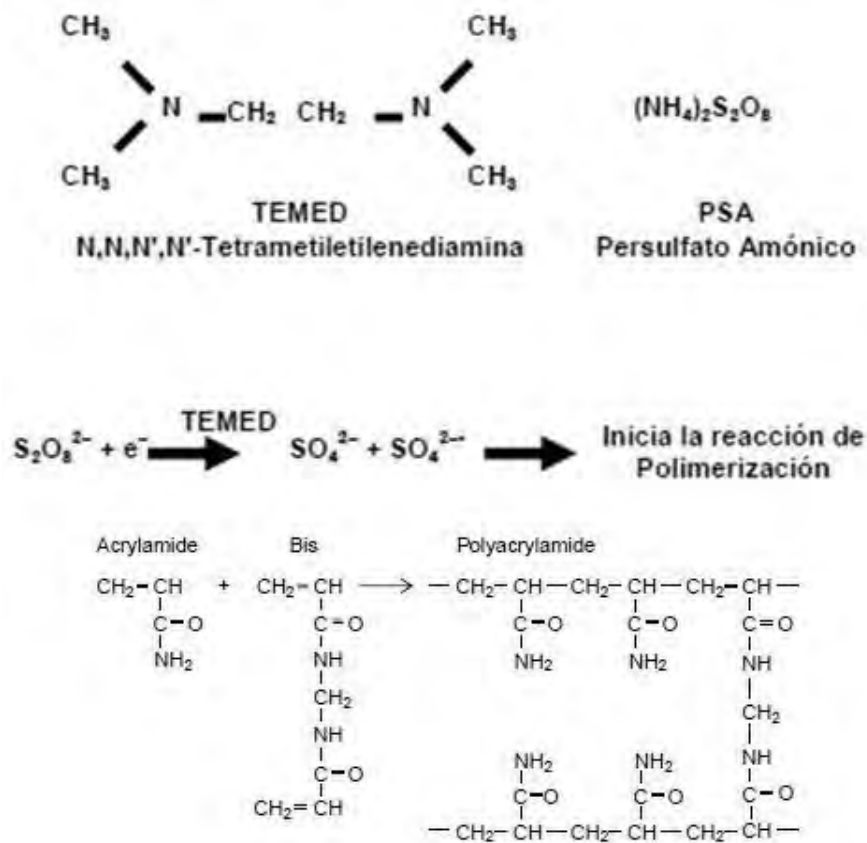
inferior), fuente de poder, que permite mantener un potencial de voltaje constante y los elementos necesarios en la formación del gel como son, peine, espaciadores, vidrios, (Ver figura 2.11) y por supuesto el soporte (gel) cuya tarea es la de un tamiz molecular.



**Figura 2.11.** Equipo de electroforesis [25].

Los soportes de elección para la electroforesis de proteínas son los geles de poliacrilamida (PAGE por sus siglas en inglés "*polyacrylamide gel electrophoresis*"), debido a su buena resolución y gran versatilidad, además de que posee una serie de ventajas como: ser químicamente inerte y transparente, se prepara rápidamente y se puede controlar el tamaño de poro variando la concentración de los reactivos que lo conforman.

El mecanismo en la formación del gel consta de la polimerización vía radicales libres del monómero acrilamida  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}_2$  y el monómero entrecruzador N,N'-metilen-bis-acrilamida  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ , la cual es catalizada por N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED) que ayuda en la formación de radicales libres que dirigen la reacción a partir del ión persulfato que se añade en forma de persulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  (APS) y que actúa como iniciador, como se muestra en la figura 2.12. La reacción es inhibida por oxígeno, es por ello que se debe desgasificar la solución.



**Figura. 2.12** Reacción de polimerización de la poliacrilamida.

### 2.5.1.2 Tamaño de poro del gel de poliacrilamida

El tamaño de poro del gel se puede controlar utilizando dos parámetros, %T y %C, donde el primero se refiere al porcentaje en masa del monómero total empleado (acrilamida + entrecruzador) que determina la longitud promedio de la cadena del polímero y el segundo, que se refiere al porcentaje en masa de la bis-acrilamida con respecto al monómero acrilamida (w/w). [26]

$$\%T = \frac{\text{Acrilamida (g)} + \text{Bisacrilamida (g)}}{\text{Volumen (mL)}} \times 100 \quad (2)$$

$$\%C = \frac{\text{Bisacrilamida (g)}}{\text{Acrilamida (g)} + \text{Bisacrilamida (g)}} \times 100 \quad (3)$$

Así, geles con un alto porcentaje de acrilamida (10-15%T) son óptimos para la separación de proteínas de baja masa molecular (menores a 50KDa), mientras que geles de porcentajes menores (<10%) son los indicados para la separación de proteínas mayores.

### **2.5.1.3 Condiciones de Electroforesis**

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida puede llevarse a cabo en condiciones nativas (ND-PAGE) o desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las diferencias radican en los componentes de los geles, tampón y el tratamiento de las muestras. En la electroforesis en condiciones nativas, las proteínas mantienen su estructura terciaria y las diferentes cadenas polipeptídicas permanecen unidas, separándose en función de su carga eléctrica, tamaño y forma. Por el contrario en condiciones desnaturalizantes descritas por Laemmli en 1970 (SDS-PAGE) se incluyen agentes desnaturalizantes como reductores ( $\beta$ -mercaptoetanol), detergentes (SDS, dodecil sulfato sódico) o calor, los cuales destruyen enlaces disulfuro, en el caso de un agente reductor y rompen las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas. Los grupos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie, así los complejos SDS-proteína adquieren una carga neta negativa. Aproximadamente una molécula de SDS se une a dos residuos de aminoácido, con una relación SDS/proteína de 1.4g /g [27]. Debido a la cantidad de SDS que se une a las proteínas es prácticamente proporcional a su tamaño, los complejos SDS-proteínas presentan un valor de carga/masa constante y por lo tanto se separan sólo en base a su tamaño y por ello la masa molecular de las proteínas puede ser estimada.

### 2.5.1.4 Sistemas de Electroforesis

Actualmente existen dos sistemas de electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en base a los tampones empleados:

- 1) Sistema Continuo de Weber y Osborn. Constituido de un gel uniforme y un mismo tampón empleado en formación del gel y de corrida.
- 2) Sistema Discontinuo o de Laemmli. Costa de dos geles: un gel llamado concentrador con un tamaño de poro grande y pH 6.8 (coloca en parte superior); y un gel separador que posee menor tamaño que el anterior y un pH de 8.8.

Figura 2.13

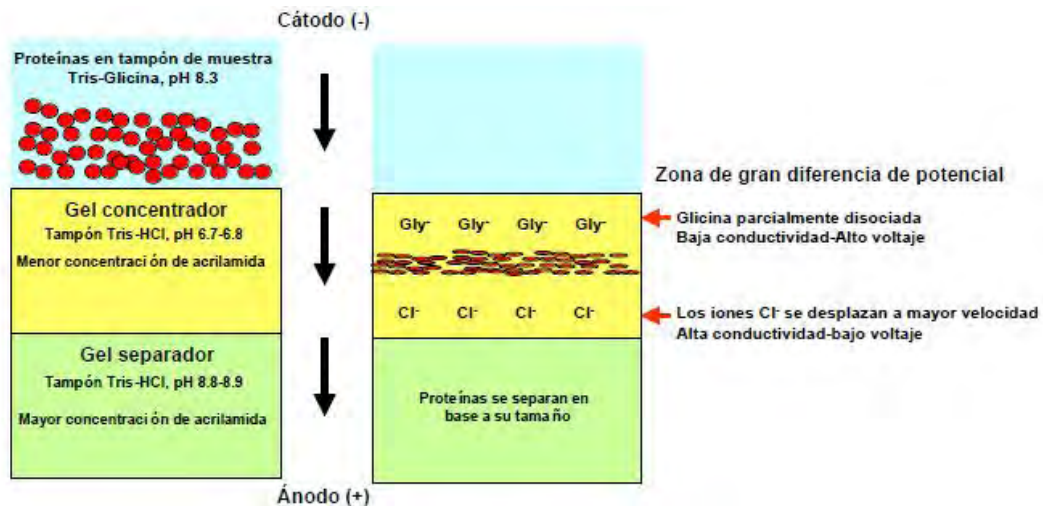


Figura 2.13. Sistema discontinuo en SDS-PAGE [24].

La movilidad de una proteína en el gel concentrador es intermedia entre la movilidad de los iones cloruro del gel y la movilidad del ión glicinato del tampón de muestra. Por tanto, entre ambos frentes existe una zona de baja conductividad y gran diferencia de voltaje, de forma que las proteínas se concentran en una zona muy reducida entre ambos iones. Una vez en el gel separador, el pH básico favorece la ionización de la glicina de forma que sus iones migran a través de los polipéptidos concentrados, justo por detrás de los iones cloruro. A partir de este momento las proteínas migran a través del gel separador en una zona de voltaje y pH uniforme de forma que se separan en base a su tamaño. La capacidad de este sistema para concentrar la muestra mejora considerablemente la resolución de los geles.

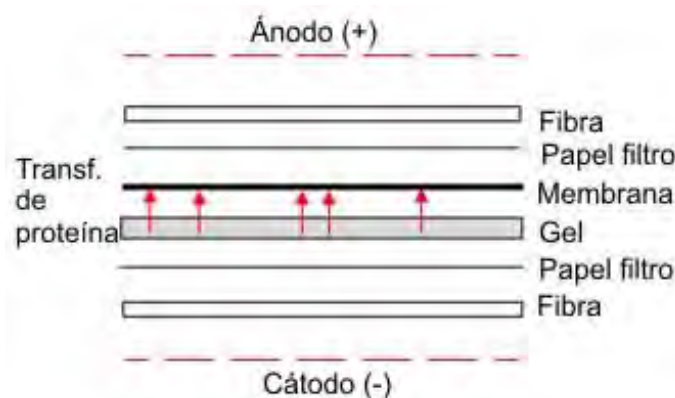
## 2.5.2 Western Blot

Es una técnica inmunológica para determinar la existencia de una proteína en particular dentro de una muestra biológica. El método consiste en la separación de las proteínas de la muestra mediante electroforesis, la transferencia de un grupo de proteínas desde el gel de electroforesis a una membrana de soporte (nitrocelulosa ó PVDF) por acción de un campo eléctrico aplicado en forma perpendicular al gel y, por último, detección de la proteína uniéndola a un anticuerpo específico para dicha proteína marcado con radiactividad o con una enzima. [28]

Las ventajas de trabajar en una membrana sobre un gel son: (a) las proteínas están más accesibles, (b) las membranas son más fáciles de manipular que el gel, (c) sólo se requieren pequeñas cantidades de reactivo, (d) el tiempo del proceso es corto.

Todo procedimiento de 'blotting' consta de 5 etapas:

1. Inmovilización de proteínas sobre la membrana. La transferencia de proteínas se realiza a través de transferencia electroforética "electroblotting", la cual tiene una duración de 1 hora aproximadamente, lo que reduce el efecto de difusión de las bandas. Se inicia con un apilamiento sucesivo de una esponja, papel filtro, gel, membrana, papel filtro y esponja, todo empapado de un amortiguador de transferencia Towbin y se dispone como se observa en la figura 2.14, el voltaje es de aproximadamente 20 Volts.



**Figura 2.14.** Sandwich empleado en la transferencia electroforética

2. Saturación (bloqueo) de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos, que son proteínas. Se han descrito numerosas soluciones bloqueantes, y todas ellas son efectivas. El factor esencial a tener en cuenta es elegir un sistema de bloqueo compatible con el sistema de detección empleado, ejemplo de estos son, disoluciones de leche en polvo, leche en polvo con Tween 20.
3. Incubación de la membrana con anticuerpos (Ab) primarios contra las proteínas de interés. Seguido de lavados para eliminar los anticuerpos no adheridos
4. Una segunda incubación con Ab secundarios, o reactivos que actúan de ligando de los anticuerpos primarios unidos a enzimas u otros marcadores. Y se realizan lavados para eliminar los Ab no adheridos.
5. Las bandas de proteínas marcadas con enzimas se hacen visibles por incubación con los sustratos apropiados para formar productos coloreados insolubles en el lugar donde se encuentran las bandas de proteína. Uno de estos sustratos es el 3,3' diaminobenzidina (DAB) que en presencia de peróxido de hidrógeno da lugar a la aparición de un precipitado marrón.



### 2.5.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Esta técnica mide el cambio de flujo de calor hacia y desde el material en función del tiempo o de la temperatura. El equipo de DSC consiste en dos cámaras cada una contiene un crisol. Los crisoles están fabricado de diferentes materiales, el más utilizado es el crisol de aluminio el cual trabaja hasta una temperatura no mayor a los 600°C, por arriba de esta temperatura se utilizan crisoles de Au, C, Pt, Ag y acero inoxidable, una condición para emplear también el crisol de aluminio es evitar la interacción química con la muestra.

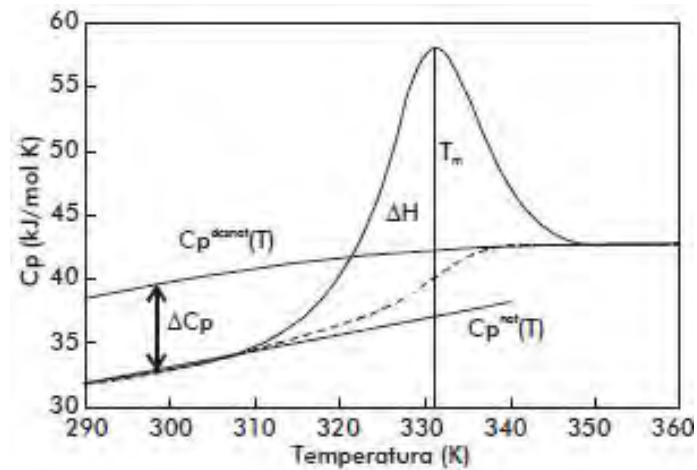
En uno de los crisoles se coloca la muestra a analizar, mientras que el otro crisol se queda vacío, sirviendo de referencia. Entonces durante el calentamiento de la muestra se mide el flujo de calor, manteniendo un equilibrio térmico entre la referencia y la muestra; esto se hace alterando la corriente que pasa a través de los calentadores de ambas cámaras. Por ejemplo, la referencia y una muestra se calientan a una velocidad determinada hasta que la muestra empieza a consumir o emitir calor. Si se trata de un proceso endotérmico, la temperatura de la muestra será menor que la de referencia.

Los circuitos del equipo están programados para proporcionar temperatura constante para los compartimentos de la muestra y de la referencia. Se suministra por lo tanto una corriente adicional al compartimento de la muestra para elevar la temperatura hasta la de referencia. Se registra la corriente necesaria para mantener la temperatura constante entre la muestra y la referencia. Al término de la corrida se tiene una gráfica denominada termograma, en donde aparecen varios picos que reflejan las transiciones ocurridas durante el experimento y donde el área bajo la curva resultante es una medida directa del calor de transición, la dirección de los picos indica si el proceso es endotérmico o exotérmicos, en este estudio los picos hacia abajo denotan procesos endotérmicos y por el contrario los picos hacia arriba se refieren a procesos exotérmicos.

Entre las variables que se pueden determinar a partir de esta técnica están las siguientes: temperatura de fusión, temperatura de ebullición, temperatura de cristalización, calor específico, pureza de la muestra, temperatura de transición vítrea, capacidad calorífica, entalpía de fusión [29].

Por otro lado, cuando se estudian proteínas, una de las principales variables a determinar y en el mejor de los casos a controlar es la estabilidad de las mismas, lo que conlleva a obtener moléculas más resistentes a agentes externos como son, la temperatura, detergentes, solventes orgánicos, etc. Sin embargo, los factores arriba mencionados están directamente relacionados con la falta de comprensión en el mecanismo de plegamiento y desplegamiento de las proteínas esto a causa de la compleja organización de estas. Es así que a través de la calorimetría diferencial de barrido y en específico de alta sensibilidad es posible obtener información de los parámetros termodinámicos y cinéticos.

Uno de los parámetros importantes en el caso de las proteínas a determinar con esta técnica es la capacidad calorífica ( $C_p$ ), que como bien se aprecia en la figura 2.15, no es la misma antes y después de la desnaturalización, por lo que  $\Delta C_p > 0$ ,  $T_m$  es la temperatura media a la que se alcanza el valor máximo de  $C_p$  y  $\Delta H$  es la entalpía de transición correspondiente a la energía necesaria para la transición de fase y se determina integrando el área bajo el pico de transición.



**Figura 2.15** Curva de capacidad calorífica vs Temperatura.

Generalmente se traza una curva de capacidad calorífica en exceso contra temperatura. Esta curva consiste en tres regiones, la primer región es el estado nativo correspondiente al poblado en condiciones fisiológicas, la segunda región es el punto máximo de la curva representativa a una transición de primer orden y la tercer región es la posterior al punto máximo y consiste en el estado desnaturalizado. Debido a que en la  $T_m$  ya no solo

hay una única contribución por parte del estado nativo, la capacidad calorífica en exceso se define como la suma de las contribuciones en términos energéticos de todos los estados presentes durante la transición térmica [30].

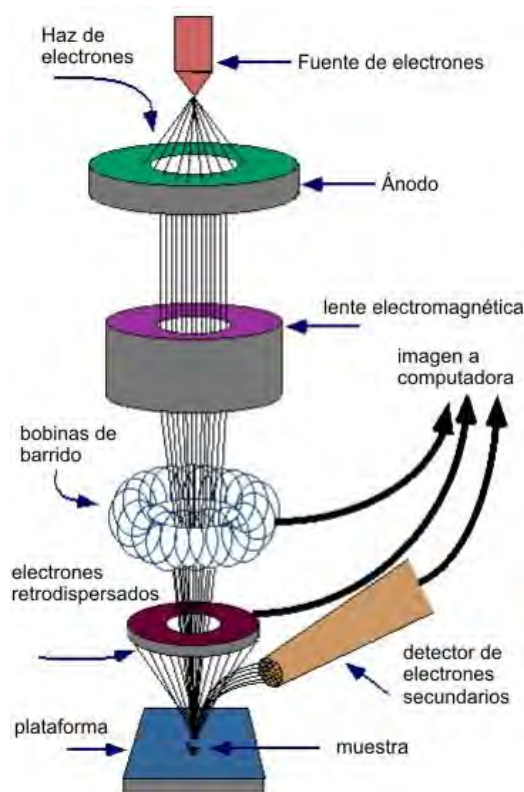
La reversibilidad de la transición de desnaturalización se comprueba con el recalentamiento de la muestra, inmediatamente después de enfriar la celda que se calentó en el primer barrido y con ello se muestra que el sistema vuelve al estado inicial (nativo), aunque es posible que no se llegue al equilibrio, si es que el sistema está controlado cinéticamente y esto se relaciona directamente con la velocidad de calentamiento. De lo anterior surge un enérgico estudio para entender el proceso de desnaturalización de las proteínas y se encuentran con dos caminos, uno en donde el proceso está dado por el equilibrio (reacción reversible) y el segundo denotado por un proceso que no está en equilibrio (reacción irreversible). Por lo que se emplean métodos para calcular parámetros tales como energía de activación, fracción de moléculas en el estado nativo y desnaturalizado, constantes de equilibrio y de velocidad, entalpía de van't Hoff definida como la cantidad de calor necesario para que cada unidad cooperativa lleve a cabo la transición de fases, etc. Dentro de los pioneros están los estudios realizados por Sánchez-Ruiz J.M. [31].

## 2.5.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido constituye una de las técnicas más utilizadas en el análisis de superficies debido a que provee una imagen de gran amplificación y definición.

Los primeros desarrollos en el diseño de un microscopio de electrones de barrido nace en los laboratorios RCA por Zworykin, Hillier y Snyder en 1942 [32] con una resolución de 1000 nm, sin embargo, durante el periodo comprendido entre 1948 y 1965 se mejoró el diseño del equipo con una resolución de 50 nm. Y es hasta esta época cuando surge el primer microscopio comercial The Cambridge Scientific Instruments Mark I “Stereoscan” [33].

El equipo de microscopía electrónica de barrido consiste en una columna que alberga un filamento (una fuente de electrones), objetivo o lente electromagnética y unas bobinas de exploración (ver en figura 2.16). En la base de la columna esta la cámara que contiene a los detectores y la plataforma donde se deposita la muestra.

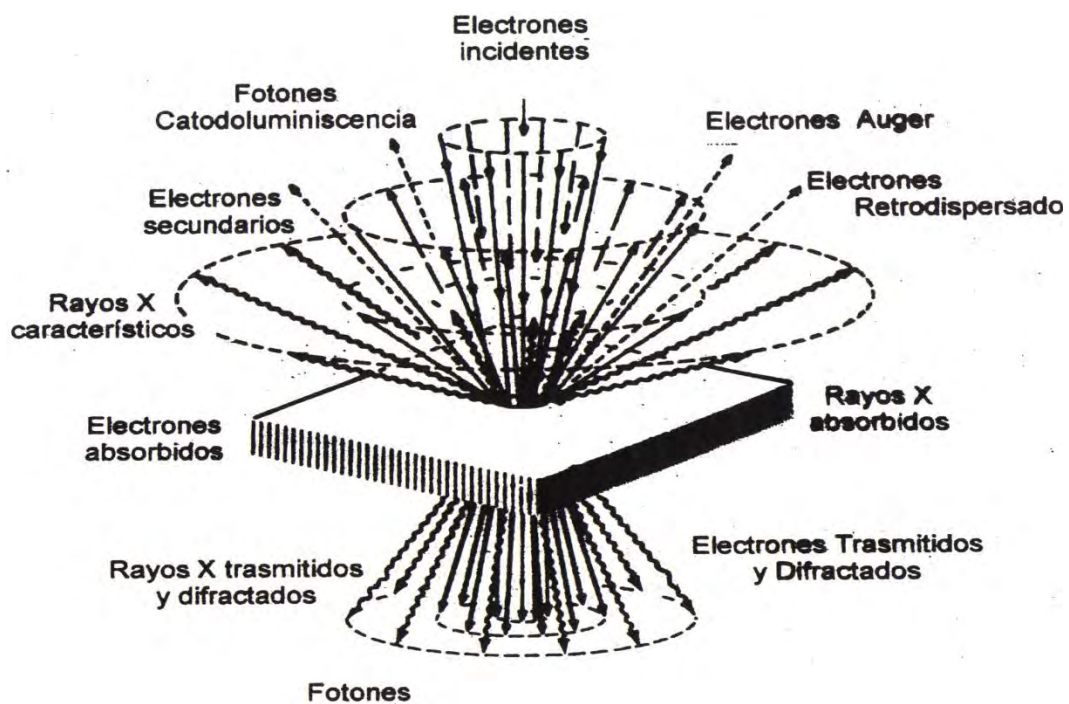


**Figura 2.16** Esquema de los componentes de un SEM

Dependiendo del objetivo particular del estudio, se puede operar el equipo en diferentes maneras, por ejemplo bajo voltaje, superficie sensible, alta resolución.

En la microscopía electrónica de barrido (SEM) los electrones emitidos por un cañón de electrones (electrones primarios) se centran por medio de unos cilindros Wehnelt y por lentes electromagnéticas sobre la superficie de la muestra, que escanea punto por punto a la muestra. De esta forma se adquieren datos de la muestra de un punto en un momento. En cada lugar donde un haz de electrones primarios impacta en la muestra, un flujo de electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos X y otros tipos de señales son emitidas de la muestra. Figura 2.17.

Los electrones secundarios y los electrones retrodispersados emitidos por la muestra son capturados por detectores y presentados en forma de modulaciones de brillo, en un monitor. Los electrones secundarios provienen de una capa superficial de hasta 10 nm de espesor, mientras que los electrones retrodispersados se originan en capas más profundas.



**Figura 2.17** Señales emitidas durante el escaneo de la muestra por SEM.

Una porción de cada señal emitida viaja en tal dirección que entra en el detector, el cual mide la intensidad de electrones emitidos en cada punto sobre la muestra y convierte este valor de intensidad en una escala de grises. Entonces valores digitalizados son desplegados en un monitor. La imagen que se obtiene en el monitor está sincronizada con el movimiento y posición del haz de electrones sobre la muestra.

