



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**“EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COLÁGENA TIPO
I A PARTIR DE DIFERENTES TEJIDOS BIOLÓGICOS”**

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. MARÍA LUISA DEL PRADO AUDELO
TUTOR: DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA

MÉXICO. D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México y a el Instituto de Investigaciones en Materiales por hacer posible el desarrollo de este proyecto profesional.
- A la Dra. María Cristina Piña Barba por su gran interés y asesoría en la realización de este trabajo.
- A la Dra. María del Carmen García de León Méndez y a todo el personal del Laboratorio de Patología, Unidad de Medicina Experimental, de la Facultad de Medicina UNAM, Campus Hospital General de México, por su apoyo incondicional para el proceso de extracción, purificación y caracterización por medio de electroforesis de colágena.
- Al Q. Miguel Canseco Martínez por su cordial apoyo para los espectros de FT-IR, TGA y DSC.
- Al Dr. Omar Novelo Peralta por su disposición con los análisis de microscopia electrónica de barrido.
- Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para poder llevar a cabo mis estudios de maestría en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE GENERAL.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
INTRODUCCIÓN	vii
OBJETIVOS	ix
Objetivo General	ix
Objetivos Específicos.....	ix
CAPÍTULO 1 Marco Teórico	1
1.1 Biomateriales.....	1
1.1.1 Materiales implantables.....	2
1.2 Proteínas.....	5
1.2.1 Estructura de las proteínas.....	5
1.2.2 Algunas propiedades de las proteínas	7
1.2.3 Niveles estructurales de las proteínas.....	9
1.2.4 Clasificación de las proteínas según su conformación	10
1.3 Colágena.....	11
1.3.1 Síntesis de la colágena.....	13
1.3.2 Estructura de la colágena.....	16
1.3.3 Niveles estructurales de la colágena.....	18
1.3.4 Estabilidad de la molécula de colágena.....	20
1.3.5 Colágena como biomaterial.....	20
CAPÍTULO 2 Técnicas de Caracterización	22
2.1 Electroforesis.....	22
2.1.1 Equipo y mecanismo de formación del gel	23
2.1.2 Tamaño de poro del gel de poliacrilamida	25
2.1.3 Condiciones de electroforesis.....	25
2.1.4 Sistemas de electroforesis	26

2.2	Análisis térmico	28
2.2.1	Análisis Termogravimétrico.....	28
2.2.1.1	Instrumentación.....	28
2.2.1.2	Generalidades	28
2.2.1.3	Aplicaciones.....	29
2.2.2	Calorimetría Diferencial de Barrido.....	30
2.3	Microscopia Electrónica de Barrido.....	31
2.4	Espectroscopía infrarroja.....	33
2.4.1	Espectrómetros infrarrojos	35
CAPÍTULO 3 Método Experimental		37
3.1	Metodología	37
3.1.1	Materia prima	37
3.1.2	Procesamiento preliminar de los tejidos.....	37
3.1.3	Extracción de colágena.....	38
3.1.4	Purificación de colágena	38
3.2	Cuantificación de colágena	42
3.3	Caracterización.....	44
3.3.1	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	44
3.3.2	Análisis Térmico	47
3.3.3	Microscopía Electrónica de Barrido.....	48
3.3.4	Espectroscopía Infrarroja	49
CAPÍTULO 4 Resultados y Discusión.....		50
4.1	Determinación del contenido de colágena.....	50
4.2	Caracterización de las muestras por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS).....	52
4.2.1	Descripción del patrón electroforético	53
4.3	Análisis térmico	54
4.3.1	Análisis Termogravimétrico.....	55
4.3.2	Calorimetría Diferencial de Barrido.....	58
4.4	Microscopía Electrónica de Barrido.....	63
4.5	Espectroscopia Infrarroja	71
CAPÍTULO 5 Conclusiones.....		75
Referencias.....		77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1 Fórmula general de un α -aminoácido	6
Figura 1. 2 Reacción de polimerización de aminoácidos para formar proteínas [29]	6
Figura 1. 3 Niveles Estructurales de las proteínas.....	9
Figura 1. 4 Síntesis de la colágena	13
Figura 1. 5 Hidroxilación de los residuos de prolina y lisina, así como la glucosilación.....	14
Figura 1. 6 Estructura de la colágena	16
Figura 1. 7 Tropocolágena	17
Figura 1. 8 Niveles de organización de la colágena tipo I. (a) estructura primaria, (b) estructura secundaria y estructura terciaria, (c) estructura cuaternaria.	19
Figura 2. 1 Equipo de electroforesis	23
Figura 2. 2 Reacción de polimerización de la poliacrilamida	24
Figura 2. 3 Proteína desnaturizada por SDS	26
Figura 2. 4 Sistema discontinuo en SDS-PAGE	27
Figura 2. 5 Esquema de una termobalanza	29
Figura 2. 6 Esquema de los componentes de un SEM	32
Figura 2. 7 Señales emitidas durante el escaneo de la muestra por SEM.....	33
Figura 2. 8 Diagrama simplificado de un espectrómetro por transformada de Fourier.....	36
Figura 3. 1 Extracción de colágena	39
Figura 3. 2 Purificación de colágena	41
Figura 3. 3 Preparación de muestra	44
Figura 3. 4 Carga y corrida de muestras	45
Figura 3. 5 Proceso para el análisis térmico de las muestras.....	47
Figura 3. 6 Proceso para la microscopía electrónica de barrido de las muestras	48
Figura 3. 7 Proceso para la espectroscopía infrarroja de las muestras	49

Figura 4. 1 Curva estándar de concentración de hidroxiprolina.....	50
Figura 4. 2 Patrón electroforético correspondiente a la colágena. I _U colágena tipo I sin reducir; II _U colágena tipo II sin reducir; III _U colágena tipo III sin reducir-, III _R colágena tipo III reducida [11].	52
Figura 4. 3 Patrón electroforético de colágena tipo I obtenida a partir de diferentes tejidos biológicos.	53
Figura 4. 4 Perfil de análisis termogravimétrico de la colágena extraída de tendón de cola de rata (muestra RT) a una velocidad de 5 °C/min.	55
Figura 4. 5 Perfil de análisis termogravimétrico de la colágena extraída de tendón bovino (muestra BT) a una velocidad de 5 °C/min.	56
Figura 4. 6 Perfil de análisis termogravimétrico de la colágena extraída de piel de bovino (muestra BS) a una velocidad de 5 °C/min.	57
Figura 4. 7 Comparación de los termogramas de muestras RT, BT y BS a una velocidad de 5 °C/min.	58
Figura 4. 8 Perfil de calorimetría diferencial de barrido de la muestra RT a una velocidad de 5 °C/min.	59
Figura 4. 9 Perfil de calorimetría diferencial de barrido de la muestra BT a una velocidad de 5 °C/min.	60
Figura 4. 10 Perfil de calorimetría diferencial de barrido de la muestra BS a una velocidad de 5 °C/min.	60
Figura 4. 11 Perfil de calorimetría diferencial de barrido para las muestras RT, BT y BS a una velocidad de 5 °C/min.	61
Figura 4. 12 Micrografía SEM de la muestra RT. Aumento X 10,000	63
Figura 4. 13 Micrografía SEM de la muestra RT. Aumento X 5,000	64
Figura 4. 14 Micrografía SEM de la muestra BT. Aumento X 10,000	65
Figura 4. 15 Micrografía SEM de la muestra BT. Aumento X 5,000	65
Figura 4. 16 Micrografía SEM de la muestra BS. Aumento X 10,000	66
Figura 4. 17 Micrografía SEM de la muestra BS. Aumento X 5,000	67
Figura 4. 18 Micrografía SEM de la muestra RT recubierta con Au. Aumento X 10,000.....	68
Figura 4. 19 Micrografía SEM de la muestra BT recubierta con Au. Aumento X 10,000.....	68
Figura 4. 20 Micrografía SEM de la muestra BS recubierta con Au. Aumento X 10,000.....	69
Figura 4. 21 Espectro infrarrojo de la muestra RT	71
Figura 4. 22 Espectro infrarrojo de la muestra BT	72
Figura 4. 23 Espectro infrarrojo de la muestra BS	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. 1 Materiales Implantables.....	4
Tabla 1. 2 Distribución de colágena en el organismo	12
Tabla 3. 1 Disoluciones para electroforesis.....	46
Tabla 4. 1 Concentración de colágena.....	51
Tabla 4. 2 Diámetros de fibra y de poro de las muestras RT, BT y BS	70

INTRODUCCIÓN

El uso de materiales en el cuerpo humano se inició hace siglos ya que es posible encontrar prótesis implantadas en momias egipcias. Sin embargo, es a partir de la segunda guerra mundial, cuando el desarrollo de estos materiales se expande y surge como ciencia. Dicha ciencia es interdisciplinaria y su objetivo principal es la investigación, desarrollo y caracterización de materiales que ayuden en la regeneración, completando o aumentando los tejidos biológicos y/o sus funciones. Estos materiales se conocen como biomateriales [1]. Los biomateriales, en función de su origen, se pueden clasificar como naturales, por ejemplo las gomas, las fibras proteicas y los metales y como sintéticos, por ejemplo los polímeros y los plásticos.

Entre los años 1970 y 1980 la expansión de las aplicaciones médicas de los biomateriales y la investigación del tejido conectivo obligaron a los científicos de orientación académica y a los laboratorios de investigación a enfocar sus estudios en la colágena. La familia de la colágena está integrada por un grupo de proteínas con una estructura molecular característica, necesaria para conferir distintas propiedades a diversos tipos de tejidos conectivos. La colágena es la proteína humana más abundante en la matriz extracelular (MEC) y es el elemento estructural de todos los tejidos conectivos. Todos los miembros de esta familia se caracterizan por una triple hélice de cadenas polipeptídicas que forman estructuras supramoleculares que presentan diferentes tamaños y funciones, para diferenciarlos, cada tipo se le asigna un número romano. La colágena tipo I es el miembro más abundante en el tejido conectivo en mamíferos y es el que define la mayoría de las propiedades biomecánicas y de resistencia a la tracción en los huesos, los tendones, ligamentos, piel y córnea. Esta proteína exhibe un excelente perfil de biocompatibilidad y una biodegradabilidad controlada, eliminando la necesidad de extracción [2].

En los últimos años, el auge de la tecnología en ingeniería de tejidos ha dado a la investigación de la colágena tipo I un nuevo impulso [3].

Además de su aplicación como biomaterial, la colágena tipo I, se utiliza ampliamente en la industria alimenticia, en la industria cosmética y en la farmacéutica [4].

Debido a esto es importante conocer a fondo su estructura y sus propiedades físicas, químicas, biológicas y mecánicas.

La colágena tipo I puede extraerse de varios tejidos, industrialmente se hace de piel y de hueso bovino, porcino o de otros mamíferos [5]. En los últimos años se han presentado estudios acerca de la obtención de la proteína a partir de animales marinos, como lo reportan Jin-Wook Woo, Sung-Jae Yu, Seung-Mock Cho, Yang-Bong Lee, Seon-Bong Kim en el 2001 [6], obteniendo colágena de la aleta dorsal del atún aleta amarilla.

En este trabajo se extrae colágena tipo I a partir de tendón y piel de bovino así como de tendón de rata, en un medio ácido. Las muestras obtenidas se caracterizan y se destacan sus similitudes y sus diferencias.

OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo fundamental de este trabajo es obtener colágena tipo I extrayéndola, en un medio ácido, de diferentes tejidos biológicos, tendón de rata, tendón y piel de bovino.

Objetivos Específicos

- Caracterizar las muestras de colágena obtenidas, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, calorimetría diferencial de barrido, análisis termogravimétrico, microscopía electrónica de barrido y espectroscopia infrarroja.
- Hacer un estudio comparativo de los resultados obtenidos para cada muestra.

CAPÍTULO 1

Marco teórico

1.1 Biomateriales

A partir de la segunda guerra mundial, aparece un vasto campo asociado a la tecnología médica y que va tomando cuerpo en una ciencia, la de los biomateriales [7].

La disciplina de los biomateriales se basa en el conocimiento de la ciencia de materiales y la ciencia de la medicina clínica, con el objetivo de conseguir una correcta interacción entre el material y el huésped. En este sentido, los biomateriales son un excelente ejemplo de un campo interdisciplinario donde el material, que desarrollan por científicos e ingenieros de materiales, tiene que ser validado y llevar a cabo su función dentro del cuerpo humano, bajo la supervisión y la experiencia de los médicos y biólogos [7].

Definir la palabra biomaterial ha sido un trabajo difícil. En 1984 Boretos [8] lo enunció como cualquier sustancia (que no sea un medicamento) o combinación de sustancias, de origen natural o sintético, que pueda utilizarse durante cierto periodo de tiempo, como un todo o como parte de un sistema, que trata, aumenta o reemplaza cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. Un biomaterial es un material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo, esta definición fue consensada por diferentes sociedades de biomateriales en Chester, Reino Unido en 1991.

Las funciones que debe cumplir un biomaterial pueden ser muy variadas: desde una mecánica, como en el caso de las prótesis ortopédicas, hasta una eléctrica como en los marcapasos o quimicobiológica como en el caso de membranas para diálisis. Por otra parte,

para ciertas aplicaciones es necesario que los biomateriales sean biodegradables, en cambio para otras se requiere que sólo sean biocompatibles. Los biomateriales inertes son los que a la larga no encuentran ningún tipo de rechazo por parte del organismo.

Un biomaterial debe ser biocompatible. La biocompatibilidad de acuerdo con el consenso realizado por la Sociedad Europea de Biomateriales llevado a cabo en 1986, es la capacidad de un determinado material para dar una respuesta apropiada a una situación específica.

La biocompatibilidad se define según ciertos autores, como la aceptabilidad biológica, se determina mediante el estudio de la interacción de los biomateriales con los tejidos susceptibles de estar en contacto con ellos [9].

1.1.1 Materiales implantables

Metales

Los metales y aleaciones utilizados como biomateriales tienen como característica común una buena resistencia a la corrosión. Se emplean aceros inoxidable, aleaciones base cobalto-cromo, así como, titanio y sus aleaciones.

En la actualidad se utilizan aceros inoxidable austeníticos del tipo AISI 316 y 316L, con contenidos de carbono inferiores al 0.08 y 0.03%, respectivamente. Los aceros inoxidable martensíticos se usan en la fabricación de material quirúrgico.

Las aleaciones base cobalto-cromo se utilizaron en primer lugar en odontología. Existen cuatro tipos: la aleación colable CoCrMo y las forjadas CoCrW_{Ni}, CoNiCrMo y CoNiCrMoW_{Fe}, aunque en la actualidad sólo la aleación colable y la forjada CoNiCrMo se utilizan de forma habitual.

La baja densidad del titanio comparada con la de los otros metales empleados como biomateriales, así como sus buenas propiedades mecánicas y su excelente resistencia a la corrosión, proporcionan a este metal un excelente potencial como material implantable.

Biocerámicas

Los materiales que se emplean en la reparación y en la reconstrucción de tejidos, se dividen en tres clases:

- a) Bioinertes: no reaccionan con el medio fisiológico, por ejemplo la alúmina, que es un material idóneo para prótesis articulares debido a su elevada dureza combinada con sus propiedades de baja fricción y de bajo desgaste.
- b) Bioactivas: las cuales forman una unión química con el tejido que las rodea, un ejemplo de éstas es la hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ que es el componente principal de la fase mineral del tejido óseo.
- c) Reabsorbibles: éstas, después de ser implantadas, son reabsorbidas. El objetivo es que vayan siendo reemplazadas por el tejido vivo. En este grupo se encuentran el sulfato de cálcico y ciertos fosfatos de calcio.

Polímeros

Las posibilidades que ofrecen los polímeros para ser implantados en el cuerpo humano son muy numerosas debido a que pueden fabricarse con facilidad en geometrías muy distintas como fibras, tejidos, películas y bloques de diferentes tamaños y formas. Como ejemplos de materiales poliméricos sintéticos utilizados como biomateriales tenemos el PET, PP, PVC, entre otros, y los de origen natural, como la colágena, el quitosán y la celulosa, que tienen la ventaja de ser reconocidos más fácilmente que los sintéticos por el organismo y por consecuencia se metabolizan más fácilmente.

Compuestos

Los biomateriales compuestos, constituidos por una cerámica y un polímero, una cerámica y un metal, entre otros; pueden ser capaces de combinar las propiedades de cada uno de los componentes, dando lugar a un *composite* que presenta una doble función.

La siguiente tabla muestra de manera condensada las ventajas y desventajas de los diferentes tipos de materiales implantables.

Tabla 1. 1 Materiales Implantables

Materiales	Ventajas	Desventajas	Ejemplos
Metales: 316, 316LSS, aleaciones de titanio, aceros de bajo contenido de carbono.	Resistencia a esfuerzos de alto impacto, alta resistencia al desgaste	Baja biocompatibilidad, corrosión en medio fisiológicos, alta densidad, pérdida de propiedades mecánicas con tejidos conectivos suaves	Fijación ortopédica: tornillos, clavos, alambres, placas, barras intermedulares, implantes dentales
Biocerámicas: óxidos de aluminio, aluminatos de calcio, óxidos de titanio.	Buena biocompatibilidad, resistencia a la corrosión, inertes	Fractura ante esfuerzos de alto impacto, difícil fabricación, baja resistencia mecánica, inelásticos, alta densidad	Prótesis de cadera, dientes, dispositivos transcutáneos
Polímeros: Silicón Teflón Nylon Dacrón	Elásticos, fáciles de fabricar, baja densidad	Baja resistencia mecánica, degradación con el tiempo	Suturas, arterias, venas, nariz, orejas, mandíbulas, dientes, tendones
Compuestos: Cerámica-metal carbón-otro material	Buena compatibilidad, inerte, resistencia a la corrosión, alta resistencia a los esfuerzos	Carecen de consistencia en la fabricación del material	Válvulas cardiacas, uniones óseas, marcapasos

1.2 Proteínas

La unión de dos o más aminoácidos por uniones tipo amida genera macromoléculas que a partir de una longitud de cadena de aproximadamente 100 residuos de aminoácidos se denominan proteínas (polipéptidos). El nombre proteína viene de la palabra griega *proteios*, que significa “primario”, por la cantidad de formas que pueden tomar.

Las funciones de las proteínas pueden clasificarse de la siguiente manera:

Formación y conservación de la estructura. Las proteínas estructurales son responsables de la forma y la estabilidad de las células y los tejidos. Como ejemplo de una proteína estructural tenemos a la colágena.

Transporte. Una proteína de transporte conocida es la hemoglobina, contenida en los eritrocitos, que tiene a su cargo el transporte del oxígeno y el bióxido de carbono y su intercambio en los pulmones y los tejidos.

Protección y defensa. El sistema inmune protege al organismo de los agentes que causan enfermedades. Como compuesto importante puede mencionarse la inmunoglobulina G.

Control y regulación. En las cadenas de señales bioquímicas las proteínas funcionan como compuestos de señalamiento (hormonas) y como receptores hormonales.

Catálisis. Las enzimas constituyen el grupo más grande de proteínas. La catálisis enzimática determina las características de las transformaciones bioquímicas en los sistemas biológicos [10].

1.2.1 Estructura de las proteínas

Los aminoácidos que constituyen a las proteínas, son sustancias que tienen como característica general el hecho de poseer un carboxilo libre y un grupo amino, situado en el carbón alfa con respecto al carboxilo. En todos los aminoácidos alfa que forman proteínas, el grupo amino alfa es un grupo primario, es decir que no tiene sustituyentes. Los

aminoácidos difieren entre sí únicamente por las características del resto de su molécula o cadena lateral (R), de manera que su fórmula general es:

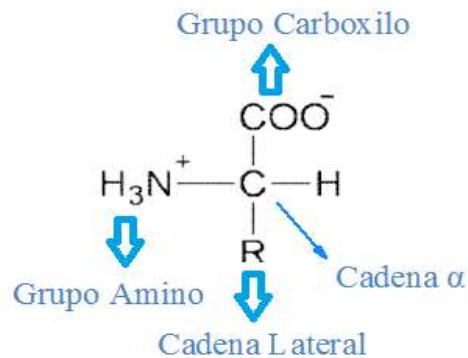


Figura 1. 1 Fórmula general de un α -aminoácido

Las propiedades de cada aminoácido libre dependen tanto de su grupo carboxilo como de su grupo alfa amino, y de su cadena lateral (R). La polimerización de los aminoácidos para formar proteínas se lleva a cabo por la reacción del grupo alfa carboxilo de un aminoácido, con el grupo alfa amino del otro.

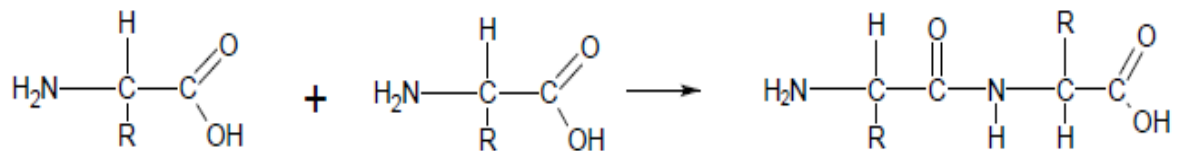


Figura 1. 2 Reacción de polimerización de aminoácidos para formar proteínas [29]

Las proteínas están constituidas por un polímero lineal de aminoácidos o polipéptido, resultante de la reacción de los grupos alfa carboxilo y alfa amino de los aminoácidos que intervienen, sólo quedan libres en los extremos un grupo alfa, el grupo amino terminal y un grupo alfa carboxilo, el grupo carboxilo terminal. Así pues, en una proteína las cadenas laterales de los aminoácidos que la constituyen, son las que fluyen de manera directa en las propiedades de cada zona a lo largo de la cadena polipeptídica y, en consecuencia,

determinan también en gran medida su comportamiento. Una de las propiedades más importantes de las cadenas laterales de los aminoácidos, es su capacidad de interacción con los disolventes acuosos, es decir, su grado de polaridad o no polaridad [9].

En su estado natural o estado nativo, cada tipo de molécula proteica tiene una forma o estructura tridimensional característica. Se llama conformación de la proteína, a la distribución espacial de él o los polipéptidos en la proteína, es decir, la forma en que los polipéptidos se pliegan en el espacio para dar lugar a un arreglo característico tridimensional en cada tipo de molécula proteica.

1.2.2 Algunas propiedades de las proteínas

Punto isoeléctrico

Aunque la mayoría de los grupos carboxilo y grupos amido de los aminoácidos se bloquean cuando éstos se unen químicamente para formar las uniones peptídicas, siempre quedan algunos de estos grupos libres, ya sea en los extremos de las cadenas polipeptídicas, o en las cadenas laterales de los aminoácidos ácidos y básicos. La disociación de los grupos ionizables que están presentes en las proteínas, ocurre como en el caso de los grupos ionizables de los aminoácidos individuales, y es gobernada por el pH del medio en el que se encuentra la proteína. A pH 7.0 o en valores cercanos, que son los habituales en la mayoría de las células, los grupos carboxilo de los ácidos aspártico y glutámico se encuentran en sus formas básicas cargadas negativamente, mientras que en los aminoácidos lisina y arginina están presentes en sus formas ácidas, cargadas positivamente. El aminoácido histidina aparece en su mayor parte sin carga y sólo cerca de un 10 por ciento del total de este aminoácido se encuentra protonado con carga positiva. La contribución de los grupos sulfhidrilo de la cisteínas, y fenólico de la tirosina, es mínima; por ejemplo, el grupo fenólico de la tirosina se encuentra ionizado en 0.1 por ciento. La carga total de la molécula proteica depende del pH de la disolución y del número relativo de cada aminoácido en la molécula. Así, cuando el pH de la disolución es tal que la carga neta de la molécula proteica es cero, es decir, cuando el número total de cargas negativas iguala al número total

de cargas positivas presentes en la molécula, se obtiene lo que se conoce como punto isoelectrico o pH isoelectrico de la proteína.

