



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

T E S I S

**ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE UN BIOPOLÍMERO
CON BASE COLÁGENA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ZAIRA GARCÍA SANABRIA



MÉXICO, D.F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Dr. José Pedraza Chaverri**
VOCAL: **Profesor: Dr. José Fausto Rivero Cruz**
SECRETARIO: **Profesor: Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes**
1er. SUPLENTE: **Profesor: Dra. María Eva González Trujano**
2° SUPLENTE: **Profesor: Dr. Mario Adán Moreno Eutimio**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE BIOMATERIALES, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
EN MATERIALES, C.U., UNAM**

ASESOR DEL TEMA: Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes

SUSTENTANTE (S): Zaira García Sanabria

Contenido

1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Colágenas.....	3
2.1.1 Colágena tipo I	4
2.1.2 Síntesis de colágena	5
2.1.3 Colágena I como material de uso médico.....	7
2.2 Polivinilpirrolidona.....	9
2.2.1 Síntesis de polivinilpirrolidona	9
2.2.2 Polivinilpirrolidona de bajo peso molecular	10
2.2.3 Polivinilpirrolidona como material de uso médico	11
2.3 Colágena-polivinilpirrolidona	12
2.3.1 Biopolímero de colágena-polivinilpirrolidona como material de uso médico	13
3. Planteamiento del problema	16
4. Hipótesis	16
5. Objetivo general	16
6. Objetivos particulares	17
7. Marco experimental	17
7.1 Preparación de muestras	17
7.1.1 Diálisis	18
7.1.2 Cuantificación de colágena mediante estimación de hidroxiprolina	18

7.2 Identificación del patrón electroforético	19
7.3. Caracterización de la microestructura mediante microscopía electrónica de barrido.....	201
7.4 Determinación de la estabilidad térmica mediante calorimetría diferencial de barrido	22
7.5 Determinación de la susceptibilidad enzimática mediante proteólisis limitada.....	24
8. Resultados y Discusión	26
8.1. Identificación del patrón electroforético	26
8.2. Caracterización de la microestructura.....	28
8.3. Determinación de la estabilidad térmica	31
8.4. Determinación de la susceptibilidad frente a la desnaturalización enzimática	36
9. Discusión	39
10. Conclusiones	40
11. Bibliografía	42

ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE UN BIOPOLÍMERO CON BASE COLÁGENA

1. Introducción

Los polímeros de origen peptídico son candidatos terapéuticos ideales para tratar, reparar o sustituir tejidos u órganos lesionados, debido a que son muy potentes y exhiben alto grado de especificidad, sin embargo, sus propiedades fisicoquímicas generalmente dificultan su aplicación directa como fármacos, debido a que la mayoría poseen alto peso molecular y generalmente se encuentran altamente cargados, además de la susceptibilidad intrínseca a la degradación enzimática, baja solubilidad acuosa, sensibilidad a la temperatura, pH y oxidación (1). Este panorama ha promovido la generación de biopolímeros, compuestos conformados por una parte biológica frecuentemente de origen peptídico, y una parte sintética, representada por un polímero "inerte" (2).

El componente biológico más utilizado para el diseño de biopolímeros compuestos es la colágena tipo I (COL 1), debido a su alta compatibilidad entre las especies y a sus efectos biológicos demostrados en la resolución de patologías con alteraciones en la matriz extracelular (MEC), además de su habilidad de combinarse con diversos polímeros sintéticos como biovidrios, biocerámicas y

aleaciones metálicas, entre otros (2, 3). En este sentido, la elección del componente sintético afectará la topografía y actividad biológica del componente peptídico, lo cual promoverá una ganancia, una pérdida o un sinergismo de la función dependiendo de las características topográficas del biopolímero resultante.

El biopolímero de colágena-polivinilpirrolidona (CLG-PVP) es la mezcla gamma irradiada de colágena porcina tipo I atelopectídica y la polivinilpirrolidona. Este biopolímero participa en procesos inflamatorios a través de la modulación de interleucinas y moléculas de adhesión celular, entre otros. Sin embargo, esta actividad biológica que exhibe el biopolímero CLG-PVP, no la presentan sus componentes por separado (1, 2). En este contexto, se ha demostrado ampliamente que la información topográfica de cualquier molécula o compuesto provee información acerca del mecanismo de acción, índices y potenciales terapéuticos (1). En las investigaciones realizadas con biopolímeros con base colágena, se ha confirmado que ésta ganancia de función, se debe principalmente a cambios estructurales en el biopolímero resultante, ya que después del proceso de copolimerización (interacción estable entre colágena y otro componente a través de medios físicos o químicos) se exhiben o encriptan regiones topográficas que no estaban presentes en los componentes por separado (4).

Bajo este panorama, este trabajo se enfocó en determinar las características estructurales de un biopolímero de colágena y

polivinilpirrolidona, así como de sus componentes por separado, con la finalidad de esclarecer la contribución de los cambios estructurales de la copolimerización y la ganancia de función del biopolímero resultante.

2. Marco teórico

2.1 Colágenas

Las colágenas conforman una familia de proteínas que se encuentra presente en todos los organismos pluricelulares, siendo las proteínas más abundantes en el caso de los vertebrados, en donde representan aproximadamente el 30% de las proteínas totales. Los miembros de esta familia se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo, ya que constituyen el principal elemento fibroso de la matriz de la piel, los huesos, los tendones, el cartílago, los vasos sanguíneos, los dientes, la córnea y el cristalino del ojo (3). De modo general, las moléculas colagénicas adoptan una conformación triple helicoidal que resulta de la asociación de tres cadenas polipeptídicas, lo que determina la distribución, la función y la estructura del tipo de colágena resultante.

2.1.1 Colágena tipo I

La primera CLG caracterizada fue la tipo I, debido a que es la más abundante en el organismo. A nivel estructural esta proteína forma fibrillas de 300 nm de largo y 1.5 nm de diámetro. Dicha fibrilla se muestra como un heterotrímero que consta de 2 cadenas α_1 idénticas y una cadena α_2 [α_1 (I) $_2$ α_2 (I)]. Cada cadena α tiene 1,050 residuos de aminoácidos que adoptan una conformación helicoidal con giros hacia la derecha y cada giro posee 3.3 residuos de aminoácidos. El análisis microscópico de las fibras de CLG-I revela una organización en forma de bandeado cruzado con intervalos de 67 nm. Finalmente, este tipo de CLG, se asocia con los tipos III, IV, VI, XII y XIV, así como con otras proteínas no colagénicas (5-7).

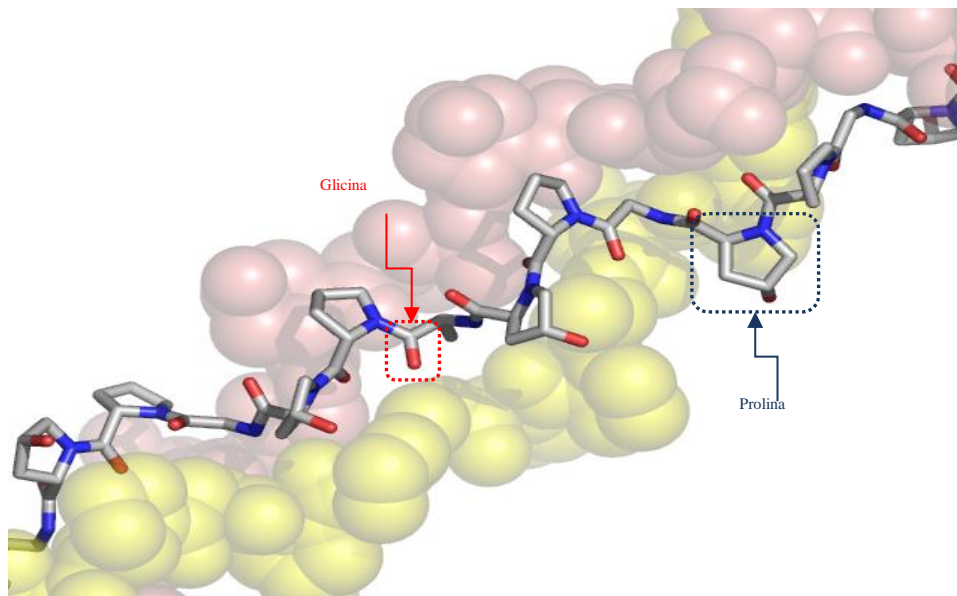


Fig. 1. Estructura de la colágena I. Se presenta una de las cadenas en la estructura de triple hélice de la colágena en esquema de palos, se observa claramente el patrón de Gly-XY, en donde X es a menudo prolina e hidroxiprolina, mientras que los anillos pirrol de la prolina residen en el exterior de la triple hélice (*Modificado a partir de PDB ID code: [1CAG](#)*)(8)

2.1.2 Síntesis de colágena

La CLG se sintetiza en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (RER) y es transportada a través del mismo hacia el aparato de Golgi en donde se empaqueta en vesículas de secreción para finalmente ser secretada al medio extracelular. Durante su trayecto, la CLG sufre modificaciones postraduccionales como son la hidroxilación y la glicosilación, que se efectúan en los residuos de prolina y lisina, y en el grupo hidroxilo de los residuos de hidroxilisina respectivamente. Posteriormente y previo a la secreción, las tres cadenas polipeptídicas recién sintetizadas se ensamblan mediante entrecruzamientos de naturaleza covalente entre los residuos de lisina en una cadena y el derivado aldehído de otro residuo de lisina localizado en una cadena opuesta. Posteriormente, la procolágena se secreta al medio extracelular donde los extremos amino y carboxilo de la molécula trimérica (llamados péptidos de extensión o telopéptidos, con una longitud de 100 a 300 aminoácidos), son eliminados por la acción de peptidasas, para dar origen a la forma madura de la CLG. Finalmente, la polimerización de la CLG madura da origen a las microfibrillas que son estructuras supramoleculares con un diámetro de 100 a 200 Å (Angstroms), dependiendo de los tipos de CLG que la conforman y del tejido donde se depositan (9, 10).

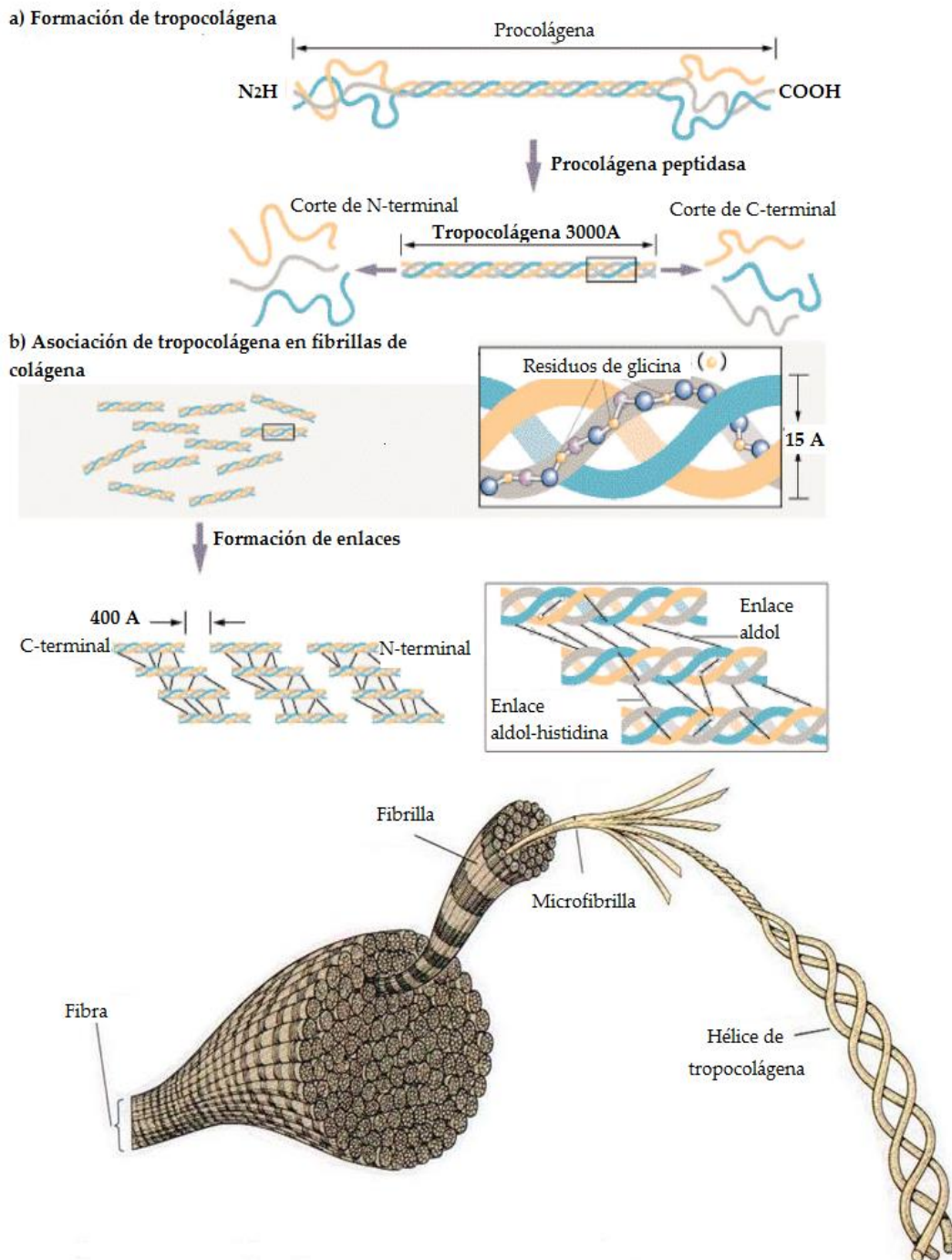


Fig.2. Síntesis de colágena. Se observa las diferentes fases y modificaciones que sufre la molécula de colágena, partiendo de la molécula precursora y la tropocolágena hasta la formación de fibrillas (11) *Modificado a partir de Campbell, NA. Biology 1995 Éditions du Renouveau Pédagogique Inc. St Laurent*