De este proceso de formación de la imagen se aplica a todas las señales colectadas y permite la imagen de cada señal para ser recogidas simultáneamente. El resultado es una imagen topográfica muy ampliada de la muestra [34].

En los nuevos equipos de SEM, todos los controles (filamento, voltaje, foco, amplificación, plataforma de control, etc.) son operados mediante una computadora y una palanca de control.

La muestra que se observa por SEM debe ser conductora, en el caso de los materiales poliméricos como la colágena, deben ser recubiertos con una película metálica (oro, oro-paladio, cromo o carbón, por ejemplo), para evitar que la muestra se cargue o se caliente cuando sea irradiada por el haz de electrones.

## 2.5.5 Espectrofotometría de absorción en la región del visible y UV

A través de esta técnica de espectrofotometría es posible determinar la concentración de las macromoléculas biológicas, en este caso de proteínas, en solución. Se basa en medir la cantidad de energía que absorbe una molécula en la región ultravioleta ó en la región visible para pasar del estado fundamental a un estado excitado.

El fenómeno consiste en hacer pasar la luz a través de un monocromador, con el cual se selecciona la longitud de onda, esta luz monocromática con una potencia radiante  $P_0$  incide en una muestra de longitud  $b$  (generalmente colocada en una celda de cuarzo). La potencia radiante del haz que emerge por el lado opuesto de la muestra es  $P$ , como la muestra puede haber absorbido algo de luz, entonces  $P \leq P_0$ .

La transmitancia  $T$ , se define como la fracción de la luz incidente que pasa a través de la muestra y está dada por

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (4)$$

Donde  $T$  puede valer 0 ó 1

A su vez la transmitancia esta relacionada con la absorbencia, que de acuerdo a la ley de Lambert-Beer

$$A = \epsilon c l \text{ ó } A = -\log_{10} T \quad (5)$$

Donde  $c$ , es la concentración molar,  $l$  la longitud en el paso de la luz, en cm y  $\epsilon$  el coeficiente de absorción molar [ $M^{-1}cm^{-1}$ ], esta última es la característica de una sustancia que nos dice cuanta luz absorbe a una longitud de onda determinada. La absorbencia leída es directamente proporcional a la concentración de la especie que absorbe la luz en la muestra [35].

Cuando se determina la concentración de alguna especie en solución, en primer lugar se construye una curva patrón, en donde el cero se conoce como blanco y se utiliza para

fijar el cero de absorbencia en el espectrofotómetro y la concentración de las muestras se calcula interpolando los valores de la absorbencia leída y de las de la curva patrón.

La parte de la molécula responsable de la absorción de la luz se llama cromóforo, por lo tanto toda sustancia que absorbe luz visible o ultravioleta aparece coloreada cuando transmite o refleja la luz.



## **CAPÍTULO 3**

### **MÉTODO EXPERIMENTAL**

#### **3.1 OBJETIVOS**

##### **3.1.1 Objetivo General**

- Plantear un método sencillo que permita la extracción y purificación de la colágena tipo I a partir de tendón de bovino.

##### **3.1.2 Objetivos Particulares**

- Caracterizar las disoluciones de colágena obtenida, a través de las técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida, calorimetría diferencial de barrido, Western Blot y microscopía electrónica de barrido.
- Determinar las variables que afectan directamente la concentración y rendimiento de las muestras de colágena obtenidas por este proceso.

#### **3.2 Materia Prima y Reactivos**

Las materias primas principales empleadas fueron:

- a) Tendón de bovino. (El tendón de bovino fue adquirido de un rastro TIF: Rastro Tipo Inspección Federal del Papaloapan) de aproximadamente 2 años.
- b) Pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma Aldrich)

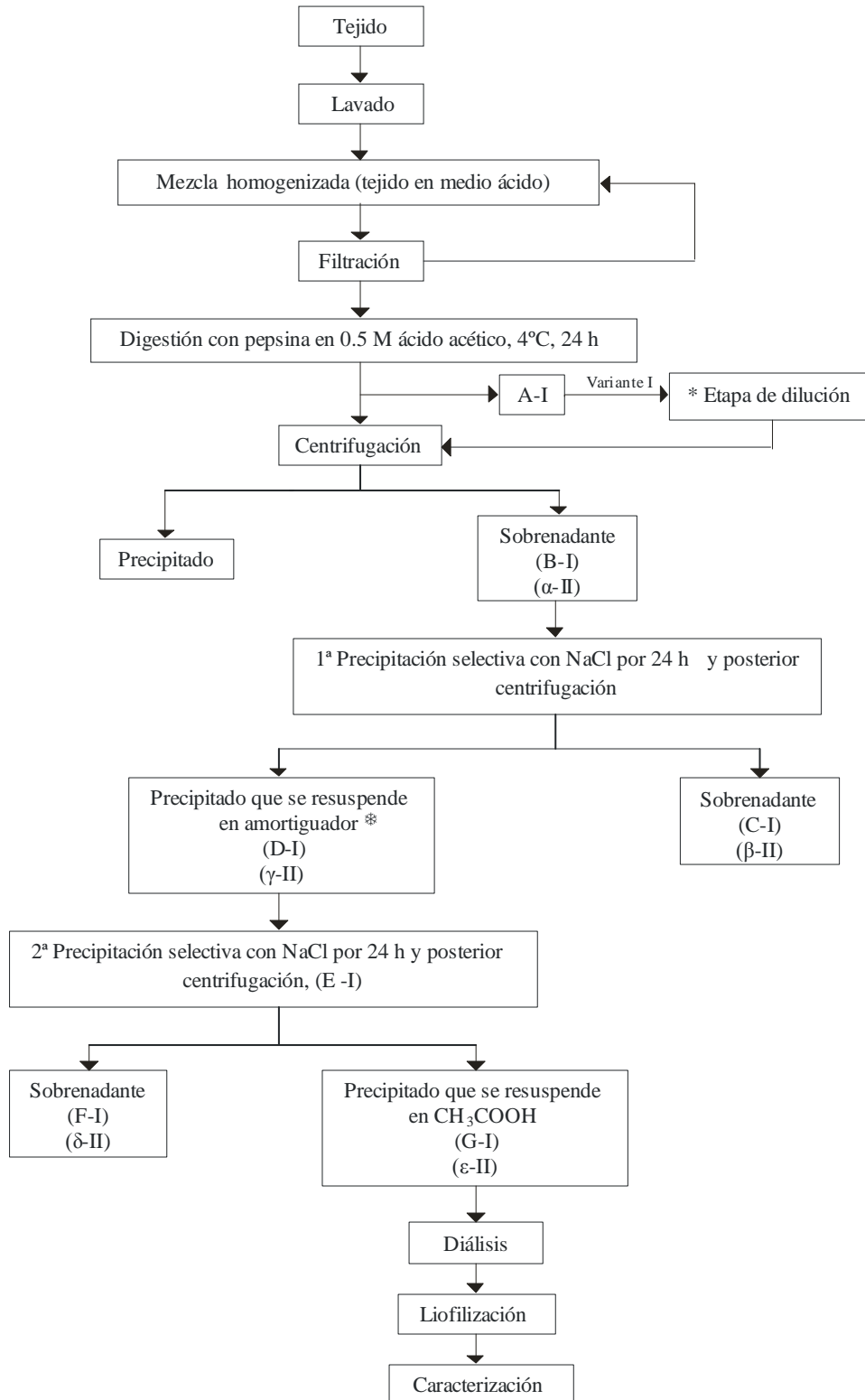
#### **3.3 Metodología**

La extracción de colágena fue desarrollada como una modificación de la técnica de Miller y Rhodes [36].

##### **3.3.1 Preparación del tendón:**

El tendón fue lavado con agua desionizada y se cortó en pequeños fragmentos, después se sumergió en acetona y se dejó en refrigeración por 12 h. Luego se retiró la acetona y

se lavó nuevamente con agua desionizada con el fin de retirar por completo el tejido adiposo. Una vez ya limpio el tendón se liofilizó y guardó hasta su uso.



**Figura 3.1.** Desarrollo experimental

### **3.3.2 Extracción de colágena:**

El proceso de extracción se llevó a una temperatura de 4°C.

Se tomó una muestra de 10 g de tendón liofilizado el cual se mezcló con una solución de ácido acético 0.5 M, pH 2.5 (ajustado con HCl 1M) con un homogenizador Polytron HSIANGTAI de 100 RPM, Modelo HG300D, con lo que se forma una masa gelatinosa debido al hinchamiento de las fibras de colágena por la intromisión de las moléculas de ácido acético que provocan la pérdida de la estructura secundaria de la proteína. Esto dificulta la solubilización de la mezcla.

A partir de lo anterior, se tomaron 50 g de masa gelatinosa y se agregó ácido acético hasta obtener una solución lo más homogénea posible, la cual se filtró con una gasa. El tejido que se retuvo en la gasa nuevamente se solubiliza en ácido acético.

Posteriormente, se adiciona la pepsina con una relación masa de la enzima/masa seco del tejido de 1/10 y se agita por 24 h con objeto de que la proteína se desprenda de los aminoácidos terminales y sea capaz de solubilizarse lo más posible.

Finalizada la incubación con la enzima, en este punto es cuando dividimos el proceso en dos variantes:

I. En donde a la solución viscosa obtenida (A-I) se le agrega un volumen igual de ácido acético con el fin de diluirla (B-I) y poder tener un mejor manejo de la misma antes de ser centrifugada. (\* Ver figura 3.1)

II. En donde la solución no se somete a la etapa de dilución e inmediatamente pasa a centrifugación.

Ambas soluciones se centrifugaron en una centrífuga Sorvall, modelo RC-5B y rotor SS34.

### 3.3.3 Purificación de colágena:

Esta es la etapa en donde se aisló la colágena tipo I del extracto obtenido durante el proceso de extracción.

Tanto las soluciones de las variantes I y II del proceso son purificadas bajo los siguientes pasos:

1. El sobrenadante obtenido de la primera centrifugación se somete a una 1ª precipitación selectiva (salting out) por la adición de cristales de NaCl, con agitación constante durante un periodo de 24 h.
2. Se procedió a centrifugar la solución anterior, desechándose el sobrenadante mientras que el precipitado se resuspendió en amortiguador durante 24 h.
3. Se llevó a cabo una 2ª precipitación selectiva con las mismas condiciones del punto 1.
4. Centrifugación, eliminándose el sobrenadante y el precipitado se resuspende en ácido acético 0.5 M.
5. Se dializó la solución en membranas semipermeables de la marca Spectra/ Por 3 Membranes a fin de retirar las sales que pudieran haberse quedado durante la precipitación contra un regulador de acetatos con una concentración 5 mM y agua destilada.
6. Finalmente se liofilizó y guardó hasta su caracterización.

En la figura 3.1 se observa el diagrama de flujo del desarrollo experimental ya mencionado arriba. Cabe decir, que durante el transcurso del proceso se tomaron alícuotas para la posterior cuantificación de colágena, las cuales fueron designadas con letras: A, B, C, D, E, F y G para la variante I; y  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\varepsilon$  para la variante II, siendo las muestras de mayor interés para este trabajo G y  $\varepsilon$  de cada variante del proceso.

A su vez se adquirió una muestra de colágena pura comercial obtenida a partir de piel porcina proporcionada por la empresa ASPID, ésta muestra se designa como muestra control.

### 3.3.4 Condiciones de Trabajo

Las condiciones de trabajo del proceso de extracción y purificación mediante la variante I son: 300 mL de ácido acético empleado para solubilizar tejido y precipitados, centrifugación a 11, 500 g por 2 h y concentración 2 M de NaCl.

Con la finalidad de determinar la variación en la concentración de la muestra de colágena al modificar ciertas variables del proceso como son: volumen de ácido acético usado para solubilizar tejidos y precipitados, velocidad de centrifugación, concentración de NaCl y tipo de amortiguador, se realizaron 5 corridas utilizando la variante II del proceso, por lo que cada una de las corridas se denota como subíndice de la alícuota designada como  $\epsilon$ .

A continuación se muestra una tabla con dichas modificaciones:

**Tabla 3.1** Especificaciones de las variables modificadas en la Variante II del proceso.

Nombre de muestra	CH <sub>3</sub> COOH (mL)	Velocidad de centrifugación (RPM) y tiempo <sup>A</sup>	Concentración de NaCl en 1 <sup>a</sup> precipitación (M)	Concentración de NaCl en 2 <sup>a</sup> precipitación (M)	Tipo de <sup>B</sup> amortiguador y concentración
$\epsilon_1$	300	20 min- 4,500 2 h-11,500	2	2	Ácido acético 0.5 M
$\epsilon_2$	240	30min-11,500 90min-11,500	2	2	Ácido acético 0.5 M
$\epsilon_3$	250	20 min-4,500 2 h-11,500	2	2	Ácido acético 0.5 M
$\epsilon_4$	250	20 min-4,500 2 h-11,500	2	2	Ácido acético 0.5 M
$\epsilon_5$	200	30 min- 4,500 2 h- 11,500	0.7	2.6	Tris-HCl 50 mM, pH 7.4

<sup>A</sup> Se describen 2 parejas de tiempo y velocidad, el primero corresponde a la centrifugación posterior a la filtración, mientras que el segundo concierne a las subsecuentes centrifugaciones. <sup>B</sup> El tipo de amortiguador arriba mencionado es el utilizado en la primera resuspensión del precipitado (\*), de acuerdo con la figura 3.1.

### 3.4 Cuantificación de colágena

El contenido de colágena se obtuvo midiendo la cantidad de hidroxiprolina presente en las muestras [37], esto debido a que éste aminoácido es muy característico de la molécula de colágena, se usó el método J.F. Woessner [38].

La preparación de las muestras involucra una serie de pasos, en principio se toman dentro de un intervalo de 100 a 200 mg de cada muestra y su respectivo duplicado, se hidrolizan con HCl 6 M a 105°C en una mufla Thermolyne modelo 48000 durante 18 h en ampollitas que fueron selladas. Las ampollitas se abren al cabo de este tiempo y el contenido se vierte en matraces aforados de 10 mL, lavando las ampollitas con una solución de NaCl 0.2 M y vaciando el contenido en el matraz, para después ajustar el pH de la solución a un valor de 7, con NaOH 1 M y HCl 0.1 M correspondiendo a una coloración ligeramente naranja.

De la solución anterior se tomaron 0.2 mL de cada muestra que se colocaron en tubos de ensayo con tapa de rosca (13x100mm), se agregaron 0.8 mL de la solución de NaCl 0.2M, 0.5 mL de una solución 0.05M que consta de cloramina T, 2-metoxietanol y amortiguador de citratos, la cual fue incubada por 20min a 25°C, después se adiciona 0.5 mL de ácido perclórico 3.15N y se mezcla durante 5 minutos, finalmente se agrega 0.5 mL de una solución de p-dimetilaminobenzaldehído al 20% que forma un complejo con el pirrol formado de la oxidación de la hidroxiprolina.

La solución anterior se agita y se calienta a 60°C durante 20 min en un baño maría. Al término de los cuales se dejó enfriar por 5min, se midió la absorbencia de las soluciones en un espectrofotómetro UV-Visible, Beckman D0780 a 557 nm.

Para construir la curva patrón se prepararon soluciones de hidroxiprolina con concentraciones de 0 a 6 µg/mL.

Para determinar la cantidad de colágena se hace uso de un factor de conversión de 7.46 para hacer la equivalencia a colágena con la siguiente fórmula [39].

$$\%CLG = \frac{(\mu g \text{ Hidroxiprolina})(7.46)(1000)}{(mg \text{ muestra})(\mu L \text{ muestra})} \quad (6)$$

### 3.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

La pureza de las soluciones de colágena fue analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, basándose en el método de Laemmli [40]. Las muestras se mezclaron con un amortiguador de muestra (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, SDS al 10%, glicerol, azul de bromofenol, agua desionizada) en relación 1:1, se calentó durante 10 minutos y se dejó enfriar, se cargaron 20  $\mu$ L de muestra al gel de poliacrilamida.

Un sistema discontinuo de gel de poliacrilamida fue empleado con una concentración de 7.5% para el gel separador y 4% para el gel concentrador y se realizó la corrida a 20 mV durante 2 h. Al término de ésta, se retiró el gel de la cámara (Dual Mini-Vertical Units Z37240-4 de Sigma-Aldrich), se tiñó en una solución de azul de Comassie R-250, ácido acético, isopropanol durante 12 h, para finalmente desteñir con una solución de metanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v) y agua desionizada 50% (v/v). Dentro de la corrida también se anexó una muestra estándar (H) y un marcador de masa molecular.

Se realizó un segundo gel, al cual se le agregó  $\beta$ -mercaptoetanol, como agente reductor, el cual reduce los enlaces disulfuro en las cadenas polipeptídicas, realizándose el mismo procedimiento arriba mencionado.

### 3.6 Transferencia de proteínas.

A través de la técnica de Western Blot se puede corroborar la presencia de colágena tipo I en la solución caracterizada y pureza, además se buscará colágena tipo III, esperando que ésta se encuentre en menor proporción, para ello, se emplearon anticuerpos específicos para este tipo de colágena.

Una vez terminada la electroforesis, se procedió a transferir las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa, para ello se sumergió el gel, papel filtro (7.5x10 cm), fibra y membrana en un amortiguador de transferencia Semi-Dry por aproximadamente 15 minutos. Se dispuso de un arreglo tipo sándwich (Ver Figura 2.14)

Se selló la cámara de transferencia y se dejó durante 12 h a 20 V, el equipo utilizado fue una Mini Trans-Blot Electrophoretic Cell de Bio-Rad. Se retira la membrana y se hacen 3 lavados con PBS 1x para después bloquearse con una solución de leche descremada en las zonas en las que no hubo transferencia de proteínas. El siguiente paso es la inmunoelectrotransferencia, es decir, la adhesión de un anticuerpo a la membrana y el reconocimiento del mismo por la proteína de interés (Colágena tipo I), esto consta de:

- 1) Leche descremada (Svelty) 5%, 0.3% Tween 20 y el anticuerpo (colágena tipo I humana en conejo, Santa Cruz CA) en una relación 1:100, incubándose toda la noche a temperatura ambiente y con agitación constante.
- 2) Se lavó tres veces la membrana con PBS-tween 20 al 0.3% y dos lavados más con PBS al 1x. Cada lavado es de 5 minutos con agitación.
- 3) Se diluyó el segundo anticuerpo (anticonejo en cabra) en PBS-tween 20 al 0.3% (1: 5000). Se incubó por una hora a temperatura ambiente y agitación.
- 4) Una vez más se realizaron los lavados.



5) Para observar si hubo reconocimiento del anticuerpo por la colágena se llevaron a cabo dos técnicas:

- la primera consiste en el revelado, para ello, una vez que se lavó la membrana se colocó en una bolsa y se le agregó una solución denominada chemilucifer working, la cual consiste en una solución de peróxido de hidrógeno en relación 1:100 con un amortiguador de peróxido de hidrógeno y finalmente se agregó un volumen equivalente a la mezcla anterior de una solución lumino/enhancer, se agitó durante tres minutos y se retiró la solución. La bolsa que contiene a la membrana se revela en un cuarto oscuro.
- la segunda técnica consiste en teñir la membrana con una solución de diaminobenzidina, peróxido de hidrógeno y 0.05M amortiguador Tris, durante 20 minutos, vigilando su comportamiento, hasta que se detiene la reacción con agua (cuando se observan bandas de color café).

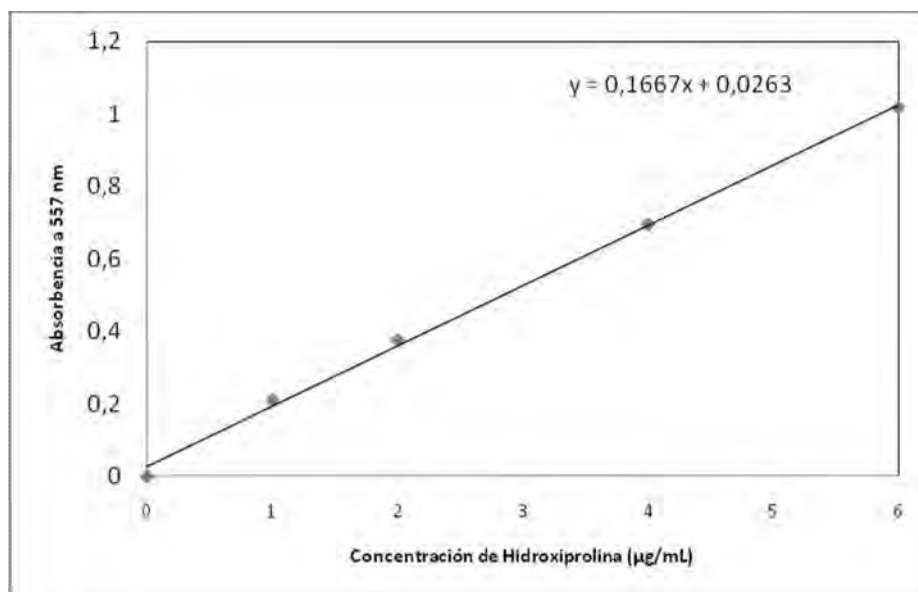
## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Determinación del contenido de colágena

##### Variante I

Mediante la técnica de J.F. Woessner se determinó la cantidad de hidroxiprolina empleando el promedio de dos medidas de la absorbencia de cada alícuota, (Figura 4.1 y Tabla 4.1). Mediante el factor de conversión (ecuación 6) se calculó el contenido de colágena en cada muestra para la variante I tomada durante el proceso de extracción purificación.



**Figura 4.1.** Curva estándar de hidroxiprolina para variante I.

En el caso de la variante I del proceso, se parte de un extracto con una concentración de colágena de 0.7 mg/mL, sin embargo, en el proceso se pierden 0.2 mg/mL después del primer ciclo de centrifugación posterior a la adición de NaCl en el sobrenadante y se tiene un precipitado (moléculas de colágena) con una concentración de 0.57 mg/mL que es resuspendido en ácido acético.

Pasado el tiempo de agitación de la solución anterior, se precipitó de nuevo con cristales de NaCl y se obtuvo una nueva solución, con una concentración de colágena de 0.42

mg/mL. Esta nueva solución se centrifugó, esperando tener más pérdidas de la colágena en el sobrenadante (E), el valor de la absorbencia en este sobrenadante resultó negativa, por lo que puede concluirse que en esta nueva solución no había presencia de colágena. Finalmente en la muestra (G) se mide una concentración de colágena tipo I de 0.3814 mg/mL, es decir, se tiene un rendimiento de 54.3%.

**Tabla 4.1** Absorbencia promedio y concentración de las alícuotas tomadas durante la extracción de colágena en variante I.

Muestra	Absorbencia	Hidroxirolina( $\mu\text{g/mL}$ )	Colágena (mg/mL)
A	0.22335	1.1821	1.1431
B	0.1168	0.5429	0.7467
C	0.0450	0.1122	0.2037
D	0.0887	0.3743	0.5783
E	0.09545	0.4148	0.4268
F	0.0219	-	-
G	0.0994	0.4383	<b>0.3814</b>
Control	0.9957	5.8152	7.1325

La Absorbencia promedio de las muestras tomadas durante la extracción de la colágena en el proceso con variante I, la concentración de hidroxiprolina y la concentración de colágena calculada mediante el factor de conversión se muestran en la tabla de arriba.

La alícuota A tomada después de la digestión proteolítica y antes de entrar a la etapa de dilución, no fue sometida al proceso de purificación, presentó una concentración de colágena tipo I de 1.14 mg/mL.

La muestra control posee una concentración de colágena tipo I de 7.13 mg/mL, un contenido bastante mayor al que se obtuvo en este trabajo, sin embargo, esto puede deberse a las distintas condiciones en el proceso de extracción, principalmente al tipo de amortiguador y cantidad de tejido empleado.