Migración electroforética

Al desplazamiento de especies cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico se le llama migración electroforética o electroforesis. En vista de que las proteínas pueden adquirir carga eléctrica neta, positiva o negativa, de acuerdo con su punto isoelectrico y del pH del medio, es posible separar las mezclas de proteínas por medio de la electroforesis, ya que cada proteína, tiene un pH isoelectrico característico y en consecuencia la magnitud de la carga, ya sea positiva o negativa, dependerá de lo alejado que esté el pH del medio de su pH isoelectrico.

Solubilidad

Puesto que las proteínas son electrolitos (electrolitos multivalentes), se comportan de modo similar a los electrolitos simples, y por lo tanto, son susceptibles a la concentración iónica del medio; a medida que ésta aumenta, mayor es la solubilidad de la proteína, porque las cargas eléctricas de ésta se estabilizan [11].

Especificidad

Se refiere a su función; cada proteína lleva a cabo una función determinada y la realiza porque posee una determinada estructura primaria y una conformación espacial propia, por lo que un cambio en la estructura de la proteína puede significar una pérdida de la función [12].

1.2.3 Niveles estructurales de las proteínas

- Estructura Primaria. Es el esqueleto covalente de la cadena polipeptídica y establece la secuencia de aminoácidos.

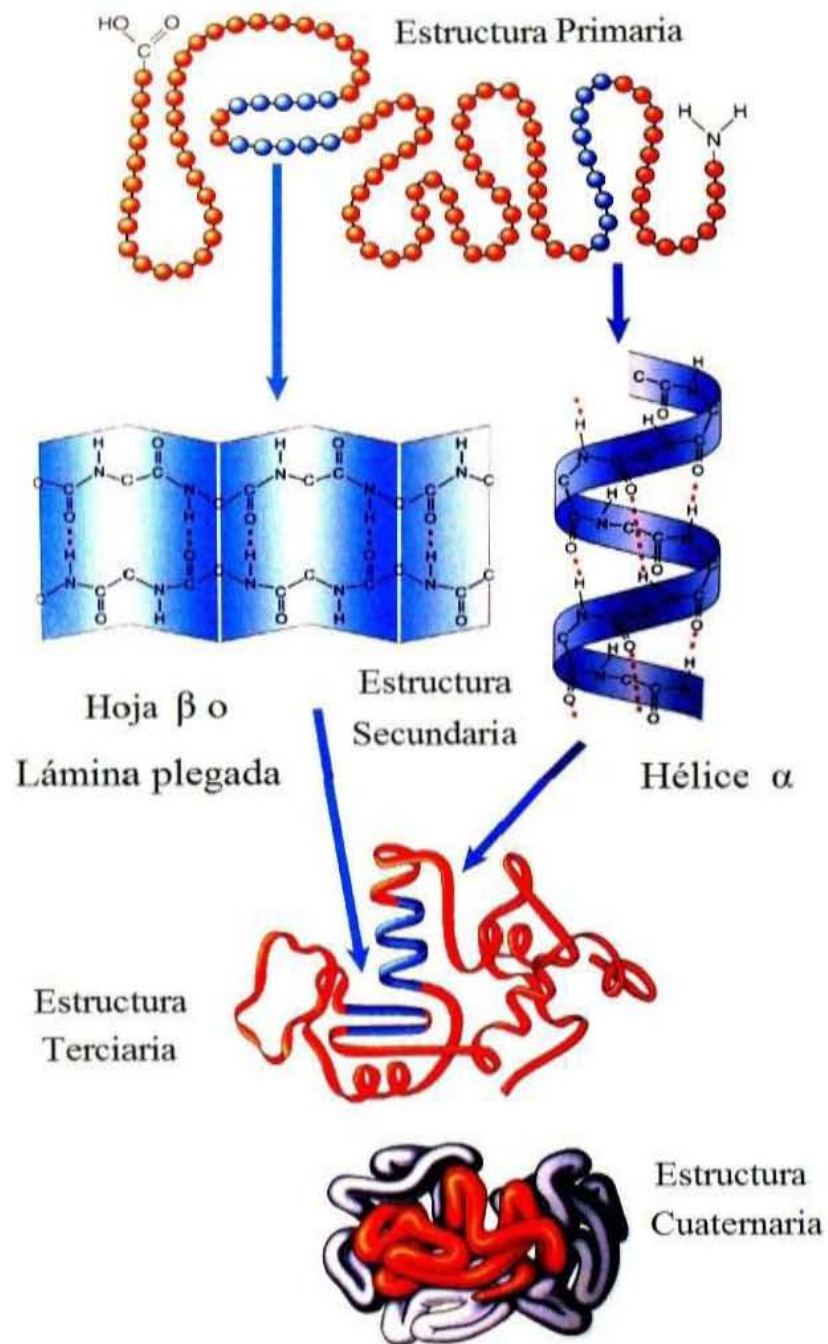


Figura 1. 3 Niveles Estructurales de las proteínas

- Estructura Secundaria. Ordenación regular y periódica de la cadena polipeptídica en el espacio. Pueden encontrarse dos arreglos, la llamada Hoja β o Lámina plegada y la Hélice α . Existen puentes de hidrógeno entre los enlaces peptídicos [13,14].
- Estructura Terciaria. Forma en la cual la cadena polipeptídica se curva o se pliega para formar estructuras estrechamente plegadas y compactas, es esta estructura las interacciones moleculares que participan son: puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales, puentes disulfuro, interacción hidrofóbica, interacción electrostática. Las proteínas son responsables de funciones diversas, estas funciones requieren una estructura terciaria tridimensional precisa
- Estructura Cuaternaria. Es el arreglo espacial de las subunidades de una proteína para formar la estructura global [13].

1.2.4 Clasificación de las proteínas según su conformación

Por conformación se entiende, la orientación tridimensional que adquieren los grupos característicos de una molécula en el espacio. Según su conformación las proteínas se dividen en dos grupos, fibrosas y globulares.

Fibrosas. Se constituyen por cadenas polipeptídicas alineadas en forma paralela; esto puede producir fibras que se trenzan sobre sí mismas formando una “macrofibra” como en el caso de la colágena.

Globulares. Cadenas polipeptídicas que se enrollan sobre si mismas en formas intrincadas como un “nudillo de hilo enredado”; como una macro-estructura de tipo esférico [14].

1.3 Colágena

Las colágenas constituyen una gran familia de proteínas fibrosas que se encuentran en todos los animales pluricelulares. Las forman las células que se encuentran dispersas en el tejido conjuntivo, las cuales, segregan una matriz extracelular compuesta de polisacáridos (GAG) y rica en colágena. La colágena es el componente más abundante en la piel, tendón y hueso, por lo que son las proteínas más abundantes en los mamíferos, constituyendo el 25% de la masa total de proteína en estos animales.

Nomenclatura

El desarrollo de la nomenclatura de las colágenas y sus cadenas de constituyentes es creciente. En general, el sistema se basa en el uso tradicional de la letra griega α para designar a una sola cadena de componentes observados en la desnaturalización de una preparación de colágena. Se han reservado letras adicionales como β , γ y δ , respectivamente, para designar a los dímeros, trímeros y tetrameros de las cadenas de α .

Como resultado de este patrón, las diferentes cadenas identificadas como los componentes primarios de las moléculas de colágena se designan, en su mayoría, con la letra α con una notación adicional para distinguir cada cadena [15].

Existen aproximadamente veinticinco conformaciones diferentes de la cadena α , cada una producido por su gen único. La combinación de estas cadenas, en grupos de tres, se reúne para formar los veintisiete tipos de colágena que se conocen. Cada uno de ellos designado por un número romano y comprendiendo cierta cantidad de cadenas polipeptídicas α . De acuerdo con su estructura molecular las colágenas se subdividen de la siguiente manera:

1. Colágenas fibrilares (tipos I, II, III, V, XI, XXIV y XXVII).
2. Colágenas de membrana basal o formadoras de mallas (IV, VII y X).
3. Asociación de fibrillas de colágena con interrupción de 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 (VI , VII, XV y XVIII).

En la tabla siguiente se muestra la distribución de los distintos tipos de colágena en el organismo [22,31].

Tabla 1. 2 Distribución de algunos los tipos de colágena en el organismo

Tipo	Tipos de cadena	Distribución en los tejidos
I	$[\alpha 1(\text{I})]_2\alpha 2(\text{I})$	Hueso, piel tendones, ligamentos, córnea (representa 90% de la colágena total del cuerpo humano)
II	$[\alpha 1(\text{II})]_3$	Cartílago, humor vítreo del ojo, disco intervertebral
III	$[\alpha 1(\text{III})]_3$	Piel y vasos sanguíneos
IV	$[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ $[\alpha 3(\text{IV})]\alpha 4(\text{IV})\alpha 5(\text{IV})$	Membrana basal
V	$[\alpha 1(\text{V})]_2\alpha 2(\text{V})$ $[\alpha 1(\text{V})]_3$ $\alpha 1(\text{V})\alpha 2(\text{V})\alpha 3(\text{V})$	Igual que el tipo I
VI	$[\alpha 1(\text{VI})]_3$	Hueso, cartílago, piel, vasos sanguíneos
VII	$[\alpha 1(\text{VII})]_3$	Mucosa oral, cordón umbilical.
VIII	$[\alpha 1(\text{VIII})]_2\alpha 2(\text{VIII})$	Cerebro, corazón, riñón, cartílago
IX	$\alpha 1(\text{IX})\alpha 2(\text{IX})\alpha 3(\text{IX})$	Cartílago
X	$[\alpha 1(\text{X})]_3$	Cartílago hipertrófico

1.3.1 Síntesis de la colágena

La síntesis de la colágena (Figura 1.3) comienza con la transcripción de la información desde el ADN al ARN mensajero, que viaja hasta el retículo endoplasmático rugoso (RER), donde los ribosomas (ARNt) lo traducen y convierten en preprocolágena, molécula que posee alrededor de 100 aminoácidos extras que se denominan péptidos de señal. La preprocolágena se sintetiza con un péptido de señal y se libera como procolágena dentro de las cisternas del RER. La procolágena contiene tres polipéptidos en cadena, sin péptido de señal y ensamblados en forma de una triple hélice [16].

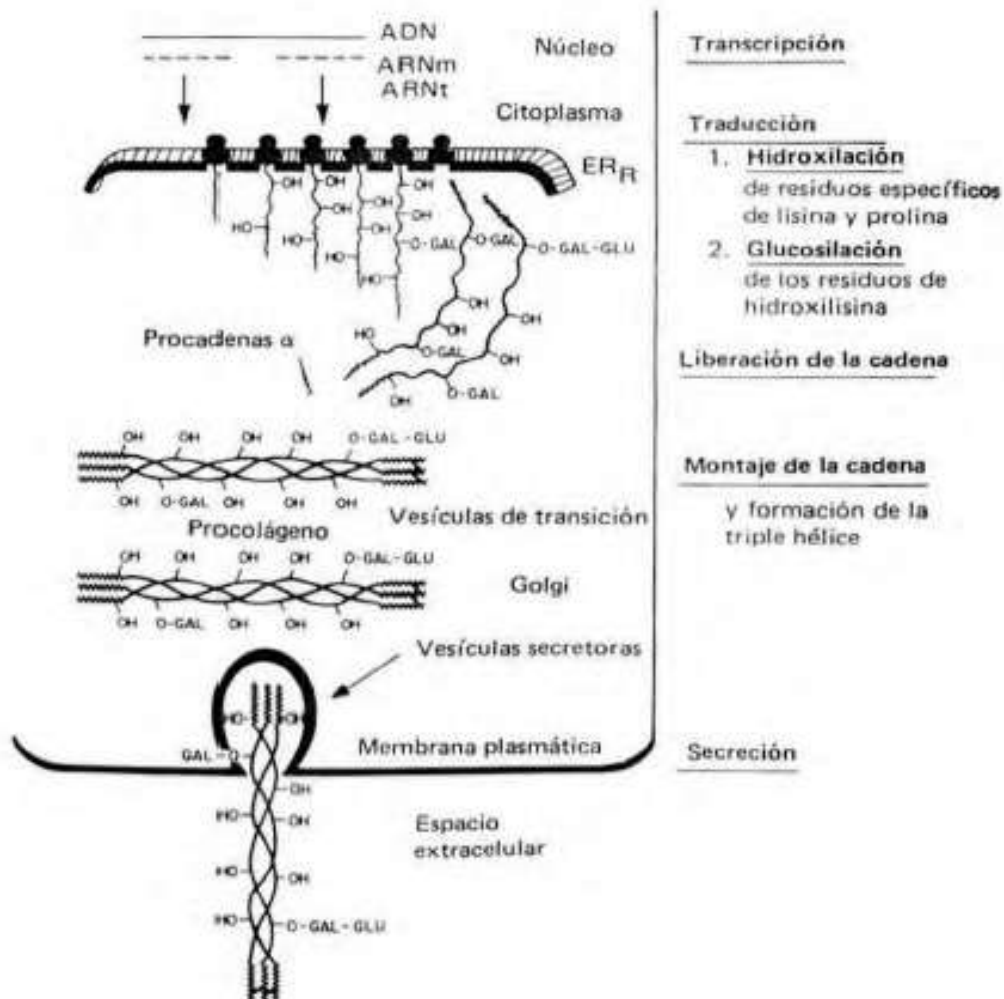


Figura 1. 4 Síntesis de la colágena

El siguiente paso es la hidroxilación de determinados residuos de prolina y lisina para formar hidroxiprolina e hidroxilisina, respectivamente.

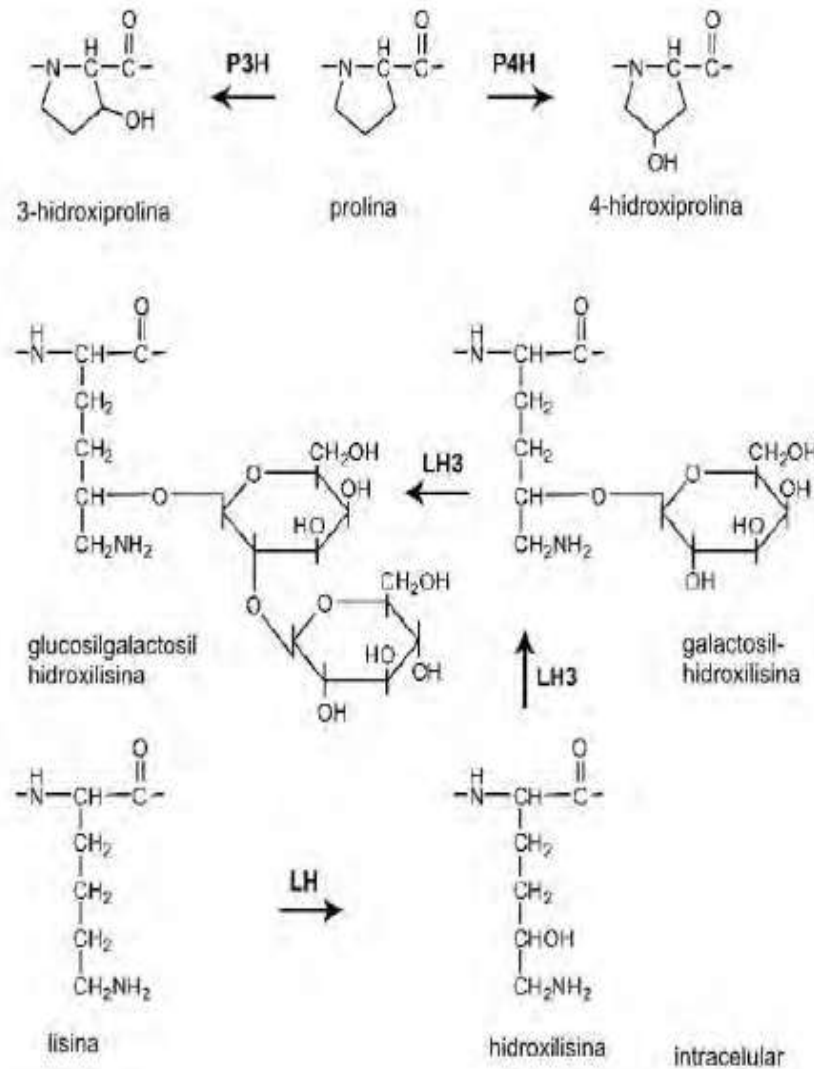


Figura 1. 5 Hidroxilación de los residuos de prolina y lisina, así como la glucosilación

P3H = prolil 3-hidroxisilasa; PH4 = prolil 4-hidroxisilasa; LH = lisilhidroxilasa

La adición de grupos sacáridos se lleva a cabo mediante las glicoltransferasas hacia las moléculas de lisina y prolina, es decir se lleva a cabo la glucosilación (Figura 1.4).

Después de esto, las procadenas (2 pro- α 1 (I) y pro- α 2 (I)) se combinan para formar una molécula helicoideal, denominada procolágena. Los propéptidos amino-terminales de ambas procadenas tienen puentes de disulfuro interconectados.

El empaquetado y la secreción de la procolágena en la célula tienen lugar en el aparato de Golgi. Tras la secreción de la procolágena, se producen los tres siguientes eventos en el espacio extracelular:

1. Eliminación enzimática (procolágena peptidasa) de la mayor parte de los extremos solubles no helicoidales de la procolágena para originar moléculas de tropocolágena solubles.
2. Autoagregación de las moléculas de tropocolágena mediante un proceso de solapamiento escalonado para formar fibrillas de colágena.
3. Formación de enlaces cruzados entre las moléculas de tropocolágena, que conduce a la formación de fibras de colágena. La lisil oxidasa cataliza la formación de enlaces cruzados entre las tropocolágenas.

Los grupos de fibras de colágena se orientan siguiendo el mismo eje para crear los haces de colágena. La formación de haces de colágena viene controlada por los proteoglucanos y otras glucoproteínas, incluidos las colágenas FACIT [31].

1.3.2 Estructura de la colágena

Una fibra de colágena está constituida por pequeños filamentos unidos entre sí, como si se tratase de una cuerda. Una molécula de colágeno consiste en una cadena de tres proteínas envueltas unas alrededor de otras, y cada una de ellas constituida por una cadena de pequeñas unidades, llamadas aminoácidos. En la Figura 1.5 se observan las fibras de colágena.

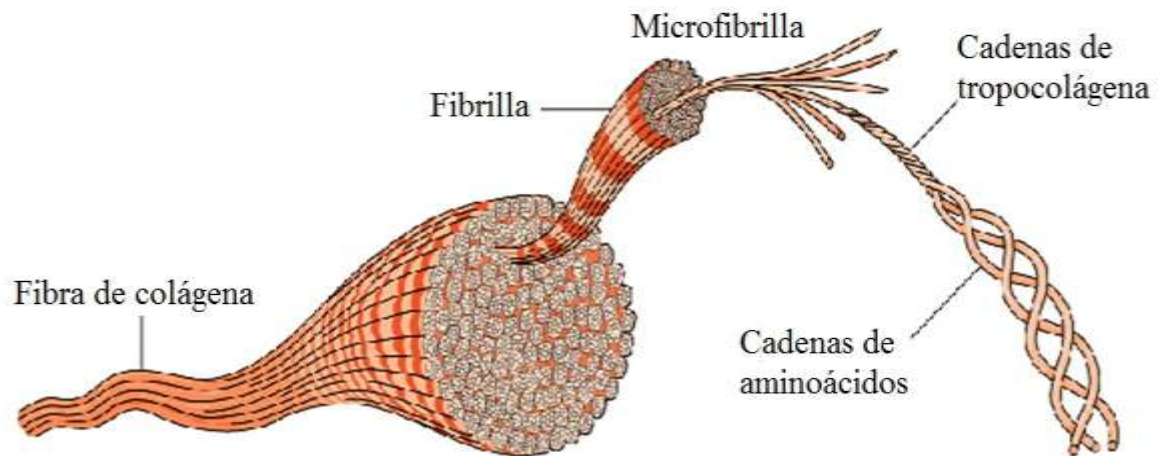


Figura 1. 6 Estructura de la colágena

Fibrillas

La formación de fibrillas en el espacio extracelular, es un proceso de ensamblaje controlado y estabilizado por los entrecruzamientos. Es un filamento delgado con un diámetro del orden de 10- 200 nm

Las fibrillas de colágena presentan estrías transversales características cada 67 nm, que reflejan el empaquetamiento escalonado y periódico de las moléculas individuales de colágena en la fibrilla.

Microfibrillas

La estructura fibrilar más pequeña es la microfibrilla, que se puede observar con un microscopio electrónico. Las microfibrillas están constituidas por 4 ó 5 moléculas de colágena, cada molécula, se encuentra alineada de forma escalonada respecto a sus vecinas.

La interacción de éstas es fuerte y es óptima cuando están desplazadas una respecto a la otra por una distancia de 67 nm [17, 18].

El proceso de la formación de las 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 resiste la tracción.

Tropocolágena

Cada fibrilla de colágena, está formada por una superposición de moléculas de colágena llamada tropocolágena (Figura 1.7)

. Cada molécula de tropocolágena que mide 280 a 300 nm de longitud, 1.5 nm de diámetro y tiene una masa molecular aproximada de 300kD, está formada por tres cadenas peptídicas enrolladas entre sí formando una superhélice dextrógira, denominadas cadenas.

La molécula de colágena, está formada 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 cualquier aminoácido [17].

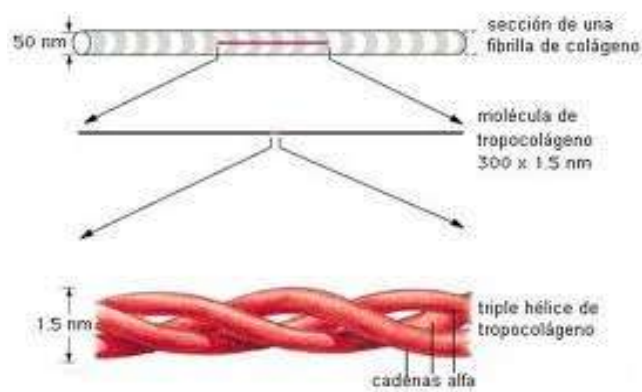


Figura 1. 7Tropocolágena

1.3.3 Niveles estructurales de la colágena

La molécula de colágena es una proteína, por lo tanto tiene cuatro niveles estructurales.

a) Estructura primaria

Es la secuencia de aminoácidos en las cadenas polipeptídicas de una determinada proteína, es decir, los aminoácidos que la componen y en el orden en el que se encuentran. Recordemos que en la colágena, la secuencia de aminoácidos está principalmente constituida por la unidad repetitiva Gly-X-Y.

b) Estructura secundaria

Es el plegamiento que la cadena peptídica experimenta gracias al establecimiento de enlaces de hidrógeno entre los átomos de las distintas uniones peptídicas $-\text{CO}-\text{NH}-$. El plegamiento secundario de la cadena peptídica puede adquirir diversas formas, pero las más importantes son las hélices y las láminas. En el caso de la molécula de colágena, la estructura secundaria es única y se denomina cadena α , levógira y con 3.3 aminoácidos por vuelta [20].

c) Estructura terciaria

La estructura terciaria es su estructura tridimensional.. Esta estructura está determinada, en gran medida, por la estructura primaria o sea por la secuencia de aminoácidos que la componen; en el caso de la colágena, esta estructura es la unión de tres cadenas α enrolladas sobre sí mismas conformando una superhélice dextrógira y con un diámetro de 1.5 nm, que recibe el nombre de tropocolágena [21].

d) Estructura cuaternaria

Es el acomodo entre distintas subunidades en un arreglo específico. En el caso de la colágena, esta estructura, es la formación escalonada de varias moléculas desplazadas unas respecto a otras a una distancia de 67 nm.