La inmunología de la CLG es importante debido a que las colágenas animales están siendo utilizadas en humanos. En el caso de la CLG-I, los determinantes antigénicos conformacionales están dados principalmente por la triple hélice y las regiones telopeptídicas. Por otro lado, la CLG es una proteína altamente conservada en la escala filogenética, su estructura primaria es muy semejante entre las especies, presentando un 94% de identidad entre la COL-I de humano y cerdo, por lo que este tipo de CLG es considerada la proteína menos inmunogénica (12, 13). No obstante, se han encontrado anticuerpos anti-CLG en pacientes en estado de autoinmunidad, así como por la administración a humanos de suspensiones con pH neutro de fibras de colágena bovina parcialmente entrecruzadas (14).

2.1.3 Colágena I como material de uso médico

Las características biológicas y fisicoquímicas de la CLG-I han impulsado la producción de una gran variedad de productos a partir de la proteína purificada, en particular; se ha potencializado su uso como andamiaje celular principalmente en tejidos como el hueso y el cartílago, donde favorece el restablecimiento de la topografía y función tisular (15-17). Asimismo, la CLG-I se ha utilizado en combinación con otros componentes de la MEC (CLG III, elastina y el ácido hialurónico, así como la hidroxiapatita), participando en la

regeneración de células corneales, la angiogénesis y la remodelación cutánea y ósea (18-24).

Así mismo, la CLG-I t se ha empleado, como vehículo de citocinas, como es el caso del factor de crecimiento de fibroblastos básico, que promueve la reparación del nervio ciático en ratas (25).

Alternativamente, se han desarrollado estrategias dirigidas a retardar la absorción de la CLG-I, a través de su copolimerización con moléculas sintéticas; concertando así, la biocompatibilidad del componente biológico y las propiedades físicas y mecánicas del componente sintético. Acorde con esto, se han elaborado biopolímeros de CLG-I con alcohol polivinílico (PVA), con poliuretano (PU) y con poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHBV), cuyos biopolímeros resultantes se han utilizado en diversas áreas de la ingeniería de tejidos con fines de tratamiento y regeneración tisular. En las investigaciones acerca de las características estructurales de estos biopolímeros con base CLG, se ha demostrado que el componente sintético ofrece estabilidad térmica a la CLG-I (26, 27). Otro copolímero sintético que ha impactado en la medicina, es la mezcla gamma irradiada de la CLG-I con la polivinilpirrolidona de bajo peso molecular, este biopolímero es un regenerador tisular con propiedades fibrolíticas, antifibróticas y cicatrizantes que ha permitido revolucionar la terapéutica en diversas áreas de la medicina (10, 28-44).

2.2 Polivinilpirrolidona

La polivinilpirrolidona (PVP) es un homopolímero compuesto por monómeros de N-vinil-2-pirrolidona, dando origen a diversos tipos de PVP que oscilan entre 2,500 y 1, 200,000 kDa de masa molecular. Los materiales con diferentes masas moleculares son distinguidos de acuerdo al número-K, existiendo así los tipos K-12, K-15, K-17, K-30 que son utilizados para administración parenteral; mientras que los tipos K-25 y K-30 son utilizados para la fabricación de productos administrados por vía oral y tópica (45).

2.2.1 Síntesis de polivinilpirrolidona

Tradicionalmente, la síntesis de N-vinil-2-pirrolidona y la polimerización del homopolímero se han basado en la técnica descrita por Reppe, la cual describe que la acetilación de la α -pirrolidona a baja presión da origen a la N-vinil-2-pirrolidona, la cual posteriormente es utilizada para formar el homopolímero de PVP. Actualmente, la polimerización en agua o alcohol son las técnicas más comunes para la síntesis de PVP dado que es posible obtener el polímero en polvo luego de un proceso de deshidratación (45).

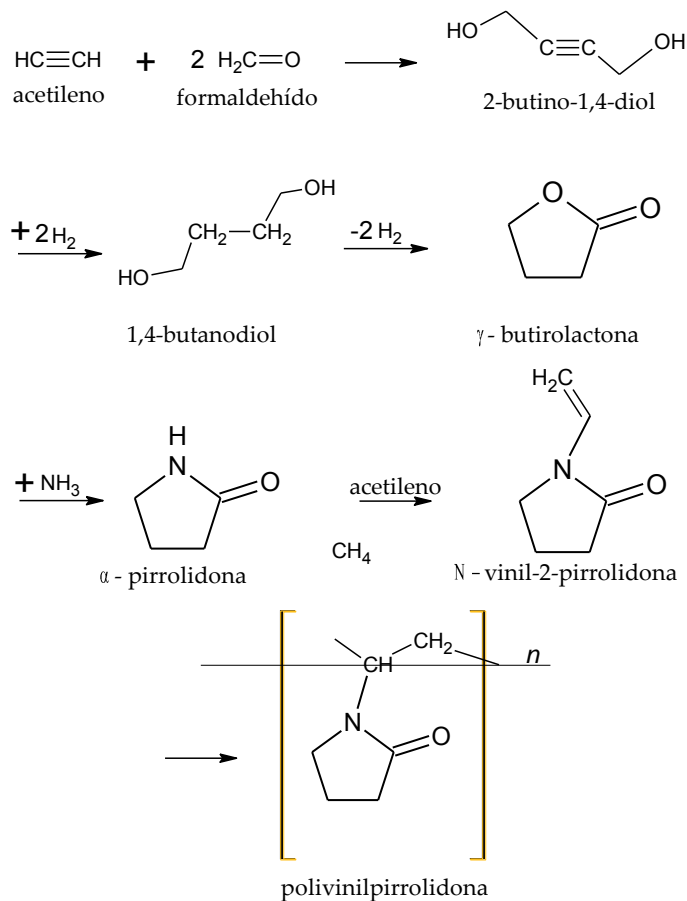


Fig. 3. Síntesis de polivinilpirrolidona. El diagrama presenta la secuencia de reacciones que ocurren en el proceso químico para la obtención de la polivinilpirrolidona (PVP), a partir de la polimerización de N-vinil-2-pirrolidona que representa a la unidad monomérica del polímero sintético. *Modificado a partir de Robinson BH, et al., 1990.(45)*

2.2.2 Polivinilpirrolidona de bajo peso molecular

Este tipo de polivinilpirrolidona es soluble en agua, así como en la mayoría de los solventes orgánicos, lo cual no altera su estructura debido a que es estable tanto en forma sólida como en solución. En solución ácida es inusualmente estable, sin cambio de apariencia y viscosidad por dos meses a 24°C en HCl 15%. Las soluciones de PVP

no tienen capacidad amortiguadora y si se calientan con bases fuertes como el litio, carbonato, o metilsalicilato de sodio precipitan. Esto ocurre debido al entrecruzamiento, el cual resulta del anillo abierto de la pirrolidona y la subsecuente reacción a través de las diferentes cadenas del polímero (45).

Dada su naturaleza química, este polímero sintético es altamente compatible y resistente a la degradación térmica, además de presentar características adhesivas y la capacidad de formar películas, baja toxicidad así como su comportamiento relativamente inerte frente a sales y ácidos, lo que ha promovido su aplicación en animales y humanos (46-48).

2.2.3 Polivinilpirrolidona como material de uso médico

La aplicación más conocida y utilizada de la PVP es su aplicación como antiséptico (yodo-povidona) (49). Sin embargo, sus aplicaciones médicas han incrementado gradualmente, debido a la develación de sus características fisicoquímicas, tal es el caso de su empleo como recubrimiento de lentes intraoculares y de catéteres uretrales, con la finalidad de prevenir la resequedad del lente y la adherencia bacteriana a los biomateriales que se implantan en el tracto urinario respectivamente (50, 51). Además, se ha utilizado para la dispersión de medicamentos como la dihidroartemisinina y la flunarizina, ya que mejora su estabilidad en solución (52, 53). Del

mismo modo, tomando ventaja de sus propiedades dispersantes se ha utilizado para la producción de nanotubos de carbón (54). Así mismo, se ha demostrado que coadministrada con epinefrina potencializa el efecto analgésico y antidepresivo de ésta (55). Recientemente, se ha utilizado la PVP en combinación con polímeros de origen biológico como es el caso de la CLG-I, entre otros componentes de la MEC.

2.3 Colágena-polivinilpirrolidona

La colágena-polivinilpirrolidona (CLG-PVP) es un biopolímero derivado de la radiación gamma de fibras solubles de CLG-I de origen porcino y la PVP, dando origen a un biopolímero con propiedades fisicoquímicas y farmacológicas (56) diferentes de sus componentes por separado (9, 10, 13-15, 30, 44, 57-73).

El conocimiento acerca de la estructura de este biopolímero es escaso, se sabe por análisis electroforéticos que este copolímero sintético presenta un ligero cambio en las movilidades relativas de los componentes colagénicos, específicamente de las cadenas $\alpha 1(I)$ y $\alpha 2(I)$, ya que estas, migran ligeramente por arriba de las cadenas alfa de la CLG-I (74). Recientemente, se ha demostrado que el patrón cromatográfico del biopolímero es significativamente diferente al de los componentes por separado, ya que la CLG-I, muestra dos especies, la PVP muestra una especie, mientras que el biopolímero

presenta una especie que al parecer incluye las tres especies presentadas por los componentes por separado (74). Estos hallazgos sugieren, que las diferencias estructurales que posee el biopolímero, determinan que la actividad biológica sea propia del mismo y no así de sus componentes por separado (75).

2.4.1 Biopolímero de colágena-polivinilpirrolidona como material de uso médico.

Este biopolímero sintético, ha sido catalogado como un hemostático y regenerador tisular por sus múltiples efectos en procesos inflamatorios. Sin embargo, pese a sus múltiples aplicaciones en la medicina, su actividad biológica no se ha dilucidado completamente. En la actualidad, se ha propuesto que la acción del biopolímero se efectúa a través de los siguientes mecanismos: 1) Modulación de la respuesta inflamatoria hasta alcanzar niveles semejantes a los fisiológicos de algunos promotores de la inflamación, como son la **interleucina 1 β (IL-1 β)**, **interleucina 8 (IL-8)**, **factor de necrosis tumoral α (TNF- α)**, **factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1)** y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); 2) Re-establecimiento de la síntesis y el depósito de diferentes proteínas de la MEC, específicamente aquellas involucradas en los procesos de reparación, como son las colágenas tipo I y III, la elastina, la osteonectina y la osteopontina, todas ellas cruciales para llevar a

cabo la reestructuración del tejido dañado; 3) Modulación del recambio de la matriz del tejido cicatrizal, a través del incremento en la producción del inhibidor de metaloproteasas 1 (TIMP-1); 4) Disminución de moléculas de adhesión celular, específicamente de la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión endotelial de leucocito 1 (ELAM-1); 5) Disminución de la actividad de la ciclooxigenasa 1 (COX-1), enzima constitutiva encargada de la síntesis de prostaglandinas; 6) Disminución de la ICAM-1 y VCAM-1, reduciendo así la activación microvascular del endotelio y 7) Activación de la apoptosis, a través de la sobreexpresión de Fas/Apo95 en células proliferativas en sinovia.