## Variante II

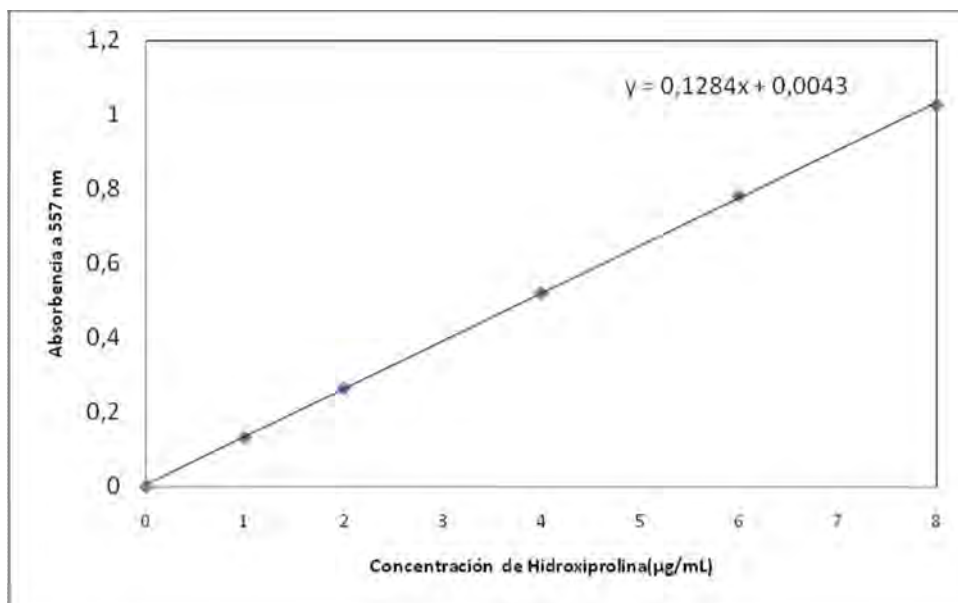
En la variante II y en el caso particular de la muestra  $\varepsilon_1$ , una vez más se construyó una curva patrón (Figura 4.2) para la cuantificación de colágena, en la Tabla 4.2 se puede observar que la concentración de colágena obtenida a través de esta variante es casi 8 veces mayor que la obtenida por la variante I y con una eficiencia de 74.19%, por lo tanto al poseer un rendimiento mayor que la variante I, es que es considerada la variante II para proceder a realizar las modificaciones mencionadas en el punto de condiciones de trabajo.

**Tabla 4.2** Absorbencia promedio y concentración de las alícuotas tomadas durante la extracción de colágena en variante II.

Muestra	Absorbencia	Hidroxiprolina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Colágena ( $\text{mg/mL}$ )
$\alpha$	0.1637	1.2414	4.0548
$\beta$	0.01035	0.0471	0.1515
$\gamma$	0.1535	1.1620	2.8365
$\delta$	-	-	-
$\varepsilon$	0.13805	1.0417	<b>3.005</b>
Control	0.82365	6.3812	8.5007

Por otro lado, la concentración de la colágena control, es un poco mayor al de la variante I, lo anterior se debe a la difusión que ocurre durante la etapa de diálisis.

Como puede verse en la Tabla 4.3 la mayor concentración de colágena obtenida en este trabajo fue la muestra  $\varepsilon_1$  correspondiente a la variante II del proceso, seguida de  $\varepsilon_5$ , la cual como se describió en la tabla 3.1 estuvo bajo una diferente concentración de NaCl en el tratamiento de purificación y en donde la colágena precipitada se suspende en una solución de 50 mM Tris-HCl a un pH de 7.4 ajustado con HCl 6 M. Los resultados de ambas muestras son relevantes, ya que se disolvió aproximadamente la misma cantidad de tejido en diferentes volúmenes de ácido acético, para  $\varepsilon_1$  en 300 mL y para  $\varepsilon_5$  en 200 mL, lo que muestra que la colágena se comporta bastante bien en una solución un poco menos ácida (pH : 6).



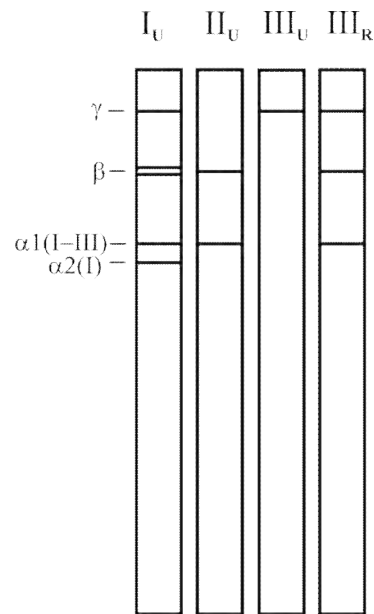
**Figura 4.2.** Curva Estándar de hidroxiprolina. (Variante II)

**Tabla 4.3** Concentración de Colágena en ambas variantes del proceso

Muestra	Concentración (mg/mL)
Control	7.132
Variante I-G	0.381
Variante II- $\epsilon_1$	3.005
Variante II- $\epsilon_2$	0.979
Variante II- $\epsilon_3$	1.377
Variante II- $\epsilon_4$	1.425
Variante II- $\epsilon_5$	2.011

## 4.2 Caracterización de las muestras por Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

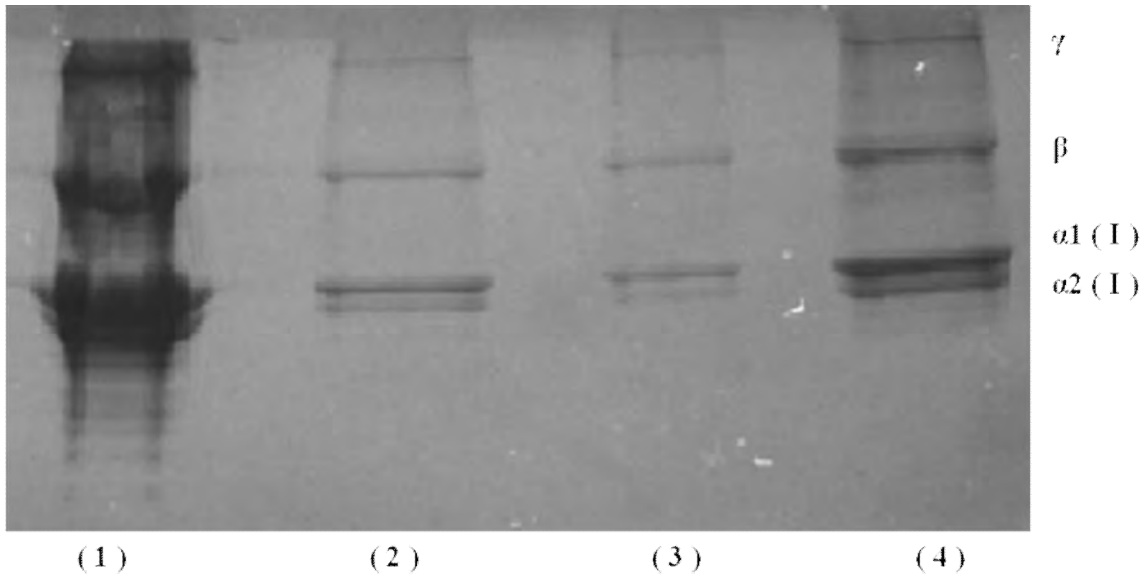
Esta técnica permite determinar la existencia y grado de pureza de la proteína en estudio. El patrón electroforético que caracteriza a la colágena tipo I, presenta una cadena  $\alpha 2$  (I), y dos cadenas  $\alpha 1$  (I) que a su vez están ligadas íntimamente con las cadenas  $\alpha 1$  (III) y los dímeros  $\beta$  y trímeros  $\gamma$ , como se observan en la siguiente figura 4.3.



**Figura 4.3.** Patrón electroforético correspondiente a la colágena.

I<sub>U</sub> colágena tipo I sin reducir; II<sub>U</sub> colágena tipo II sin reducir;  
III<sub>U</sub> colágena tipo III sin reducir; III<sub>R</sub> colágena tipo III reducida [36].

## 4.2.1 Patrón Electroforético en Variante I:



**Figura 4.4.** Patrón electroforético de: (1) 20  $\mu\text{L}$  de muestra control; (2) y (3) 20  $\mu\text{L}$  y 10  $\mu\text{L}$  muestra G, respectivamente; (4) 20  $\mu\text{L}$  de muestra A. (Variante I)

### 4.2.1.1 Descripción del patrón electroforético.

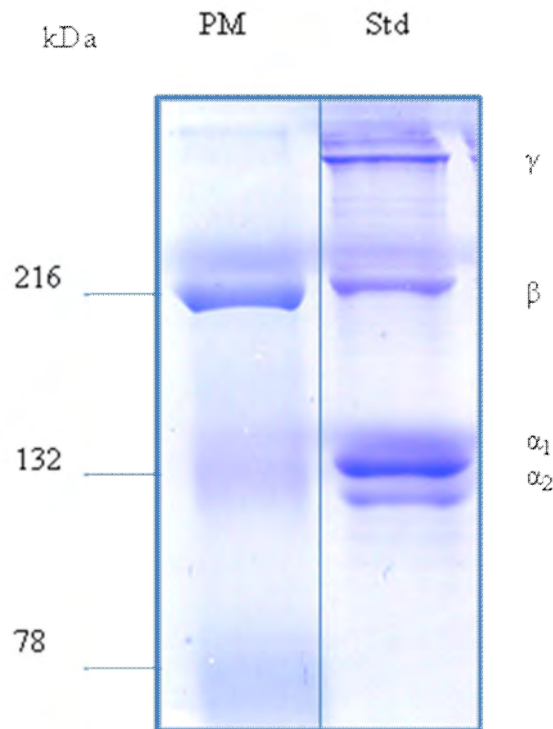
-Carril (1): la muestra posee una alta concentración de colágena, lo que se ve reflejado en el grosor e intensidad de las bandas y provoca un barrido entre los trímeros y las cadenas  $\alpha 2 (I)$ . También se observa la presencia de una gran cantidad de bandas por debajo de esta cadena, lo cual indica la degradación de la colágena.

-Carril (2) Y (3): Correspondientes a la colágena obtenida en la variante I del proceso (G), en ambos casos se observa perfectamente la presencia de colágena y no se observa degradación alguna, simplemente la diferencia radica en la cantidad cargada en los pozos del gel.

-Carril (4): Es la colágena a la cual no se le realizó proceso de purificación por lo cual presenta una intensidad y espesor mayor que en la muestra G. La aparición de bandas entre las bandas correspondientes a las cadenas  $\alpha$  corresponden a otras proteínas o a un diferente tipo de colágena. Sin embargo, es clara la presencia de colágena tipo I.

### 4.2.2 Patrón Electroforético en Variante II:

Una vez cuantificada la colágena se realizó la corrida de electroforesis obteniéndose los siguientes patrones:

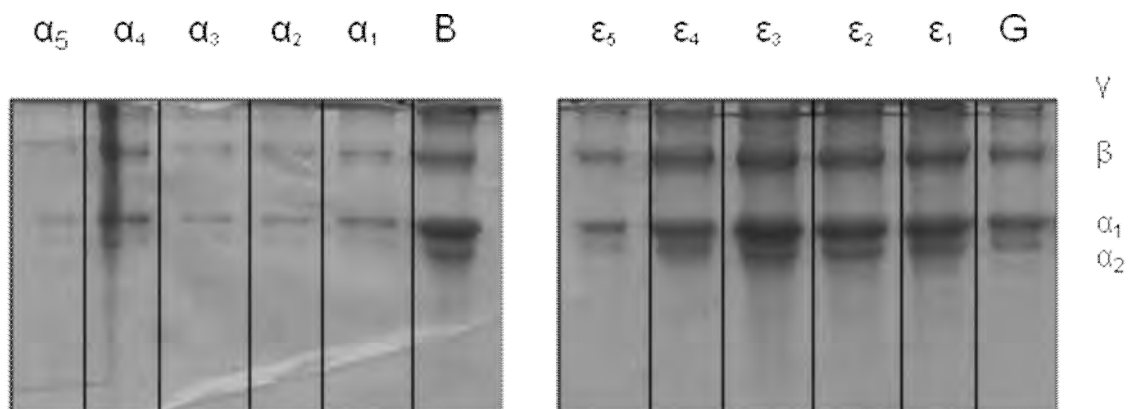


**Figura 4.5** Patrón electroforético de la colágena control y marcador de masa molecular

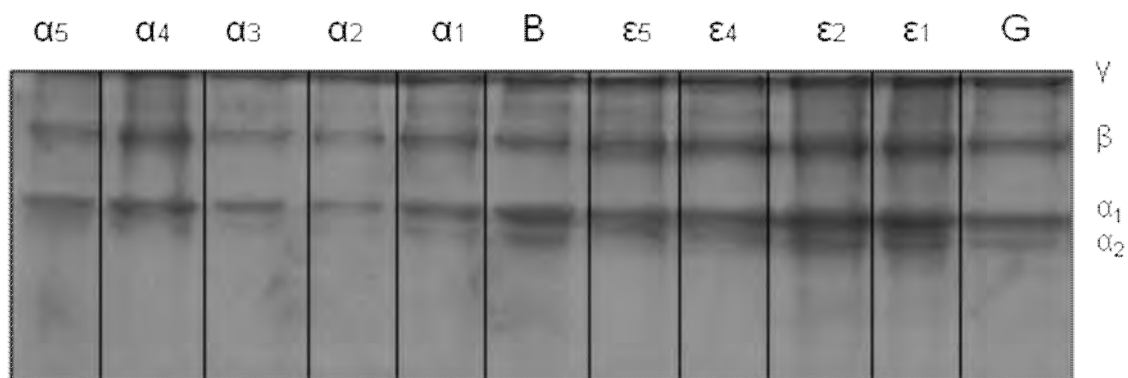
Con la finalidad de visualizar perfectamente la masa molecular aproximada de las bandas correspondientes a las cadenas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  de la colágena, se realiza un aumento de los carriles que contienen el marcador de masa molecular (Kaleidoscope Prestained Standards de Bio-rad) y colágena control (Figura 4.5).

Además se corrieron dos geles, el primero presente en la figura 4.6 bajo condiciones desnaturalizantes y el segundo, en la figura 4.7 expuesto a condiciones desnaturalizantes y de reducción usando 2- $\beta$ mercaptoetanol.





**Figura 4.6** Sin reducir



**Figura 4.7** Condiciones reductoras

Recordando que las muestras B y  $\alpha_x$  son las alícuotas iniciales de colágena para la variante I y II respectivamente, antes de ser sometidas a la etapa de purificación y Std. la colágena control, se puede apreciar una diferencia en cuanto a intensidad de bandas entre las alícuotas  $\alpha_x$  y  $\epsilon_x$ . Lo anterior se debe a que se colocaron 5 $\mu$ L en las primeras alícuotas, mientras que para las segundas fueron 10 $\mu$ L, por lo tanto en el supuesto de colocar la misma cantidad de materia en ambas, se observaría una tinción mayor en las  $\alpha$  y no se apreciaría con definición sus respectivas bandas, por lo cual se decidió colocar la mitad de muestra. Otra observación es la presencia aunque en menor proporción de trímeros ( $\gamma$ ).

Una vez más se obtienen las bandas correspondientes a las cadenas alfa y sin importar las condiciones bajo las que se realice la corrida, es decir, reductoras o sin reducir, no se perciben diferencias entre los geles.

A simple vista se puede decir, que la masa molecular aproximada de las cadenas  $\alpha_1$  es mayor a 132kDa, mientras que las cadenas  $\alpha_2$  poseen un valor ligeramente menor a este. Para tener una mejor aproximación en cuanto a la masa molecular se obtuvo una curva estándar que es generada por la movilidad electroforética relativa (Rf) del marcador de masa molecular. En donde se consideran las distancias de migración de la proteína a partir del gel separador y la distancia de migración del frente del gel (azul de bromofenol), ver ecuación 7.

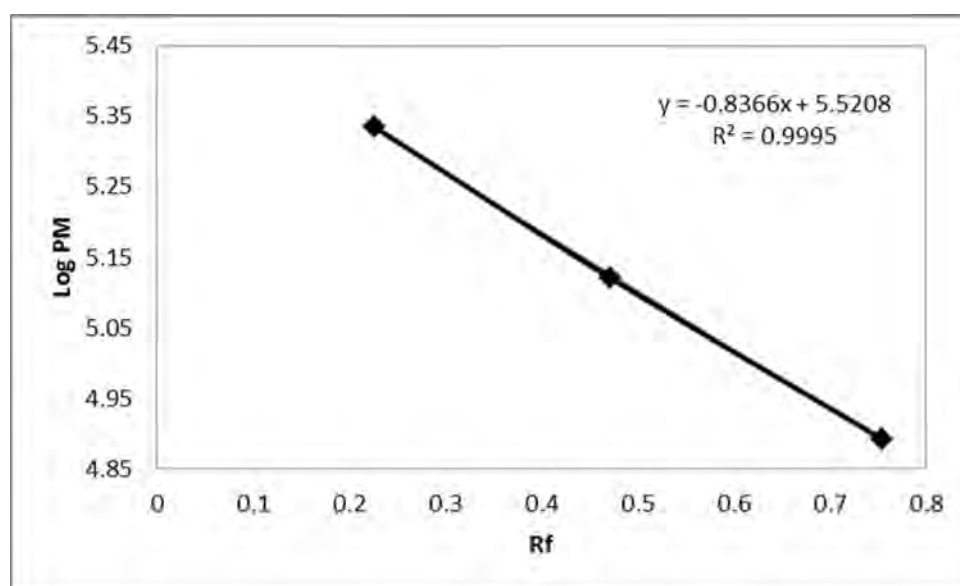
$$R_f = \frac{\text{Distancia que migra una determinada proteína}}{\text{Distancia que migra el frente del gel}} \quad (7)$$

En la tabla 4.4 en la primera columna se mencionan las proteínas que conforman al marcador de masa molecular, así como en la segunda columna se denotan los colores en los que se presentan de forma visual las bandas de dichas proteínas, en la tercera columna se tiene la masa molecular de cada proteína, excepto para las muestras problemas, en este caso las cadenas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , en la cuarta columna se registra la distancia a partir del gel separador hasta el centro de cada una de las bandas, en nuestro experimento no se presenciaron las bandas inferiores a la masa molecular de 78,000 Da y en la última columna se calcula la movilidad relativa a partir de la ecuación (7), teniendo un valor de 53 mm el denominador de esta ecuación.

**Tabla 4.4** Determinación de masa molecular para cadenas alfa

Proteína	Color	PM (Da)	Distancia (mm)	Rf (vs 53 mm)
Miosina	Azul	216,000	12	0.2264
$\beta$ -galactosidasa	Magenta	132,000	25	0.4716
Albúmina sérica bovina	Verde	78,000	40	0.7547
Anhidrasa carbónica	Violeta	45,700	-	-
Inhibidor de tripsina	Naranja	32,500	-	-
Lisozima	Rojo	18,400	-	-
Aprotinina	Azul	7,600	-	-
Cadenas $\alpha_1$	-	¿?	23.5	0.4434
Cadenas $\alpha_2$	-	¿?	26	0.4906

Finalmente se grafica Log del PM vs Rf como se observa en la figura 4.8 y se interpola para conocer el PM de la proteína de interés, en este caso de cada cadena alfa.



**Figura 4.8** Curva estándar para la determinación de masa molecular de las cadenas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ .

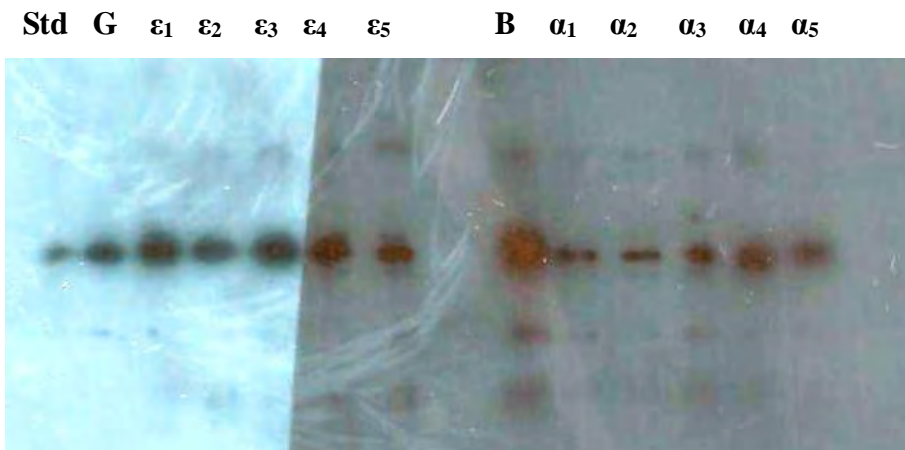
Utilizando la ecuación de regresión lineal de la curva estándar se obtiene la masa molecular de las cadenas:

**Tabla 4.5** Valores de masa molecular de las cadenas alfa de la colágena tipo I

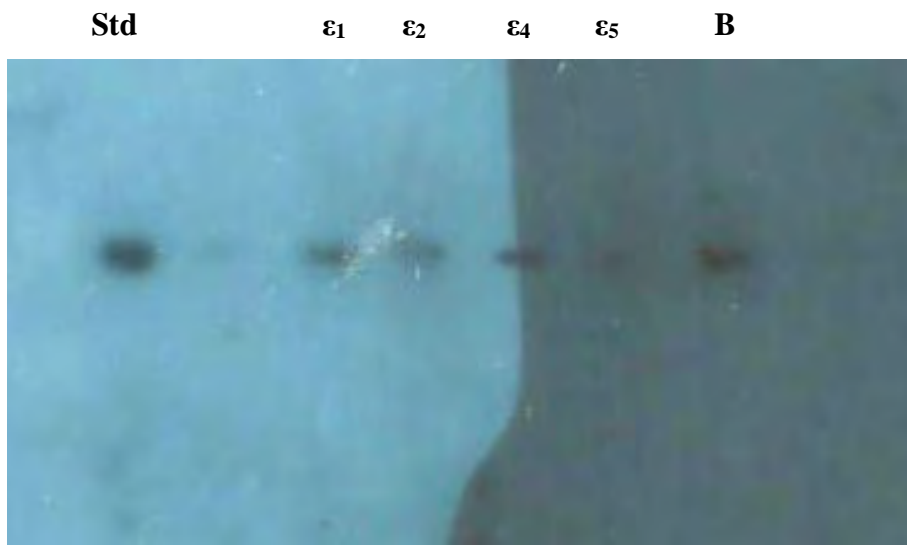
Cadena	PM (Da)
$\alpha_1$	141,206
$\alpha_2$	128,941

### 4.3 Caracterización por Western Blot

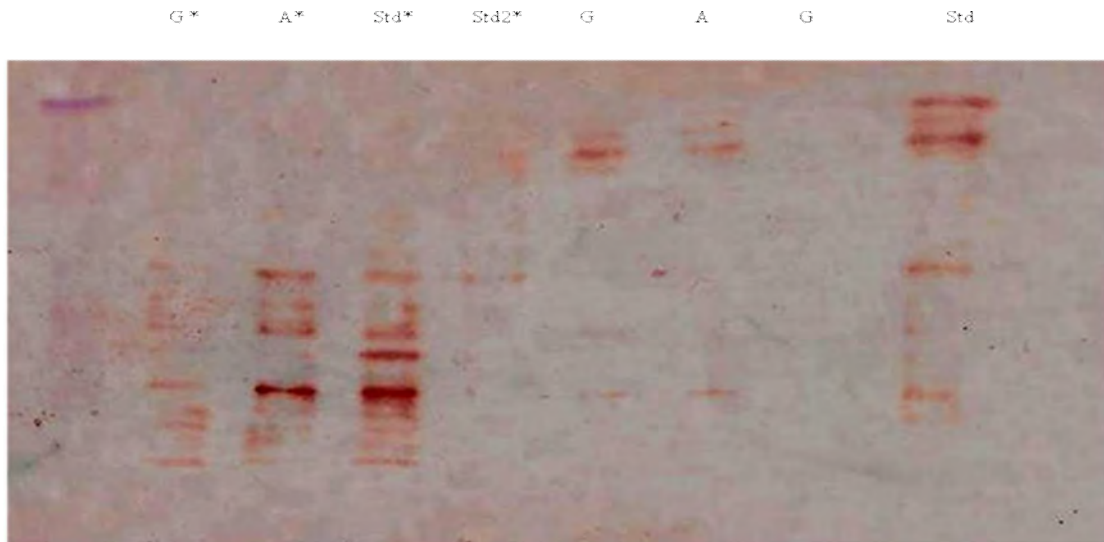
Al relacionar el patrón electroforético con respecto al obtenido mediante Western Blot, se puede decir, que el grado de pureza de las muestras es bastante alto, ya que como bien puede observarse en la figura 4.9 y 4.10, esencialmente las bandas con mayor intensidad y alineadas sobre el mismo eje horizontal corresponden a las cadenas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , también se nota una ligera presencia de dímeros y péptidos que pudieran haberse formado por la degradación parcial de la colágena durante su almacenamiento, el cual no incluyó ni congelamiento de la muestra, así como tampoco la adición de inhibidores de proteasa. Es así que, los resultados obtenidos al emplear un anticuerpo para colágena tipo I usando la técnica de revelado fueron positivos.