En la figura 1.8 se presentan los niveles de organización de la colágena tipo I.

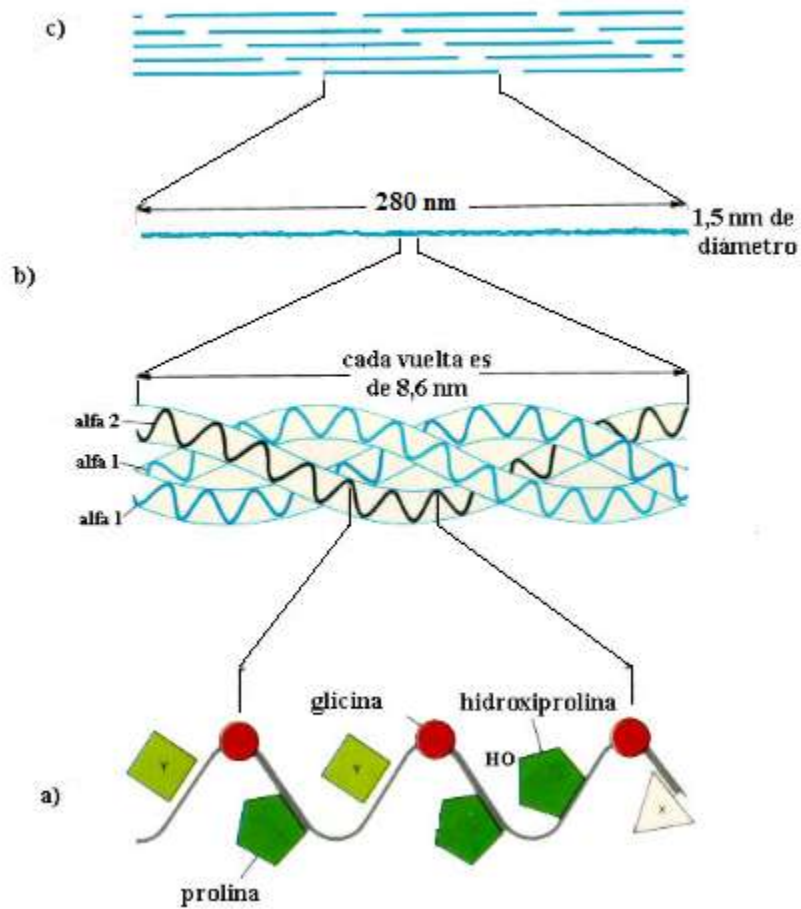


Figura 1. 8 Niveles de organización de la colágena tipo I. (a) estructura primaria, (b) estructura secundaria y estructura terciaria, (c) estructura cuaternaria.

1.3.4 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 empaquetamiento denso 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 se pueden acomodar fácilmente.

La estabilidad de la estructura helicoidal se debe en gran parte a los puentes de hidrógeno que se forman entre las cadenas α y que componen la triple hélice y entre cada una de las cadenas α con el agua.

1.3.5 Colágena como biomaterial

La presencia de colágena en todo el tejido conectivo la convierte en una de las moléculas más estudiadas de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés).

La colágena puede procesarse en diferentes formas, por ejemplo, hojas, tubos, esponjas, espumas, matrices, polvo, disoluciones inyectables y dispersiones. Todas ellas han encontrado una aplicación en el campo de la medicina.

Inmunogenicidad y biocompatibilidad

El uso de material biológico para aplicaciones médicas requiere hacer una distinción entre inmunogenicidad y antigenicidad. La inmunogenicidad, se refiere a desencadenar una respuesta inmune, mientras que la antigenicidad, se refiere a la interacción entre los anticuerpos y los antígenos determinados. Estudios inmunológicos han demostrado que la respuesta inmune contra la colágena, se enfoca principalmente a los antígenos de la región del telopéptido de cada extremo de la molécula de tropocolágena. Sin embargo, la conformación de la parte helicoidal y la secuencia de aminoácidos en la superficie de las fibrillas de colágena polimerizada también influyen en el perfil inmunológico de la molécula de colágena.

La colágena tipo I, es un material adecuado para la implantación, ya que sólo una pequeña cantidad de personas poseen inmunidad humoral en contra de ella, y una simple prueba serológica puede verificar si un paciente es susceptible a una reacción alérgica en respuesta a un biomaterial a base de colágena.

Es importante mencionar que estos datos sobre la inmunogenicidad de colágena son aplicables también a una matriz extracelular acelular formada por las moléculas de colágena ya que las respuestas inmunes más adversas que se han encontrado debido a un andamio acelular no son necesariamente originadas por la molécula de colágena como tal. Así una descelurización incompleta es muy frecuentemente la causa de rechazo agudo o respuesta inmune [22].

CAPÍTULO 2

Técnicas de Caracterización

2.1 Electroforesis

Una molécula con una carga eléctrica se desplaza en un campo eléctrico. Este fenómeno, llamado electroforesis por primera vez en 1907 por Michaelis, ofrece un procedimiento poderoso para separar proteínas u otras moléculas, como DNA y RNA. La velocidad de migración (v) de una proteína (o de cualquier otra molécula) en un campo eléctrico depende de la fuerza de ese campo eléctrico (E), de la carga neta de la proteína (z), y del coeficiente de fricción (f), como lo expresa la ecuación (1).

$$v = \frac{Ez}{f} \quad (1)$$

La fuerza eléctrica que arrastra a la molécula cargada hacia el electrodo de carga opuesta, sufre una resistencia, debido a la fricción viscosa entre la molécula que se desplaza y el medio en el que lo hace. El coeficiente de fricción f depende tanto de la masa como de la forma de la molécula que migra así como, de la viscosidad del medio (η).

Para moléculas esféricas de radio r , se cumple que:

$$f = 6\pi\eta r \quad (2)$$

Las separaciones electroforéticas se realizan casi siempre sobre geles (o sobre soportes sólidos como el papel) porque el gel funciona como un tamiz molecular que potencia la separación [23].

2.1.1 Equipo y mecanismo de formación del gel

El equipo utilizado para llevar a cabo esta técnica, consiste en una cámara de electroforesis, la cual puede ser horizontal o vertical, que consta de dos electrodos (cátodo y ánodo) y de dos recipientes que contienen el buffer o amortiguador de corrida (superior e inferior), de una fuente de poder, que permite mantener un potencial de voltaje constante y en los elementos necesarios para la formación del gel como son, peine, espaciadores, vidrios, (Fig. 2.1) y por supuesto el soporte (gel) cuya tarea es la de un tamiz molecular. Los soportes usualmente elegidos para la electroforesis de proteínas son los geles de poliacrilamida (PAGE por sus siglas en inglés “polyacrilamide gel electrophoresis”), debido a su buena resolución y gran versatilidad, además de que posee una serie de ventajas como: ser químicamente inerte y transparente, prepararse rápidamente y poderse controlar el tamaño del poro variando las concentraciones de los reactivos que los conforman.



Figura 2. 1 Equipo de electroforesis [24]

El mecanismo de la formación del gel consta de la polimerización vía radicales libres del monómero acrilamida y el monómero entrecruzante N,N' – metilen bis – acrilamida , al cual cataliza el N,N,N',N' – tetrametilendiamina (TEMED) que ayuda en la formación de radicales libres a partir del ion persulfato que se añade como persulfato de amonio y que

actúa como iniciador (Figura 2.2). Como el oxígeno inhibe la reacción, se debe desgasificar la disolución [25].

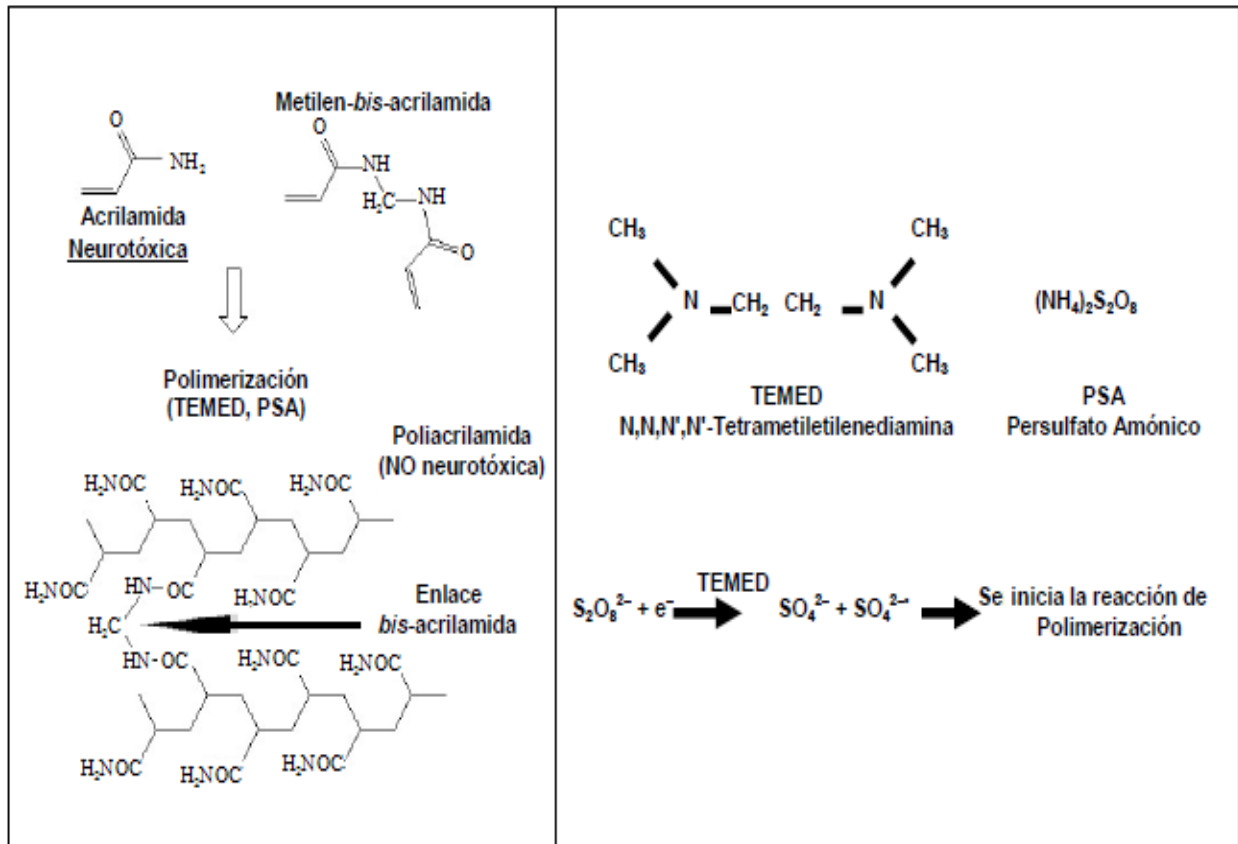


Figura 2. 2 Reacción de polimerización de la poliacrilamida [26]

2.1.2 Tamaño de poro del gel de poliacrilamida

El tamaño de poro del gel se puede controlar utilizando dos parámetros, %T y %C, el primero, se refiere al porcentaje en masa del monómero total empleado (acrilamida + entrecruzador) que determina la longitud 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).

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

$$\%C = \frac{\text{Bisacrilamida(g)}}{\text{Acrilamida(g)} + \text{Bisacrilamida(g)}} \times 100 \quad (4)$$

Así, geles con un alto porcentaje de acrilamida (10-15 %T) son óptimos para la separación de proteínas de baja masa molecular (menores a 50 KDa), mientras que geles de porcentajes menores (<10 %T) son indicados para la separación de proteínas de mayor tamaño [26].

2.1.3 Condiciones de electroforesis

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida puede llevarse a cabo en condiciones nativas (ND-PAGE) o desnaturalizadas (SDS-PAGE). Las diferencias radican en los componentes de los geles, del amortiguador y del tratamiento de las muestras. En la electroforesis en condiciones nativas, las proteínas mantienen su estructura terciaria y cuaternaria, y las diferentes cadenas polipeptídicas permanecen unidas, separándose en función de su carga eléctrica, forma y tamaño. Por el contrario, en condiciones desnaturalizantes (descritas por Laemmli en 1970) (SDS-PAGE) se incluyen agentes desnaturalizantes como reductores (β -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 (Figura 2.3). 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.

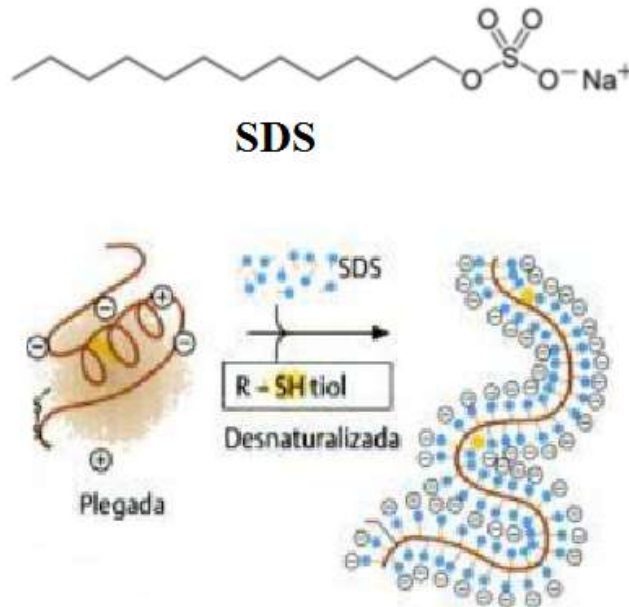


Figura 2. 3 Proteína desnaturalizada por SDS

Aproximadamente una molécula de dodecil sulfato sódico, SDS, se une a dos residuos de aminoácidos, con una relación SDS/proteína de 1/4. 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 con base en su tamaño y por ello la masa molecular de las proteínas puede estimarse.

2.1.4 Sistemas de electroforesis

Actualmente existen dos sistemas de electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con base en los amortiguadores empleados:

1. El sistema continuo de Weber y Osborn, constituido por un gel uniforme y un mismo amortiguador empleado en la formación del gel y para la corrida.
2. El sistema discontinuo o de Laemmli consta de dos geles: un gel llamado concentrador con un tamaño de poro grande y pH de 6.8 (colocado en la parte superior); y un gel separador que posee un tamaño de poro menor y un pH de 8.8 (Ver Figura 2.4).

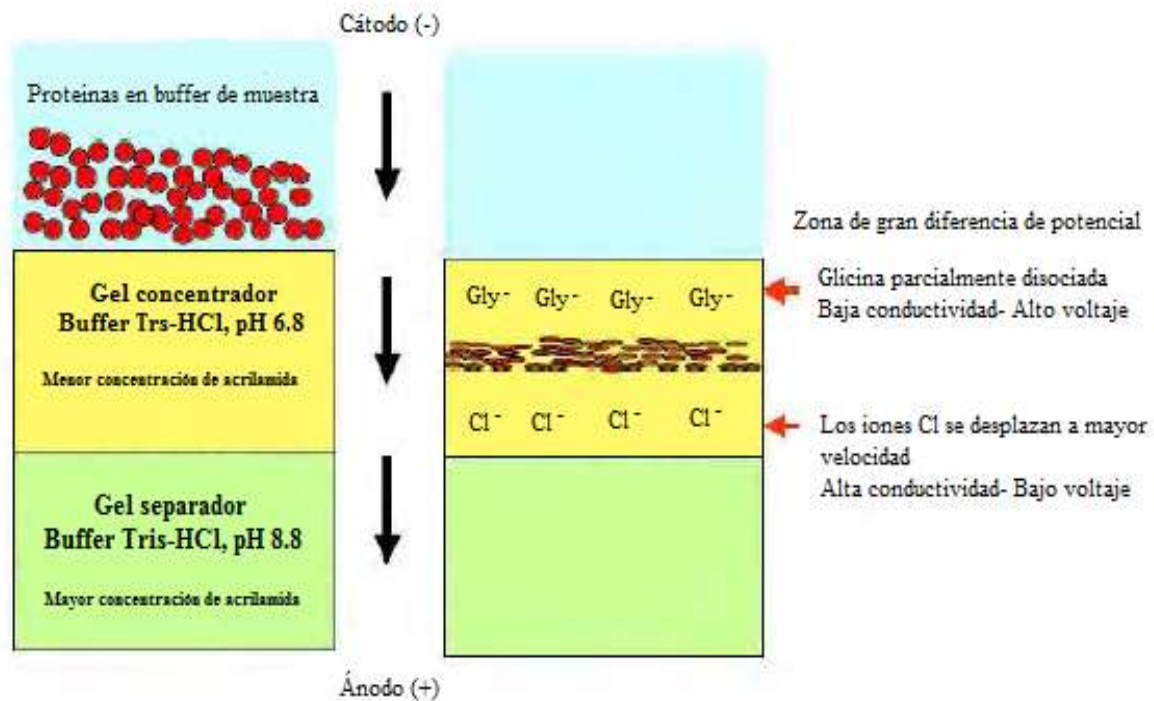


Figura 2. 4 Sistema discontinuo en SDS-PAGE [27]

La movilidad de una proteína en el gel concentrador es intermedia entre la movilidad de los iones de cloruro del gel y la movilidad del ion glicinato del amortiguador de muestra. Por lo 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 migren 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 con base en su tamaño. La capacidad de este sistema para concentrar la muestra mejora considerablemente la resolución de los geles.

2.2 Análisis térmico

2.2.1 Análisis Termogravimétrico

El análisis termogravimétrico mide la variación porcentual en la masa de un material al ser sometido a un calentamiento gradual, variación que es producto de las eventuales descomposiciones que experimente dicho material como consecuencia del desprendimiento de compuestos volátiles.

Dependiendo de la sustancia sometida al calentamiento, se pueden observar en el gráfico o termograma un número característico de peldaños (pérdida de masa) con diferentes longitudes e inclinaciones, que constituyen, en definitiva, un perfil gracias al cual se puede llegar por comparación, a la identificación de la sustancia [28].

2.2.1.1 Instrumentación

Los instrumentos comerciales modernos empleados en termogravimetría constan de: (1) una balanza analítica sensible, (2) un horno, (3) un sistema de gas de purga para proporcionar una atmósfera inerte (o algunas veces reactiva) y (4) un microprocesador para el control del instrumento y la adquisición y visualización de datos.

2.2.1.2 Generalidades

Cuando se lleva a cabo un análisis térmico gravimétrico, un cambio en la masa de la muestra provoca una desviación en el brazo de la termobalanza, que cierra el paso de la luz entre la lámpara y uno de los fotodiodos.

El desequilibrio resultante en la corriente fotodiódica se amplifica y alimenta la bobina, que está situada entre los polos del imán permanente, el campo magnético generado por la corriente en la bobina devuelve el brazo a su posición original. La corriente amplificada del fotodiodo se recoge y transforma en información sobre la masa o pérdida de masa en el sistema de adquisición de datos [29]. En la siguiente figura se muestran las partes de una termobalanza.

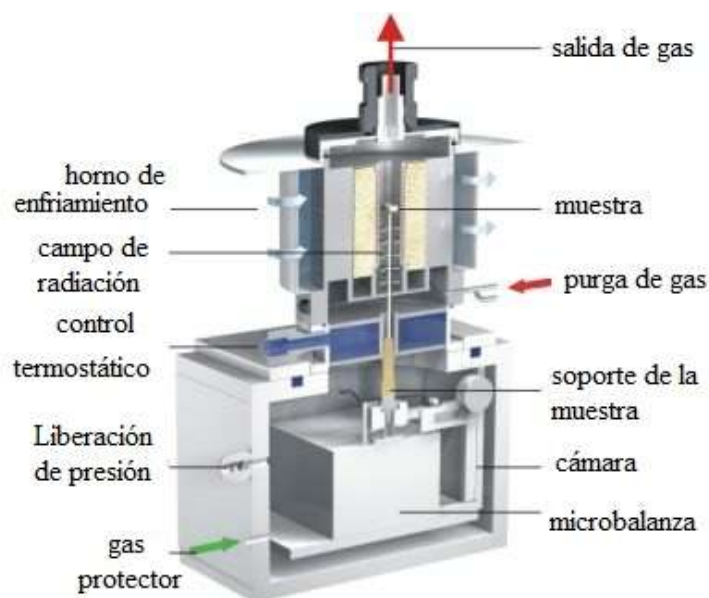


Figura 2. 5 Esquema de una termobalanza

2.2.1.3 Aplicaciones

Los métodos termogravimétricos se utilizan en el estudio de las reacciones de descomposición y de oxidación y en procesos como la vaporización, la sublimación y la desorción. Entre las aplicaciones se encuentra el estudio de polímeros donde los termogramas proporcionan información sobre los mecanismos de descomposición y estabilidad de diversas preparaciones poliméricas. Además, los modelos de descomposición

son característicos de cada tipo de polímero y, en algunos casos, pueden utilizarse con fines de identificación.

2.2.2 Calorimetría Diferencial de Barrido

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, acrónimo del nombre inglés “Differential Scanning Calorimetry”), es la técnica experimental más directa y precisa para caracterizar sistemas moleculares bien definidos, cuyas estructuras están estabilizadas por numerosas fuerzas débiles y por consiguiente, susceptibles de experimentar transiciones conformacionales y/o cambios de fase al modificar la temperatura. Es, consecuentemente, la técnica más adecuada para caracterizar termodinámicamente sistemas macromoleculares como proteínas y biomembranas.

El uso de la calorimetría diferencial de barrido permite medir la capacidad calorífica aparente de una disolución macromolecular como una función continua de la temperatura, obteniéndose así, lo que comúnmente se denomina termograma. A partir de esta función es posible, si el sistema macromolecular está bien definido, determinar los parámetros termodinámicos asociados con la transición inducida por la temperatura: cambios de entalpía (ΔH), de entropía (ΔS), de energía de Gibbs (ΔG) y de capacidad calorífica (ΔC_p) [30].

El equipo de DSC consiste en dos cámaras, cada una contiene un crisol. Los crisoles están fabricados en diferentes materiales, el más utilizado es el crisol de aluminio, el cual trabaja hasta una temperatura máxima de 600 °C. Por arriba de esta temperatura se utilizan crisoles de Au, C, Pt, Ag y acero inoxidable. Una condición para emplear el crisol de aluminio es evitar una interacción química con la muestra.

En uno de los crisoles se coloca la muestra a analizar, mientras que el otro crisol se queda vacío o se coloca un material de referencia como por ejemplo el óxido de aluminio. 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 modificando 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 la referencia [31].

Los circuitos del equipo están programados para proporcionar una temperatura constante tanto en el compartimiento de la muestra como en el de la referencia. Se suministra, por lo tanto, una corriente adicional al compartimiento 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 obtiene un termograma, en donde aparecen varias señales 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 las señales indica si el proceso es endotérmico o exotérmico. En este estudio las señales hacia abajo denotan procesos endotérmicos y por el contrario los picos hacia arriba se refieren a procesos exotérmicos.

