



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FÍSICOQUÍMICA DEL COLÁGENO FIBRILAR DE *Holothuria inornata* y *Holothuria lubrica* DISUELTO CON PEPSINA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

JORGE AUGUSTO OSORIO KUAN

TUTOR PRINCIPAL

Dr. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
Instituto de química

MIEMBROS DE COMITÉ TUTOR

Dr. FRANCISCO ALONSO SOLÍS MARÍN
Instituto de ciencias del mar y limnología

Dr. HORACIO REYES VIVAS
Instituto nacional de pediatría

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Junio de 2019



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.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi familia. A mi mamá Dolly, mis hermanas Dayana y Tatiana y a mi abuelita Yoya. Que este logro sea motivo de felicidad para todos y sirva para permanecer más unidos

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar mis estudios de maestría y abrirme las puertas a esta gran institución académica.

Al instituto de química y en particular al laboratorio de Bioquímica 2 por permitirme realizar mis investigaciones en sus instalaciones.

Al Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros por la oportunidad de hacer parte de su grupo, su confianza sin límites y constante aliento para terminar este proyecto.

Al Dr. Francisco Solís Marín y al Dr. Horacio Reyes Vivas quienes fungieron como mis tutores durante el transcurso de la maestría. Su apoyo y acertadas recomendaciones, fueron fundamentales para la culminación de este proyecto.

A los integrantes del comité sinodal Dr. Jaime Mas Oliva, Dra. Anna Kozina, Dr. Leovigildo Quijano, Dra. Judith Sánchez Rodríguez y el Dr. José Estuardo López Vera.

A la Dra. Delia Rosalba Simental Crespo por el constante apoyo en el proyecto y también por brindarme la posibilidad de compartir mis avances en el IEC 16.

A la Dra. María Esther Duipotex Chong y la Dra. Rosa María Vigueras Villaseñor por su apoyo en la realización de este trabajo.

A la Dra. Marisol Reyes Lezama por su apoyo con los experimentos de FTIR y también a la Dra. Annia Rodríguez Hernández y la QFB María del Rocío Patiño Peña por sus enseñanzas y soporte en los experimentos de dicroísmo circular.

Al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca 48227 de la convocatoria de becas nacionales del segundo periodo de 2017.

Al programa de apoyo a los estudios de posgrado (PAEP).

Al programa de maestría y doctorado en ciencias bioquímicas; a Julio y la maestra Norma por atenderme con tanta amabilidad y colaborarme en todas las veces que necesité de su ayuda (las cuales, fueron bastantes).

A mi madre, abuela y hermanas por su aliento y entusiasmo, los cuales fueron vitales para llevar a término mis estudios de maestría.

A Verónica por todo su amor, comprensión, entusiasmo y bonitos deseos.

A mis amigos tanto de Colombia como México, compañeros de laboratorio (Alan, Esteban, Miguel, Martha, María, Noé, Noel, Rogeiro, Fernando, Frank, Aranza, Sergio y Ulises) y todas L.A.S personas que hicieron de mi estancia en este país una experiencia feliz. A todos ellos mi más sincera gratitud y amistad.

"I could only raise my hat to a group of creatures that
seemed to be created especially to confuse and baffle the researchers ... "

Libby Henrietta Hyman, 1955

Tabla de contenido

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
4. Marco de referencia.....	5
4.1 Phylum Echinodermata.....	5
4.1.1 <i>Holothuria (Halodeima) inornata</i> Semper, 1868.....	6
4.1.2 <i>Holotuhria (Selenkothuria) lubrica</i> Selenka, 1867.....	7
4.2 Antecedentes en la investigación en equinodermos aplicada a la biotecnología y bioprospección.....	8
4.3 Estructura de proteínas.....	10
4.3.1 Aminoácidos.....	10
4.3.2 El esqueleto de la estructura de las proteínas.....	11
4.3.3 Estructura secundaria.....	12
4.3.3.1 Hélices α	13
4.3.3.2 Estructuras β	13
4.3.3.3 Hélices de poliprolina y colágeno.....	14
4.3.3.4 Giros.....	15
4.4 Matriz extracelular.....	15
4.4.1 Colágeno.....	16
4.4.1.1 Familia del colágeno.....	19
4.4.1.1.1 Colágenos fibrilares.....	20
4.4.1.1.2 Colágenos asociados a fibrillas con triple hélices interrumpidas (<i>Fibrillar associated collagens with interrupted triple helix</i> [FACIT's])....	21
4.4.1.1.3 Colágenos asociados a membranas.....	22

4.4.1.1.4 Colágenos formadores de redes.....	23
4.4.1.1.5 Multiplexinas.....	24
4.4.1.1.6 Colágeno XVI y la familia de proteínas Emu.....	24
4.4.1.2 Entrecruzamientos del colágeno.....	24
4.4.1.3 Fibrilogénesis.....	25
4.4.1.4 Colágeno en equinodermos.....	26
4.4.1.5 Tejido colagénico mutable.....	28
5. Objetivo General.....	34
6. Objetivos Específicos.....	34
7. Hipótesis.....	34
8. Método.....	35
8.1 Estrategia experimental.....	35
8.2 Naturaleza de las muestras.....	36
8.2.1 Codificación de las muestras.....	36
8.2.1.1 Muestras del extracto colagénico sin purificar.....	36
8.2.1.2 Fracciones FPLC.....	36
8.2.1.2.1 Fracciones FPLC <i>Holothuria inornata</i>	36
8.2.1.2.2 Fracciones FPLC <i>Holothuria lubrica</i>	36
8.2.1.3 Muestra disuelta en ácido acético 0.1 M.....	36
8.2.1.4 Muestra de colágeno de rata tipo I Sigma-Aldrich®.....	36
8.3 Extracción y purificación de colágeno.....	37
8.3.1 Protocolo original.....	37
8.3.2 Modificaciones en el protocolo de extracción de colágeno fibrilar.....	38
8.3.3 Protocolo ajustado para volúmenes en tubos falcon de 50 ml.....	38
8.4 Cuantificación de proteína BCA.....	38

8.5 Separaciones cromatográficas.....	39
8.5.1 FPLC.....	39
8.5.2 HPLC.....	39
8.5.2.1 Cromatografía de exclusión molecular.....	39
8.5.2.2 Cromatografía de intercambio catiónico.....	40
8.6 Caracterización fisicoquímica.....	40
8.6.1 Peso molecular.....	40
8.6.1.1 SDS-PAGE.....	40
8.6.1.2 Densitometría GelAnalyzer.....	40
8.6.2 Identificación por LC-MS.....	40
8.7 Caracterización estructural.....	41
8.7.1 Determinación del agregamiento y solubilidad.....	41
8.7.1.1 Diámetro hidrodinámico.....	41
8.7.1.2 Verificación de solubilidad del colágeno.....	41
8.7.2 Espectroscopia en el Infrarrojos.....	42
8.7.2.1 FTIR.....	42
8.7.2.2 ATR.....	42
8.7.3 Dicroísmo circular.....	43
8.7.4 Predicción de estructura secundaria.....	44
8.7.4.1 FTIR.....	44
8.7.4.2 Dicroísmo circular.....	45
8.7.4.2.1 MSSA Spectra Manager™ suite.....	45
8.7.4.2.2 CAPITO.....	45
8.7.4.2.3 DICHROMATCH.....	46
8.7.4.3 Espectros de referencia de péptidos colagénicos.....	47

8.7.4.3.1 2STRUC.....	47
8.7.4.3.2 PDB2CD.....	47
8.7.4.3.3 POLYPRONLINE.....	48
9. Resultados y discusión.....	48
9.1 Separación cromatográfica.....	48
9.1.1 Cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC).....	48
9.1.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	50
9.2 Análisis de densitometría.....	53
9.3 Espectrometría de masas.....	55
9.3.1 Identificación por LC-MS.....	55
9.4 Análisis de la estructura secundaria.....	58
9.4.1 FTIR de las fracciones purificadas por FPLC del extracto de H. inornata. .	58
9.4.1.1 Amida A y B.....	59
9.4.1.3 Amida I y III.....	59
9.4.2 ATR Hino Ac. Acético 0.1M.....	62
9.4.3 Dicroísmo Circular.....	63
9.5 Determinación de la estructura secundaria.....	68
9.5.1 Infrarrojos.....	68
9.5.2 Dicroísmo circular.....	72
9.6 Fibrilogénesis.....	77
9.6.1 Monitoreo por dispersión dinámica de luz (DLS).....	77
10. Conclusiones.....	82
12. Referencias bibliográficas.....	85
13. Anexos.....	100

Índice de figuras

Figura 1.....	11
Figura 2.....	12
Figura 3.....	16
Figura 4.....	17
Figura 5.....	43
Figura 6.....	44
Figura 7.....	46
Figura 8.....	48
Figura 9.....	49
Figura 10.....	50
Figura 11.....	51
Figura 12.....	52
Figura 13.....	53
Figura 14.....	54
Figura 15.....	58
Figura 16.....	60
Figura 17.....	60
Figura 18.....	61
Figura 19.....	61
Figura 20.....	62
Figura 21.....	62
Figura 22.....	63
Figura 23.....	66
Figura 24.....	67

Figura 25.....	68
Figura 26.....	70
Figura 27.....	70
Figura 28.....	75
Figura 29.....	76
Figura 30.....	77
Figura 31.....	79
Figura 32.....	80
Figura 33.....	103
Figura 34.....	105
Figura 35.....	106

Índice de tablas

Tabla 1.....	37
Tabla 2.....	39
Tabla 3.....	45
Tabla 4.....	49
Tabla 5.....	51
Tabla 6.....	54
Tabla 7.....	71
Tabla 8.....	74
Tabla 9.....	75
Tabla 10.....	76
Tabla 11.....	77
Tabla 12.....	99
Tabla 13.....	100
Tabla 14.....	101
Tabla 15.....	102

Lista de acrónimos y siglas

AA	Araquidonic acid
ACE	Angiotensin converter enzyme
Ach	Acetil coline
ADAMTS	A desintegrin and mellaproteinase with trombospodin motifs
AFM	Atomic force microscopy
ASC	Acid solubilized collagen
ATP	Adenosine triphosphate
ATR	Atenuated total reflectance
B1	Thiamine
B2	Ribofalvin
B3	Niacin
BMP1	Bone morphogenetic factor 1
CAPITO	A CD analysis & plotting tool
cbEGF	Calcium binding epidermal growth factor
CCh	Carbamilcoline
CDR	Cystein rich domain
COL	Collagenic domain
CRR	Cystein rich repeat domain
DHA	Docosahexaenoic acid
DLS	Dynamic light scattering
DSSP	Dictionary of secondary structure of proteins
ECM	Extracellular matrix
EEB	Bovine spongiform encephalopathy

EET	Transmissible spongiform encephalopathy
EFG	Epidermal growth factor domain
EPA	Eicosapentaenoic acid
ER	Endoplasmic reticulum
ERGIC	Endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment
FACIT	Fibrilar associated collagens with interrupted helix
FLS	Fibrous long spacing
FN3	Fibronectin 3
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
Gly	Glicine
Hy	Hidroxilisine
Hyp	Hidroxiprolina
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LC-MS/MS	Liquid chromatography-Tandem mass spectrometry
LOX	Lisil oxidase
Lys	Lisine
MARCO	Macrophage receptor with collagen structure
MeACh	Metacoline
MMP	Matrix metalloproteinase
MSSA	Multivariate secondary structure analysis
MTC	Mutable collagenous tissue
NC	Non collagenous domains
NSF	Novel stiffening factor
PCDDDB	Protein circular dichroism data bank
PCR	principal component regression

PDB	Protein data bank
PDI	Protein disulfide isomerase
PLS	Partial least squares
Pro	Proline
PSC	Pepsin solubilized collagen
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
SAXS	Small angle X ray scattering
SEM	Scanning electron microscopy
SLS	Segmental long spacing
SNC	Central nervous system
SR-A	Macrophage scavenger receptors type A
SSECM	Secondary structure estimation calibration model
STRIDE	Structural identification
TB	Transforming growth factor domain binding
TEM	Transmission electron microscopy
TGF-B	Transforming growth factor beta
TIMP	Tissue inhibitor metalloproteinase
TSPN	Thrombospondin N terminal like domain
vWA	Von Willebrand factor A

1. Resumen

Holothuria inornata y *Holothuria lubrica* son abundantes pepinos de mar (clase holothuroidea) que habitan en el litoral del Pacífico mexicano en aguas hasta los 40 metros de profundidad. Este trabajo se enfocó en el aislamiento y caracterización fisicoquímica y estructural del colágeno fibrilar tipo I disuelto con pepsina de las especies antes dichas. El colágeno fibrilar se purificó mediante FPLC usando una columna Superdex HiLoad 16/60 y se logró una identificación positiva como precursor de la cadena α I de colágeno tipo I marino por LC-MS/MS. El peso molecular se estimó en 133 KDa por medio de densitometría en geles SDS-PAGE. El análisis de las cromatografías de exclusión molecular (Shodex® KW802.1) e intercambio catiónico (Bio-Gel® TSK SP-5-PW) reveló la existencia de agregados, que además fueron confirmados por dispersión dinámica de luz presentando radios hidrodinámicos que corresponden con las reportadas para las fibrillas colágenicas. El análisis de la estructura secundaria por espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier de la amida I (1600 – 1700 cm^{-1}) y amida III (1250 – 1400 cm^{-1}) permitió evidenciar la fuerte contribución de estructuras tipo hoja β en las fracciones Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17, Hino FPLC 18-23 y Hino Ac. Acet 0.1mg/ml. Las predicciones de la estructura secundaria por medio de los software secondary structure stimation de la suite Spectra™ Manager y el servidor CAPITO, denotaron la altísima contribución de las categorías estructurales “otro” e “irregular” respectivamente. Se llevó a cabo un análisis informático con péptidos colagénicos del PDB y se hizo uso de los servidores para predecir estructura secundaria 2STRUC y POLYPRONLINE; se encontró la presencia extendida de hélices de poliprolina tipo II (PPII's). La herramienta del PCDDB DICROMATCH emparejó las fracciones Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17, Hino FPLC 18-23, Col I rata y Hino Ac. Acet 0.1mg/ml con colágeno fibrilar tipo II de origen bovino, sugiriendo la identificación positiva del colágeno fibrilar con las marcas espectroscópicas características de las PPII's en sus respectivos espectros de DC. Finalmente, la muestra con evidente estado de agregamiento Hino Ac. Acet. 0.1mg/ml, fue examinada por DC a diferentes temperaturas revelando marcas espectrales posiblemente asociadas con la formación y pérdida de estructura de fibrillas colagénicas.

2. Abstract

Holothuria inornata and *Holothuria lubrica* are sea cucumbers (class holothuroidea) that inhabit the coast of the Mexican Pacific even at depths up to 40 meters. This work focused on the isolation and physicochemical and structural characterization of fibrillar collagen type I solubilized with pepsin from the species aforementioned. Fibrillar collagen was purified by FPLC using a Superdex HiLoad 16/60 column and positive identification was achieved as a precursor of the α I chain of marine type I collagen by LC-MS / MS. The molecular weight was estimated at 133 KDa by densitometry on SDS-PAGE gels.. The analysis of gel permeation (Shodex® KW802.1) and cation exchange chromatography's (Bio-Gel® TSK SP-5-PW) revealed the existence of aggregates; which were also confirmed by dynamic light dispersion presenting hydrodynamic radii that correspond to the reported for collagen fibrils. The analysis of the secondary structure by Fourier transformed infrared spectroscopy of amide I (1600 - 1700 cm^{-1}) and amide III (1250 - 1400 cm^{-1}) revealed a strong contribution of β -sheet structures in the fractions Hino FPLC 8- 11, Hino FPLC 15-17, Hino FPLC 18-23 and Hino Ac. Acet 0.1mg/ml. The prediction of the secondary structure by means of the software secondary structure stimation of the Spectra™ Manager suite and the CAPITO server denoted the very high contribution of the "other" and "irregular" structural categories, respectively. An informatic analysis was carried out with collagen peptides from the PDB and by using the protein secondary structure prediction servers 2STRUC and POLYPRONLINE and an extended presence of polyproline II type helices (PPII's) was found. The PCDDB DICROMATCH tool matched the fractions Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17, Hino FPLC 18-23, Col I rat and Hino Ac. Acet 0.1mg / ml with type II fibrillar collagen from bovine origin, suggesting the positive identification of fibrillar collagen with the characteristic spectroscopic marks of PPII's in their respective DC spectra. The sample Hino Ac. Acet. 0.1mg/ml with evident state of aggregation, was examined by DC at different temperatures revealing spectral marks possibly associated with the formation and loss of structure of collagenic fibrils.

3. Introducción

Los océanos son una fuente inagotable de moléculas con potencial biotecnológico. Esta miríada de moléculas surge por la inmensa biodiversidad de organismos vivos que habitan los ambientes marinos, ocupan más del 70% de la superficie terrestre contando con los entornos aún inexplorados, como las profundidades del mar y el bentos marino debajo de los glaciares. Dentro de los phyla que más se han investigado en este aspecto, se encuentran Porifera, Cnidaria, Mollusca y también Echinodermata. Estos grupos han sido tan extensamente estudiados debido a que todos comparten (con algunas excepciones) el carácter más o menos sésil en su hábito de vida; obligándolos a desarrollar defensas químicas poderosas en su ambiente, las cuales durante millones de años de evolución molecular han refinado sus mecanismos y la afinidad por sus dianas. Específicamente dentro del phylum Echinodermata se han logrado aislar biomoléculas como: antibióticos (Abraham, Nagarajan, & Shanmugam, 2002), moléculas con actividad antitumoral como lectinas (Gana & Merca, 2002), triterpenos glicosilados (Zou et al., 2003) y ácidos grasos ramificados (Yang et al., 2003); así como poderosos analgésicos (Yaacob, Kim, & Mustapha, 1994), opsoninas (Xing & Chia, 2000), glicosaminoglicanos con actividad anticoagulante (Tapon-Brethaudiere et al., 2002), gangliósidos neuritogénicos (Kaneko, Kisa, Yamada, Miyamoto, & Higuchi, 1999; Yamada, Matsubara, Kaneko, Miyamoto, & Higuchi, 2001) entre otras.

Muchos de los compuestos antes señalados, provienen de pepinos de mar, los cuales son organismos dóciles y bentónicos que son comunes a todas las costas, representando a veces hasta el 80% de la biomasa de algunos ambientes marinos (Martínez Melo et al., 2018). Los pepinos de mar también han sido recursos de uso tradicional en la medicina y culturas orientales. Siendo considerados como un alimento nutracéutico debido a la gran cantidad de moléculas con actividades benéficas (Kiew & Don, 2012). Aparte de lo anterior, estos organismos son una fuente rica de colágeno¹ puesto que es muy abundante en su dermis; y más sorprendente aún, es su capacidad de modificar las propiedades mecánicas del tejido conectivo a voluntad y en periodos de tiempo muy cortos, siendo considerado este tejido como tejido colagénico mutable (*mutable collagenous tissue* [MCT])² por diferentes autores. Esta propiedad de modular los componentes del tejido conectivo en respuesta a un estímulo no ha pasado

1 El colágeno es la proteína más abundante en los animales, y suele constituir hasta el 30% del total de proteínas. Actualmente se conocen 28 tipos de colágeno diferentes aunque los más abundantes son los colágenos fibrilares como el I, II y III. La estructura del colágeno se caracteriza por surgir a partir de la interacción entre de 3 L-cadenas α que se enrollan hacia la derecha formando la triple hélice colagénica. Estas hélices colagénicas, pueden estructurarse de manera ulterior para formar una supraestructura molecular como las fibrillas, que es el componente más abundante en los tejidos conectivos (ver sección 4.3.1).

2 Ver sección 4.4.1.5.

desapercibida, y actualmente se propone que el colágeno de origen holoturoideo podría servir para nuevos materiales inteligentes que se adapten dinámicamente a diferentes requerimientos (Kiew & Don, 2012). Sumado a lo anterior, el colágeno de origen marino también presenta otras ventajas frente al de origen bovino. Por ejemplo, los métodos de extracción de colágeno equinodermo permiten aislar fibrillas colagénicas completas³ (Szulgit, 2007), no presentan reacciones de alergenidad cuando se hacen ensayos de citotoxicidad (Ferrario et al., 2015), se encuentran libres de proteínas priónicas⁴ y los métodos de extracción⁵ al parecer no desestructuran a la proteína, manteniendo su triple hélice (Veeruraj, Arumugam, & Balasubramanian, 2013).

Las razones anteriormente expuestas, hacen del colágeno de origen marino un producto comercial bastante apetecido por las industrias farmacéutica y cosmética. Según el portal de noticias CISION® PR Newswire⁶, el mercado mundial de colágeno marino se espera que crezca hasta los 897.5 millones de USD para 2023 a una tasa de crecimiento anual compuesto del 7.7%. Actualmente el tamaño de este mercado es de 620.3 millones de USD por lo que el colágeno marino se encuentra en pleno auge; especialmente el colágeno fibrilar tipo I proveniente de peces. No obstante, aunque la participación en el mercado del colágeno obtenido de estos animales es la más grande, los equinodermos y en especial los pepinos de mar, seguramente jugarán un rol importante dadas sus características especiales y la biocompatibilidad demostrada en los biomateriales elaborados con esta proteína (Ferrario et al., 2015). La abundancia de estos organismos en México (dada la enorme extensión litoral de aproximadamente 11,122 Km, de la cual 7,828 Km le corresponden al litoral del Pacífico/Golfo de California, y 3,294 Km al Golfo de México/Mar Caribe), convierten al país en una fuente importante de este recurso. Sin embargo, los estudios de base sobre las propiedades del colágeno de pepinos de mar oriundos de México, son inexistentes. Por

- 3 La estructura nativa de las fibrillas colagénicas se conoció primero en estos animales, y a partir de ahí se definieron detalles estructurales importantes para la comprensión de la propia estructura molecular de las fibrillas en vertebrados, como la forma paraboidal y el cambio en la polaridad de las moléculas hacia el centro de las fibrillas.
- 4 Los priones causantes de enfermedades como la encefalopatía espongiforme bovina y la enfermedad de Creutzfeld-Jakob pueden contaminar al colágeno durante los procesos de extracción.
- 5 En la literatura, se habla principalmente de dos métodos de extracción: i) Disolución con pepsina (*pepsin solubilized collagen* [PSC]), donde se eliminan los telopéptidos colagénicos volviendo solubles de este modo a las cadenas α colagénicas en un buffer de fosfatos y ii) Disolución con ácido (*acid solubilized collagen* [ASC]), donde el colágeno se disuelve libremente en ácido acético y luego se extrae. Ambos protocolos de extracción son capaces de recuperar buenos rendimientos, aunque el protocolo de PSC suele tener mejores rendimientos.
- 6 Marine Collagen Market - Global Forecast to 2023. Publicado el 27 de Abril de 2018. Consultado el 13 de Marzo de 2019. URL: <https://www.prnewswire.com/news-releases/marine-collagen-market---global-forecast-to-2023-300637942.html>.

lo tanto este trabajo busca proporcionar una caracterización fisicoquímica y estructural del colágeno fibrilar tipo I disuelto con pepsina (PSC) de las especies *Holothuria inornata* y *Holothuria lubrica* como primer paso para la búsqueda y/o propuesta de aplicaciones biotecnológicas novedosas de este recurso.

4. Marco de referencia

4.1 Phylum Echinodermata

Los equinodermos son un grupo de animales marinos cuya característica principal es su cuerpo cubierto de espinas (de ahí su nombre). Este Phylum cuenta con más de 7000 especies actuales reportadas y alrededor de 13000 especies extintas, de las que se tiene información por su extenso registro fósil que data desde el periodo cámbrico (hace 570 Ma) (Brusca, 2003). Los equinodermos tienen planos corporales muy variados, son estrictamente marinos (con excepción de algunos representantes que viven en zonas intermareales) y bénticos (Brusca, 2003). También poseen un endoesqueleto formado por osículos calcáreos que pueden estar fusionados o conectados por tejido conjuntivo (principalmente colágeno), un sistema vascular acuático único en estos animales que cumple una variedad de funciones, desarrollo embrionario típico de los deutostomados⁷ y simetría radial pentámerica (Brusca, 2003). Los equinodermos son animales muy importantes y cumplen diferentes roles en los ecosistemas, desde depredadores como algunas estrellas de mar, ramoneadores de algas como los erizos y detritívoros (pepinos de mar) que se encargan del reciclaje y ciclado de nutrientes en el lecho marino (Brusca, 2003).

El Phylum Echinodermata está constituido por cinco clases correspondientes a i) Crinoidea (lirios de mar) que se caracterizan por presentar la boca orientada hacia arriba, cuerpo en forma de cáliz, pedúnculo aboral (que puede estar presente o no) y brazos ramificados que se proyectan hacia arriba, existen alrededor de 625 especies actuales reportadas; ii) Asteroidea (estrellas de mar) que presentan un cuerpo estrellado generalmente con 5 apéndices (aunque en algunas especies pueden haber más), boca orientada al substrato y ano en la superficie aboral. Para esta clase se reportan 1500 especies actuales; iii) Ophiuroidea (estrellas quebradizas) caracterizadas por la presencia de cinco brazos móviles que se desprenden con facilidad de un cuerpo redondeado o disco, presenta más de 2000 especies en la actualidad; iv) Echinoidea (erizos y dólares de mar) caracterizados por un cuerpo globoso o discoidal, con boca

⁷ La característica que define a los deutostomados, es el hecho que durante la gástrula, el blastoporo que es la abertura que tiene el arquenterón (cavidad embrionaria que forma la luz del tubo digestivo) se convierte en ano, a diferencia de los protostomados en los que el blastoporo da origen a la boca. El desarrollo embrionario de los deutostomados es el mismo que poseen los mamíferos, por lo que los equinodermos, en especial los erizos de mar han sido ampliamente estudiados en su desarrollo embrionario, aportando grandes hallazgos como el descubrimiento de las ciclinas y su papel en la embriogénesis.

orientada hacia el substrato, aparato bucal muy sofisticado (linterna de aristóteles) y presencia de espinas móviles (Brusca, 2003). Existen alrededor de 950 especies actuales; y finalmente, v) Holothuroidea (pepinos de mar) que cuentan con un cuerpo alargado con un claro eje oral-aboral, esqueleto reducido a osículos reducidos, carnosos y con tentáculos especializados para la alimentación alrededor de la boca. Esta clase cuenta con más de 1700 especies vivas (Brusca, 2003).

4.1.1 *Holothuria (Halodeima) inornata* Semper, 1868

Reino:Animalia

Phylum:Echinodermata

Subphylum:Echinozoa

Clase: Holothuroidea

Orden: Holothuriida

Familia: Holothuriidae

Género: *Holothuria*

Subgénero: *Halodeima*

Especie: *Holothuria inornata*

Holothuria inornata, es un pepino de mar caracterizado por ser de talla grande (>200 mm) que presenta 20 tentáculos de color negro. Los pies ventrales son cilíndricos y no contraídos. Superficie dorsal generalmente con cuatro a seis filas de verrugas pequeñas, papilas pequeñas y con pies ambulacrales más pequeños, más o menos cilíndricos dispersos entre ellas. Presenta espículas similares a las de *Holothuria kefersteini* (Sotelo Casas, Cupul Magaña, Solís Marín, & Rodríguez Troncoso, 2015), las cuales consisten de tablas con el disco reducido en la parte dorsal, espira bien desarrollada y barra transversal, cuatro dientes erguidos y ocho proyecciones laterales. En la capa interna de la superficie dorsal presenta placas perforadas pequeñas y dispersas que tienen de dos a cuatro orificios centrales grandes y unos pocos marginales. Las papilas y pies dorsales presentan una placa vestigial o en la mayoría de los casos ausente con una gran cantidad de barrotes rectos con los extremos perforados. Las espículas de la parte ventral son en forma de tabla similares a las del dorso pero aproximadamente de la mitad de tamaño, generalmente reducidas con el disco o los dientes embebidos. Los pies ambulacrales ventrales presentan placa terminal y con grandes placas de soporte, desarrolladas más o

menos simétricamente con dos orificios amplios en el centro; además barrotes rectos iguales a los del dorso, pero en menor cantidad. Su coloración es rojiza o café y usualmente se encuentra recubierta de arena (Solís Marín, Arriaga Ochoa, Laguarda Figueras, & Frontana Uribe, 2009). En cuanto a su distribución, esta especie se distribuye en el Pacífico desde el Golfo de California hasta el norte de Perú; y en las Islas Clarión y Socorro (México), Isla del Coco (Costa Rica), Islas Galápagos (Ecuador) (Solís-Marín et al. 2009), Isla Foca e islas Lobos de Afuera (Perú). Estos organismos en general habitan en aguas someras, entre 0 a 18 metros de profundidad, en hábitats rocosos-arenosos (Alvarado & Solís Marín, 2014)

4.1.2 *Holothuria (Selenkothuria) lubrica* Selenka, 1867

Reino:Animalia

Phylum:Echinodermata

Subphylum:Echinozoa

Clase: Holothuroidea

Orden: Holothuriida

Familia: Holothuriidae

Género: *Holothuria*

Subgénero: *Selenkothuria*

Especie: *Holothuria (Selenkothuria) lubrica*

La descripción de este organismo se transcribió exactamente de Solís Marín et al., en el 2009).

Organismo de forma subcilíndrica, de 50 a 180 mm de longitud; extremo anterior, ancho y truncado, extremo posterior angosto y romo. 20 tentáculos más o menos en posición terminal, de color pardo negruzco aproximadamente del mismo tamaño. Boca dirigida hacia la superficie ventral. Pies ambulacrales de la superficie ventral cilíndricos, papilas dorsales cónicas, dispersas y escasas. Anillo calcáreo bien calcificado, piezas radiales grandes, en forma de “U”; piezas interradales de forma triangular. Una vesícula de poli. Gónadas divididas en hebras de un sólo penacho cerca al anillo calcáreo. Una capa externa de tablas casi escasas, la capa interna se compone de barrotes pequeños o placas, lisos o espinosos. Pies ventrales con una gran placa terminal y la pared de barrotes o

placas de diferentes tamaños, rara vez presentan barras especiales de soporte. Pies dorsales con una placa terminal reducida o sin ella y algunos barrotes cortos que pueden tener orificios terminales o marginales.

4.2 Antecedentes en la investigación en equinodermos aplicada a la biotecnología y bioprospección

Los equinodermos han sido un viejo aliado en las ciencias biológicas y en la investigación científica, empezando por el uso de embriones de erizos de mar en la elucidación de aspectos de biología celular como la mitosis, división celular, diferenciación, formación de órganos, los cuales los conectaron con grandes científicos y precursores de la biología celular como Theodor Boveri, Oscar Hertwig y Daniel Mazia entre otros⁸. Hoy en día, los equinodermos continúan utilizándose como modelo para muchos estudios de biología celular y también aportan valiosa información en estudios de toxicología, dado que su desarrollo embrionario se encuentra muy bien caracterizado (Kim, 2012).

Actualmente, la bioprospección de los productos naturales que generan los equinodermos, es un área fundamental dentro de la investigación relacionada con este phylum. A partir de estudios de este tipo, se han descrito moléculas con diferente naturaleza química y también actividad biológica. En los equinodermos, se han encontrado principalmente saponinas y derivados de esteroides, aunque también terpenoides, glicoproteínas, cerebrósidos, nucleósidos de purinas y pirimidinas, polisacáridos y B-caroteno (Kim, 2014). Por ejemplo, algunas de las saponinas (triterpenos glicosilados y también saponinas aisladas de asteroideos) que se encuentran en organismos como pepinos, estrellas y erizos de mar han mostrado una poderosa actividad hemolítica y antineoplásica (Kim, 2014). Así mismo, los nucleósidos de pirimidinas y purinas de ofiuros también son interesantes desde el punto de vista farmacológico ya que al tener gran afinidad por las bases nitrogenadas (actúan como antimetabolitos⁹), compiten por estas moléculas afectando la síntesis de ácidos nucleicos en tejidos de rápida división celular como el cáncer (Murray et al., 2002). Otra de las

8 Theodor Boveri (1862-1915), fue un científico alemán notable por su contribución a la biología celular en el siglo XIX a la que aportó grandes descubrimientos como el centrosoma y una de las primeras teorías sobre el origen del cáncer que se conoce. Oscar Hertwig (1849 – 1922) fue un zoólogo Alemán experto en la biología del desarrollo comparativa, y ayudó a elucidar las interacciones entre espermatozoides y óvulos durante la fecundación. Daniel Mazia (1912-1996) junto a Katsuma Dan fueron capaces de aislar las estructuras celulares responsables de la mitosis.

9 Los antimetabolitos son sustancias que reemplazan, inhiben o compiten con un metabolito específico. Se ha señalado que los 2' deoxinucleótidos aislados de ciertas especies de ofiuros, pueden servir como fármacos bloqueadores de la transcriptasa reversa del virus del VIH.

características particulares de este grupo, es la capacidad de sintetizar de ácidos grasos poliinsaturados (Kim, 2014) en gran cantidad y almacenarlos en las gónadas, lo cual es un característica altamente deseable, ya que los ácidos eicosapentaenóico (EPA) y docosahexaenóico (DHA) tienen efectos positivos en el tratamiento de la obesidad (Kim, 2014). Por último, recientemente se ha enfocado la atención a los péptidos bioactivos debido a sus propiedades nutraceuticas. Estos péptidos generalmente contienen entre 3 y 20 residuos, y su actividad depende de la composición y también secuencia de aminoácidos. Estas pequeñas cadenas suelen ser inactivas mientras permanecen en la proteína que las contiene; no obstante, su activación (liberación) puede ocurrir durante la digestión gastrointestinal, procesamiento o fermentación (Bordbar, Anwar, & Saari, 2011). Los péptidos bioactivos, también se pueden producir *in vitro* por medio de hidrólisis enzimática con enzimas proteolíticas comerciales, abriendo de este modo nuevas posibilidades para el descubrimiento de péptidos con actividades provechosas. Las principales actividades biológicas caracterizadas para los péptidos de origen marino, corresponden a i) actividad antihipertensiva que ocurre al inhibir a la enzima convertidora de angiotensina I (ACE)¹⁰, ii) actividad antioxidante, iii) Actividad antiproliferativa de cáncer cuyo mecanismo frecuente es la inducción de apoptosis, iv) anticoagulante al prolongar el tiempo parcial de la tromboplastina y v) antimicrobiana (Bordbar et al, 2011).

Aparte de las propiedades de los compuestos biológicamente activos de los equinodermos que se enunciaron en el párrafo anterior, los holoturidos y equinoideos tienen un valor medicinal (tradicionalmente son usados como medicina para la hipertensión, asma, reumatismo entre otras enfermedades) y nutricional, dado que culturalmente son aprovechados como alimento en el sudeste asiático y también china. Por ejemplo, para el pepino de mar *Isostichopus sp.* el análisis nutricional reveló un gran contenido de proteína (alrededor de 7%) y un bajo porcentaje de lípidos (0,3%) (Vergara & Rodríguez, 2016), en otro estudio comparativo de la composición química y nutricional de 8 especies de pepinos de mar, se encontraron valores similares y un alto contenido de ácidos grasos benéficos como PUFA, AA y EPA (Gao et al., 2015), además de vitamina A (retinol), B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina) y diversos minerales (Kim, 2014). Las importantes propiedades nutricionales y medicinales que se le atribuyen a estos organismos, han generado un mercado global donde los pepinos de mar son procesados como un producto seco (Beche de mer), que se comercializa. Tan solo la pesca conjunta de este recurso en el Asia y el océano pacífico alcanza entre las 20000 a 40000 toneladas por año (Bordbar et al., 2011), aunque también existen proyectos para implementar el aprovechamiento en otras partes del mundo como el caribe.

10 La enzima convertidora de angiotensina (ACE) cataliza la reacción de conversión de angiotensina I a angiotensina II, quien es un potente vasoconstrictor responsable de aumentar la tensión arterial.

A parte de las propiedades nutraceuticas de los productos naturales de los equinodermos, y en especial de las saponinas y péptidos con actividad biológica de la clase Holoturidea, recientemente se ha volcado la atención a la proteína constitutiva más abundante en estos organismos, el colágeno.

Las razones que motivan el interés por el aprovechamiento de esta proteína, radican en el enorme aprovechamiento farmacéutico, cosmético e industrial que tiene. No obstante, la mayoría del colágeno que se usa es de origen bovino, el cual ha despertado preocupación en los últimos años debido a los brotes de enfermedades como la EEB encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) y encefalopatía espongiiforme transmisible (EET). Pese a que no se tienen reportes de transmisión directa de la enfermedad por el uso de colágeno de animales infectados, la extensa cobertura mediática que cubrió los famosos brotes de la enfermedad en la década de los 90's generó gran desconfianza por los productos naturales de animales infectados y una importante caída en el consumo de cosméticos con colágeno bovino en Norte América y Europa (Carruthers & Carruthers, 2002), por lo que un posible aprovechamiento de fuentes de esta proteína no convencionales (y sobre todo inocuas para enfermedades transmisibles como EEB o EET), sería de gran valor. Otras de las ventajas de la aplicación de colágeno marino, es la extensa cantidad de esta proteína en los invertebrados, excelente aplicación como proteína de andamiaje, debido a su baja alergenicidad y potencial para el crecimiento de células (ej. formación de hueso) (Silva et al., 2014; Subhan et al., 2014).

4.3 Estructura de proteínas

4.3.1 Aminoácidos

Las proteínas están compuestas por cadenas de L-aminoácidos. El carbono α es quiral excepto en el caso de la glicina y este se encuentra unido a un átomo de hidrógeno, un grupo amino, una cadena lateral y Finalmente, un grupo carboxilo. La secuencia de aminoácidos es la estructura *primaria* y se encuentra conformada por 20 aminoácidos ubicuos a todas las proteínas que han sido seleccionados evolutivamente. Actualmente se han identificado muchas modificaciones postraduccionales en los aminoácidos y muchas de estas, tienen importantes funciones de señalización (Liljas et al., 2009).

Los aminoácidos pueden ser divididos en grupos de acuerdo a sus propiedades de su cadena lateral R:

No polares con grupos R alifáticos: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met.

Con grupos R aromáticos: Phe, Tyr, Trp.