**Figura 4.9** Detección de colágena tipo I en muestras sin reducir



**Figura 4.10** Detección de colágena tipo I. En muestras reducidas



**Figura 4.11** Membrana teñida con diaminobenzidina para la detección de colágena tipo I. Muestras con asterisco, están reducidas con 2-βmercaptoetanol.

También se realizó la técnica de tinción con diaminobenzidina, con la cual se observa la presencia de colágena tipo I como una pigmentación roja sobre la membrana (figura 4.11), ésta última técnica no es tan sensible como la anterior, sin embargo, al igual que las autorradiografías de las figuras 4.9 y 4.10, se puede obtener información sobre la respuesta que presenta el antígeno frente al anticuerpo y sobretodo de la pureza de la muestra. De nuevo se alcanza a percibir un gran número de bandas en cada carril y de igual forma se presume que este fenómeno es debido principalmente a la degradación de la colágena, esta degradación está dada en mayor proporción en la colágena control tanto en condiciones reductoras, como en su ausencia.

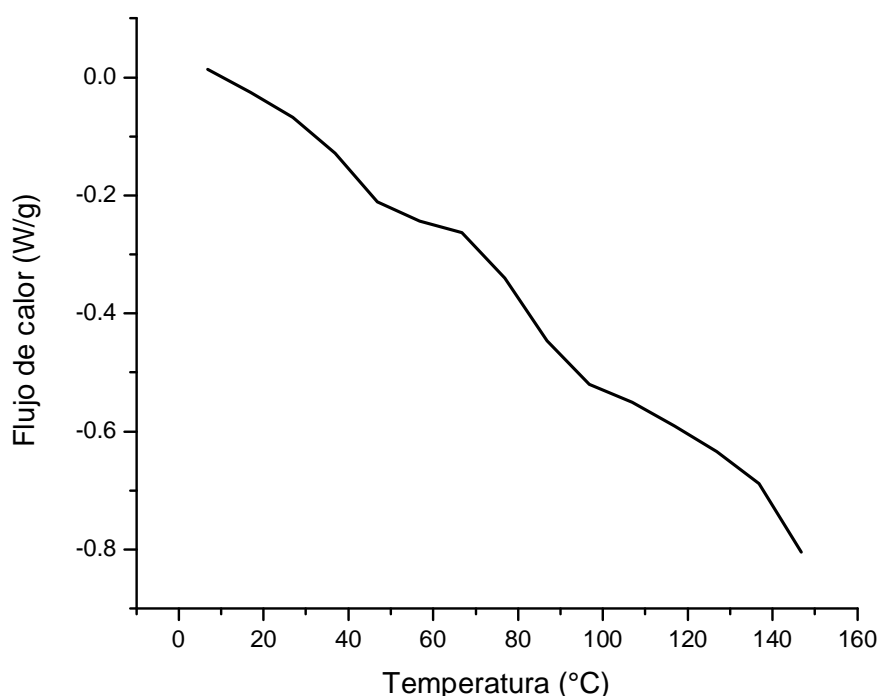
Se realizó una segunda transferencia de proteína a la membrana de nitrocelulosa, para determinar si dentro de las muestras se tenía la presencia de colágena tipo III, ya que ésta tiene cadenas  $\alpha 1$  que están muy relacionadas con a las de la colágena tipo I, sin embargo al realizar el revelado, la autorradiografía fue negativa, es decir, no existe la presencia de bandas.

#### 4.4 Calorimetría Diferencial de Barrido

Para realizar este estudio se liofilizó cada una de las soluciones de colágena (seis en total), así como la colágena control. El equipo utilizado fue de la marca TA Instruments DSC 2910 Modulated.

El intervalo de temperatura empleado es de 0° C a 150 °C en una atmósfera de nitrógeno y se llevó a cabo a dos velocidades de calentamiento, 1° C /min y 10° C /min respectivamente.

De la muestra G, se tiene un intervalo en el cual se observó la temperatura de desnaturalización comprendido entre 50-90°C, la cual se podría decir que presenta una transición débil, ya que no es clara una transición endotérmica con respecto a la línea base, más bien pareciese el comportamiento típico de una temperatura de transición vítrea (Tg), siendo la primera Tg a 42.99°C y la segunda Tg a 85.33°C. Figura 4.12



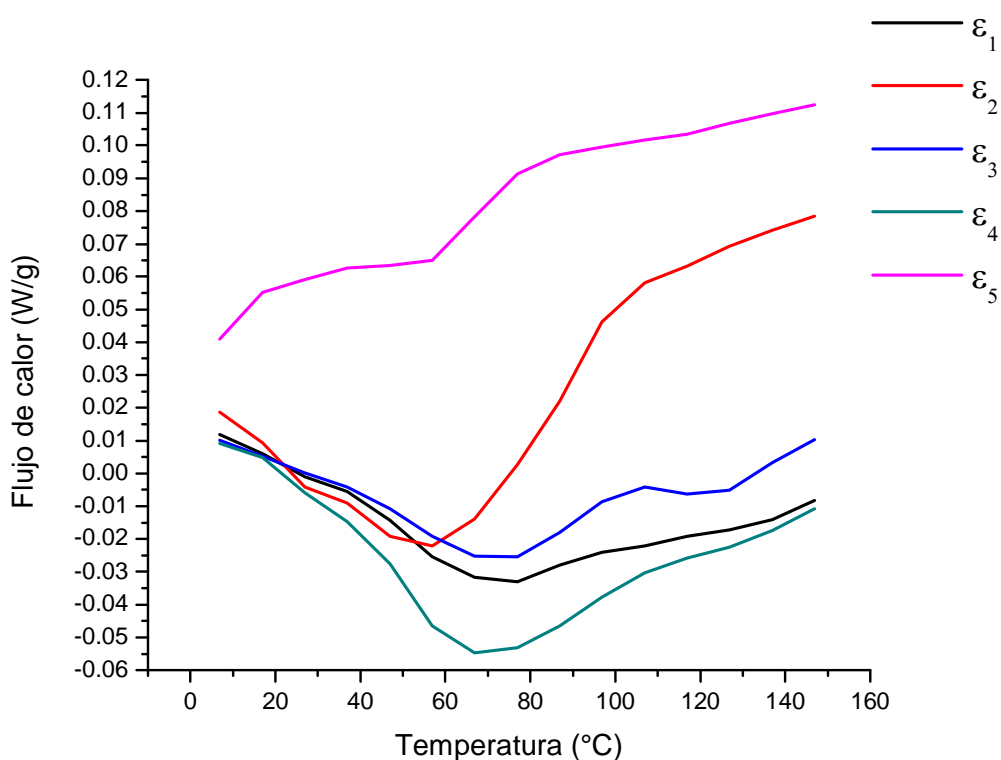
**Figura 4.12** Muestra G a una velocidad de calentamiento de 1°C/min.

En la figura 4.13 se presentan los termogramas para las muestras  $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$ ,  $\epsilon_4$  y  $\epsilon_5$  a la velocidad de  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  se puede observar dos comportamientos, por un lado las muestras  $\epsilon_2$  y  $\epsilon_5$  tiene una conducta parecida y por otro lado las muestras  $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_3$  y  $\epsilon_4$  exhiben un comportamiento muy semejante, la descripción para cada muestra se detalla a continuación:

Para la muestra  $\epsilon_1$  un pico de carácter endotérmico a una temperatura de  $70.79^\circ\text{C}$  que representa la temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ) de la molécula de colágena.

De la misma forma, en el termograma obtenido en la muestra  $\epsilon_2$ , también se observa un pico a  $58.64^\circ\text{C}$  correspondientes a la temperatura de desnaturalización.

Sin embargo para la muestra  $\epsilon_3$ , el termograma obtenido tiene un patrón diferente a los dos anteriores, ya que existen dos transiciones endotérmicas. A  $67.49^\circ\text{C}$  que indica la temperatura de desnaturalización, y a  $124.58^\circ\text{C}$  en donde se supone una degradación total de la colágena.

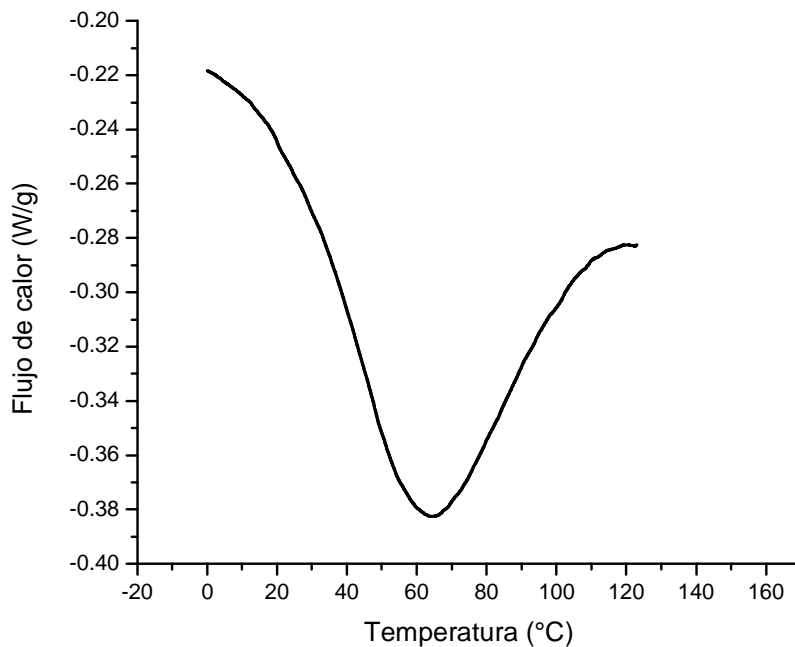


**Figura 4.13** Termogramas de muestras  $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$ ,  $\epsilon_4$  y  $\epsilon_5$  a la velocidad de  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ .

Para la muestra  $\varepsilon_4$  el termograma una vez más sigue el patrón de un pico endotérmico indicando una  $T_d$  de  $69.34^\circ\text{C}$ .

El termograma de la muestra  $\varepsilon_5$  es el que más difiere, ya que la energía requerida para dar paso a las transiciones térmicas es menor de  $2.893 \text{ J/g}$ , la temperatura de desnaturalización observable es a  $58.45^\circ\text{C}$ .

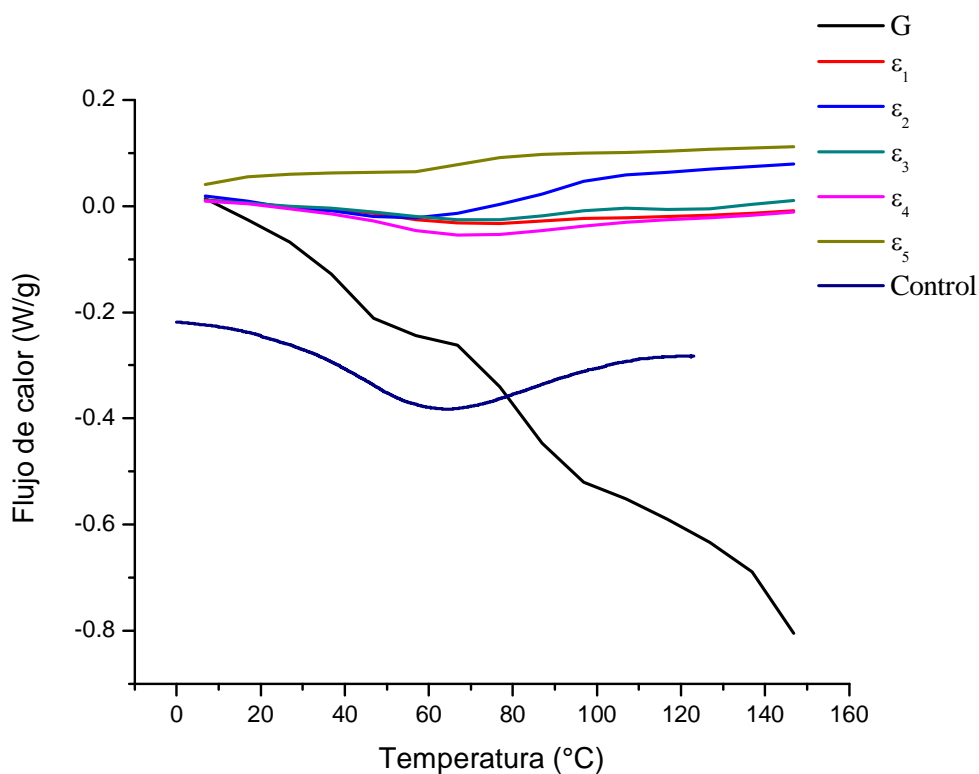
En el caso de la muestra de colágena control el termograma de la figura 4.14 presenta una temperatura de desnaturalización a  $60.13^\circ\text{C}$ .



**Figura 4.14** Termograma de colágena control a velocidad de  $1^\circ\text{C}/\text{min}$

En la Figura 4.15 se presentan los termogramas donde se observan las comparaciones entre cada una de las muestras, así como también respecto a la muestra control. De los resultados obtenidos se observa que claramente la muestra G no sigue el mismo patrón que el resto de la muestras y que a su vez, todas las muestra difieren en la energía de absorción con respecto a la muestra control.





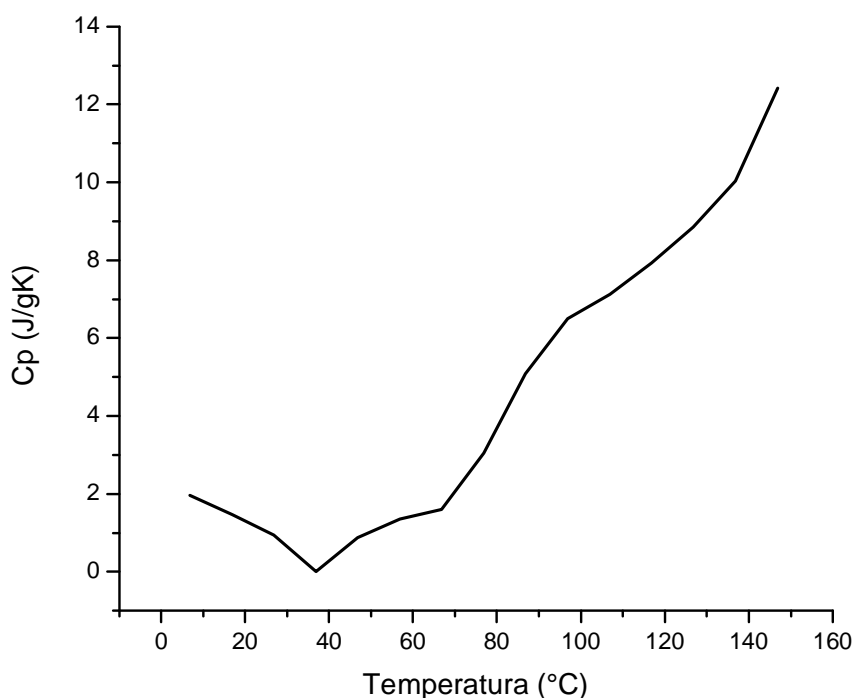
**Figura 4.15** Termogramas de todas las muestras, además de la muestra control a la velocidad de 1°C/min.

A continuación se presenta una tabla con los respectivos valores de energía y temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ):

**Tabla 4.6.** Valores correspondientes a las muestras a la velocidad de 1°C/min.

Muestra	$T_d$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
G	-	-
$\epsilon_1$	70.79	165.6
$\epsilon_2$	58.64	188.8
$\epsilon_3$	67.49	77.14
$\epsilon_4$	69.34	238.6
$\epsilon_5$	58.45	2.893
Control	60.13	375.7

Por otro lado, los termogramas correspondientes a las capacidades caloríficas ( $C_p$ ) vs temperatura ( $T$ ), se dividen en 3 gráficos para tener una mejor definición y detalle de las muestras. En la figura 4.16 se tiene el termograma para la muestra G, la cual como se denoto anteriormente presenta un comportamiento totalmente diferente con respecto a la mayoría de las muestra y además no se puede definir una capacidad calorífica, debido a que no es observable tal transición.



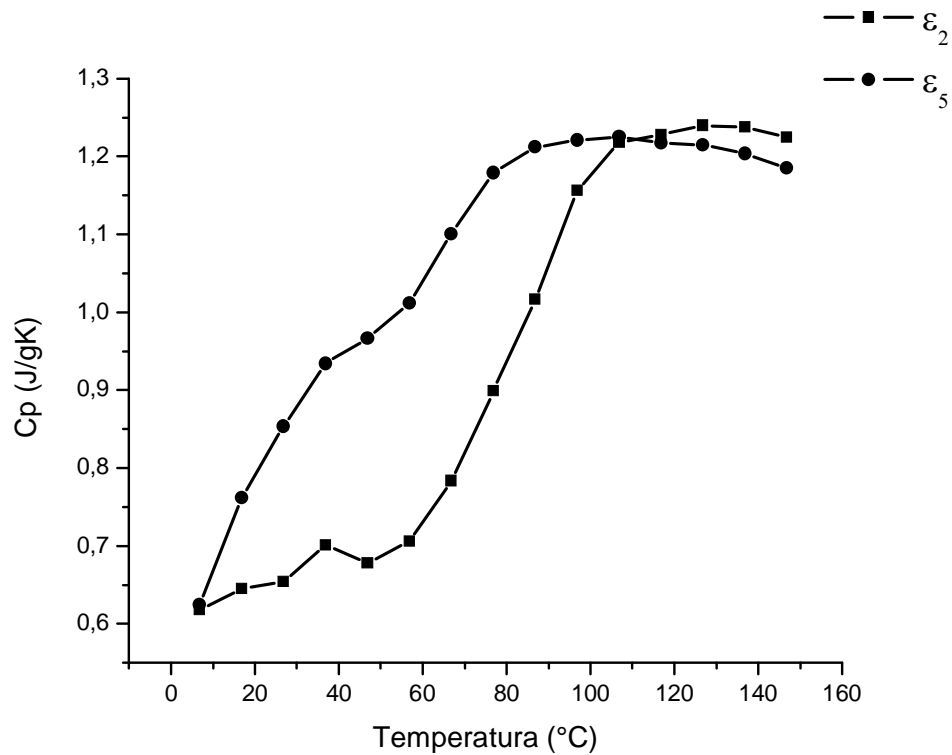
**Figura 4.16** Termograma  $C_p$  vs  $T$  de muestra G a velocidad de  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ .

En la figura 4.17, se muestran los termogramas para las muestras  $\varepsilon_2$  y  $\varepsilon_5$  tampoco se observa una curva típica, es decir, de una función cuadrática, por lo que sólo se puede suponer que el punto final de cada gráfica corresponde a la capacidad calorífica en el estado de final de desnaturalización.

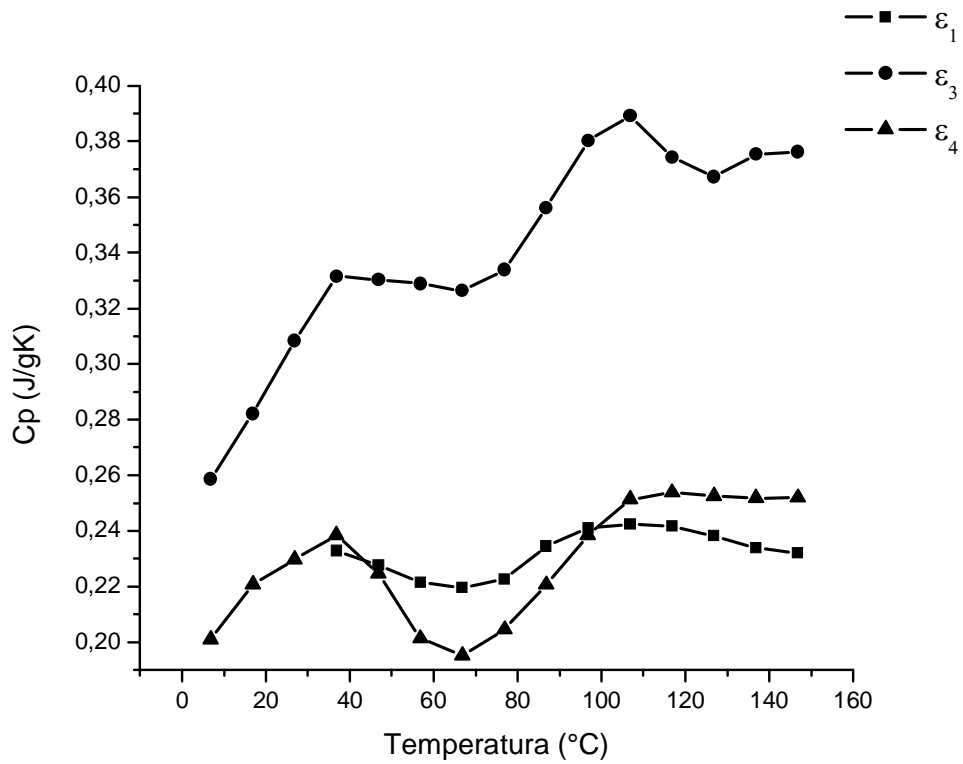
Para las muestra  $\varepsilon_1$ ,  $\varepsilon_3$  y  $\varepsilon_4$  se tienen las transiciones térmicas correspondientes a las capacidades caloríficas. También se puede apreciar otro tipo de fenómeno que podría corresponder a una desnaturalización mediada por intermediarios o desarrollada en distintas etapas, es decir, el cambio de un estado a otro no necesariamente se da

directamente en una sola fase, esto se puede intuir por el número de picos en los termogramas. (Figura 4.18)

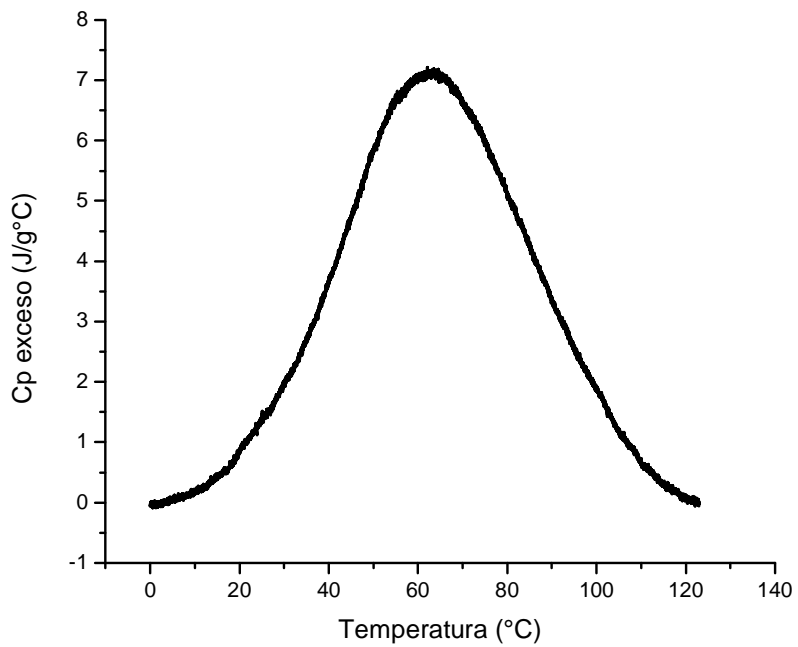
Finalmente en la figura 4.19 se tiene el termograma para la muestra control, el cual presenta una transición muy bien definida a 62.58°C correspondiente a una valor de capacidad calorífica específica de 7.09 J/g°C. Sin embargo, ninguna de las muestras obtenidas presentó similitudes con la muestra control.