2.3 Microscopia Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barrido o SEM (por sus siglas en inglés) constituye una de las técnicas más utilizadas en el análisis de superficies debido a que provee una imagen de gran amplificación y definición [31].

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 (Fig. 2.6). En la base de la columna está la cámara que contiene a los detectores y la plataforma donde se deposita la muestra. Dependiendo del objetivo particular del estudio, se puede operar el equipo en diferentes maneras, por ejemplo bajo voltaje, superficie sensible, alta resolución [31].

En la microscopía electrónica de barrido (SEM) los electrones emitidos por un cañón de electrones (electrones primarios) se centran por medio de lentes electromagnéticas sobre la superficie de la muestra, que barre punto por punto la muestra. De esta forma se adquieren datos de un punto de la muestra en un momento. En cada lugar donde el haz de electrones

primarios impacta en la muestra, se emite un flujo de electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos X y otros tipos de señales (Figura 2.7).

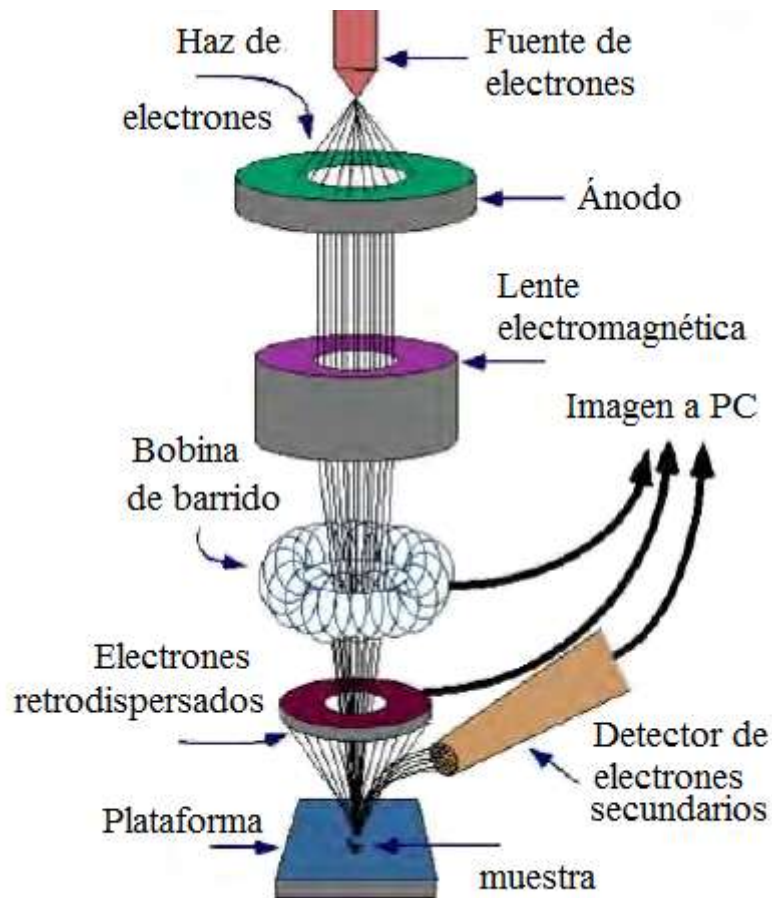


Figura 2. 6 Esquema de los componentes de un SEM

Una porción de cada señal emitida viaja en tal dirección que entra en el detector, el cual mide la intensidad de los electrones emitidos en cada punto de la muestra y convierte este valor de intensidad en una escala de grises. Entonces, los 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 [31]. El resultado es una imagen topográfica muy ampliada de la muestra [32].

La muestra debe ser conductora. Por lo tanto, los materiales poliméricos naturales como la colágena, deben recubrirse 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 [31].

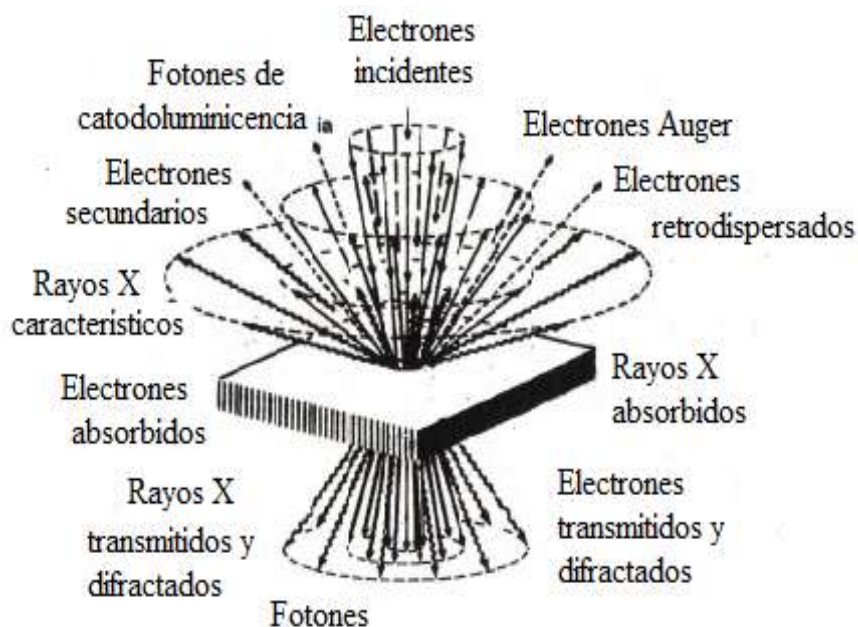


Figura 2. 7 Señales emitidas durante el escaneo de la muestra por SEM

2.4 Espectroscopía infrarroja

La espectroscopía infrarroja tiene más de 130 años de existencia. En 1881, Abney y Festing observaron el primer espectro de vibraciones moleculares, prepararon emulsiones fotográficas sensibles al infrarrojo cercano y fotografiaron el espectro de absorción de 48 líquidos orgánicos [33].

Las transiciones entre los niveles de vibración del estado fundamental de una molécula y el excitado son el resultado de la absorción de la luz con longitudes de onda en la zona infrarroja del espectro electromagnético (IR): desde 10^3 hasta 10^4 nm. Esos niveles de vibración y, por consiguiente, los espectros IR son generados por los movimientos característicos (como tensiones y doblamientos de los enlaces, así como otros movimientos

más complejos) de los grupos funcionales (metilo, carbonilo, amida, etc.). El valor de los espectros IR, como instrumento de análisis, proviene de su extraordinaria sensibilidad a los cambios de la estructura química, de la conformación espacial y del medio en el que se halle la muestra examinada. En este sentido, la espectroscopía infrarroja no se diferencia de la visible y de la ultravioleta. Se le considera distinta simplemente porque utiliza luz infrarroja y con ella se pueden estudiar las vibraciones moleculares de grupos químicos que no son posibles por las otras dos espectroscopias.

En principio, los espectrofotómetros infrarrojos no se diferencian de los de luz visible o ultravioleta. La fuente de radiación es un objeto calentado a 1500 o 1800 K; se usa un monocromador para seleccionar la longitud de onda, pero el detector es un termopar en vez de una célula fotoeléctrica.

El principal problema de la espectroscopía infrarroja es que no puede aplicarse a sustancias disueltas a causa de la fuerte absorción de la radiación IR que posee el disolvente (debido a su elevado coeficiente de extinción). Este inconveniente puede solucionarse parcialmente utilizando agua pesada o mezclas de H₂O y D₂O. También se utiliza con bastante frecuencia el cloroformo, puesto que muchas sustancias polares se disuelven en él, pero, en cambio, produce dificultades a causa de los cambios conformacionales que induce. El método más frecuente para las macromoléculas es el empleo de películas muy delgadas y secas. Estas películas se preparan disolviendo la macromolécula en un disolvente volátil, colocando la disolución en un recipiente plano para que se evapore el disolvente y recogiendo la película formada sobre dicho recipiente [34,35].

El alto contenido de información que brinda un espectro infrarrojo se traslada también a los sistemas biológicos. Esto convierte a la espectroscopia infrarroja en una herramienta valiosa para la investigación de la estructura de las proteínas [36].

El espectro infrarrojo comúnmente se representa con una gráfica de la transmitancia T contra el inverso de la longitud de onda, (el número de onda $\tilde{\nu}$). Es proporcional a la energía de transición y tiene la unidad de cm^{-1} . La coordenada x del espectro va de valores altos a valores bajos de acuerdo con la recomendación de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) [37].

La región espectral infrarroja es adyacente al espectro de la región visible y se extiende desde $0.78\ \mu\text{m}$ a aproximadamente $1000\ \mu\text{m}$. Puede subdividirse en la región del infrarrojo cercano que va desde $780\ \text{nm}$ a $2.5\ \mu\text{m}$, la región del infrarrojo medio de $2.5\ \mu\text{m}$ a $50\ \mu\text{m}$ y el infrarrojo lejano región de $50\ \mu\text{m}$ a $1000\ \mu\text{m}$.

Dentro de la información que se puede deducir de un espectro infrarrojo destaca la siguiente:

- Estructura química del grupo funcional
- Estados de óxido-reducción
- Ángulos de enlace
- Tipos de enlace (sencillo, doble, etc)
- Propiedades químicas de los grupos vecinos en la molécula

2.4.1 Espectrómetros infrarrojos

Existen dos tipos de espectrómetros infrarrojos, los dispersivos y los de transformada de Fourier.

Equipos dispersivos

Los espectrómetros infrarrojos dispersivos ya no se utilizan para las mediciones de rutina, pero siguen siendo valiosos para aplicaciones especiales. Un espectrómetro infrarrojo de dispersión consta de una fuente de luz, la óptica (a menudo espejos) que enfocan la luz sobre la muestra y luego en la rendija de entrada de un monocromador, de un monocromador, de otro espejo para enfocar la luz en un detector y de un detector. El posicionamiento del monocromador detrás de la muestra evita la detección de la radiación de calor de la muestra. La desventaja de estos instrumentos es que la luz incidente se divide en sus componentes espectrales.

Equipos de transformada de Fourier

Su nombre proviene del hecho de que a la señal que llega al detector de estos espectrómetros se le efectúa un proceso matemático llamado Transformación de Fourier.

Su funcionamiento es el siguiente: un haz colimado, proveniente de una fuente que emite en toda la región infrarroja, incide sobre un divisor de haz. El haz incidente se divide en dos haces perpendiculares de igual energía, uno de los cuales incide sobre el espejo móvil y el otro sobre el espejo fijo. Los haces son reflejados por ambos espejos y se recombinan al llegar al divisor de haz. Esto da lugar a una interferencia, la cual puede ser constructiva o destructiva dependiendo de la posición relativa del espejo móvil con respecto del espejo fijo. El haz resultante pasa a través de la muestra, en donde sucede una absorción selectiva de longitudes de onda y, finalmente, llega al detector (véase la Figura 2.8).

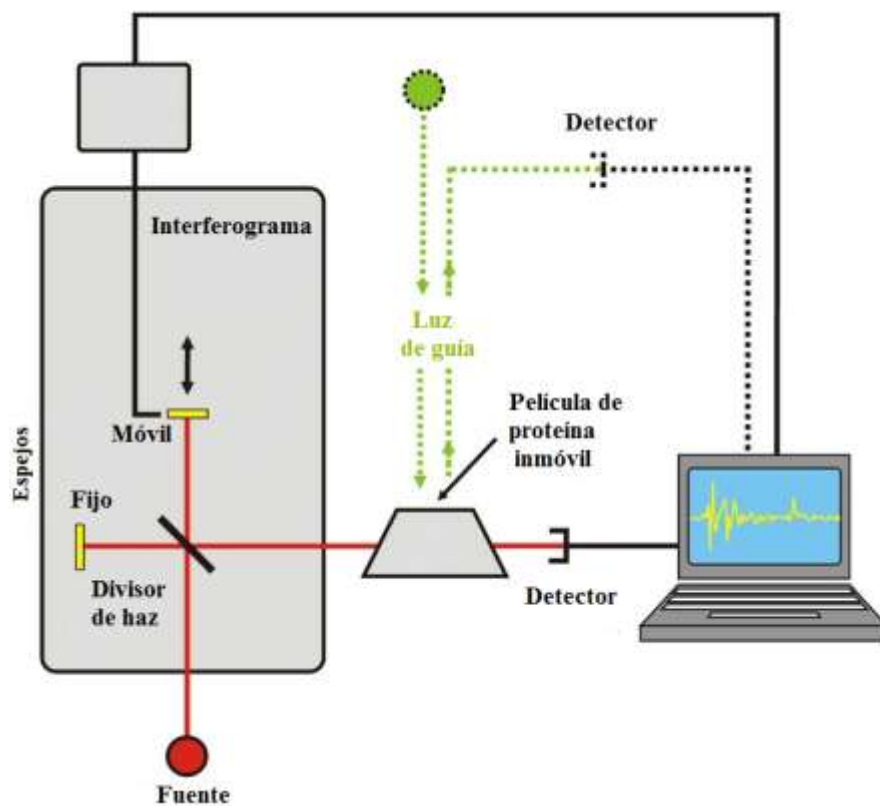


Figura 2. 8 Diagrama simplificado de un espectrómetro por transformada de Fourier

La información recabada por el detector se utiliza para obtener el interferograma, el cual es digitalizado. Una computadora desarrolla el cálculo apropiados de la transformada de Fourier del interferograma, debido a que después de digitalizar la información ya no se puede trabajar con variables continuas.

CAPÍTULO 3

Método Experimental

3.1 Metodología

La preparación de colágena abarca varias etapas diferentes. Éstas incluyen la transformación de un órgano o tejido apropiado, la extracción de colágena y su purificación. Dada la extrema diversidad de los tejidos y órganos en que se produce colágena, así como la multiplicidad de tipos de colágena que pueden estar presentes en una determinada fuente, no existe un protocolo estándar o método idóneo para la obtención de colágena.

3.1.1 Materia prima

Los tejidos biológicos empleados para la extracción de colágena fueron:

- Tendón de cola de rata (RT)
- Tendón de cola de bovino (BT)
- Piel de bovino (BS)

3.1.2 Procesamiento preliminar de los tejidos

Los tendones se cortaron en rodajas relativamente delgadas utilizando un bisturí, mientras que las pieles se cortaron en cuadrados para hacer más fácil su tratamiento.

3.1.3 Extracción de colágena

El proceso de extracción se llevó a cabo a una temperatura de 4 °C, con el fin de minimizar el crecimiento bacteriano y aumentar la solubilidad de la colágena. Los tejidos se mezclaron con ácido acético 0.5 M, utilizando una parrilla agitación magnética.

De esta manera, los enlaces cruzados intermoleculares de tipo aldimina se disocian por efecto de la disolución ácida, causando la inflamación de las estructuras fibrilares, produciendo una masa viscosa.

La extracción se llevó a cabo en un lapso de 48 horas. Después de este tiempo, la mezcla de extracción se filtró a través de varias capas de gasa para lograr la separación inicial de la disolución de colágena y los residuos de tejido insolubles. Éstos últimos pueden volver a suspenderse en ácido para después volver a filtrarse con el fin de obtener un mayor rendimiento.

Al terminar la filtración, la disolución de colágena se centrifugó a 19000 rpm durante 60 minutos manteniendo una temperatura de 4 °C (Condiciones C1). Esto se hizo en una centrífuga SORVALL RC 6C Plus utilizando un rotor SS34. Se desechó el sedimento. En la figura 3.1 se esquematiza el proceso de extracción de colágena.

3.1.4 Purificación de colágena

El proceso de purificación empieza con una primera precipitación selectiva (salting out) adicionando cristales de NaCl al 5 % (5 g de NaCl por cada 100 mL de disolución). Se mantuvo en agitación constante durante aproximadamente 24 hrs y manteniendo una temperatura de aproximadamente 4 °C.

La mezcla se centrifugó a 9000 rpm durante 30 minutos a 4 °C (Condiciones C2), se conservó el sedimento y se resuspendió en ácido acético 0.5 M durante 24 horas.

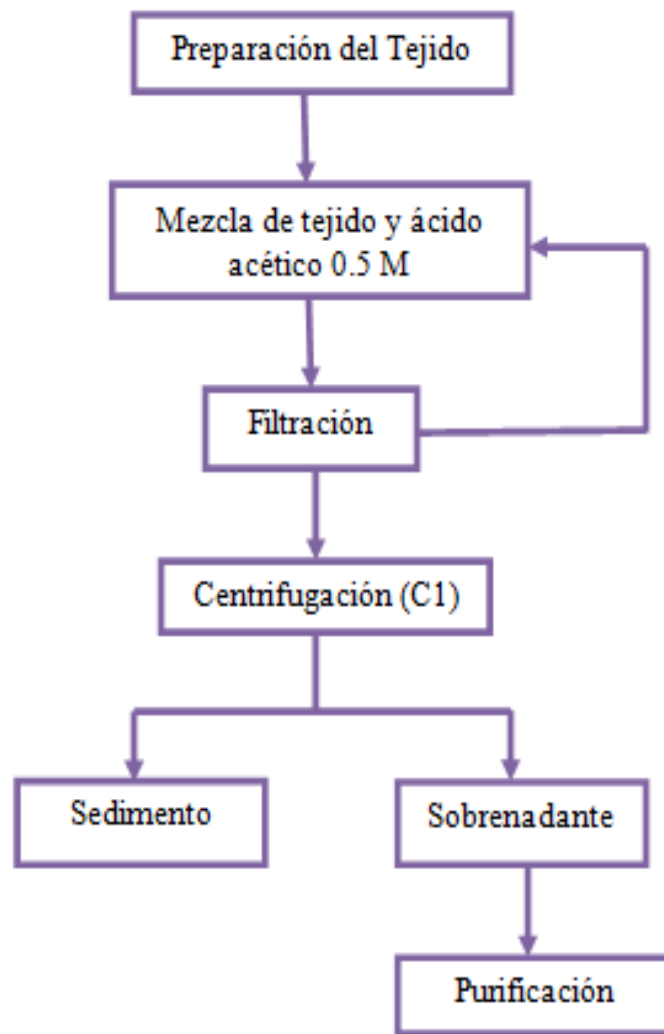


Figura 3. 1Extracción de colágena

Se dializó la disolución en membranas semipermeables para retirar las sales que pudieran haberse quedado durante la precipitación contra un amortiguador de acetatos de potasio con una concentración 4 mM durante 48 horas (3 cambios de amortiguador).

La disolución dializada se centrifugó a una velocidad de 19000 rpm durante 60 minutos a 4 °C (C1) desechando el sedimento y llevando el sobrenadante a una segunda precipitación con NaCl ahora al 20 % (20 g de cloruro de sodio por 100 mL de disolución). Así, el sobrenadante se sometió nuevamente a centrifugación bajo las condiciones (C2), se

resuspendió el precipitado en ácido acético y se dejó en agitación constante durante 24 horas. La disolución volvió a dializarse contra un regulador de fosfatos de potasio y a centrifugarse a condiciones (C1).

Se realizó la última diálisis contra un amortiguador de fosfatos de sodio 0.1 M durante 48 horas (3 cambios de amortiguador). La disolución dializada se centrifugó por última vez bajo las condiciones (C2). Finalmente se realizó una liofilización para proceder con la caracterización de la muestra (Figura 3.2).

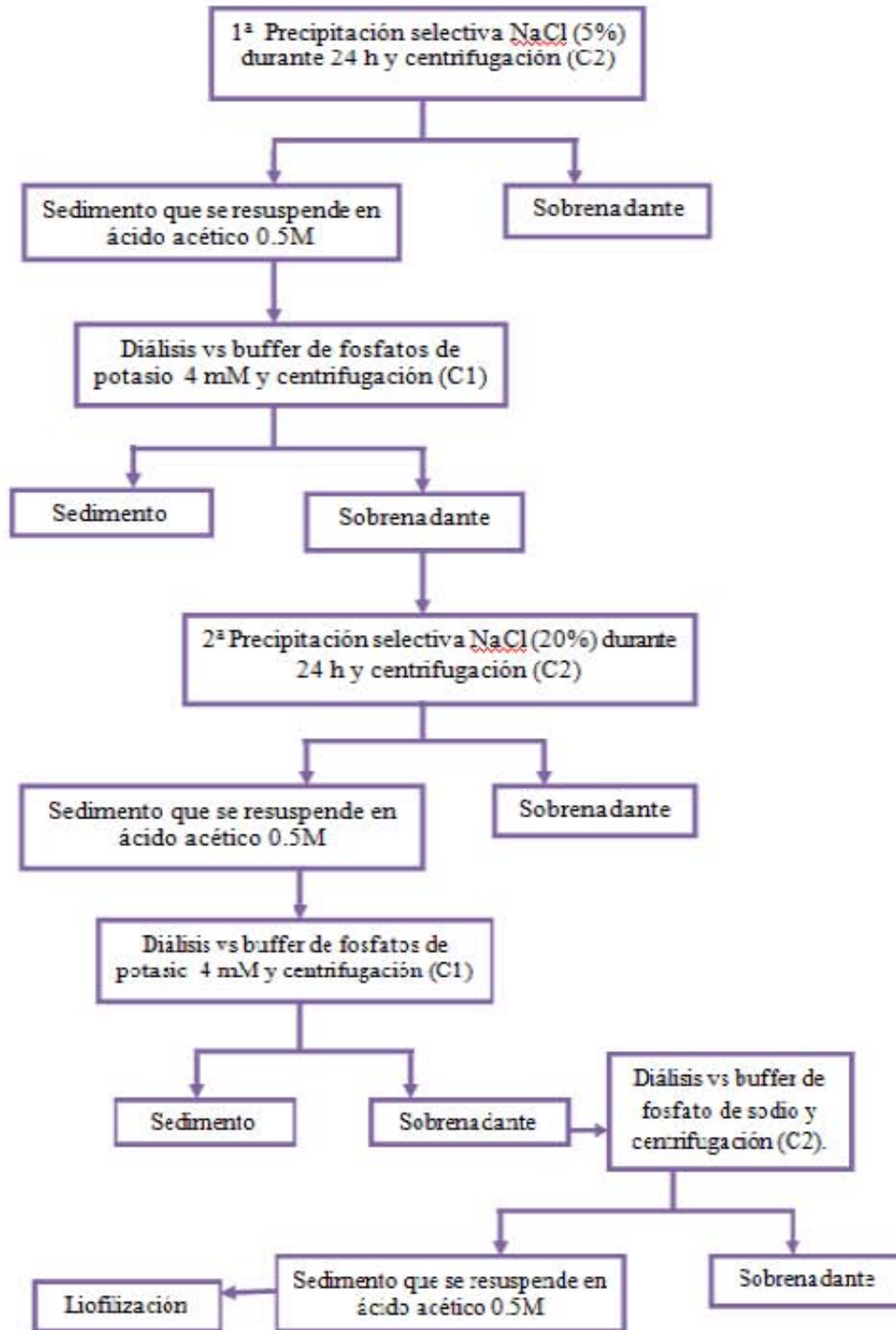


Figura 3. 2 Purificación de colágena

3.2 Cuantificación de colágena

El contenido de colágena se obtuvo determinando la cantidad de hidroxiprolina presente en las muestras. Esto en función de que éste aminoácido es característico de la molécula de colágena. Se utilizó en este trabajo el método reportado por J.F. Woessner. [38]

La colágena se encuentra en dos formas isoméricas, una de ellas es la hidroxiprolina. La *trans*-4-hidroxi-L-prolina constituye más del 95% de la hidroxiprolina total de las colágenas tipo I y tipo III. Una cantidad crítica de *trans*-4-hidroxi-L-prolina es un prerrequisito para el plegamiento de las cadenas α en las triple hélices, conformación necesaria para la secreción normal de las moléculas de procolágena hacia el exterior de la molécula [39].