Polares con grupos R no cargados: Ser, Thr, Cys, Pro, Asn, Gln.

Polares con grupos R cargados positivamente: Lys, Arg, His.

Polares con grupos R cargados negativamente: Asp, Glu.

Los pares de residuos de Cys pueden formar puentes disulfuro, uniendo de forma covalente partes de la misma o de diferentes proteínas incrementando de este modo la estabilidad (Liljas et al., 2009).

Las cadenas laterales de los aminoácidos son las que dan a las proteínas sus propiedades, estas pueden no solo determinar el plegamiento, también determinan propiedades de superficie, las cuales son cruciales para la interacción entre moléculas y también la catálisis en las reacciones químicas. Finalmente, estas cadenas laterales en una misma proteína también pueden interactuar entre sí, por ejemplo, los residuos alifáticos no polares interactúan entre si y suelen encontrarse escondidos en la conformación de la proteína, así mismo los residuos polares frecuentemente interactúan con residuos de cargas opuestas y también pueden formar puentes de hidrógeno aumentando el grado de organización y estabilidad (Liljas et al., 2009).

4.3.2 El esqueleto de la estructura de las proteínas

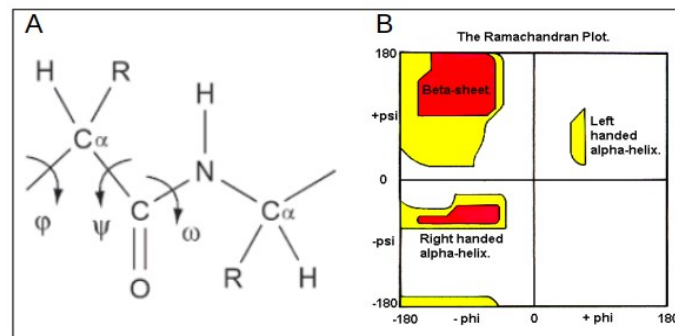


Figura 1. A. Detalle de los ángulos ω , ϕ y ψ en el esqueleto de la estructura de las proteínas (backbone) de una proteína. Debido a la resonancia del doble enlace del grupo CO el ángulo ω puede ser 0° para una posición -cis y 180° para una posición -trans. B. Gráfico de Ramachandran donde se evidencian las regiones a las que se restringen las estructuras secundarias de hélices α orientada la derecha, hélices α orientadas a la izquierda y hojas β .

En las proteínas, los residuos de aminoácidos se encuentran unidos mediante enlaces peptídicos. El enlace entre CO y NH tiene un carácter de doble enlace parcial debido a la resonancia entre el enlace normal y el doble enlace entre N y C. Lo anterior hace que todos los átomos que se conectados al $C\alpha$ se encuentran en el mismo plano. El ángulo ω para un enlace en configuración *trans* corresponde a $\pm 180^\circ$ y es el que más se favorece,

exceptuando a los enlaces peptídicos entre residuos de prolina donde el ángulo ω equivale a 0° . Debido al carácter planar del enlace peptídico, la conformación de los polipéptidos en el esqueleto de la estructura puede ser descrita por dos ángulos de torsión por cada residuo (phi [ϕ] y psi [ψ]) (ver figura 1). Estos ángulos, tienen valores restringidos debido al impedimento estérico entre el oxígeno del carbonilo, el hidrógeno del grupo amino, el hidrógeno del $C\alpha$ y los átomos de las cadenas laterales (Liljas et al., 2009). El gráfico de Ramachandran muestra las regiones permitidas para cada una de las conformaciones estructurales en proteínas (ver figura 1).

En el gráfico de Ramachandran, las dos principales regiones permitidas corresponden a los dos tipos de conformaciones principales observadas en proteínas, las hojas β y las α hélices (inclusive el gráfico describe una pequeña región correspondiente a hélices α orientadas a la izquierda) (Liljas et al., 2009).

4.3.3 Estructura secundaria

El backbone de una proteína posee solamente dos tipos de estructura secundaria regular (Hélices α y Hojas β), las cuales a su vez se muestran claramente en el gráfico de Ramachandran. Estos dos tipos conformacionales satisfacen las necesidades de donadores y aceptores de hidrógenos para la formación de puentes. Las partes de la proteína con regiones irregulares en cuanto a las conformaciones permitidas se conocen como *giros* o *coiled regions* (Liljas et al., 2009).

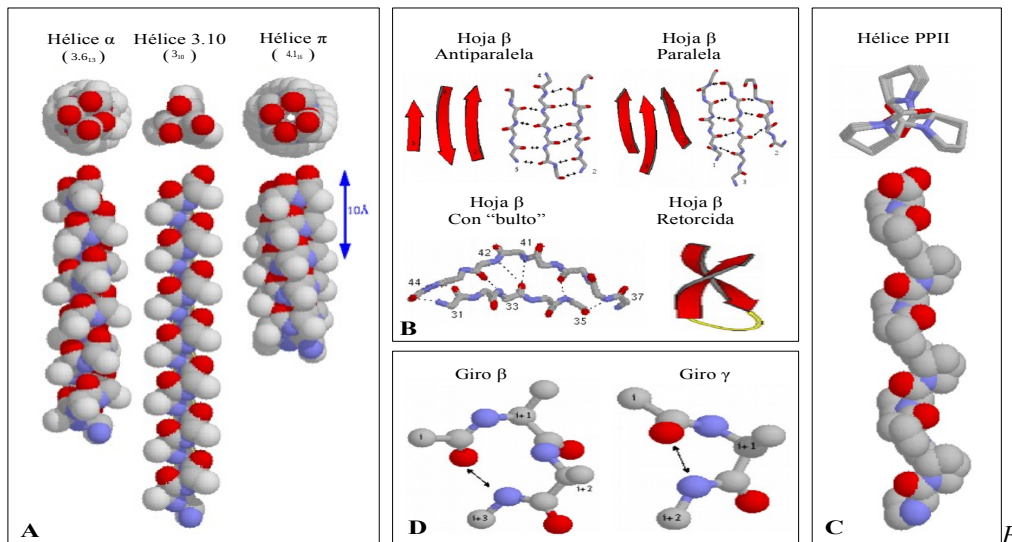


Figura 2. A. Vista superior y lateral de las hélices alpha. De derecha a izquierda se encuentran Hélices α , Hélice 3.10 y Hélice π . B. Tipos de estructuras beta. De izquierda a derecha y luego de arriba hacia abajo: Hoja β antiparalela, Hoja β paralela, Hoja β con "bulto" y Hoja β retorcida. C. Vista superior y lateral de una hélice de polirprolina tipo II. D. Detalle de la estructura de un Giro β y un Giro γ . Todas las imágenes fueron tomadas del recurso en línea http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/course/section8/ss-960531_1.html consultado el 3 de marzo de 2019.

4.3.3.1 Hélices α

Los polipéptidos pueden adoptar diferentes conformaciones de hélice, aunque en la práctica únicamente ocurren regularmente tres. El tipo más común es conocido como la hélice α ó hélice 3.6_{13} (Ver Figura 2.A). En esta nomenclatura, el número 3.6 indica el número de residuos por cada vuelta y el índice 13 la cantidad de átomos en el anillo que se forma mediante un puente de hidrógeno entre el protón la amida NH y el CO de la cadena principal. En este tipo de hélices, los puentes de hidrógeno se forman entre el oxígeno de los carbonilos y el hidrógeno de las amidas de la siguiente vuelta (residuos n y $n+4$). Existe un levantamiento de 1.5 Å por residuo, las cadenas laterales a lo largo de la hélice apuntan hacia afuera en intervalos de aproximadamente 100° y los C β apuntan hacia el extremo N-terminal (Liljas et al., 2009).

El siguiente tipo de hélice es el tipo 3_{10} (Ver Figura 2.A) en donde los puentes de hidrógeno se forman entre el residuo n y $n+3$. La hélice 3_{10} es menos estable que la hélice 3.6_{13} y existen pocos ejemplos de hélices largas de este tipo. El otro tipo de hélice corresponde a la hélice π , en donde los puentes de hidrógeno se forman entre los residuos n y $n+5$ y su nomenclatura es 4.1_{16} (Ver Figura 4.A). Dado el gran número de átomos por vuelta, en este tipo estructural las cadenas laterales se apilan a lo largo de la hélice; usualmente este tipo de estructura se considera inestable dada la gran circunferencia que se forma por vuelta (Liljas et al., 2009).

Las hélices frecuentemente son irregulares y los patrones de puentes de hidrógeno pueden variar en toda la extensión de la hélice. El patrón 3.6_{13} suele ser el más dominante, aunque hacia los extremos ésta se puede hacer más ancha o angosta, y por lo tanto, cambiando el patrón de puentes de hidrógeno a 3_{10} ó 4.1_{16} . En cuanto a las hélices orientadas hacia la izquierda, éstas pueden ser del tipo 3_{10} ó 3.6_{13} aunque son muy cortas (Liljas et al., 2009).

Finalmente, dada la estructura de las hélices en donde los péptidos se orientan en el mismo plano, se favorece el comportamiento tipo dipolo en donde el extremo N-terminal se encuentra con carga parcial positiva y el extremo C-terminal una carga parcial negativa. Lo anterior facilita la estabilización de este tipo de estructura por cargas complementarias en cada uno de los extremos de la hélice (ej. unión de substratos u coenzimas), e inclusive por interacciones electrostáticas cuando las hélices se organizan de forma antiparalela (Liljas et al., 2009).

4.3.3.2 Estructuras β

Las hojas β se forman por largas extensiones de la cadena en donde los grupos CO y NH forman puentes de hidrógeno entre las cadenas vecinas. Las hojas β pueden ser

paralelas, antiparalelas o mixtas, dependiendo de la dirección de la cadena (Ver Figura 4.B). En una estructura de hoja β ideal, todos los grupos NH de las cadenas internas formarían puentes de hidrógeno con los grupos CO. Las cadenas en los bordes tendrían extremos NH y CO libres (Liljas et al., 2009).

Las cadenas laterales en las hojas β se extienden desde la cadena de forma perpendicular y alternando el lado desde el que protruyen. Lo anterior hace que las hojas β no sean planas si no retorcidas en la misma dirección (Liljas et al., 2009) (Ver Figura 2.B).

Dado que los extremos de cada cadena en la estructura de hojas β se encuentran libres, este tipo de estructuras tiene la tendencia de prolongarse al unir nuevas hojas β . Lo anterior ocurre en numerosas proteínas en donde la agregación de subunidades se produce mediante el emparejamiento de láminas. El agregamiento de β amiloides también ocurre de forma similar y consiste en interacciones de hojas β anormales entre dominios o partes de la proteína que normalmente harían parte otro tipo de plegamiento. Finalmente, otra estructura recurrente entre las hojas β es el abultamiento, el cual sucede cuando las cadenas se encuentran fuera de fase por la adición de un aminoácido en una de las cadenas (Ver Figura 2.B). El resultado es un retorcimiento mayor de los plegamientos tipo lámina β (Liljas et al., 2009).

4.3.3.3 Hélices de poliprolina y colágeno

Las secuencias ricas en prolina pueden adoptar un tipo especial de conformación estructural secundaria conocida como hélices de poliprolina. Dependiendo del valor del ángulo ω , la hélice puede ser tipo II (PPII, $\omega:180^\circ$) o tipo I (PPI $\omega:0^\circ$). Las PPII's poseen una orientación hacia la izquierda y en este caso los enlaces peptídicos se encuentran en conformación *-trans*; mientras que las PPI's poseen una orientación hacia el sentido contrario y enlaces peptídicos en posición *-cis*. La longitud de las PPII's es corta (4-8 residuos) lo cual puede ser causando por la falta de elementos estabilizadores como los puentes de hidrógeno (Adzhubei, Sternberg, & Makarov, 2013). Lo anterior también causa que este tipo de estructura sea más flexible que las hélices α . Lo cual no es raro, dado que las PPII's también tienen un levantamiento por residuo casi dos veces mayor que el de las hélices α , lo que las hace más largas con el mismo número de residuos; en este tipo estructural, la cadena principal se encuentra mucho más accesible (Adzhubei, Sternberg, & Makarov, 2013) (Ver Figura 2.C).

Las hélices PPII's se encuentran mucho más expuestas al solvente respecto a otros tipos de estructura secundaria, excepto los giros β , y a pesar de que no forman puentes de hidrógeno entre sus grupos NH y CO, las hélices PPII's al parecer se estabilizan mediante puentes de hidrógeno con el agua, por lo que suelen tener un patrón regular en cuanto a este tipo de interacciones; haciendo que las PPII's se suelen encontrar en las

superficies de las proteínas (Adzhubei, Sternberg, & Makarov, 2013). El principal aminoácido que favorece las PPII's es la prolina, aunque otros residuos hidrofílicos como glutamina, serina, arginina y alanina pueden formar este tipo de estructura. La geometría de las hélices PPII's permite que esta conformación conduzca o comience inmediatamente después de otro motivo estructural, por lo que las PPII's pueden servir como puentes entre diferentes tipos de estructura secundaria. En el gráfico de Ramachandran, la conformación de poliprolinas se encuentra en la región de las estructuras β con valores ϕ : -60° y ψ : 160° (Adzhubei, Sternberg, & Makarov, 2013; Liljas et al., 2009).

Este tipo de estructura es dominante en el colágeno, en donde las tres cadenas de polipéptidos poseen una secuencia altamente repetitiva y rica en prolina (prolina-hidroxiprolina-glicina) que se enrollan entre sí produciendo un tipo especial de triple hélice orientada hacia la izquierda (Liljas et al., 2009). Este tipo de estructura no es única del colágeno y de hecho parece ser un elemento estructural crítico en la interacción proteína-proteína con dominios SH3¹¹ (Adzhubei et al., 2013).

4.3.3.4 Giros

El giro reverso es otro tipo de estructura secundaria regular en las proteínas. Son cortos y suelen conectar dos hojas β . El giro β idealmente forma un puente de hidrógeno entre el CO del residuo n y el grupo NH del residuo $n+3$. Este tipo de giro cerrado impone fuertes restricciones a los residuos en posición $n+1$ y $n+2$. Los aminoácidos que favorecen en este tipo de estructura son la prolina y glicina ya que sus propiedades son importantes para la estabilidad del giro (Liljas et al., 2009) (Ver Figura 2.D).

Otro tipo de giro que se encuentra en algunas proteínas es el giro γ , en donde el puente de hidrógeno se forma entre el grupo CO del residuo n y el grupo NH del residuo $n+2$ (Liljas et al., 2009) (Ver Figura 2.D).

4.4 Matriz extracelular

La matriz extracelular (ECM) es una red compuesta por células y elementos no celulares. Su función consiste no solo de proveer un andamiaje físico en donde de las células se encuentran inmersas, sino también la de regular muchos procesos celulares incluyendo la migración, crecimiento, diferenciación, homeóstasis y morfogénesis (Frantz, Stewart, & Weaver, 2010). La matriz extracelular, consiste de una gran variedad de macromoléculas cuya composición precisa difiere entre tejidos, aunque los

11 Los dominios SH3 consisten de aproximadamente 60 aminoácidos, y tienen similitudes en la secuencia. Estos dominios poseen la misma topología: Dos grupos de tres hojas β antiparalelas empaquetadas una frente a la otra, con dos lazos. Los dominios SH3 se unen a secuencias ricas en prolina pero también tienen preferencia por secuencias ricas en residuos de arginina y leucina.

componentes principales pueden diferenciarse en proteínas fibrosas como el colágeno, elastina, fibronectina, lamininas y también como complejos interfibrilares de carbohidratos y proteínas tales como glicoproteínas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos (Theocharis et al., 2016). Aunque en la mayoría de los tejidos, el colágeno tipo I y el colágeno tipo II (en el cartílago) son los componentes principales respectivamente.

4.4.1 Colágeno

Los colágenos son probablemente las proteínas más abundantes en el reino animal, y se encuentran inclusive en los metazoos más primitivos (Kielty, 2002), llegando a representar cerca del 30% del peso total de proteínas (Ricard, Ruggiero, & Van Der Rest, 2005). Esta proteína, se encuentra principalmente en la matriz extracelular proveyendo soporte y estructura, aunque también participa en otros procesos celulares como la regulación del crecimiento, diferenciación y migración celular mediante la interacción con diversos receptores celulares (Gordon & Hahn, 2011).

La estructura general del colágeno consiste en una hélice alfa compuesta por unidades repetitivas de los aminoácidos Gly-Xaa-Yaa, donde Xaa generalmente es prolina (Pro) y Yaa hidroxiprolina (Hyp) (Gordon, 2011). Las hélices alfa se entretrejen formando una triple hélice (denominada como dominios COL), donde cada una de las cadenas de la molécula es una hélice de poliprolinas tipo II orientada a la izquierda, que se caracteriza por presentar residuos de L-prolina con todos los enlaces peptídicos en conformación *trans* (Engel & Bächinger, 2005). Las tres hélices se encuentran escalonadas por un residuo, es decir, que en la estructura del colágeno la glicina de una hélice se encuentra enfrentada al aminoácido en la posición Xaa de la hélice vecina (y no frente a otra glicina), y este a su vez se ubica frente al aminoácido ubicado en la posición Yaa de la tercera hélice. Finalmente, las tres cadenas se asocian en torno a un mismo eje en sentido de las manecillas del reloj (Ver Figura 3.) (Engel & Bächinger, 2005).

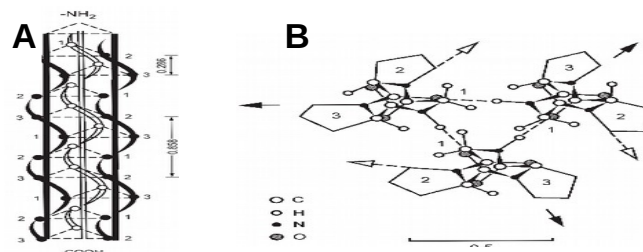


Figura 3.A. Modelo de la triple hélice de colágeno. Obsérvese el tripéptido (Gly—Pro-Pro)_n, donde Gly esta representado por el número 1, prolina por el 2 y 3 cuando se encuentra en la posición Yaa. B. Vista superior del modelo de la triple hélice del colágeno. Se identifican los residuos de Glicina que apuntan hacia dentro de la hélice, mientras los residuos de prolina apuntan hacia afuera.

Un requerimiento para la formación de la hélice, es la presencia del tripéptido Gly-Xaa-Yaa dado que en este la glicina se encuentra hacia el interior de la estructura e interactúa formando puentes de hidrógeno entre el grupo amida (-NH) y el carbonilo (-CO) del aminoácido que ocupa la posición Yaa dando estabilidad a la estructura (Engel & Bächinger, 2005). Las cadenas laterales de los residuos correspondientes a las posiciones Xaa y Yaa se orientan hacia afuera quedando disponibles para interactuar libremente con otras moléculas (Engel & Bächinger, 2005). Lo anterior es muy importante en la formación de fibrillas, dado que las interacciones electrostáticas entre residuos con cargas opuestas de las diferentes moléculas de colágeno en la estructura fibrilar (que se yuxtaponen paralelamente), resultan en el patrón típico de bandas D donde cada periodo, está conformado por dos bandas anchas denominadas “gaps” o “overlaps” que se tiñen con una intensidad diferente (Engel & Bächinger, 2005). Las diferencias en la intensidad de la tinción, son debidas a la organización de las moléculas de colágeno en las fibrillas, puesto que, según el modelo de (Chapman, Tzaphlidou, Meeks, & Kadler, 1990) las 5 moléculas de la proteína se encuentran organizadas de forma escalonada con una diferencia de 67 nm, donde cada “gap” pasa por 4 moléculas de colágeno y cada “overlap” por 5 (Ver Figura 4).

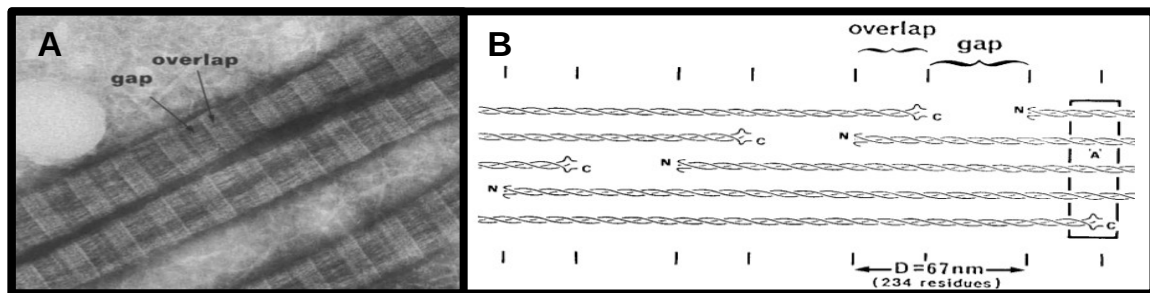


Figura 4. A. Vista de las fibrillas de colágeno por microscopía electrónica de transmisión. Nótese el contraste entre los gaps y overlaps tomado de (Chapman et al., 1990). B. Esquema de la organización de los monómeros de colágeno fibrilar organizándose en una fibrilla.

La forma alargada de los dominios de triple hélice y el arreglo lineal de las cadenas laterales expuestas hacia afuera de la hélice, permiten al colágeno formar estructuras como fibrillas o ensamblar superestructuras moleculares complejas en la piel, hueso, tendón, cartílago, membranas basales y otros tejidos conectivos. Estos tipos de superestructuras moleculares difieren respecto al tipo de colágeno que presentan (Engel & Bächinger, 2005) y también a las interacciones que puede tener esta proteína con otras moléculas en el tejido. Dichas interacciones dependen fundamentalmente de la heterogeneidad de las hélices, las cuales aparte de tener en común el dominio COL, también presentan otros referidos comúnmente como dominios NC (non collagen domains).

Estos dominios, también son conocidos como los propéptidos N-terminal y C-terminal del colágeno y juegan un papel determinante en la biosíntesis, nucleación y propagación de la triple hélice. Durante la biosíntesis del procolágeno en el retículo endoplásmico (ER), los residuos de prolina y lisina son hidroxilados por enzimas unidas a la cara interna de la membrana del RE, luego las lisinas hidroxiladas (hidroxilisinas) son glicosiladas con glucosa y galactosa (Boot & Tuckwell, 2003). A continuación, los dominios C-terminales de cada una de las hélices interactúan por medio de puentes disulfuro, estabilizando de esta manera a las 3 hélices para su posterior nucleación y enrollamiento (Koide & Nagata, 2005). Aparte del dominio C-terminal, también adyacente (hacia la región N-terminal del dominio C) se encuentra una región con motivos α hélice súper enrollada que también promueven la asociación de las 3 cadenas de la proteína (McAlinden et al., 2003) e inclusive, en el colágeno tipo III, el telopéptido C también contribuye a esta unión a través de puentes disulfuro (Koide & Nagata, 2005) (Ver anexo 1).

Luego de la síntesis del complejo de las tres α hélices unidas a través del dominio C-terminal, ocurre la nucleación que consiste en la formación del primer centro con la estructura plegada de la triple hélice. El paso determinante para lograr esto, es la hidroxilación de por lo menos dos residuos de prolina a 4-hidroxiprolina que se encuentren en el tripéptido Gly-Xaa-Pro adyacente al dominio C-terminal (Koide & Nagata, 2005). A continuación, la estructura de triple hélice se propaga desde el dominio C hasta el dominio N terminal, aunque se encuentra limitada por el número de enlaces tipo *trans* entre los aminoácidos del tripéptido, ya que los enlaces tipo *cis* no pueden acomodarse en la triple hélice (Engel & Bächinger, 2005). De hecho, la constante de equilibrio entre los enlaces *cis/trans* ($K_{cis/trans}$) tiene valores entre 0,11 y 0,43; lo que denota la presencia de enlaces tipo *cis* que corresponden principalmente a los enlaces entre los aminoácidos Gly-Pro y Pro-Hyp del colágeno (Buevich et al., 2000), los cuales son isomerizados por acción de las isomerasas *cis-trans* peptidil prolil (PPIasas) (Koide & Nagata, 2005). No obstante, estas enzimas no son las únicas que ayudan en el apropiado plegamiento de la triple hélice de la proteína¹², de hecho, existen varias proteínas que trabajan como chaperonas moleculares las cuales se pueden dividir en dos grandes grupos. En el primer grupo se encuentran las chaperonas del retículo endoplásmico como Bip/grp78, Grp94, calnexina, calreticulina, PDI¹³ que se

12 Aparte de ayudar al correcto plegamiento del colágeno, las proteínas que a continuación, se nombran también están involucradas con el control de calidad, prevención del agregamiento del precolágeno y en el transporte al aparato de Golgi (tráfico vesicular).

13 Bip/grp78 interactúa con el propéptido C mal plegado efectuando control de calidad sobre el procolágeno, la calnexina y calreticulina operan reconociendo los glúcidos unidos al propéptido C debido a que son lectinas que reconocen oligosacaridos, por último PDI (protein disulfide isomerase) cataliza el correcto emparejamiento de los puentes disulfuro del propéptido C (Zhang, 2006) y también se encuentra haciendo parte como subunidad β de la proteína P4-H (Koide, 2005).

unen principalmente al dominio no colagénico de la proteína; mientras que el segundo, está conformado por aquellas chaperonas que operan sobre los dominios colagénicos de la molécula Col1 y Col2 como Hsp47, P4-H y PPIasas¹⁴(Koide & Nagata, 2005) (Ver anexo 1).

Luego de que el colágeno se pliega correctamente, este es exportado desde el retículo endoplásmico (ER) hacia el aparato de Golgi a través de vesículas en las que participan los complejos COPI y COPII (Stephens & Pepperkok, 2002). Una vez estas vesículas arriban a la cara *cis* del aparato de Golgi, el colágeno forma agregados que posiblemente debido a la disociación con Hsp47 que ocurre en entornos ácidos (pH < 6.3) como la cara *cis* del aparato de Golgi o la región ERGIC (endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment) (Thomson & Ananthanarayanan, 2000). Estos agregados permiten que el plegamiento de la triple hélice se mantenga y también protegen la estructura de las proteasas del aparato de Golgi; A continuación, los agregados se desplazan por el aparato de Golgi haciéndose cada vez más voluminosos mediante un tipo de transporte que consiste en la maduración de cisternas que se desplazan en sentido *cis* → *trans* (Pelham, 2001). Finalmente, las cisternas maduras liberan al espacio extracelular los agregados colagénicos en donde los dominios N y C son escindidos de la molécula por medio de metaloproteasas pertenecientes a las familias ADAMTS (*a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) y BMP1 (*bone morphogenetic protein 1*), obteniéndose el tropocolágeno que retiene una pequeña porción de los propéptidos N y C conocidos como telopéptidos. Luego del clivaje de los dominios NC, los residuos de lisina o hidroxilisina del colágeno son desamidados por la enzima lisil oxidasa (LOX), generando de este modo los aldehídos para iniciar el proceso de entrecruzamiento (Rodríguez & Slatter, 2016) (Ver anexo 1).

4.4.1.1 Familia del colágeno

Los colágenos son una extensa familia de proteínas compuesta hasta la fecha de 28 tipos constituidos por combinaciones de 42 hélices codificadas en 41 genes (Brinckmann, 2005). Cada uno de estos colágenos, tienen funciones específicas dentro de la estructura de la matriz extracelular llegando a formar superestructuras (Birk & Bruckner, 2005). Estas proteínas se caracterizan por poseer múltiples dominios, aunque de manera general el dominio COL corresponde a la triple hélice la cual puede variar en longitud (30-1500 aminoácidos) y puede estar interrumpida o con imperfecciones en la secuencia del tripéptido Gly-Xaa-Yaa alterando su flexibilidad, rigidez entre otras propiedades.

14 P4-H (prolil 4-hidroxiliasa) es una proteína que cataliza la hidroxilación en el carbono 4 del residuo de prolina en la posición Yaa del tripéptido y también previene los sitios de nucleación diferentes del propéptido C. Finalmente, Hsp47 participa en el correcto plegamiento de la triple hélice, evita el agregamiento de procolágeno en el lumen del ER, ayuda en el transporte al aparato de Golgi y protege la estructura de la triple hélice frente a la desnaturalización por el calor. que en el colágeno puede ocurrir a temperaturas entre 36-37°C.

Los otros dominios NC corresponden a regiones no colagénicas que proveen de funciones específicas y también capacidad para anclar y modular la respuesta de otros componentes moleculares de la matriz extracelular (Ricard, 2011). La extensa diversidad estructural de este grupo de proteínas se debe a eventos de empalme (splicing) alternativo, presencia de promotores alternativos y la capacidad de mezclar polipéptidos colagénicos de forma combinatoria generando isoformas. Además, como ya se mencionó, el colágeno también sufre modificaciones postraduccionales como la glicosilación en residuos de hidroxilisina y también el procesamiento proteolítico por enzimas en la remoción de los péptidos N y C (Birk et al., 2005).

4.4.1.1.1 Colágenos fibrilares

Los colágenos de este tipo se caracterizan por formar agregarse y formar fibrillas de longitudes variables que pueden ser heterogéneas en su composición (fibras heterotípicas), los principales representantes de este tipo son el colágeno I, II y III quienes en su conjunto conforman la mayor parte del colágeno presente en los animales, aunque también dentro de este grupo se incluyen otras proteínas de este tipo menos abundantes como V, XI, XXIV y XXVII. Las fibrillas del colágeno pueden considerarse como una mezcla de elementos moleculares colagénicos y no colagénicos (proteínas y proteoglicanos)

Todos los tropocolágenos de este grupo se encuentran formados por un largo dominio COL caracterizado por el plegamiento como triple hélice y la secuencia repetitiva del tripéptido Gly-Xaa-Yaa. En vertebrados, el tamaño de este dominio para el colágeno tipo I es de 339 repeticiones continuas del tripéptido, mientras que, en invertebrados, para el mismo colágeno tipo I, las repeticiones son menores y oscilan entre 3-323 (Boot-Handford et al., 2003). Bordeando a el dominio COL, se encuentran extensiones terminales conocidas como el propéptido C y N. El propéptido C, se conoce como el dominio NC1 (*non collagenous domain 1*) y el propéptido N se divide en los siguientes subdominios: cadena corta (NC2) que une la triple hélice más grande (COL1) con la hélice menor (COL2) y el dominio globular terminal (NC3) que puede mostrar variaciones estructurales. Los colágenos fibrilares se sintetizan como precolágenos que contienen los dos propéptidos (N y C) los cuales son madurados como colágenos en el espacio extracelular mediante el clivaje de los dominios N y C. No obstante, no todos los colágenos fibrilares pierden por completo sus dominios NC como el colágeno V y XI, quienes conservan parte de su dominio N terminal el cual es fundamental en la fibrillogénesis y también regula el diámetro de las fibrillas (Fichard, Kleman, & Ruggiero, 1995). Las variaciones en el subdominio NC3 de propéptido N en los colágenos fibrilares son las más importantes dada su representatividad en el tejido conectivo en los animales. Dichas modificaciones pueden dividirse en aquellas que contienen una secuencia rica en cisteínas (CRR *cystein rich repeat domain*) como en las

hélices (ej. $\alpha 1(I)$, $\alpha 1(IIA)$, $\alpha 1(III)$ y $\alpha 2(V)$) y en aquellas que contienen un dominio N terminal similar a la trombospodina (TSPN *thrombospondin N-terminal-like domain*) (ej. $\alpha 1(V)$, $\alpha 3/\alpha 4(V)$, $\alpha 1(XI)$, $\alpha 2(XI)$, $\alpha(XXIV)$ Y $\alpha 1(XXVII)$). Respecto a estos últimos, los tipos XXIV y XXVII aparte de presentar la región TNSP en su dominio N, también pueden tener imperfecciones en las repeticiones (Gly-Xaa-Yaa)_n que pueden estar involucradas con posibles sitios de unión a otras proteínas y también la actividad proteasa (Ricard et al., 2005) lo cual los relaciona más con el colágeno de invertebrados cuya estructura es menos rígida y conservada (Boot & Tuckwell, 2003).

Tanto el dominio CRR como el dominio TSPN desempeñan papeles muy importantes que se relacionan con la función de los tipos de tropocolágenos que los portan, por ejemplo, se ha sugerido que el dominio CRR en el colágeno tipo IIA participa en la regulación y distribución de importantes factores de crecimiento como las proteínas TGF-B (*Transforming growth factor beta*). Inclusive, en los organismos marinos como las anémonas y medusas, los dominios CDR's (*cysteine rich domains*) son vitales en la polimerización y estructura de los minicolágenos que se encuentran formando los nematocistos¹⁵ y se ha sugerido que son vitales para el funcionamiento de mecanismo de estas células. Respecto al dominio TSPN, a pesar de que no se conoce mucho del papel que cumple cuando se encuentra asociado con el colágeno, de manera general cumple funciones de interacción con i) glicosaminoglicanos, calreticulina y también integrinas, ii) el receptor de lipoproteínas de baja densidad y iii) el fibrinógeno durante la agregación de las plaquetas.

4.4.1.1.2 Colágenos asociados a fibrillas con triple hélices interrumpidas (*Fibrillar associated collagens with interrupted triple helix* [FACIT's])

Estos tropocolágenos se distinguen por sus cortos dominios triple hélice que se encuentran interrumpidos por otras secuencias no colagénicas. Dentro de los representantes de esta subfamilia se encuentran los tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII los cuales son muy heterogéneos entre sí y se diferencia por su masa molecular (desde 60 kDa hasta 220 kDa), tamaño, secuencia de extremos C y N terminal y en la proporción de la molécula que consiste en los dominios COL (por ejemplo 10% para $\alpha 1(XII)$ y hasta 59% para $\alpha 1(XVI)$). La conservación de los dominios Col es crítica para el asociamiento lateral de FACIT's con la superficie de las fibrillas, dado que este grupo no forma estructuras más complejas, y de hecho, los tipos IX, XII y

15 Los nematocistos o cnidocistos, son organelos muy complejos que se encuentran exclusivamente en el phylum Cnidaria. Estos consisten de una cápsula cilíndrica, que se extiende en uno de sus extremos como un túbulo enrollado que se aloja dentro. Los nematocistos se activan por estímulos químicos o físicos y se “disparan” de forma análoga a un arpón. La fuerza mecánica que dirige esta repentina descarga del nematocisto es la presión osmótica, la cual puede alcanzar hasta 150 bar. Por lo tanto, los nematocistos requieren de una estructura proteínica inusual que soporte las fuerzas físicas extremas a las que se somete.

XIV “decoran” la superficie de las fibrillas intersticiales donde actúan como acoplantes moleculares que organizan y anclan las fibrillas en un patrón tridimensional definido al interactuar con otros elementos de la matriz extracelular (ECM).

Algunos de los dominios no colagénicos que caracterizan a estas proteínas, son el factor TNSP que se encuentra siempre en el dominio N seguido por una región COL¹⁶, el factor Von Willdebrand A (vWA), y la fibronectina III (FN3). La composición heterogénea de FACIT's y la interrupción de las triples hélices rígidas, hacen que esta subfamilia de proteínas se caracterice por ser muy flexible. Función que es explotada como ya se dijo en la estabilización de los elementos fibrilares en la matriz extracelular de los distintos tejidos, que como particularidad tienen FACIT's asociados de manera específica, por ejemplo el tipo IX frecuentemente se asocia con el colágeno fibrilar tipo II presente en el cartílago y el tipo XIV con el colágeno tipo I presente en ligamentos y tendones.

4.4.1.1.3 Colágenos asociados a membranas

Los colágenos asociados a membranas son proteínas transmembranales con topología tipo II debido a que su dominio N terminal se encuentra dentro de la célula¹⁷. Los colágenos que se incluyen en esta subfamilia son los tipos XXIII, XVII, XXIII, XXV los cuales participan en la unión de células a la membrana basal y las proteínas membranales con dominios COL como la ectodisplasina, MARCO (*macrophage receptor with collagen structure*), SR-A (*macrophage scavenger receptors type A*) que participan en procesos de regulación y señalización celular. Los colágenos de este grupo, funcionan como receptores celulares y también como moléculas disueltas en la matriz extracelular, que se mantienen como un trímero luego de que escinden de la superficie celular, los cuales tienen funciones estructurales, regulatorias y de andamiaje dado que pueden unirse a otros componentes de la matriz como la fibronectina, receptores celulares (ej. integrinas) y también a la heparina (en el caso del colágeno XIII y XXIII).

Particularmente los tropocolágenos tipo XIII y XVII participan en la adherencia de fibroblastos y queratinocitos a la membrana basal e inclusive el colágeno XVII se encuentran entre los hemidesmosomas. El colágeno XXIII se encuentra relacionado con la adherencia de células cancerosas y el XXV tiene una relevancia médica especial dado que está relacionado con la deposición de proteínas amiloides en los pacientes con

16 Los dominios colagénicos (COL) y no colagénicos (NC) dentro de la subfamilia de FACIT's suelen ser abundantes debido a las interrupciones. Dichos dominios, tienen una nomenclatura ordenada. Ej. Col1, Col2, Col3 para triple hélices y NC1, NC2, NC3 para dominios diferentes.

17 Las proteínas transmembranales con topología tipo II son muy raras y apenas representan al rededor del 5% de todas las proteínas que cruzan la membrana plasmática.

Alzheimer y también con la unión entre neuronas en el SNC. Respecto a las proteínas con dominios COL, la ectodisplasina A se encuentra usualmente asociada con los componentes del citoesqueleto en las superficies laterales y apicales de la célula y es una proteína de señalización celular importante en la morfogénesis epitelial. MARCO, SR-AI, SR-AII son proteínas estructuralmente similares y participan en la defensa frente infecciones y adhesión/metabolismo de lípidos respectivamente.

4.4.1.1.4 Colágenos formadores de redes

Dentro de este grupo se encuentran los colágenos que pueden formar estructuras reticulares de forma muy diferente al colágeno fibrilar, las proteínas que hacen parte de este grupo son los tipos IV, VI, VIII y XX (Birk & Bruckner, 2005). El colágeno tipo IV se distingue de los otros dado que su presencia está mayoritariamente restringida a las membranas basales celulares¹⁸; este colágeno se caracteriza por presentar varias isoformas debido a que sus α hélices pueden estar codificadas por 6 genes diferentes (COL4A1-COL4A6) (Birk & Bruckner, 2005). En cuanto a sus dominios, se destaca un dominio COL con muchas interrupciones confiriéndole de este modo flexibilidad y también un dominio N terminal que para esta proteína se conoce como dominio 7S, el cual facilita la interacción entre los colágenos tipo IV individuales, para formar nodos de 4 moléculas que se organizan de forma antiparalela y con las triple hélices extendiéndose hacia afuera (Birk & Bruckner, 2005).