Tabla 1. Principales usos terapéuticos del copolímero de colágena-polivinilpirrolidona, efecto y acción biológica.

Patología	Efecto de la aplicación de CLG-PVP	Actividad de biológica
Ortopedia y traumatología	<p>Aceleración de la consolidación ósea. Modula factores de crecimiento en células mesenquimales. Síntesis temprana de osteopontina y osteonectina. Incremento de TGF-β y proteínas morfogénicas del hueso 2 y 4. Neoformación de capilares, osteoblastos, osteoclastos y tejido mesenquimal (hueso trabecular maduro). Funciona como matriz extracelular <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>.</p>	Osteogénico

Patología	Efecto de la aplicación de CLG-PVP	Actividad de biológica
Gastroenterología	Aceleración del cierre de la lesión. Estimulación de la hemostasia.	Hemostático
Sistema vascular y periférico	Pronta recuperación de la secuela. Incremento de la irrigación sanguínea. Producción temprana del tejido de granulación. Neoformación de vasos sanguíneos.	Angiogénico
Dermatología	Modulación de la inflamación. Remodelación del tejido dañado. Disminución de citocinas pro-inflamatorias y fibrogénicas (IL-1 β , TNF- α , TGF- β y PDGF). Disminución de moléculas de adhesión celular (ELAM-1 y VCAM-1). Regula el recambio de colágena I y III en matriz extracelular.	Antifibrótico Regenerador tisular Modulador de la inflamación
Cirugía general	Previene la producción exagerada de proteínas como la colágena. Disminuye el dolor e hipersensibilidad. Remodelación de tejido conjuntivo (apariencia estética).	Antifibrótico Regenerador tisular
Reumatología	Modulación de la inflamación. Modulación negativa de COX-1. Incremento de TIMP-1. Disminución de ICAM-1 y VCAM-1. Provee lubricación y estabilidad mecánica.	Modulador de la inflamación

3. Planteamiento del problema

La copolimerización de la colágena con compuestos sintéticos y/o naturales induce la generación de biopolímeros con una función nueva o incrementada en comparación con sus componentes por separado, sin embargo, el conocimiento de los cambios estructurales que se generan en el biopolímero resultante son escasos. Por tal motivo este trabajo se enfocó en determinar las características estructurales de un biopolímero de colágena y polivinilpirrolidona, así como de sus componentes por separado, con la finalidad de esclarecer la contribución de los cambios estructurales de la copolimerización y la ganancia de función del biopolímero resultante.

4. Hipótesis

El biopolímero de CLG-PVP muestra una estabilidad estructural mayor en comparación de sus componentes por separado.

5. Objetivo general

Determinar la estabilidad estructural del copolímero de CLG-PVP así como de sus componentes por separado mediante pruebas fisicoquímicas.

6. Objetivos particulares

- Identificar el patrón electroforético mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes.
- Caracterizar la microtopografía mediante microscopía electrónica de barrido.
- Determinar la estabilidad térmica mediante calorimetría de barrido.
- Determinar la susceptibilidad a proteasas mediante proteólisis limitada.

7. Marco experimental

7.1 Preparación de muestras

7.1.1 Diálisis

La diálisis tiene la finalidad de separar moléculas en solución de acuerdo a sus índices de difusión o presión osmótica a través de una membrana semipermeable. En el laboratorio, esta técnica se emplea frecuentemente para eliminar las sales presentes en soluciones proteicas, en virtud de que las sales y otras moléculas pequeñas presentes en la solución proteica migran de la membrana de diálisis en la dirección del amortiguador que posee una concentración de

sales más baja, de tal manera que las proteínas con un diámetro mayor del poro de la membrana de diálisis serán retenidas.

Para eliminar las sales presentes en el biopolímero, se dializaron alícuotas de 10 mL del mismo así como de colágena I a través de una membrana semipermeable Spectra, de 10 mm de ancho por 6.4 mm de diámetro con un corte molecular de 3.5 kDa, dicho procedimiento se realizó empleando un amortiguador de acetatos 5 mM durante 18 h, con tres cambios intermitentes de amortiguador (76).

7.1.2 Cuantificación de colágena mediante estimación de hidroxiprolina

El singular contenido de hidroxiprolina en la colágena sugiere que la determinación de este aminoácido es un método efectivo de medición para determinar la concentración de colágena en una mezcla de proteínas. La técnica de Neuman y Logan para la determinación de hidroxiprolina se basa en la cromogenicidad del grupo pirrol y el ácido carboxílico presentes en su estructura, los cuales pueden ser detectados espectroscópicamente a 557 nm, bajo condiciones oxidantes (77).

La determinación de hidroxiprolina se realizó empleando muestras dializadas de colágena I y del biopolímero de CLG-PVP. Brevemente se describe la técnica, alícuotas de **200 µg de colágena y del biopolímero** se hidrolizaron con ácido clorhídrico 6 N a 105°C durante 18 h; posteriormente los compuestos hidrolizados se neutralizaron a

pH 7.0 y se incubaron con cloramina-T a 25°C durante 20 minutos. Finalmente, la concentración de hidroxiprolina se estimó a través de la interpolación de los datos de absorbancia en una curva estándar de 200 a 600 µg de hidroxiprolina valorada. Para la estimación del contenido de colágena se empleó la siguiente relación matemática.

$$\%CLG = \frac{(\mu\text{g Hidroxiprolina})(7.46)(1000)}{(\mu\text{g muestra})(\mu\text{l muestra})}$$

µg Hidroxiprolina= Interpolación de la absorbencia de la muestra en la curva estándar.

7.46= Factor reportado que se relaciona con la concentración de hidroxiprolina en una molécula de colágena.

1000= Factor de dilución acorde a las diluciones del proceso de determinación de hidroxiprolina.

µg muestra= Peso de la muestra expresado en microgramos.

µl muestra= Volumen de la muestra en microlitros que se leyó en el espectro.

7.2 Identificación del patrón electroforético

Para la identificación del patrón electroforético del biopolímero, se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), dado que es un método rápido y reproducible que permite cuantificar, comparar y caracterizar

proteínas, a través de su resolución de acuerdo a su masa molecular bajo la acción de un campo eléctrico, esto en virtud de que el SDS interacciona con las proteínas y les confiere una carga neta negativa (78). Para ello, **alícuotas de 10 µg de proteína de acuerdo al contenido de hidroxiprolina tanto del biopolímero como de colágena I se resolvieron en geles al 7.5 % de poliacrilamida en presencia de SDS utilizado una cámara de electroforesis MiniProtean 3 (Bio-Rad) a un voltaje constante de 80 volts. Finalmente las bandas se revelaron mediante tinción con azul de Coomasie y el patrón electroforético se determinó mediante densitometría óptica con el programa Quantity One versión 4.6.9 de Bio-Rad.**

7.3. Caracterización de la microestructura mediante microscopía electrónica de barrido

Una de las técnicas más utilizada en el análisis de superficies es la microscopía electrónica de barrido, debido a que el haz de electrones empleado en este tipo de microscopía posee una baja penetrancia, lo que hace a esta técnica adecuada para el estudio de la topología de superficies de materiales metálicos, cerámicos, biológicos y compuestos, que cumplan con la premisa de ser conductores o de recubrirse con una película metálica (oro, oro-paladio, cromo o carbón) (79-82).

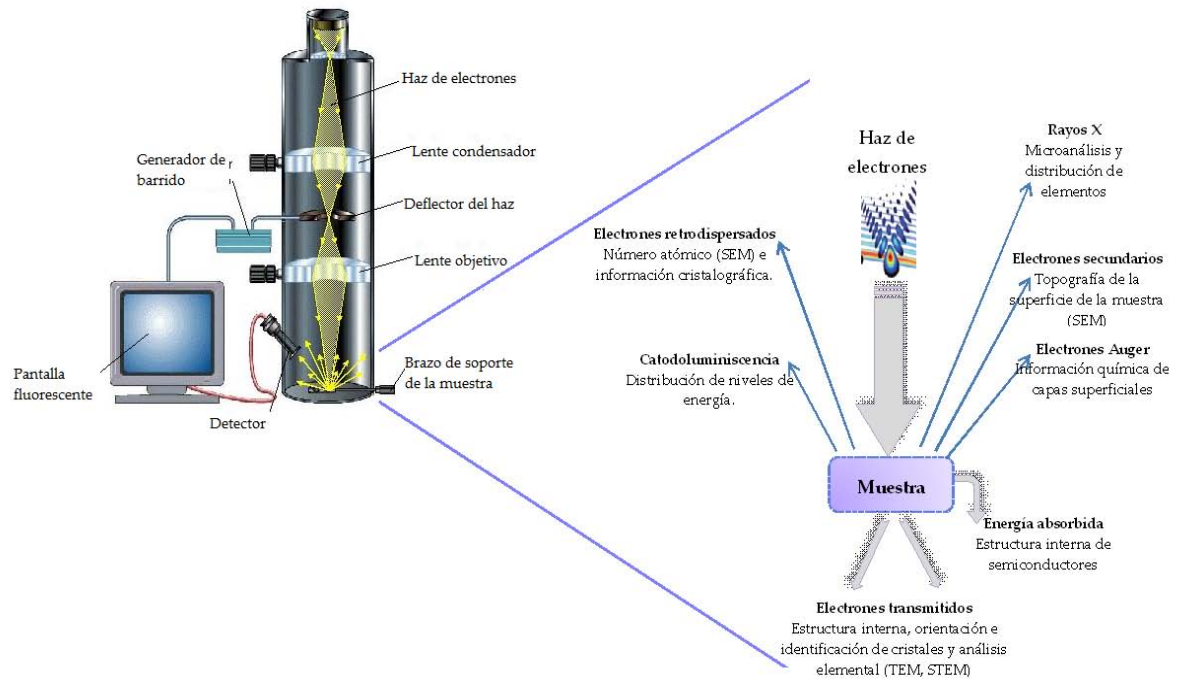


Fig. 4. Funcionamiento del microscopio electrónico de barrido. Los diversos componentes del microscopio electrónico de barrido, median el paso del haz de electrones primarios desde el cátodo hasta su incidencia en la muestra. La intensidad de los electrones que se generan a partir de esta colisión (superficie de la muestra-electrones primarios), es registrada por el detector y presentados como modulaciones de brillo en una escala de grises en el monitor, dando como resultado una imagen ampliada de la topografía del material analizado (83, 84).

Para estimar las características topográficas del biopolímero, así como de sus componentes por separado y de la mezcla física de los mismos, 1 mL de cada muestra con una concentración de 2.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de acuerdo a el contenido de hidroxiprolina, se liofilizó durante 6 h en un equipo de liofilización LABCONCO. Posteriormente, alícuotas de 1 mg peso seco de cada muestra se recubrieron con una película de oro mediante electrodeposición, una vez terminado este proceso, se

realizó un registro fotográfico, utilizando un microscopio electrónico de barrido Leica-Cambridge modelo Stereoscan 440 con filamento de tungsteno.