La preparación de las muestras involucra una serie de pasos que se enlistan a continuación. En un principio se tomó 1 ml de la muestra y su respectivo duplicado, se hidrolizó con 1 mL de HCl buscando una concentración final de 6 M, en una mufla Thermolyne modelo 48000 a una temperatura de 110°C durante 18 h en ampollas previamente selladas.

Transcurrido ese tiempo las ampollas se abrieron y el contenido se vertió en tubos de 15 mL, para después ajustar el pH de la disolución a un valor de 6 o 7, utilizando soluciones de NaOH y HCl. Teniendo las muestras neutralizadas, se llevó a cabo la reacción de oxidación de la hidroxiprolina, utilizando las siguientes soluciones:

- *Buffer de acetatos pH 6.0:*
 - 50 g ácido cítrico ($C_6H_8O_7$)
 - 120 g acetato de sodio trihidratado ($CH_3COONa \cdot 3 H_2O$)
 - 34 g hidróxido de sodio (NaOH)
 - 15 mL ácido acético (CH_3COOH)

Aforar a 1 L con agua destilada, ajustando el pH a 6.

- *Disolución de Cloramina T:*
 - 0.141g cloramina T ($C_7H_7ClNO_2Na$)

- 3 mL de 2-metoxietanol (CH₃OCH₂CH₂OH)
 - 2 mL de agua destilada
 - 5 mL de buffer de acetatos
- *Ácido perclórico 2.5M*
HClO₄ al 70%, tomar 53.7 mL para 250 ml de solución.
 - *Disolución de p-dimetilaminobenzaldehído (pDAB) al 20%*
Tomar 2 g de pDAB y aforar a 10 mL con 2-metoxietanol.

Y mediante el siguiente procedimiento:

1. Se prepararon tubos de ensayo por duplicado con 0.2 mL de muestra y se llevó a un volumen de 2 mL con agua destilada.
2. Se agregó 1 mL de disolución de cloramina T y se agitó vigorosamente con ayuda de un vortex y se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
3. Se adicionó 1 mL de disolución de ácido perclórico 2.5 M y se agitó vigorosamente.
4. Se agregó 1 mL de pDAB y se agitó vigorosamente.
5. Después de esto se incubaron las muestras a 60 °C durante 20 minutos.
6. Por último se dejaron enfriar y se leyeron en un espectrofotómetro “*Thermo scientific Biomate 3*” a 557 nm.

Se construyó una curva patrón utilizando disoluciones de hidroxiprolina con concentraciones de 0 a 1 µg/mL, la cual se discute en el capítulo 4, página 51.

Para determinar la cantidad de colágena se hace uso de un factor de conversión para hacer la equivalencia a colágena con la siguiente fórmula [40].

$$\text{mg colágena} = \frac{\mu\text{g hidroxiprolina} * 7.42}{1000} \quad (5)$$

3.3 Caracterización

Una vez extraída y cuantificada la colágena obtenida, se procedió a hacer la caracterización. La metodología utilizada para cada una de las técnicas usadas se describe a continuación.

3.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Como se mencionó anteriormente, la electroforesis en gel de poliacrilamida se suele usar en la identificación y la caracterización de diferentes tipos de colágena. Ha demostrado ser una técnica útil en los estudios sobre las cadenas y los péptidos derivados de las cadenas de colágena y tiene las ventajas de ser relativamente rápida y de presentar la posibilidad de ser utilizada para analizar varias muestras al mismo tiempo.

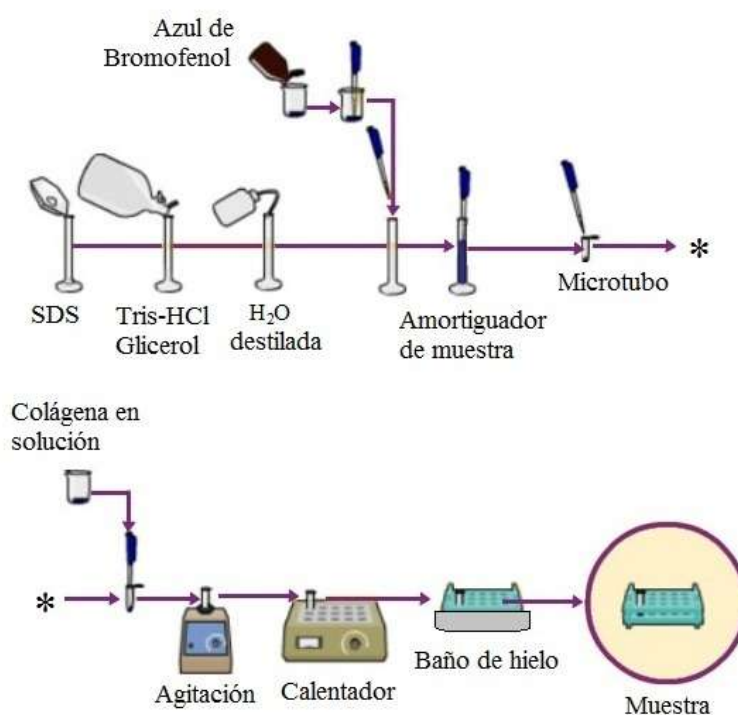


Figura 3. 3 Preparación de muestra

La electroforesis, se realizó basándose en el método de Laemmli [41]. Las muestras se mezclaron con un amortiguador de muestra (tabla 3.1) utilizando una relación de volumen/volumen de 1 a 1. Se procedió a desnaturalizar las proteínas. Para esto las muestras se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos e inmediatamente después se colocaron en hielo. El procedimiento se ilustra en la Figura 3.3.

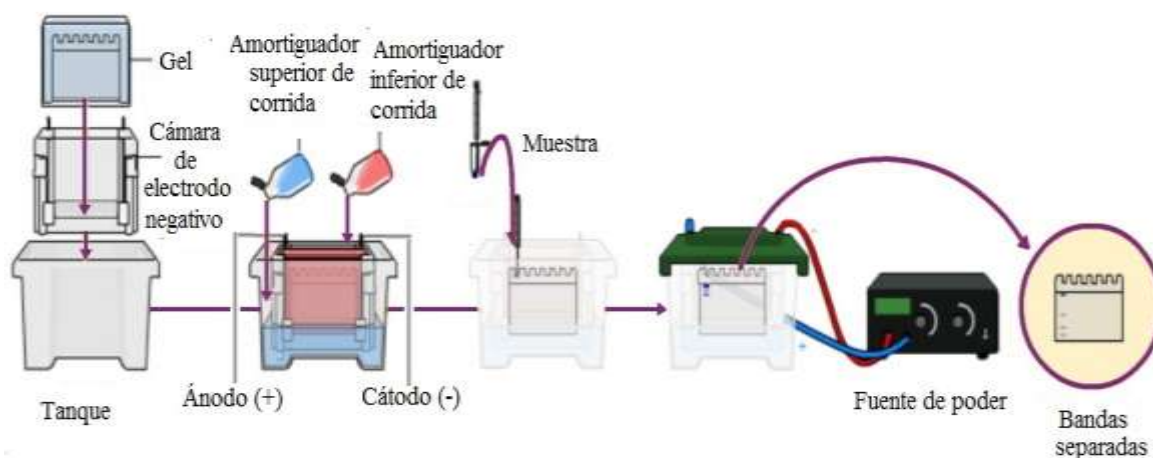


Figura 3. 4 Carga y corrida de muestras

Se empleó un sistema discontinuo de gel de poliacrilamida con una concentración de 8 % para el gel separador y 5 % para el gel concentrador, y se realizó la corrida a 20 mA/gel durante aproximadamente 1 hora con 30 minutos (Figura 3.4).

Al término de ésta, se retiró el gel de la cámara (Mighty Small II SE 250 de Hoefer scientific instruments), se tiñó en una disolución de azul de Coomassie R-250, ácido acético e isopropanol durante 12 h, para finalmente desteñir con una disolución de metanol 40 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v) y agua doble destilada 50 % (v/v). Dentro de la corrida también se anexó un marcador de masa molecular.

En la siguiente tabla se muestran los componentes de los geles y los amortiguadores usados en esta técnica de caracterización.

Tabla 3. 1 Disoluciones utilizadas en electroforesis

Disolución	Componentes
Gel Separador 8 %	H ₂ O Acrilamida Amortiguador inferior Persulfato de amonio TEMED
Gel concentrador 5 %	H ₂ O Acrilamida Amortiguador superior Persulfato de amonio TEMED
Amortiguador inferior	TRIS 1.5 M (pH 8.8) SDS 10 %
Amortiguador superior	TRIS 0.5 M (pH 6.8) SDS 10 %
Amortiguador inferior de corrida	TRIS Glicina
Amortiguador superior de corrida	TRIS Glicina SDS 10 %
Amortiguador muestra	Amortiguador inferior Glicerol SDS 10 % Azul de bromofenol 0.2 %

3.3.2 Análisis Térmico

Para llevar a cabo los análisis térmicos (Termogravimetría y Calorimetría Diferencial de Barrido) se tomaron 5 mL de las disoluciones obtenidas, RT, BT y BS; se liofilizaron en un equipo “LABCONCO FreeZone 1” durante 24 horas con el fin de eliminar el líquido contenido en las muestras sin alterar la estructura de las mismas, posteriormente se pesaron.

El equipo utilizado para el análisis termogravimétrico fue un “Hi-Res TGA 2950 Thermogravimetric Analyzer”, mientras que la calorimetría diferencial de barrido se llevó a cabo en un “Differential Scanning Calorimeter 2910 Modulated TA Instruments”

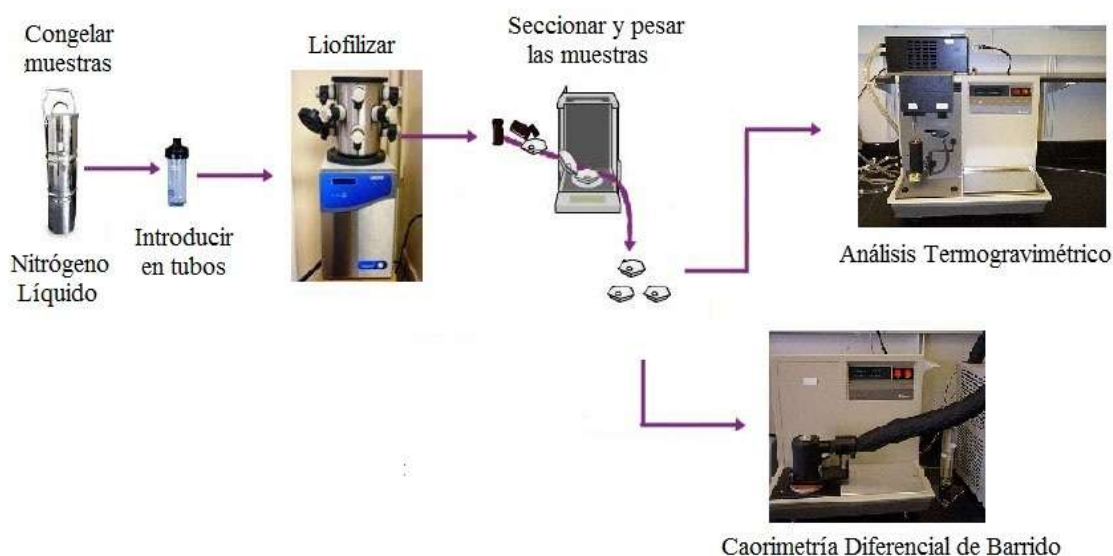


Figura 3. 5 Proceso para el análisis térmico de las muestras

El intervalo de temperatura empleado para ambas pruebas fue de temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) a 500 °C en una atmósfera de Nitrógeno a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min. En la figura 3.5 se observa un diagrama del procedimiento llevado a cabo para esta técnica.

3.3.3 Microscopía Electrónica de Barrido

Para llevar a cabo esta caracterización fue necesario, al igual que en las pruebas térmicas, liofilizar las muestras para observarlas.

Debido a que las muestras son biológicas, es decir no conductoras, se recubrieron con una capa fina de oro mediante electrodeposición o deposición asistida por plasma.

También se dejaron muestras sin recubrimiento para observarlas en el microscopio y poder hacer una comparación de imágenes con y sin capa de oro.

El equipo empleado fue un “*JEOL JSM-7600F Field Emission Scanning Electron Microscope*” (Figura 3.6).

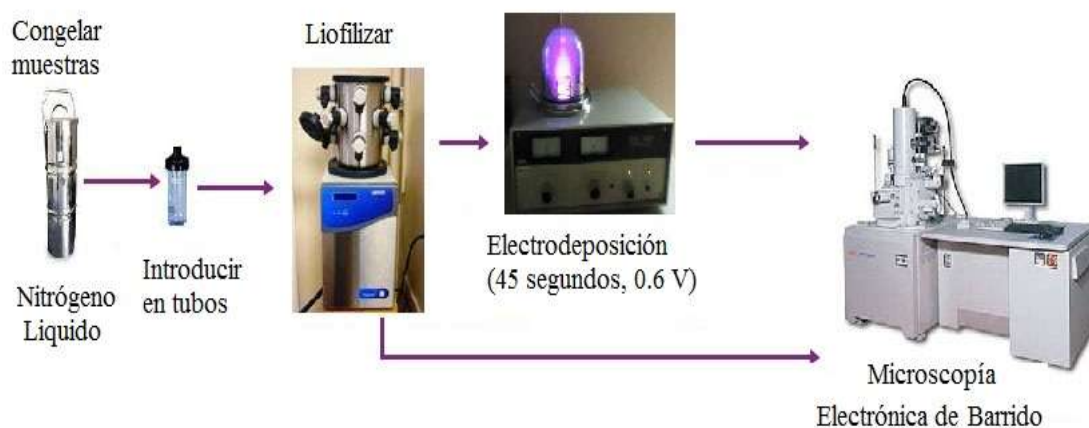


Figura 3. 6 Proceso para la microscopía electrónica de barrido de las muestras

3.3.4 Espectroscopía Infrarroja

Las muestras se liofilizaron durante 24 horas, ya que se hicieron espectros de éstas en disolución y no se lograron apreciar las bandas características de la colágena, debido a la presencia del agua.

Los espectros se obtuvieron con la ayuda del equipo " *Scientific Nicolet 6700 FT-IR*".

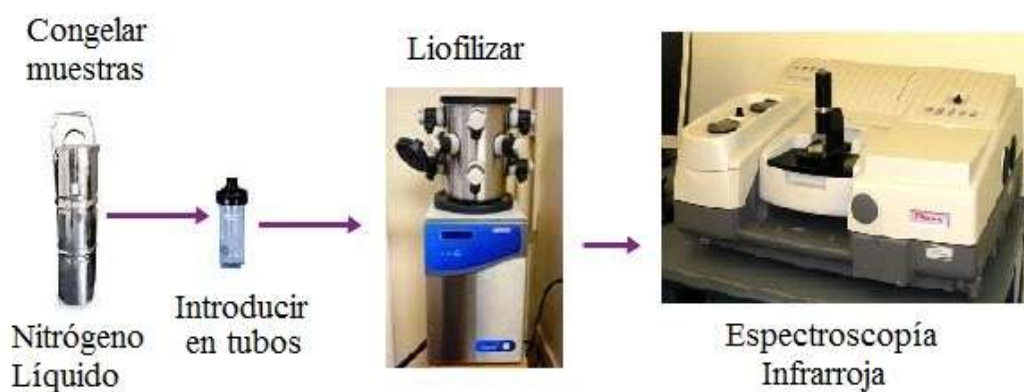


Figura 3. 7 Proceso para la espectroscopía infrarroja de las muestras

CAPÍTULO 4

Resultados y Discusión

4.1 Determinación del contenido de colágena

La cantidad de hidroxiprolinase determinó en cada muestra mediante el método de J.S. Woessner, haciendo dos alícuotas de cada muestra y obteniendo el promedio entre éstas para después utilizar el factor de conversión (5) mencionado en la sección 3.2 (página 44) para obtener los mg de colágena.

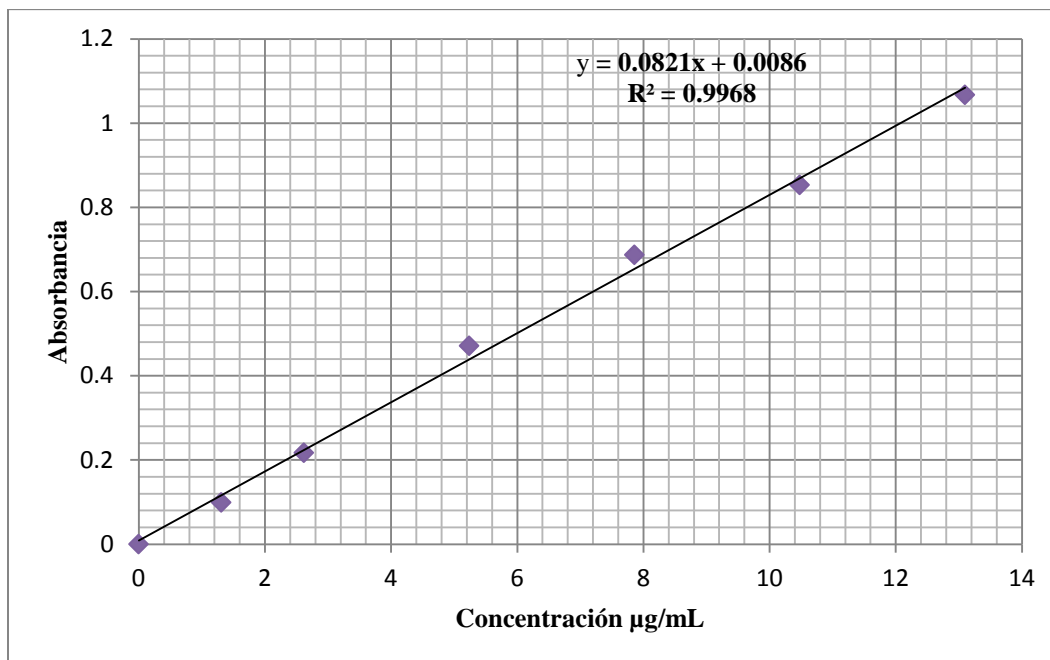


Figura 4. 1 Curva estándar de concentración de hidroxiprolina

La Figura 4.1 muestra la curva de calibración para poder obtener las concentraciones de las muestras.

Se llevó a cabo el procedimiento descrito en la parte experimental con cada una de las muestras y leyéndose la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 557 nm. En la siguiente tabla se muestran los datos obtenidos.

Tabla 4. 1 Concentración de colágena

Muestra	µg Hidroxiprolina/mL	mg colágena/MI
RT	1272.24	9.4
BT	353.01	2.6
BS	285.12	2.1

Al comparar los datos de la tabla anterior, resulta evidente que la muestra RT presenta la mayor concentración de colágena. Esto se debe a la facilidad de extraer la proteína de la cola de rata debido a que, en comparación con la cola de res, ésta se encuentra sujeta a un intenso estrés biomecánico.

A pesar de la gran cantidad de colágena presente en la piel, el resultado obtenido para BS es muy bajo, esto puede deberse a distintos factores, por ejemplo la edad del animal. El tejido es de un animal considerado joven (2 años) pero aún así, la extracción fue difícil de llevar a cabo por la dureza de la piel.

4.2 Caracterización de las muestras por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)

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 β y trímeros γ , como se aprecia en el siguiente esquema [11].

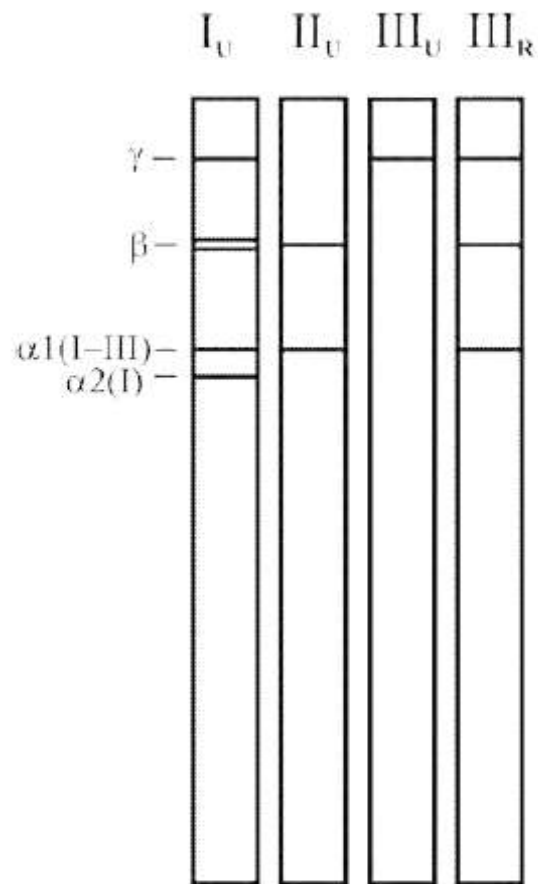


Figura 4. 2 Patrón electroforético correspondiente a la colágena. I_U colágena tipo I sin reducir; II_U colágena tipo II sin reducir; III_U colágena tipo III sin reducir-, III_R colágena tipo III reducida [11].

Una vez completada la corrida de electroforesis y realizado el tñido y posterior desteñido del gel, se obtuvo el patrón electroforético correspondiente (Figura 4.3).

Al hacer una comparación de la Figura 4.3 con la Figura 4.2, se observa que el patrón electroforético obtenido experimentalmente es un patrón típico de colágena tipo I, ya que es posible observar las bandas α_1 , α_2 y la cadena β con un poco de dificultad. Probablemente usando un amperaje menor para la corrida electroforética, pueda observarse mejor la banda β y la banda γ . El amperaje utilizado para este patrón fue de 20 mA. A continuación se da una explicación más a detalle de cada carril del patrón electroforético.

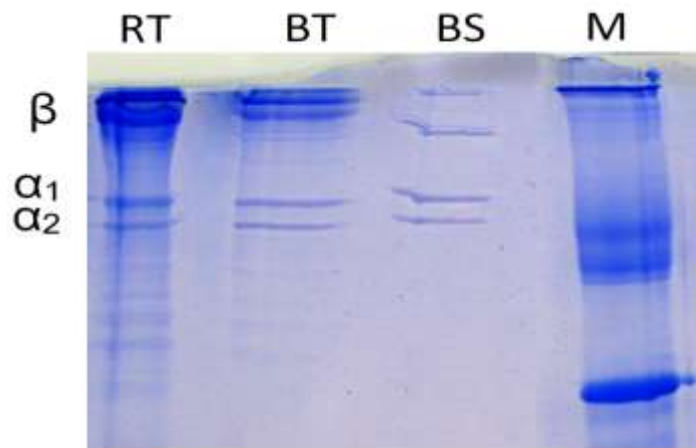


Figura 4. 3 Patrón electroforético de colágena tipo I obtenida a partir de diferentes tejidos biológicos.