El colágeno tipo VI es un componente ubicuo de los tejidos conectivos. Se encuentra formando redes filamentosas muy extensas con el colágeno fibrilar y forma estructuras únicas como microfibrillas, redes hexagonales y bandas anchas. Esta proteína, puede interactuar con varias moléculas de la ECM, por ejemplo los colágenos I, II, IV, XIV, perlecan, decorina, biglicano, hialuronato, heparina, integrinas y fibronectina entre otras (Birk & Bruckner, 2005). Esta gran cantidad de interacciones que tiene, también lo vuelven un agente importante en procesos como migración, diferenciación, apoptosis y proliferación celular (Birk & Bruckner, 2005). Estructuralmente esta molécula se caracteriza por presentar dos dominio globulares ubicados en los extremos N y C terminales que contienen múltiples motivos Von Willdebrand A, los cuales coordinan las interacciones no covalentes entre tropocolágenos del mismo tipo formando dímeros y tetrameros, que cuando se “polimerizan” dan lugar a las estructuras reticulares características del colágeno tipo VI (Birk & Bruckner, 2005). No obstante, al igual que con el colágeno fibrilar, los agregados moleculares formados por los tropocolágenos de este tipo, son estructuras compuestas que presentan otras moléculas integradas que

18 La membrana basal, es una capa de matriz extracelular de sostén que se encuentra en la base de los tejidos epiteliales y se encuentra formada por dos capas; la lámina lúcida que contiene proteínas como lamininas, integrinas y glicoproteínas como los nidógenos, y la lámina densa formada principalmente por colágeno tipo IV cubierto con proteoglicanos como el heparán sulfato.

modulan la función y propiedades de la superestructura. Finalmente, los colágenos VIII y X también forman redes aunque su distribución se encuentra restringida sólo a algunos tipos de tejidos. El colágeno tipo VIII se encuentra presente en los vasos sanguíneos localizándose subendotelialmente y también en la membrana de Descemet¹⁹. El colágeno tipo X tiene una distribución aún más restringida y se encuentra únicamente en el cartílago hipertrófico; la estructura distintiva de estos dos tipos de proteínas es un entramado hexagonal (Birk & Bruckner, 2005).

4.4.1.1.5 Multiplexinas

Dentro de esta subfamilia se encuentran los tipos XV y XVIII los cuales poseen múltiples regiones de triple hélice (9 para el colágeno XV y 10 para el XVIII) que se encuentran interrumpidas, también poseen en su región N terminal el dominio TNSP al igual que los colágenos formadores de fibrillas y FACIT's, sin embargo, a diferencia de estos últimos en su extremo C terminal tienen un dominio endostatina que cuando es liberado proteolíticamente, inhibe la proliferación y migración de células endoteliales, induce la apoptosis, inhibe la angiogénesis y también el crecimiento de células tumorales.

4.4.1.1.6 Colágeno XVI y la familia de proteínas Emu

Los miembros de este tipo de proteínas presentan una región rica en residuos de cisteína en la región N terminal (el dominio EMI). A parte del colágeno XVI, existen algunas proteínas con dominios Col y EMI como la emilina1, emilina2 que están asociadas con fibras elásticas y emu1 y emu2 las cuales se cree que se incorporan a los colágenos fibrilares como conectores macromoleculares (similares a FACIT's).

4.4.1.2 Entrecruzamientos del colágeno

La fuerza ténsil del colágeno depende de la formación de enlaces intermoleculares covalentes (crosslinks) entre los tropocolágenos individuales. Todos los colágenos formadores de fibrillas en vertebrados (tipos I, II, III, V y XI) se enlazan mediante mecanismos basados en las reacciones de aldehídos generados enzimáticamente a partir de la lisina (o hidroxilisina) por parte de la enzima lisil oxidasa I (LOX) (Eyre & Wu, 2005). Esta ruta opera desde las fibrillas de esponjas (Phylum Porífera), pasando por los demás Phyla de invertebrados como Echinodermata, hasta los vertebrados y por su puesto los mamíferos (Rodríguez & Slatter, 2016). Dado que las fibrillas de colágeno son heterotípicas, los entrecruzamientos ocurren entre diferentes tipos de colágeno y es sabido que las microfibrillas entre los tipos V/XI sirven de andamiaje para que el colágeno I y II se ensamble conjuntamente para formar las fibrillas de mayor tamaño

¹⁹ La membrana de Descemet es una de las seis capas que constituyen la córnea y separa el endotelio del estroma.

(Eyre & Wu, 2005). En el cartilago, el colágeno tipo IX (FACIT) también se une a la superficie del copolímero de colágeno V/XI reticulándose covalentemente por medio del mecanismo de la lisil oxidasa (Eyre & Wu, 2005).

Los dos mecanismos básicos iniciadores de los entrecruzamientos del colágeno (aldehídos de lisina Vs Aldehídos de hidroxilisina) aparecen en tejidos conectivos relajados Vs rígidos respectivamente (Eyre & Wu, 2005). En ambos procesos la reacción inicial es la desaminación de residuos de lisina o hidroxilisina que produce aldehídos (conocidos como alisina e hidroxialisina). Estos aldehídos son altamente reactivos con las aminas primarias de otros residuos de lisina o hidroxilisina, y forman uniones bivalentes que a su vez pueden reaccionar con residuos de histidina u otros entrecruzamientos bivalentes produciendo conexiones maduras (trivalentes) (Eyre & Wu, 2005).

Históricamente, la ruta con los aldehídos de residuos de lisina fue más fácil de estudiar debido a que las aldíminas formadas son fácilmente clivadas a pH bajo, permitiendo a los monómeros de colágeno ser fácilmente disueltos con ácido acético 0,5 M. En las uniones covalentes generadas por aldehídos de hidroxilisinas, estas no son susceptibles a dichas condiciones ácidas y por lo tanto su aislamiento fue más difícil (Eyre & Wu, 2005). No obstante, debido a que los entrecruzamientos frecuentemente ocurren en los telopéptidos N y C, el tratamiento con pepsina permitió el clivaje de estos “subdominios”, lográndose así la disolución de las fibras (Wood, 1986).

4.4.1.3 Fibrillogénesis

La capacidad de formar fibrillas por parte del colágeno de tipo fibrilar, se conoce como fibrillogénesis y existe abundante información en la literatura científica sobre las condiciones fisicoquímicas que promueven dicha agregación (Harris, Soliakov, & Lewis, 2013; Li, Asadi, Monroe, & Douglas, 2009; Shen, Bu, Yang, Liu, & Li, 2018; Frederick H Silver, 1981). Por ejemplo, se sabe que la temperatura, pH y fuerza iónica modulan la cinética de la formación de fibrillas medida por la disminución en la temperatura de desnaturalización (que corresponde a la desorganización de la estructura cristalina de la triple hélice con la correspondiente formación de fibrillas y agregados) (Bianchi, Gonio, Ciferri, Puett, & Rajagh, 1967; Hayashi & Nagai, 1973; Ripamonti et al., 1980). En un estudio de 2013, Harris et. al, monitorearon la formación de fibrillas por TEM a partir de colágeno de rata que conservaba los telopéptidos no colagénicos N y C terminales, los autores concluyeron que el pH cercano al neutro y una concentración de NaCl en exceso [200 – 500 mM] (respecto a las fisiológicas) promovía la formación de fibrillas, presumiblemente por la unión entre los iones cloro y los aminoácidos polares de la superficie del colágeno, quienes podrían reclutar moléculas de agua para la formación de puentes de hidrógeno. Cabe anotar que la triple hélice se estabiliza

fundamentalmente por los puentes de hidrógeno intercatenarios mediados por el agua. En otro estudio de Li en 2009, se evaluó el potencial Z del colágeno buscando esclarecer el rol de la carga superficial en los eventos de fibrilogénesis. El estudio concluyó que la neutralización de las cargas superficiales cuando se llega al punto isoeléctrico (pH de 6.0 a 9.0²⁰) contribuye favorablemente a la agregación y a la formación de estructuras fibrilares posiblemente por las interacciones favorables entre las regiones altamente hidrofóbicas del colágeno. Los diferentes estudios que se han enfocado a caracterizar las condiciones para la fibrilogénesis del colágeno, han permitido observar que las fibrillas que se generan *in vitro* son consistentes con las que ocurren en los tejidos conectivos, conservando el patrón de bandeo D y también la periodicidad de 67 nm (Ripamonti et al., 1980). No obstante, experimentalmente también se ha demostrado que el colágeno puede formar fibrillas con dimensiones y morfologías diferentes como las fibras con espaciamentos amplios (FLS²¹) que se generan en condiciones ácidas, produciendo de este modo un patrón de bandeo diferente de entre 200 y 300 nm²² (Harris & Lewis, 2016; Paige, MF, JK, & MC, 1998; Zhu & Kaufman, 2014). Otra estructura fibrilar anómala corresponde a los fragmentos de fibras con amplios espaciamentos (cristalitos o SLS²³) que se producen también en condiciones ácidas pero bajo el efecto del ATP (Loo, Goh, Cheng, Su, & Goh, 2012; Paige & Goh, 2001). Las fuerzas que gobiernan la formación de dichas estructuras son las mismas que para las fibrillas, aunque algunos ligandos como la glicoproteína alpha-1 ácida y el ATP generan FLS's y SLS's respectivamente.

4.4.1.4 Colágeno en equinodermos

El colágeno de origen equinodermo ha sido extensamente estudiado especialmente en erizos de mar, dado que, como se enunció antes, la relación entre los erizos de mar y la investigación ha sido altamente provechosa. De hecho, desde 1939 se sabe que en los túbulos de Cuvier de los holoturoideos existe el colágeno por los trabajos pioneros de Astbury, más adelante esto fue confirmado por Bear (1952), Watson y Sylvester (1959) empleando microscopía electrónica y también análisis de aminoácidos (Wood, 1986). Estructuralmente, las fibras de todas las clases de equinodermos, presentan una

20 El punto isoeléctrico para este caso no es un único valor, dado que el colágeno disuelto con pepsina presenta una población de hélices colagénicas de longitudes variables.

21 Fibrous Long Spacing.

22 A pesar de que la interacción entre la glicoproteína alpha-1 ácida y el colágeno no es del todo clara, se sabe que en algunas enfermedades como placas ateroscleróticas y Hodgkin's este tipo de fibras pueden encontrarse. La formación de las FLS's se atribuye principalmente la interacción entre colágeno inmaduro (que conserva sus dominios C y N terminales) con diferentes glicoproteínas y mucopolisacáridos ácidos ó a la degradación por collagenasas de las fibras reticulares.

23 Segmental Long Spacing.

periodicidad de 68 nm aunque las más extensamente caracterizadas han sido las de estrellas y erizos de mar (Wood, 1986). En cuanto a la composición de aminoácidos, los primeros trabajos se realizaron en fibras insolubles, arrojando como resultados un bajo porcentaje de hidroxiprolina, lisina y una alta composición de aminoácidos ácidos (Watson et al., 1959). No obstante, Matsumura (1979) encontró que pese a estas diferencias el colágeno equinodermo era muy similar al tipo I de vertebrados; Baily (1982) también analizó los tubos de Cuvier de los holotúridos encontrando también semejanzas con el colágeno tipo I de mamíferos el cual está formado por 2 cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$. No obstante, en los trabajos más recientes de caracterización del colágeno de holotúridos, se ha encontrado que esta proteína tiene una composición diferente. Por ejemplo (Cui et al., 2007) encontraron que el colágeno fibrilar de *Stichopus japonicus* correspondía a 3 cadenas $\alpha 1$ que individualmente pesaban 135 kDa, (Zhong et al., 2015) reportaron el mismo trímero de cadenas $\alpha 1$ (137 kDa) para *Stichopus monotuberculatus*, (Liu et al., 2011) hicieron lo mismo para el pepino de mar rojo gigante *Parastichopus californicus* encontrando el mismo trímero $\alpha 1$ con un peso molecular de 138 kDa, (Abedin et al., 2013) caracterizaron el colágeno de *Stichopus vastus* encontrando la misma composición pero con un peso un poco más bajo de 122 kDa y Finalmente, (Adibzadeh et al., 2014) determinaron en *Holothuria parva* la presencia de las 3 cadenas $\alpha 1$ (130 kDa).

La estructura de las fibrillas también se mantiene por las conexiones covalentes, sin embargo, el grado de entrecruzamiento (bivalente o trivalente) entre las fibrillas de colágeno depende el patrón de glicosilaciones (Terajima et al., 2014), respecto a esto Katzman (1969) encontró que los residuos glicosilados con galactosa-glucosa correspondían principalmente a residuos de hidroxilisina (Hyl), y cerca de la mitad de estos residuos tenían dicha modificación. Pese a que no se tiene mucha información sobre los tipos de crosslinks en el colágeno de holotúridos, Eyre y Glimcher (1973) demostraron la presencia del entrecruzamiento bivalente hidroxilsino-5-cetonorleucina de manera abundante y también ampliamente glicosilado, de hecho, la proporción de este tipo de unión por mg de colágeno, fue cerca de 20 veces más que en el colágeno tipo I en mamífero. La mayor proporción de este tipo de interacción, evidentemente produce un colágeno altamente insoluble. Sin embargo, el uso de pepsina permite su disolución debido a que la mayoría de los crosslinks se forman entre los telopéptidos (remanente de los dominios NC clivados), de manera similar a como ocurre en vertebrados (Wood, 1986).

La estabilidad térmica de esta proteína, también ha sido otro punto fundamental en la caracterización del colágeno. Es sabido que cuando las fibras se calientan, se produce una reducción de cerca de un tercio en su longitud. En el colágeno mamífero, esta reducción se alcanza entre los 63-65 °C mientras que en los equinodermos, esta temperatura corresponde a los 47-48 °C. La temperatura de desnaturalización del

colágeno es menor que la temperatura corporal. En un estudio de 2002, Leikina et al. encontraron que el colágeno tipo I mamífero se desnatura inclusive a temperaturas menores a 36 °C y proponen que la conformación energética más favorable para la molécula es la de “random coil”, plegándose de nuevo como triple hélice únicamente por debajo de los 30 °C. Por lo tanto, tan pronto como la proteína se exporta al medio extracelular, esta tiende a desnaturarse. Sin embargo, la microdesnaturalización de los dominios con menor temperatura de desnaturalización desencadenan el autoensamblaje en estructuras fibrilares para proteger la estructura terciaria del colágeno en forma de triple hélice (Leikina et al., 2002). En los holoturoideos, debido a la semejanza estructural entre los colágenos fibrilares se presume que pasa lo mismo, con la diferencia de que la temperatura de desnaturalización es mucho menor debido al contenido significativamente más bajo de iminoácidos (hidroxiprolinas y prolinas) que estabilizan la triple hélice por medio de puentes de hidrógeno (Wood, 1986). Por ejemplo Liu et al., (2010) determinaron que la T_m (temperatura de transición) para *Parastichopus californicus* es de 32.7 °C y la T_d (temperatura de desnaturalización) de 18.5 °C en un colágeno con 153 residuos de iminoácidos por cada 1000 residuos, así mismo Cui et al., (2007) calcularon T_s (temperatura de estabilidad térmica) para *Stichopus japonicus* en 57 °C en un colágeno con 161 iminoácidos, Zhong et al., (2015) encontraron T_m para *Stichopus monotuberculatus* en 30.2 °C en una proteína con 151 iminoácidos, Abedin et al., (2013) calcularon T_d para *Stichopus vastus* en 21.23 °C, Finalmente, (Adibzadeh et al., 2014) reportaron una T_m de 47 °C y una T_d de 32 °C en un colágeno con 158 iminoácidos. En todas las experiencias anteriores, el colágeno de holotúridos siempre presentó una estabilidad térmica menor respecto al colágeno de mamíferos (Ej. Colágeno tipo I bovino $T_m:40.8^{\circ}C, T_d:37^{\circ}C, T_s:62^{\circ}C$) y también un contenido menor de iminoácidos respecto al colágeno bovino que es de 215 por cada 1000 residuos. Demostrando de este modo la estrecha relación entre el contenido de residuos de prolina e hidroxiprolina y la estabilidad de la proteína.

4.4.1.5 Tejido colagénico mutable

Las propiedades mecánicas de los tejidos conectivos colagénicos usualmente no cambian en periodos de tiempo cortos. A pesar de que el tejido colagénico típico de los mamíferos se vuelve más rígido con el tiempo (Eyre & Wu, 2005), el cambio es muy lento y la importancia de este endurecimiento no es totalmente clara. En los equinodermos, este cambio en las propiedades mecánicas del tejido conectivo colagénico suele ser muy rápido y también reversible. Por lo que Motokawa en 1984, estableció el nombre de “*catch connective tissue*” para describir este tejido, aunque en la actualidad también se le conoce como tejido colagénico mutable (*mutable collagenous tissue* [MTC]). El anterior término puede causar cierta confusión, especialmente porque

el término “mutable” puede interpretarse en el contexto del código genético. Sin embargo, esta palabra debe interpretarse únicamente como la mutabilidad/modificabilidad en las propiedades mecánicas y por lo tanto en la laxitud/rigidez en el tejido conectivo; por lo tanto, a partir de ahora en este texto se hará referencia a este tejido como tejido colagénico modificable (TCM).

El TCM ocurre en todas las clases de equinodermos y tiene diferentes funciones, por ejemplo, en los pepinos de mar, este tejido endurece la pared del cuerpo haciéndolo más rígido al tacto dado que la dermis se compone principalmente de tejido colagénico modificable; de hecho, se ha demostrado experimentalmente que la dermis aislada de pepinos de mar, responde a estímulos mecánicos, eléctricos y fóticos (Motokawa, 1984). Durante la evisceración en estos mismos organismos, los tendones de los músculos retractores de la faringe pierden rigidez y se rompen, permitiendo la expulsión de las vísceras. Este tejido también es útil durante la fisión transversal (reproducción asexual) que realizan algunos pepinos de mar, dado que la dermis pierde completamente el tono separándose fácilmente (Motokawa, 1984). El tejido colagénico modificable también es capaz de generar fuerza ténsil mediante una contracción activa. Este fenómeno se ha hecho evidente en ligamento capsular que se encuentra en la junta entre la espina y la testa del erizo de mar *Eucidaris tribuloides*, puesto que la exposición de este tejido a agonistas colinérgicos como AcetilColina (Ach), Metacolina (MeACh) y Carbamilcolina (CCh) provocaron el endurecimiento del ligamento y también su acortamiento reversible cuando los estimulantes eran removidos (Vidal, del Castillo, & Smith, 1993).

El tejido colagénico de los equinodermos, no dista mucho en cuanto a sus componentes y organización respecto al tejido conjuntivo de los vertebrados. En cuanto al componente celular, este tejido suele tener células musculares embebidas aunque tan sólo representan del 1 al 3% del área transversal del ligamento (Morales, del Castillo, & Smith, 1989) y no participan activamente la contracción activa de las fibras. También se encuentran células pluripotenciales que se distinguen por la presencia de grandes vacuolas de origen lisosomal que contienen restos celulares y colágeno las cuales pueden adoptar el fenotipo fibrogénico y Finalmente, otras células alargadas con grandes gránulos citoplasmáticos, las cuales se conocen como células yuxtaligamentales en ofiuroideos. Este último elemento celular, frecuentemente se encuentra innervado por neuronas motoras y es común a todos los equinodermos, aunque en holotúridos, estas células se encuentran aisladas de la matriz extracelular por una lámina basal (Trotter, Thurmond, & Koob, 1994). La clara evidencia histológica del contacto entre el tejido nervioso con las células yuxtaligamentales, sumado a la poca representatividad de elementos celulares dentro del tejido colagénico modificable, ha permitido que se les atribuya a estas células la función efectora que directamente altera las propiedades mecánicas del MCT (I.C. Wilkie, 2005). Koob et al., en 1999 también distinguieron dos

tipos de células yuxtaligamentales que se diferencian por el tamaño y forma de los gránulos citoplasmáticos; las células endurecedoras (stiffener) y plastificantes (plasticiser). Recientemente se ha confirmado por medio de inmunohistoquímica, la presencia de moléculas (péptidos) con actividad efectora sobre las propiedades mecánicas del tejido colagénico modificable (Koob, Koob-emunds, & Trotter, 1999). El colágeno que hace parte de este tejido, no dista mucho del tejido colagénico de los mamíferos y puede organizarse en fibrillas que exhiben diferentes patrones como paralelos, transversales y también formando entramados. En holotúridos, frecuentemente la composición de las cadenas colagénicas suele ser de tres monómeros $\alpha 1$ a diferencia de otras clases como los equinoideos donde es de dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$ (Omura, Urano, & Kimura, 1996; Robinson, 1997). Dado que las fibrillas colagénicas del MCT pueden ser aisladas mediante condiciones suaves, su morfología y organización se conoce bastante bien. Estas fibrillas son de forma paraboidal²⁴ y con forma de husillo (spindle shaped) con longitudes que varían y con los extremos amino siempre orientados hacia los extremos de la fibrilla. Asociados a las fibrillas colagénicas, se encuentran los proteoglicanos, los cuales consisten en un núcleo de proteína al que se le unen covalentemente glicosaminoglicanos sulfatados los cuales pueden estar o no unidos covalentemente con las fibrillas colagénicas y se unen en sitios específicos en el patrón de bandeado D (Trotter et al., 1994). El dermatán sulfato es el elemento más abundante de los glicosaminoglicanos que no se unen covalentemente con las fibrillas; mientras que los glicosaminoglicanos que se unen covalentemente frecuentemente poseen derivaciones (branching) con fucosa como el condroitín sulfato E (Kariya, Watabe, Kyogashima, Ishihara, & Tadashi, 1997). También se han identificado glicosaminoglicanos de alto peso molecular que pueden unirse al colágeno probablemente mediante puentes disulfuro, proveyendo sitios de anclaje para la glicoproteína estiparina. Adicionalmente, en holotúridos también se ha encontrado glicosaminoglicanos solubles más pequeños que pueden unirse directamente a la estiparina inhibiendo la unión de la estiparina a otros glicosaminoglicanos o al colágeno, aportado por lo tanto a la regulación dinámica de las propiedades mecánicas del MCT (Trotter, Lyons-levy, Koob, & Thurmond, 1995). Otro de los componentes del tejido colagénico modificable, son los elementos proteicos diferentes del colágeno. Dentro de estos, la estiparina es la proteína más abundante, la cual tiene la propiedad de agregar las fibras colagénicas en solución, probablemente mediante la unión a los glicosaminoglicanos de superficie unidos covalentemente al colágeno aunque su mecanismo de agregamiento no es completamente claro. No obstante, la estiparina no tiene efecto sobre las propiedades mecánicas del tejido aplicada sobre una dermis intacta (Koob, Koob, & Trotter, 1999; I.C. Wilkie, 2005). Los efectos del tratamiento con detergentes y también del sometimiento de la dermis a ciclos de congelamiento y

24 La forma paraboidal de las fibrillas se caracteriza por engrosarse hacia el centro y volverse más delgada hacia los extremos.

descongelamiento, han revelado la existencia de otros elementos que presumiblemente pueden estar en los gránulos de las células yuxtaligamentales, como la tensilina el cuál es un elemento que facilita la agregación de fibrillas colagénicas in vitro y en tejidos intactos, sugiriendo la posible interacción de esta proteína con glicosaminoglicanos de superficie de las fibrillas colagénicas (Koob, Koob, et al., 1999). El factor nuevo de rigidez o NSF (novel stiffening factor) también es una proteína que conduce a la manifestación del estado rígido de dermis aunque su mecanismo de acción es desconocido (Iketani, Yamada, Motokawa, Oiwa, & Tamori, 2010). La softenina es otra proteína de la dermis de *Holothuria leucospilota* y *Stichopus chloronatus* que presumiblemente inhibe el entrecruzamiento entre fibrillas colagénicas y es antagónica al efecto de la tensilina (Takehana, Yamada, Tamori, & Motokawa, 2014). El factor plastificante que se encuentra en la dermis externa, debilita la dermis interna *Cumaria frondosa*. Birenheide et al. En 1998 aislaron otros cuatro péptidos que ejercen control sobre el tejido conectivo de los pepinos de mar (Koob, Koob, et al., 1999). La Holoturina 1 y 2 funcionan como debilitadores de la estructura y por lo tanto logran ablandar el tejido, mientras que el péptido NGIWY-amida provoca el endurecimiento de la dermis y además es un neuropéptido que se extiende por prácticamente todo el tejido nervioso del animal, y también en elementos celulares embebidos en la dermis, los cuales recuerdan las células yuxtaligamentales (Inoue et al., 1999). Finalmente, las microfibrillas son elementos formados por fibrina, que suelen encontrarse como hélices u hojas que rodean laxamente los haces de colágeno en los tendones de tejido colagénico modificable y también en el tejido conjuntivo equinodermo que no muta. Aunque no se tiene noción de la función de las microfibrillas en el MCT, se cree que puede proveer de elasticidad (I.C. Wilkie, 2005).

Los componentes antes mencionados, juegan un papel clave para el dinamismo de las propiedades mecánicas del tejido. No obstante, el mecanismo mediante el cual todo se orchestra se desconoce. Motokawa en 1984, definió tres estados del tejido conectivo colagénico modificable de los holoturoideos; Suave (S_a), estándar (S_b) y rígido (S_c) en donde la rigidez aumenta en el sentido $S_a > S_b > S_c$ mientras que la disipación de energía se reduce en el sentido contrario $S_a < S_b < S_c$. Diferentes ensayos de materiales como pruebas de deformación (creep test), curvas de relajamiento (relaxation curves) y pruebas de tensión (tensile test), han demostrado que la mutabilidad de este tejido, esta dada por los cambios en la viscosidad más no por modificaciones en la elasticidad (el cambio inclusive puede ser de dos órdenes de magnitud) (Motokawa, 1984). La viscosidad en este contexto, esta determinada por la resistencia a la translación, es decir, que la fuerza y el número de interacciones débiles (no covalentes) entre las macromoléculas que componen el MCT son las que se modifican durante el cambio hacia los diferentes estados del tejido. Por lo tanto, es posible argumentar que el cambio en la viscosidad ocurre por la variación entre las

interacciones no covalentes entre las diferentes moléculas en la dermis. La elasticidad en cambio estaría determinada por las uniones covalentes entre las moléculas. Respecto a lo anterior, Motokawa en 1984, plantea que la regulación de las propiedades dinámicas del MCT, están dadas por los cambios de la concentración de iones en el ambiente de la dermis. Por ejemplo se sabe que el aumento del Ca^{2+} y K^{1+} conduce al aumento de la viscosidad así como la presencia de neurotransmisores como la acetilcolina. No obstante, el efecto de este último posiblemente ocurra sobre el componente celular modificando por lo tanto la concentración de los iones en la matriz extracelular. La hipótesis anterior, actualmente se encuentra muy cuestionada, principalmente por el hallazgo de moléculas capaces de inducir el estado rígido a pesar de que el calcio se encuentra ausente como la tensilina (Iketani et al., 2010; M. Tamori et al., 2006). De forma contraria Szulgit & Shadwick en el 2000, demostraron que los cambios en las propiedades del tejido están relacionados con el componente elástico, es decir las fibras colagénicas y los entrecruzamientos covalentes (*crosslinks*) con otras moléculas de la dermis especialmente las microfibrillas de fibrina. Su teoría estaría respaldada por las evidencias en los cambios ultraestructurales asociados al endurecimiento reversible del MCT de *Holothuria leucospilota* y *Stichopus chloronotus* (Takehana et al., 2016), donde los autores describen el aumento de crosslinks e interacciones covalentes durante el estado rígido, así como la pérdida de masa por exudación (agua) (Masaki Tamori, Takemae, & Motokawa, 2010) y por lo tanto el acercamiento de las fibras colagénicas entre sí. Estos mismos cambios ultraestructurales también fueron evidentes en el ligamento depresor del compás en el erizo *Paracentrotus lividus* (Iain C. Wilkie et al., 2015) y más recientemente se confirmó por SAXS que los mecanismos de deformación fibrilar del MCT a nanoescala, son debidos a los cambios en los crosslinks que ocurren en la matriz extracelular más no en la periodicidad del colágeno (Mo et al., 2016). Finalmente, la visión moderna del mecanismo de control del MCT se ve enriquecida por la presencia de otras moléculas. Por ejemplo, la transición de S_a hacia S_b se ve favorecida por la tensilina, mientras que la reversibilidad en este paso estaría promovida por la softenina; el factor de endurecimiento NSF permitiría el cambio de S_b a S_c produciendo el estado rígido. Esta última visión se vuelve aún más compleja tomando en cuenta a las proteasas remodeladoras de matriz extracelular (MMP's). Por ejemplo Ribeiro et al. en el 2012 demostraron la existencia de MMP's en el MCT y el efecto positivo del inhibidor de MMP's galardina en el mantenimiento del estado rígido (S_c). Además, los mismos autores propusieron un mecanismo donde las MMP's contribuirían a la modulación de las propiedades mecánicas del tejido. En dicho modelo, las células sintetizarían y secretarían a la matriz extracelular las MMP's inactivas (proenzimas), que a continuación, serían activadas mediante la remoción enzimática del dominio del péptido. El modelo asume que los crosslinks (o al menos las proteínas que

mantendrían la red colagénica en su lugar) son sintetizados por las mismas células, secretados también a la matriz y posteriormente ensamblados a las fibras colágenicas para crear la estructura. Tanto las MMP's inactivas como los elementos que componen los crosslinks se secretan a una misma tasa la cual es constante. El modelo supone que la cohesión interfibrilar esta regulada solamente por los cambios en la tasa en la que el inhibidor endógeno de las MMP's (TIMP's o *tissue inhibitor metalloproteinase*)²⁵, se produce y es liberado a la matriz extracelular. Por lo tanto en el estado S_c habría una elevada producción de TIMPs, inhibición de MMP's y elevado crosslinking; en el estado estándar S_b niveles intermedios de TIMP's, inhibición de MMP's y crosslinking y Finalmente, en el estado suave S_a bajos niveles de TIMP's, baja inhibición de MMP's y bajo nivel de crosslinking. Finalmente, lo autores también proponen que el TIMP endógeno que afectaría a las metaloproteasas de matriz, podría desempeñar un doble papel funcionando o haciendo parte de los crosslinks entre las fibrillas colagénicas dada la homología del 21 al 36% de la tenisilina con los TIMP's de mamífero.

25 Dicho inhibidor aún no se ha descubierto, aunque en este mismo estudio un análisis de la secuencia de la tenisilina resultó tener una homología del 21 al 36% con los TIMPs de los mamíferos.

5. Objetivo General

Extraer, purificar y caracterizar estructural y fisicoquímicamente al colágeno disuelto con pepsina del tejido conectivo de las especies *Holothuria inornata* y *Holothuria lubrica* (Clase Holothuroidea).

6. Objetivos Específicos

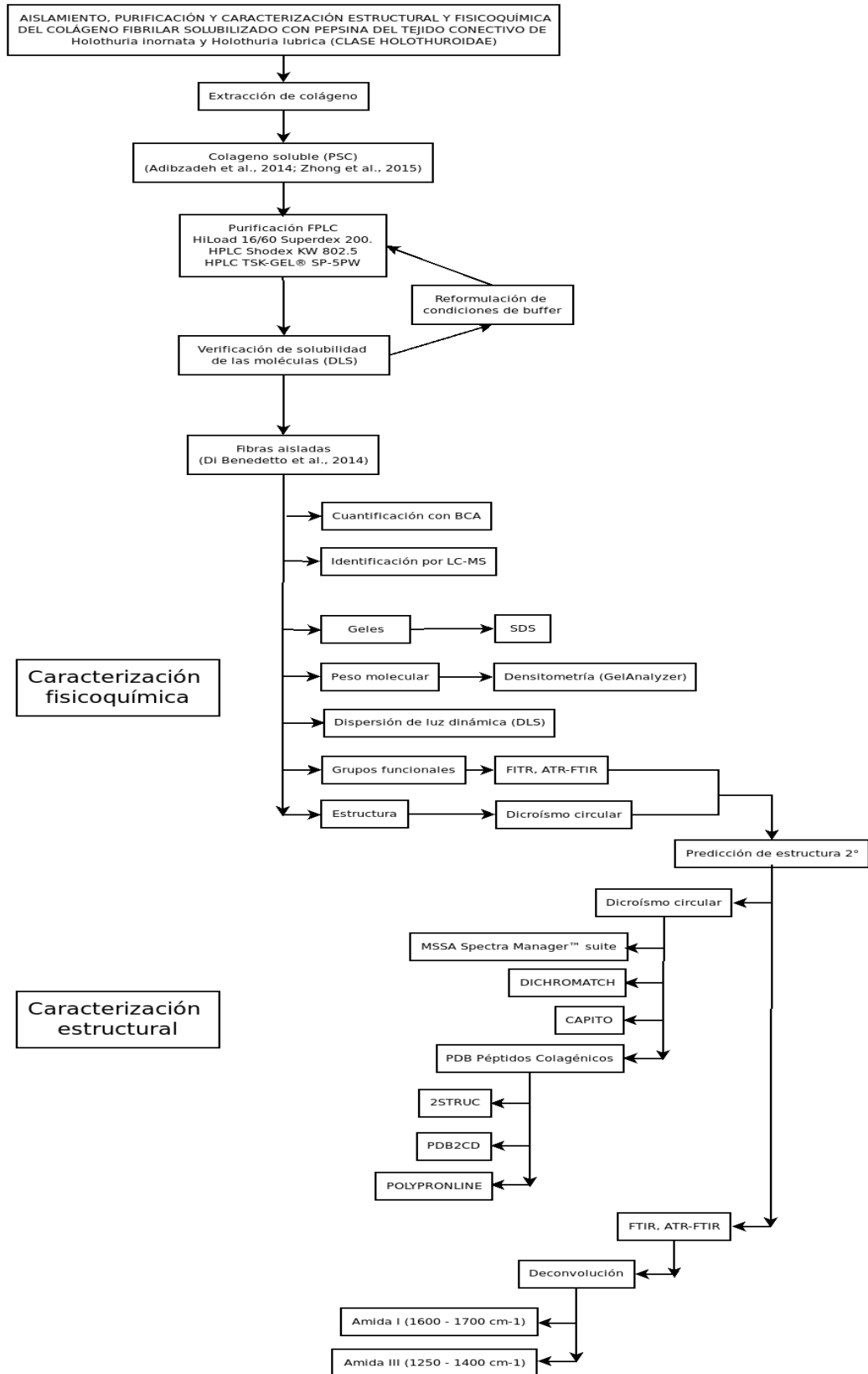
- Extraer y purificar el colágeno fibrilar del tejido conjuntivo de *H. inornata* y *H. lubrica*.
- Caracterizar estructural y fisicoquímicamente al colágeno fibrilar disuelto con pepsina del tejido conjuntivo de *H. inornata* y *H. lubrica* empleando técnicas de microscopía y espectroscopia.

7. Hipótesis

Conforme las propiedades mecánicas del tejido colagénico modificable y condiciones ambientales en donde *Holothuria inornata* y *Holothuria lubrica* habitan, el colágeno fibrilar de estos organismos tendrá características fisicoquímicas y estructurales diferentes de las reportadas para el colágeno fibrilar de mamíferos.

8. Método

8.1 Estrategia experimental



8.2 Naturaleza de las muestras

Las muestras de las que se extrajo la proteína provienen de dermis de organismos eviscerados de los holotúridos mexicanos *Holothuria lubrica* y *Holothuria lubrica*. Dichos especímenes se colectaron por el grupo del Dr. Francisco Solís durante dos salidas de campo a Baja California en julio de 2017 y abril de 2018, posteriormente, las muestras se transportaron a ciudad de México congeladas a -20°C. En el laboratorio 2 de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la UNAM se procedió a realizar la extracción de proteína mediante el protocolo de Adibzadeh et al., 2014 & Zhong et al., 2015 (ver anexo 2) el cuál se modificó hasta lograr reducir el volumen de extracción a 50 ml, a diferencia de los volúmenes >1L que se reportan en los protocolos antes mencionados (ver sección 8.3.3 del método para el protocolo final de extracción de colágeno fibrilar sugerido por el autor de esta tesis).

8.2.1 Codificación de las muestras

Las muestras con las que se llevaron a cabo los experimentos fueron las siguientes.

8.2.1.1 Muestras del extracto colagénico sin purificar

Los extractos obtenidos luego de la extracción de colágeno mediante el protocolo ajustado para tubos Falcon de 50 ml, se nombraron Hino FILT y Hlub FILT.

8.2.1.2 Fracciones FPLC

Durante la purificación de colágeno fibrilar mediante FPLC (ver sección 8.5.1 y 9.1.1) se recogieron las siguientes fracciones:

8.2.1.2.1 Fracciones FPLC *Holothuria inornata*

Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17 y Hino FPLC 18-23.

8.2.1.2.2 Fracciones FPLC *Holothuria lubrica*

Hlub FPLC 8-11, Hlub FPLC 15-17 y Hlub FPLC 18-23.

8.2.1.3 Muestra disuelta en ácido acético 0.1 M

Luego de las extracciones de proteína, se intentó disolver el colágeno extraído de las dos especies en ácido acético 0.1M. A pesar de lo anterior, la muestra permaneció insoluble, formándose un precipitado blanco posiblemente constituido por fibrillas colagénicas (Ver figura 5). Se nombró esta muestra como Hino Ac. Acetico 0.1M.

8.2.1.4 Muestra de colágeno de rata tipo I Sigma-Aldrich®

En algunos experimentos se utilizó un colágeno comercial como control positivo. Esta proteína se disolvió conforme las indicaciones del fabricante y también en distintos buffers para evaluar la fibrilogénesis y el agregamiento (Ver sección 9.6). Se nombró esta muestra como Col I.