**Figura 4.17** Cp vs T de muestras  $\epsilon_2$  y  $\epsilon_5$  a velocidad de 1°C/min.



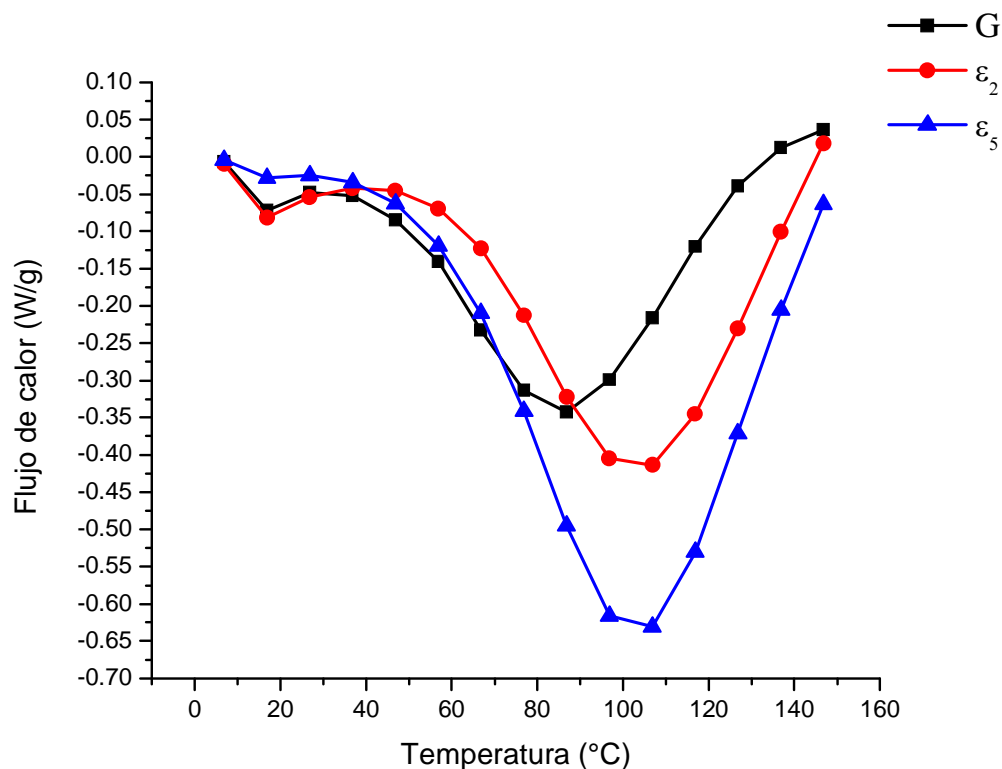
**Figura 4.18**  $C_p$  vs T de muestras  $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_3$  y  $\epsilon_4$  a velocidad de 1°C/min.



**Figura 4.19** Termograma  $C_p$  vs T de muestra control a velocidad de 1°C/min.

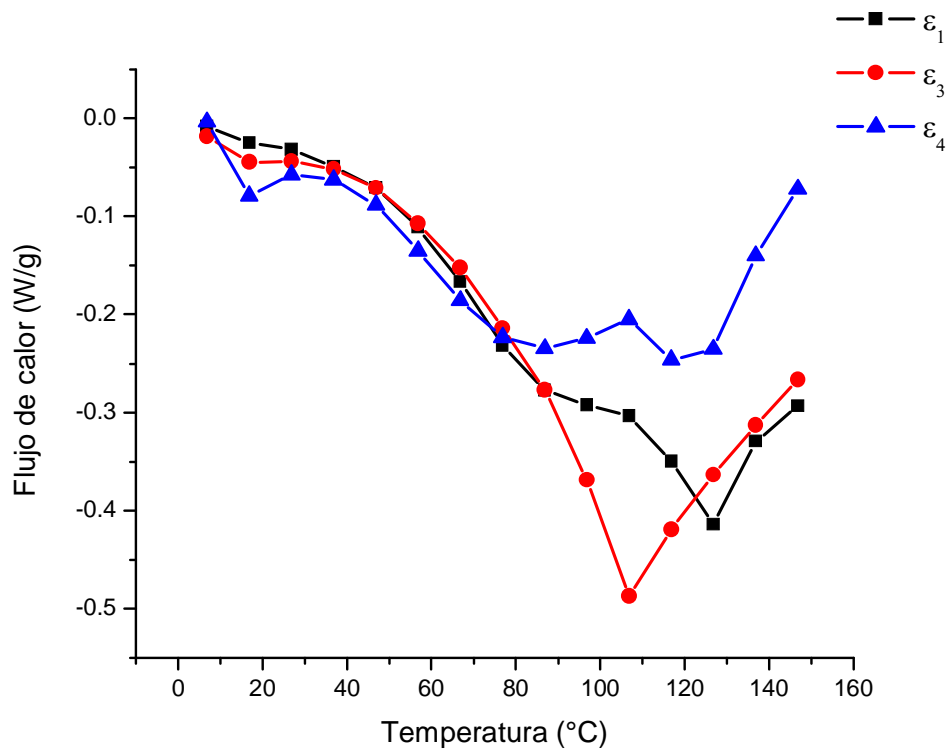
Ahora bien, los resultados obtenidos a la velocidad de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  son: Las muestras G,  $\varepsilon_1$ ,  $\varepsilon_2$ ,  $\varepsilon_3$ ,  $\varepsilon_4$  y  $\varepsilon_5$  (Ver figura 4.20 y 4.21) presentan una sola transición térmica, el fenómeno de desplegamiento se llevo a cabo a las temperaturas de  $89.10^{\circ}\text{C}$ ,  $124.29^{\circ}\text{C}$ ,  $104.84^{\circ}\text{C}$ ,  $104.08^{\circ}\text{C}$ ,  $122.93^{\circ}\text{C}$  y  $102.41^{\circ}\text{C}$  respectivamente. Al contrario de lo que sucede a una velocidad de  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , en la muestra  $\varepsilon_3$  no observa una segunda transición, esto se puede atribuir a que dicha transición quizá se llevará a una mayor temperatura de  $160^{\circ}\text{C}$  y al ser mayor la velocidad de calentamiento, también se incrementa la temperatura a la cual se daría la segunda transición, sin embargo, el estudio se realizó solo hasta  $150^{\circ}\text{C}$ .

De la misma manera que para las muestras corridas a  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , se dividió el estudio de los termogramas en dos gráficos para su mejor análisis. Es así que en la figura 4.20 se tienen a las muestras G,  $\varepsilon_2$  y  $\varepsilon_5$  que presentan un comportamiento semejante y bien definido, es decir, con un solo pico que constituye la transición térmica de desnaturalización.



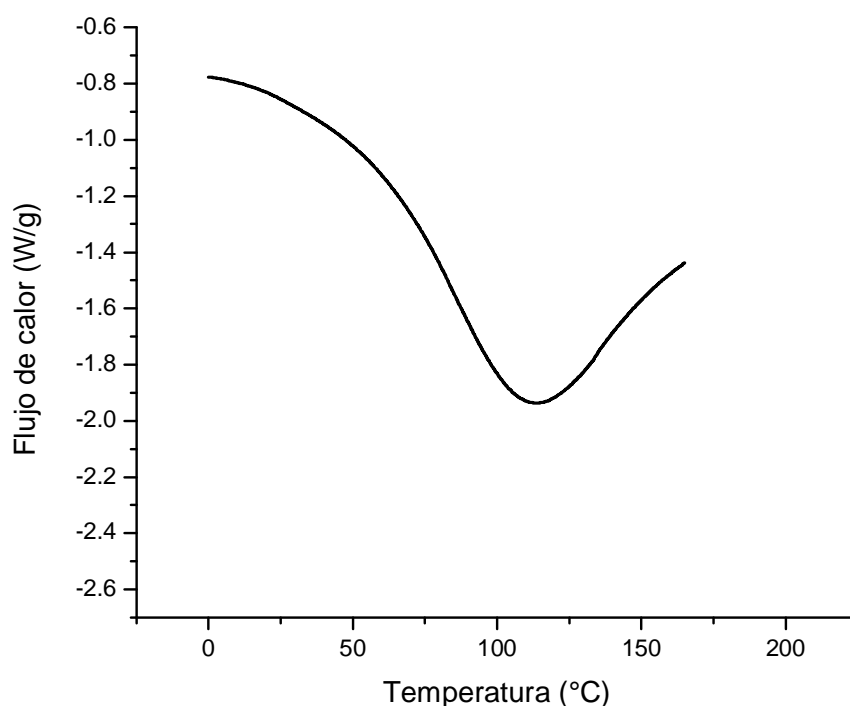
**Figura 4.20** Termograma de muestras G,  $\varepsilon_2$  y  $\varepsilon_5$  a la velocidad de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

Para las muestras restantes (figura 4.21) se tiene un patrón diferente a las observadas en la figura 4.20, sin embargo, también presentan la transición de desnaturalización denotada como un pico endotérmico, aunque no único, como es el caso de la muestra  $\epsilon_4$ .



**Figura 4.21** Termograma de muestras  $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_3$  y  $\epsilon_4$  a una velocidad de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ .

En el caso de la colágena control en la figura 4.22, se tiene una temperatura de desnaturalización de  $113.16^\circ\text{C}$  y presenta una transición bien definida.



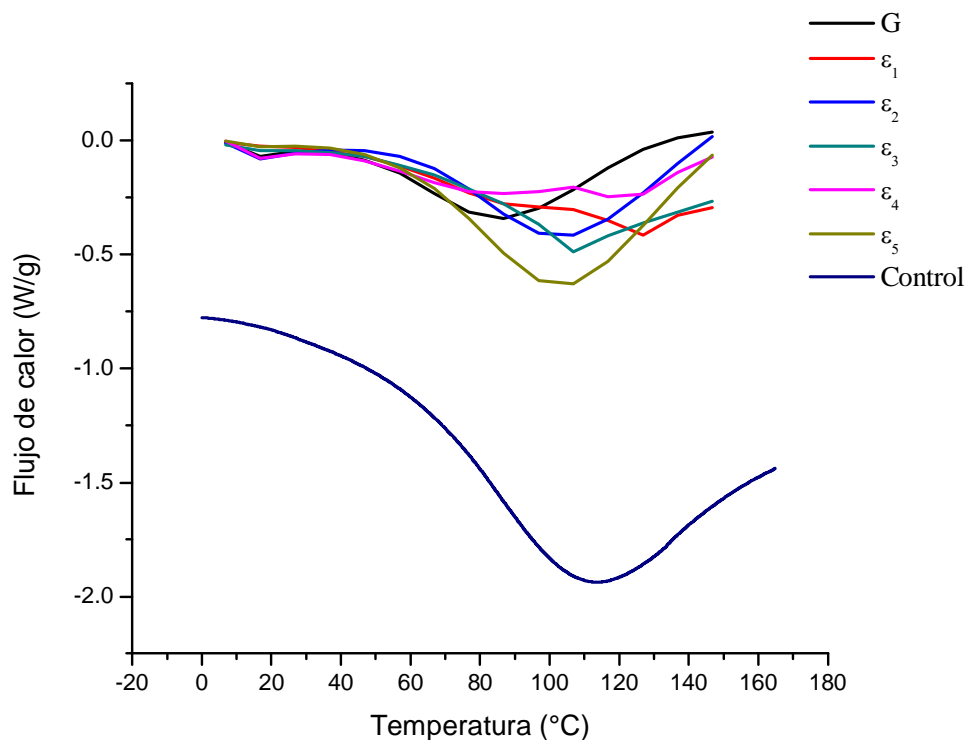
**Figura 4.22** Termograma de colágena control a velocidad de 10°C/min

Los valores obtenidos a esta velocidad se presentan en la siguiente tabla.

**Tabla 4.7.** Valores correspondientes a las muestras a la velocidad de 10°C/min.

Muestra	T <sub>d</sub> (°C)	ΔH (J/g)
G	89.10	105.40
ε <sub>1</sub>	124.29	11.64
ε <sub>2</sub>	104.84	125.20
ε <sub>3</sub>	104.08	78.90
ε <sub>4</sub>	122.93	7.78
ε <sub>5</sub>	102.41	198.20
Control	113.16	317.2

En la figura 4.23 se observa el termograma que incluye todas las muestras obtenidas en este estudio, así como la muestra de colágena control, se puede ver que a esta velocidad es más notorio el parecido que se tiene entre cada una de las muestras y con la muestra control, no obstante, sigue habiendo una gran diferencia de energía entre estas dos últimas.



**Figura 4.23** Termogramas de muestras todas las muestras obtenidas y control corridas a una velocidad de 10° C/min.

De la misma forma que a la velocidad de 1°C/min, se estudian los termogramas correspondientes a la capacidad calorífica vs temperatura. Se presentan en dos gráficos como en la velocidad anterior. En la figura 4.24 con una tendencia similar las muestras G, ε<sub>2</sub> y ε<sub>5</sub> y en la figura 4.25 con una similitud entre su comportamiento las muestras ε<sub>1</sub>, ε<sub>3</sub> y ε<sub>4</sub>. Sin embargo, en ambas figuras se tiene un comportamiento muy alejado al observado a la velocidad de 1°C/min, pero con mayor contenido en información, y es que posiblemente se tiene un proceso de desnaturalización en el cual están involucrados más de dos estados, esto se sospecha debido a la gran cantidad de picos presentes. Es decir, se presume la existencia de intermediarios estables entre el estado nativo y el estado desnaturalizado. La situación anterior en gran parte se debe a que ciertas regiones o dominios de la proteína se desnaturalizan independientemente uno del otro [41].

La capacidad calorífica de la colágena control (Figura 4.26) es de 4.028 J/g°C, con una transición nuevamente muy bien marcada a 108.82°C.



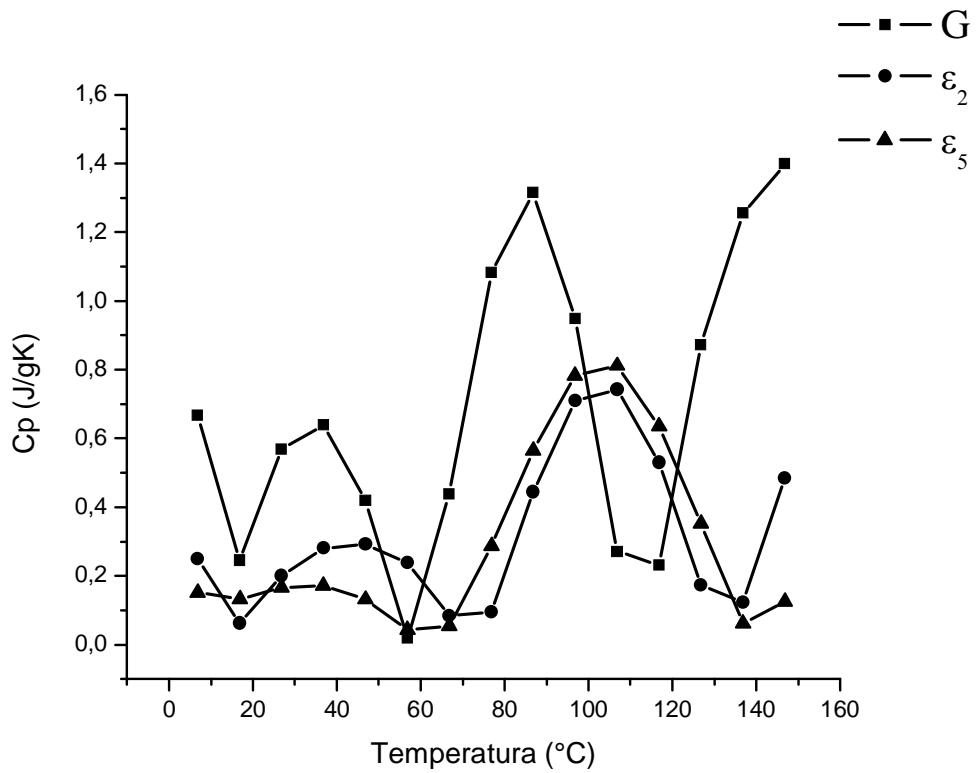


Figura 4.24 Termograma de Cp vs T de muestras G,  $\epsilon_2$  y  $\epsilon_5$  a velocidad de 10°C/min.

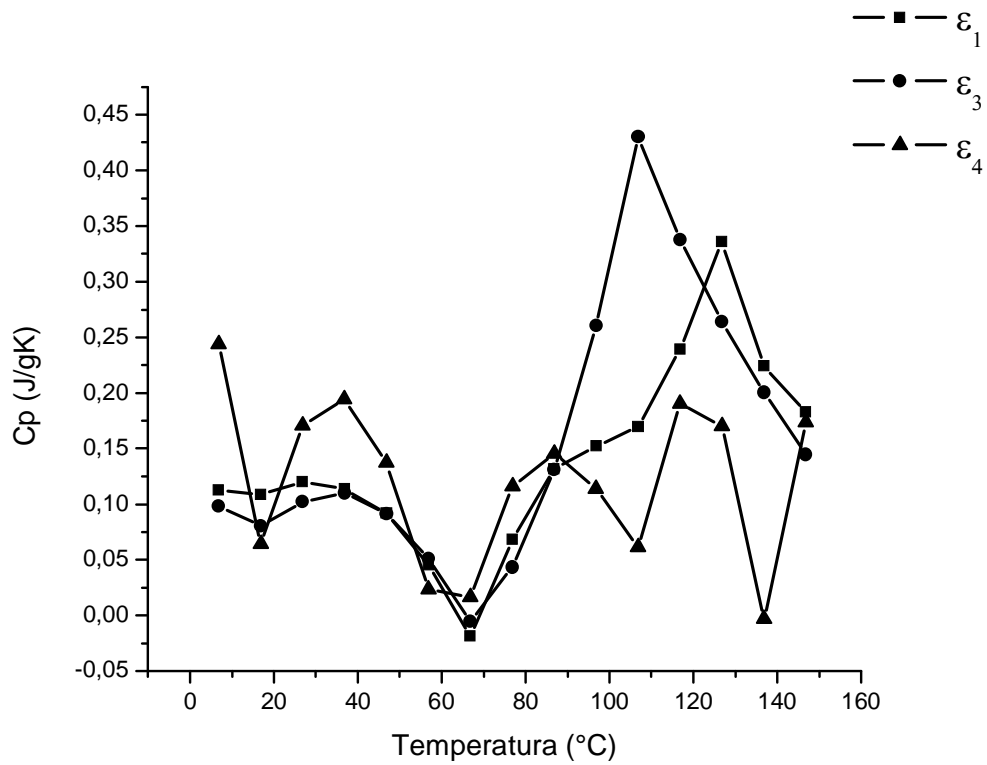
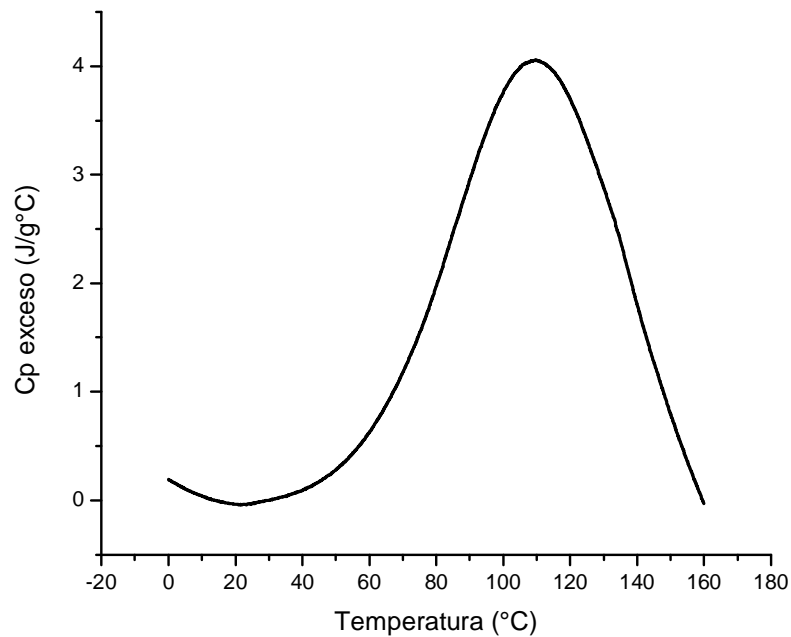


Figura 4.25 Termograma de Cp vs T de muestras  $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_3$  y  $\epsilon_4$  a velocidad de 10°C/min.



**Figura 4.26** Cp vs T de muestra control a velocidad de 10°C/min.

Cabe mencionar que cada una de las transiciones térmicas obtenidas se llevan a cabo a lo largo de un intervalo, sin embargo, para poder definir una temperatura a la cual ocurre este fenómeno se denota un punto como  $T_{1/2}$  o  $T_d$ , definida como la temperatura a la cual aproximadamente el 50% de las moléculas de una proteína han sido desnaturalizadas. El proceso de desnaturalización es considerado como una transición reversible y en algunas proteínas es irreversible, dadas entre dos estados macroscópicos generalmente, el nativo y el desnaturalizado.

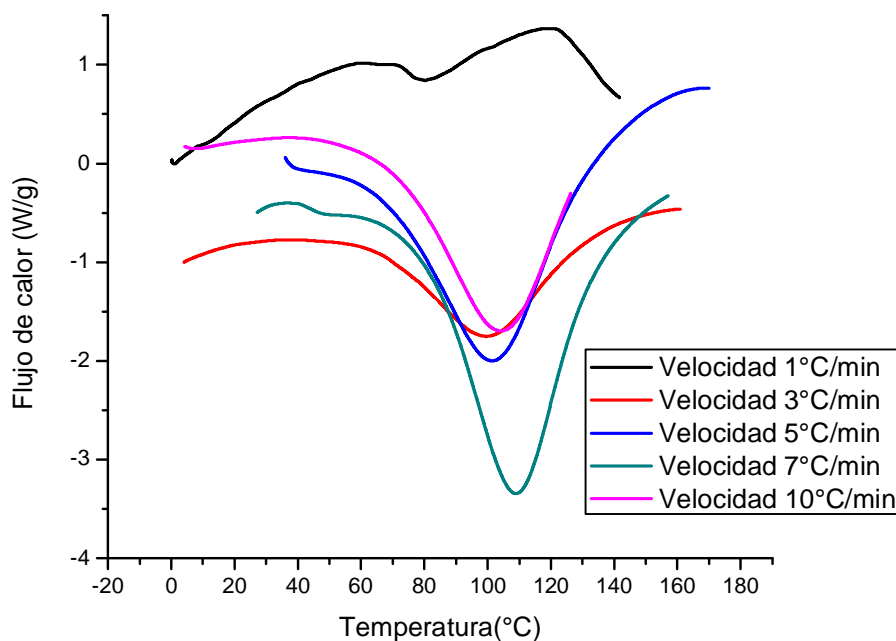
El desplazamiento observado en las temperaturas de desnaturalización a una velocidad de 10°C/min con respecto a la velocidad de 1°C/min se debe a que a mayor velocidad de calentamiento, el flujo de calor aumenta sobre un periodo de tiempo corto y a una velocidad menor se tiene un flujo de calor más lento en un periodo de tiempo más largo.

A 1°C/min, la muestra es calentada lentamente, por lo que hay tiempo suficiente para que la molécula se desdoble totalmente y de ahí que pierda su estructura terciaria y secundaria. Cuando se lleva a una velocidad de calentamiento de 10°C/min, se obliga a que la molécula de colágena se desdoble, sin quizá lograrlo completamente.