7.4 Determinación de la estabilidad térmica mediante calorimetría diferencial de barrido

El análisis térmico mediante calorimetría diferencial de barrido, aporta información acerca de los cambios físicos-químicos de un material en función de su temperatura, bajo un sistema controlado a través de la estimación del diferencial de calor que es aplicado a una muestra con respecto a una muestra de referencia (térmicamente inerte en el intervalo de interés) a una velocidad de calentamiento constante, en función de la temperatura (85). Las aplicaciones de ésta técnica, varían en función de las características del material que se pretende analizar térmicamente. En el campo de las biomoléculas, permite caracterizar los cambios conformacionales temperatura dependientes de las proteínas y otras macromoléculas biológicas, mediante al análisis de los parámetros termodinámicos y cinéticos del plegamiento-desplegamiento proteico, así como de la estabilidad del sistema biológico. En este sentido, parámetros cinéticos como la **capacidad calorífica (ΔC_p), la entalpía (ΔH), la entropía (ΔS) y energía libre de Gibbs (ΔG), están directamente relacionados con el proceso de desnaturalización de proteínas (86-91).**

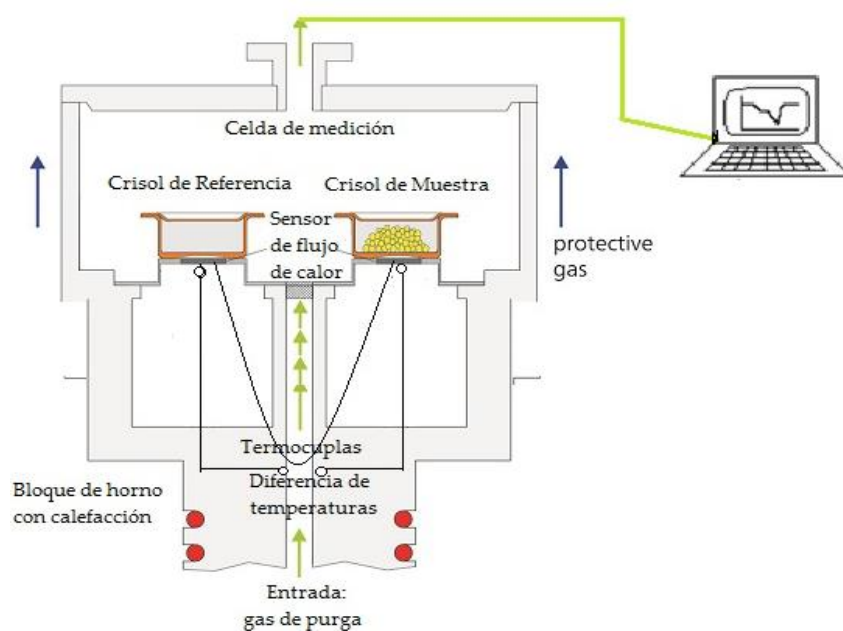


Figura 5. Esquema del calorímetro. El equipo consta de dos cámaras contenedoras acondicionadas con crisoles: la cámara de muestra y la cámara de referencia, en una cámara se deposita la muestra, mientras que la otra queda vacía o conteniendo el solvente de disolución de la muestra. Ambas cámaras incrementan su temperatura simultáneamente a una velocidad de calentamiento constante (escaneadas) y el instrumento registra la diferencia de la capacidad calorífica entre las dos cámaras.

Modificado a partir de The heat-flux cell NETZSCH DSC 214 Polyma

Para determinar las propiedades térmicas del biopolímero de CLG-PVP, así como de sus componentes por separado, se empleó un calorímetro DSC Q100 (TA Instruments), calibrado con una muestra de zafiro, obteniendo una línea base horizontal (sin ruidos). El análisis térmico se llevó a cabo con alícuotas de 1 mg de peso seco de cada muestra, en atmósfera de nitrógeno, utilizando portamuestras de aluminio como mediador de la conductividad térmica. El barrido se realizó desde 30°C hasta 90°C, a una velocidad de calentamiento de

1, 5 y 10°C/min. Los termogramas resultantes se reportaron como flujo de calor (W/g) contra temperatura (°C).

7.5 Determinación de la susceptibilidad enzimática mediante proteólisis limitada.

La estructura triple helicoidal de la CLG-I es estabilizada por interacciones no covalentes precisas que tienen lugar entre los residuos de aminoácidos que la constituyen, sin embargo, como la gran mayoría de los compuestos peptídicos presenta regiones específicas que son sujetas de hidrólisis proteolítica, este fenómeno de fragmentación, depende del reconocimiento del sitio blanco sujeto de la digestión enzimática (92). En el caso del biopolímero CLG-PVP, la adición de PVP a su estructura puede impedir el reconocimiento y por tanto la fragmentación enzimática de CLG-PVP, lo cual será evidenciado mediante proteólisis limitada frente a diversas condiciones desnaturizantes como es la exposición a urea, tripsina y proteinasa K.

La urea como agente desnaturizante de proteínas, debilita las interacciones intramoleculares a través de su interacción con la región parcialmente positiva del enlace peptídico, por lo que a la vez que las estructuras secundaria y terciaria de la proteína se debilitan se favorece la interacción solvente-proteína dando como resultado

general un despliegue favorable entrópica y entálpicamente de la proteína (92-96).

Por otro lado, la tripsina es una enzima peptidasa, que cataliza la hidrólisis del enlace peptídico en el extremo carboxilo terminal de los residuos de arginina o lisina formando péptidos de menor tamaño en comparación con el péptido inicial. Para el caso de compuestos con base CLG se ha demostrado una óptima reacción se lleva a cabo a una concentración mayor a los 10 mg por litro, en un amortiguador con pH de 5.9, agitación continua y 40°C (97).

La proteinasa K, es una serin proteasa cuya especificidad le permite hidrolizar enlaces peptídicos en el extremo carboxilo de residuos de aminoácidos alifáticos y aromáticos como la glicina (98, 99).

Para la estimación de la susceptibilidad enzimática del biopolímero de CLG-PVP, así como de sus componentes por separado y de la mezcla **física de los mismos, alícuotas de 400 µg de** cada muestra de acuerdo a el contenido de hidroxiprolina se incubaron bajo tres condiciones experimentales: 1) incubación con tripsina [10 µg/mL] en HCl 1 mM a 25 °C, 2) incubación con proteinasa K [50 µL/mL] en un amortiguador de fosfatos a 37°C y, 3) incubación con urea [1 M] con NaOH 1 N; durante 7 tiempos (0, 5, 10, 20, 40, 60 y 120 min). Finalmente, los productos de la hidrólisis se resolvieron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes, en geles de poliacrilamida al 7.5% analizados por densitometría óptica.

8. Resultados y Discusión

8.1. Identificación del patrón electroforético

El patrón de bandeo del biopolímero presenta masas moleculares superiores en todas las especies detectadas (β 183.6, α_1 121.9 α_2 107.6) en comparación con la CLG-I nativa (β 171.8, α_1 113.6, α_2 105.3) Este hallazgo, indica un cambio estructural propio del biopolímero que no presentan sus componentes ni se origina por la mezcla física de los mismos, ya que en este último las agrupaciones β , α_1 y α_2 presentan masas moleculares semejantes a la CLG-I nativa (β 172.8, α_1 113.4, α_2 105.1).

Los resultados del patrón electroforético del biopolímero, apuntan a que el proceso de copolimerización de la CLG I con PVP en un ambiente oxidante (radiación gamma), promueve cambios estructurales determinantes para la actividad biológica del biopolímero CLG-PVP. Estos cambios estructurales en la movilidad electroforética del biopolímero pueden atribuirse a que la PVP este interaccionando con la CLG-I a través de puentes de hidrógeno mediante su anillo pirrol como se ha demostrado en biopolímeros irradiados con luz ultravioleta (100, 101).

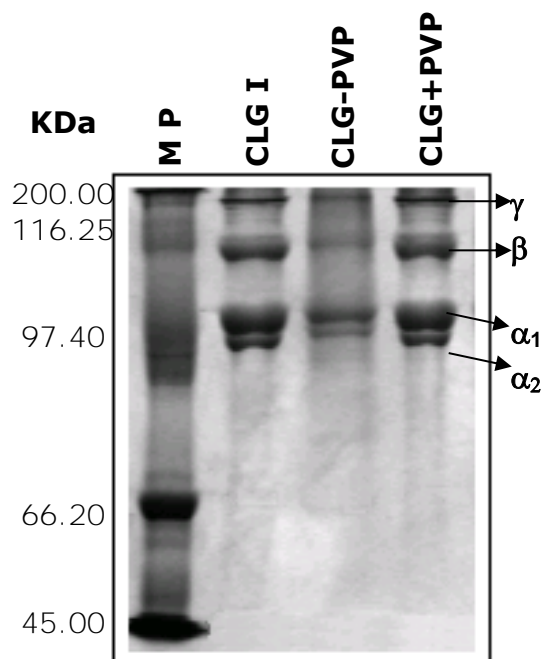


Figura 6. Patrón electroforético del biopolímero de CLG-PVP y de sus componentes por separado. En el electroferograma se aprecia el desplazamiento en las movilidades relativas de las cadenas que conforman al biopolímero. CLG, colágena porcina I pepsinizada. CLG + PVP, Colágena I mezclada con polivinilpirrolidona sin irradiar. CLG-PVP, biopolímero.

Tabla 2. Presenta los datos de la masa molecular estimada para las agrupaciones β , α_1 y α_2 y su desviación estándar, n= 10. *p < 0.005

Agrupación	Muestra		
	CLG	CLG + PVP	CLG-PVP
β	171.8 ± 1.7	172.8 ± 1.3	183.6 ± 1.2*
α_1	113.6 ± 1.1	113.4 ± 1.2	121.9 ± 1.2*
α_2	105.3 ± 1.3	105.1 ± 1.1	107.6 ± 1.3*

8.2. Caracterización de la microestructura

El análisis microscópico del biopolímero CLG-PVP, permite apreciar una estructura de fases lisas y entramados fibrilares que interaccionan entre sí, constituyendo una misma topografía, semejante a la mezcla física CLG+PVP. Por otro lado, la CLG-I exhibe una estructura fibrosa característica de este componente de la MEC, manifestándose como una especie de esponja elástica, que no se fractura al estiramiento manual, y que se caracteriza por un entramado fibrilar estrecho altamente entrecruzado y con porosidad periódica. Esta estructura ordenada, es la responsable de las propiedades mecánicas, como su elasticidad y resistencia a la compresión y la presión, así como de su capacidad de interacción con otras proteínas colagénicas y no colagénicas (102, 103).

En contraste, la PVP presenta una estructura plana y lisa, sin presencia de poros interconectados o entramados fibrilares, lo cual explica que este polímero sintético fracture al estirarlo manualmente, ya que microscópicamente no posee componentes estructurales que le doten de elasticidad para resistir a la tensión y al estiramiento. El comportamiento de la PVP en estado sólido (liofilizado) es sumamente frágil en comparación con la CLG-I, sin embargo, estas propiedades físicas que posee la PVP son las que lo han colocado como el aditivo de elección para mejorar las propiedades reológicas

de un gran número de polímeros tanto sintéticos como naturales (45, 48-55, 102, 103).