8.3 Extracción y purificación de colágeno

8.3.1 Protocolo original

La extracción de colágeno fibrilar de *H. inornata* y *H. lubrica* se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos en Adibzadeh et al., 2014 & Zhong et al., 2015. Inicialmente se tomaron 30 gr peso húmedo de la pared del cuerpo de *H. inornata* los cuales se recortaron en trozos de aproximadamente 1 cm^2 . A continuación, se lavaron con 10 volúmenes de agua destilada fría (4°C) 2 veces por 30 minutos. Acto seguido, el material se incubó en agitación a 4°C por 24 horas en 10 volúmenes de un amortiguador 100 mM Tris, 4 mM EDTA, pH 8.0 con el propósito de disgregar el material y también quelar los iones bivalentes requeridos por las metaloproteasas de matriz extracelular. Luego de las 24 horas, se recuperó el material mediante centrifugación a 6337 RCF a 4°C por 30 minutos y el precipitado se lavó con agua destilada fría (4°C) por 24 horas. Para separar el material de matriz extracelular disgregado, se procedió a utilizar un embudo büchner de tamaño de poro aproximado de $0,78 \text{ mm}^2$ en un sistema de vacío. El material se centrifugó a 6337 RCF a 4°C por 30 minutos para recuperar el precipitado. A continuación, se incubó en agitación constante a 4°C el precipitado en 10 volúmenes de NaOH 0.1 M por 72 horas para desnaturalizar proteasas y también “hinchar” las fibras colagénicas solubles favoreciendo de este modo su disgregamiento. Después de este tiempo, se centrifugó a 6337 RCF a 4°C por 30 minutos para recuperar el precipitado, que posteriormente se lavó con agua destilada fría hasta lograr un pH de 7.0; en este caso, bastaron 2 lavados para lograr dicho pH. A continuación, las fibras colagénicas se incubaron por 48 horas en agitación constante a 4°C en una solución de ácido acético 0.5 M con 0,5% P/V de pepsina gástrica porcina (pH 2.0). Transcurrido el tiempo, la solución se centrifugó a 11265 RCF a 4°C por 1 hora y se almacenó el sobrenadante que contiene el colágeno disuelto con pepsina (PSC). Para recuperar a la proteína en solución, se procedió a precipitar con sulfato de amonio al 70% (+/- 3.2 M) y se centrifugó por a 6337 RCF a 4°C por 30 minutos. A continuación, el pellet se resuspendió en ácido acético 0.5 M y se dializó mediante una membrana de diálisis de corte de 12 - 14 KDa frente a una solución 20 mM de fosfato sódico. Finalmente, la solución desalada se separó en viales de 2 ml y liofilizó para su posterior uso.

8.3.2 Modificaciones en el protocolo de extracción de colágeno fibrilar

Como se indicó antes, los pasos generales para la extracción de colágeno fibrilar se llevaron a cabo siguiendo los protocolos de Adibzadeh et al., 2014 & Zhong et al., 2015. No obstante, se realizaron varias modificaciones buscando estandarizar i) la preparación de la muestra para la extracción de proteína, ii) las condiciones de digestión con pepsina gástrica porcina, iii) la remoción de contaminantes orgánicos (pigmentos de la dermis) y iv) el *salting out* con sulfato de amonio (Ver anexo 3).

8.3.3 Protocolo ajustado para volúmenes en tubos falcon de 50 ml.

Se tomaron 100 mg de la muestra tratada (ver Anexo 2) y se introdujeron en un tubo Falcon de 50ml. A continuación, se aforó hasta 50 ml con un amortiguador 100 mM Tris, 4 mM EDTA, pH 8.0 y se incubó en agitación a 4°C por 24 horas. Luego de este tiempo, se recuperó el material mediante centrifugación a 6337 RCF a 4°C por 30 minutos y el precipitado se lavó con agua destilada fría (4°C) por 24 horas. Para separar el material de matriz extracelular disgregado, se filtró a través de un embudo büchner de tamaño de poro aproximado de 0,78 mm^2 en un sistema de vacío. El material “soluble” se centrifugó a 6337 RCF a 4°C por 30 minutos para recuperarse. A continuación, se aforó el tubo falcon hasta 40 ml con NaOH y se incubó en agitación constante a 4°C por 72 horas. Transcurrido dicho tiempo, se centrifugó a 6337 RCF a 4°C por 30 minutos. Acto seguido, se realizaron dos lavados con agua destilada a 4°C sobre el precipitado hasta neutralizar el pH (7.0). Para la digestión, el precipitado se aforó hasta 50 ml en un tubo Falcon con una solución 0,75% P/V de pepsina gástrica porcina en ácido acético 0.5M (pH < 2.0) y se incubó por 48 horas a 4°C. Luego de la incubación por dicho tiempo, se centrifugó a 11265 RCF a 4°C por 1 hora y se almacenó el sobrenadante. Para recuperar a la proteína en solución, se procedió a precipitar con 12.16 gr sulfato de amonio (+/- 3.2 M) un volumen de 27 ml del sobrenadante y se centrifugó por a 6337 RCF a 4°C por 30 minutos. A continuación, el pellet se resuspendió en ácido acético 0.5 M y se dializó mediante una membrana de diálisis de corte de 12 - 14 KDa frente a una solución 20 mM de fosfato sódico. Finalmente, la solución desalada se alicuotó en viales de 2 ml y liofilizó para su posterior uso.

8.4 Cuantificación de proteína BCA

Las proteínas fueron cuantificadas mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) en ensayos de microplaca según recomienda el fabricante (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). Se tomaron 25 μ L de la muestra problema y se colocaron en un pozo junto con 200 μ L del reactivo de trabajo. A continuación, se incubó a 37°C por 30 minutos y transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 562 nm en el lector de microplacas BioTek Synergy HTX ®. La concentración de proteína de las muestras se calculó

tomando como referente una curva de calibración con albúmina sérica bovina a diferentes concentraciones (0 – 2000 µg/mL).

8.5 Separaciones cromatográficas

8.5.1 FPLC

Se utilizó un sistema FPLC de la marca Pharmacia con los componentes: Bombas P-500, controlador LCC-500 PLUS, válvulas MV-8 5 Mpa, mezclador 5 Mpa y colector FRAC-100, acoplados a un detector UV/vis SPD 10A de la marca Shimadzu. Junto con una columna HiLoad 16/600 superdex® con límite de exclusión de 10 – 600 Kda para llevar a cabo una cromatografía de exclusión molecular a un flujo de 1mL/min. Se inyectó 1 mL del colágeno soluble de *H. inornata* y *H. lubrica* y se colectaron sus fracciones en alícuotas de 5 ml. Las longitudes de onda que se detectaron fueron de 280 nm y 222 nm.

8.5.2 HPLC

Se empleó un sistema HPLC Shimadzu con los componentes: controlador - inyector - rack SCL-10A, bombas LC-10AT, detector UV/vis SPD 10A y mezclador FCV-10AL. Se llevaron a cabo las técnicas cromatográficas de exclusión molecular e intercambio catiónico.

8.5.2.1 Cromatografía de exclusión molecular

Haciendo uso del equipo HPLC antes mencionado, se utilizó una columna Shodex® KW 802.5 (límite de exclusión molecular para proteínas de 150.000 Da) con diferentes amortiguadores para el aislamiento de colágeno de *H. inornata* y *H. lubrica* (Ver sección 8.7.1.2) se inyectaron 25 µL de la muestra y se utilizó el buffer 20 mM de fosfato de sodio dibásico pH 7.5 a un flujo de 0.5 ml/min. La colecta de las fracciones se hizo de forma manual cuando la absorbancia rebasaba ± 10 UA (unidades arbitrarias de absorbancia) en el detector. Las longitudes de onda que se detectaron fueron de 280 nm y 222 nm. Para los ensayos de solubilidad con colágeno de cola de rata (concentración 0.3 mg/mL) se emplearon los siguientes sistemas buffer (ver tabla 1) al mismo flujo y con el mismo volumen de inyección:

Buffer	Sistema Buffer	Fuerza iónica	Urea	Detergente	pH
#1	Fosfatos 35mM	100 mM	2M	Brij 35 0.07mM	6.0
#2	Fosfatos 20mM	-	-	-	6.0
#3	Fosfatos 20mM	-	-	-	5.0
#4	Fosfatos 20mM	-	-	-	3.0
#5	Tris-HCl 50mM	100 mM	2M	-	7.5
#6	Glicina/HCl 50mM	100 mM	2M	-	3.6

Tabla 1. Buffers para separación por HPLC del colágeno tipo I de rata.

8.5.2.2 Cromatografía de intercambio catiónico

Con la misma configuración del sistema HPLC, se utilizó una columna TSK-GEL® SP-5PW con los amortiguadores CH₃COONa/CH₃COOH pH 7.0 (equilibrio) y CH₃COONa/CH₃COOH 1 mM, NaCl 1 M pH 7.0 (elución) a un flujo de 0.1 ml/min. El programa que se utilizó correspondió a: 0.00-10.00 min equilibrio, 10.01 – 40.00 min elución (aumento de la fuerza iónica de 0 a 0.5M), 40.01- 50.00 min elución (aumento de 0.5 M a 1 M en la fuerza iónica) y lavado/regeneración 50.01- 65.00 min. Se inyectaron 25 µL de la muestra de colágeno de *H. inornata*. La colecta de las fracciones se hizo de forma manual cuando la absorbancia rebasaba ±10 UA (unidades arbitrarias de absorbancia) en el detector. Las longitudes de onda que se detectaron fueron de 280 nm y 222 nm.

8.6 Caracterización fisicoquímica

8.6.1 Peso molecular

8.6.1.1 SDS-PAGE

Se hicieron geles desnaturalizantes de poliacrilamida a diferentes concentraciones (8, 10 y 12%) y se tiñeron con azul de coomasie. Para el marcador de peso molecular se utilizó el PageRuler™ prestained protein ladder.

8.6.1.2 Densitometría GelAnalyzer

El cálculo del peso molecular de la cadena alpha del colágeno fibrilar de *H. inornata* y *H. lubrica* se llevó a cabo por análisis de regresión lineal y densitometría mediante el software libre GelAnalyzer

8.6.2 Identificación por LC-MS

El ensayo se llevó a cabo en el Departamento de Innovación Biomédica (DIB), del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. La enzima purificada se digirió con tripsina para obtener los péptidos tripticos y una vez obtenidos. Se inyectaron 5 uL de la digestión a través de un equipo de cromatografía de líquidos Nano LC 415 (AB SCIEX, Foster City, CA), utilizando una columna HALO Phenyl Hexyl para el desalado, y separación analítica. Los disolventes estaban compuestos por agua/acetonitrilo/ácido fórmico (A: 98/2/0.2 %, B: 2/98/0.2 %) y la captura y desalinización se llevaron a cabo a 5 µL/min durante 120 minutos.

La adquisición de datos se realizó con un sistema TripleTOF 5600 (AB SCIEX, Concord, ON) equipado con una fuente Nanospray III (AB SCIEX, Concord, ON) y una punta de cuarzo extraída como emisor (New Objectives, Woburn, MA). Los datos se procesaron con Protein Pilot Software v. 4.0 (AB SCIEX, Foster City, CA) utilizando el algoritmo Paragon y Progroup.17; el software convierte los datos en bruto (.wiff) en listas de picos (.mgf), y la base de datos empleada fue una de 495 secuencias de la cadena $\alpha 1$ del colágeno contenidas en la base de datos de secuencias de proteínas del NCBI, descargada en formato FASTA el 15 de noviembre del 2018.

8.7 Caracterización estructural

8.7.1 Determinación del agregamiento y solubilidad

8.7.1.1 Diámetro hidrodinámico

Las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular mediante FPLC se analizaron por dispersión dinámica de luz (DLS) mediante el equipo Malvern Zetasizer nano®. Se midió el radio hidrodinámico de la muestra en nanómetros y también la polidispersión en una rejilla de cuarzo con 60 µL de cada una de las fracciones.

8.7.1.2 Verificación de solubilidad del colágeno

Para verificar las mejores condiciones del amortiguador que evitaran agregamientos de las cadenas alpha solubles, se utilizó colágeno de cola de rata tipo I del proveedor Merck® incubado en diferentes amortiguadores a una concentración final de 0.3 mg/mL. Se planteó un diseño experimental cúbico donde se evaluaron las variables de pH, fuerza iónica y concentración de Urea (ver Tabla 2). Debe de tenerse en cuenta que se utilizaron condiciones fijas como el buffer de fosfatos 35 mM y también el detergente no iónico Brij-35 en una concentración por debajo de su MMC²⁶ es decir 0.07 mM.

26 MMC es el acrónimo de “concentración micelar mínima” la cual consiste en la concentración donde el detergente comienza a formar micelas. Se utilizó una concentración de 0.07 mM la cual es menor a 0.09 mM (MMC para Brij-35) buscando ayudar a la solubilidad y prevenir el agregamiento del

DISEÑO EXPERIMENTAL CÚBICO

UREA	FUERZA IÓNICA (CONCENTRACIÓN NaCl)	pH
2M	100mM	7.0
		5.0
	50mM	7.0
		5.0
8M	100mM	7.0
		5.0
	50mM	7.0
		5.0
5M	75mM	6.0

Tabla 2. Diseño experimental cúbico para el defecto de las variables de Urea, Fuerza iónica y pH sobre el tamaño de los agregados del colágeno Tipo I de cola de rata en solución.

8.7.2 Espectroscopia en el Infrarrojos

La espectroscopía de infrarrojos es una técnica que analiza las transiciones vibracionales de las moléculas. Típicamente se utiliza luz en el espectro infrarrojo (la cual puede ser cercana [$13000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$], media [$4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$] o lejana [$400 - 10 \text{ cm}^{-1}$]) generando un interferograma que el equipo reconstruye como un espectro de transmitancia o absorbancia mediante una transformada de Fourier. Usualmente, la luz infrarroja que se utiliza es la media dado que en este intervalo se identifican la mayoría de los grupos funcionales, dentro de los que se encuentran las amidas (principalmente I, III A y B) que son útiles para la predicción de estructura secundaria de las proteínas. Actualmente existen muchas variantes a la técnica que han permitido estudiar diferentes substratos independientemente de su naturaleza (sólidos, líquidos o gaseosos) y propiedades (transmisibles o no transmisibles)

8.7.2.1 FTIR

Para llevar a cabo estos experimentos se utilizó un espectrómetro de infrarrojos Bruker Alpha® equipado con el Universal Sample Module. Dentro de la cámara de la muestra, se cargaron 5 mg liofilizados de las fracciones Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17, Hino FPLC 18-23 del colágeno de *H. inornata* a los cuales fueron compactados. A continuación, se procedió a generar el espectro de transmisión el cual se visualizó mediante el software OPUS de la misma marca (Bruker®).

8.7.2.2 ATR

La espectroscopía en el infrarrojos es una técnica muy poderosa para la estimación de la conformación estructural de las proteínas, No obstante, la interpretación de esto puede conducir a errores debidos al descuido en la preparación de la muestra. Por ejemplo, con los sistemas FTIR tradicionales, se requiere de celdas correctamente cargadas y sin

colágeno.

gases, así mismo, los sistemas tradicionales de pastillas de bromuro de potasio (KBr) son inútiles para muestras de naturaleza líquida. Por lo tanto, muchos de los equipos de infrarrojos actuales cuentan con un módulo de reflectancia total atenuada (ATR) que permite una medición rápida de la muestra sin complicaciones en la preparación. En un sistema ATR, se utiliza un cristal de diamante o germanio el cual tiene un alto índice refractivo a través del cual se hace pasar el haz infrarrojo, generándose una onda evanescente mono o multireflectante que penetra la muestra de forma somera, inmediatamente la señal es interpretada por el equipo como un interferograma que a continuación, se procesa para generar un espectro de transmisión. Dentro de las recomendaciones que se deben de seguir para la generación de un buen espectro, se debe tomar en cuenta el utilizar una muestra de índice de refracción menor que el cristal (en este caso se cumple dado que el cristal de germanio tiene un índice de refracción de 5.69, mientras que el agua es de apenas 1.33) y también asegurar un buen contacto entre el cristal y la muestra (el cual se logró aplicando presión en el módulo de ATR y la superficie del cristal).

Para los experimentos de IR con el módulo de ATR, se utilizó el espectrómetro Agilent 670 FTIR® equipado con un cristal de diamante. La muestra que se midió por ATR fue la Hino Ac. Acético 0.1M (19.0 mg/ml) debido a sus características macroscópicas como la formación de un precipitado de color blanco posiblemente adjudicable a fibrillas colagénicas (Ver figura 5).



*Figura 5. Detalle de la muestra Hino Ac. Acético 0.1M.
Nótese el precipitado de color Blanco en el fondo
posiblemente constituido por proteína.*

8.7.3 Dicroísmo circular

El dicroísmo circular es una técnica excelente para la evaluación rápida de la estructura secundaria de las proteínas. Ésta se define como la absorción diferencial de la luz circularmente polarizada a la derecha y a la izquierda y generalmente se mide en miliangulos de elipicidad, dado que cuando ocurre el fenómeno de absorción, uno de los dos vectores (es decir, la luz circularmente polarizada a la derecha e izquierda que además se encuentra fuera de fase) se absorbe con mayor fuerza, resultando en una distorsión que si se mirara de forma frontal produciría una elipse (Ver figura 6).

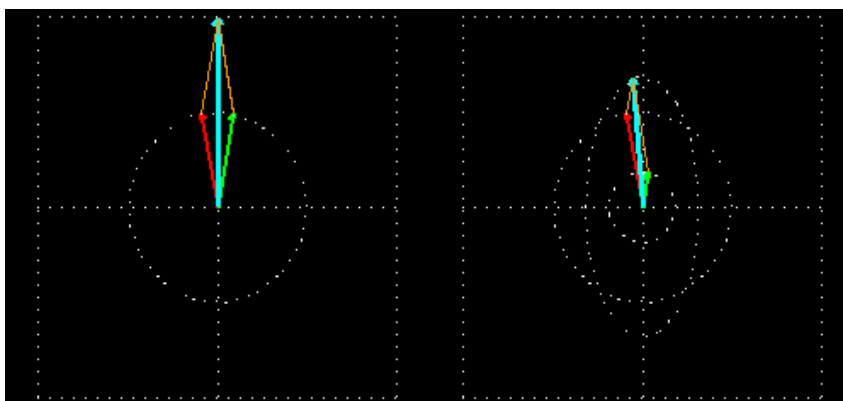


Figura 6. Diferencia en la absorción de la luz circularmente polarizada. Los componentes de ambas haces de luz circularmente polarizada (rojo y verde) presentan diferente magnitud ante la absorción por el cromóforo de un sólido. Nótese cómo en la lámina de la derecha se observa una distorsión produciéndose una elipse.

Los diferentes tipos de estructura secundaria en las proteínas, poseen marcas espectrales únicas debido a las transiciones de los orbitales en los grupos amida, por lo tanto es posible estimar la contribución de estructuras como α -hélices, hojas- β y otros en un espectro de dicroísmo circular. Los experimentos con esta técnica se llevaron a cabo en un espectropolarímetro Jasco J-1500 en la región del UV-lejano (185 – 260 nm) mediante el uso de una celda de 0.1 mm y un volumen de muestra de 200 μ L a una concentración de proteína de 100 mM. Los espectros fueron procesados mediante la suite Spectra Manager™.

8.7.4 Predicción de estructura secundaria

8.7.4.1 FTIR

La predicción de estructura secundaria a partir de los espectros de infrarrojos se llevó a cabo mediante el análisis y deconvolución de la amida I (1600 – 1700 cm^{-1}) y amida III (1250 – 1400 cm^{-1}). Los espectros fueron procesados en el software OPUS® y los datos almacenados como archivos .txt. Se procedió a transformar los valores de transmitancia en absorbancia mediante la expresión $A = 2 - \log_{10} T$ y a continuación, se graficaron en la suite QtiPlot® para la plataforma linux. La deconvolución se hizo en el mismo software; redefiniendo en primer lugar la línea base entre las longitudes de onda para la amida I y III, generando la segunda derivada para dichos valores y finalmente, seleccionando los picos manualmente según la información gráfica provista por la segunda derivada. El ajuste en la deconvolución fue del tipo gaussiano.

Los picos que se generaron con la deconvolución fueron caracterizados según su área y centro, y se calculó su porcentaje del área total del ajuste gaussiano. A continuación, dichos centroides sirvieron como punto de referencia para establecer el tipo de

estructura secundaria según la literatura científica. Para ver las publicaciones que orientaron dicha asignación de tipos de estructurales ver el anexo 4.

8.7.4.2 Dicroísmo circular

8.7.4.2.1 MSSA Spectra Manager™ suite

Los porcentajes de tipos de estructura secundaria fueron estimados a partir de los espectros de dicroísmo obtenidos mediante el espectropolarímetro Jasco J-1500; en primer lugar, los valores de elipicidad (mdeg) fueron transformados a elipicidad molar ($\Delta\varepsilon$) mediante la expresión:

$$\Delta\varepsilon = \frac{(\theta^\circ) * (MW)}{(10) * (l) * (C)}$$

donde θ° corresponde a los miliángulos de elipicidad, MW a peso molecular, l la longitud de la celda o pathlength y C la concentración molar de la proteína. A continuación, dichos espectros en unidades de elipicidad molar fueron procesados en la herramienta Multivariate Secondary Structure Analysis (MSSA) de la suite Spectra Manager™, a partir de un modelo tipo mínimos cuadrados parciales (PLS) y regresión de componentes principales (PCR) para análisis multivariado cuantitativo, generado en la herramienta Secondary Structure Estimation Calibration Model (SSECM) de la misma suite. El modelo se generó haciendo uso de 26 espectros de referencia con porcentajes conocidos de las estructuras “Hélice α ”, “Hoja β ”, “Giro” y “Otro” provistos por el fabricante Jasco®; A continuación, se optimizó definiendo el número de componentes (8) para PCR y factores (7) para PLS para cada uno de los tipos de estructura secundaria.

8.7.4.2.2 CAPITO

La herramienta en línea CAPITO: a Cd Analysis & PlotIng Tool (<http://capito.nmr.leibniz-fli.de/index.php>) se utilizó para generar predicciones de estructura secundaria. Este servidor funciona prediciendo los componentes estructurales de hélice (a), hoja (b) e irregular (i) a partir de la base de datos de espectros de dicroísmo circular de proteínas con estructura secundaria conocida (PCDDDB) (Wiedemann, Bellstedt, & Görlach, 2013). El modelado que realiza este servidor es del tipo lineal, y evalúa la contribución de cada tipo estructural conforme a la expresión:

$$f_a + f_b + f_i = 1$$

Donde f_a corresponde a la contribución de la función para alpha hélice, f_b para hoja beta y f_i para irregular. El uso del ajuste de cuadrados mínimos (PLS) permite calcular el valor de elipicidad para cada longitud de onda y así derivar un espectro

característico para cada tipo estructural. Por lo tanto para el espectro base de α hélices, se encuentran dos mínimos negativos a 210 y 222 nm y un máximo a 194 nm, para las hojas beta una marca espectral positiva menos fuerte a 197nm y un negativo pronunciado a 217 nm, Finalmente, para el tipo de estructura irregular, las marcas espectrales se configuran en torno a un mínimo negativo fuertemente pronunciado a 197 nm y un tenue positivo a 223 nm (Wiedemann, Bellstedt, & Görlach, 2013) (ver figura 7). Estos tres espectros base se utilizan entonces para calcular las contribuciones de cada uno de los tipos estructurales en un espectro de una proteína con estructura secundaria desconocida.

Los espectros que fueron sometidos a la predicción de estructura secundaria en el servidor CAPITO fueron las fracciones Hino FPLC 8-11, 15-17, 18-23, un control positivo para colágeno de cola de rata tipo I y también para la muestra Hino Ac. Acético 0.5 M.

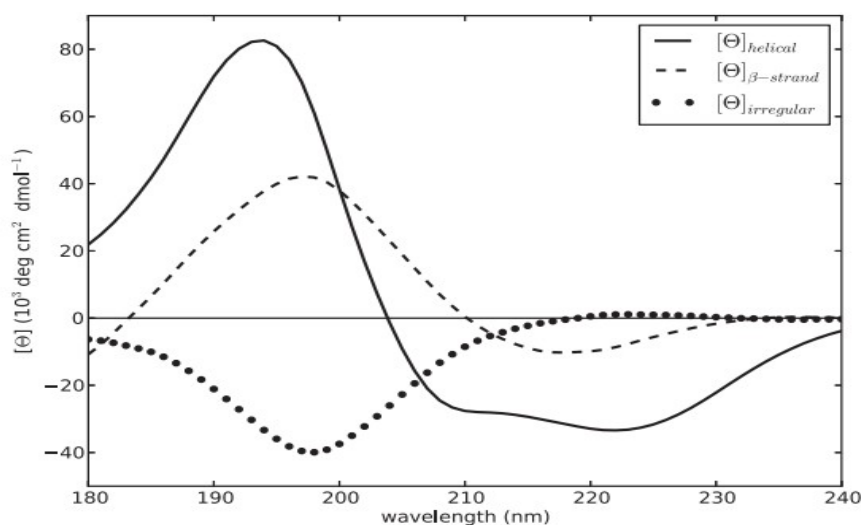


Figura 7. Espectros “ideales” de una α hélice, hoja β y random coil ó irregular. El software CAPITO computa el porcentaje de estructura secundaria basándose en estos espectros. Tomado de (Wiedemann, Bellstedt, & Görlach, 2013)

8.7.4.2.3 DICHRMATCH

Dichromatch (<http://pcddb.cryst.bbk.ac.uk/dichromatch.php>) es una herramienta de la base de datos de dicroísmo circular de proteínas (PCDDDB <http://pcddb.cryst.bbk.ac.uk/home.php>) que sirve para identificar vecinos cercanos de espectros de dicroísmo circular usando como input un espectro provisto por el usuario. Existen varios métodos de comparación, aunque en el presente trabajo únicamente se llevó a cabo una “comparación simple” que funciona buscando un match entre las proteínas en la base de

datos y el espectro problema en el rango especificado (185 – 260 nm) (Whitmore, Mavridis, Wallace, & Janes, 2018). Los espectros sometidos a este match fueron los mismos que se utilizaron con la herramienta CAPITO.

8.7.4.3 Espectros de referencia de péptidos colagénicos

Con el propósito de verificar las marcas espectrales y también aspectos estructurales del colágeno, se procedió a generar una pequeña base de datos de péptidos colagénicos a partir de Protein Data Bank (PDB). Los péptidos seleccionados se encuentran en la tabla 3.

PÉPTIDOS COLAGÉNICOS PARA ANÁLISIS DE MARCAS ESPECTRALES Y ESTRUCTURA SECUNDARIA	
3DMW	Crystal structure of human type III collagen G982-G1023 containing C-terminal cystine knot
5CTI	Crystal structure of the type IX collagen NC2 hetero-trimerization domain with a guest fragment a2a1a1 of type I collagen (native form)
2CUO	Collagen model peptide (PRO-PRO-GLY)9
5Y46	Crystal structure of a collagen-like peptide with interruption sequence
2G66	Crystal structure of a collagen-like peptide with 3(S)Hyp in the Xaa position
2D3F	Crystal structures of collagen model peptides (Pro-Pro-Gly)4-Pro-Hyp-Gly-(Pro-Pro-Gly)4

Tabla 3. Péptidos colagénicos tomados del PDB para su análisis en los servidores 2STRUC, PDB2CD y POLYPRONLINE.

Los péptidos colagénicos de la tabla 3 fueron sometidos a la predicción de su estructura secundaria en los servidores 2STRUC y POLYPRONLINE y también a la generación de sus espectros de dicroísmo circular teóricos en la herramienta PDB2CD

8.7.4.3.1 2STRUC

Los péptidos de la tabla 3 fueron analizados mediante el servidor 2STRUC (<http://2struc.cryst.bbk.ac.uk/twostruc>) para estimar su estructura secundaria. Esta herramienta incorpora varios algoritmos para la predicción de estructuras, aunque en el presente trabajo sólo se utilizaron DSSP, STRIDE y P-SEA. DSSP asigna elementos estructurales secundarios solamente por la formación de puentes de hidrógeno (Kabsch & Sander, 1983), STRIDE toma en cuenta puentes de hidrógeno y ángulos Phi y Psi (Dmitrij & Patrick, 1995), Finalmente, P-SEA predice conforme a la posición de los α (Labesse, Colloc'h, Pothier, & Mornon, 2007) ver tabla 8.

8.7.4.3.2 PDB2CD

La herramienta PDB2CD (<http://pdb2cd.cryst.bbk.ac.uk/>) permite generar espectros teóricos de dicroísmo circular a partir de un archivo .pdb. Ver figura 29.

8.7.4.3.3 POLYPRONLINE

El servidor PolyprOnlinE (http://www.dsimb.inserm.fr/dsimb_tools/polyproline/) al igual que 2STRUC predice estructura secundaria. La novedad que presenta este servidor consiste en que los algoritmos que utiliza también predicen hélices de poliprolina tipo II (PPII's); PROSS y SEGNO asignan este tipo de estructura a partir de los ángulos dihedros mientras que XTLSSTR calcula tres distancias y dos ángulos a partir de los átomos del backbone de la proteína (Mansiaux, Joseph, Gelly, & de Brevern, 2011) ver tabla 8.

9. Resultados y discusión

9.1 Separación cromatográfica

9.1.1 Cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC)

Se procedió a utilizar un sistema de cromatografía líquida para proteínas (FPLC) utilizando una columna de exclusión molecular Hi-Load 16/60 Superdex 200®, que tiene como rango de separación para proteínas desde 10.000 a 600.000 Da. En total se inyectó 1ml del colágeno extraído mediante el protocolo previamente descrito de *H. lubrica* y *H. inornata* a un flujo de 1ml/min. Los cromatogramas junto con las fracciones se muestran A continuación, en la figura 8.

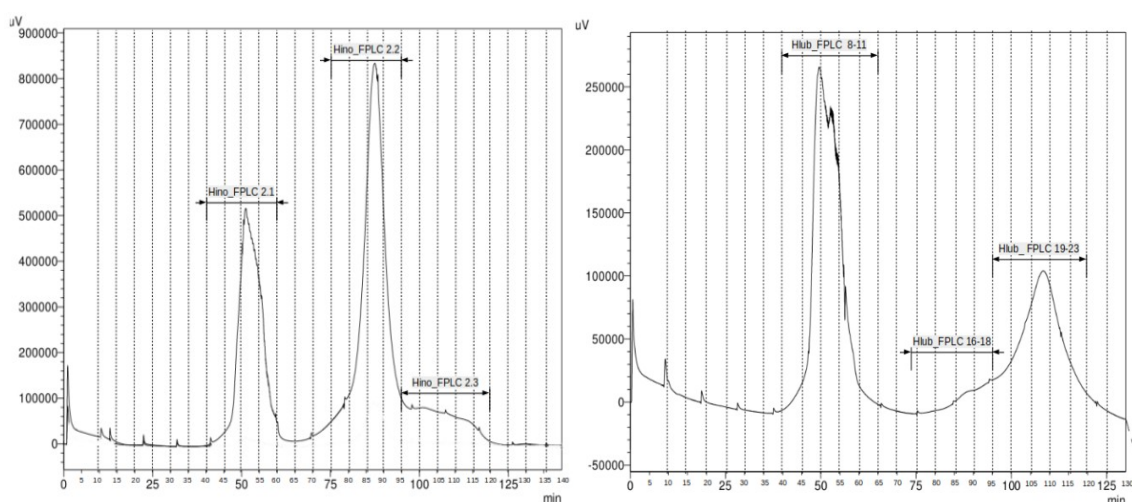


Figura 8. Cromatografía FPLC de exclusión molecular en una columna Hi-Load 16/60 Superdex 200®, flujo de 1ml/min. A. Extracto de colágeno fibrilar de *Holothuria inornata*, se identifican las fracciones Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17 y Hino FPLC 18-23. B. Extracto de colágeno fibrilar de *Holothuria lubrica*, se identifican las fracciones Hlub FPLC 8-11, Hlub FPLC 16-18 y Hlub FPLC 19-23. En ambas figuras la longitud de onda que se monitoreó fue de 222 nm.

En ambos cromatogramas se ve un aumento en la intensidad a una longitud de onda de 222 nm. La señal a 280 no se representa en la imagen debido a que no hay intensidades significativas, esto se explica por el coeficiente de extinción molar a 280 tan bajo que tiene el colágeno. Por ejemplo, tomando como referencia al precursor de la cadena alpha del colágeno tipo I del pez cebra (*Danio rerio*) (Ver anexo 3) éste presenta una composición de aminoácidos aromáticos (Trp, Phe, Tyr) de apenas el 2% (aproximadamente 33 aminoácidos de 1447 totales), presentando un coeficiente de extinción molar de 0.338 - 0.347 M⁻¹ cm⁻¹²⁷. Lo anterior permite concluir que hay una muy baja composición de aminoácidos aromáticos en el colágeno tipo I proveniente de *H. inornata* y *H. lubrica*. La figura 8 también revela las fracciones para *H. inornata* y *H. lubrica*, las cuales tuvieron tiempos de retención similares; por ejemplo, las fracciones Hino FPLC 8-11 y Hlub FPLC 8-11 surgen en los mismos tiempos de retención ($\pm 45 - 60$ min).

Las fracciones se colectaron y concentraron al vacío (*speed-vac*) y dializaron con una membrana de corte de 14 kDa frente a un amortiguador de fosfato disódico 0.02 M para remover el exceso de sal e intercambiar el buffer. Finalmente, las fracciones dializadas se cargaron en un SDS-PAGE (Figura 9).

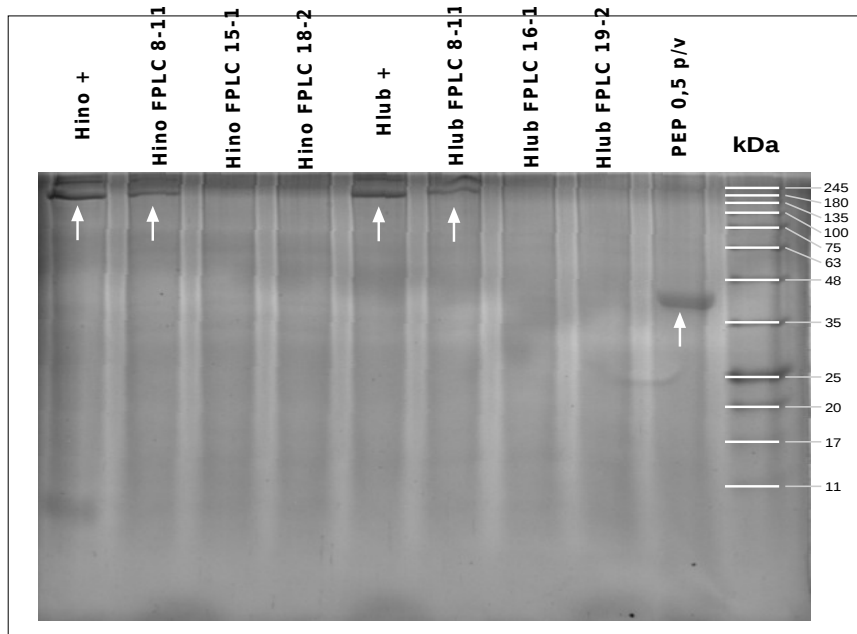


Figura 9. SDS-PAGE al 12% de las fracciones recolectadas en la separación cromatográfica de los extractos colagénicos de *Holothuria inornata* y *Holothuria lubrica*. En orden de izquierda a derecha: Control positivo de colágeno (Hino +), FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17, Hino FPLC 18-23, control positivo de colágeno (Hlub+), FPLC 8-11, Hlub FPLC 16-18, Hlub FPLC 19-23 y control positivo de pepsina (PEP 0,5 p/v).

27 Estos valores se establecieron haciendo uso de la herramienta ProtParam del ExPASy y con la secuencia NP_954684.1 del precursor de la cadena alpha del colágeno tipo I de *Danio rerio*.

El gel muestra claramente bandas de alto peso molecular entre 135 y 180 kDa en los controles positivos (Hino PRC + y Hlub PRC+) y también las fracciones Hino FPLC 8-11, Hlub FPLC 8-. Las cuales corresponden a los tamaños reportados para las cadenas alfa del colágeno fibrilar tipo I de holotúridos (ver tabla 4).

Organismo	Tipo	Cadenas	PM	Cantidad de iminoácidos (Hyp, Pro)	Cita
<i>Stichopus japonicus</i>	Tipo 1	3 [α1]	135 kDa	161/1000	(Cui et al., 2007)
<i>Stichopus monotuberculatus</i>	Tipo 1	3 [α1]	137 kDa	151/1000	(Zhong et al., 2015)
<i>Parastichopus californicus</i>	Tipo 1	3 [α1]	138 kDa	153/1000	(Liu et al., 2011)
<i>Stichopus vastus</i>	Tipo 1	3 [α1]	122 kDa	N.A	(Abedin et al., 2013)
<i>Holothuria parva</i>	Tipo 1	3 [α1]	130 kDa	158/1000	(Adibzadeh et al., 2014)

Tabla 4. Tipo de colágeno fibrilar, composición de cadenas de la triple hélice, peso molecular y cantidad de iminoácidos (Hyp, Pro) reportados para distintas especies de pepino de mar.