4.2.1 Descripción del patrón electroforético

- Colágena extraída de tendón de cola de rata (Carril RT): La muestra posee una alta concentración de colágena (como se observó antes en la cuantificación) que se comprueba tanto por el grosor y en la intensidad de las bandas como por el un barrido en el dímero β . También se observa la presencia de bandas debajo de las cadenas α , lo cual indica la degradación de la colágena.

- Colágena obtenida del tendón la cola de bovino (Carril BT): La muestra posee una cantidad de colágena mucho menor que la muestra RT, aunque las bandas se observan perfectamente. En este carril no hay degradación de la proteína, esto radica en la cantidad cargada en los pozos de gel.

- Colágena extraída de piel de bovino (Carril BS): Al igual que las muestras anteriores, se observan las bandas características de la colágena. Debido a que la concentración de colágena en esta muestra es menor que en las otras, las bandas son un poco más claras y más fáciles de observar.

-Carril (M): Este carril corresponde a un marcador de masas moleculares.

Al comparar el patrón electroforético con los obtenidos en otros trabajos [42] en notoria la pureza de la proteína extraída en este trabajo, dado que presenta las bandas características de la colágena tipo I y, además, se observa claramente que, después de la aparición de dichas bandas, en los carriles no se observa ninguna otra banda, lo cual significa la presencia única de colágena en las muestras.

4.3 Análisis térmico

4.3.1 Análisis Termogravimétrico

La figura 4.4 muestra el termograma obtenido con la muestra RT con una masa inicial de 2.21mg, así como la primera derivada de la curva de TGA (curva azul), curva DTA.

De la curva de TGA (curva morada) se determinó el decremento de la masa durante el proceso de calentamiento.

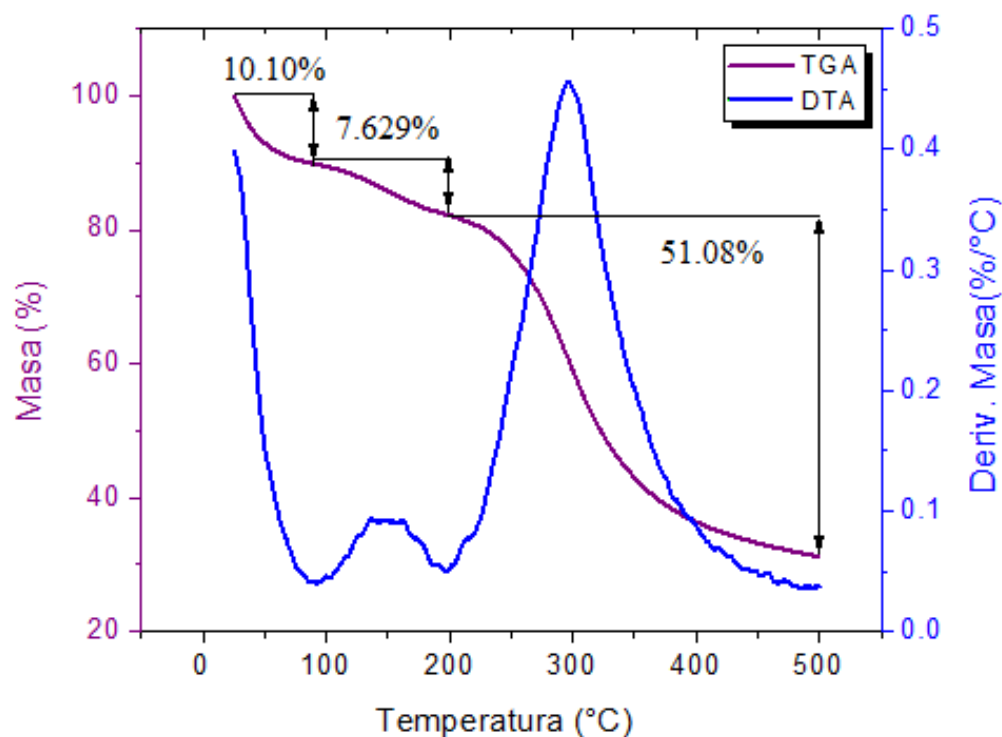


Figura 4. 4 Perfil de análisis termogravimétrico de la colágena extraída de tendón de cola de rata (muestra RT) a una velocidad de 5 °C/min.

Hasta ~90 °C se observa una pérdida de masa del 10.10 %. Desde 90 °C hasta ~200 °C se observa una pérdida de masa del 7.6 %. En el intervalo de 200-500 °C existe una pérdida del 51.08 %.

Para la muestra BT se obtuvo el siguiente termograma, mostrando una pérdida de masa del 7.52 % al llegar a una temperatura de 78.67 °C, una del 9.176 % hasta ~190 °C y desde esta temperatura hasta 500 °C una pérdida del 54.18 %.

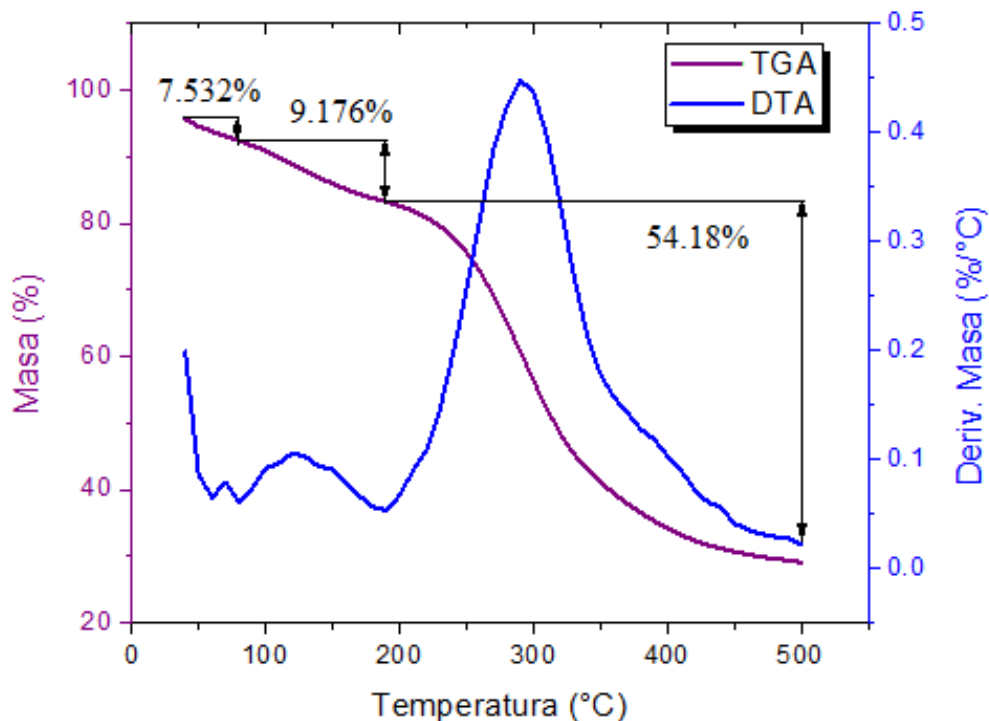


Figura 4. 5 Perfil de análisis termogravimétrico de la colágena extraída de tendón bovino (muestra BT) a una velocidad de 5 °C/min.

La curva obtenida con la muestra BS se presenta en la Figura 4.6, observando un comportamiento similar al de las dos muestras anteriores. Con un 7.48 % de pérdida de masa a una temperatura de 81.36 °C, una pérdida del 8.21 % hasta 194.38 °C y mostrando una 60.49 % de pérdida de masa hasta 500 °C.

Al comparar las curvas termogravimétricas (Figura 4.7) se observa un comportamiento muy parecido en todas ellas, lo que implica que la estabilidad térmica de la proteína después del proceso para obtenerla no se vio afectada.

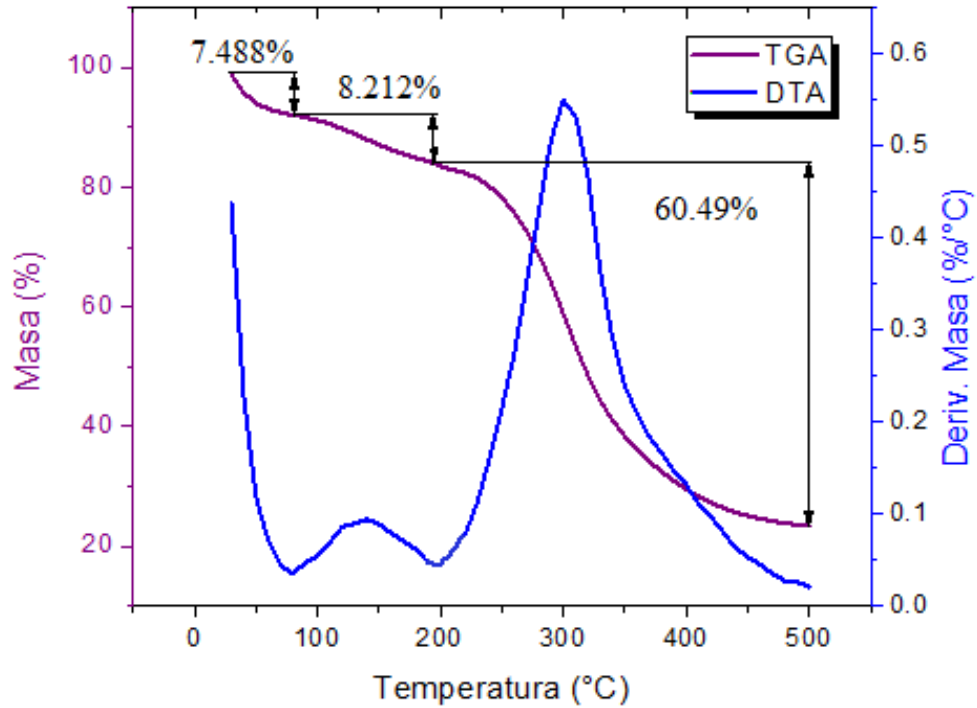


Figura 4. 6 Perfil de análisis termogravimétrico de la colágena extraída de piel de bovino (muestra BS) a una velocidad de 5 °C/min.

Se observan en las curvas tres cambios importantes. El primero se da en los tres casos, antes de 100°C (de 78 a 90°C), el cual corresponde al agua superficial de la molécula de colágena. En el segundo cambio (hasta ~200°C) se empieza a perder el agua estructural de la molécula [43,44]. La última pérdida abarca de ~200°C a 500 °C y corresponde a la descomposición de las cadenas de colágena [45], es decir, ocurre la degradación de la matriz orgánica [46].

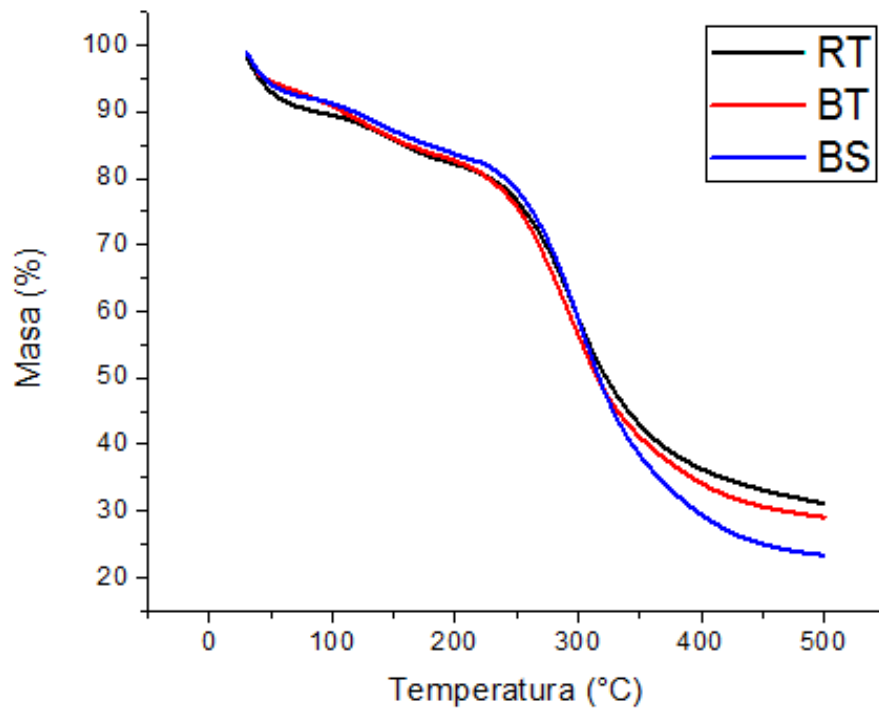


Figura 4.7 Comparación de los termogramas de muestras RT, BT y BS a una velocidad de 5 °C/min.

4.3.2 Calorimetría Diferencial de Barrido

A continuación se muestran las curvas obtenidas con la técnica de calorimetría diferencial de barrido. En cada una se indica la temperatura de desnaturalización y la temperatura a la cual empieza la degradación de la molécula.

Para la muestra RT se obtuvo una temperatura de desnaturalización de 74.57 °C y se observa un cambio exotérmico que empieza a ~220 °C.

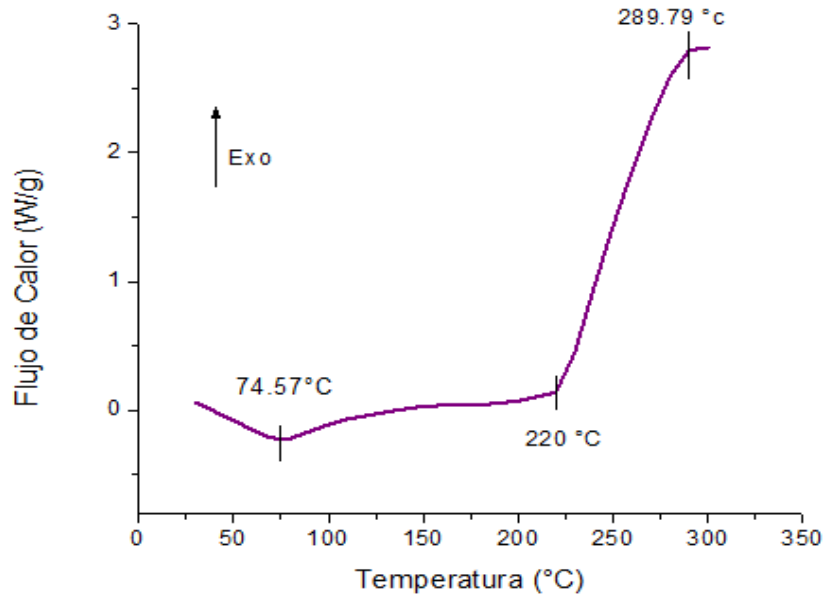


Figura 4. 8 Perfil de calorimetría diferencial de barrido de la muestra RT a una velocidad de 5 °C/min.

En la curva correspondiente a la muestra BT se observa un pico endotérmico que indica una temperatura de desnaturalización de 70.05 °C. Los cambios exotérmicos se presentan a una temperatura de ~220 °C.

De igual forma, en la figura 4.10 se observa la curva resultante del análisis por calorimetría diferencial de barrido para la muestra de colágena obtenida a partir de piel de bovino, BT, dónde se observa un temperatura de desnaturalización a 84.54 °C. El pico exotérmico comienza, al igual que en las curvas correspondientes a las muestras anteriores, en ~220 °C.

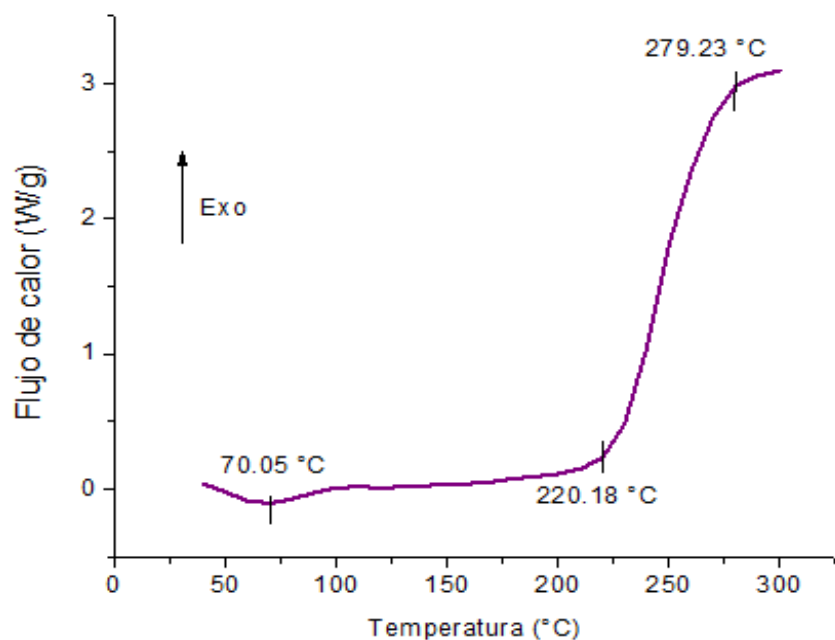


Figura 4. 9 Perfil de calorimetría diferencial de barrido de la muestra BT a una velocidad de 5 °C/min.

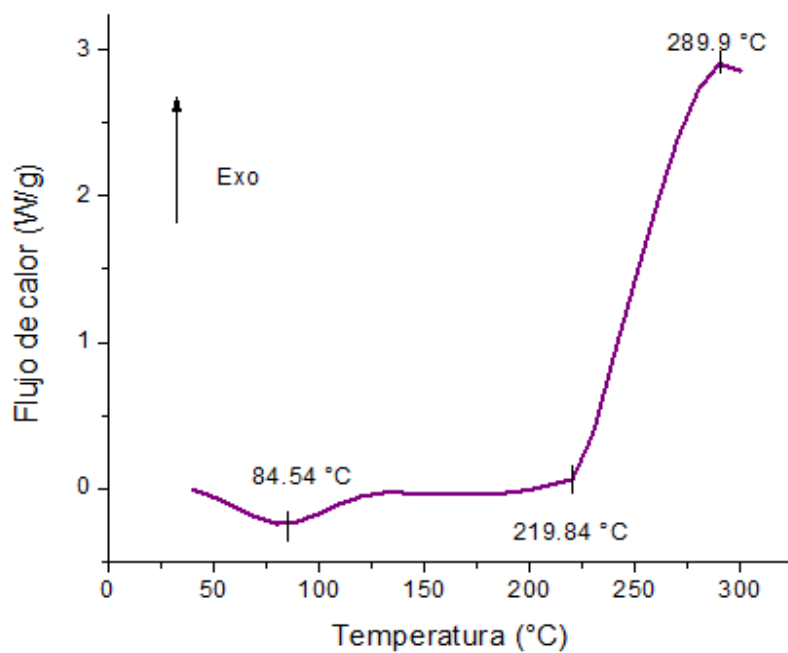


Figura 4. 10 Perfil de calorimetría diferencial de barrido de la muestra BS a una velocidad de 5 °C/min.

En general, en las curvas obtenidas con la técnica de DSC, podemos encontrar un primer pico, con carácter endotérmico, antes de los 100 °C para las tres muestras el cual corresponde a la temperatura de desnaturalización. Existen resultados en los que se reportan temperaturas de desnaturalización entre 104 y 112 °C para colágenas [43,47]. La temperatura de desnaturalización está relacionada con la transición de la estructura de triple hélice de la colágena a una estructura de espiral al azar [46,47] (modificación de la estructura terciaria, la cual va estrechamente de la mano con la funcionalidad de la proteína), es decir, si se pierde esta estructura la función de la proteína se pierde; este cambio puede verse también en el análisis termogravimétrico (Figuras 4.4, 4.5 y 4.6), ya que el primer cambio importante, tiene lugar antes de 100 °C.

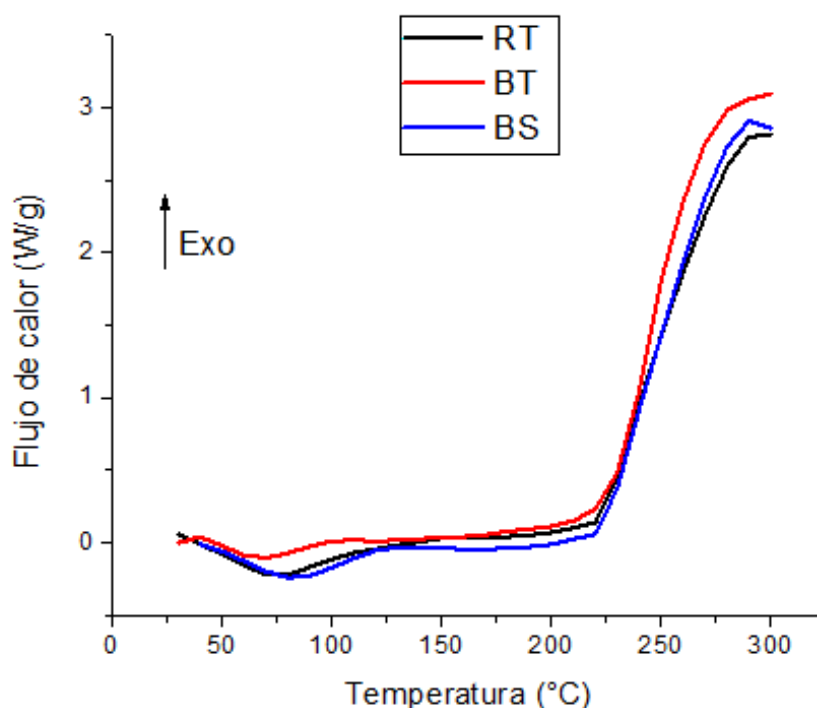


Figura 4. 11 Perfil de calorimetría diferencial de barrido para las muestras RT, BT y BS a una velocidad de 5 °C/min.

Se puede afirmar que después de la temperatura de desnaturalización la reacción es irreversible, esta aseveración tiene bases en trabajos anteriores [31], en los cuales se reportan curvas de DSC, en las que, una vez calentada la muestra se enfría la muestra a la misma velocidad de calentamiento, posterior a esto se realiza un segundo calentamiento. Al observar las curvas resultantes, es claro que la segunda curva de calentamiento es diferente a la primero, esto debido a que el procesos no es reversible para la colágena tipo I. Esto se debe a que, como se mencionó anteriormente la temperatura de desnaturalización está ampliamente relacionada con la pérdida de la estructura terciaria de la proteína.

El segundo pico observado en los termogramas es un pico exotérmico, que tiene que ver con la degradación de la proteína, esto es un resultado consistente, ya que éste mismo comportamiento se ve reflejado en las curvas termogravimétricas de las muestras, puesto que las temperaturas en las que las curvas del DSC presentan cambios coinciden con las temperaturas de TGA (~200 a 350 °C).

4.4 Microscopía Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barrido se realizó con el fin de observar las estructuras de las muestras. Como se mencionó anteriormente (Sección 3.3.3), esta técnica se aplicó a muestras con y sin recubrimiento de oro.

Se presentarán primero las imágenes que se lograron con las muestras sin recubrimiento de oro, seguidas de las imágenes de las muestras recubiertas, para posteriormente, hacer una comparación entre ellas.

Sin recubrimiento

Las primeras micrografías (Figuras 4.12 y 4.13) corresponden a la colágena obtenida a partir de tendón de rata, RT. Se tomó de una misma muestra pero una de ellas exhibe el lado anterior (figura 4.12) y la otra presenta el lado posterior (figura 4.13). En la figura 4.12 pueden observarse fibras de diferentes diámetros entrelazadas; que se presentan de manera apelmazada.