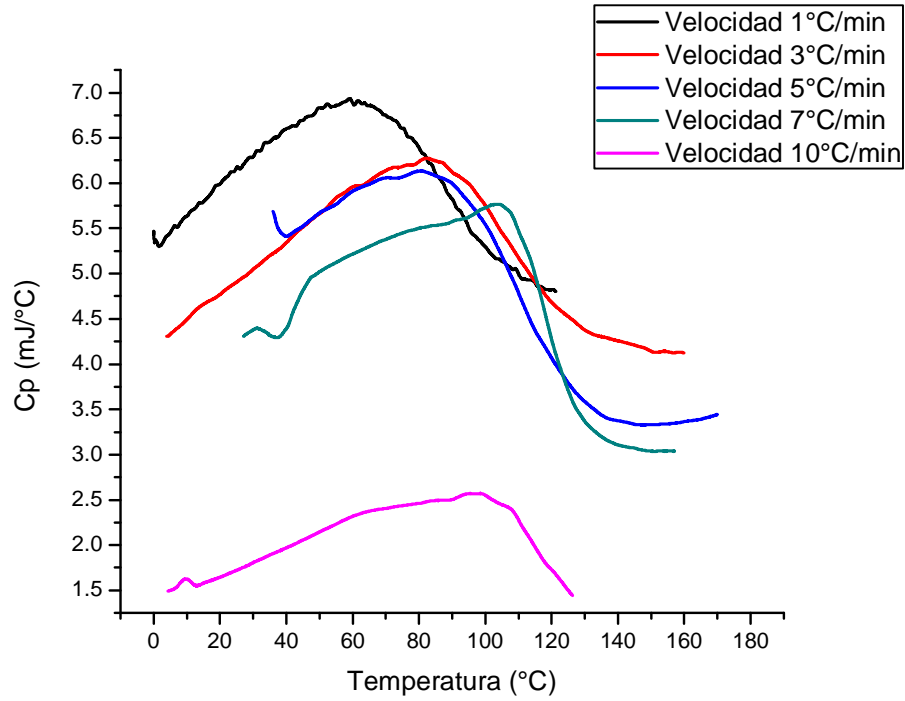
Si observamos los termogramas anteriores claramente salta a la vista el desplazamiento de la temperatura de desnaturalización en relación con la velocidad de calentamiento. A diferencia de los polímeros sintéticos en donde no existe un corrimiento en la temperatura de fusión cuando se varía la velocidad de calentamiento, si lo hay para la colágena (polímero natural), lo anterior se puede deber a una cuestión cinética en la transición.

Para poder entender lo anterior, se decidió tomar la muestra que tuviera un comportamiento similar al de la colágena control, siendo la muestra  $\epsilon_5$  la elegida y se procedió a ampliar el intervalo de velocidades de calentamiento, siendo las velocidades de calentamiento: 1, 3, 5, 7 y 10 °C/min. Y de esta forma definir mejor el comportamiento de la proteína en cuanto a su estabilidad frente a diferentes velocidades de calentamiento.

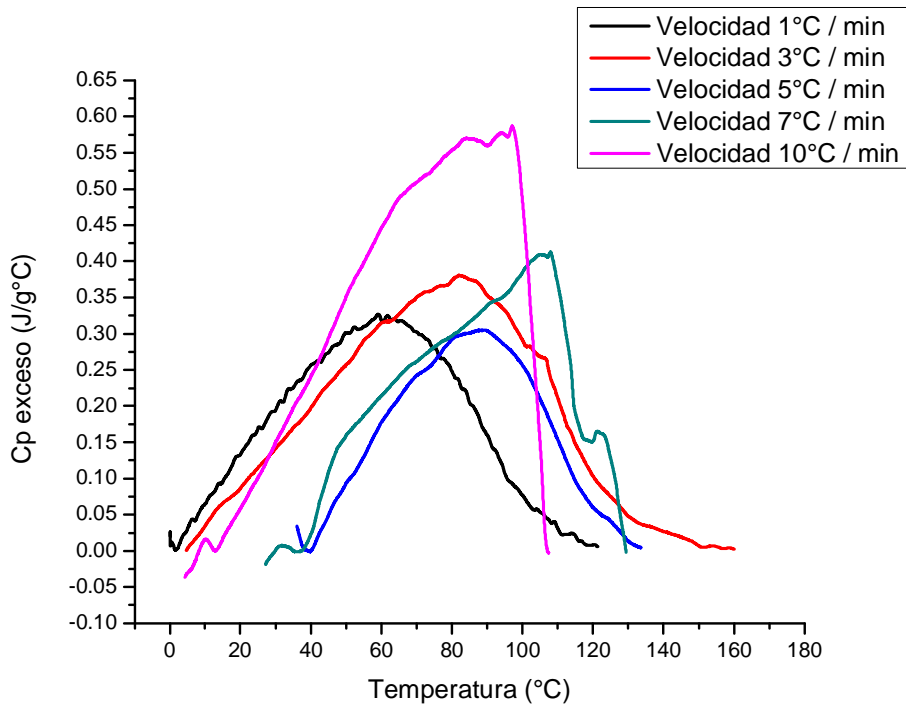
A continuación en las figuras 4.27, 4.28 y 4.29 se observan los termogramas obtenidos tanto para flujo de calor, capacidad calorífica y capacidad calorífica de exceso vs temperatura, respectivamente:



**Figura 4.27** Termograma de Q vs T de la muestra  $\epsilon_5$  a las velocidades 1, 3, 5, 7, y 10 °C/min.

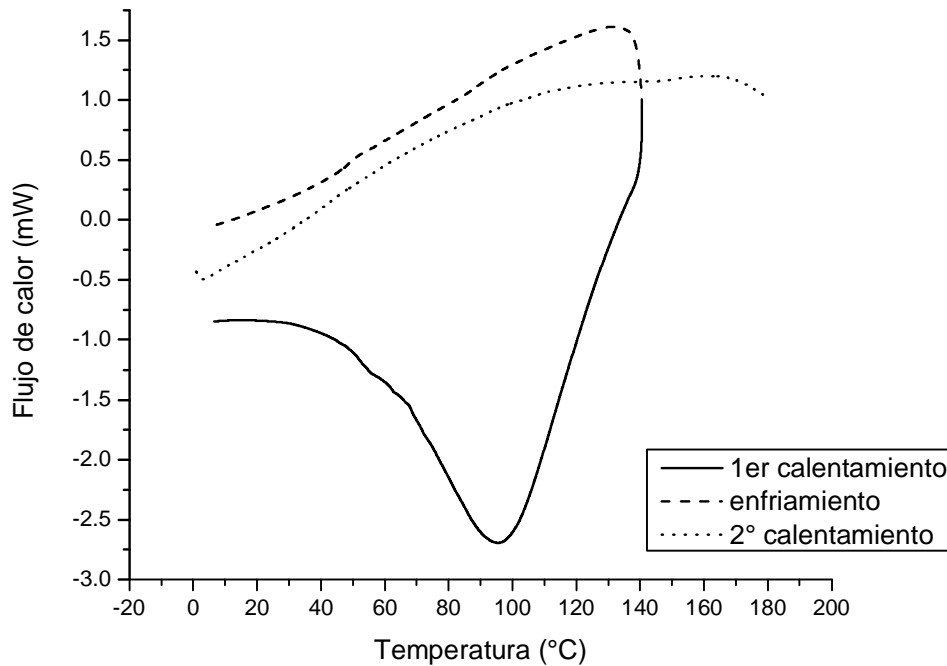


**Figura 4.28** Termograma de  $C_p$  vs  $T$  de la muestra  $\epsilon_5$  a las velocidades 1, 3, 5, 7, y 10  $^\circ\text{C}/\text{min}$ .



**Figura 4.29** Termograma de  $C_p$  exceso vs  $T$  de la muestra  $\epsilon_5$  a las velocidades 1, 3, 5, 7, y 10  $^\circ\text{C}/\text{min}$ .

Además para poder determinar si el proceso de desnaturalización es reversible, una vez calentada la muestra se enfrió a la misma velocidad de calentamiento y se realizó un segundo calentamiento (figura 4.30), de acuerdo con los resultados se observó que el fenómeno de plegamiento-desplegamiento no es reversible para la colágena tipo I.



**Figura 4.30** Proceso de desnaturalización y renaturalización de la colágena a una velocidad de 5°C/min de la muestra  $\epsilon_5$ .

Para poder explicar el proceso de desplegamiento (desnaturalización) y plegamiento en la molécula de colágena ha sido necesario el empleo de modelos termodinámicos y cinéticos, el primero se emplea cuando se presenta una transición de tipo reversible, mientras que el segundo cuando existe una transición irreversible.

En la figura 4.29 se observa claramente que existe una fuerte relación entre la temperatura de desnaturalización y la velocidad de calentamiento, lo cual es un fenómeno concurrente en procesos irreversibles. Por lo que, primero se analizará en términos de un modelo de dos estados irreversible, de acuerdo a la ecuación (8):

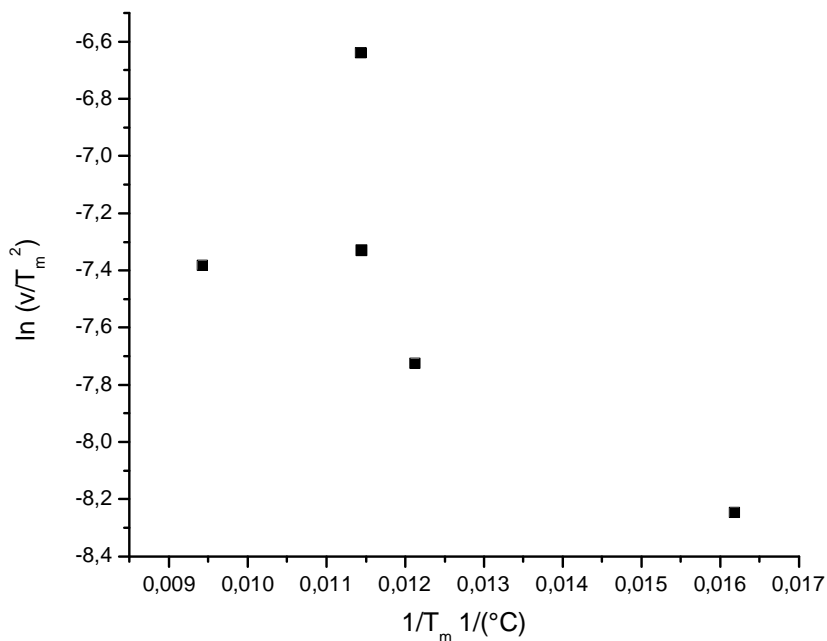


Donde N y D representan los estados nativo y desnaturalizado respectivamente y existe una constante de velocidad k entre ambos estados de primer orden y que está en función de la temperatura de acuerdo con la ecuación de Arrhenius.

A partir de lo anterior Sánchez-Ruiz y colaboradores [31] propusieron varios métodos que permiten calcular ciertos valores, tales como la constante de velocidad de una reacción (k) y la energía de activación ( $E_A$ ). En nuestro caso sólo empleamos un método, de acuerdo con la ecuación

$$\ln (v/T_m^2) = \ln (AR/E_A) - E_A /RT_m \quad (9)$$

En donde  $T_m$  es la temperatura en el máximo de la curva de Cp exceso vs T, v la velocidad de calentamiento, A el factor preexponencial y R la constante de los gases. Al utilizar la ecuación (9) se tiene la gráfica mostrada en la figura 4.31. De lo observado se concluye que el modelo de dos estados no es el adecuado para demostrar el comportamiento de desnaturalización irreversible en la colágena, ya que para justificar el uso de la ecuación (9) se debería de obtener una línea recta [42].



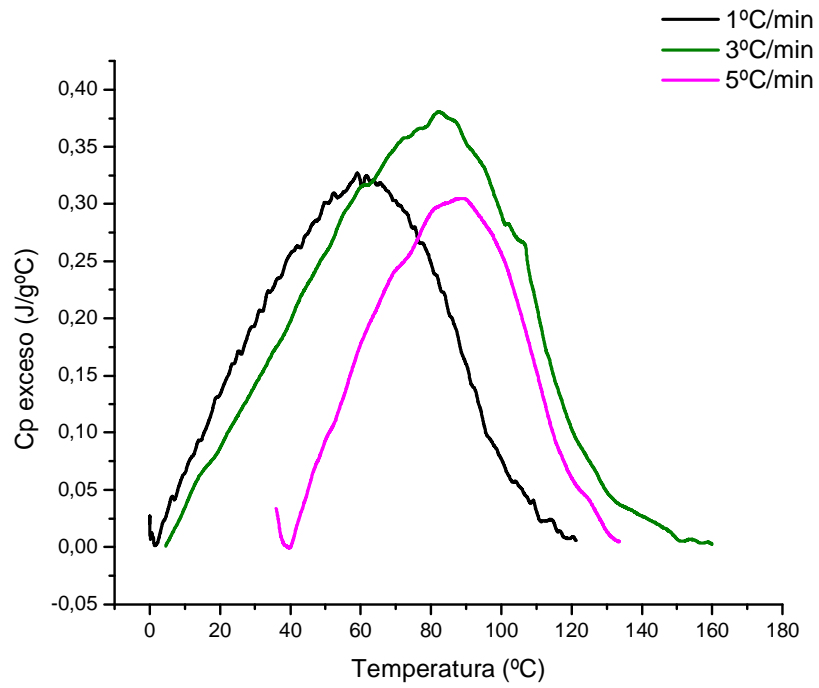
**Figura 4.31** Gráfico de  $\ln (v/T_m^2)$  vs  $1/T_m$ . Cada punto corresponde a una de las cinco transiciones térmicas mostradas en la figura 4.29. Coeficiente de correlación  $r=0.48$ .

Por lo que para poder explicar el comportamiento antes observado se considera el modelo de Lumry-Eyring, en donde se asume la presencia de un estado desplegado reversible antes de una desnaturalización total e irreversible. Este modelo propone que el desplegamiento se da en dos pasos: (1) un equilibrio reversible de desplegamiento de la estructura terciaria y (2) un paso irreversible que involucra un deplegamiento de la estructura secundaria de primer orden, como se muestra en la ecuación (10):

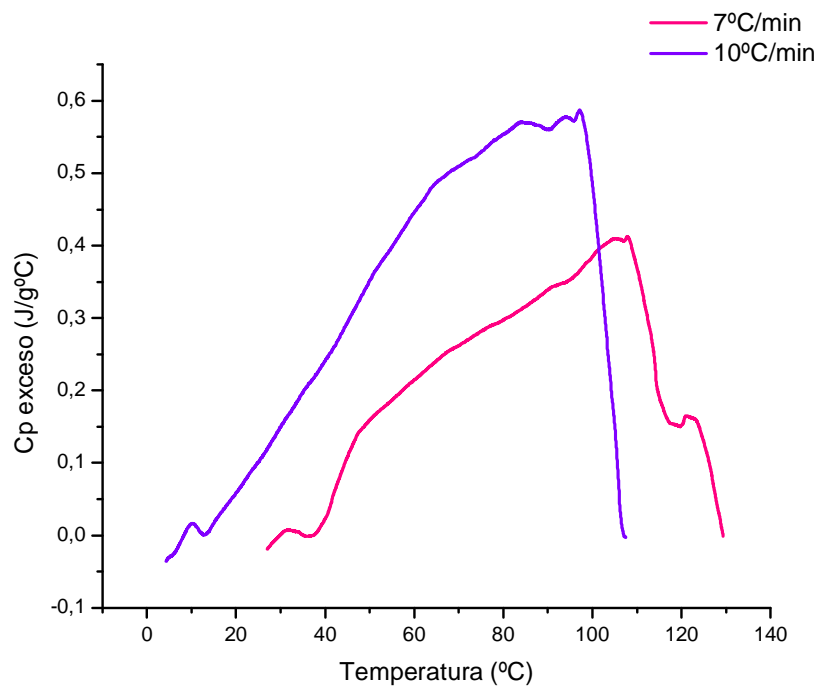


Siendo U un estado de desnaturalización reversible, K la constante de equilibrio entre el estado nativo y el estado desnaturalizado en la reacción reversible y k la constante de velocidad de primer orden para la reacción irreversible. De acuerdo con este modelo, la colágena en estado nativo ( $N_3$ ) al desnaturalizarse se disocia en tres monómeros (3U), que corresponden a cada una de las cadenas alfa que constituyen a la tropocolágena, para que finalmente se desnaturalicen por completo e irreversiblemente (3D).

Se grafican los termogramas correspondientes a Cp exceso vs T a cada una de las velocidades de calentamiento, observándose una misma tendencia para las velocidades 1, 3 y 5 °C/min (Figura 4.32) mientras que las muestras a las velocidades de calentamiento de 7 y 10°C/min (Figura 4.33) presentan una ligera desviación a las obtenidas en las tres primeras velocidades. Se presentan en la Tabla 4.8 las temperaturas de desnaturalización para cada una de las velocidades de calentamiento, así como la cantidad de muestra empleada durante cada corrida. De la tabla se observa que a la velocidad de 10°C/min no se tiene la mayor temperatura de desnaturalización como era de esperarse y es que se había llevado la tendencia de aumentar  $T_d$  al incrementarse la velocidad de calentamiento, una posible causa es la disminución en la cantidad de muestra.

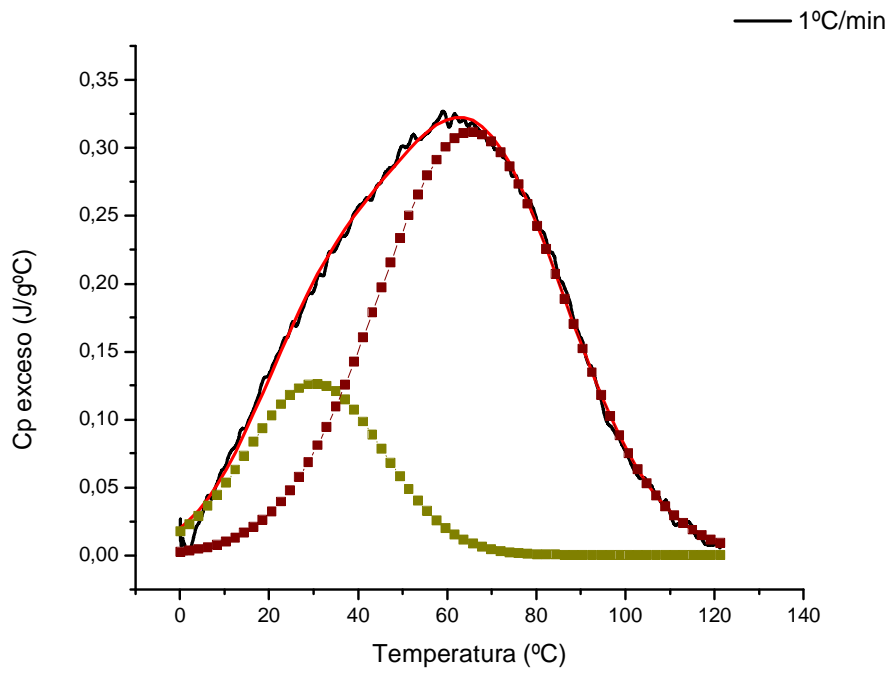


**Figura. 4.32** Cp exceso vs Temperatura a la velocidad de 1, 3 y 5°C/min.

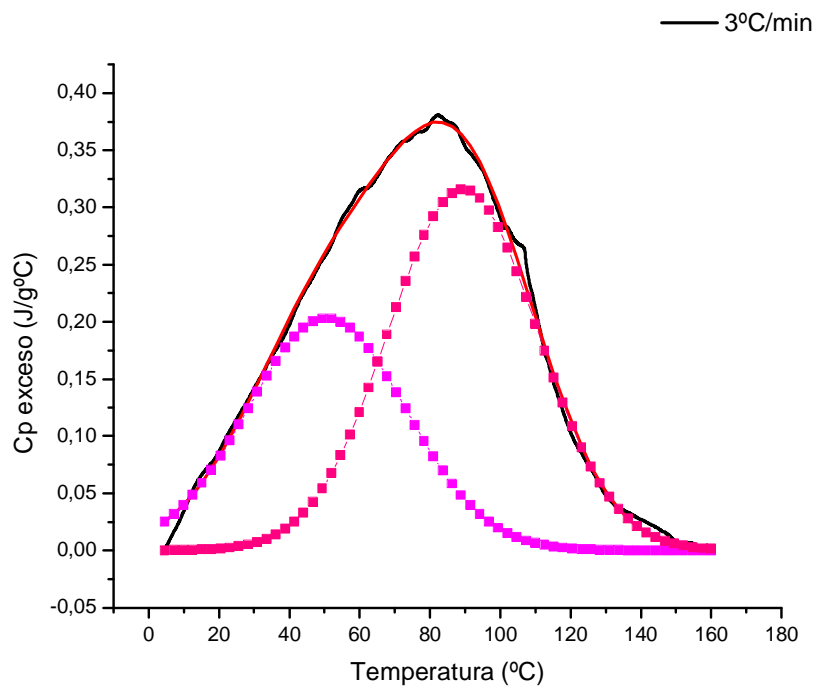


**Figura 4.33** Cp exceso vs Temperatura a la velocidad de 7 y 10°C/min.

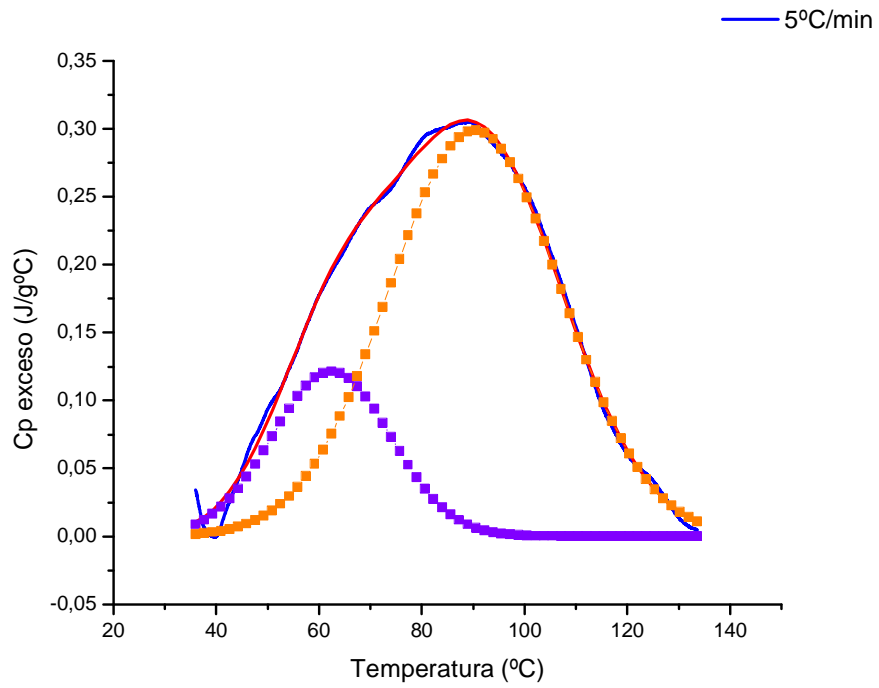




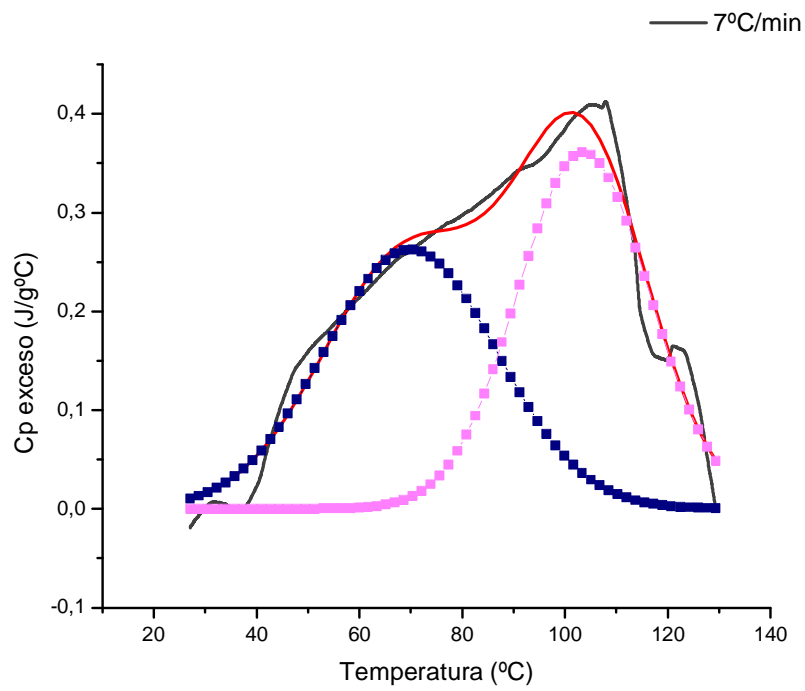
**Figura 4.34** Deconvolución de Cp exceso vs T a 1°C/min.