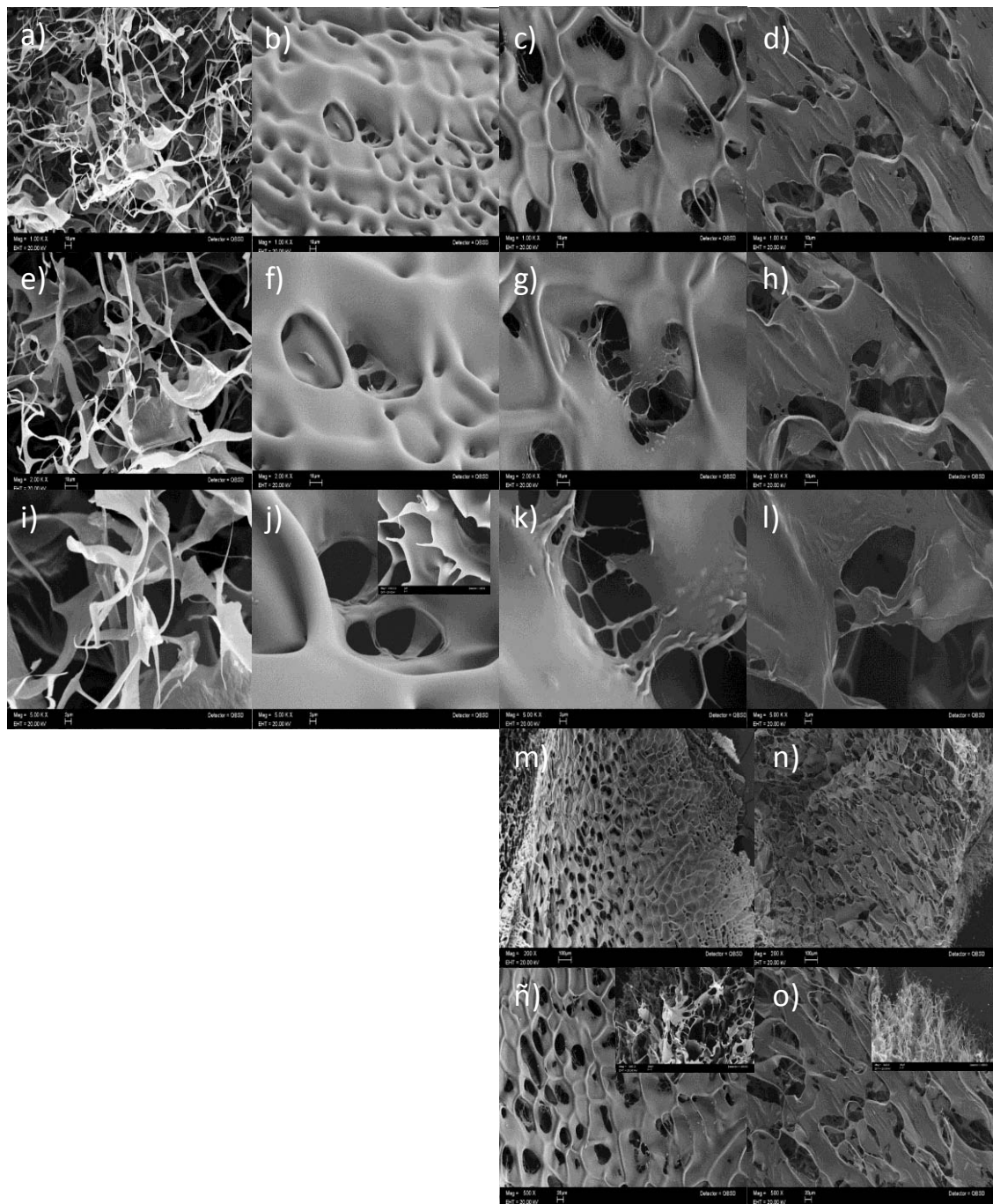


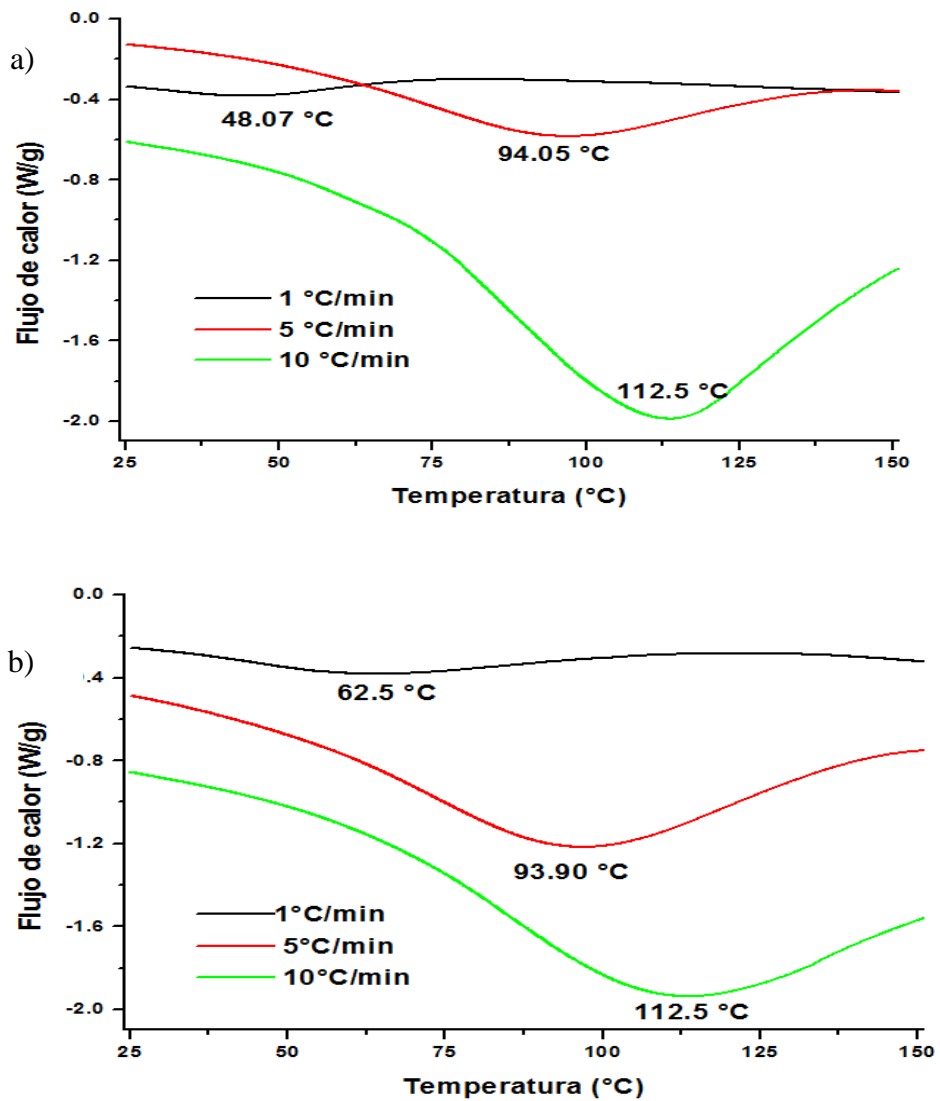
Figura 7. Características topográficas del copolímero de CLG-PVP. Micrografías electrónicas de CLG-I (a, e, i) en las cuales se aprecia la estructura típica fibrilar; PVP (b, f, j), mostrando una fase lisa sin presencia de entramado; CLG + PVP (c, g, k, m), y CLG-PVP (d, h, l, n, o) indicando que la CLG-I y PVP en solución promueve un cambio estructural dando origen a una estructura regular. Los paneles localizados en la parte superior

derecha de las micrografías j, ñ y o, corresponden a una vista lateral del material, mientras que el resto de las micrografías corresponden a la parte frontal. El aumento empleado para el registro fotográfico está indicado en la parte inferior de cada micrografía (10 KX = 10 μ m)

El análisis efectuado por microscopía electrónica de barrido, sugiere que los cambios estructurales que presenta el copolímero de CLG-PVP, se debe a las interacciones que se establecen entre la CLG-I y la PVP en solución, ya que tanto la mezcla física (CLG+PVP) como el biopolímero sujeto de ionización gamma, presentan propiedades topográficas semejantes, lo cual permite inferir que la actividad biológica que presenta el biopolímero en comparación con la mezcla física y de sus componentes por separado, probablemente se deba a cambios sutiles en la topografía. Ejemplo de ello, son los estudios estructurales realizados en proteínas y enzimas, en los cuales se ha demostrado que cambios conformacionales de un par de Angstrom, son capaces de promover la pérdida o ganancia de función al **modificar "motivos" de reconocimiento o** sitios blancos de hidrólisis (104). Así mismo, se ha demostrado que la topografía superficial de andamios celulares con base CLG-I, influyen no solo la capacidad de adhesión y proliferación de células osteogénicas, sino también la diferenciación, por lo que un entramado ordenado o desordenado, depresiones puntuales o continuas, porosidad interconectada o aislada, son factores que afectarán la actividad biológica que el material presente en un contexto biológico (105-107).

8.3. Determinación de la estabilidad térmica

Mediante el análisis calorimétrico a diferentes velocidades de calentamiento ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$), se lograron caracterizar los cambios conformacionales (transiciones) durante la inducción térmica del biopolímero de CLG-PVP, así como de los componentes por separado (CLG y PVP) Figura 8.



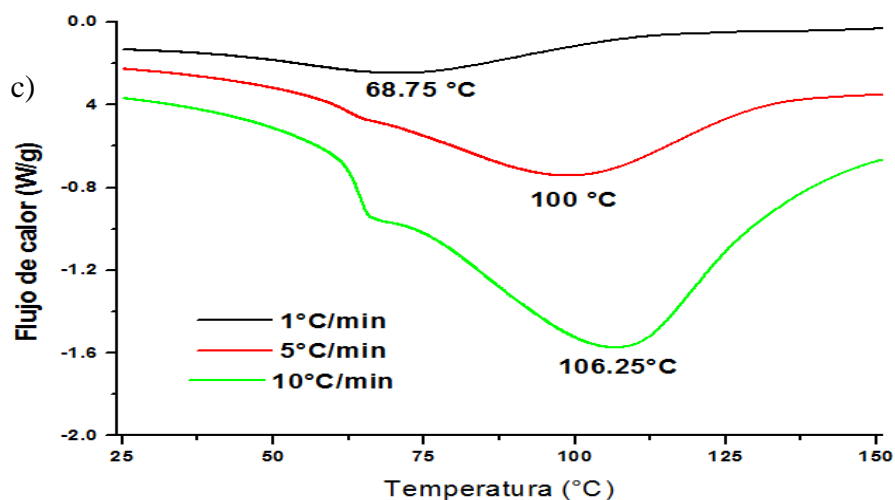


Figura 8. Las curvas DSC fueron se obtuvieron utilizando una rampa de calentamiento de 1, 5 y 10 °C/min. Cada termograma muestra el flujo de calor (W/g) contra la temperatura (°C). a) Muestra liofilizada del copolímero de Clg-PVP, b) Termograma de colágena I nativa y c) Termograma de PVP.

En los termogramas independientemente de la velocidad de calentamiento y de la muestra en cuestión, se observa una línea base inicial que representa las moléculas en su estado nativo enmarcando la fase de pre-transición, seguida de la fase de transición de primer orden (un pico) corresponde al proceso de desnaturalización de los compuestos. Dado que el proceso de desnaturalización no es prolongado, el flujo de calor regresa a valores comparativamente bajos a la línea base inicial, indicando la etapa de post-transición donde la población de moléculas se encuentra en su estado

desplegado, como se ha reportado para el proceso de desnaturalización de biomoléculas de origen proteico (108, 109).

Para la velocidad de calentamiento más baja que se aplicó a los sistemas (1°C/min), se observa que las muestras de CLG-PVP y CLG comparten el valor de flujo de calor, que fue de -0.4 W/g, en contraste, la muestra de PVP mostró un valor de 0.25 W/d. Este hallazgo, indica que el proceso de desnaturalización de las muestras de CLG y CLG-PVP son semejantes, lo cual permite inferir que la estabilidad térmica del biopolímero de CLG-PVP se debe en gran medida a su componente proteico representado por la CLG, y no así al componente sintético representado por la PVP, esto en virtud de que un flujo de calor más bajo favorece el estado nativo, mientras que un flujo de calor elevado favorece el estado desnaturalizado en el equilibrio termodinámico de los compuestos. De manera conjunta, las temperaturas de transición (temperatura a la cual se alcanzó el máximo valor de flujo de calor), muestran que la PVP es el componente más estable del biopolímero, ya que éste requiere de un flujo de calor mayor para que su desnaturalización ocurra, (CLG = 62.5°C, CLG-PVP = 48.07°C y PVP = 68.75°C) como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Tabla comparativa de los resultados arrojados por el análisis térmico a diferentes velocidades de calentamiento.

Velocidad de calentamiento (°C/min)	CLG		CLG-PVP		PVP	
	F _t , Flujo de calor (W/g)	T _t (°C)	F _t , Flujo de calor (W/g)	T _t (°C)	F _t , Flujo de calor (W/g)	T _t (°C)
1	-0.4	62.5	-0.4	48.07	-0.25	68.75
5	-1.2	93.9	-0.6	94.05	-0.75	100.0
10	-1.9	112.5	-2.0	112.5	-1.60	106.25

F_t, Fase de transición; T_t, temperatura de transición. Las siglas de CLG-PVP, CLG y PVP corresponden a las muestras del biopolímero y de sus componentes por separado respectivamente en estado sólido. n=3

El comportamiento cinético empleando una velocidad de calentamiento de 5°C/min, muestra una tendencia diferente, ya que utilizando esta rampa de calentamiento, se determinó que el CLG-PVP (Flujo de calor -0.6) es más estable térmicamente en comparación con las muestras de PVP y CLG, las cuales mostraron un valor de flujo de calor de -1.2 W/g y 0.75W/g, respectivamente. Sin embargo, la temperatura de transición (desnaturalización) muestra ligeras diferencias entre los compuestos (CLG = 93.9°C, CLG-PVP = 94.05°C, PVP = 100°C), aunado a esto, la etapa de transición es más prolongada en la muestra de CLG (mostrando un pico con un área de la curva mayor) indicando la ocurrencia de un proceso de desnaturalización mayor en comparación con las muestras de CLG-PVP y PVP.