9.1.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Se procedió a separar mediante exclusión molecular utilizando una columna Shodex KW-802.5® (límite de exclusión molecular para proteínas de 150.000 Da) a un flujo de 0.5 ml/min en un buffer Na₂HPO₄ 20 mM pH 8.0, los diferentes componentes del extracto, como los dímeros β, trímeros γ y péptidos que quedan como producto de la disolución incompleta de las fibrillas colagénicas. El cromatograma se muestra A continuación, con las fracciones Hlub_HPLC 6.1 – 6.6 que se recolectaron a partir de la muestra HI_4.48_70%:

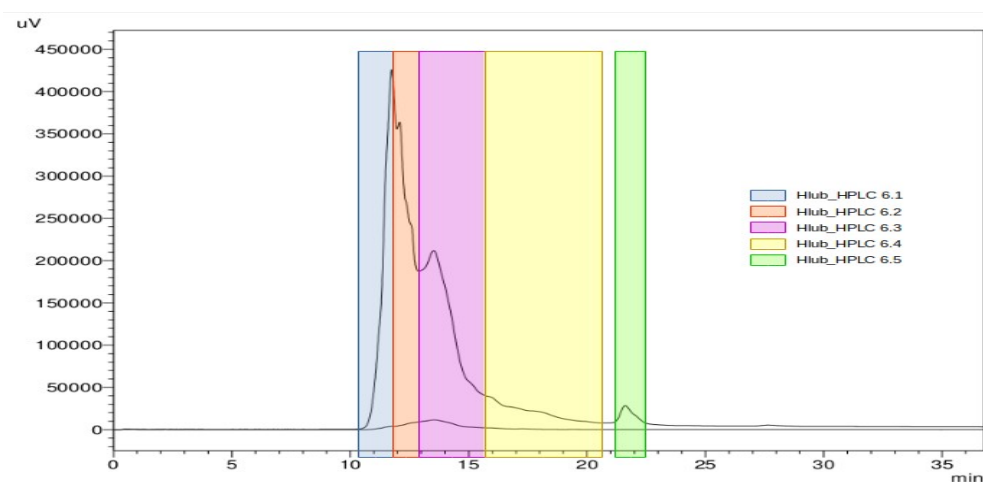


Figura 10. Cromatograma de exclusión molecular Shodex KW-802.5® a un flujo de 0.5 ml/min. Las fracciones se muestran encerradas en los recuadros de color. La longitud de onda que se monitoreó fue de 222 nm.

En total se hicieron 10 corridas en el HPLC utilizando esta misma columna debido a las limitaciones en la cantidad de muestra que se podía inyectar (25µl por corrida). De acuerdo con el cromatograma, se identifican picos con una absorbancia a 210 nm muy grande en comparación con la de 280, lo cual concuerda con las intensidades para estas mismas longitudes de onda halladas en las cromatografías de FPLC. Sin embargo, a pesar de que las fracciones que se recolectaron fueron cargadas en un SDS-PAGE al 12%, no fue posible revelarlas con las tinciones de coomasie y de plata.

La separación por HPLC de las proteínas extraídas mediante el protocolo ajustado para un Falcon® de 50ml también se hizo empleando la misma fase y principio (columna Shodex KW-802.5®, 1ml/min, con buffer Na₂HPO₄ 20 mM) (ver figura 11).

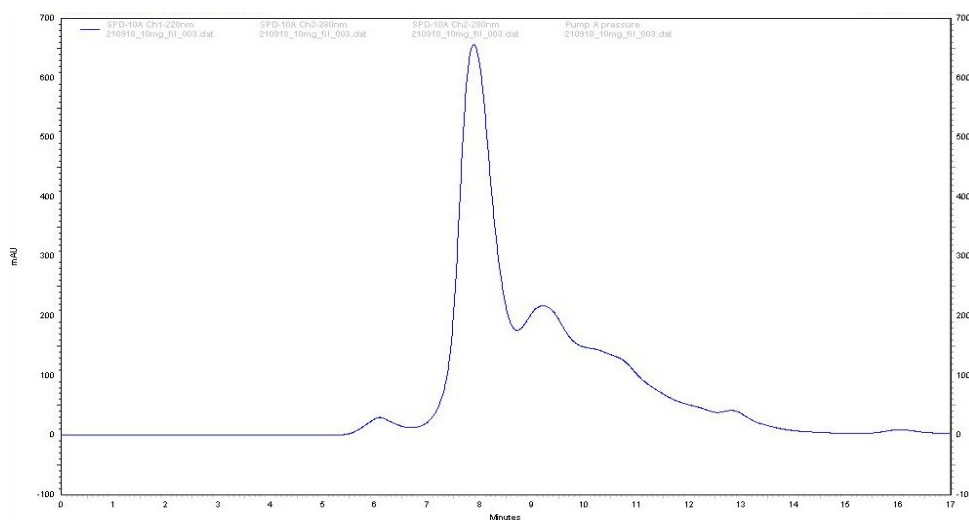


Figura 11. Cromatograma de exclusión molecular Shodex KW-802.5® a un flujo de 1 ml/min. La longitud de onda que se monitoreó fue de 222 nm.

Se utilizó también una cromatografía de intercambio catiónico (Bio-Gel® TSK SP-5-PW, flujo de 0.1 ml/min buffer de acetatos 1 mM, pH 7.0) buscando resolver mejor las especies moleculares presentes en la muestra. No obstante, estas fases pusieron en evidencia su complejidad, ya que se observaron varios picos muy solapados; sugiriendo también, un problema de agregación de las cadenas del colágeno (Ver figura 12).

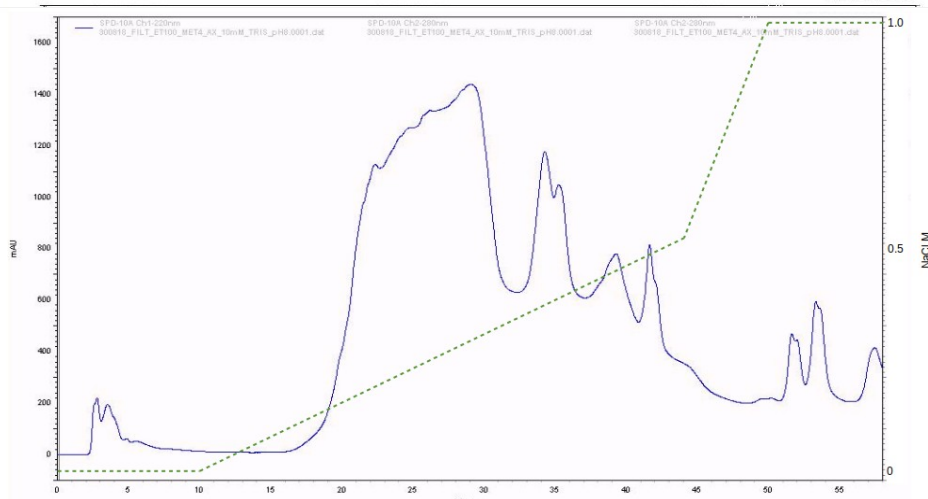


Figura 12. Cromatograma de intercambio catiónico Bio-Gel® TSK SP-5-PW, flujo de 0.1 ml/min buffer de acetatos 1 mM, acetatos 1 mM + 1M NaCl, pH 7.0. La concentración de NaCl a los diferentes tiempos se representa con la línea verde. La longitud de onda que se monitoreó fue de 222 nm.

Para descartar el problema de la agregación, se procedió a evaluar experimentalmente (HPLC y DLS [ver sección 9.1.2 y 9.6.1]) diferentes amortiguadores con aditivos como urea y detergentes iónicos (Brij-35) para facilitar la separación de las especies moleculares colagénicas presentes en un control de colágeno de rata tipo I de Sigma Aldrich®. Este colágeno se disolvió conforme las indicaciones del fabricante en ácido acético 0.1 M agitando vigorosamente en el vortex y luego incubándolo a 37°C por 3 horas. A continuación, se prepararon alícuotas de 1 mg/ml.

Inicialmente se intentó verificar el estado de agregamiento mediante HPLC utilizando una columna de exclusión molecular Shodex KW 801.5 a un flujo de 0.5ml/min. Se probaron distintos buffers en los que el colágeno se disolvía dejándolo en una concentración de 0.3 mg/ml. Los amortiguadores que se utilizaron se resumen en la tabla 5.

Buffer	Sistema Buffer	Fuerza iónica	Urea	Detergente	pH
#1	Fosfatos 35mM	100 mM	2M	Brij 35 0.07mM	6.0
#2	Fosfatos 20mM	-	-	-	6.0
#3	Fosfatos 20mM	-	-	-	5.0
#4	Fosfatos 20mM	-	-	-	3.0
#5	Tris-HCl 50mM	100 mM	2M	-	7.5
#6	Glicina/HCl 50mM	100 mM	2M	-	3.6

Tabla 5. Buffers para separación por HPLC del colágeno tipo I de rata.

En la figura 13, se evidencia que los cromatogramas, a pesar de la gran variabilidad en los buffers donde se resuspendió el colágeno de rata tipo I para su separación por HPLC, los perfiles de elución son altamente similares y los picos con mayor absorbancia se registran entre los minutos 10 - 16 que de acuerdo al fabricante corresponden a elementos con una masa molecular ligeramente superior a los 380 kDa²⁸. Así mismo, de manera consistente, hacia los minutos 22 – 28 aparecen otros picos con mayor o menor intensidad para todas las corridas con tamaño menor a 5.8

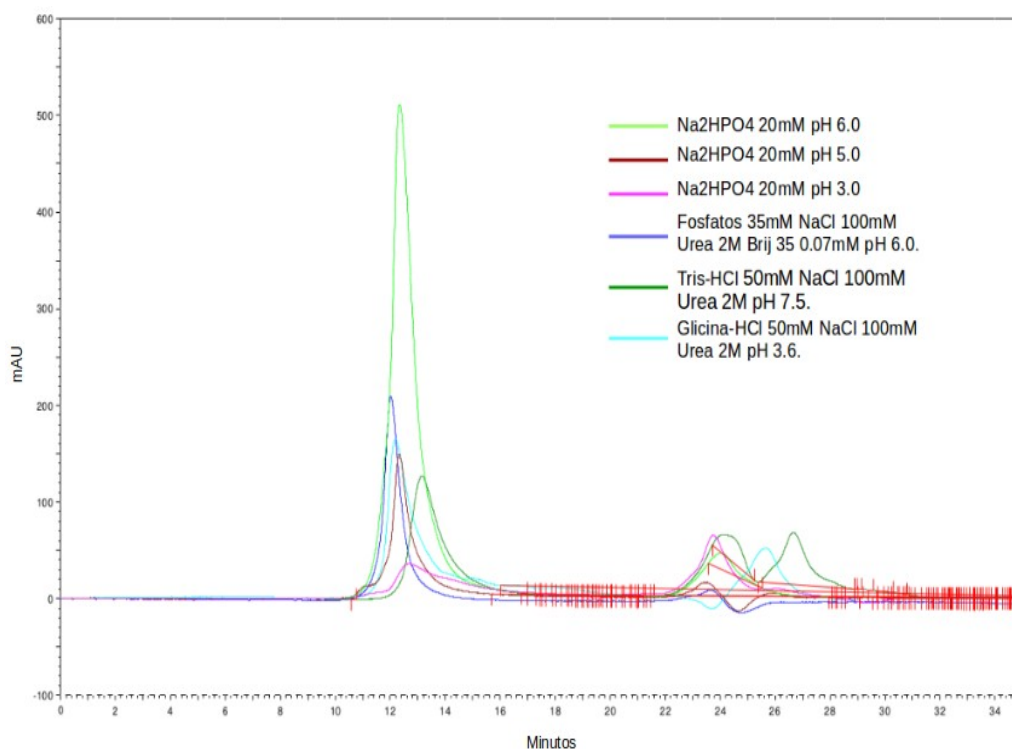


Figura 13. Cromatografías de exclusión molecular del colágeno de rata tipo I con la columna Shodex KW 802.5 (flujo 0.5 ml/min) para los diferentes buffers. La longitud de onda que se monitoreó fue de 222 nm.

Dado que el análisis de la figura 9 reveló la presencia de un agregado molecular de gran tamaño, se procedió a evaluar las variables de pH, fuerza iónica y concentración de Urea mediante un diseño experimental cúbico, utilizando como variable de respuesta el diámetro hidrodinámico medido por dispersión dinámica de luz (ver sección 9.6.1).

9.2 Análisis de densitometría

Para estimar el peso molecular de las fracciones eluidas mediante FPLC (ver figura 8), se procedió a hacer un análisis de densitometría del gel de la figura 9 con el software libre GelAnalyzer (ver figura 14). Para la estimación se empleó el marcador de peso

28 Ver hoja del fabricante de la columna Shodex KW 802.5 (ver anexo 5).

molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus de Fermentas® con rango de 10 a 250 KDa.

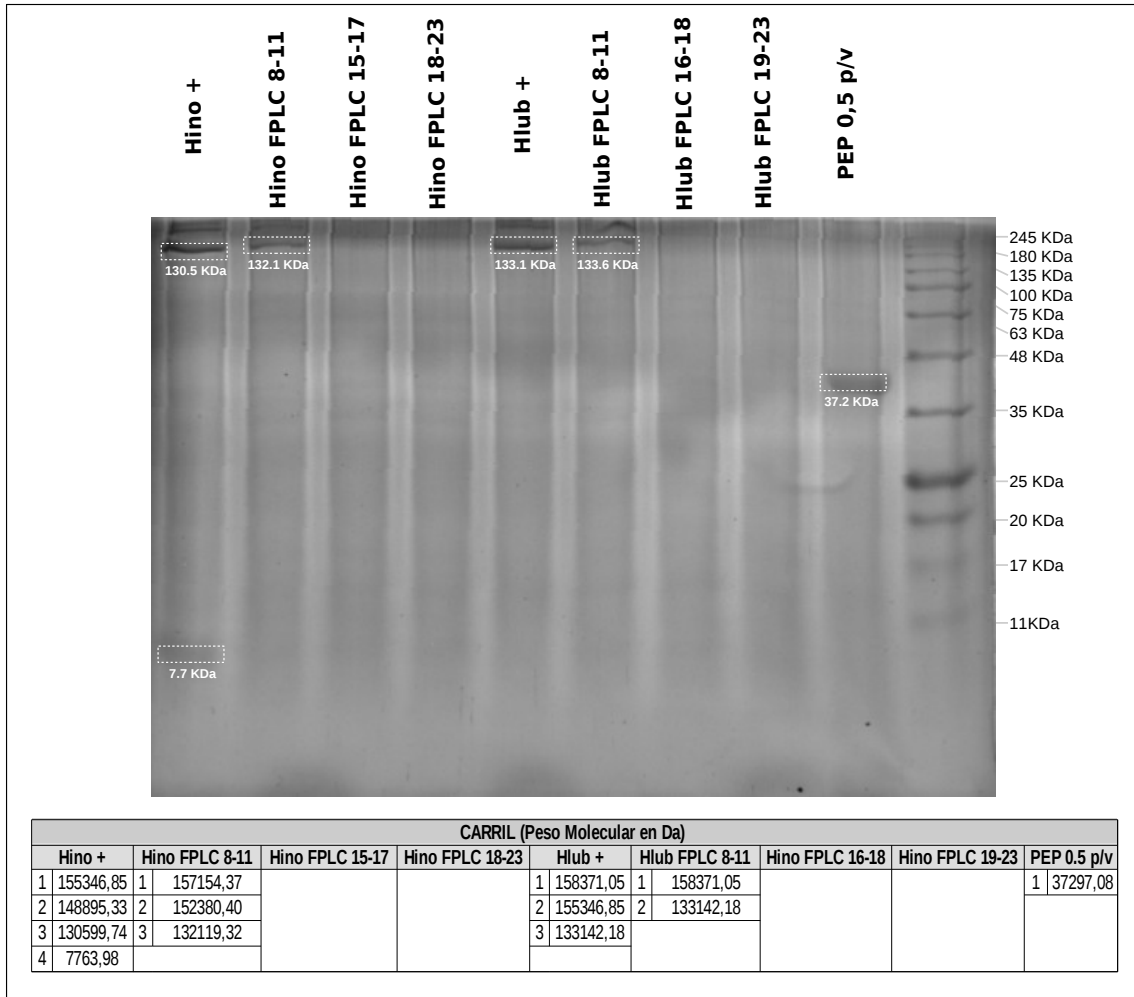


Figura 14. SDS-PAGE al 12% de las fracciones recolectadas en la separación cromatográfica de los extractos colagénicos de *Holothuria inornata* y *Holothuria lubrica*. En orden de izquierda a derecha:

Control positivo de colágeno (Hino +), FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17, Hino FPLC 18-23, control positivo de colágeno (Hlub+), FPLC 8-11, Hlub FPLC 16-18, Hlub FPLC 19-23 y control positivo de pepsina (PEP 0,5 p/v). En la parte inferior se observan las predicciones del peso molecular para cada una de las bandas identificables mediante el software GelAnalyzer.

La predicción del peso molecular de cada una de las bandas identificables mediante el software GelAnalyzer, reveló que el carril con la extracción de colágeno de *Holothuria inornata* (Hino +) se encontraron 4 especies moleculares de 155.3, 148.8, 130.9 y 7.7 KDa. Para la fracción Hino FPLC 8-11, los pesos resultantes de las bandas identificables fueron de 157.1, 152.2 y 132.1 KDa, mientras que en las fracciones Hino FPLC 15-17 y Hino FPLC 18-23 no se identificaron bandas en el gel revelado con azul de coomasie. Los resultados fueron bastante similares para las muestras

correspondientes a *Holothuria lubrica*; y en el carril con la extracción de colágeno, se registraron 3 bandas correspondientes a 158.3, 155.3 y 131.1 KDa, la fracción Hlub FPLC 8-11 tuvo bandas de 158.3 y 133.1 KDa, y al igual que con las fracciones de *Holothuria inornata*, en las fracciones Hlub FPLC 16-18 y Hlub FPLC 19-23 no se identificaron bandas. Finalmente, el carril con el control positivo de pepsina gástrica porcina (PEP 0.5 p/v) se encontró una banda de 37.2 KDa atribuible a la pepsina dado que el peso molecular que reporta el fabricante es de 35 KDa.

Los resultados del análisis mediante densitometría al menos revelan tanto para *Holothuria inornata* como para *Holothuria lubrica* la presencia de bandas con pesos moleculares cercanos a la cadena $\alpha 1$ del colágeno reportados para especies de holotúridos (ver tabla 4). Estas bandas se encontrarían en el rango de los 130.5 – 133.1 KDa²⁹. No obstante, el análisis también revela bandas de pesos mayores (las cuales se encuentran en el rango de 148.8 – 158.3 KDa) que no coinciden con las másas reportadas anteriormente y que son difícilmente atribuibles a algún componente proteico de la matriz extracelular en los equinodermos, excepto fragmentos de fibrina u colágeno parcialmente degradado por la pepsina. Lo anterior cobraría mayor sentido si se analiza a la luz de los análisis de espectrometría de másas donde el mayor número de fragmentos peptídicos que se lograron identificar corresponden a fibrina (ver sección 9.3.1). También debe de considerarse la sensibilidad del método, dado que puede incurrir en muchos errores producto de la dinámica como se mueven las proteínas en el gel, la precisión del software para determinar RF's y evidentemente la calidad de la fotografía y la alineación de ésta. De hecho, las regresiones lineales para la estimación del peso molecular de las bandas con los valores para el marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus de Fermentas® tuvieron coeficientes de R^2 de apenas 0,94 (ver anexo 4) lo que permite inferir un margen de error muy elevado.

9.3 Espectrometría de masas

9.3.1 Identificación por LC-MS

Los resultados de la identificación por espectrometría de másas se muestran A continuación, en la tabla 6.

N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species	Peptides(95%)
1	38,54	38,54	17,8	NP_001274014.1	fibrillin-1 precursor [Canis lupus familiaris]	Canis lupus familiaris	22
2	4,06	4,06	39,5	XP_016082263.1	PREDICTED: collagen alpha-1(I) chain, partial [Ornithorhynchus anatinus]	Ornithorhynchus anatinus	3
3	2,22	2,22	27,2	BAG72200.1	collagen type I alpha 1 [Carassius auratus]	Carassius auratus	2
4	2,05	2,18	28,3	XP_005946026.1	PREDICTED: collagen alpha-1(I) chain isoform X2 [Haplochromis burtoni]	Haplochromis burtoni	3

Tabla 6. Resultados de la identificación de proteínas por LC-MS para las extracción de colágeno de *Holothuria inornata*.

A partir de la tabla 6 se observa que las proteínas identificadas por espectrometría de masas corresponden a proteínas de matriz extracelular como fibrina y colágeno. Resulta interesante ver que tres de las cuatro moléculas corresponden a la cadena alpha 1 del colágeno fibrilar, con un porcentaje de cobertura de $\pm 33\%$ y entre 2-3 péptidos con homologías de al menos el 95%. No obstante, los péptidos que se identifican corresponden a colágeno de origen marino pero en vertebrados (peces). Lo anterior puede estar relacionado con la alta homología que presentan las secuencias de aminoácidos del colágeno, pero también por la cantidad de iminoácidos presentes en la molécula. Los iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) son muy importantes a nivel estructural para el colágeno y son responsables de estructurar y también formar interacciones entre monómeros colagénicos o mediante puentes de hidrógeno con el agua. Se ha visto que la cantidad de residuos de 4-hidroxiprolina se relaciona directamente con la estabilidad de la triple hélice, y existe una relación positiva entre el número de estos residuos y el incremento en la temperatura de desnaturalización (Burjanadze, 2000). Posiblemente lo anterior se relacione con que la cantidad de iminoácidos entre los péptidos identificados por masas y los presentes en la muestra sean similares por compartir un mismo régimen de temperaturas en el ambiente acuático ($\pm 25^\circ\text{C}$). Sumado a lo anterior, también debe tomarse en cuenta que las secuencias de péptidos colagénicos pertenecientes a equinodermos y en especial a holoturoideos reportadas en bases de datos, no son muy abundantes.

La proteína que más péptidos (22) tuvo con homología superior al 95% fue la fibrina, No obstante, la cobertura fue de apenas el 17%, es decir la mitad respecto a los péptidos identificados como colágeno fibrilar tipo I. Las microfibrillas de fibrina, son un componente muy importante en la matriz extracelular y especialmente en tejidos altamente flexibles (Kielty, Sherratt, Marson, & Baldock, 2005). En equinodermos, las microfibrillas de fibrilina suelen formar fibras o láminas que rodean a las fibras colagénicas y putativamente tienen la función de conferir soporte, flexibilidad estabilidad y orientación del componente colagénico del tejido modificable (Ribeiro et al., 2011; Thurmond & Trotter, 1996). De acuerdo con este modelo, las fibras colagénicas se deslizarían libremente modificando de forma dinámica las interacciones entre ellas, mientras se encuentran embebidas en una matriz de microfibrillas de fibrilina, la cual actuaría como un resorte dada su gran elasticidad y retorno por ejemplo en la transición entre los estados $S_a \rightarrow S_b \rightarrow S_c$ ó $S_a \leftarrow S_b \leftarrow S_c$. La fibrilina, al ser una molécula muy grande (340 KDa) posee diferentes dominios que cumplen funciones trascendentales en la matriz extracelular. Por ejemplo, al menos para la Fibrilina-1 humana (que es la más estudiada) posee al menos 14 secuencias consenso para N-glicosilaciones, 47 dominios EFG (epidermal growth factor), de los cuales 43 son

dominios de unión a calcio cbEGF (calcium binding epidermal growth factor), 7 son módulos TB (motivos de 8 cisteínas), 2 corresponden a dominios híbridos EFG/cbEFG-TB y una región rica en prolinas (Kielty et al., 2005). Muchos de estos dominios, como por ejemplo los cbEFG son muy importantes en la flexibilidad de la red y se ha demostrado que su perturbación o la falta de Ca^{2+} desestructura a la matriz y al tejido conectivo. Un efecto similar se observa cuando se aumenta la concentración de calcio en el MCT resultando cambio en el componente viscoso del tejido (Motokawa, 1984) y también en el componente flexible (G. K. Szulgit & Shadwick, 2000). Sumado a lo anterior, la fibrilina en la matriz de los holotúridos resulta ser muy parecida con la fibrina que se encuentra en los mamíferos. Por ejemplo Thurmond, Koob, Bowness, & Trotter, en 1997 encontraron una altísima reactividad de la fibrilina de *Cumaria frondosa* con un antisuero policlonal contra fibrilina de origen mamífero, por lo que no es extraño suponer que los péptidos identificados por LC-MS/MS corresponden a fibrina de pepino de mar aunque la identificación por bases de datos corresponda con una proteína de perro. Para finalizar, resulta interesante haber identificado por medio de espectrometría de masas fibrilina en la extracción de colágeno de pepino de mar, dado que diversos autores han señalado la exquisita participación de las microfibrillas de fibrilina en el modulamiento dinámico de las propiedades del MCT (Ribeiro et al., 2011; Thurmond & Trotter, 1996), No obstante, su rol en el funcionamiento del tejido colagénico modificable no es del todo claro, y tan sólo se conoce el fenómeno de compactación de la red de microfibrillas en el estado rígido (S_c) con la consecuente pérdida de masa en agua y el acercamiento de las fibrillas colagénicas, y también la dispersión de estos elementos durante el estado lábil (S_a).

9.4 Análisis de la estructura secundaria

9.4.1 FTIR de las fracciones purificadas por FPLC del extracto de *H. inornata*

Las fracciones purificadas por FPLC del extracto de colágeno disuelto con pepsina (PSC) de *Holothuria inornata* se analizaron mediante espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR³⁰). Esta técnica fundamentalmente entrega información sobre la estructura de las moléculas que se analizan ya que las frecuencias vibracionales están determinadas principalmente por la fuerza (distancia) de los enlaces moleculares y las masas de los átomos que vibran³¹, por lo que tradicionalmente se utiliza para la elucidación estructural de moléculas pequeñas o para el monitoreo de las reacciones químicas. No obstante, las moléculas grandes como los polímeros y las proteínas también son susceptibles a ser analizadas mediante infrarrojos, aunque con la desventaja de que mucha de la información que se puede abstraer se encuentra solapada debido a la gran cantidad de grupos polares que pueden coexistir en el ambiente intra/intermolecular. Particularmente en proteínas, la técnica del FTIR puede entregar información acerca de la estructura molecular de los grupos que vibran, las propiedades químicas de los grupos vecinos, el estado redox, los puentes de hidrógeno y detalles estructurales como el ángulo de los enlaces y la libertad conformacional de las moléculas (Barth, 2007).

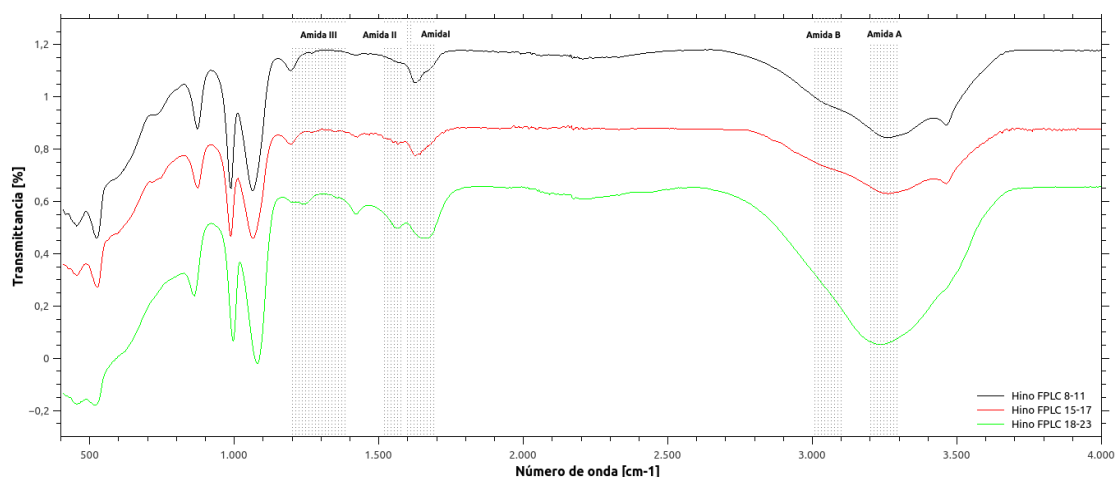


Figura 15. FTIR de las fracciones Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17 y Hino FPLC 18-23. ; químico en la que se pueden identificar compuestos químicos y grupos funcionales específicos debido a la absorción de la luz en las regiones de 0.7μm hasta 500μm.

- 31 Las frecuencias vibracionales dependen de la fuerza y polaridad de los enlaces químicos. No obstante, estas fuerzas a su vez se ven modificadas por el ambiente intra e intermolecular. De forma tal, que la región aproximada donde ocurren la absorbancia depende de las masas de los átomos en los grupos que vibran y el tipo de enlace (sencillo, doble o triple) y la posición exacta por el intercambio de electrones en el ambiente intra/intermolecular y también por el acoplamiento con otras vibraciones.

En la figura 15 pueden observarse los espectros completos de las fracciones Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17 y Hino FPLC 18-23. Las áreas sombreadas indican las regiones en el espectro donde se encuentra la amida I (1600-1700 cm^{-1}), II (1500-1600 cm^{-1}), III (1250-1400 cm^{-1}), amida A (3400-3440 cm^{-1}) y amida B (3030-3100 cm^{-1}).

9.4.1.1 Amida A y B

La absorbancia en la región de la amida A se debe exclusivamente a la vibración del estiramiento del grupo NH y por lo tanto es insensible a la conformación estructural del backbone de la proteína, aunque si brinda información acerca de la frecuencia y fuerza de los puentes de hidrógeno. De acuerdo con Barth en el 2007, los infrarrojos son una de las pocas técnicas que permiten recoger información experimental sobre la fuerza de los puentes de hidrógeno. Estas interacciones moleculares aumentan la frecuencia vibracional, aunque bajan la fuerza de reposicionamiento (restoring force)³² de forma tal que típicamente la presencia de puentes de hidrógeno recorren la posición de las bandas hacia un menor valor de número de onda. De acuerdo con la figura 15, la fracción Hino FPLC 18-23 es la que posee un menor porcentaje de transmitancia en la región correspondiente a la amida A y también un número de onda ligeramente desplazado respecto a las otras dos fracciones de $\pm 3235 \text{ cm}^{-1}$, lo que indicaría una mayor presencia de puentes de hidrógeno. Las fracciones Hino FPLC 8-11 y Hino FPLC 15-17 presentan un perfil muy similar para la amida A, con un número de onda de $\pm 3260 \text{ cm}^{-1}$ y un porcentaje de transmitancia mucho mayor, indicando una menor contribución de esta amida al espectro de infrarrojo en dichas dos fracciones. Estas diferencias, sugieren una presencia mucho mayor de puentes de hidrógeno en la fracción Hino FPLC 18-23 lo cual podría estar relacionado con la estabilización favorable de las fibrillas colágenicas mediante puentes de hidrógeno coordinados con el agua. En cuanto a la amida B, esta se le atribuye principalmente al estiramiento asimétrico de $=\text{C}-\text{H}$ y NH_3 (Zhong et al., 2015). En este caso para ninguna de las fracciones se encontró una intensidad fuerte de esta amida, sin embargo, las fracciones Hino FPLC 8-11 y Hino FPLC 15-17 volvieron a tener un comportamiento muy similar y un porcentaje de transmitancia ligeramente menor respecto a Hino FPLC 18-23 en esta región. Posiblemente por la presencia mayor de lisinas libres en las primeras dos fracciones.

9.4.1.3 Amida I y III

Las amidas I y III son las que entregan más información estructural sobre una proteína en un espectro de infrarrojos. La amida I surge primordialmente por la vibración del estiramiento de $\text{C}=\text{O}$ y en menor medida por el estiramiento de CN , y al igual que con la amida A, la amida I no se ve afectada por las cadenas laterales de los aminoácidos

32 La ley de Hooke establece que el alargamiento unitario que experimenta un material elástico es directamente proporcional a la fuerza aplicada sobre el mismo.

aunque a diferencia de esta, si depende de la estructura del backbone de la proteína (Barth, 2007). Por otro lado, la amida III pese a que si puede verse afectada por las cadenas laterales de aminoácidos, también puede utilizarse para la predicción/verificación de la estructura secundaria de una proteína ya que se origina por la vibración del estiramiento de CN y CO (Barth, 2007). En la figura 16 pueden verse las regiones de las amidas I, II y III para las fracciones Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17 y Hino FPLC 18-23.

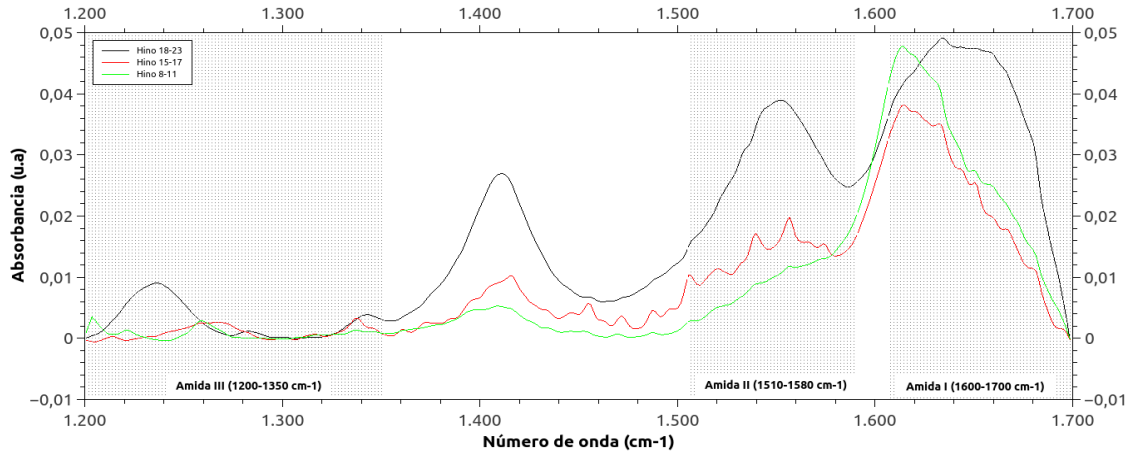


Figura 16. Región de la Amida I, II y III de las fracciones Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17 y Hino FPLC 18-23.

Para el análisis de la amida I (1600-1700 cm-1) se procedió a graficar de manera independiente la región, redefiniendo la línea base en el programa para QtiPlot para la plataforma LINUX. En la figura 17 se observan las regiones de la amida I para cada una de las fracciones del extracto de *H. inornata* y en la parte inferior la segunda derivada correspondiente.

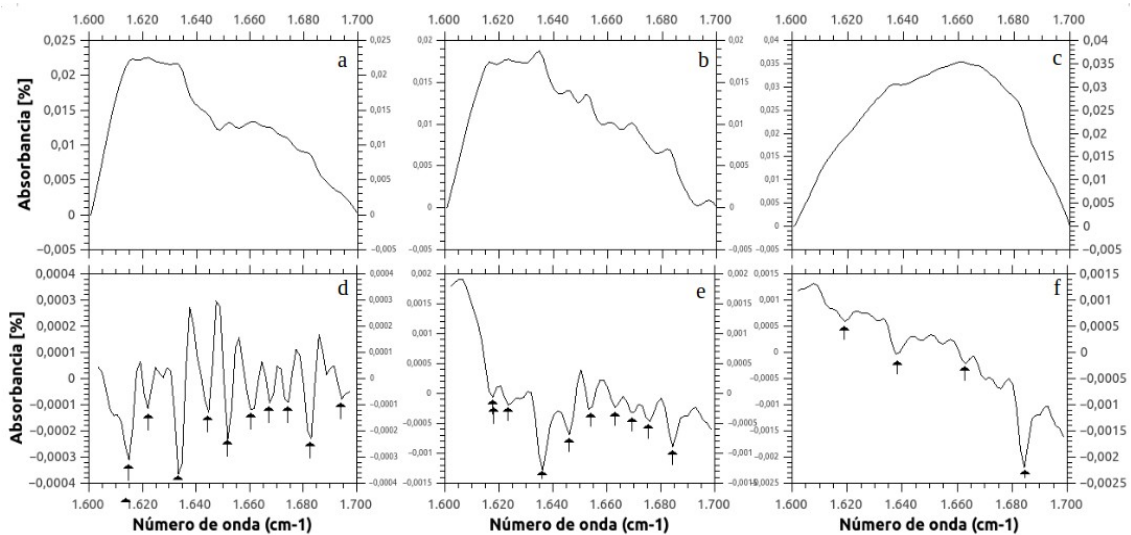


Figura 17. Región de la Amida I y segunda derivada para las fracciones Hino FPLC 8-11(a, d), Hino FPLC 15-17 (b, e) y Hino FPLC 18-23 (c, f).

esta información y también con la posición relativa de cada uno de los picos señalados en la segunda derivada, se procedió a hacer una deconvolución de las regiones correspondientes a la amida I (1600-1700) para cada una de las fracciones (figura 18).

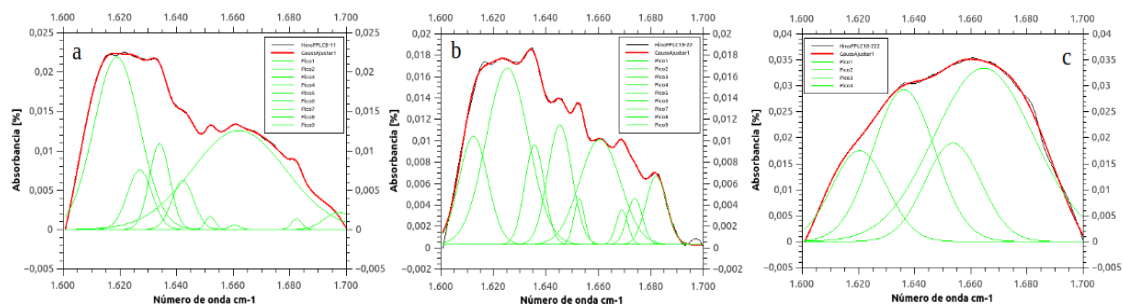


Figura 18. Deconvolución de la región de la Amida para las fracciones Hino FPLC 8-11(a), Hino FPLC 15-17 (b) y Hino FPLC 18-23 (c).

En la deconvolución de la banda de la amida I (Figura 18), se puede observar la contribución de varios picos a los que posteriormente se les asignó un tipo de estructura secundaria basándose en la literatura reportada.

El análisis de la amida III (Figura 19), se llevó a cabo de la misma forma que para la amida I y se observa la contribución de diferentes picos a la banda de la amida III para cada una de las fracciones. En este caso 10 para Hino FPLC 8-11, 9 para Hino FPLC 15-17 y 3 para Hino FPLC 18-23. La asignación de tipos de estructura secundaria se basó en la literatura científica reportada.