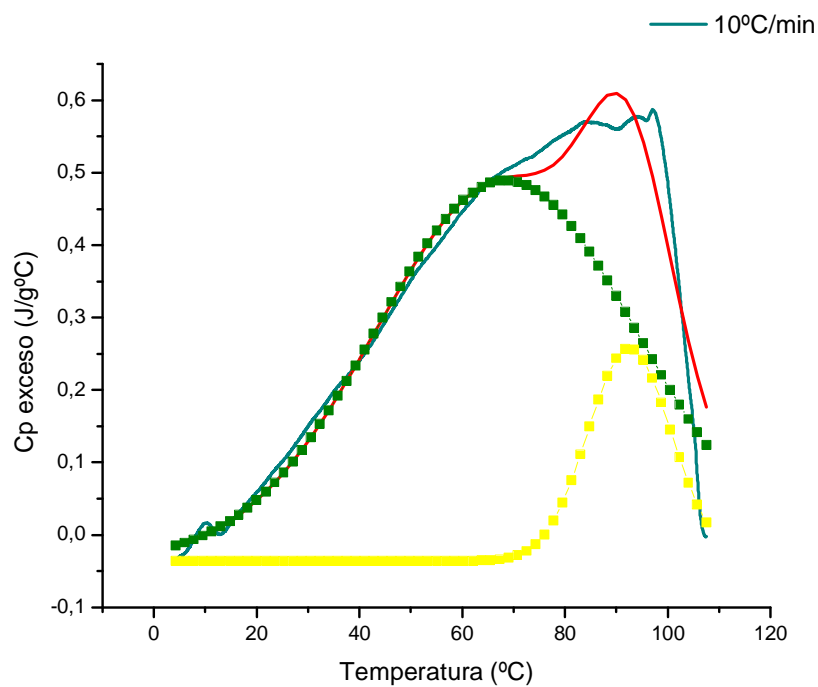
**Figura 4.35** Deconvolución de Cp exceso vs T a 3°C/min.



**Figura 4.36** Deconvolución de Cp exceso vs T a 5°C/min.



**Figura 4.37** Deconvolución de Cp exceso vs T a 7°C/min.



**Figura 4.38** Deconvolución de Cp exceso vs T a 10°C/min.

**Tabla 4.8** Temperatura de desnaturalización a cada velocidad de calentamiento.

<b>Velocidad (°C/min)</b>	<b>T<sub>d</sub> (°C)</b>	<b>Masa de muestra (mg)</b>
1	61.8	5.8
3	82.4	5.5
5	87.4	5.4
7	106.1	5.6
10	87.4	2.2

Una vez planteado esto, se procedió a realizar la deconvolución de los termogramas de las figuras (4.34 - 4.38) se observa que la proteína posee un mecanismo de tres estados en el proceso de desnaturalización térmica de la colágena. Además se pudo determinar la entalpía antes y después del punto de equilibrio, correspondiendo a la entalpía de van't Hoff, la entalpía en el proceso de equilibrio.

De acuerdo con lo anterior en la Tabla 4.9 se dan los valores de estas entalpías,  $\Delta H_1$  y  $T_{d-1}$  corresponden a la porción reversible en el proceso de desnaturalización (primera curva), mientras que  $\Delta H_2$  y  $T_{d-2}$  (segunda curva) corresponde al calor absorbido durante la etapa de desnaturalización irreversible, un mayor valor de cualquiera de las entalpías implica una mayor estabilidad. Se denota el valor del coeficiente de correlación.

**Tabla 4.9** Valores de Temperatura de desnaturalización y entalpía.

<b>Velocidad (°C/min)</b>	<b>T<sub>d-1</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>d-2</sub> (°C)</b>	<b><math>\Delta H_1</math> (J/g)</b>	<b><math>\Delta H_2</math> (J/g)</b>	<b>Coef. de correlación</b>
1	30.4	65.4	4.8	16.4	0.9976
3	50.7	89.4	11.4	16.9	0.9974
5	62.4	90.4	3.5	12.6	0.9971
7	69.9	103.6	11.1	11.7	0.965
10	69.0	92.7	33.3	5.9	0.967

Dentro de las tres primeras velocidades de calentamiento, sobresale la velocidad de 3°C/min, que posee la mayor estabilidad térmica y referente a las dos últimas velocidades, a 10°C/min se tiene gran estabilidad.

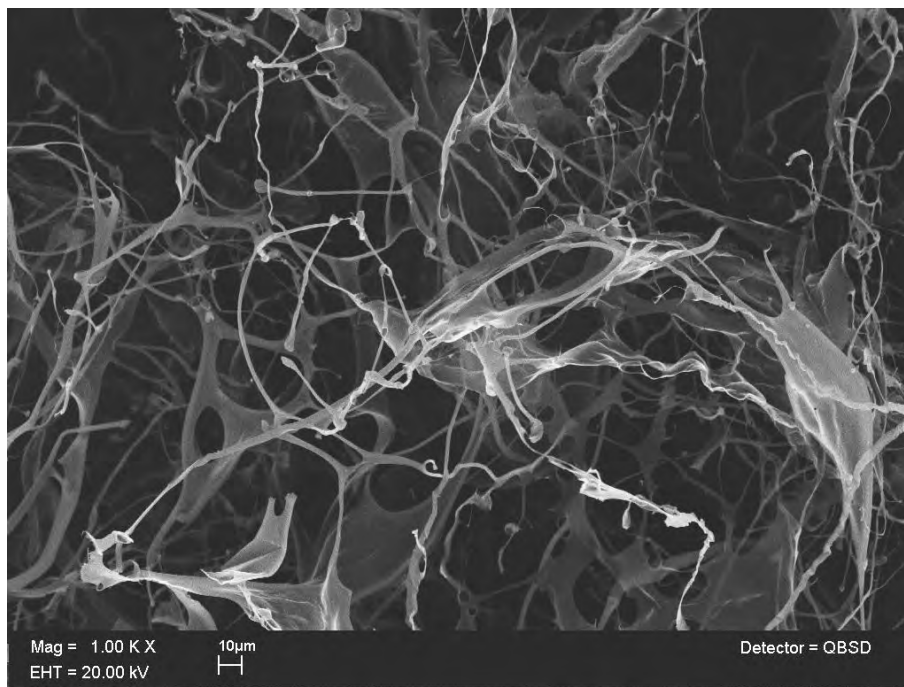
Por los resultados aportados en este estudio se revalida el uso del modelo de Lumry-Eyring para determinar el mecanismo de desnaturalización de la colágena y se concluye que las transiciones irreversibles dependen en gran medida de la velocidad de calentamiento, por lo tanto esto explicaría el corrimiento de las temperaturas de desnaturalización de las muestras a la velocidad de 10°C/min con respecto a las obtenidas a 1°C/min en las muestras G,  $\epsilon_1$  a  $\epsilon_5$  y muestra control.

## 4.5 Microscopía Electrónica de Barrido

Al igual que la técnica anterior se liofilizaron las muestras y colágena control, se recubrieron con una película de oro mediante electrodeposición para ser vistas al microscopio. El equipo empleado fue un Leica Stereoscan 440, equipado con filamento de tungsteno.

### Muestra G

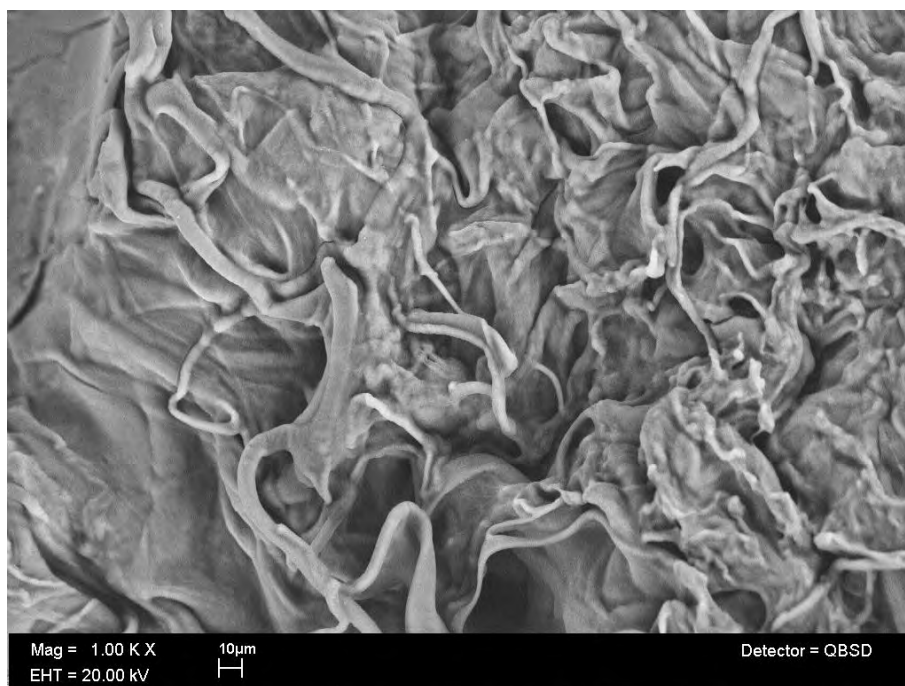
La microscopía para esta muestra se observa en la figura 4.39, la cual presenta una serie de fibras de diferentes diámetros y entrelazadas entre sí, también se logra ver una superficie lisa parecida a una membrana dispuesta al azar dentro de la matriz de la muestra, sin embargo la disposición en general, de las fibras no es homogénea, el aumento de la imagen es de 1 KX.



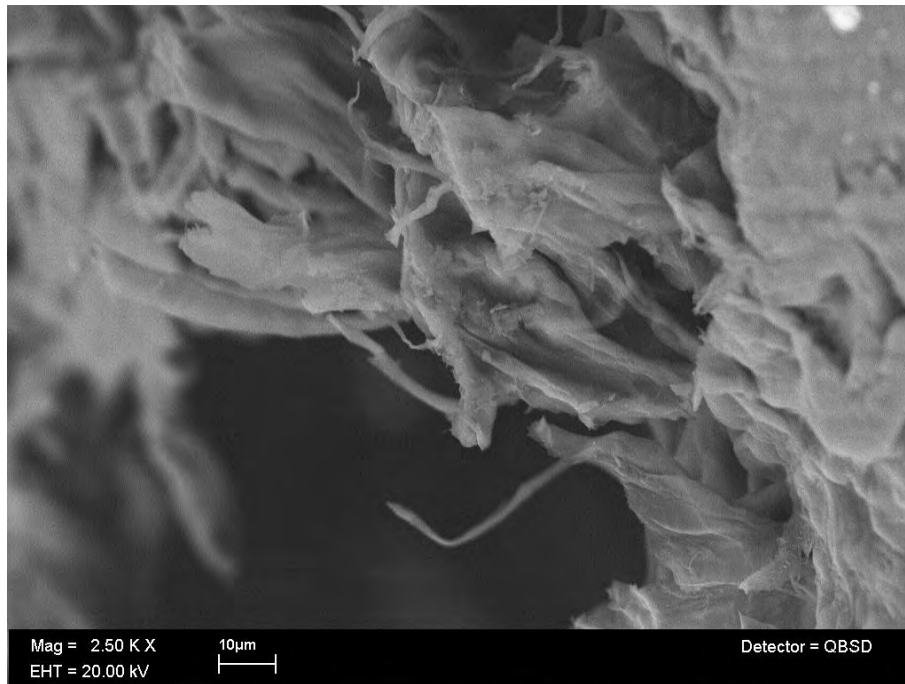
**Figura 4.39** Microscopía de la muestra G. Aumento de 1 KX.

### Muestra $\epsilon_1$

Contrario a lo que se esperaba, es decir, una estructura formada principalmente de fibras, en esta muestra se observa en la figura 4.40 una matriz de superficie compacta y rugosa lo cual sugiere una mayor cohesión de las molécula de colágena y por lo tanto un mayor entrecruzamiento y de ahí una mayor resistencia mecánica, sin embargo, a un mayor aumento de 2.5 KX en la figura 4.41, se nota la presencia de una zona de la cual surge un entramado de pequeñas fibras, con lo que se pensaría que este entrecruzamiento no sería del todo homogéneo.



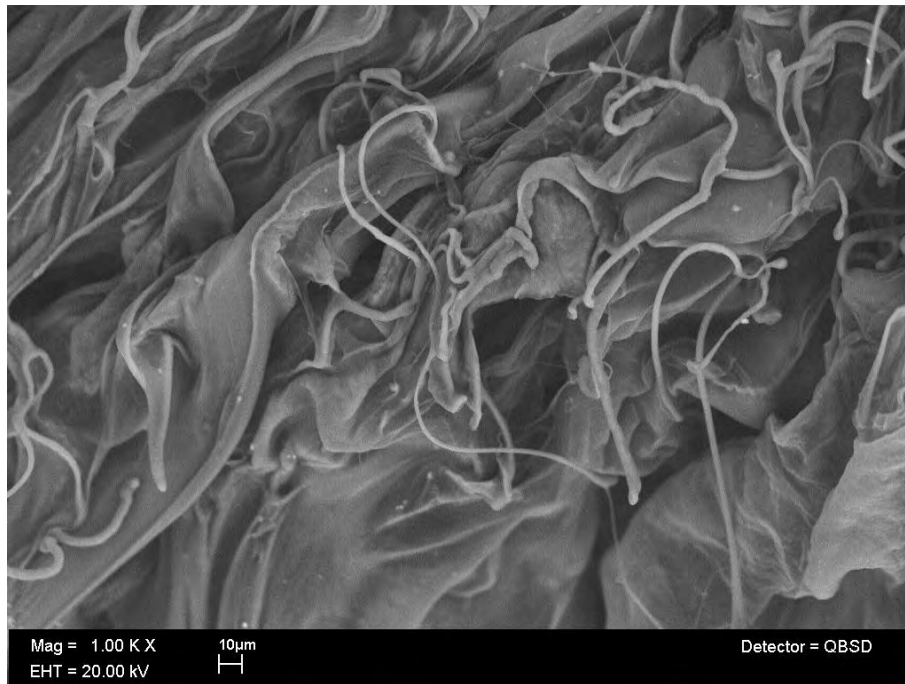
**Figura 4.40** SEM de la matriz de la muestra  $\epsilon_1$  a primera vista. Aumento 1 KX.



**Figura 4.41** Microscopía de zona aledaña a las imágenes anteriores mostrándose una gran cantidad de fibras en su interior.

### Muestra $\varepsilon_2$

En la figura 4.42 con un aumento de 1 KX se observa la estructura de la matriz  $\varepsilon_2$ , la cual está conformada por un puñado de fibras expuestas al azar sobre una superficie muy parecida a la de la muestra  $\varepsilon_1$ . Lo anterior nuevamente sugiere un alto grado de entrecruzamiento, sin embargo, si recordamos la concentración de esta muestra, está muy por debajo que  $\varepsilon_1$ , por lo tanto, no se puede decir con certeza si posee una estructura realmente entrecruzada.

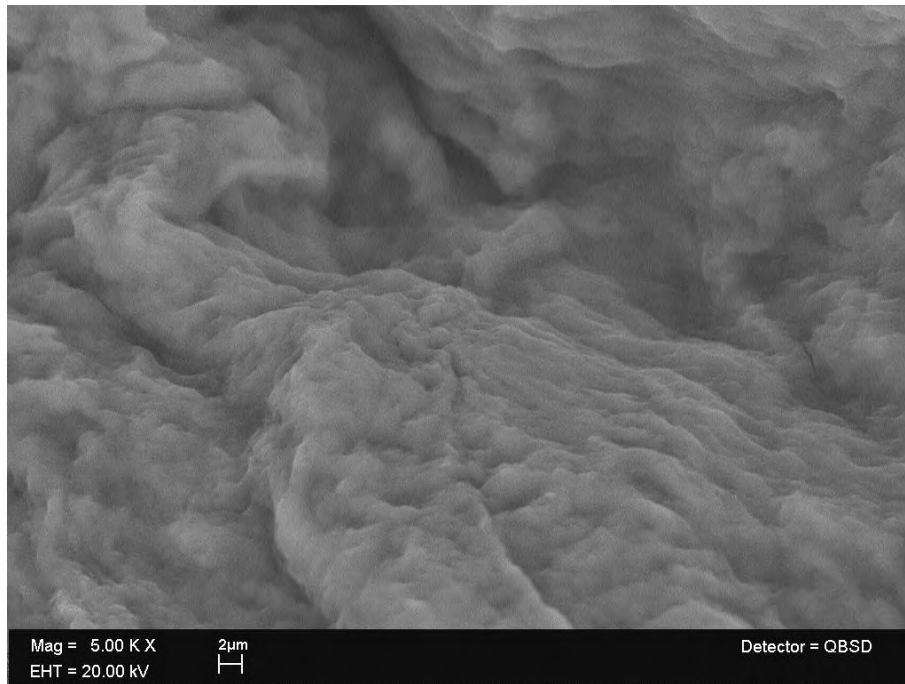


**Figura 4.42** Microscopía Electrónica de barrido de la superficie de la muestra  $\epsilon_2$ .  
Aumento 1 KX.

### Muestra $\epsilon_3$

En la figura 4.43, se observa una superficie rugosa y sin la presencia de poros, ésta topología se extiende a la largo de toda la superficie de la muestra sin cambio alguno, el estudio se realizó a diferentes aumentos 2.5 KX, 5 K, 10 KX y 20 KX, sin embargo en todas la microscopías electrónicas de barrido se aprecia la misma superficie, es por ello que sólo se muestra una imagen en este estudio, ya que las otras imágenes no brindan información extra. Esta muestra es la única que presenta este tipo de característica.

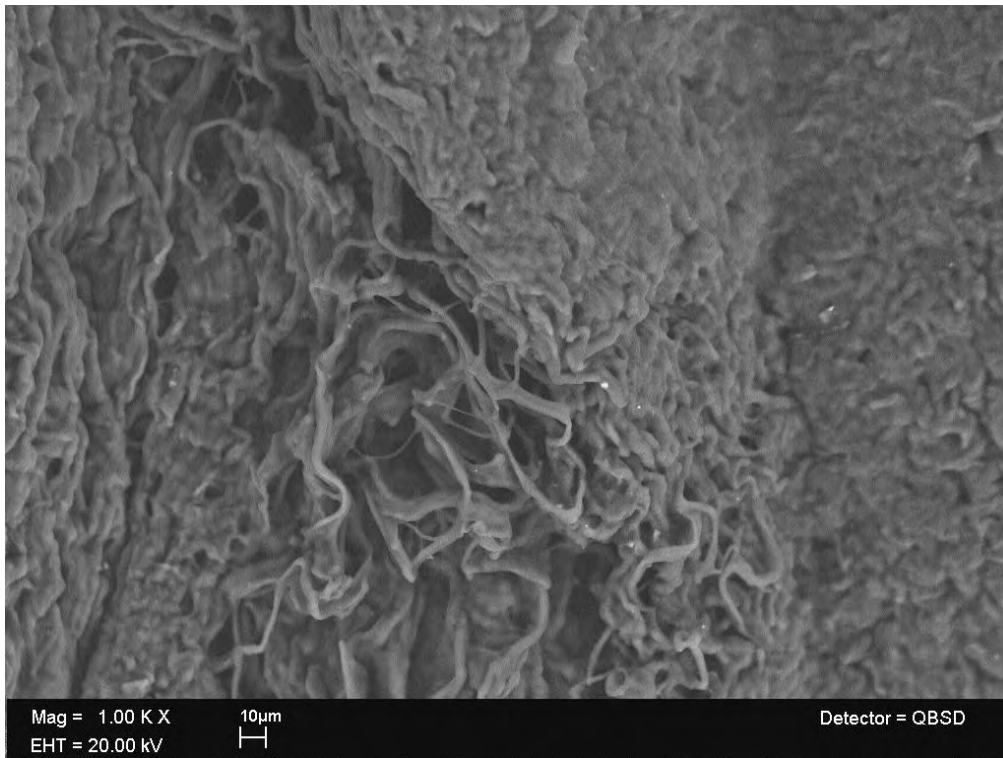




**Figura 4.43** SEM de la Superficie de la muestra  $\epsilon_3$ . Aumento de 5 KX.

#### Muestra $\epsilon_4$

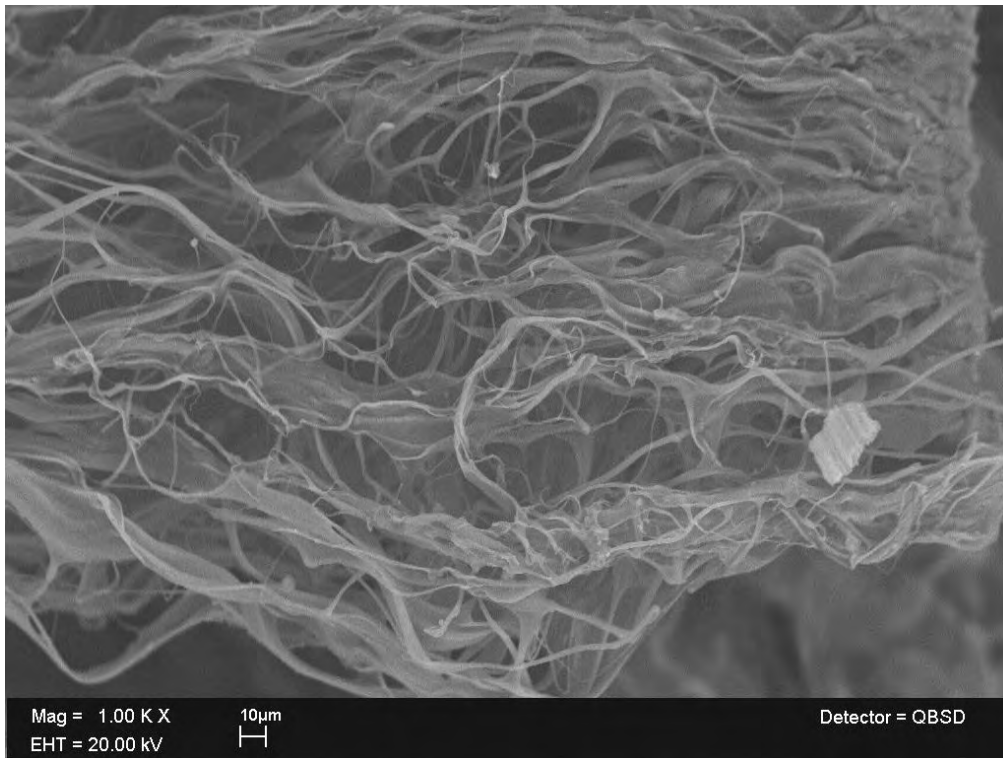
Se puede observar en la figura 4.44 con un aumento de 1KX, una superficie de textura sumamente rugosa y con cierta compactación, así como una región con poros. Por otro lado, esta muestra debería poseer la misma estructura que la muestra anterior, ya que ambas fueron obtenidas bajo las mismas condiciones de trabajo (ver tabla 3.1) y sus concentraciones en colágena fueron semejantes, por lo cual, es de gran sorpresa estas diferencias tan marcadas.



**Figura 4.44** Superficie de la muestra  $\epsilon_4$ . Aumento 1 KX.

#### Muestra $\epsilon_5$

Esta muestra presenta claramente una estructura completamente fibrilar, la cual según estudios previos, es la que debería constituir a una muestra de colágena tipo I. En la figura 4.45, se observa una malla constituida de fibras de diferentes grosores entrelazadas unas con otras. Aumento 1 KX.