De manera conjunta, las muestras sometidas a una velocidad de calentamiento de 10°C/min, se observa un patrón semejante a los

resultados anteriores, ya que mediante este análisis se observó que la muestra de PVP es más estable térmicamente, mientras que las muestras de CLG y CLG-PVP presentan un patrón de desnaturalización semejante, dichas muestras exhiben valores de flujo de calor -1.9 y -2.0 W/g, respectivamente. Sin embargo, el análisis comparativo respecto a las temperaturas de transición, se homogeniza a esta velocidad de calentamiento, estas temperaturas máximas fueron, 112.5 °C para las muestras de CLG y CLG-PVP, respectivamente y 106.25 para la PVP, confirmando que el biopolímero térmicamente conserva mayor similitud con el comportamiento del componente proteico, el cual requiere menos energía para el proceso de desnaturalización, sin embargo en el termograma comparativo a esta velocidad se puede observar claramente la disminución del flujo de calor para el biopolímero, con lo que se puede inferir que el proceso de desnaturalización con tratamiento térmico se lleva a cabo con menor energía lo que implica una organización conformacional menos estable que el de sus componentes por separado Figura 9.

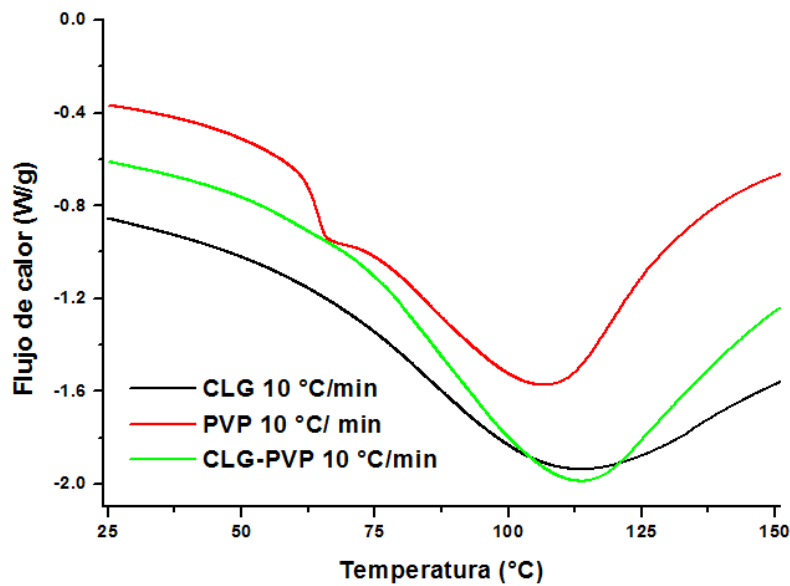


Figura 9. Termograma comparativo de las curvas DSC empleando la velocidad de calentamiento de 10°C/min, para el copolímero y sus componentes por separado del flujo de calor (W/g) contra temperatura (°C).

8.4. Determinación de la susceptibilidad frente a la desnaturalización

El análisis electroforético del biopolímero CLG-PVP y CLG-I, frente a la acción digestiva de urea, tripsina y proteinasa K, no pone en evidencia diferencias en los periodos de tiempo de tratamiento establecidos para cada uno, no obstante los patrones de bandeo entre los dos compuestos en general, proporcionan información valiosa.

En el tratamiento con urea, se observa desplazamiento en la movilidad relativa de las agrupaciones beta y alfa de colágena nativa, mientras que el biopolímero muestra una estructura más compacta que nos permite inferir una mayor resistencia a la acción de esta

enzima, debido a que su acción más directa es con el solvente, para promover el estado desplegado disminuyendo las fuerzas repulsivas de sus grupos hidrófobos con el medio, el comportamiento del biopolímero resulta consecuente ya que en este se incorporan estructuras alifáticas provenientes de la PVP, incrementando la proporción hidrofóbica y disminuyendo así la susceptibilidad.

El patrón que muestra la CLG-I ante tripsina permite observar las bandas alfa 1 y 2, sin embargo no se aprecia degradación significativa en comparación con el biopolímero. Esto probablemente se deba a que la copolimerización de CLG-I con PVP no expone los sitios de corte de esta enzima exopeptidasa que tiene su acción en los extremos carboxilo los residuos de arginina y lisina, los cuales abundan en la estructura de la colágena. Aunado a esto, en el copolímero de CLG-PVP, existe un impedimento estérico proporcionado por el componente inorgánico del compuesto (PVP), lo cual limita la degradación enzimática. En contraste, la desnaturalización catalizada por la proteinasa K, favoreció una desnaturalización del biopolímero de CLG-PVP así como de CLG-I, sin embargo, en el biopolímero se aprecia una menor sensibilidad ante la degradación enzimática, ya que en el patrón electroforético de CLG-I se observan algunas bandas por debajo del sexto marcador de peso molecular (30 Da). Este hallazgo que debe de confirmarse indicaría que en el copolímero de CLG-PVP algunos sitios de glicina están bloqueados por lo que la proteinasa K no puede hidrolizarlos Fig. 10.

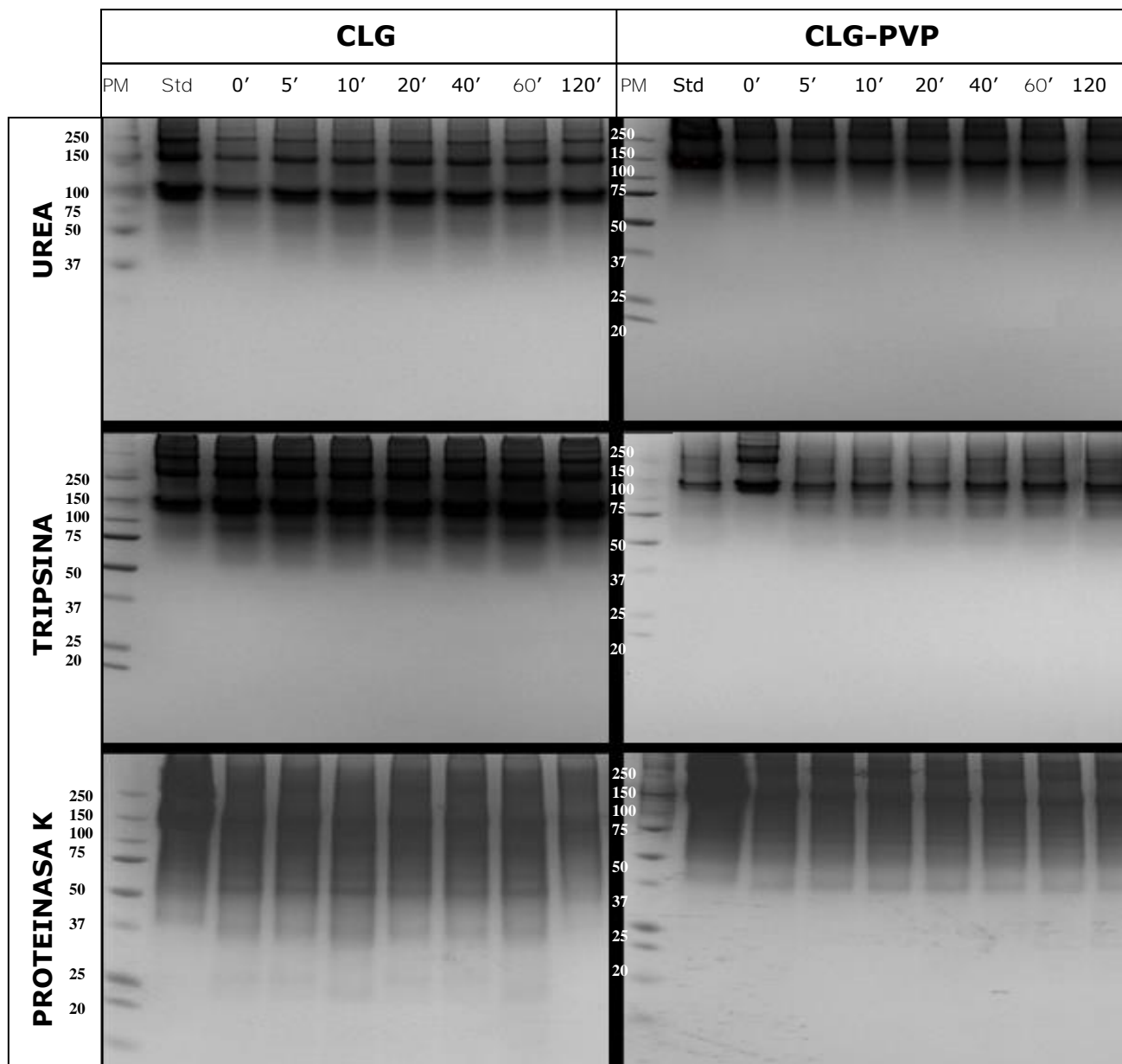


Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE de la colágena nativa I y biopolímero de CLG-PVP ante la acción de urea, tripsina y proteinasa K, durante 7 tiempos (0, 5, 10, 20, 40, 60 y 120 min), reveladas con azul de Coomassie.

9. Discusión

El análisis térmico, reveló que el biopolímero de CLG-PVP es menos estable que sus componentes por separado, ya que presenta un flujo de calor muy similar al de la mezcla física, sin embargo requiere una temperatura de transición comparativamente menor (CLG = 62.5°C, CLG-PVP = 48.07°C y PVP = 68.75°C). Este bajo requerimiento de inducción térmica para alcanzar el fenómeno de desnaturalización está intrínsecamente relacionado a las uniones intermoleculares (CLG-PVP) e intramoleculares (CLG-CLG, PVP-PVP) de los componentes que dan origen al biopolímero, por lo que con base en estos hallazgos se puede inferir que la estabilidad térmica que exhibe el biopolímero se debe principalmente a su componente proteico representado por la CLG-I y no así por la presencia de su contraparte sintética (PVP), como ha sido descrito para diversas mezclas de CLG y PVPs, en los cuales se han develado sutiles cambios térmicos al mezclar estos compuestos e irradiarlos con ionización UV (4, 101, 110).

El estudio de la digestión enzimática de la CLG-I como parte de la matriz extracelular es muy relevante debido a que se trata de un proteína crítica para la regulación en la función de células epiteliales, mesénquimales y troncales, ya que tiene una influencia directa en la

célula por medio de múltiples mecanismos como la forma, polaridad, expresión genética, migración, invasión, proliferación, diferenciación y vías de muerte celular, por lo que la optimización del método para demostrar las pequeñas diferencias que presenta el compuesto de CLG-PVP irradiado y que le confieren actividad biológica es necesario. Como una perspectiva del proyecto, se propone un método de ultrasonicación, seguido con una incubación nocturna con tripsina en presencia de un agente surfactante que no altere la función enzimática, y de acuerdo a estudios previos se puede llegar a obtener una resolución del patrón de bandas de 85 y 60 péptidos, con **una cobertura de 35 y 39 % para las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$** , respectivamente (111).

Probablemente, las interacciones entre la CLG-I y la PVP no inducen cambios significativos en la estabilidad térmica de los componentes al ser mezclados e irradiados para conformar el biopolímero (CLG-PVP), este hallazgo ya ha sido descrito previamente en diversas mezclas de CLG y PVPs de mayor masa molecular, en los cuales se ha demostrado que los cambios conformacionales que se induce al mezclar estos compuestos e irradiarlos con ionización UV son pequeños tanto térmica como topográficamente (4, 45, 48-55, 101-110).

10. Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos es posible concluir que los efectos de la radiación sobre el copolímero de CLG-PVP inducen pequeños cambios en sus propiedades térmicas, y estructurales como se demostró en el análisis por microscopía electrónica de barrido, sin embargo, la significancia biológica es la principal favorecida, dado que el copolímero presenta actividad biológica que no poseen sus componentes por separado, como se ha reportado previamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible concluir que el biopolímero de CLG-PVP presenta una estabilidad térmica y enzimática (proteínasa K) ligeramente mayor en comparación de sus componentes por separado, aunado a cambios estructurales que preservan características topográficas de los componentes natural (CLG-I) y sintético (PVP).

11. Bibliografía

1. Smith HJ, Williams H. Introduction to the principles of drug design and action: CRC Press; 2005. 328-36.
2. Subbarao C, Neelakantan P, Subbarao C. In vitro biocompatibility tests of glass ionomer cements impregnated with collagen or bioactive glass to fibroblasts. The Journal of clinical pediatric dentistry. 2012;36(3):269-74.
3. Miller EJ, Gay S. The collagens: An overview and update. Methods in enzymology. 1987;144:3-32.
4. **Sionkowska A, Kaczmarek H, Wiśniewski M, Kowalonek J, Skopinska J.** Surface characteristics of UV-irradiated collagen/PVP blended films. Surface science. 2004;566:608-12.
5. Miller EJ. Isolation and characterization of a chick cartilage collagen containing three identical chains. Biochemistry. 1971;10(9):1652-9.
6. Utto J. Collagen polymorphism: Isolation and partial characterization of $\alpha 1$ (I)-trimer molecules in normal human skin. Archives of biochemistry and biophysics. 1979;192(2):371-79.
7. Brinckmann J, Notbohm H, Müller PK. Collagen: primer in structure, processing and assembly Springer Berlin Heidelberg2005. 1-16 p.
8. Goodsell DS. PDB Molecule of the Month: Collagen. 2000.
9. Hames B, Hooper N. Instant notes in biochemistry2000. 39-47 p.
10. Eyre DR. Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold. Science. 1980;207(4437):1315-22.
11. Bhattacharjee A, Bansal M. Collagen structure: the Madras triple helix and the current scenario. IUBMB life. 2005 Mar;57(3):161-72. PubMed PMID: 16036578. Epub 2005/07/23. eng.
12. Ramachandran GN, Reddi AH. Biochemistry of collagen: Plenum Press; 1976.
13. Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M. Methods of Enzymatic Analysis: Proteins and peptides: Verlag Chemie; 1986. 186-8 p.
14. Tromovitch TA, Stegman SJ, Glogau RG. Zyderm collagen: Implantation technics. Journal of the American Academy of Dermatology. 1984;10(2, Part 1):273-8.
15. Joos U, Ochs G, Ries PE. Influence of Collagenfleece on bone regeneration. Biomaterials. 1980;1(1):23-6.

16. Stadlinger B, Pilling E, Huhle M, Mai R, Bierbaum S, Scharnweber D, et al. Evaluation of osseointegration of dental implants coated with collagen, chondroitin sulphate and BMP-4: an animal study. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2008; 37(1):54-9.
17. Linke RD, Ulmer M, Imhoff AB. Replacement of the meniscus with a collagen implant (CMI). *Operative Orthopadie und Traumatologie*. 2006; 18(5-6): 453-62.
18. Al-Munajjed A, Gleeson J, O'Brien F. Development of a collagen calcium-phosphate scaffold as a novel bone graft substitute. *Studies in health technology and informatics*. 2008; 133:11-20.
19. Fukui N, Sato T, Kuboki Y, Aoki H. Bone tissue reaction of nano-hydroxyapatite/collagen composite at the early stage of implantation. *Bio-medical materials and engineering*. 2008; 18(1):25-33.
20. Liu L, Zhang L, Ren B, Wang F, Zhang Q. Preparation and characterization of collagen-hydroxyapatite composite used for bone tissue engineering scaffold. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*. 2003; 31(4): 435-48.
21. Liu W, Merrett K, Griffith M, Fagerholm P, Dravida S, Heyne B, et al. Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes. *Biomaterials*. 2008; 29(9): 1147-58.
22. Zhong S, Teo WE, Zhu X, Beuerman R, Ramakrishna S, Yung LYL. Formation of collagen-glycosaminoglycan blended nanofibrous scaffolds and their biological properties. *Biomacromolecules*. 2005; 6(6):2998-04.
23. Daamen WF, Nillesen ST, Wismans RG, Reinhardt DP, Hafmans T, Veerkamp JH, et al. A biomaterial composed of collagen and solubilized elastin enhances angiogenesis and elastic fiber formation without calcification. *Tissue Engineering Part A*. 2008; 14(3):349-60.
24. Daamen WF, Nillesen S, Hafmans T, Veerkamp J, Van Luyn M, Van Kuppevelt T. Tissue response of defined collagen-elastin scaffolds in young and adult rats with special attention to calcification. *Biomaterials*. 2005; 26(1): 81-92.
25. Yao C-C, Yao P, Wu H, Zha Z-G. Absorbable collagen sponge combined with recombinant human basic fibroblast growth factor promotes nerve regeneration in rat sciatic nerve. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2007; 18(10): 1969-72.

26. Barbani N, Cascone M, Giusti P, Lazzeri L, Polacco G, Pizzirani G. Bioartificial materials based on collagen: 2. Mixtures of soluble collagen and poly (vinylalcohol) cross-linked with gaseous glutaraldehyde. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 1996;7(6):471-84.
27. Scotchford C, Cascone M, Downes S, Giusti P. Osteoblast responses to collagen-PVA bioartificial polymers in vitro: the effects of cross-linking method and collagen content. *Biomaterials*. 1998;19(1-3):1-11.
28. Krötzsch-Gómez FE, Furuzawa-Carballeda J, Reyes-Márquez R, Quiróz-Hernández E, de León LD. Cytokine Expression is Downregulated by Collagen-Polyvinylpyrrolidone in Hypertrophic Scars¹. *Journal of investigative dermatology*. 1998;111(5):828-34.
29. Chimal-Monroy J, Bravo-Ruíz T, FURUZAWA-CARBALLEDA G, Cruz J, Almazan A, KRÖTZSCH-GÓMEZ F, et al. Collagen-PVP Accelerates New Bone Formation of Experimentally Induced Bone Defects in Rat Skull and Promotes the Expression of Osteopontin and SPARC during Bone Repair of Rat Femora Fractures. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;857(1):232-6.
30. Almazán Díaz A, de la Cruz García JC, Lira Romero JM, Arrelin G, Chimal Monroy J, Díaz de León L, et al. Investigación experimental de la regeneración ósea en fémures de rata después de la aplicación de colágena 1 polimerizada: estudio radiológico, histológico e histoquímico. *Rev mex ortop traumatol*. 1996;10(3):142-52.
31. Bermúdez Hickey R, Nesme Avila W, Ruiz Flores L, Suárez E. Tratamiento de la pseudoartrosis de tibia con colágeno polivinilrrolidona. *Rev mex ortop traumatol*. 1999;13(2):148-51.
32. Cervantes-Sánchez CR, Olaya E, Testas M, García-López N, Coste G, Arrellin G, et al. Collagen-PVP, a collagen synthesis modulator, decreases intraperitoneal adhesions. *Journal of Surgical Research*. 2003;110(1):207-10.
33. **Caldelas C, Zarur M. Jumper's knee. Surgery and arthroscopic treatment with scraping and povidone collagen in high-performance athletes. *Acta Ortop Mex*. 2007;21(5):234-8.**
34. De Hoyos Garza A, Aguilar EAE, Richards GC. Ileocolonic ulcer treated by endoscopic application of collagen-polyvinylpyrrolidone. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 2007;21(8):513-5.

35. De Hoyos A, Monroy M, Checa G, Rodríguez P. Collagen/povidone as a new endoscopic treatment option in peptic ulcer bleeding. *Endoscopy*. 2006; 38(01): 99.
36. Furuzawa C, García A. Estudio piloto sobre la eficacia del uso de la colágena-polivinilpirrolidona (Clg-PVP) en la regeneración ósea en cirugía endodóncica. *Revista Odontológica Mexicana*. 2005; 9(4): 191-6.
37. Furuzawa-Carballeda J, Alcocer-Varela J, Díaz de León L. Collagen-PVP Decreases Collagen Turnover in Synovial Tissue Cultures from Rheumatoid Arthritis Patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999; 878(1): 598-602.
38. Furuzawa-Carballeda J, Cabral AR, Zapata-Zuñiga M, Alcocer-Varela J. Subcutaneous administration of polymerized-type I collagen for the treatment of patients with rheumatoid arthritis. An open-label pilot trial. *The Journal of rheumatology*. 2003; 30(2): 256-9.
39. Furuzawa-Carballeda J, et al. La colágena-polivinilpirrolidona, administrada localmente, previene la formación de adherencias peritoneales en un modelo murino. *Rev Esp Med Quir*. 2001; 6(2): 11-6.
40. Furuzawa-Carballeda J, Krötzsch E, Barile-Fabris L, Alcalá M, Espinosa-Morales R. Subcutaneous administration of collagen-polyvinylpyrrolidone down regulates IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, ELAM-1 and VCAM-1 expression in scleroderma skin lesions. *Clinical and experimental dermatology*. 2005; 30(1): 83-6.
41. Furuzawa-Carballeda J, P.M. M-R, D. C-R, V. S-A, M.I. V-R, M. D-Z, et al. Anti-inflammatory Effect of Polymerized Type-I Collagen (Polymerized-IClg) vs. Others Modified Extracellular Matrix Proteins (MECMPs) in CIA. 13th International Congress of Immunology-ICI. 2007: 269-75.
42. Furuzawa-Carballeda J, Muñoz-Chablé O, Macías-Hernández S, Aguallimpia-Janning A. Effect of polymerized-type I collagen in knee osteoarthritis. II. In vivo study. *European journal of clinical investigation*. 2009; 39(7): 598-606.
43. Furuzawa-Carballeda J, Rodríguez-Calderón R, León L, Alcocer-Varela J. Mediators of inflammation are down-regulated while apoptosis is up-regulated in rheumatoid arthritis synovial tissue by polymerized collagen. *Clinical & Experimental Immunology*. 2002; 130(1): 140-9.

44. Saitta B, Gaidarova S, Cicchillitti L, Jimenez SA. CCAAT binding transcription factor binds and regulates human COL1A1 promoter activity in human dermal fibroblasts: demonstration of increased binding in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism*. 2000; 43(10): 2219-29.
45. Robinson B, et al. Synthesis and Properties on PVP, in *PVP A critical review of the kinetics and toxicology polyvinylpyrrolidone (povidone)*. Michigan, USA: Lewis Publishers; 1990. 7-21 p.
46. Robinson B, et al. Functional Consequences of PVP Uptake by Body Tissues, with Particular Reference to the Reticuloendothelial System (RES) and the Immune System, in *PVP A critical review of the kinetics and toxicology polyvinylpyrrolidone (povidone)*. Michigan, USA.: I. Lewis Publishers; 1990. 105-16. p.
47. Robinson B, et al. Toxicological Studies on PVP, in *PVP A critical review of the kinetics and toxicology polyvinylpyrrolidone (povidone)*. Michigan, USA: Lewis Publishers; 1990. 121-44. p.
48. Hort E, R. G. N-vinyl monomers and polymers. Kirk-Othmer, editor. New York: John Wiley and Sons, Inc.; 1983. 960-79 p.
49. Homann H-H, Rosbach O, Moll W, Vogt PM, Germann G, Hopp M, et al. A liposome hydrogel with polyvinyl-pyrrolidone iodine in the local treatment of partial-thickness burn wounds. *Annals of plastic surgery*. 2007; 59(4): 423-7.
50. Koh S, Maeda N, Hamano T, Hirohara Y, Mihashi T, Hori Y, et al. Effect of internal lubricating agents of disposable soft contact lenses on higher-order aberrations after blinking. *Eye & contact lens*. 2008; 34(2): 100-5.
51. Tunney M, Gorman S. Evaluation of a poly (vinyl pyrrolidone)-coated biomaterial for urological use. *Biomaterials*. 2002; 23(23): 4601-8.
52. Ansari MT, Sunderland VB. Solid dispersions of dihydroartemisinin in polyvinylpyrrolidone. *Archives of pharmacal research*. 2008; 31(3): 390-8.
53. **Marín MT, Margarit M, Salcedo GE. Characterization and solubility study of solid dispersions of flunarizine and polyvinylpyrrolidone. II Farmaco**. 2002; 57(9): 723-7.
54. Jeong SY, Jeon SH, Han GH, Hyeok An K, Bae DJ, Lim SC, et al. Efficient synthesis of individual single-walled carbon nanotube by water-

based catalyst with poly (vinylpyrrolidone). *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2008; 8(1): 329-34.