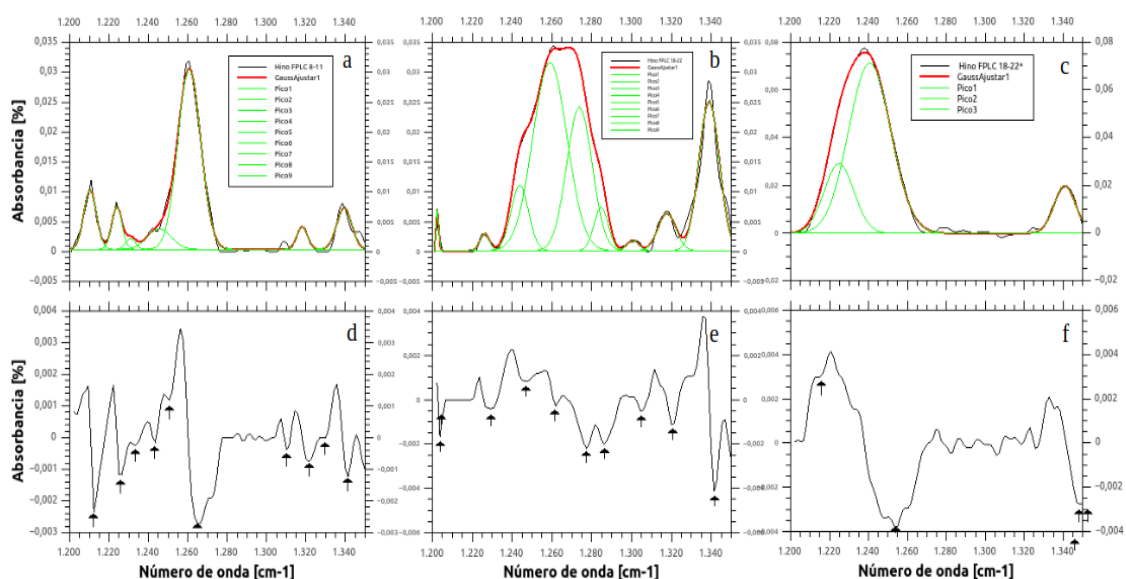


Figura 19. Región de la amida III, segunda derivada y deconvolución de la amida III para las fracciones Hino FPLC 8-11(a, d), Hino FPLC 15-17 (b, e) y Hino FPLC 18-23 (c, f).

9.4.2 ATR Hino Ac. Acético 0.1M

Con el propósito de verificar el estado de agregamiento del colágeno de *H. inornata*, se procedió a hacer un análisis de la estructura secundaria de la fracción Hino FILT Ac. Acético por infrarrojos utilizando la técnica de attenuated total reflectance (ATR) (ver figura 20). En esta técnica, la muestra (sólida ó líquida) se coloca sobre un cristal formando una capa uniforme y luego se hace pasar un haz de luz infrarrojo que atraviesa el cristal, creando una onda “evanescente” que se extiende hasta la muestra. Las regiones donde la muestra absorbe hacen que la onda se atenúe y luego de varias reflectancias, Finalmente, la luz llega al detector llevando la información sobre el espectro. Diversos autores han resaltado las ventajas del ATR sobre la técnica de infrarrojos convencional especialmente para proteínas, por ejemplo la reproducibilidad, bajo costo y facilidad de trabajar con muestras agregadas o insolubles debido al contacto directo entre la muestra y el cristal (Ruyschaert & Raussens, 2018; Sarroukh et al., 2011).

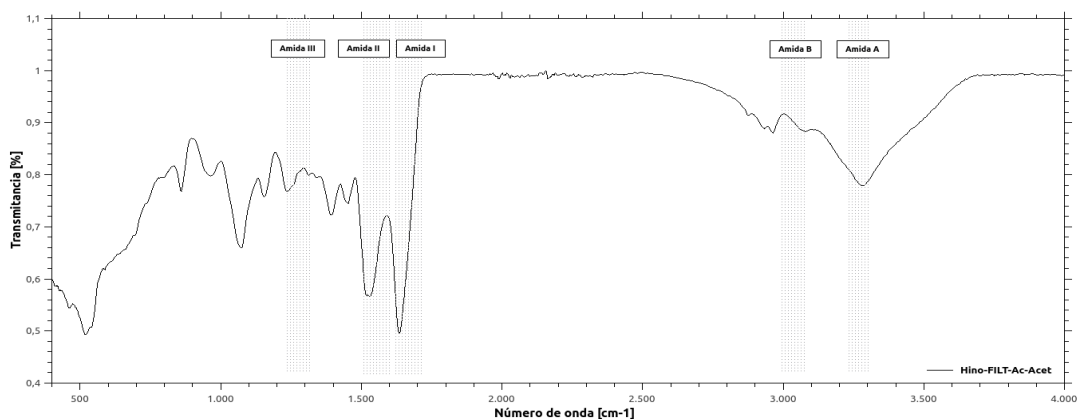


Figura 20. ATR-FTIR de la muestra Hino Ac. Acético 0.1M

El análisis de la estructura secundaria se llevó a cabo de la misma forma que con las muestras provenientes de las fracciones separadas por FPLC del extracto colagénico de *H. inornata*. En general, los picos de las amidas señalados en las áreas sombreadas de la figura 20 se encuentran mejor definidos (por lo menos para la amida B [3030 – 3100 cm-1] y la amida III [1250-1400 cm-1]). La figura 21 y figura 22 muestran el análisis y ajuste multipicos para la región de la amida I y III de la muestra Hino Ac. Acético 1M.

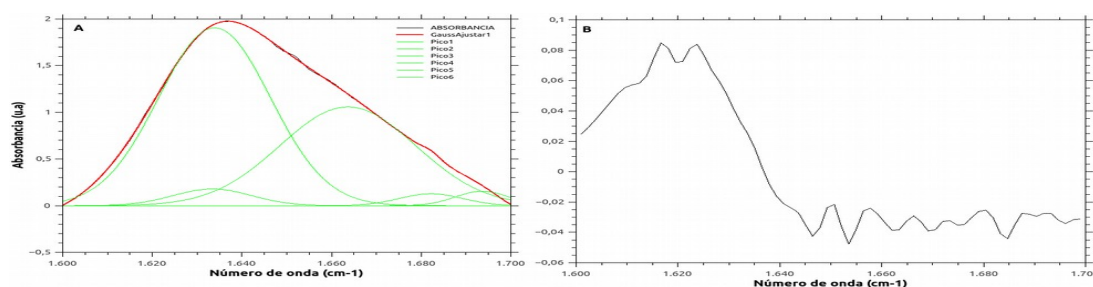


Figura 21. Región de la amida I (a), segunda derivada (b) y deconvolución de la amida I (a) para la muestra Hino Ac. Acético 0.1M.

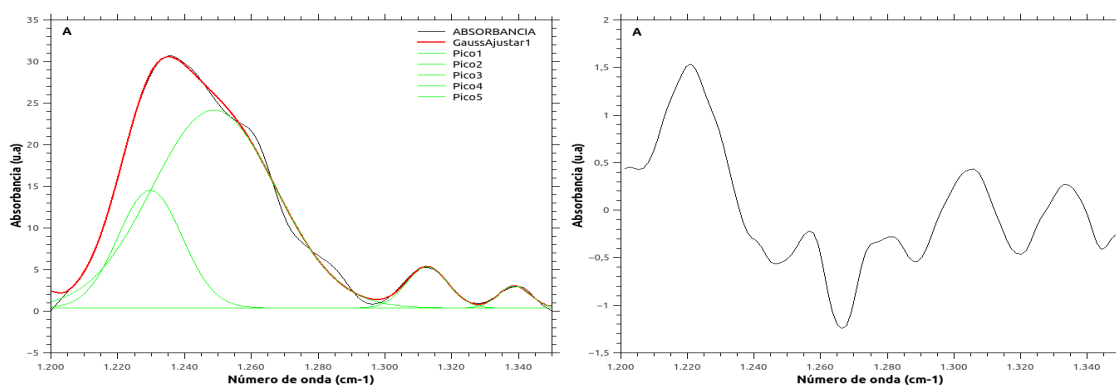


Figura 22. Región de la amida III (a), segunda derivada (b) y deconvolución de la amida III (a) para la muestra Hino Ac. Acético 0.1M.

9.4.3 Dicroísmo Circular

El dicroísmo circular es una técnica que permite medir la diferencia en la absorción de la luz circularmente polarizada a la derecha y a la izquierda. En la práctica, el espectro de dicroísmo puede considerarse como una serie de bandas donde cada una corresponde a la transición electrónica de un estado basal a uno excitado (Woody, 1996). Cada una de estas bandas se caracteriza por varias propiedades, aunque las más importantes corresponden a la posición (nanómetros) y también la intensidad que se reporta en $\Delta\epsilon$ (diferencia en la absorción de luz circularmente polarizada a la derecha y la izquierda) o en $\tan \theta^{33}$ (miliángulos [mdeg]) (Woody, 1996). Esta técnica es altamente sensible a los cambios en la estructura secundaria especialmente en la región del UV lejano (por debajo a 250 nm), debido a la fuerte absorbancia diferencial de la luz circularmente polarizada en ambas direcciones de las amidas del backbone proteico (Greenfield, 2006; Venyaminov & Yang, 1996). En tanto que el UV cercano refleja las contribuciones de las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos, puentes disulfuro y también otras aportaciones los de grupos prostéticos en las proteínas, pudiendo inferir también interacciones y constantes de afinidad entre las proteínas y sus ligandos (Greenfield, 2004).

Los diferentes tipos de estructura secundaria, poseen marcas conspicuas en el espectro de dicroísmo circular. Estas señales han sido ampliamente caracterizadas y validadas en

33 La luz circularmente polarizada se produce cuando dos rayos ortogonales se encuentran fuera de fase. Si se viese este fenómeno de manera frontal el resultado sería un círculo perfecto formado por un rayo polarizado en una dirección y otro exactamente a 90° . Cuando sucede el fenómeno de la absorción, los vectores de cada uno de estos haces de luz se ven disminuidos dependiendo de las características del analito y los cromóforos que presenta; por lo tanto, dado que las magnitudes son diferentes, el círculo pasa verse como una elipse en donde la función \tan del ángulo θ describe el valor de los vectores de la luz absorbida en la luz polarizada derecha e izquierda.

la literatura científica, por lo que es posible hacer predicciones de estructura secundaria basadas en dichas bandas y sus intensidades respectivas. Por ejemplo, las α hélices poseen un doble mínimo a 222 y 208 nm y un máximo de mucha mayor intensidad a 191-193 nm, mientras que las hojas β usualmente poseen una única banda negativa entre 210 – 225 nm³⁴ y una señal positiva más intensa entre 190 – 200 nm (Venjaminov & Yang, 1996). Las proteínas con hélices α y hojas β , usualmente poseen espectros donde destacan mayoritariamente las bandas correspondientes a las hélices por lo que es usual encontrar dos bandas negativas a 222 nm y 208-210 nm y una positiva más intensa en la región de 190 – 195 nm; aunque también puede encontrarse una única banda negativa entre 210 – 220 nm debido a la superposición de las hélices y las hojas β (Venjaminov & Yang, 1996). Finalmente, las proteínas desestructuradas, desnaturalizadas y también péptidos pequeños se caracterizan por presentar una única banda negativa de alta intensidad cerca de los 200 nm y algunas veces bandas muy tenues en la región de 220 – 230 nm las cuales pueden tener valores positivos ó negativos (Venjaminov & Yang, 1996).

El espectro de dicroísmo del colágeno es único dadas las características particulares de su estructura, ya que la estabilización de triple hélice ocurre fundamentalmente por el impedimento estérico que proporcionan los iminoácidos Pro y Hyp, los puentes de hidrógeno transversales que ocurren una vez cada triplete (Gly-Pro[x]-Hyp[y]) y también los puentes de hidrógeno intercatenarios coordinados con el agua que aparecen en regiones de tripletes colagénicos interrumpidos y baja proporción de iminoácidos (Bella, 2016). A diferencia de las otras proteínas, las triple hélices colagénicas no poseen aminoácidos enterrados en su estructura, si no por el contrario las cadenas laterales apuntan hacia el exterior, lo que implica que los backbones de las cadenas individuales se encuentren muy próximos pudiéndose formar de este modo puentes de hidrógeno entre cadenas adyacentes, en los que el grupo amida de Gly se convierte en el grupo donador y el carbonilo del aminoácido en posición Xaa funciona como grupo aceptor (Bella, 2016). El resultado de estas interacciones son puentes de hidrógeno transversales a la dirección de la hélice, lo cual constituye una marcada diferencia con los puentes de hidrógeno de las α Hélices que se forman en sentido paralelo. Además de lo anterior, el colágeno en su estructura de triple hélice posee una fuerte relación con el agua, la cual puede estructurar puentes de hidrógeno entre aminoácidos diferentes de Pro y Hyp en la posición Xaa y la glicina, así como formar nuevos puentes entre el grupo OH de los residuos de hidroxiprolina, los cuales funcionan como ejes ayudando a organizar toda una capa de solvatación alrededor de las triples hélices, facilitando de este modo la estabilización de la supraestructura fibrilar del colágeno y confiriéndole propiedades como la alta elasticidad y también la alta temperatura de desnaturalización

34 En algunas hojas β altamente distorsionadas ó constituidas por hojas β cortas e irregulares, se encuentra una banda negativa a 200 nm (Wu, Yang, & Wu, 1992).

(Bella, 2016). Otra de las características particulares del colágeno, tiene que ver con su altísimo contenido glicina dado que este aminoácido es fundamental en el motivo colagénico Gly-Xaa-Yaa. Experimentalmente, diversos autores han evaluado la estructura de péptidos de poliglicina, encontrando que la estructura recurrente es una hélice orientada a la izquierda con ángulos dihedros de $\Phi=-75^\circ$ y $\Psi=144^\circ$ sin ningún indicio de la presencia de un α hélice. Finalmente, el colágeno contiene una abundante cantidad de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina), los cuales son responsables de conferir el principal atributo estructural de las cadenas colagénicas, la formación de la hélice de poliprolina tipo II (Bhatnagar & Gough, 1996).

Las hélices de poliprolina II corresponden a un plegamiento local que se caracteriza por presentar ángulos dihedros de $\Phi=-75^\circ$ y $\Psi=150^\circ$ y un enrollamiento extendido hacia la izquierda (3.1 \AA por residuo). Pese a que se tenga conocimiento de este tipo de estructura desde hace mucho tiempo³⁵, su asignación no es muy común debido a la ausencia de puentes de hidrógeno; por lo que se ha teorizado que este tipo de estructura se produce únicamente en el estado de random coil o en proteínas completamente desestructuradas (Adzhubei et al., 2013). Sin embargo, a pesar de que las frecuencias de las hélices de poliprolina tipo II no son muy comunes, estas estructuras se pueden encontrar en proteínas con estructuras cristalográficas resueltas (Kumar & Bansal, 2016) e inclusive en proteínas globulares; especialmente porque las hélices de poliprolina II se produce también en secuencias que no necesariamente contienen una alta densidad de iminoácidos (Makowska et al., 2006). Biológicamente, se ha sugerido por diversos autores que las hélices de poliprolina tipo II participan en diferentes procesos como la fibrilogénesis en proteínas amiloides, interacciones proteína-proteína o proteína-ácido nucleico y en el facilitamiento del plegamiento proteico (Adzhubei, Anashkina, & Makarov, 2017). El dicroísmo circular, es una excelente técnica para la verificación y la ocurrencia de este tipo de estructuras. Por ejemplo se sabe que las hélices de poliprolina tipo II en péptidos sintéticos Pro_n poseen un máximo positivo a 228 nm (transición $\pi-\pi^*$) y negativo a 206 nm (transición $n-\pi$). No obstante, estos valores suelen recorrerse en modelos de politripéptidos colagénicos con abundante contenido de iminoácidos (Bhatnagar & Gough, 1996).

En cuanto al espectro típico del colágeno, este suele explicarse por la aportación de las hélices de poliprolina tipo II y también las glicinas presentes en la estructura. Encontrándose generalmente un máximo positivo a 220 nm y un mínimo negativo a 196.5 nm (Bhatnagar & Gough, 1996). Conforme con la figura 23.a, se observa que para el colágeno de cola de rata tipo I se identifica claramente el mínimo negativo a ± 197 nm pero no la banda positiva a 220 nm, aunque en la medición a 4°C se identifica una banda en esta región con valores de elipicidad negativos que se acercan mucho al 0.

35 Las hélices de poliprolina tipo II se han identificado desde los primeros trabajos de deducción estructural del colágeno.

Las otras mediciones a 20°C, 35°C y 60°C muestran claramente el desestructuramiento de la triple hélice del colágeno de cola de rata debido a la pérdida de intensidad del mínimo negativo a 197 nm y también de la banda a 220 nm. La muestra correspondiente a Hino FILT 0.1 mg/ml (Figura 23.b) presenta un espectro similar en el mínimo negativo, el cual se encuentra en 200 nm para la medición a 4°C, aunque la banda positiva a 220 nm es inexistente en cualquiera de las mediciones. A diferencia de la muestra de colágeno de rata, se observa una pérdida menor de estructura en función de la temperatura lo cual puede ser indicio de la desestructuración inicial de la muestra al comienzo de la medición. Esto último cobraría mayor sentido, dado que el máximo de absorción a 200 nm se corresponde muy bien con el máximo que se suele encontrar en los espectros de proteínas en estado “random coil”. No obstante, las marcas espectroscópicas de las muestras Hino FILT 0.1mg/ml y las de colágeno de cola de rata también coinciden con aquellas reportadas por (Drzewiecki, Grisham, Parmar, Nanda, & Shreiber, 2016) para la fibrillogénesis de Telo y atelocolágeno de rata tipo I³⁶. En dicho estudio, se identificaron 2 transiciones correspondientes a la fibrillogénesis y a la desnaturalización a 25 y 45°C respectivamente. El cambio en los espectros de dicroísmo entre las transiciones de *triple hélice* → *Fibrillas* → *Desnaturalización* estuvo acompañado por la pérdida del máximo a 222nm y el surgimiento de una fuerte señal negativa entre 204 – 210nm. Por lo tanto, podría suponerse que tomando como evidencia los espectros de dicroísmo de las muestras antes señaladas, el mínimo reportado por Drzewiecki y colaboradores en 2016 se encuentra presente, siendo esta la marca espectral más conspicua. Finalmente, no escapa a la atención el suavizamiento del mínimo negativo entre 204 – 210 nm en función de la temperatura, dado que a 60°C el valor de miliángulos de elipicidad (mdeg) es menor comparado con las mediciones a 4, 20, 35°C. Sugiriendo por lo tanto la presencia de otros motivos estructurales presentes en la muestra, los cuales dada la evidencia recogida por HPLC y también por DLS harían pensar en fibrillas colagénicas.

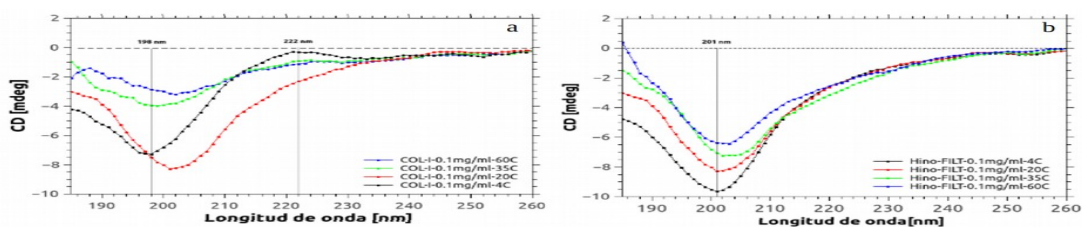


Figura 23. Espectro de dicroísmo circular. (a) Colágeno de cola de rata tipo I a diferentes temperaturas (4°, 20°, 35° y 60°C), (b) Hino FILT 0.1M ácido acético a diferentes temperaturas (4°, 20°, 35° y 60°C).

36 Atelocolágeno hace referencia a aquel colágeno que carece de los telopéptidos C y N terminal. Telocolágeno se refiere al colágeno con los telopéptidos C y N terminales completos.

El espectro de dicroísmo circular de las fracciones Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17 y Hino FPLC 18-23 se muestran en la figura 24. La fracción Hino FPLC 8-11 destaca por su gran similitud respecto a los espectros de dicroísmo reportados para el colágeno en Bhatnagar & Gough, 1996; Drzewiecki, Grisham, Parmar, Nanda, & Shreiber, 2016, encontrándose un máximo de intensidad a 220 nm y un mínimo a 197nm que corresponderían a la transición $n\pi^*$ y $\pi\pi^*$ respectivamente. Inclusive Jenness, Sprecher, & Johnson en 1976 propusieron que el monitoreo de las intensidades de estas dos bandas podría servir como predictor del contenido de la triple hélice en una muestra. Así mismo otros autores como Brown, Hopfinger, & Blout (1972), Chien & Wise (1975) y Hayashi & Prockop (1979) han advertido del uso de estas dos bandas para el monitoreo de los cambios conformacionales en el colágeno y también en polímeros de triple hélice. Por lo tanto, las altas intensidades de estas dos bandas en la muestra Hino FPLC 8-11 corresponderían a una estructura de triple hélice. Las otras dos fracciones no presentan bandas en estas longitudes de onda, por lo que racionalmente podría concluirse que corresponden a polímeros sin estructura. Nótese también en la figura 19 que la muestra de colágeno de cola de rata (COL I 0.1 mg/ml 4C) también posee bandas en las mismas longitudes de onda aunque comparativamente mucho más atenuadas respecto a Hino FPLC 8-11, lo que sugiere posiblemente un cambio en la estructuración de la triple hélice dentro del control positivo, el cual se ve mucho más evidente en la figura 9 (a) donde el incremento de temperatura reduce considerablemente las intensidades en la banda de 220 nm y 197nm.

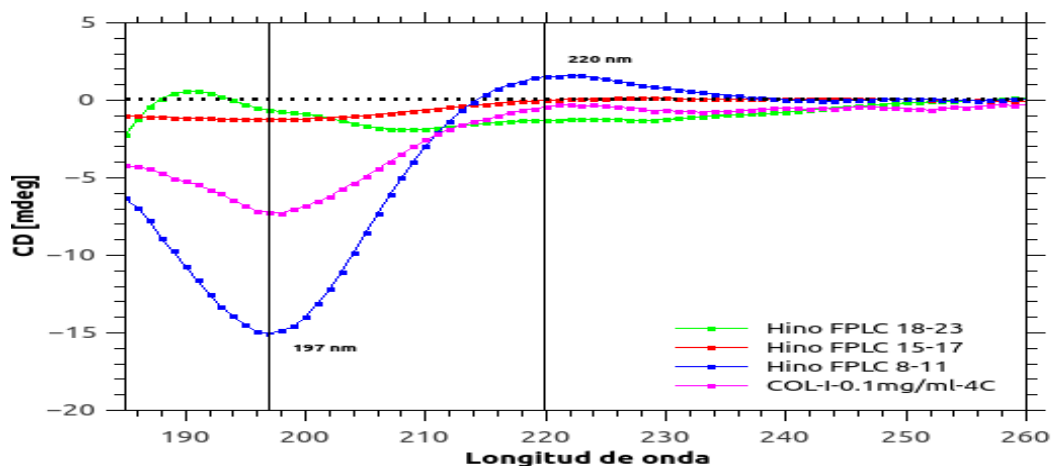


Figura 24. Espectro de dicroísmo circular de las muestras Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17 y Hino FPLC 18-23. Se incluye también como control positivo un espectro de colágeno tipo I de cola de rata (COL I 0.1 mg/ml 4C).

9.5 Determinación de la estructura secundaria

9.5.1 Infrarrojos

Los picos generados durante la deconvolución de la amida I (1600-1700 cm^{-1}) y la amida III (1200-1350 cm^{-1}), se analizaron como porcentajes de contribución a la intensidad total en el ajuste Gaussiano de la señal original; esto se pudo hacer tomando el valor de la integral de los picos (áreas) y encontrando su contribución en términos de porcentaje. El anexo 4 muestra los picos, porcentajes de contribución, centros y asignación de estructura secundaria para la amida I y III respectivamente.

El análisis de la amida I revela la presencia de estructuras secundarias como α hélices, hojas β , giros y evidencia de cadenas agregadas en la predicción de estructura por medio del FTIR para las fracciones Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17 y Hino FPLC 18-23 (Ver figura 25 y 26). No obstante, la contribución de cada uno de estos tipos no es la misma en todas las fracciones. Por ejemplo las hélices contribuyen con un 39,3% en la fracción FPLC 8-11, mientras que en las otras dos fracciones (Hino FPLC 15-17 y Hino FPLC 18-23) apenas constituyen el 19,2% y el 10,1% respectivamente; las hojas β en cambio, poseen una mayor contribución en la fracción Hino FPLC 15-17 (34,9%) y Hino FPLC 18-22 (18,3%) mientras que en Hino FPLC 8-11 es de apenas el 4,0%. Los giros también poseen un porcentaje de participación alto, especialmente en la primera fracción (Hino FPLC 8-11) donde su porcentaje es del 39% aunque para la fracción siguiente (Hino FPLC 15-17) apenas sea del 4,1%; en la última fracción (Hino FPLC 18-23) los giros explican un 31,3% de la estructura secundaria. Finalmente, el agregamiento de las cadenas también puede inferirse tomando en cuenta las predicciones de Jackson & Mantsch en 1995. De acuerdo con este último criterio, las fracciones Hino FPLC 15-17 y Hino FPLC 18-23 poseen un 41,8% y 40,3% de agregamiento de cadenas mientras que Hino FPLC 8-11 un 16,4%.

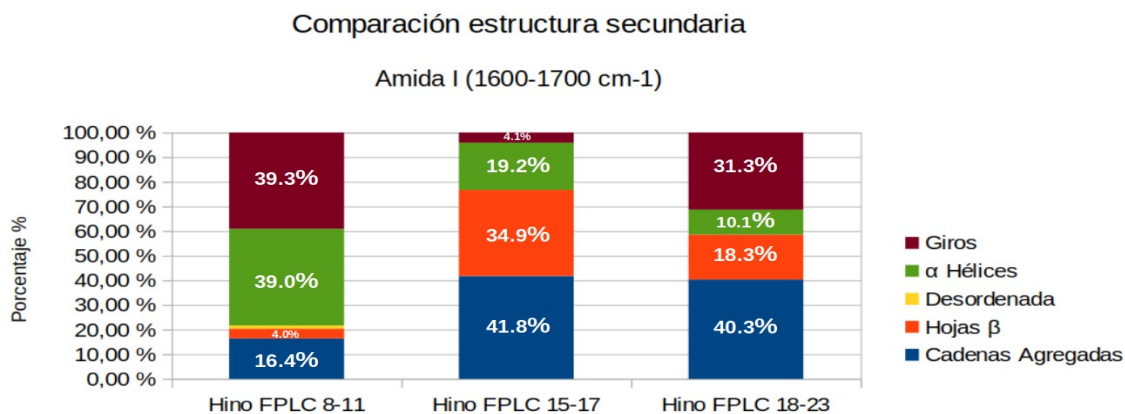


Figura 25. Contribución de los tipos de estructura secundaria predichos en la deconvolución de la amida I (1600 – 1700 cm^{-1}) para las fracciones Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17 y Hino FPLC 18-23.

El análisis de la amida III también permite determinar y/o confirmar los tipos de estructura secundaria presentes en una proteína. En este caso, se puede corroborar la presencia de α hélices y hojas β en diferentes proporciones para todas las fracciones. Por ejemplo las hélices α contribuyen en un 39.5% en la predicción de estructura para la fracción Hino FPLC 8-11 y tan sólo 9.4% para la fracción Hino FPLC 15-17; las hojas β por su parte aportan el 8.8, 6.3 y 89.8% para las fracciones Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17 y Hino FPLC 18-23 respectivamente. Pese a que conforme con la información en la literatura científica revisada, los autores no predicen giros ni agregamientos de proteína en la amida III, si se introduce una nueva categoría: *Random Coil*.

El estado de *random coil* se conoce desde hace mucho tiempo y se ha estudiado en proteínas principalmente bajo condiciones desnaturalizantes; según Tanford (1968) este puede describirse como aquel en la que la rotación interna puede llevarse a cabo en cada enlace que conecta los monómeros del polímero con la misma libertad que como si ocurriera en una molécula de menor tamaño, mientras que Shortle en 1996 lo ha descrito como un estado donde no ocurren interacción entre cadenas laterales, Smith, Fiebig, Schwalbe, & Dobson (2000) lo asumen como una conformación en la que los ángulos Φ y Ψ de un residuo son independientes de los ángulos Φ y Ψ de los demás residuos presentes en el polímero. En sentido práctico en las proteínas, el *random coil* consiste en la orientación aleatoria de los aminoácidos mientras aún permanecen unidos mediante enlaces peptídicos. Según la teoría, el *random coil* no consiste en una única estructura, sino en una distribución estadística de las distintas conformaciones e inclusive se ha llegado a plantear, que en este estado aún persisten elementos estructurales residuales que pueden servir como centros de nucleación para el plegamiento correcto de la proteína³⁷.

Según el análisis de estructura secundaria de la amida III, las fracciones Hino FPLC 8-11 y Hino FPLC 15-17 presentan respectivamente un 36,8% y un 64,9% de contribución del estado *random coil* en su estructura; mientras que la fracción Hino FPLC 18-23 no hay aportación de este a la estructura secundaria.

37 Las evidencias a favor de la persistencia de estructura secundaria residual en el estado de random coil, surgen principalmente por la determinación del R_g (radio de giro) en proteínas desnaturalizadas mediante las técnicas de viscosidad intrínseca, NMR (efecto nuclear Overhauser) y también SAXS (small angle x-ray scattering). En varios de los experimentos reportados en la literatura el radio de giro calculado para la condición de random coil no corresponde con el experimental si no que por el contrario, este resulta ser menor (Logan, Thériault, & Fesik, 1994; Neri, Billeter, Wider, & Wüthrich, 1992; Shih et al., 2015; Sosnick & Trewthella, 1992).

Comparación estructura secundaria

Amida III (1200-1350 cm⁻¹)

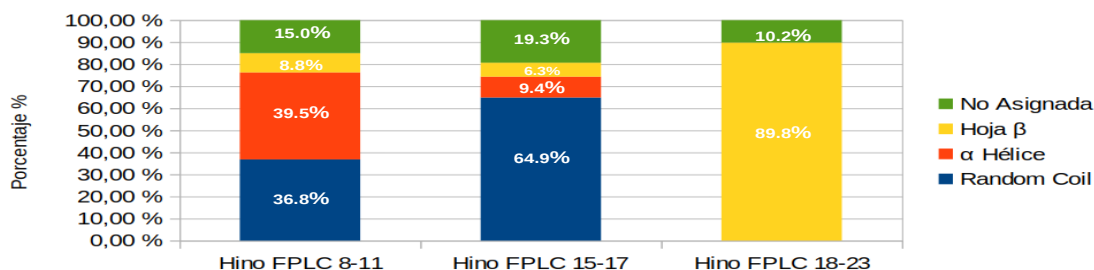


Figura 26. Contribución de los tipos de estructura secundaria predichos en la deconvolución de la amida III (1200 – 1350 cm⁻¹) para las fracciones Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17 y Hino FPLC 18-23.

Para la muestra Hino FILT 0.1M, la deconvolución del pico de la amida I reveló una contribución del 44% de hojas β, 25.7% de hélices α, 27.1% de giros y tan sólo 2.7% de agregamiento en las cadenas. La amida III mostró una participación menor de hojas β (21.9%), hélices α (4.9%) (Figura 27). El estado de random coil para esta muestra conforme la amida III contribuye en un 71.2%.

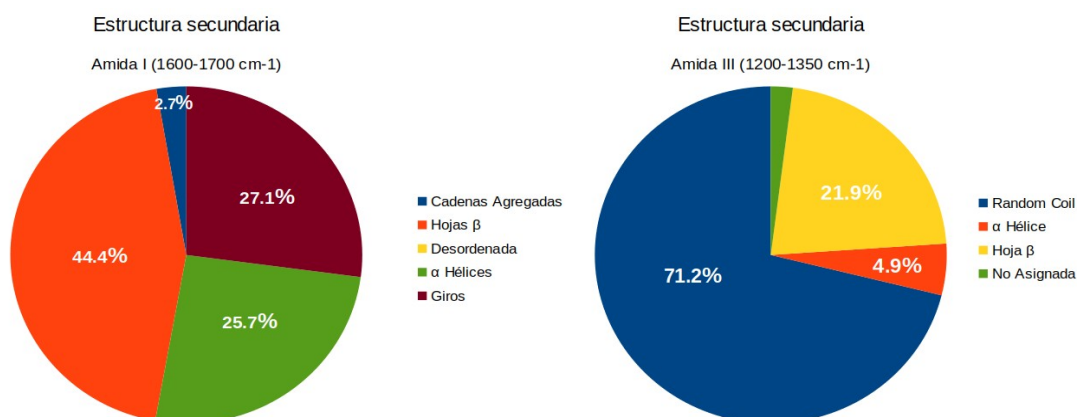


Figura 27. Contribución de los tipos de estructura secundaria predichos en la deconvolución de la amida I (1600 – 1700 cm⁻¹) y amida III (1200 – 1350 cm⁻¹) para la muestra Hino FILT Ácido acético 0.1M.

Los resultados de la participación de los diferentes tipos de estructura secundaria tienen una marcada diferencia entre las fracciones Hino FPLC y la muestra Hino FILT Ac. Acet 0.1M; particularmente, la contribución del estado de agregamiento de cadenas en el pico de la amida I (1610 – 1628 cm⁻¹) (Jackson & Mantsch, 1995) resulta ser mucho mayor en las muestras Hino FPLC 8-11, 15-17 y 18-23; en tanto que para la muestra Hino FILT la contribución es muy pequeña (2.7%). Esto puede deberse a las condiciones diferenciales del buffer ya que las muestras Hino FPLC se mantuvieron en

buffer Na_2HPO_4 20 mM, pH 8.0, mientras que la muestra Hino FILT en ácido acético 0.1M, pH 2.5. Esta diferencia resulta ser no trivial, dado que diversos autores han estudiado la cinética de agregación del colágeno bajo condiciones diferentes de pH, fuerza iónica y sistema buffer (Bianchi et al., 1967; Harris et al., 2013; Hayashi & Nagai, 1973; Kotch & Raines, 2006; Li et al., 2009; Marelli et al., 2015; Ripamonti et al., 1980; Frederick H Silver, 1981; Zhu & Kaufman, 2014), determinando por ejemplo que un sistema buffer de fosfatos ligeramente alcalino (7.0 – 9.0) y una fuerza iónica alta (NaCl 100 – 500 mM) propenden la generación de fibras colagénicas con patrones de bandeado congruentes con el espaciamiento de 67 nm. Inclusive, en este trabajo se condujeron experimentos de verificación de diámetros hidrodinámicos por DLS buscando el “mejor” buffer que promoviera el desagregamiento del colágeno, encontrando que la condición Tris 35 mM, NaCl 100 mM, Urea 8 M, Brij 35 0.07 mM a un pH de 8.0 reduce el radio hidrodinámico, aunque este no coincide con el reportado para la cadena alpha 1 de 13.8 nm (F. H. Silver & Trelstad, 1981). No obstante, los radios hidrodinámicos de otras condiciones (especialmente aquellas con pH's ligeramente alcalinos) promovían la agregación de la proteína (ver figura 27) encontrando radios hidrodinámicos similares a los diámetros determinados por AFM (100 – 400 nm) (Erickson et al., 2013; Revenko, Sommer, Minh, Garrone, & Franc, 1994). Otro resultado de estos experimentos con DLS resultó ser el tamaño de los diámetros hidrodinámicos que se producían en el ácido acético 0.5M, dado que bajo esta condición se generan los mayores y menores tamaños (3000 – 12 nm respectivamente) lo cual resuena con las observaciones iniciales de la muestra Hino FILT ácido acético 0.1M (formación de un precipitado insoluble inclusive a bajas concentraciones de proteína [1mg/ml]) y también con el análisis de FITR puesto que, la deconvolución de la amida I no reveló presencia de agregados aunque sí una fuerte contribución del estado de *random coil* según la amida III, pudiendo sugerir entonces que el ácido acético en este caso permite disolver eficazmente el colágeno aunque este asuma un desestructuración/hélice de poliprolina tipo II. Lo anterior cobra aún mayor sentido cuando se toma en cuenta que es bien sabido de la capacidad de los ácidos orgánicos como el ácido acético para disolver y extraer el colágeno de los tejidos animales (Fitch, Harkness, & Harkness, 1955; Mocan, Tagadiuc, & Nacu, 2011; Schmidt et al., 2016) y también la baja tasa de formación de agregados (Harris et al., 2013; Zhu & Kaufman, 2014).

La presencia de estructuras tipo hoja β según el análisis de infrarrojos tanto para las fracciones Hino FPLC (8-11, 15-17 y 18-23) como para la muestra Hino FILT ácido acético 0.1M resulta interesante desde el punto de vista estructural; dado que, el proceso de agregamiento de proteínas generadoras de encefalopatías como Tau y las β amiloides se encuentra marcado por la transición hacia estructuras secundarias tipo hoja β durante la formación de fibras. Dentro de este contexto, la espectrometría de infrarrojos ha

resultado una excelente técnica para la verificación y también la evaluación del crecimiento de fibras amiloides. Por ejemplo Cerf et al. (2009) y Sarroukh et al. (2011) verificaron los cambios en la estructura secundaria del péptido β 1-40 y β 1-42 respectivamente durante el proceso de agregamiento y fibrilogénesis mediante FTIR; encontrando una estructuración inicial de hojas β antiparalelas que los autores atribuyen a los oligómeros, seguida de un cambio hacia hojas β paralelas características de las fibras. Tomando en cuenta lo anterior, puede sugerirse una relación entre la presencia de hojas β y el agregamiento de proteínas durante la formación de fibras, e inclusive esto resonaría con la fuerte presencia de dichas estructuras en los datos experimentales para el colágeno (fracciones Hino FPLC y la muestra Hino FILT 0.1M ácido acético). Sin embargo la interpretación de estos datos debe ser cautelosa dado que la estructuración de ambas fibras es completamente distinta. Por ejemplo, se ha sugerido que la formación de la triple hélice colagénica ocurre como una “cremallera” (*zipper like*) en la que la transición de los enlaces peptídicos *-cis* hacia *-trans* promueve la estructuración de la triple hélice (asumiendo probablemente una conformación en los monómeros tipo hélice de poliprolina tipo II) a lo largo del esqueleto de la estructura, que luego se mantiene por los puentes de hidrógeno y la interacción con el agua, mientras que en las proteínas β amiloides ocurre un fenómeno de apilamiento de las hojas β individuales formando una fibra que se estructura también por puentes de hidrógeno y puede formar otros plegamientos β como solenoides, prismas, espirales y cintas (Kajava, Squire, & Parry, 2006). Posiblemente uno de los factores que al menos parece evitar la transición hacia hojas β en las cadenas monoméricas del colágeno, resulta ser la baja propensión de la prolina y la glicina a formar estructuras de este tipo (Shoulders & Raines, 2009), además al parecer se requiere de suficiente cantidad de estos dos aminoácidos para formar elastómeros en lugar de fibras amiloides (Shoulders & Raines, 2009).