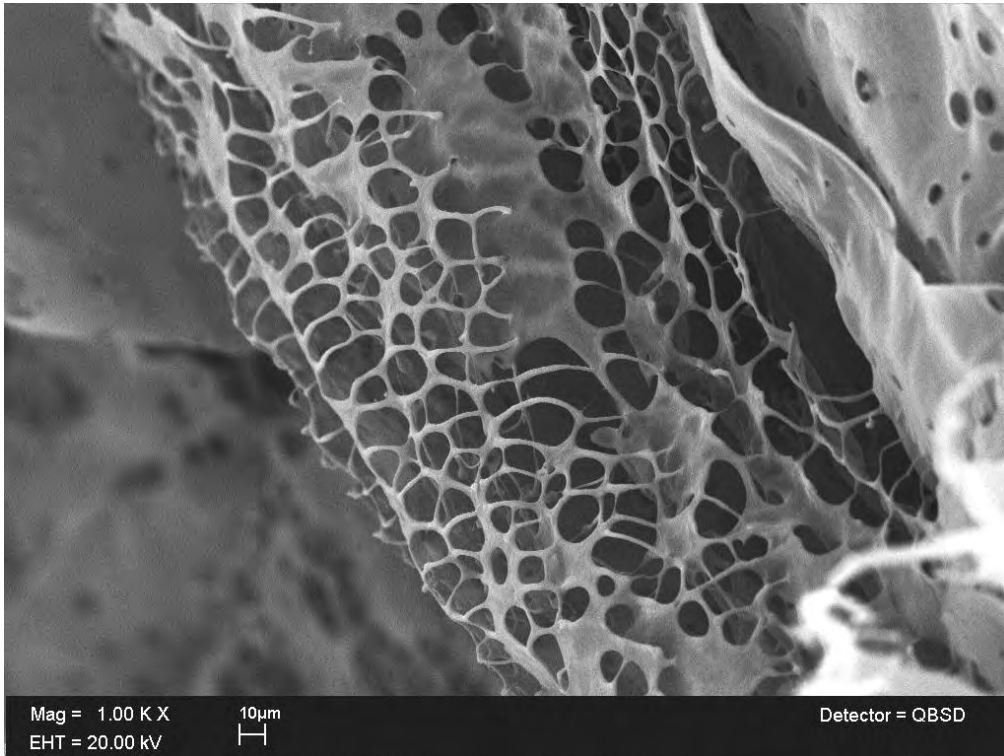


**Figura 4.45** Microscopía de la superficie de la muestra  $\epsilon_5$ . Aumento 1 KX.

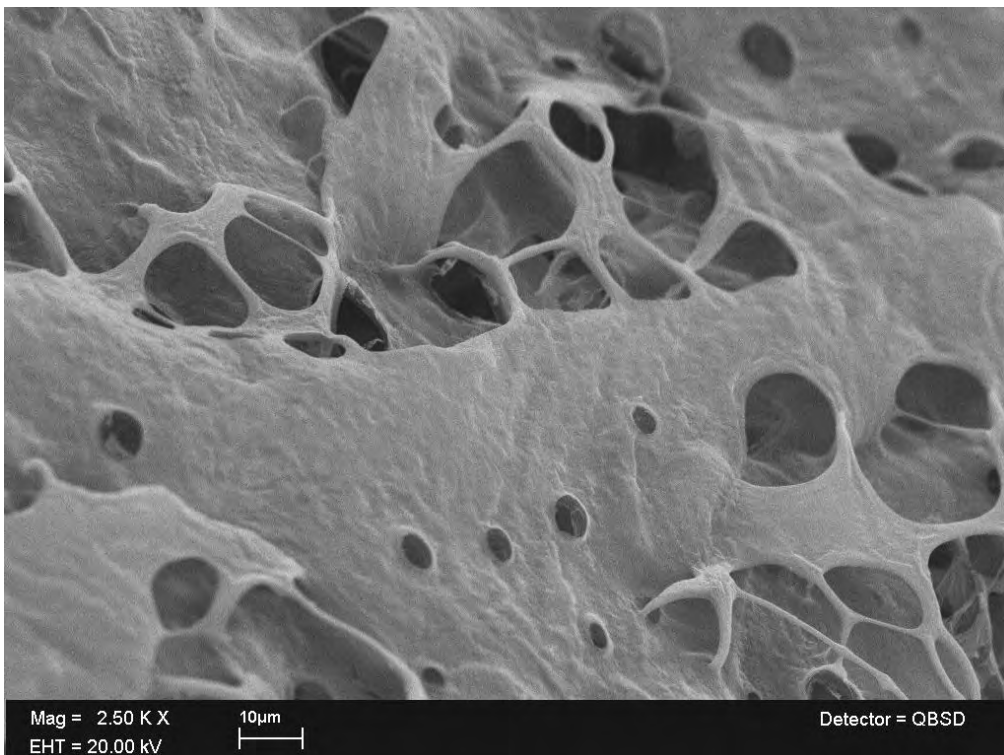
### Muestra Control

La morfología de la muestra control es de gran interés como referencia respecto a las otras muestras. Se puede observar en las figuras 4.46 y 4.47 que se tiene una matriz que consiste básicamente es una estructura con cierto arreglo repetitivo y una porosidad constante a lo largo de toda la superficie de la muestra y con un alto grado de entrecruzamiento, lo cual le brinda excelentes propiedades físicas, química y mecánicas, a pesar de no poseer una estructura fibrilar.

Los aumentos de las imágenes son de 1 KX y 2.5 KX, respectivamente.



**Figura 4.46** SEM de la colágena control. Aumento 1 KX.



**Figura 4.47** Matriz con estructura porosa. Aumento 2.5 KX.

Del estudio de microscopía electrónica de barrido se puede clasificar a las muestras en dos aspectos, morfología y densidad. Con respecto a la morfología se tienen dos tipos de superficies, la primera en donde se tienen fibras, estas son las muestra G,  $\varepsilon_2$  y  $\varepsilon_5$  independientemente en la proporción en se encuentren las fibras; y la segunda representa una estructura compacta, entre ellas están las muestras  $\varepsilon_1$ ,  $\varepsilon_3$  y  $\varepsilon_4$ . En cuanto a la densidad, la gran mayoría de las muestras presentan superficies muy densas, con excepción de la muestras G, lo cual se puede atribuir a su baja concentración en colágena. El diámetro de las fibras correspondientes a las muestras G y  $\varepsilon_2$  es de aproximadamente  $2 \mu$ , mientras que para la muestra  $\varepsilon_5$  es de aproximadamente 200 nm.

Es así que la microscopía electrónica de barrido es una gran herramienta que nos ayuda a visualizar la morfología de cada muestra y a la vez nos permite comprender otro tipo de características, especialmente de carácter químico.

## 4.6 DISCUSIÓN GENERAL

El empleo de pepsina en la etapa de extracción de colágena ayudó fuertemente a eliminar los enlaces covalentes presentes en la zona telopeptídica que ayuda a enlazar entre sí a cada una de las tropocolágenas impidiendo la solubilización de éstas. Sin embargo, algo que no se realizó en este trabajo y quizá tuvo consecuencia en las propiedades físicas, como lo es la estabilidad de la molécula, fue la desactivación de la pepsina, que al no llevarse a cabo y continuar el proceso de extracción y purificación bajo condiciones ácidas e inferior a un pH de 5, produjo una mayor fragmentación en cada una de las cadenas alfa. Otra desventaja de este proceso, es el de no haber usado inhibidores de proteasa, que permitirían proteger a las soluciones de colágena de bacterias durante su almacenamiento.

Con la técnica de electroforesis se pudo determinar rápidamente el número de proteínas que existen en la solución obtenida al final de este trabajo, constatándose como única proteína presente a la colágena de tipo I. El patrón electroforético resultante coincide perfectamente con el patrón electroforético característico de esta proteína. El uso de pepsina permitió detectar una mayor intensidad en las bandas  $\beta$ ,  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  que en las bandas  $\gamma$ , ésto debido al corte realizado en los puntos terminales de la molécula de colágena (telopéptidos) con lo cual se reduce el tamaño y por ende el peso molecular de las moléculas provocando una mayor cantidad de moléculas de bajo peso molecular. Por lo tanto se espera tener una ligera reducción en el peso molecular de las cadenas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  de las muestras obtenidas, contrario a lo que sucedería de no usar pepsina, por ello en principio se creía que la colágena control mostraría un desplazamiento ligeramente hacia arriba (es decir, mayor peso molecular) de las bandas características de la colágena tipo I, sin embargo, al observar detalladamente el patrón electroforético, no fue así, por lo que se presume quizá que la colágena control se obtuvo bajo el uso de pepsina, por lo cual no muestra diferencia alguna con respecto al bandeo obtenido en las muestras. Los pesos de las cadenas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  fueron de 141,206 Da y 128,941 Da respectivamente.

En cuanto a la determinación en la concentración de proteína en las muestras, existen varios métodos para ello, como son los métodos de Lowry, Bradford, etc. Sin embargo

todos estos métodos determinan la concentración de proteína total, lo cual para este trabajo es insuficiente, ya que se quería determinar el contenido de colágena, que posee dentro de su secuencia de aminoácidos a la prolina e hidroxiprolina. Es por lo anterior que el método de Woessner es el más preciso para cuantificar la colágena a partir de la determinación del aminoácido hidroxiprolina.

Con la ayuda de la técnica de Western Blot fue posible determinar la pureza de las muestras y verificar si existía la presencia de colágena tipo III, ya que como se había mencionado esta proteína posee tres cadenas  $\alpha_1$  idénticas que están directamente relacionadas con las cadenas  $\alpha_1$  de la colágena tipo I, después de realizar la inmunodetección se descartó esta creencia. Esta técnica es muy sensible, ya que el uso de anticuerpos específicos para cada tipo de proteína elimina falsos positivos, lo cual la hace una técnica confiable.

Las temperaturas de desnaturalización ( $T_d$ ) obtenidas mediante calorimetría diferencial de barrido arrojaron distintos valores para cada una de las muestras y a las dos velocidades de calentamiento, aunque siempre estos valores se encontraron dentro de un intervalo, siendo no mayor a los 70°C y 124°C a las velocidades de calentamiento de 1°C/min 10°C/min respectivamente.

Se observó que el fenómeno de desnaturalización de las muestras de colágena es mediado por un mecanismo cinético, ya que la temperatura de desnaturalización registrada en el máximo de la curva de transición se desplazaba a mayores valores al incrementarse la velocidad de calentamiento. La primera caracterización de la colágena en cuanto a cambios conformacionales inducidos por cambios de temperatura reportó un comportamiento irreversible, sin embargo, quizá si en lugar de haber calentado más allá de la  $T_d$  se hubiera realizado el barrido por debajo de este punto seguida por un enfriamiento y un segundo calentamiento, se podría haber observado un proceso en equilibrio, es decir, reversible.

Una vez hecho lo anterior, fue importante determinar el tipo de patrón que sigue el desplegamiento de la colágena, y siendo el modelo de los dos estados (nativo a desnaturalizado,  $N \rightarrow D$ ) el más simple, se procedió a aplicar una de las tantas ecuaciones que desarrollo Sánchez-Ruiz, ecuación (9), que vino a comprobar que

definitivamente no era el modelo al que se ajustaba la colágena, ya que no existió linealidad y por lo tanto no fue posible determinar la energía de activación que venía siendo la pendiente de la recta, de acuerdo con la ecuación de Arrhenius. Este hecho y los antecedentes en el número de picos encontrados en los termogramas de  $C_p$  vs  $T$  de todas las muestras, señalaron que el proceso de desnaturalización estaba dado por un modelo que involucraba más de dos estados y Lumry-Eyring explica el comportamiento presentado ya que incluye estados intermediarios entre los estados nativos y desnaturalizados. La determinación del número de estados que posee la colágena fue conseguida a partir de la deconvolución de las curvas de  $C_p$  en exceso, resultando en un modelo de tres estados, (1) del estado nativo al (2) estado desnaturalizado siendo un intermediario en equilibrio y de este estado al (3) estado final de desnaturalización mediado por un proceso irreversible y con una constante de velocidad de primer orden. Además con el análisis de deconvolución es posible estimar la entalpía de van't Hoff ( $\Delta H_1$ ) que corresponde al área de la curva antes de la temperatura de desnaturalización y que a su vez concierne a la etapa de equilibrio del modelo de Lumry-Eyring. Este calor absorbido indica que la velocidad de calentamiento a la cual es más estable la colágena durante la transición térmica, es  $3^\circ\text{C}/\text{min}$ , a pesar de que a la velocidad de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  aparentemente tiene mayor estabilidad, la desventaja es que a esta última velocidad se pierde detalle de todas las posibles transiciones que pueden llevarse a cabo durante la prueba de calorimetría de barrido diferencial.

Además de comparar los valores de  $T_m$  y  $\Delta H$  a cada una de las velocidades, se planteó la posibilidad de comparar estos mismos parámetros a velocidad constante de calentamiento, y en específico a la velocidad de  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  para las muestras G,  $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$ ,  $\epsilon_4$ , y  $\epsilon_5$ , sin embargo, la capacidad calorífica de éstas muestras se determinó a partir de la Norma ASTM E-1269 [43]; la muestra barrida a las velocidades de 1, 3, 5, 7 y  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  se calculó por modulación, por lo cual, no fue posible comparar los resultados.

Se puede concluir que la técnica de calorimetría diferencial de barrido nos permite elegir el procedimiento bajo el cual se obtienen moléculas estables térmicamente. En la literatura se ha reportado que  $62^\circ\text{C}$  es la temperatura de desnaturalización de la colágena tipo I a partir de tendón bovino, comparable con los resultados obtenidos a la menor temperatura de calentamiento en este trabajo.



El uso de distintos solventes y concentraciones, así como la diferencia en el pH empleado para la disolución de la colágena, se ve reflejada en las diversas morfologías de las muestras. Las muestras disueltas en ácido acético glacial con una concentración de 0.5 M (muestras  $\varepsilon_1$  a  $\varepsilon_4$ ) presentan una morfología parecida, sin embargo las muestras G y  $\varepsilon_5$  poseen fibras a lo largo de su superficie. Con una menor proporción de fibras, la muestra G fue disuelta en una solución de ácido acético glacial con una concentración de 0.5 M a un pH de 2.5, mientras que la muestra  $\varepsilon_5$  se disolvió en una solución de Tris-HCl 50 mM a un pH de 7.4, a su vez esta muestra fue precipitada a dos distintas concentraciones de NaCl, lo cual modificó completamente su estructura convirtiéndola en una matriz fibrilar.

En el caso de la colágena comercial, su morfología es totalmente diferente al resto de las muestras, se debe al proceso por el cual se extrajo la colágena, el amortiguador en el cual está suspendida la proteína (citratos con un pH de 4.2) y sobre todo a la fuente de origen, ya que se obtuvo a partir de piel porcina.

Existe una fuerte relación entre la morfología de la muestra y su respuesta al análisis térmico. Si se tiene una estructura con fibras y medianamente densa, se tiene una baja temperatura de desnaturalización, ejemplo de esto, es la muestra  $\varepsilon_5$  ( $T_d = 58.45^\circ\text{C}$ ) la cual es una matriz fibrilar y densa, aparentando de manera cualitativa una densidad inferior al resto de las muestras.

Es así que las muestras conformadas por una estructura compacta, densa, y con un alto grado de entrecruzamiento, oponen mayor resistencia a ser desplegadas y requieren de una mayor cantidad de energía para llegar a la desnaturalización.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

La metodología empleada para la extracción y purificación de colágena a partir de tendón bovino en este trabajo, es un proceso sencillo, basado en centrifugaciones y resuspensiones del precipitado para la etapa de purificación y el uso de ácido acético y pepsina para la etapa de obtención de colágena a partir del extracto inicial.

En concreto se puede decir que se planteó sólo un proceso para la obtención de colágena en solución, sin embargo, la justificación de describir la variante I, está en que una vez pasada la digestión enzimática se tuvo una disolución bastante viscosa, lo cual en primera instancia dificultaría su manejo en las siguientes etapas.

Claramente, podemos decir, que el proceso llevado a cabo para cumplir con el objetivo general de este trabajo se cumplió, y es que se tuvo un rendimiento de 74.19% en el caso de la variante II, mientras que para la variante I fue de 54.3%, lo cual indica que es preferible utilizar la ruta de la variante II para la obtención de colágena.

Las técnicas más representativas para la caracterización de las muestras, son la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, Western Blot y calorimetría diferencial de barrido. Con el uso de la primera, se pudieron visualizar las cadenas alfas que constituyen a la colágena tipo I mediante el desdoblamiento de la molécula al usar SDS y además se constató la presencia de esta proteína especialmente al final del tratamiento de purificación como se observó en los patrones electroforéticos, por otro lado la pureza de las muestras se determinó con Western Blot.

Si bien, por microscopía electrónica de barrido se observaron las superficies de las muestras, esta técnica sólo fungió como un método que permitió comparar cualitativamente el grado de entrecruzamiento de las muestras y su relación con la estabilidad de la colágena.

Esencialmente la calorimetría diferencial de barrido es la técnica que aportó más información a este estudio, en cuanto estabilidad y mecanismo por el cual se

desnaturaliza la colágena, siendo como se pudo comprobar de carácter cinético y descrito por el método de Lumry-Eyring con intermediarios hasta su desnaturalización total.

Por otro lado, los resultados finales están directamente relacionados con el proceso empleado, pero principalmente con algunas variables que se modificaron durante el tratamiento de las muestras, entre ellas están el volumen de ácido acético utilizado durante la homogenización, el tiempo y velocidad durante cada una de las centrifugaciones realizadas, concentración de NaCl manejado y finalmente y en un único caso el uso de un amortiguador diferente al ácido acético como lo fue el Tris-HCl en la muestra  $\varepsilon_5$ , todos los anteriores factores influenciaron la concentración final de la colágena, pero sobre todo sus propiedades físicas como son temperatura de desnaturalización y morfología.

## **PERSPECTIVAS**

Se obtuvieron buenos resultados en este estudio, sin embargo, para poder tener un mejor aporte, se sugiere realizar al menos tres barridos a cada una de las velocidades de calentamiento implementadas en este trabajo, y de esta forma trabajar con un promedio.

Por otro lado, sólo se evaluó el mecanismo de plegamiento-desplegamiento y estabilidad de la muestra  $\varepsilon_5$ , por lo que es indispensable realizarse el mismo estudio para el resto de las muestras (G,  $\varepsilon_1$ ,  $\varepsilon_2$ ,  $\varepsilon_3$  y  $\varepsilon_4$ ). Con podrá darse un veredicto más justo en cuanto a la elección al método de extracción, ya que se tendrá un registro sobre la estabilidad de cada una de las muestras lo que repercutirá directamente en el uso que se le quiera brindar a la colágena como biomaterial, es decir, como biomaterial con un alto tiempo de degradación o con un mínimo tiempo de degradación.

## REFERENCIAS

- [1] Torres Arreola W., Pacheco Aguilar R., Sotelo Mundo R.R, Rouzaud Sáñez O., Ezquerro Brauer J.M. Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Ciencia y Tecnología Alimentaria* **6** (2008): 101-108.
- [2] Mizuta S., Hwang J.H., Yoshinaka R. Molecular species of collagen from wing muscle of skate (*Raja kenoi*). *Food Chem.* **76** (2002): 53-58.
- [3] Kittiphattanabawon P., Benjakul S. Visessanguan W., Nagai T., Tanaka M. Characterization of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chem.* **89** (2005): 363-372.
- [4] Gross Jerome, Highberger John H., Schmitt Francis O. Extraction of collagen from connective tissue by neutral salt solutions. *Biochemistry* **41** (1955): 1-7.
- [5] Hsiu-O Ho, Lun-Huei Lin, Ming-Thau Sheu. Characterization of collagen isolation and application of collagen gel as a drug carrier. *Journal of Controlled Release* **44** (1997):103-112
- [6] Silver Frederick H. & Christiansen David L. *Biomaterials Science and Biocompatibility*. New York: Springer, 1999. pp. 1-11.
- [7] Black Jonathan. *Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility*. 3ª Edición. New York: M. Dekker, 1999. pp. 3-12.
- [8] Sastre R., De Aza S. & San Román J. *Biomateriales*. CYTED. Faenza Editrice Ibérica, 2004. pp. 27-124.
- [9] Vogel K.G. Tendon structure and response to changing mechanical load. *J. Musculoskel Neuron Interact* **3**(2003): 323-325.
- [10] Kannus P. Structure of tendon connective tissue. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **10**(2000):312-320.
- [11] Devlin Tomas M. *Bioquímica, Volumen I*. 3ª Edición. Editorial Reverté. 1999. pp-24-30.

- [12] Nelson David L., Cox Michael M. Lehninger Principios e Bioquímica. Ediciones Omega, 2002. pp. 115-128.
- [13] Brinckmann J., Notbohm H. & Müller P.K. Collagen: primer in structure, processing and assembly. Berlín: Springer, 2005. pp. 1-16.
- [14] Fratzel Peter. Collagen: Structure and mechanics. New York: Springer, 2008. pp. 15-31.
- [15] Alberts Bruce, Bray Dennis, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith & Watson James D. Biología Molecular de la Célula. 3ª Edición. Ediciones Omega, 2002. pp. 1048-1054.
- [16] Park Joon B. and Bronzino Joseph D. Biomaterials: principles and applications. Boca Raton, Florida: CRC, 2003. pp. 117-133.
- [17] Stryer Lupert. Bioquímica, Tomo I. 3ª Edición. Barcelona; México: Editorial Reverté, 1988. pp. 267-280.
- [18] Wolfgang Friess. Collagen-biomaterial for drug delivery. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. **45** (1998): 113-136.
- [19] Viidik A. and Vuust J. Biology of collagen. London: Academic, 1980. pp. 1-12.
- [20] Wheelwright Scott M. Protein purification: design and scale up of downstream processing. New York: J. Wiley, 1994. pp. 26-40.
- [21] R. González Paz, A. Orillo, J.L. Feijoo, K. Noris-Suárez, R. Perera y J. López. Estudio de Mezclas de Polietileno de Alta Densidad (PEAD) con colágeno/acetato de sodio e Hidroxiapatita (HA). IFMBE Proceedings **18**(2007): 676–680
- [22] Koob Thomas J., Hernández Daniel J. Material properties of polymerized NDGA-collagen composite fibers: development of biologically based tendon constructs. Biomaterials **23** (2002): 4833-4841.
- [23] Lie Ma, Changyou Gao, Zhengwei Mao, Jie Zhou, Jiacong Shen, Xueqing Hu, Chunmao Han. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved bioestability for skin tissue engineering. Biomaterials **24** (2003): 4833-4841.

- [24] Maldonado Alconada A. M., Jorrín Novo J.V. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de hojas de *Arabidopsis thaliana*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba
- [25] [www.biorad.com](http://www.biorad.com)
- [26] Ahmed Hafiz. Principles and reactions of protein extraction, purification and characterization. Boca Ratón: CRC, 2005. pp. 71-87.
- [27] García Pérez H.M. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstica* **1** (2000): 31-34.
- [28] Abbas Abul K. & Lichtman Andrew H. Inmunología celular y molecular. 5<sup>a</sup> Edición. Elsevier, Madrid, España, 2004. pp. 522-528.
- [29] Seymour R. Introducción a la química de los polímeros. Editorial Reverté. Barcelona, 1998. pp. 160-163.
- [30] Freire E. Differential Scanning calorimetry. *Methods Mol. Biol.* **40** (1995): 191-218.
- [31] Sánchez-Ruiz, J.M. Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophys. J.* **61** (1992): 921-35
- [32] Zworykin V.K., Hillier J., Snyder R.L. A scanning electron microscope. *ASTM Bull* **117** (1942): 15-23.
- [33] Pease R.F.W. and Nixon W.C., High resolution scanning electron microscopy. *Journal of Scientific Instruments* **42** (1965): 81-85
- [34] *Characterization and Analysis of Polymers*. Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience. 2008. pp. 333-335, 627-632
- [35] Harris Daniel C. Análisis Químico Cuantitativo. 2<sup>a</sup> Edición. Editorial Reverté. 2001. pp. 499-509.
- [36] Miller E. J. and Rhodes R.K. Preparation and characterization of the different types of collagen. *Methods in Enzymology* **82** (1982): 33-64.

- [37] Nalinanon S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chem* **104** (2007): 593–601.
- [38] Woessner J.F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. of Biochem. and Biophys.* **93** (1961): 440-447.
- [39] Krötzsch F.E. Método modificado para extracción de colágena nativa a partir de piel de ovino no-nato. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. (México, D.F. 1992).
- [40] Creighton T.E. *Protein Structure: A practical approach*. Oxford, 1989. pp. 1-19.
- [41] Beldarraín Alejandro. Aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido al estudio de la estabilidad de las proteínas. *Biotecnología Aplicada* **18** (2001): 10-16.
- [42] Tello-Solís, S.R., García-Sánchez M.A. Irreversible Thermal denaturation of bovine hemoglobin. *Chem. Educator* **15** (2010): 270-274.
- [43] ASTM E1269-01 “Standard Test Method for Determining Specific Heat Capacity by Differential Scanning Calorimetry”, pp. 1-6