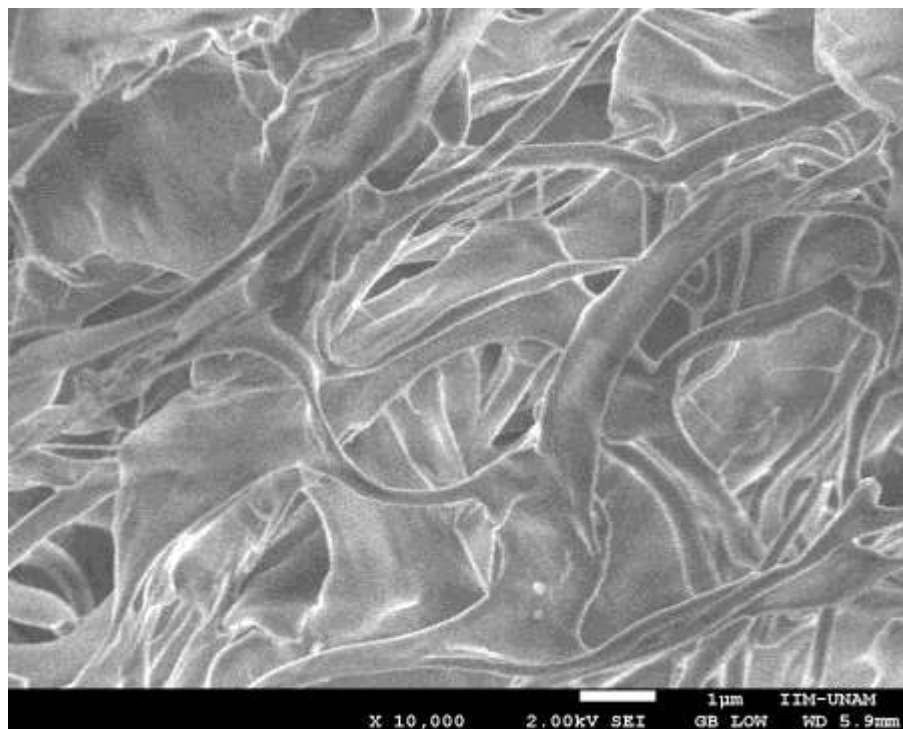


Figura 4. 12 Micrografía SEM de la muestra RT. Aumento X 10,000

A pesar de presentar una conformación aglomerada, puede observarse también la presencia de poros dentro de la muestra. En la imagen anterior, esto no puede visualizarse tan fácilmente, por ello a continuación se presenta la imagen 4.13, la cual a un aumento de x 5000 deja ver claramente cierta cantidad de poros de la muestra.

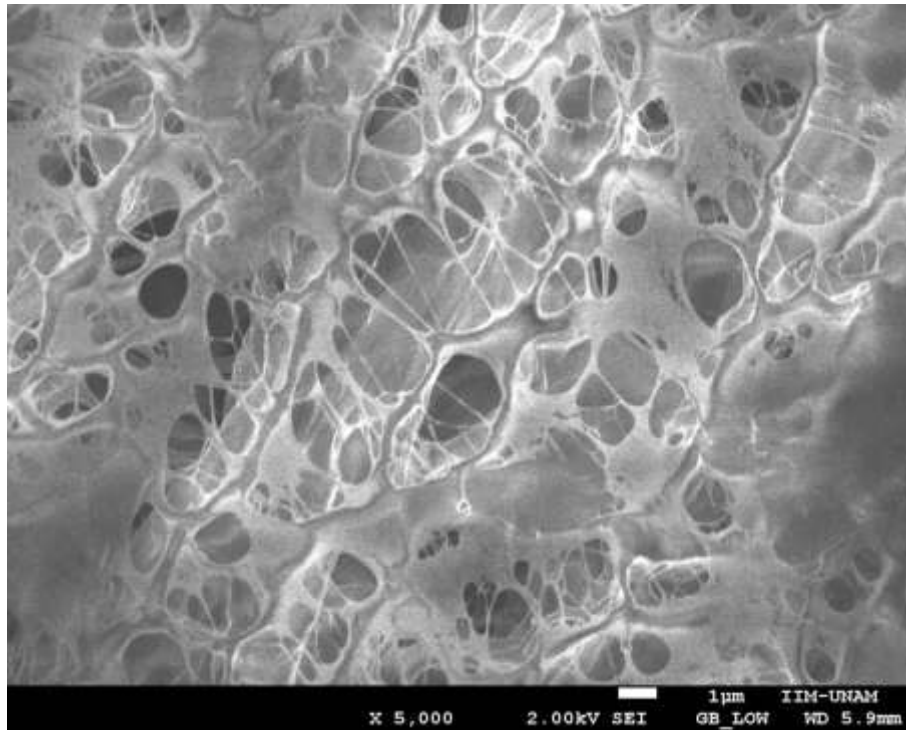


Figura 4. 13 Micrografía SEM de la muestra RT. Aumento X 5,000

Esta imagen deja en claro una de las utilidades más importantes del uso de la colágena en biomateriales, ya que es posible formar membranas porosas que pueden usarse como injertos de piel.

Con ayuda del programa AxioVision y las imágenes obtenidas en SEM, se obtuvieron los valores aproximados de los diámetros de las fibras y de los poros observados. Los diámetros de las fibras van desde 0.10 μm hasta 0.41 μm , mientras que los diámetros de poro van desde 0.28 μm a 2.30 μm ; la medición de los poros se hizo tomando la longitud mayor medida horizontalmente.

Las imágenes obtenidas para la colágena obtenida de tendón bovino, BT, se muestran en las Figuras 4.14 y 4.15. La primera imagen revela una morfología fibrosa, rugosa y compacta.

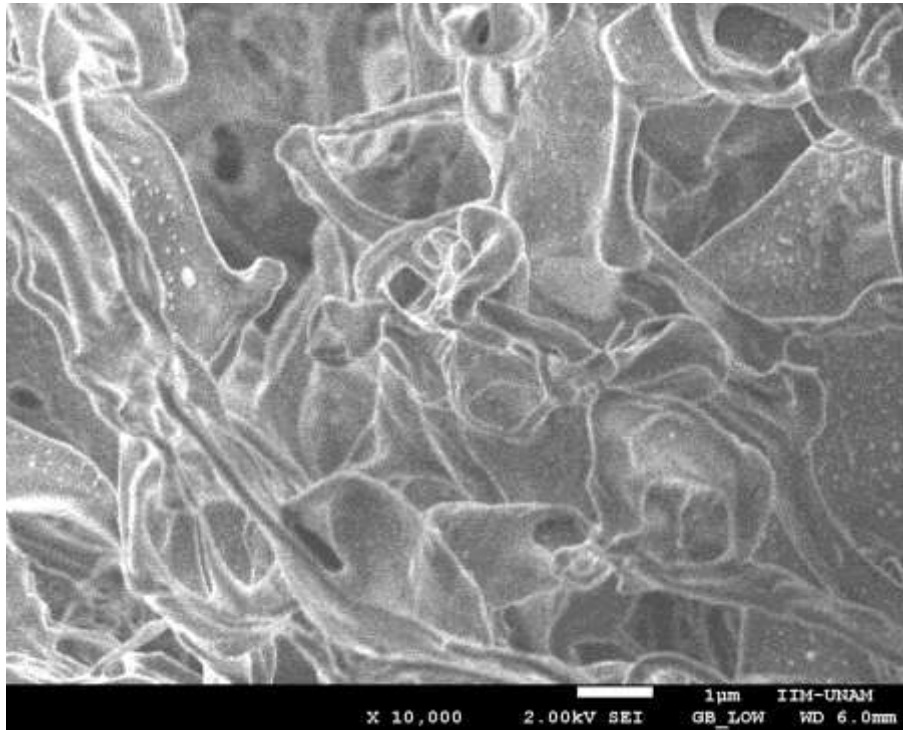


Figura 4. 14 Micrografía SEM de la muestra BT. Aumento X 10,000

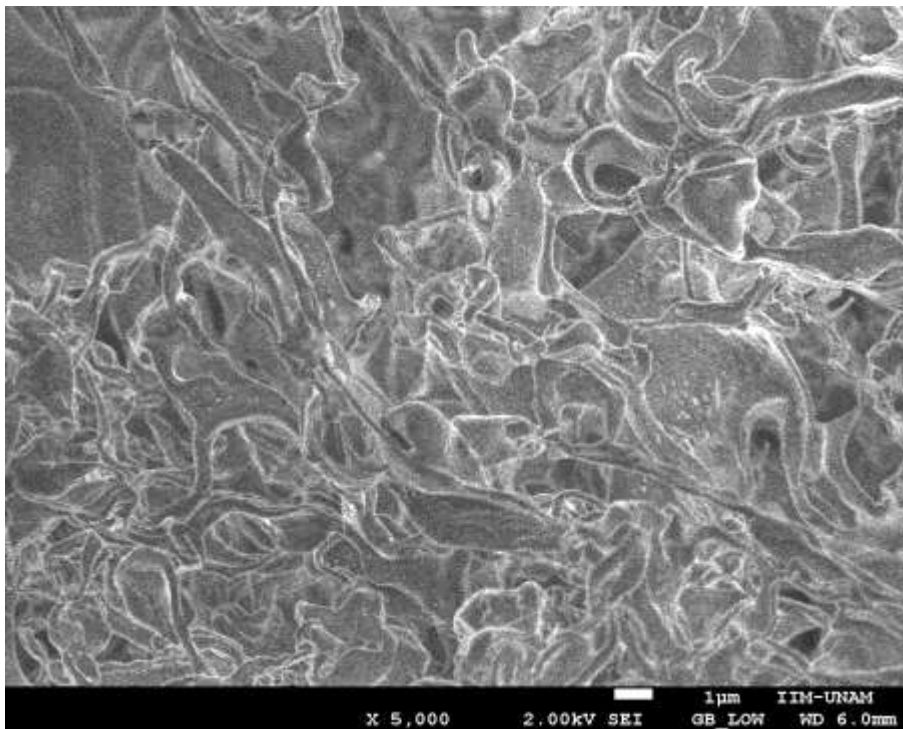


Figura 4. 15 Micrografía SEM de la muestra BT. Aumento X 5,000

Esto sugiere una mayor cohesión de las moléculas de colágena y por lo tanto un mayor entrecruzamiento [28].

La figura 4.15 muestra la misma zona pero con un aumento menor; en esta imagen se puede constatar la homogeneidad de la muestra. Los diámetros aproximados de las fibras para BT van de $0.8 \mu\text{m}$ a $0.64 \mu\text{m}$.

La colágena obtenida a partir de piel de bovino, BS, muestra una morfología fibrosa aunque no es muy parecida a las observadas en RT y BT. Las Figuras 4.16 y 4.17 muestran distintos aumentos de una misma zona en la muestra BS, en ambas imágenes es posible observar fibras de colágena, aunque en menor cantidad respecto a RT y BT.

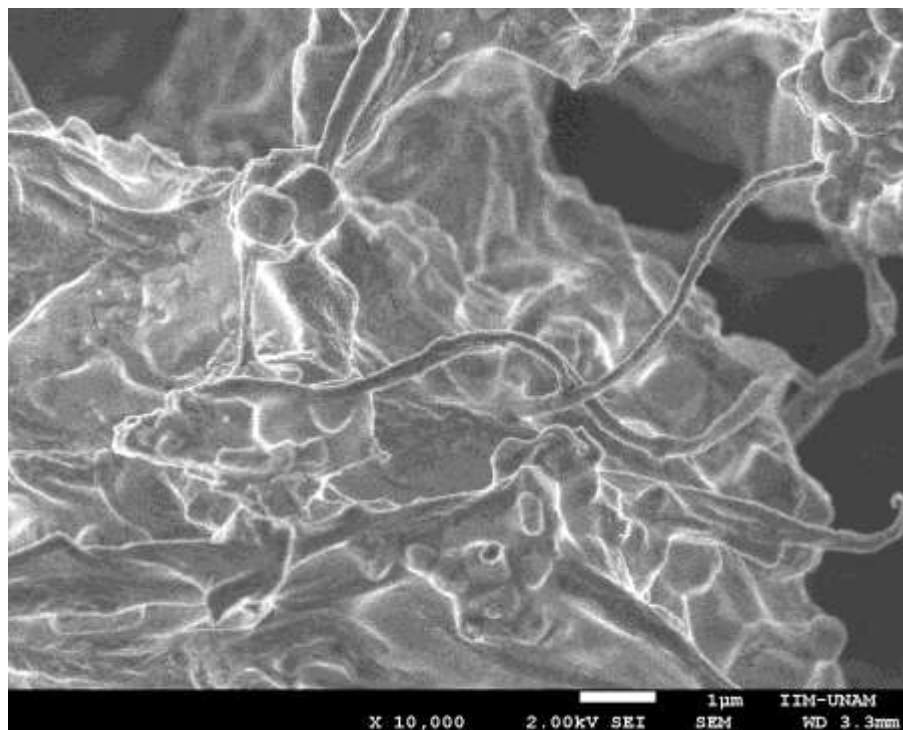


Figura 4. 16 Micrografía SEM de la muestra BS. Aumento X 10,000

Para BS también se obtuvieron los valores aproximados de los diámetros de las pocas fibras observadas, obteniendo así un intervalo de 0.06 a $0.53 \mu\text{m}$.

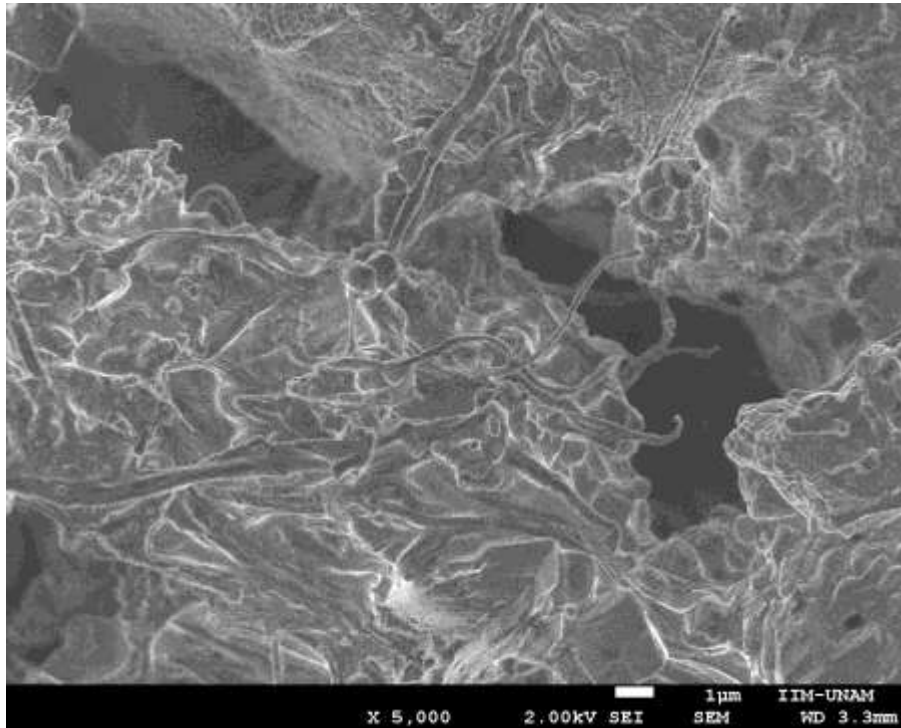


Figura 4. 17 Micrografía SEM de la muestra BS. Aumento X 5,000

Con recubrimiento

Las siguientes imágenes exponen las microscopías obtenidas de las muestras RT, BT y BS sometidas previamente a la técnica de electrodeposición.

La Figura 4.18 muestra, al igual que la Figura 4.13, la morfología porosa de RT; también se observa que debido a la manipulación de la muestra existen algunas zonas maltratadas, es decir, que los poros no están definidos.

La Figura 4.19 corresponde a la microscopía de la muestra BT. Se presenta también una morfología rugosa y aglomerada, sin embargo, al moverse en la muestra se encuentra una zona parecida a la observada para la muestra RT, es decir, con poros, aunque en mucho menor cantidad. Aún así, con ayuda del programa AxioVision se obtuvieron los valores aproximados del diámetro de poro, que se encuentran en el intervalo de 0.62 a 2.60 μm . Esto sugiere, una vez más, que dependiendo de la concentración de las muestras podemos encontrar distintas aplicaciones.

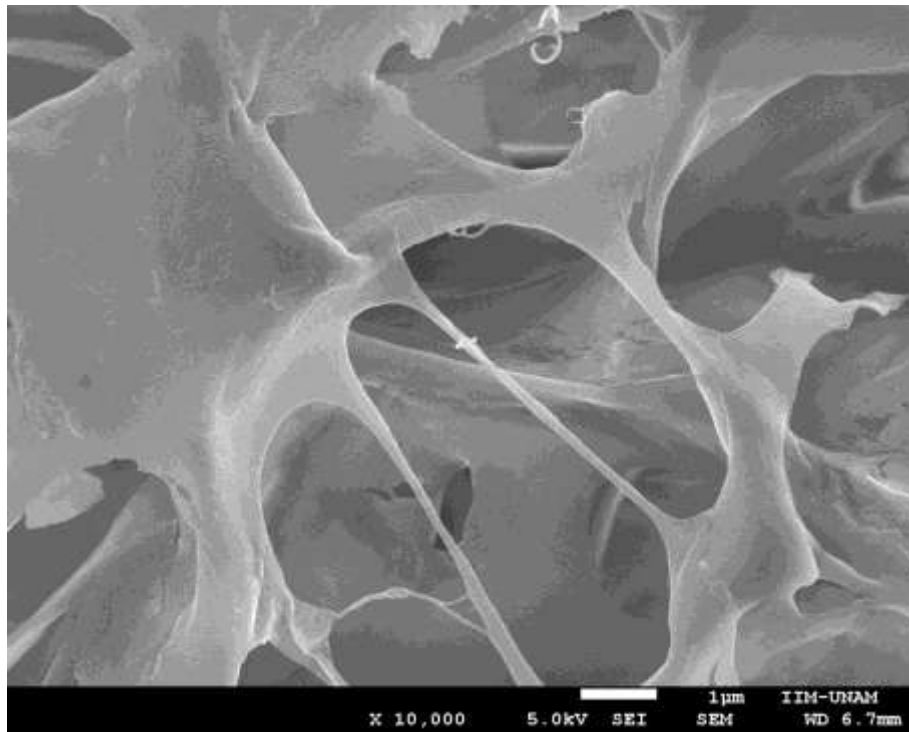


Figura 4. 18 Micrografía SEM de la muestra RT recubierta con Au. Aumento X 10,000

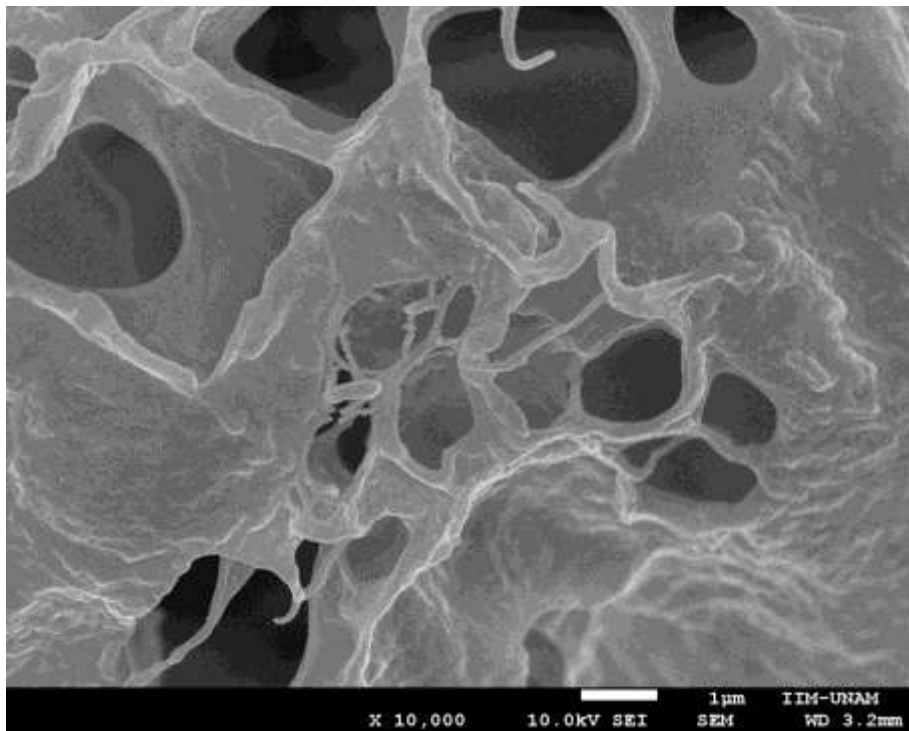


Figura 4. 19 Micrografía SEM de la muestra BT recubierta con Au. Aumento X 10,000

La siguiente imagen (Figura 4.20) corresponde a BS; presenta una estructura aglomerada, del mismo modo que en las imágenes sin recubrimiento de oro (Figuras 4.16 y 4.17) se observan muy pocas fibras. Para esta muestra no fue posible encontrar zonas porosas.

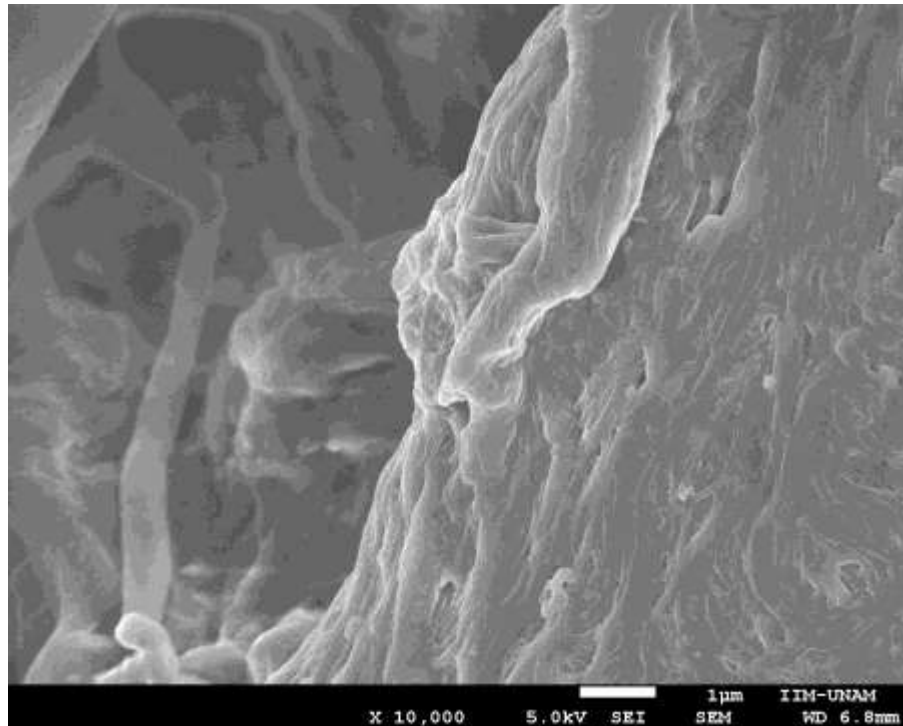


Figura 4. 20 Micrografía SEM de la muestra BS recubierta con Au. Aumento X 10,000

Comparando las imágenes obtenidas entre las muestras con y sin recubrimiento de oro por electrodeposición, se observa una mayor nitidez en las imágenes con recubrimiento, esto se debe a que aún con el avanzado y buen funcionamiento del microscopio, las muestras biológicas al no ser conductoras, no proveen una buena resolución de imagen por sí solas. También debe tenerse en cuenta que la técnica de electrodeposición debe llevarse a cabo por poco tiempo (para este trabajo el proceso de recubrimiento duró 45 segundos). Mantener las muestras bajo el oro por un tiempo prolongado, podría causar repercusiones en las imágenes, puesto que a grandes aumentos lo que se observaría serían las nanopartículas de oro.