9.5.2 Dicroísmo circular

Los espectros generados de dicroísmo circular fueron utilizados para generar predicciones de estructura secundaria utilizando las herramientas Secondary structure stimulation de la suite Spectra™ Manager, el servidor web CAPITO y la herramienta DicroMatch para emparejar los espectros experimentales con secuencias reportadas en la base de datos de espectros de dicroísmo circular PCDDDB. Las predicciones de estructura se encuentran resumidas en la tabla 7.

MUESTRA	Secondary structure stimation (Spectra™ Manager suite)				Cd Analysis & Plotfing Tool (CAPITO)			DibroMatch		
	Hélice	Hoja β	Giro	Otro	Hélice	Hoja β	Irregular	Match	PCDDBid	NRMSD
Hino FPLC 8-11	4,90 %	35,70 %	14,20 %	45,20 %	0,00 %	1,00 %	99,00 %	bovine collagen type II	CD0004552000	0,999
								bovine collagen type II	CD0004556000	0,999
								bovine collagen type II	CD0004557000	0,999
Hino FPLC 15-17	5,00 %	37,00 %	13,90 %	44,10 %	0,00 %	1,00 %	99,00 %	bovine collagen type II	CD0004552000	0,994
								bovine collagen type II	CD0004557000	0,995
								bovine collagen type II	CD0004556000	0,995
Hino FPLC 18-23	5,00 %	37,40 %	13,80 %	43,80 %	99,00 %	1,00 %	99,00 %	eGFP	CD0004253000	0,969
								eGFP	CD0004252000	0,971
								eGFP	CD0004254000	0,988
Hino Col 0,1mg 4C	11,30 %	23,00 %	17,80 %	47,90 %	99,00 %	1,00 %	99,00 %	bovine collagen type II	CD0004552000	0,999
								bovine collagen type II	CD0004556000	1
								bovine collagen type II	CD0004557000	1
Hino FILT 0,1mg 4C	3,70 %	34,90 %	13,80 %	47,60 %	99,00 %	1,00 %	99,00 %	bovine collagen type II	CD0004552000	0,999
								bovine collagen type II	CD0004557000	0,999
								MEG-14	CD0004058000	0,999

Tabla 7. Predicción de estructura secundaria (Spectra™ Manager suite & CAPITO) y emparejamiento de espectros experimentales con espectros del PCDDDB para las muestras Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17, Hino FPLC 18-23, Hino Col 0,1mg 4C y Hino FILT 4C.

La predicción de estructura secundaria tanto del servidor CAPITO como de la herramienta Secondary Structure Stimation de la suite Spectra™ Manager revelaron un gran porcentaje de estructuras irregulares (99% para el servidor CAPITO) y también de estructuras no asignadas ($\pm 45\%$ en el *Secondary Structure Stimation*). Así mismo, las estructura tipo hélice α tuvo una baja representación ($\pm 5\%$) en la herramienta de la suite Spectra™ Manager mientras que con el servidor web CAPITO, para las muestras Hino FPLC 18-23, Col 0,1mg 4°C y Hino FILT 0,1mg 4°C la predicción fue del 99%. Las hojas β tuvieron una asignación muy baja para todas las muestras según la predicción del servidor web, en tanto que, con la herramienta de la suite Spectra™ Manager éstas en promedio fueron de $\pm 33\%$.

Los anteriores resultados difieren considerablemente respecto a las predicciones hechas mediante la deconvolución de la amida I y III del FTIR, aunque a grandes rasgos coinciden las contribuciones grandes de las hojas β y también del *random coil* (donde se incluyen las categorías de “desordenadas”, “irregulares” y “otro”). La aportación mayoritaria del *random coil* según las predicciones de estructura generadas a partir de los datos de dicroísmo, a primera vista confirmaría la desnaturalización del colágeno en la muestra, No obstante, otras estructuras secundarias de proteínas en particular la hélice de poliprolina tipo II también genera espectros similares. Esta ambigüedad ha sido explorada por diferentes autores; por ejemplo Lopes, Miles, Whitmore, & Wallace en 2014 propusieron que las propiedades espectroscópicas del colágeno son bastantes acertadas para representar a las hélices de poliprolina tipo II que ocurren en las proteínas de forma nativa; particularmente, señalan a el máximo positivo a 222 nm como un elemento clave para diferenciar los espectros de proteínas desnaturalizadas,

dado que en estas últimas se encontraría ausente³⁸. Lo anterior resuena con el espectro generado para la fracción Hino FPLC 8-11 y también el control positivo de colágeno de rata (Col 0.1 mg 4°C) ya que estas marcas espectroscópicas se encuentran presentes; corroborando de esta forma la posible presencia de hélices de poliprolina tipo II a pesar de que en los predictores no se incluye esta categoría³⁹. Las otras muestras también tienen como componente mayoritario de su estructura secundaria la categoría de “otro” o “irregular”; No obstante, el máximo de 222 nm se encuentra ausente aunque el mínimo alrededor de los 200 nm se mantiene. Esto último podría estar relacionado con la presencia de fibras de acuerdo a Drzewiecki et al., (2016) puesto que en este trabajo encontraron que las fibras colagénicas presentan una marca espectral en la que desaparece el máximo a 222 nm (de hecho, la intensidad negativa a esta longitud de onda se vuelve mayor) y se encuentra un mínimo muy pronunciado \pm 200 nm. Finalmente, en cuanto al porcentaje alto de estructuras tipo hoja β generado durante la predicción con la herramienta *Secondary Structure Stimulation*, este podría explicarse también por la tendencia a la estructuración de este tipo en proteínas fibrilares; por ejemplo, Esipova et al. en el 2009, caracterizaron la estructura secundaria de análogos sintéticos de la espiroína I y II por medio de dicroísmo circular, demostrando la fuerte presencia de hélices de poliprolina tipo II y también una transición hacia estructuras tipo hoja β que los autores correlacionan con la deshidratación de la cadena (en un buffer de etanol al 50%) y también la formación de fibras. Sin embargo, pese a que existen muchos otros ejemplos de la transición hacia estructuras tipo hoja β durante la fibrillogénesis de proteínas amiloides como Tau y la α -sinucleína, la formación de fibras colagénicas nunca se ha caracterizado por presentar transición hacia hojas β . En cambio, como ya se ha planteado antes, el espectro característico corresponde a una hélice de poliprolina tipo II. Aunque, examinando los ángulos Φ y Ψ de esta clase de estructura (-75° y 150°), se encuentra que son muy similares a los de las hojas β (-80° y 150°) presentando diferencias únicamente en el ángulo Φ . Respecto a lo anterior Bhatnagar & Gough (1996) han postulado que la barrera entre hojas β y hélices PPII's es lábil (Ver figura 28), ya que tomando como referencia los mapas de energía potencial del dipéptido Ala-Ala, la energía potencial para pasar de un lado a otro no es muy alta, pudiendo favorecerse de este modo la conformación PPII ante un pequeño estímulo producido probablemente por la interacción de las cadenas laterales. Resulta interesante

38 A parte del máximo a 222nm, otra de las marcas espectroscópicas que caracterizan al colágeno consiste de un mínimo que ocurre cerca a los 200 nm, el cual puede recorrerse a longitudes de onda menores cuando las proteínas se desnaturalizan.

39 La mayoría de los algoritmos que generan predicciones de estructura secundaria de proteínas, se basan en la búsqueda de puentes de hidrógeno que estabilizan estructuras como hélices, hojas y también giros. No obstante, las hélices de poliprolina tipo II carecen de este tipo de interacciones, y su geometría se define principalmente por el impedimento estérico que causan los anillos de las prolinas e hidroxiprolinas.

ver aquí que los espectros entre una estructura (Hoja β) y otra (Hélice PPII) son altamente diferentes a pesar que el reordenamiento de los ángulos de torsión es relativamente bajo.

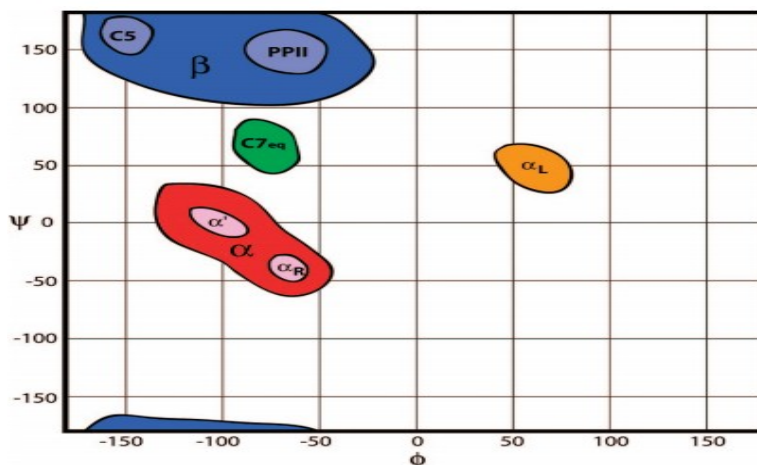


Figura 28. Representación esquemática de las mayores “cuencas” conformacionales muestreadas a partir de Los ángulos Φ y Ψ en residuos diferentes de glicina y prolina. Tomado de Feig (2008).

Para verificar que la marca característica en los espectros de dicroísmo circular del colágeno consiste en una hélice de poliprolina tipo II, se procedió a generar una base de datos con péptidos colagénicos con estructuras cristalográficas resueltas en el PDB, a los que se les hizo predicción de estructura secundaria mediante los servidores 2Struc y PolyprOnline haciendo uso de varios algoritmos como DSSP, P-SEA, STRIDE, PROSS, SEGNO y DSSP-PPII (ver tabla 8).

PEPTIDOS COLAGÉNICOS PARA ANÁLISIS DE ESPECTRO DICROÍSMO		PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA 2° (2Struc)									PREDICCIÓN DE PP's II (PolyprOnline)			
		DSSP			P-SEA			STRIDE			PP's II	α Hélices	Hojas β	Coil/Turn/Gap
		α Hélices	Hojas β	Otro	α Hélices	Hojas β	Otro	α Hélices	Hojas β	Otro				
3DMW	Crystal structure of human type III collagen G982-G1023 containing C-terminal cystine knot	0,0%	0,0%	100,0%	-	-	-	0,0%	3,2%	86,8%	↑↑↑	-	-	↑
5CTI	Crystal structure of the type IX collagen NC2 hetero-trimerization domain with a guest fragment a2a1a1 of type I collagen (native form)	33,2%	0,0%	66,8%	34,1%	3,3%	62,6%	34,6%	0,0%	65,4%	↑↑↑	↑↑	-	↑
2CUO	Collagen model peptide (PRO-PRO-GLY)9	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	↑↑↑	-	-	↑
5Y46	Crystal structure of a collagen-like peptide with interruption sequence	0,0%	0,0%	100,0%	-	-	-	0,0%	0,0%	100,0%	↑↑↑	-	-	↑
2G66	Crystal structure of a collagen-like peptide with 3(S)Hyp in the Xaa position	0,0%	0,0%	100,0%	-	-	-	0,0%	0,0%	100,0%	↑↑↑	-	-	↑
2D3F	Crystal structures of collagen model peptides (Pro-Pro-Gly)4-Pro-Hyp-Gly-(Pro-Pro-Gly)4	0,0%	0,0%	100,0%	-	-	-	0,0%	0,0%	100,0%	↑↑↑	-	-	↑

Tabla 8. Péptidos colagénicos para análisis del espectro de dicroísmo circular teórico generado mediante el servidor PDB2CD y predicción de elementos de estructura secundaria mediante los servidores 2Struc y PolyprOnline. Nótese la inclusión de péptidos colagénicos de diferentes longitudes, con inclusión de dominio N-terminal (5CTI), motivos colagénicos ininterrumpidos (2CUO) e interrumpidos (5Y46). En cuanto a la predicción de elementos de estructura secundaria, se reportan en porcentaje excepto para el servidor PolyprOnlineDonde (↑↑↑) indica alta, (↑↑) media y (↑) baja representatividad.

A continuación, se generaron espectros de dicroísmo circular teóricos utilizando el servidor web PDB2CD y se compararon con las muestras Hino FPLC 8-11 , Hino FILT 0.1 mg/ml 4C° y Col 0.1 mg/ml 4C° (ver figura 29).

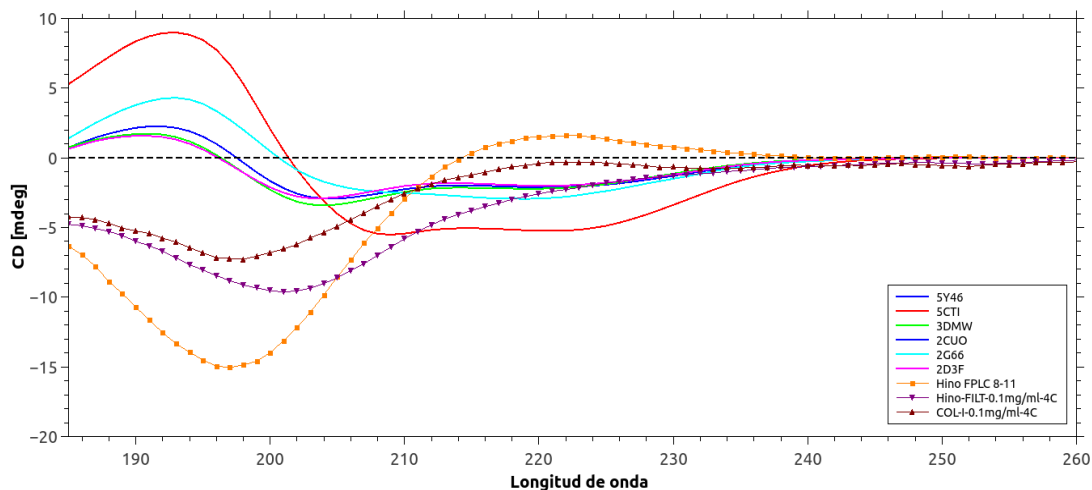


Figura 29. Espectros de dicroísmo circular de péptidos colagénicos generados a partir del servidor 2Struc. Nótese en la figura los espectros experimentales de Hino FPLC 8-11, Hino FILT 0,1 mg/ml 4C y COL I 0,1 mg/ml 4C.

La figura 29 muestra los espectros teóricos para los péptidos colagénicos antes señalados; en donde se identifica que las marcas espectrales típicas del colágeno y/o de hélices de poliprolina tipo II se encuentran ausentes. De hecho, la mayoría de los espectros tienen propiedades similares a las de las α hélices, especialmente el péptido 5CTI dado que el dominio N-terminal se caracteriza por presentar este tipo de estructuras, empero, los otros espectros tienen características similares como el doble mínimo negativo a 208 y 222 nm. Los espectros teóricos también poseen características comunes a las proteínas con estructura secundaria tipo hoja β II, ya que se observan máximos positivos en la región entre los 190 y 200 nm, sin embargo estas predicciones teóricas no logran identificar el mínimo negativo altamente pronunciado a \pm 198 nm característico de las hélices PPII's. Este problema ha sido identificado y también actualmente mucha investigación se lleva a cabo con el propósito de encontrar verdaderas funciones de onda que describan este comportamiento. Sumado a lo anterior, debe tomarse en cuenta que la predicción del espectro de dicroísmo circular teórico de una proteína, se deteriora en función del porcentaje de estructuras irregulares y también del mayor número de puentes disulfuro (Bulheller, Rodger, & Hirst, 2007).

Finalmente, los emparejamientos hechos con el servidor DicroMatch (ver tabla 8) mostraron coincidencias con el espectro del colágeno tipo II de origen bovino (PCDDB) en todas las muestras analizadas, excepto la fracción Hino FPLC 18-23, la cual coincide

con el espectro de la proteína verde fluorescente eGFP. Esto último resulta alentador dado que al parecer existe una coincidencia entre los espectros experimentales y los reportados para el colágeno, No obstante, las marcas espectroscópicas de esta proteína (hélice PPII) presentan ambigüedades pudiéndose confundir con un espectro característico de una proteína desestructurada y también con el espectro de una proteína con estructuras hoja β II.

9.6 Fibrillogénesis

9.6.1 Monitoreo por dispersión dinámica de luz (DLS)

Para verificar el tamaño de las moléculas aisladas en las fracciones obtenidas mediante FPLC de la extracción de colágeno de *Holothuria inornata* y *Holothuria lubrica*, se procedió analizarlas por DLS (ver tabla 9) encontrando evidencia a favor de un fuerte agregamiento de los monómeros α dado que el diámetro hidrodinámico no se encuentra cerca del reportado por Silver en 1981.

	Radio hidrodinámico (nm)	Diámetro hidrodinámico (nm)
Hino FPLC 8-11	141,7	283,4
Hino FPLC 15-17	187,95	375,9
Hino FPLC 18-23	109	218
Hlub FPLC 8-11	81,45	162,9
Hlub FPLC 16-18	105,4	210,8
Hlub FPLC 19-23	120,35	240,7
Monomer α (Silver, 1981)	13,8	27,6
Dimer β (Silver, 1981)	21,5	43
Trimer γ (Silver, 1981)	25,7	51,4

Tabla 9. Diámetro y radio hidrodinámico (nm) de las fracciones colectadas de *H. inornata* (Hino) y *H. lubrica* (Hlub).

El gráfico de intensidad (Figura 30) muestra claramente agregados con diámetros hidrodinámicos que se ubican entre 105 – 605 nm, los cuales corresponden con el tamaño para los radios hidrodinámicos reportados para las fibrillas colagénicas.

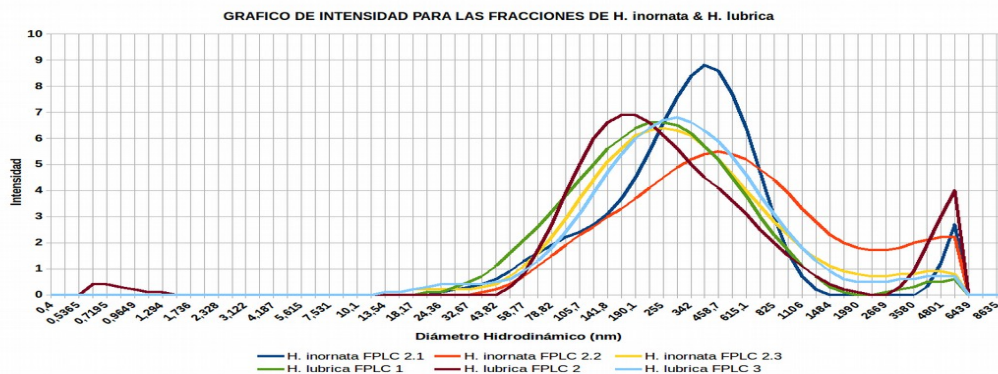


Figura 30. Gráfico de intensidad para las fracciones de *Holothuria inornata* y *Holothuria lubrica*.

Buscando encontrar mejores condiciones para prevenir el agregamiento del colágeno aislado de *H. inornata* y *H. lubrica*, se procedió a hacer experimentos con colágeno Tipo I de cola de rata de la marca Sigma-Aldrich® (Ver sección 9.1.2).

Dado que el análisis de los cromatogramas y también de los diámetros hidrodinámicos obtenidos por DLS reveló la presencia de un agregado molecular de gran tamaño, se procedió a evaluar las variables de pH, fuerza iónica y concentración de Urea mediante un diseño experimental cúbico (ver tabla 10). Debe de tenerse en cuenta que se utilizaron condiciones fijas como el buffer de fosfatos 35 mM y también el detergente no iónico Brij-35 en una concentración por debajo de su MMC⁴⁰ es decir 0.07 mM.

DISEÑO EXPERIMENTAL CÚBICO

UREA	ERZA IÓNICA (CONCENTRACIÓN Na	pH
2M	100mM	7.0
		5.0
	50mM	7.0
		5.0
8M	100mM	7.0
		5.0
	50mM	7.0
		5.0
5M	75mM	6.0

Tabla 10. Diseño experimental cúbico para el efecto de las variables de Urea, Fuerza iónica y pH Sobre el tamaño de los agregados de colágeno fibrilar Tipo I de cola de rata en solución.

Se evaluó el tamaño de los agregados mediante DLS y se incubaron las muestras a 40°C por 20 minutos. Los resultados de las poblaciones moleculares para cada tratamiento se pueden observar en la Figura 31.

40 MMC es el acrónimo de “concentración micelar mínima” la cual consiste en la concentración donde el detergente comienza a formar micelas. Se utilizó una concentración de 0.07mM la cual es menor a 0.09 mM (MMC para Brij-35) buscando ayudar a la solubilización y prevenir el agregamiento del colágeno.

Gráficos de intensidad para los distintos tratamientos

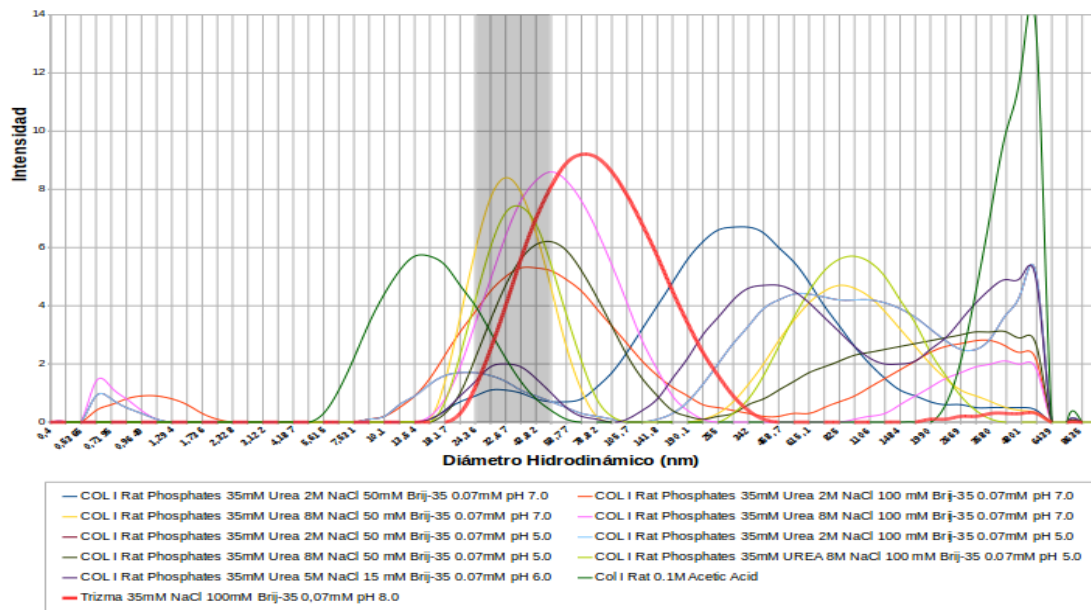


Figura 31. Gráfico de intensidad de los diámetros hidrodinámicos del colágeno de cola de rata Tipo I para los diferentes tratamientos. En gris se sombrea el área que corresponde a los diámetros hidrodinámicos reportados por Silver en 1981 para el colágeno fibrilar Tipo I.

De acuerdo con la figura 31, se evidencia que no existen poblaciones moleculares homogéneas, lo que se interpreta como diferentes estados de agregamiento del colágeno presumiblemente formando fibrillas (las cuales se encuentran en el rango de 200 nm según Li en el 2009) o estructuras similares. Para verificar el efecto de cada variable por separado y también la interacción de éstas sobre el diámetro hidrodinámico de las especies moleculares del colágeno en solución, se procedió a hacer un análisis de varianza (ANOVA) (ver tabla 11).

Análisis de Varianza para Diámetro hidrodinámico					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Urea	39538.7	1	39538.7	28.53	0.0001
B:Cloruro de sodio	5476.13	1	5476.13	3.95	0.0654
C:pH	3389.87	1	3389.87	2.45	0.1386
AB	931.628	1	931.628	0.67	0.4251
AC	0.129735	1	0.129735	0.00	0.9924
BC	8344.49	1	8344.49	6.02	0.0268
Error total	20785.6	15	1385.7		
Total (corr.)	82522.3	21			

Tabla 11. Análisis de varianza para la variable de respuesta diámetro hidrodinámico.

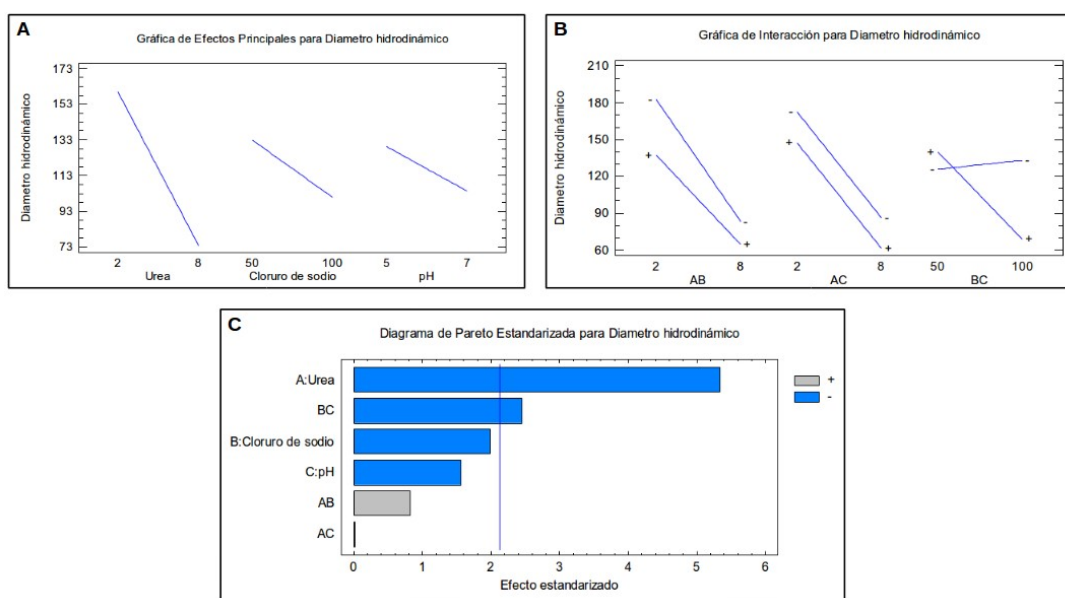


Figura 32. Gráfico de efectos principales de los factores sobre la variable diámetro hidrodinámico (A), gráfico de interacción de factores sobre la variable diámetro hidrodinámico (B), diagrama de Pareto para los efectos de los factores sobre la variable diámetro hidrodinámico (C).

En la tabla 11 se muestra que la única variable que tiene un efecto significativo en la disminución del diámetro hidrodinámico es la concentración de Urea ($p=0.0001$), así mismo la interacción entre las variables fuerza iónica y pH también posee un efecto sobre la disminución de los agregados del colágeno ($p=0.0268$). Este mismo efecto se muestra en el diagrama de Pareto (C) de la figura 31. El efecto de la urea al ser un caótropro consiste en la desestructuración completa de las proteínas (Of, Body, & Coli, 2011; Rossky, 2008) lo que impediría la fibrillogénesis del colágeno de forma organizada y por lo tanto, disminuiría el tamaño de los agregados. En cuanto a la interacción entre las variables de pH y fuerza iónica, en este caso el aumento del pH contribuye a la menor solubilidad de la cloruro de sodio contribuyendo de este modo a que menos iones interactúen con la superficie del colágeno, limitando el reclutamiento del agua⁴¹ para formar los puentes de hidrógeno intracatenarios característicos en las estructuras fibrilares, explicando de este modo el observable en la disminución de los diámetros hidrodinámicos de los agregados de colágeno. Con los datos recogidos del análisis de varianza, y particularmente con el gráfico A de la Figura 31 (Efectos principales de los factores sobre la variable diámetro hidrodinámico) se concluye que a mayor concentración de urea, aumento de la fuerza iónica y también aumento en el pH, el tamaño de los agregados disminuye, lo cual se contradice con lo reportado por (Harris

41 Debe de recordarse que a un pH entre 6.0 – 9.0 las especies moleculares colagénicas de tamaños heterogéneos se encuentran en su punto isoeléctrico y por lo tanto presentan menos interacciones con el agua, favoreciendo de este modo las interacciones proteína-proteína.

et al., 2013) donde el monitoreo por SEM de las fibras de colágeno reveló la formación preferencial de estas estructuras justamente a un pH mayor y también una fuerza iónica superior a las condiciones fisiológicas (200 – 300 mM). Posiblemente el efecto de la urea en este caso particular sea lo que más peso tenga en la reducción de los diámetros hidrodinámicos de los agregados, ya que ciertamente explica gran parte de la variación en el modelo de ANOVA empleado (ver por ejemplo el diagrama de Pareto para los efectos de los factores sobre la variable diámetro hidrodinámico © de la figura 31) aunque esta hipótesis tendría que verificarse más extensamente, por ejemplo monitoreando la fibrillogénesis del colágeno por SEM, AFM o microscopía confocal (Zhu & Kaufman, 2014).

Finalmente, con la información recogida se emplearon nuevas condiciones para la disolución del colágeno, esta vez empleando Tris 35 mM⁴², NaCl 100 mM, Urea 8 M, Brij 35 0.07 mM a un pH de 8.0 y se verificaron los diámetros hidrodinámicos por DLS (ver línea de color rojo en la Figura 31). El análisis del gráfico de intensidad para este tratamiento reveló una población menos heterogénea de moléculas y con un diámetro hidrodinámico claramente desplazado hacia la izquierda respecto a los otros tratamientos (salvo el ácido acético 0.5 M, el cual presenta la combinación de diámetros hidrodinámicos más pequeños, pero también los agregados más grandes⁴³).

42 Se utilizó Tris en este caso dado que el pH del buffer se desplazó desde 7.0 a 8.0.

43 Podría especularse en este caso la presencia de SLS's debido a las condiciones ácidas o inclusive una precipitación de la proteína cuando se encuentra sometida a la temperatura de 40°C, aunque ambos postulados requerirían una verificación ulterior.

10. Conclusiones

- Se desarrolló una nueva metodología para la extracción del colágeno fibrilar de holotúridos, logrando mayores rendimientos (1.4x respecto a los reportados) y un ajuste a un volumen final de 50 ml, que facilita las extracciones de colágeno en el laboratorio con mayores rendimientos.
- Se lograron separar mediante HPLC y FPLC las fracciones de colágeno fibrilar de *Holothuria inornata* y *Holothuria lubrica*. No obstante, los cromatogramas revelan fuertes agregados resistentes a su desnaturalización por agentes caotrópicos como la urea.
- Se logró hacer una identificación positiva del colágeno fibrilar marino en las muestras mediante LC-MS/MS. Esto constituye una nueva metodología para la identificación de este tipo de proteínas dado que no existen reportes que empleen estos métodos para la identificación de colágeno fibrilar en organismos marinos.
- Se demostró que la estructura del colágeno fibrilar de las especies *Holothuria inornata* y *Holothuria lubrica* es similar respecto a la reportada para el colágeno fibrilar de cola de rata. E inclusive, los espectros experimentales de dicroísmo circular de correspondieron con el de colágeno bovino tipo II mediante la herramienta del PCDDB Dichromatch.
- Los predictores de estructura secundaria a partir de espectros de dicroísmo circular CAPITO y la herramienta MSSA de la suite Spectra Manager™, no permiten la identificación de las hélices de poliprolina tipo II debido a la falta de una función de onda que la describa. Por lo tanto, los predictores antes señalados sólo identifican en los espectros estructuras aleatorias (*random coil*). Este mismo problema se reveló también en la generación de espectros de dicroísmo teóricos para los péptidos colagénicos sintéticos rescatados del PDB, donde las marcas espectroscópicas típicas de las hélices de poliprolina tipo II están ausentes. No obstante, el uso de la herramienta POLYPRONLINE permitió establecer la presencia de este tipo de estructuras, que inclusive se propagan por toda la cadena.
- La presencia de fibrillas colagénicas tiene como marcas espectroscópicas características, un pronunciado mínimo negativo entre 200 – 210 nm y la desaparición del máximo a 222 nm (Drzweicki et al., 2016). Estas marcas se encontraron en la muestra Hino FILT 0.1M por lo que suponemos que puede estar formando fibrillas.

- La evaluación de los diámetros hidrodinámicos medidos por DLS de las fracciones Hino FPLC 8-11, Hino FPLC 15-17 y Hino FPLC 18-23, confirmaron de la presencia de agregados que se encuentran en el rango de los observados para las fibrillas de colágeno.

11. Perspectivas

- Se recomienda hacer extracciones de colágeno usando pepsina y ácido acético, urea o cloruro de guanidinio con el fin de conservar los telopéptidos en las triple hélices colagénicas. Poder tener muestras con telopéptidos ausentes y presentes brindará mejores perspectivas y permitirá hacer un análisis más profundo y diferencial sobre el proceso de fibrilagénesis. Así mismo se recomienda el uso de enzimas que hidrolizen las muy numerosas glicosilaciones del colágeno.
- Para la caracterización fisicoquímica, se recomienda hacer la cuantificación de aminoácidos, un isoelectroenfoque y también emplear técnicas como la calorimetría diferencial de barrido para encontrar la T_m .
- El análisis estructural del colágeno fibrilar tipo I en solución, se vería mejor reforzado si se incluye dentro de los análisis experimentos de reología. Estos experimentos fueron iniciados en el presente proyecto aunque no se presentan resultados, dado que no se llevaron a término. Particularmente, el cálculo de los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') a través de un gradiente de temperatura, permitirá identificar las transiciones entre el proceso de fibrilagénesis dependientes de temperatura (complementando así, los espectros de dicroísmo que se hicieron a diferentes temperaturas para las muestras Hino FILT 0.1mg/ml y colágeno de rata tipo I de la marca Sigma Aldrich® (ver figura 23)).
- Finalmente, se sugiere complementar este trabajo con experimentos de microscopía electrónica de transmisión (TEM), barrido (SEM) y también de fuerza atómica (AFM), para caracterizar físicamente a las fibrillas colagénicas y poder medir atributos como forma y patrón de bandeo.

12. Referencias bibliográficas

- Abedin, M. Z., Karim, A. A., Ahmed, F., Latiff, A. A., Gan, C. Y., Che Ghazali, F., & Islam Sarker, M. Z. (2013). Isolation and Characterization of Pepsin-Solubilized Collagen From the Integument of Sea Cucumber (*Stichopus Vastus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(5), 1083–1088. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5854>
- Abraham, T. J., Nagarajan, J., & Shanmugam, S. A. (2002). Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurian species. *Indian Journal of Marine Sciences*, 31(2), 161–164.
- Adibzadeh, N., Aminzadeh, S., Jamili, S., Karkhane, A. A., & Farrokhi, N. (2014). Purification and characterization of pepsin-solubilized collagen from skin of sea cucumber *Holothuria parva*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(1), 143–154. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0823-4>
- Adzhubei, A. A., Anashkina, A. A., & Makarov, A. A. (2017). Left-handed polyproline-II helix revisited: proteins causing proteopathies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(12), 2701–2713. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1229220>
- Adzhubei, A. A., Sternberg, M. J. E., & Makarov, A. A. (2013). Polyproline-II helix in proteins: Structure and function. *Journal of Molecular Biology*, 425(12), 2100–2132. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.03.018>
- Alvarado, J. J., & Solís Marín, F. A. (Eds.). (2014). *Echinoderm research and diversity in Latin America*. Echinoderm Research and Diversity in Latin America. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-20051-9>
- Bandaranayake, W. M., & Des Rocher, A. (1999). Role of secondary metabolites and pigments in the epidermal tissues, ripe ovaries, viscera, gut contents and diet of the sea cucumber *Holothuria atra*. *Marine Biology*, 133(1), 163–169. <https://doi.org/10.1007/s002270050455>
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1767(9), 1073–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
- Bella, J. (2016). Collagen structure: new tricks from a very old dog. *Biochemical Journal*, 473(8), 1001–1025. <https://doi.org/10.1042/BJ20151169>

- Bhatnagar, R. S., & Gough, C. A. (1996). Circular Dichroism of Collagen and Related Polypeptides. In G. D. Fasman (Ed.), *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Springer US.
- Bianchi, E., Gonio, G., Ciferri, A., Puett, D., & Rajagh, L. (1967). The Role of pH, Temperature, Concentration on the Stability Helical, and Randomly Coiled of Collagen * Salt Type, and Salt of the Crystalline, Forms. *The Journal of Biological Chemistry*, 242(7), 1361–1369. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/242/7/1361.full.pdf>
- Birenheide, R., Tamori, M., Motokawa, T., Ohtani, M., Iwakoshi, E., Muneoka, Y., ... Nomoto, K. (1998). Peptides controlling stiffness of connective tissue in sea cucumbers. *The Biological Bulletin*, 194(3), 253–9. <https://doi.org/10.2307/1543095>
- Birk, D. E., & Bruckner, P. (2005). Collagen suprastructures. *Topics in Current Chemistry*, 247, 185–205. <https://doi.org/10.1007/b103823>
- Boot-Handford, R. P., & Tuckwell, D. S. (2003). Fibrillar collagen: The key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest. *BioEssays*, 25(2), 142–151. <https://doi.org/10.1002/bies.10230>
- Bordbar, S., Anwar, F., & Saari, N. (2011). High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods - A review. *Marine Drugs*, 9(10), 1761–1805. <https://doi.org/10.3390/md9101761>
- Brown, F. R., Hopfinger, A. J., & Blout, E. R. (1972). The collagen-like triple helix to random-chain transition: Experiment and theory. *Journal of Molecular Biology*, 63(1), 101–115. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(72\)90524-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(72)90524-4)
- Buevich, A. V., Dai, Q. H., Liu, X., Brodsky, B., & Baum, J. (2000). Site-specific NMR monitoring of cis-trans isomerization in the folding of the proline-rich collagen triple helix. *Biochemistry*, 39(15), 4299–4308. <https://doi.org/10.1021/bi992584r>
- Bulheller, B. M., Rodger, A., & Hirst, J. D. (2007). Circular and linear dichroism of proteins. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9(17), 2020–2035. <https://doi.org/10.1039/b615870f>
- Burjanadze, T. V. (2000). New analysis of the phylogenetic change of collagen thermostability. *Biopolymers*, 53(6), 523–528. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(200005\)53:6<523::AID-BIP8>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(200005)53:6<523::AID-BIP8>3.0.CO;2-7)

- Carruthers, J., & Carruthers, A. (2002). MAd cows, prions, and wrinkles. *Archives of Dermatology*, 138(5), 667–670. <https://doi.org/der10001> [pii]
- Cerf, E., Sarroukh, R., Tamamizu-Kato, S., Breydo, L., Derclaye, S., Dufrenes, Y. F., ... Raussens, V. (2009). Antiparallel β -sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid β -peptide. *Biochemical Journal*, (421), 415–423. <https://doi.org/10.1042/BJ20090379>
- Chapman, J. A., Tzaphlidou, M., Meeks, K. M., & Kadler, K. E. (1990). The collagen fibril - a model system studying the staining and fixation. *Electron Microscopy Reviews*, 3(1), 143–182.
- Chien, J. C. W., & Wise, W. B. (1975). A13C Nuclear Magnetic Resonance and Circular Dichroism Study of the Collagen-Gelatin Transformation in Enzyme Solubilized Collagen. *Biochemistry*, 14(12), 2786–2792. <https://doi.org/10.1021/bi00683a036>
- Cui, F. xia, Xue, C. hu, Li, Z. jie, Zhang, Y. qin, Dong, P., Fu, X. yan, & Gao, X. (2007). Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Food Chemistry*, 100(3), 1120–1125. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.019>
- Dmitriy, F., & Patrick, A. (1995). Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 23(4), 566–579. <https://doi.org/10.1002/prot.340230412>
- Drzewiecki, K. E., Grisham, D. R., Parmar, A. S., Nanda, V., & Shreiber, D. I. (2016). Circular Dichroism Spectroscopy of Collagen Fibrillogenesis: A New Use for an Old Technique. *Biophysical Journal*, 111(11), 2377–2386. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.10.023>
- Engel, J., & Bächinger, H. P. (2005). Structure, stability and folding of the collagen triple helix. *Topics in Current Chemistry*, 247, 7–33. <https://doi.org/10.1007/b103818>
- Erickson, B., Fang, M., Wallace, J. M., Orr, B. G., Les, C. M., & Banaszak Holl, M. M. (2013). Nanoscale structure of type I collagen fibrils: Quantitative measurement of D-spacing. *Biotechnology Journal*, 8(1), 117–126. <https://doi.org/10.1002/biot.201200174>
- Exterior, C., & Universitaria, C. (2012). Bioactive Peptides from Marine Organisms: A Short Overview, 700–707.