55. Serdyuk S, Gmiro V. Epinephrine potentiates the analgesic and antidepressant effects of polyvinylpyrrolidone and cholecystokinin due to stimulation of afferents in the gastric mucosa. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2007; 143(3): 350-2.

56. Rippe RA, Almounajed G, Brenner DA. Sp1 binding activity increases in activated Ito cells. *Hepatology*. 1995; 22(1): 241-51.

57. Houglum K, Buck M, Adir V, Chojkier M. LAP (NF-IL6) transactivates the collagen alpha 1 (I) gene from a 5'regulatory region. *Journal of Clinical Investigation*. 1994; 94(2): 808-14.

58. Bornstein P. **Regulation of expression of the α 1 (1) collagen gene: A critical appraisal of the role of the first intron.** *Matrix biology*. 1996; 15(1): 3-10.

59. Antoniv TT, Tanaka S, Sudan B, De Val S, Liu K, Wang L, et al. Identification of a repressor in the first intron **of the human α 2 (I) collagen gene (COL1A2).** *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(42): 35417-23.

60. Wang L, Tanaka S, Ramirez F. GATA-4 binds to an upstream element **of the human α 2 (I) collagen gene (COL1A2) and inhibits transcription in fibroblasts.** *Matrix biology*. 2005; 24(5): 333-40.

61. Inagaki Y, Truter S, Ramirez F. Transforming growth factor-beta stimulates alpha 2 (I) collagen gene expression through a cis-acting element that contains an Sp1-binding site. *Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269(20): 14828-34.

62. Czuwara-Ladykowska J, Shirasaki F, Jackers P, Watson DK, Trojanowska M. Fli-1 inhibits collagen type I production in dermal fibroblasts via an Sp1-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(24): 20839-48.

63. Svegliati S, Canello R, Sambo P, Luchetti M, Paroncini P, Orlandini G, et al. Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2. Amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*. 2005; 280(43): 36474-82.

64. McGaha TL, Le M, Koder T, Stoica C, Zhu J, Paul WE, et al. Molecular mechanisms of interleukin-4-induced up-regulation of type I collagen gene

- expression in murine fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism*. 2003;48(8):2275-84.
65. Jinnin M, Ihn H, Yamane K, Tamaki K. Interleukin-13 stimulates the **transcription of the human $\alpha 2$ (I) collagen gene in human dermal fibroblasts**. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(40):41783-91.
66. Ghosh AK, Bhattacharyya S, Mori Y, Varga J. Inhibition of collagen gene expression by interferon- γ : Novel role of the CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β). *Journal of cellular physiology*. 2006;207(1):251-60.
67. Higashi K, Kouba DJ, Song YJ, Uitto J, Mauviel A. A proximal element within the human alpha 2(I) collagen (COL1A2) promoter, distinct from the tumor necrosis factor-alpha response element, mediates transcriptional repression by interferon-gamma. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 1998 Mar;16(8):447-56. PubMed PMID: 9550262. Epub 1998/04/29. eng.
68. Verrecchia F, Wagner EF, Mauviel A. Distinct involvement of the Jun-N-terminal kinase and NF- κ B **pathways in the repression of the human COL1A2 gene by TNF- α** . *EMBO reports*. 2002;3(11):1069-74.
69. Kouba DJ, Nakano H, Nishiyama T, Kang J, Uitto J, Mauviel A. Tumor necrosis factor-alpha induces distinctive NF-kappa B signaling within human dermal fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001 Mar 2;276(9):6214-24. PubMed PMID: 11087727. Epub 2000/11/23. eng.
70. Hirose T, Nakazato K, Song H, Ishii N. TGF-beta1 and TNF-alpha are involved in the transcription of type I collagen alpha2 gene in soleus muscle atrophied by mechanical unloading. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2008 Jan;104(1):170-7. PubMed PMID: 17916675. Epub 2007/10/06. eng.
71. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes & development*. 2005;19(23):2783-810.
72. Inagaki Y, Truter S, Bou-Gharios G, Garrett LA, de Crombrughe B, Nemoto T, et al. Activation of Proalpha2(I) collagen promoter during hepatic fibrogenesis in transgenic mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998 Sep 29;250(3):606-11. PubMed PMID: 9784393. Epub 1998/10/24. eng.

73. Verrecchia F, Mauviel A. TGF-beta and TNF-alpha: antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression. *Cellular signalling*. 2004 Aug;16(8):873-80. PubMed PMID: 15157666. Epub 2004/05/26. eng.
74. Jesús CM, Teresa BR, E. KGF, Lino DdL. Implantes de fibroquel aceleran la formación de hueso nuevo en defectos óseos inducidos experimentalmente en cráneos de rata: un estudio histológico. *Revista biomédica - Universidad Autónoma de Yucatán*. 1997;8(2):81-8.
75. Furuzawa-Carballeda J, Rojas E, Valverde M, Castillo I, De León LD, Krötzsch E. Cellular and humoral responses to collagen polyvinylpyrrolidone administered during short and long periods in humans. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2003;81(11):1029-35.
76. Gómez-Lizárraga K, Piña-Barba C, Rodríguez-Fuentes N, Romero M. Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino. *Superficies y vacío*. 2011;24(4):137-40.
77. Stegemann H, Stalder K. Determination of hydroxyproline. *Clinica Chimica Acta*. 1967;18(2):267-73.
78. Bollag DM, Edelstein S. *Proteins methods*. USA: Wiley Liss Publications; 1996. 229 p.
79. Flegler SL, Heckman JW, Klomparens KL. *Scanning and transmission electron microscopy: an introduction*. UK: Oxford University; 1993. 225 p.
80. *The Scanning Electron Microscope*. [Internet]. Institute of Metals. 1988.
81. Bard AJ, Mirkin MV. *Scanning electrochemical microscopy*. New York: CRC Press; 2012.
82. Bettina V, Eleni CS. *Electron Microscopy: The Basics, Physics of Advanced Materials* Winter school 2008.
83. V.K. Z, J. H, R.L. S. *A scanning electron microscope*. *ASTM Bull* 1942;117:15-23.
84. González GM, Noguez EA. *Principios de Microscopia Electrónica de Barrido y Microanálisis por Rayos X Característicos*. Facultad de Química: UNAM; 2006.
85. E.L. C, S.B. W. *Thermal Analysis Techniques and Applications*. E.U.A: The Royal Society of Chemistry; 1992.
86. Hatakeyama T, Quinn F. *Fundamentals and applications to polymer science*: Wiley; 1994. 38-40 p.

87. L. MJ, Mortimer CT. *Calorimetría Diferencial de Barrido*: Ed. Perkin Elmer Corporation; 1975.
88. Daniels T. *Thermal Analysis*: Von Nostrand Reinhold Company; 1973. 19 p.
89. Ibarra-Molero B, Sanchez-Ruiz JM. Differential scanning calorimetry of proteins: an overview and some recent developments. *Advanced Techniques in Biophysics*: Springer; 2006. p. 27-48.
90. Sanchez-Ruiz J. Differential Scanning Calorimetry of Proteins. In: Biswas BB, Roy S, editors. *Proteins: Structure, Function, and Engineering. Subcellular Biochemistry*. 24: Springer US; 1995. p. 133-76.
91. Brown ME. *Introduction to thermal analysis: techniques and applications*: Springer; 2001. Chapter 4 p.
92. Reyes-Vivas H, Martínez-Martínez E, Mendoza-Hernández G, López-Velázquez G, Pérez-Montfort R, Tuena de Gómez-Puyou M, et al. Susceptibility to proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: characterization of an enzyme with an intact and a nicked monomer. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2002; 48(3): 580-90.
93. Stumpe MC, Grubmüller H. Interaction of urea with amino acids: implications for urea-induced protein denaturation. *Journal of the American Chemical Society*. 2007; 129(51): 16126-31.
94. **Zangi R, Zhou R, Berne B. Urea's action on hydrophobic interactions.** *Journal of the American Chemical Society*. 2009; 131(4): 1535-41.
95. Rezus Y, Bakker H. Effect of urea on the structural dynamics of water. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103(49): 18417-20.
96. Usha R, Ramasami T. The effects of urea and n-propanol on collagen denaturation: using DSC, circular dichroism and viscosity. *Thermochimica acta*. 2004; 409(2): 201-6.
97. Thomas AW, Seymour-Jones F. The hydrolysis of collagen by trypsin¹. *Journal of the American Chemical Society*. 1923; 45(6): 1515-22.
98. N. SA. *Chemistry of enzymes*. Printers S, editor. Delhi: Discovery Publishing House; 2009. 236-9 p.
99. Barrett AJ, Woessner JF, Rawlings ND. *Handbook of proteolytic enzymes*: Elsevier; 2004.

100. Nurkeeva ZS, Mun GA, Dubolazov AV, Khutoryanskiy VV. pH Effects on the Complexation, Miscibility and Radiation-Induced Crosslinking in Poly (acrylic acid)-Poly (vinyl alcohol) Blends. *Macromolecular bioscience*. 2005; 5(5): 424-32.
101. Sionkowska A. Interaction of collagen and poly (vinyl pyrrolidone) in blends. *European polymer journal*. 2003; 39(11): 2135-40.
102. Kar K, Amin P, Bryan MA, Persikov AV, Mohs A, Wang Y-H, et al. Self-association of collagen triple helix peptides into higher order structures. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281(44): 33283-90.
103. Hulmes D, Jesior J-C, Miller A, Berthet-Colominas C, Wolff C. Electron microscopy shows periodic structure in collagen fibril cross sections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981; 78(6): 3567-71.
104. Cronan JE. The Biotinyl Domain of *Escherichia coli* Acetyl-CoA Carboxylase Evidence that the "thumbs" structure is essential and that the domain functions as a dimer. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(40): 37355-64.
105. Meseguer-Olmo L, Muñoz-Ruiz J, Bernabeu-Esclapez A, Clavel-Sainz Nolla M, Arcos-Pérez D, Vallet-Regí M, et al. Cinética de crecimiento in vitro de osteoblastos humanos sobre cerámica porosa de hidroxiapatita. *Rev Orto Traumatol*. 2014; 58(05): 224-32.
106. Ball M, Grant DM, Lo WJ, Scotchford CA. The effect of different surface morphology and roughness on osteoblast-like cells. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2008 Sep; 86(3): 637-47. PubMed PMID: 18022800. Epub 2007/11/21. eng.
107. Yannas IV, Tzeranis DS, Harley BA, So PT. Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization. *Philosophical transactions Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*. 2010 Apr 28; 368(1917): 2123-39. PubMed PMID: 20308118. Pubmed Central PMCID: PMC2944393. Epub 2010/03/24. eng.
108. Robertson AD, Murphy KP. Protein Structure and the Energetics of Protein Stability. *Chemical reviews*. 1997 Aug 5; 97(5): 1251-68. PubMed PMID: 11851450. Epub 1997/08/05. Eng.
109. Muñoz V, Sanchez-Ruiz JM. Exploring protein-folding ensembles: a variable-barrier model for the analysis of equilibrium unfolding experiments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America. 2004 Dec 21;101(51):17646-51. PubMed PMID: 15591110. Pubmed Central PMCID: PMC539728. Epub 2004/12/14. eng.

110. Sionkowska A, Wisniewski M, Kaczmarek H, Skopinska J, Chevallier P, Mantovani D, et al. The influence of UV irradiation on surface composition of collagen/PVP blended films. *Applied Surface Science*. 2006 12/15/;253(4):1970-7.

111. Hansen KC, Kiemele L, Maller O, O'Brien J, Shankar A, Fornetti J, et al. An in-solution ultrasonication-assisted digestion method for improved extracellular matrix proteome coverage. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2009 Jul;8(7):1648-57. PubMed PMID: 19351662. Pubmed Central PMCID: PMC2709248. Epub 2009/04/09. eng.