A continuación se presenta una tabla comparativa con los valores aproximados de los diámetros de poro y de las fibras para cada una de las muestras. Como puede observarse, las muestras presentan una morfología muy similar.

Tabla 4. 2 Diámetros de fibra y de poro de las muestras RT, BT y BS

Muestra	Intervalo de diámetro de fibra (μm)	Intervalo de diámetro de poro (μm)
RT	0.1-0.41	0.28-2.30
BT	0.08-0.64	0.62-2.60
BS	0.06-0.53	Sin poros

4.5 Espectroscopia Infrarroja

La técnica de IR nos permite identificar las bandas de vibración características de un material. Los espectros IR de las proteínas muestran las vibraciones que se producen en los enlaces peptídicos, en particular el grupo amida, cuando la proteína es sometida a la radiación.

En los espectros obtenidos de las muestras (Figuras 4.13 a 4.16) se lograron identificar las bandas Amida A, Amida B, Amida I, Amida II y Amida III; lo cual deja ver que la técnica IR es adecuada debido a que permite identificar con claridad las bandas de las diferentes amidas.

La banda Amida A se encuentra, por lo general, alrededor de 3300 cm^{-1} ; se origina por resonancia de Fermi entre el primer armónico de la banda Amida II y la vibración de tensión del enlace NH.

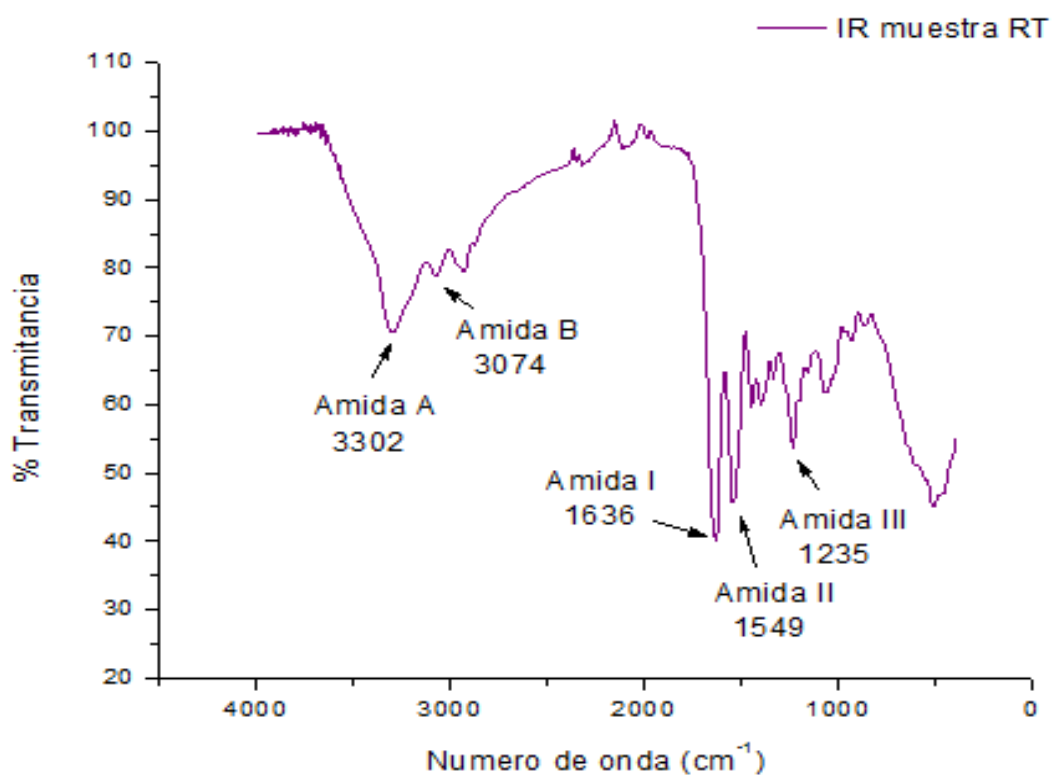


Figura 4. 21 Espectro infrarrojo de la muestra RT

Este modo de vibración no es dependiente de la conformación del esqueleto polipeptídico pero es muy sensible a la fuerza de enlace del hidrógeno; así que si la banda Amida A cae en frecuencias de 3225 y 3280 cm^{-1} para longitudes de puente de Hidrógeno entre 2.69 y 2.85 Å [50]. Debido a lo anterior y a los datos obtenidos en los espectros de las muestras, se puede aseverar que la distancia entre los enlaces de H de la muestra BT y la BS, tienen una distancia de aproximadamente 2.85 Å.

La banda Amida B se encuentra generalmente entre 3100 y 3070 cm^{-1} y se debe al estiramiento del enlace NH [51], las vibraciones de estiramiento corresponden esencialmente a la variación de las distancias internucleares (movimientos a lo largo de los ejes de enlace). Las tres muestras caen dentro del rango.

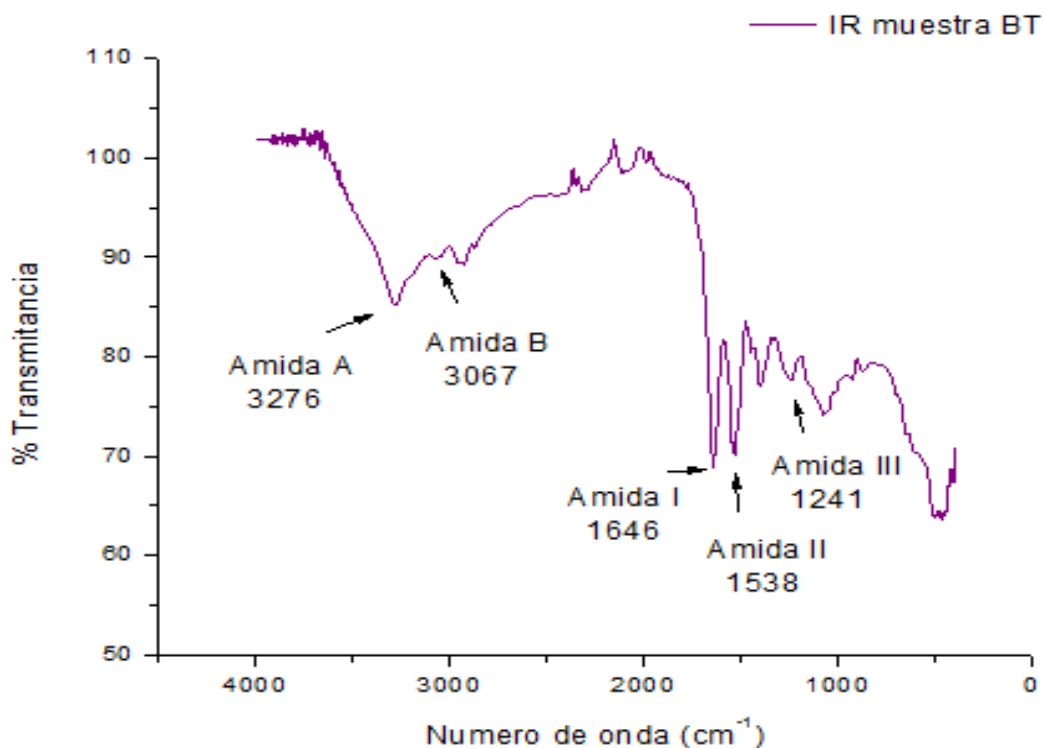


Figura 4. 22 Espectro infrarrojo de la muestra BT

La banda Amida I es la más intensa de las bandas de absorción en proteínas, entre 1600 y 1700 cm^{-1} . Está asociada, principalmente con las vibración de tensión del grupo carbonilo

del enlace peptídico C=O y está directamente relacionada con la conformación del esqueleto polipeptídico y el patrón de enlaces de hidrógeno.

Cuando la banda cae alrededor de 1660 y 1650 cm^{-1} es asignada a una forma helicoidal, mientras que el estado de espiral al azar (random coil form) se caracteriza por números de onda inferiores [50,52]; como se observa en los espectros, la banda Amida I de las muestras RT y BS caen en frecuencias menores a 1660 cm^{-1} (muestra RT: 1636 cm^{-1} , muestra BS: 1631 cm^{-1}), de acuerdo a estos datos, estas muestras tienen forma de ovillo al azar, en el caso de la muestra BT (1646 cm^{-1}) se puede decir que presenta una forma helicoidal.

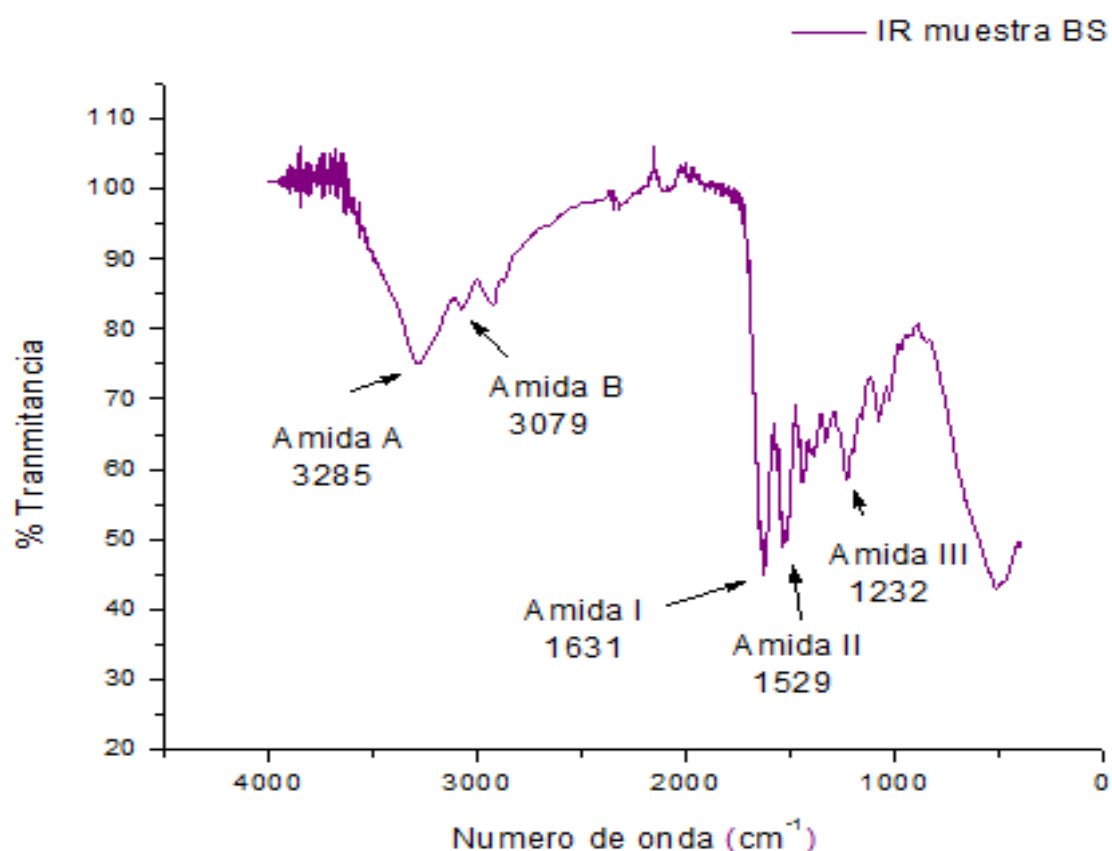


Figura 4. 23 Espectro infrarrojo de la muestra BS

La banda Amida II generalmente se observa en un rango de 1530-1550 cm^{-1} , esta banda está relacionada con la vibración de flexión del enlace NH y con la vibración de tensión de los enlaces CN y del C-C [50].

Así pues la banda Amida I se debe al estiramiento de enlace C=O, débilmente acoplado al estiramiento de CN y a la flexión de NH, mientras que la banda Amida II se debe sobre todo al estiramiento del enlace CN y a las vibraciones de flexión de CNH y CC débilmente acoplado al modo de estiramiento de C=O [49].

La banda Amida III se encuentra en el rango de 1278 a 1204 cm^{-1} , se asocia con el estiramiento CN y la deformación del enlace NH [53].

Se sabe que las frecuencias de las bandas amida dependen de la conformación de la colágena y cuanto menor sea el orden estructural más baja es la frecuencia de estas bandas amida [52].

CAPÍTULO 5

Conclusiones

Con la metodología empleada fue posible extraer colágena tipo I a partir de diferentes tejidos biológicos, con un alto grado de pureza, mediante un proceso en medio ácido, esto debido al alto grado de solubilidad que tiene la proteína en soluciones ácidas.

El método utilizado está basado en varias centrifugaciones, diálisis y resuspensiones, esto con el fin de conseguir un mayor grado de pureza en la colágena que la obtenida en métodos que emplean menor cantidad de estos procedimientos. La desventaja de éste proceso es que al repetir las centrifugaciones y las diálisis, la cantidad de proteína obtenida puede ser menor, debido a que con cada paso se va perdiendo un poco de volumen.

Se obtuvo colágena a partir de la disolución de los tres tejidos, mostrando que el tendón de cola de rata posee una concentración más alta que la de las otras dos soluciones obtenidas, debido a la mayor facilidad de extraer la proteína de este tejido mediante este procedimiento.

Con la caracterización mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, se obtuvo un patrón electroforético típico de la colágena tipo I, ya que se observaron claramente las cadenas alfa constituyentes de esta proteína. Esto fue posible ya que la molécula sufrió un desdoblamiento al usar SDS en el proceso.

Gracias al análisis térmico realizado fue posible aproximar los valores de la temperatura de desnaturización de cada muestra, así como describir el comportamiento de la molécula al ser sometidas a incrementos de temperatura.

La microscopia electrónica de barrido permitió observar las superficies de las muestras encontrando en todas ellas la morfología fibrosa característica de la colágena. También se logró hacer una comparación entre las imágenes obtenidas a partir de las muestras tratadas por el método de electrodeposición y de las mismas muestras sin dicho tratamiento, resultando la electrodeposición un método esencial para observar muestras biológicas. Gracias a esta técnica se pudieron obtener los datos aproximados de los diámetros de fibra y de poro de cada una de las muestras, observando un comportamiento muy similar entre las tres.

Con la espectroscopia infrarroja se observaron las bandas características de la colágena, las cuales son la bandas Amida I, Amida II, Amida III, Amida A y Amida B.

Debido a los resultados obtenidos con las diferentes técnicas de caracterización, se puede concluir que se obtuvo colágena tipo I de manera exitosa, obteniendo una pureza alta. Al no observar cambios importantes entre los resultados de los diferentes tejidos se puede decir que no existen variaciones apreciables en las características de la proteína en función del origen de ella.

La única característica que es diferente en función del material empleado, es la concentración de la proteína, ya que depende de la concentración de ésta depende del tejido del cual se obtenga la colágena, lo cual a su vez se relaciona con la función de este.

Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo son satisfactorios, pero se recomienda expandir el estudio en el análisis térmico haciendo barridos a diferentes velocidades de calentamiento, con el fin de obtener un mejor análisis en cuanto a la temperatura de desnaturalización y la degradación de la molécula.

Por otro lado es de interés utilizar las disoluciones o bien las muestras liofilizadas obtenidas, para poder realizar membranas para después llevar a cabo una esterilización con el fin de que se implanten como injertos en piel.

Referencias

- [1] Viladot Antonio. Lecciones básicas de biomecánica del aparato locomotor. Springer Valencia. 2001. pp. 291-304.

- [2] Ruozi B., Tosi G., Leo E., Parma B., Vismara S., Forni F., Vandelli M. Intact collagen and atelocollagen sponges: Characterization and ESEM observation. *Materials Science and Engineering* 27(2007):802-810.

- [3] Friess W. Collagen-biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45(1998):113–136.

- [4] Lee C. H., Singla A., Lee Y. Biomedical Applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics* 221(2001):1–22.

- [5] Parenteau-Bareil R., Gauvin R., Cliche S., Gariépy C., Germain L., Berthod F. Comparative study of bovine, porcine and avian collagens for the production of a tissue engineered dermi. *Acta Biomaterialia* 7(2011):3757–3765.

- [6] Woo J., Yu S., Cho S., Lee Y., Kim S. Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) dorsal skin. *Food Hydrocolloids* 22 (2008):879–887.

- [7] Vallet-Regí M. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. *C. R. Chimie* 13(2010):174–185.

- [8] Boretos John. Contemporary biomaterials: material and host response, clinical applications, new technology, and legal aspects, National Institutes of Health (U.S.) Noyes Publications, 1984.

- [9] Furth M. E., Atala A., Dyke M. E. V. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* 28(2007):5068–5073.
- [10] Koolman Jan. *Bioquímica: Texto y Atlas*. Editorial Médica Panamericana. Tercera edición. 2005. pp. 65-70.
- [11] Peña Antonio. *Bioquímica*. Editorial Limusa. Segunda edición. México. 1988. pp. 65-96.
- [12] Lembrino Pérez I., Peralta Alatríste J. *Química II*. Cengage Learning Editores. 2006. pp. 269.
- [13] Jaramillo Antonio. *Biología*. Editorial MAD. Segunda edición. España. 2004. pp. 33-35.
- [14] Garrido Armando, Teijón José, Blanco Dolores, Villaverde, Carmen, Mendoza Carlos, Ramírez Jesús. Editorial Tébor. Segundo edición, 2006. pp. 71-85.
- [15] Miller E. J., Gay S. Collagen: An Overview. *Methods in enzymology*, volume 82. Academic Press, Inc. 1982. pp. 3-15.
- [16] Kierszenbaum Abraham. *Histología y Biología Celular*. Elsevier. Segunda edición. España. 2008. pp. 110.
- [17] Campbell P. N. *Bioquímica Ilustrada: bioquímica y biología molecular en la era posgenómica*. Elsevier. Quinta edición. España. 2006. pp. 125.
- [18] Viidik A., Vuust J. *Biology of collagen*. Academic Press. 1980. pp. 1-12.
- [19] Stryer Lupert. *Bioquímica, Tomo I*. Editorial Reverté. Tercera edición. España. 1988. pp. 267-280.

- [20] Battaner Arias Enrique. Biomoléculas. Ediciones Universidad de Salamanca. Primera edición. España. 1993. pp. 198.
- [21] http://en.wikipedia.org/wiki/Secondary_structure#Secondary_structure
- [22] Parenteau-Bareil R., Gauvin R., Berthod F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials* 3(2010):1863-1887.
- [23] Berg J., Stryer L., Tymoczko J.L. Bioquímica. Reverté. España. 2008. pp. 70-73.
- [24] www.biorad.com
- [25] García Pérez H. M. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Laboratorios Beterá. Univ Diag* 2(2000):31-41.
- [26] Maldonado Alconada A.M., Jorrín Novo J.V. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de hokas de *Arabidopsis thaliana*. Departamento de bioquímica y biología molecular. Córdoba.
- [27] Berth M, Moser FM, Kolbe M, et al: “These state of art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images”. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76(2007):1223-43.
- [28] Matteini Mauro, Moles Arcangelo. *Ciencia y Restauración*. Editorial NEREA. España. 2001. pp. 151-153.
- [29] Skoog. Douglas A. *Principios de análisis instrumental*. Edición. Editorial Mc Graw Hill. Sexta edición. México. 2001. pp. 864-867.
- [30] Sabín Fernández Juan. *Estabilidad coloidal de nanoestructuras liposómicas*. Tesis de doctoado. Facultad de Física. Universidad Santiago de Compostela. Brasil.. pp. 75-77.

- [31] Gómez Lizárraga Karla. Obtención de colágena tipo I a partir de tendón bovino. Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones en Materiales. Posgrado en Ciencias e Ingeniería de Materiales. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF. 2010. pp. 31-33.
- [32] Pease R.F.W. and Nixon W.C., High resolution scanning electron microscopy. *Journal of Scientific Instruments* 4(1965):81-85.
- [33] *Characterization and Analysis of Polymers*. Hoboken, New jersey: Wiley-Interscience. 2008. pp. 333-335, 627-632.
- [34] B. Schrader, *Infrared and Raman Spectroscopy*, VCH, Alemania, 1995.
- [35] Freifelder David. *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. Editorial Reverte. España. 1981. pp. 451.
- [36] Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochemica et Biophysica* 1767(2007): 1073-1101.
- [37] I. Mills, T. Cvitas, K. Homann, N. Kallay, K. Kuchitsu. *Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 1988.
- [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] Fitzpatrick Thomas. *Dermatología en Medicina General, Volumen 1*. Editorial Medica Panamericana. Séptima edición. Argentina. 2009. pp 522.
- [40] Krötsch 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).

- [41] Creighton Thomas. Protein Structure: A practical approach. Oxford. 1989. pp 1-19.
- [42] Labastida A., Piña C., Romero M., Tello S. Physicochemical properties of collagen sheet from bovine femur. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics* 7(2009):200-204.
- [43] Mno V., Ribeiro e Silva M.. Bioartificial Polymeric Materials Based on Collagen and Poly(N isopropylacrylamide). *Materials Research* 10(2007):165-170.
- [44] Sionkowska A., Kozłowska J. Characterization of collagen/hydroxiapatite composite sponges as a potential bone substitute. *Intenational Journal of Biological Macromolecules* 47(2010):483-487.
- [45] Lirong H., Changdao M., Jiabo S., Qian Z., Bi S., Wei L. Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. *Intenational Journal of Biological Macromolecules* 48(2011):354-359.
- [46] Janković B., Kolar-Anić L., Smičiklas I, Dimović S. Arandelović D. The non-isothermal thermogravimetric tests of animal bones combustion. Part. I, Kinetics analysis. *Thermochimica Acta* 495(2009):129-138.
- [47] Bigi A., Differential calorimetric and x-ray diffraction study of tendon collagen thermal denaturalization. *Int. J. Biol. Macromol.* 9(1987):363-367.
- [48] Pietrucha K. Changes in denaturation and rheological properties of collagen–hyaluronic acid scaffolds as a result of temperature dependences. *Int J Biol Macromol* 36(2005):299–304.
- [49] Davidenko N. et al. Collagen–hyaluronic acid scaffolds for adipose tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 6 (2010):3957–3968.
- [50] http://www.ugr.es/~olopez/estruct_macromol/IR/FTIR.pdf

- [51] Rainer E., Hong H., G Hong-Wei, Xiang H., Xun C., Wei-Dong H. Characteristic infrared spectroscopic patterns in the protein bands of human breast cancer tissue. *Vibrational Spectroscopy* 27(2001):165-173.
- [52] Kamińska A., Sionkowska A. Effect of UV radiation on the infrared spectra of collagen. *Polymer Degradation and Stability* 51(1996):19-26.
- [53] Bei-wei Z., Xiu-ping D., Da-yong Z., Yang G., Jing-feng Y., Dong-mei L. Physicochemical properties and radical scavenging capacities of pepsin-solubilized collagen from sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Food Hydrocolloids* 28(2012):182-188.