- Eyre, D. R., & Wu, J. J. (2005). Collagen cross-links. *Topics in Current Chemistry*, 247, 207–229. <https://doi.org/10.1007/b103828>
- Ferrario, C., Leggio, L., Leone, R., Di Benedetto, C., Guidetti, L., Coccè, V., ... Sugni, M. (2015). Marine-derived collagen biomaterials from echinoderm connective tissues. *Marine Environmental Research*. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.03.007>
- Fichard, A., Kleman, J. P., & Ruggiero, F. (1995). Another look at collagen V and XI molecules. *Matrix Biology*, 14(7), 515–531. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(05\)80001-0](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(05)80001-0)
- Fitch, S. M., Harkness, M. L. R., & Harkness, R. D. (1955). Extraction of collagen from tissues [3]. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/176163a0>
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123, 4195–4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>
- Gana, A. E., & Merca, F. E. (2002). Isolation and purification of a cytotoxic lectin from brown sea cucumber by affinity chromatography. *Philippine Agricultural Scientist*, 85(3), 236–247.
- Gao, Y., Li, Z., Qi, Y., Guo, Z., Lin, Y., Li, W., ... Zhao, Q. (2015). Proximate composition and nutritional quality of deep sea growth sea cucumbers (*Stichopus japonicus*) from different origins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (July), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7353>
- Gordon, M. K., & Hahn, R. A. (2011). *Collagens*, 339(1), 247–257. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0844-4.Collagens>
- Greenfield, N. J. (2004). Circular Dichroism Analysis for Protein-Protein Interactions. In H. Fu (Ed.), *Protein-Protein Interactions: Methods and Applications* (pp. 55–77). Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-762-9:055>
- Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1(6), 2876–2890. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202.Using>
- Harris, J. R., & Lewis, R. J. (2016). The collagen type I segment long spacing (SLS) and fibrillar forms: Formation by ATP and sulphonated diazo dyes. *Micron*, 86, 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2016.04.008>

- Harris, J. R., Soliakov, A., & Lewis, R. J. (2013). In vitro fibrillogenesis of collagen type I in varying ionic and pH conditions. *Micron*, 49, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.03.004>
- Hayashi, T., & Nagai, Y. (1973). Effect in of pH on the Stability of Collagen Molecule in Solution. *The Journal of Biochemistry*, 73(5), 999–1006.
- Hayashi, T., & Prockop, D. J. (1979). Thermal Stability of the Triple Helix of Type, 4182–4187.
- Iketani, T., Yamada, A., Motokawa, T., Oiwa, K., & Tamori, M. (2010). A novel stiffening factor inducing the stiffest state of holothurian catch connective tissue. *Journal of Experimental Biology*, 213(20), 3416–3422. <https://doi.org/10.1242/jeb.044149>
- Inoue, M., Birenheide, R., Koizumi, O., Kobayakawa, Y., Muneoka, Y., & Motokawa, T. (1999). Localization of the Neuropeptide NGIWY Amide in the Holothurian Nervous System and Its Effects on Muscular Contraction. *Proceedings Royal Society London: Biological Sciences*, 266(1423), 8.
- Jackson, M., & Mantsch, H. H. (1995). The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(2), 95–120. <https://doi.org/10.3109/10409239509085140>
- Jenness, D. D., Sprecher, C., & Johnson, W. C. (1976). Circular dichroism of collagen, gelatin, and poly(proline) II in the vacuum ultraviolet. *Biopolymers*, 15(3), 513–521. <https://doi.org/10.1002/bip.1976.360150308>
- Kabsch, W., & Sander, C. (1983). Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features. *Biopolymers*, 12(3), 2577–2637. <https://doi.org/10.1002/bip.360221211>
- Kajava, A. V., Squire, J. M., & Parry, D. A. D. (2006). B-Structures in Fibrous Proteins. In *Advances in protein chemistry*. Vol 73. Fibrous proteins: Amyloids, Prions and Beta Proteins (pp. 5–17).
- Kaneko, M., Kisa, F., Yamada, K., Miyamoto, T., & Higuchi, R. (1999). Structure of Neuritogenic Active Ganglioside from the Sea Cucumber *Stichopus japonicus*. *European Journal of Organic Chemistry*, 1999(11), 3171–3174. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0690\(199911\)1999:11<3171::AID-EJOC3171>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0690(199911)1999:11<3171::AID-EJOC3171>3.0.CO;2-B)

- Kariya, Y., Watabe, S., Kyogashima, M., Ishihara, M., & Tadashi, I. (1997). Structure of fucosa branches in the glycosaminoglycan from the body wall of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Carbohydrate Research*, 297, 273–279.
- Kielty, C. M., & Grant, M. E. (2002, May 10). The Collagen Family: Structure, Assembly, and Organization in the Extracellular Matrix. *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*. <https://doi.org/doi:10.1002/0471221929.ch2>
- Kielty, C. M., Sherratt, M. J., Marson, A., & Baldock, C. (2005). Fibrillin microfibrils. In D. A. Parry & J. M. Squire (Eds.), *Advances in protein chemistry*. Vol 70. *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers* (pp. 407–436). Elsevier Academic Press.
- Kim, S.-K. (Ed.). (2012). *Marine Pharmacognosy: Trends and Applications*. <https://doi.org/10.1201/b13868>
- Kim, S.-K. (Ed.). (2014). *Seafood Processing By-Products Trends and Applications*. Springer. <https://doi.org/10.1201/9781420027396>
- Koide, T., & Nagata, K. (2005). Collagen biosynthesis. *Topics in Current Chemistry*, 247, 85–114. <https://doi.org/10.1007/b103820>
- Koob, T. J., Koob-emunds, M. M., & Trotter, J. A. (1999). CELL-DERIVED STIFFENING AND PLASTICIZING FACTORS IN SEA CUCUMBER (*CUCUMARIA FRONDOSA*) DERMIS. *The Journal of Experimental Biology*, 202, 2291–2301.
- Koob, T. J., Koob, M. M., & Trotter, J. A. (1999). CELL-DERIVED STIFFENING AND PLASTICIZING FACTORS IN SEA CUCUMBER (*CUCUMARIA FRONDOSA*) DERMIS. *The Journal of Experimental Biology*, 2301, 2291–2301.
- Kotch, F. W., & Raines, R. T. (2006). Self-assembly of synthetic collagen triple helices. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(9), 3028–3033. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508783103>
- Kumar, P., & Bansal, M. (2016). Structural and functional analyses of PolyProline-II helices in globular proteins. *Journal of Structural Biology*, 196(3), 414–425. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.09.006>
- Labesse, G., Colloc'h, N., Pothier, J., & Mornon, J.-P. (2007). P-SEA: a new efficient assignment of secondary structure from Ca trace of proteins. *Bioinformatics*, 13(3), 291–295. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/13.3.291>

- Leikina, E., Merts, M. V, Kuznetsova, N., & Leikin, S. (2002). Type I collagen is thermally unstable at body temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), 1314–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.032307099>
- Li, Y., Asadi, A., Monroe, M. R., & Douglas, E. P. (2009). pH effects on collagen fibrillogenesis in vitro: Electrostatic interactions and phosphate binding. *Materials Science and Engineering C*, 29(5), 1643–1649. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.01.001>
- Liljas, A., Liljas, L., Piskur, J., Lindblom, G., Nissen, P., & Kjeldgaard, M. (2009). *Textbook of Structural Biology*. WORLD SCIENTIFIC. <https://doi.org/doi:10.1142/6620>
- Liu, Z., Oliveira, A. C. M., & Su, Y. C. (2010). Purification and characterization of pepsin-solubilized collagen from skin and connective tissue of giant red sea cucumber (*Parastichopus californicus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1270–1274. <https://doi.org/10.1021/jf9032415>
- Liu, Z., Su, Y., & Zeng, M. (2011). Amino acid composition and functional properties of giant red sea cucumber (*Parastichopus californicus*) collagen hydrolysates. *Journal of Ocean University of China*, 10(1), 80–84. <https://doi.org/10.1007/s11802-011-1787-4>
- Loo, R. W., Goh, J. B., Cheng, C. C. H., Su, N., & Goh, M. C. (2012). in vitro Synthesis of Native, Fibrous Long Spacing and Segmental Long Spacing Collagen. *Journal of Visualized Experiments*, (67). <https://doi.org/10.3791/4417>
- Lopes, J. L. S., Miles, A. J., Whitmore, L., & Wallace, B. A. (2014). Distinct circular dichroism spectroscopic signatures of polyproline II and unordered secondary structures: Applications in secondary structure analyses. *Protein Science*, 23(12), 1765–1772. <https://doi.org/10.1002/pro.2558>
- Makowska, J., Rodziejewicz-Motowidlo, S., Baginiska, K., Vila, J. A., Liwo, A., Chmurzyński, L., & Scheraga, H. A. (2006). Polyproline II Conformation Is One of Many Local Conformational States and Is Not an Overall Conformation of Unfolded Peptides and Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(6), 1744–1749. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/30048450>
- Mansiaux, Y., Joseph, A. P., Gelly, J. C., & de Brevern, A. G. (2011). Assignment of polyproline ii conformation and analysis of sequence - structure

relationship. PLoS ONE, 6(3), 1–15.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018401>

- Marelli, B., Ghezzi, C. E., Zhang, Y. L., Rouiller, I., Barralet, J. E., & Nazhat, S. N. (2015). Fibril formation pH controls intrafibrillar collagen biomineralization invitro and invivo. *Biomaterials*, 37, 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.008>
- McAlinden, A., Smith, T. A., Sandell, L. J., Ficheux, D., Parry, D. A. D., & Hulmes, D. J. S. (2003). ??-Helical Coiled-coil Oligomerization Domains Are Almost Ubiquitous in the Collagen Superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 42200–42207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302429200>
- Mo, J., Prévost, S. F., Blowes, L. M., Egertová, M., Terrill, N. J., Wang, W., ... Gupta, H. S. (2016). Interfibrillar stiffening of echinoderm mutable collagenous tissue demonstrated at the nanoscale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(42), E6362–E6371. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609341113>
- Mocan, E., Tagadiuc, O., & Nacu, V. (2011). Aspects of collagen isolation procedure. *Clin. Res. Studies*, 8–10.
- Morales, M., del Castillo, J., & Smith, D. S. (1989). Acetylcholine sensitivity of the spine-test articular capsule of the sea urchin *Eucidaris tribuloides*. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology*, 94(2), 547–554.
- Motokawa, T. (1984). Connective Tissue Catch in Echinoderms. *Biological Reviews*, 59, 255–270.
- Motokawa, T., & Tsuchi, A. (2003). Dynamic Mechanical Properties of Body-Wall Dermis in Various Mechanical States and Their Implications for the Behavior of Sea Cucumbers. *Biological Bulletin*, 205(3), 261–275.
- Murray, A. P., Araya, E., Maier, M. S., & Seldes, A. M. (2002). Nucleosides and nucleobases from *Ophiactis asperula*, *Ophiacantha vivipara* and *Gorgonocephalus chilensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(3), 259–262. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(01\)00091-6](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(01)00091-6)
- Of, R., Body, I., & Coli, F. E. (2011). Refolding of inclusion body proteins from *e. coli*, 319–338.
- Omura, Y., Urano, N., & Kimura, S. (1996). Occurrence of fibrillar collagen with structure of $(\alpha 1)_2 \alpha 2$ in the test of sea urchin *Asthenosoma ijimai*.

Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology, 115(1), 63–68. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(96\)00085-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(96)00085-5)

- Paige, M. F., & Goh, M. C. (2001). Ultrastructure and assembly of segmental long spacing collagen studied by atomic force microscopy. *Micron*, 32(3), 355–361. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(00\)00038-X](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(00)00038-X)
- Paige, MF;, R., JK;, G., & MC. (1998). Fibrous long spacing collagen ultrastructure elucidated by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 74(6), 3211–3216. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)78027-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)78027-0)
- Pangestuti, R., & Arifin, Z. (2018). Medicinal and health benefit effects of functional sea cucumbers. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(3), 341–351. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.06.007>
- Pelham, H. R. B. (2001). Traffic through the Golgi apparatus. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.200110160>
- Revenko, I., Sommer, F., Minh, D. T., Garrone, R., & Franc, J. M. (1994). Atomic force microscopy study of the collagen fibre structure. *Biology of the Cell*, 80(1), 67–69. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(94\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0248-4900(94)90019-1)
- Ribeiro, A. R., Barbaglio, A., Benedetto, C. D., Ribeiro, C. C., Wilkie, I. C., Carnevali, M. D. C., & Barbosa, M. A. (2011). New insights into mutable collagenous tissue: Correlations between the microstructure and mechanical state of a Sea-Urchin ligament. *PLoS ONE*, 6(9), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024822>
- Ribeiro, A. R., Barbaglio, A., Oliveira, M. J., Ribeiro, C. C., Wilkie, I. C., Candia Carnevali, M. D., & Barbosa, M. A. (2012). Matrix Metalloproteinases in a Sea Urchin Ligament with Adaptable Mechanical Properties. *PLoS ONE*, 7(11), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049016>
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Ricard-Blum, S., Ruggiero, F., & Van Der Rest, M. (2005). The collagen superfamily. *Topics in Current Chemistry*, 247, 35–84. <https://doi.org/10.1007/b103819>
- Ripamonti, a., Roveri, N., Braga, D., Hulmes, D. J. S., Miller, A., & Timmins, P. a. (1980). Effects of pH and ionic strength on the structure of collagen fibrils. *Biopolymers*, 19, 965–975. <https://doi.org/10.1002/bip.1980.360190503>

- Robinson, J. J. (1997). Comparative biochemical analysis of sea urchin peristome and rat tail tendon collagen. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 117(2), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00092-8](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00092-8)
- Rodriguez-Pascual, F., & Slatter, D. A. (2016). Collagen cross-linking: insights on the evolution of metazoan extracellular matrix. *Scientific Reports*, 6(November), 37374. <https://doi.org/10.1038/srep37374>
- Rossky, P. J. (2008). Protein denaturation by urea: Slash and bond. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(44), 16825–16826. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809224105>
- Ruyschaert, J. M., & Raussens, V. (2018). ATR-FTIR analysis of amyloid proteins. *Methods in Molecular Biology*, 1777, 69–81. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7811-3_3
- Sarroukh, R., Cerf, E., Derclaye, S., Dufrêne, Y. F., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J. M., & Raussens, V. (2011). Transformation of amyloid B(1-40) oligomers into fibrils is characterized by a major change in secondary structure. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(8), 1429–1438. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0529-x>
- Schmidt, M. M., Dornelles, R. C. P., Mello, R. O., Kubota, E. H., Mazutti, M. A., Kempka, A. P., & Demiate, I. M. (2016). Collagen extraction process. *International Food Research Journal*, 23(3), 913–922.
- Shen, L., Bu, H., Yang, H., Liu, W., & Li, G. (2018). Investigation on the behavior of collagen self-assembly in vitro via adding sodium silicate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115(2017), 635–642. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.074>
- Shortle, D. (1996). The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability. *FASEB Journal*, 10(1), 27–34.
- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, (78), 929–958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>.COLLAGEN
- Silva, T. H., Moreira-Silva, J., Marques, A. L. P., Domingues, A., Bayon, Y., & Reis, R. L. (2014). Marine origin collagens and its potential applications. *Marine Drugs*, 12(12), 5881–5901. <https://doi.org/10.3390/md12125881>

- Silver, F. H. (1981). Type I Collagen Fibrillogenesis in Vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(10), 4973–4977.
- Silver, F. H., & Trelstad, R. L. (1981). Physical properties of type I collagen in solution: Structure of α -Chains and β - and γ -components and two-component mixtures. *Biopolymers*, 20(2), 359–371. <https://doi.org/10.1002/bip.1981.360200208>
- Smith, L. J., Fiebig, K. M., Schwalbe, H., & Dobson, C. M. (n.d.). The concept of a random coil. *Distribution*, 95–106.
- Solís Marín, F. A., Arriaga Ochoa, J. A., Laguarda Figueras, A., & Frontana Uribe, S. C. (2009). *Holoturoideos (Echinodermata: holothuroidea) del Golfo de California*. Ciudad de México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.
- Sotelo Casas, R. C., Cupul Magaña, A. L., Solís Marín, F. A., & Rodríguez Troncoso, A. P. (2015). New records of sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) at Islas Marietas , Central Mexican Pacific. *Marine Biodiversity Records*, 8, 1–8. <https://doi.org/10.1017/S1755267215000810>
- Stephens, D. J., & Pepperkok, R. (2002). Imaging of procollagen transport reveals COPI-dependent cargo sorting during ER-to-Golgi transport in mammalian cells. *Journal of Cell Science*, 115, 1149–1160.
- Subhan, F., Ikram, M., Shehzad, A., & Ghafoor, A. (2014). Marine Collagen: An Emerging Player in Biomedical applications. *Journal of Food Science and Technology*, 52(August), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1652-8>
- Szulgit, G. (2007). The echinoderm collagen fibril: A hero in the connective tissue research of the 1990s. *BioEssays*, 29(7), 645–653. <https://doi.org/10.1002/bies.20597>
- Szulgit, G. K., & Shadwick, R. E. (2000). Dynamic mechanical characterization of a mutable collageneous tissue: response of sea cucumber dermis to cell lysis and dermal extracts. *The Journal of Experimental Biology*, 203, 1539–1550.
- Takehana, Y., Osawa, T., Ogasawara, K., Hanasaka, T., Ishida, K., Tamori, M., ... Matsuura, E. (2016). Ultrastructural Changes Associated with Reversible Stiffening in Catch Connective Tissue of Sea Cucumbers. *PLOS ONE*, 11(5), e0155673. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155673>

- Takehana, Y., Yamada, A., Tamori, M., & Motokawa, T. (2014). Softenin, a novel protein that softens the connective tissue of sea Cucumbers through Inhibiting Interaction between collagen fibrils. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085644>
- Tamori, M., Takemae, C., & Motokawa, T. (2010). Evidence that water exudes when holothurian connective tissue stiffens. *Journal of Experimental Biology*, 213(11), 1960–1966. <https://doi.org/10.1242/jeb.038505>
- Tamori, M., Yamada, A., Nishida, N., Motobayashi, Y., Oiwa, K., & Motokawa, T. (2006). Tensilin-like stiffening protein from *Holothuria leucospilota* does not induce the stiffest state of catch connective tissue. *Journal of Experimental Biology*, 209(9), 1594–1602. <https://doi.org/10.1242/jeb.02178>
- Tanford, C. (1968). Protein denaturation. *Advanced Protein Chemistry*, (23), 121–282.
- Tapon-Brethaudiere, J., Chabut, D., Zierer, M., Matou, S., Bros, A., Mourao, P. A. S., & Fischer, A. (2002). A Fucosylated Chondroitin Sulfate From Echinoderm Modulates in Vitro Fibroblast Growth Factor 2 – Dependent Angiogenesis. *Molecular Cancer Research*, 1(December), 96–102.
- Terajima, M., Perdivara, I., Sricholpech, M., Deguchi, Y., Pleshko, N., Tomer, K. B., & Yamauchi, M. (2014). Glycosylation and cross-linking in bone type I collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 289(33), 22636–22647. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.528513>
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., & Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 4–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>
- Thomson, C. a, & Ananthanarayanan, V. S. (2000). Structure-function studies on hsp47: pH-dependent inhibition of collagen fibril formation in vitro. *The Biochemical Journal*, 349 Pt 3, 877–883. [https://doi.org/349, 877–883](https://doi.org/349, 877-883)
- Thurmond, F. A., Koob, T. J., Bowness, J. M., & Trotter, J. A. (1997). Partial biochemical and immunologic characterization of fibrillin microfibrils from sea cucumber dermis. *Connective Tissue Research*, 36(3), 211–222. <https://doi.org/10.3109/03008209709160221>

- Thurmond, & Trotter. (1996). Morphology and biomechanics of the microfibrillar network of sea cucumber dermis. *The Journal of Experimental Biology*, 199(Pt 8), 1817–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9319729>
- Trotter, J. A., Lyons-levy, G., Koob, T. J., & Thurmond, A. (1995). Covalent composition of collagen fibrils from the dermis of the sea cucumber, 112(June), 463–478.
- Trotter, J. A., Thurmond, F. A., & Koob, T. J. (1994). Molecular structure and functional morphology of echinoderm collagen fibrils. *Cell and Tissue Research*, 275, 451–458. <https://doi.org/10.1007/BF00318814>
- Tsushima, M., Ikuno, Y., Nagata, S., Kodama, K., & Matsuno, T. (2002). Comparative biochemical studies of carotenoids in sea cucumbers. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 133(3), 331–336. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00159-8)
- Van Dyck, S., Caulier, G., Todesco, M., Gerbaux, P., Fournier, I., Wisztorski, M., & Flammang, P. (2011). The triterpene glycosides of *Holothuria forskali*: usefulness and efficiency as a chemical defense mechanism against predatory fish. *Journal of Experimental Biology*, 214(8), 1347–1356. <https://doi.org/10.1242/jeb.050930>
- Veeruraj, A., Arumugam, M., & Balasubramanian, T. (2013). Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). *Process Biochemistry*, 48(10), 1592–1602. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.011>
- Venyaminov, S. Y., & Yang, J. T. (1996). Determination of Protein Secondary Structure. In G. D. Fasman (Ed.), *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Springer US.
- Vergara, W., & Rodríguez, A. (2016). Nutritional Composition of Sea Cucumber. *Natural Resources*, 130–137. <https://doi.org/10.4236/nr.2016.73013>
- Vidal, A. M., del Castillo, J., & Smith, D. S. (1993). Contractile properties of the articular capsule or ligament, in the primary spines of the sea-urchin *Eucidaris tribuloides*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Comparative*, 106(3), 643–647. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(93\)90221-6](https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90221-6)
- Whitmore, L., Mavridis, L., Wallace, B. A., & Janes, R. W. (2018). DichroMatch at the protein circular dichroism data bank (DM@PCDDDB): A

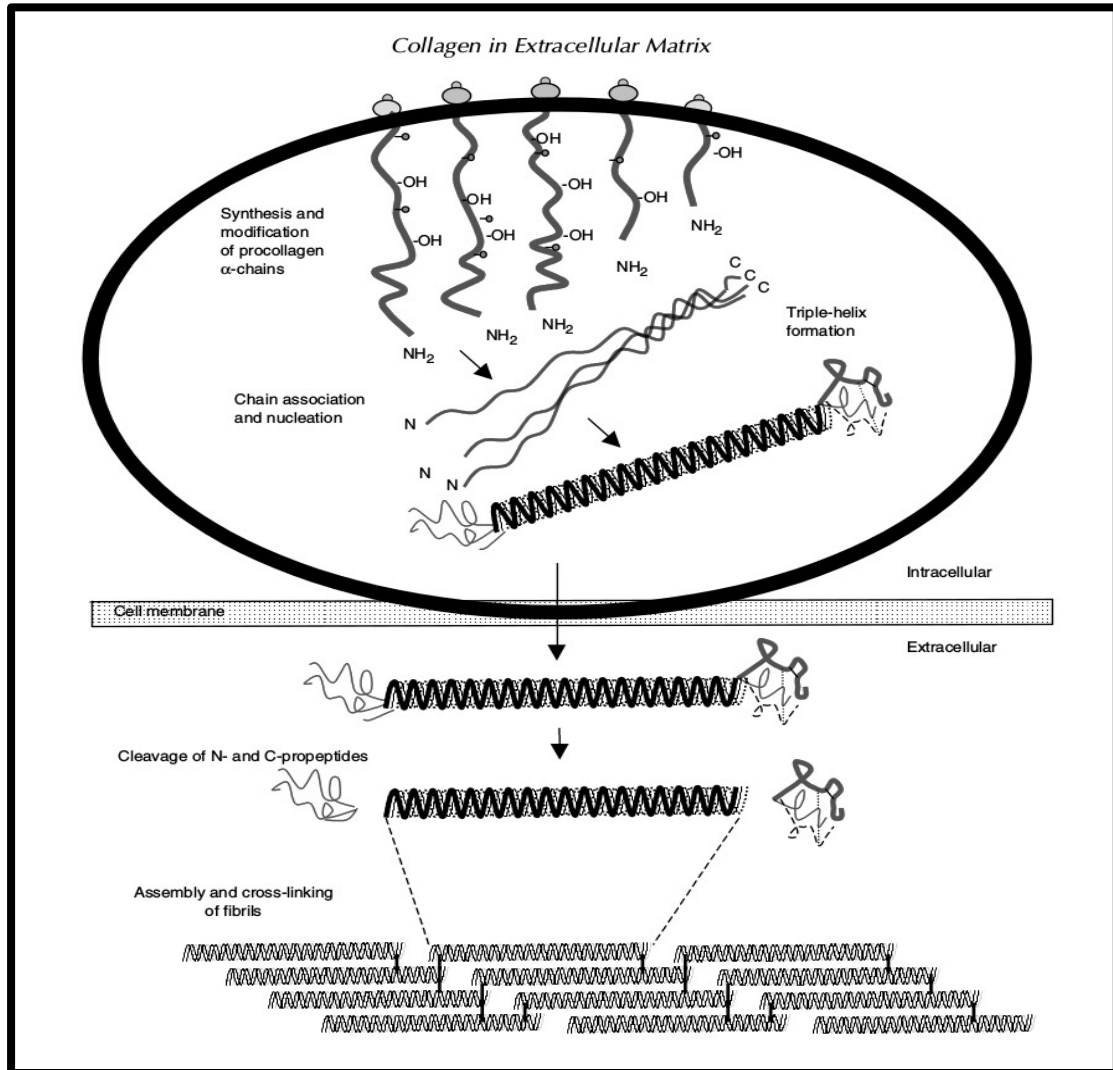
- web-based tool for identifying protein nearest neighbors using circular dichroism spectroscopy. *Protein Science*, 27(1), 10–13. <https://doi.org/10.1002/pro.3207>
- Wiedemann, C., Bellstedt, P., & Görlach, M. (2013). CAPITO - A web server-based analysis and plotting tool for circular dichroism data. *Bioinformatics*, 29(14), 1750–1757. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt278>
 - Wilkie, I. C. (2005). Mutable Collagenous Tissue: Overview and Biotechnological Perspective. *Echinodermata*, 221–250. https://doi.org/10.1007/3-540-27683-1_10
 - Wilkie, I. C., Fassini, D., Cullorà, E., Barbaglio, A., Tricarico, S., Sugni, M., ... Carnevali, M. D. C. (2015). Mechanical properties of the compass depressors of the sea-urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea) and the effects of enzymes, neurotransmitters and synthetic tensilin-like protein. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120339>
 - Wood, E. (1986). Biology of Invertebrate and Lower Vertebrate Collagens. *Biochemical Education*, 14(2), 92. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(86\)90088-9](https://doi.org/10.1016/0307-4412(86)90088-9)
 - Woody, R. W. (1996). Theory of Circular Dichroism of Proteins. In G. D. Fasman (Ed.), *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules* (1st ed.). Springer US.
 - Wu, J., Yang, J. T., & Wu, C. S. C. (1992). β -II conformation of all- β proteins can be distinguished from unordered form by circular dichroism. *Analytical Biochemistry*, 200(2), 359–364. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90479-Q](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90479-Q)
 - Xing, J., & Chia, F. S. (2000). Oponin-like molecule found in coelomic fluid of a sea cucumber, *Holothuria leucospilota*. *Marine Biology*, 136(6), 979–986. <https://doi.org/10.1007/s002270000305>
 - Yaacob, H. B., Kim, K. H., & Mustapha, M. S. (1994). Antinociceptive effect of the water extract of Malaysian sea cucumber. *Asia Pacific Journal of Pharmacology*, 9(1), 23–28.
 - Yamada, K., Matsubara, R., Kaneko, M., Miyamoto, T., & Higuchi, R. (2001). Constituents of Holothuroidea. 10. Isolation and Structure of a Biologically Active Ganglioside Molecular Species from the Sea Cucumber *Holothuria leucospilota*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 49(4), 447–452. <https://doi.org/10.1248/cpb.49.447>

- Yang, P., Collin, P., Madden, T., Chan, D., Sweeney-Gotsch, B., McConkey, D., & Newman, R. A. (2003). Inhibition of proliferation of PC3 cells by the branched-chain fatty acid, 12-methyltetradecanoic acid, is associated with inhibition of 5-lipoxygenase. *The Prostate*, 55(4), 281–291. <https://doi.org/10.1002/pros.10243>
- Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2006). Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 172, 69–91. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2007.09.003>
- Zhong, M., Chen, T., Hu, C., & Ren, C. (2015). Isolation and Characterization of Collagen from the Body Wall of Sea Cucumber *Stichopus monotuberculatus*. *Journal of Food Science*, 80(4), C671–C679. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12826>
- Zhu, J., & Kaufman, L. J. (2014). Collagen I self assembly: Revealing the developing structures that generate turbidity. *Biophysical Journal*, 106(8), 1822–1831. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.03.011>
- Zou, Z., Yi, Y., Wu, H., Wu, J., Liaw, C., & Lee, K. (2003). Intercedensides A - C , Three New Cytotoxic Triterpene Glycosides from the Sea Cucumber *Mensamaria intercedens* Lampert. *Journal of Natural Products*, 66, 1055–1060.

13. Anexos

Anexo 1

Biosíntesis del colágeno tomado y reproducido de (Kielty & Grant, 2002)



Biosíntesis del colágeno. Cuando las hélices de colágeno comienzan a sintetizarse dentro del RE, inmediatamente comienzan a hidroxilarse algunos de los residuos de prolina y lisina en la posición Yaa, al mismo tiempo las isomerasas convierten los enlaces *cis* entre Gly-Pro y Pro-Hyp a enlaces *trans* por las isomerasas *cis-trans* peptidil prolil (PPIasas). A continuación las cadenas de precolágeno interactúan por medio de puentes disulfuro que se forman en los dominios C ricos en residuos de Cys. La nucleación comienza luego de encontrar al menos dos residuos de 4-hidroxiprolina que se encuentran en el tripéptido Gly-Xaa-Yaa y adyacentes al dominio C. Todo este proceso es asistido por chaperonas moleculares. A continuación el colágeno se exporta desde el ER por medio de vesículas al aparato de Golgi; allí los precolágenos se agregan y finalmente son liberados al espacio extracelular. En el espacio extracelular diferentes metaloproteasas cortan los dominios NC (por lo menos en los colágenos fibrilares. En colágenos de otras subfamilias a veces se retienen los dominios NC) quedando el colágeno maduro. Finalmente se conforman los crosslinks entre las diferentes moléculas de colágeno fibrilar (aunque los crosslinks también pueden ocurrir entre componentes de las fibrillas como proteoglicanos y glicosaminoglicanos) por acción de la deaminación de residuos de hidroxilisia o lisina mediada por la enzima lisil oxidasa (LOX). Estos residuos desaminados se entrecruzan espontáneamente formando entrecruzamientos divalentes o trivalentes. La mayoría de los residuos de lisina e hidroxilisia se encuentran en los telopéptidos.

Anexo 2

Aislamiento y purificación de colágeno de holotúridos disuelto con pepsina (PSC)

*Todo debe realizarse en condiciones de agitación constante 4°C o en su defecto, en hielo.

1. Quitar tripas, piel y tomar solo dermis interna (trotter, 1995).
2. La dermis interna se corta en trozos pequeños (< 1 cm²) y se toman aproximadamente 100 gr en peso húmedo.
3. Lavar los trozos dos veces con 2 litros de dH₂O por 30 min.
4. dejar en agitación en 1 litro de 0,1 M de tris buffer (pH 8.0) con 4 mM EDTA por 24 horas.
5. Centrifugar a 9000 x g a 4°C por 30 min.
6. Lavar el precipitado con 1 L de dH₂O por 24 horas.
7. Pasar la anterior solución por un lienzo para queso (cheese cloth) para remover el material no soluble.
8. Centrifugar el filtrado a 9000 x g a 4°C por 30 min.
9. El precipitado se deja se mezcla con 20 volúmenes de 0,1M de NaOH y se deja en agitación por 72 horas.
10. Centrifugar el filtrado a 9000 x g a 4°C por 30 min.
11. Lavar con dH₂O el precipitado insoluble.
11. Se repiten los dos últimos pasos hasta lograr un pH 7.0.
12. El precipitado se disuelve en una solución de 20 volúmenes de 0,5M de ácido acético que contiene pepsina al 0,5% (W/W) con agitación constante por 48 horas.
13. La solución se centrifuga a 12000 RCF por 1 hora y el sobrenadante corresponde al colágeno.
14. El colágeno se precipita con una solución 0,8 M de NaCl en agitación constante por 24 horas.
15. El colágeno se recupera centrifugando a 9000 x g por 30 minutos y se disuelve el pellet en ácido acético 0,5 M.
16. Se dializa el colágeno en una membrana de 10 kDa frente a una solución 0,02 M de Na₂HPO₄.
17. El PSC se liofiliza y guarda a 4 °C para su posterior análisis.

Tomado de (Adibzadeh et al., 2014; Zhong et al., 2015)

Anexo 3

I. Preparación de la muestra

Las muestras de dermis de *H. inornata* se limpiaron con agua destilada fría (4°C) y también se removió la epidermis, procurando dejar limpio el tejido conectivo. Inicialmente la muestra se recortó en trozos <1 cm² como se indica en los protocolos antes mencionados. No obstante, para aumentar el rendimiento de la proteína, se procedió a cortar finamente la dermis en pedazos <0.5 cm² que posteriormente se liofilizaron. La cantidad de muestra que se usó en los ensayos en tubo falcon® de 50ml fue de 100mg⁴⁴.

De forma general, los pasos subsecuentes en la extracción de proteína fueron la incubación y disgregamiento de la muestra en 20 ml de buffer 0,1 M de tris buffer (pH 8.0), 4 mM EDTA por 24 horas, filtración a través de un embudo Büchner (poro de 0,78 mm²) donde se separó el material disgregado y fino (FILT) y el remanente del material que no atravesó el filtro (RM)⁴⁵.

II. Condiciones de digestión con pepsina gástrica porcina

El material insoluble que atravesó el filtro del embudo Büchner se disolvió en una disolución de ácido acético 0,5 M usando pepsina al 0,5% p/v. La pepsina actúa cortando preferiblemente en los telopéptidos de los extremos C terminal de las fibrillas colagénicas; No obstante, las propias cadenas alpha también son susceptibles de clivarse en las interrupciones de los dominos colagénicos Gly-Pro-HyPro, dado que la pepsina al ser una endopeptidasa aspártica tiene preferencia en clivar aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos en los sitios P1 y P1' principalmente entre Phe-Val, Gln-His, Glu-Ala, Ala-Leu, Leu-Tyr, Tyr-Leu, Gly-Phe, Phe-Phe y Phe-Tyr.

Las condiciones de temperatura y tiempo de digestión se definieron mediante un experimento probando las variables de tiempo y temperatura en diferentes ensayos manteniendo una concentración constante de pepsina al 0,5% P/V en 15 ml y aproximadamente 1 – 1.5 gr (peso húmedo) de tejido disgregado⁴⁶ proveniente de

44 La cantidad de material sugerida para la extracción de colágeno en los protocolos de Adibzadeh et al., 2014 & Zhong et al., 2015 es de 100 gr de peso húmedo. Haciendo la extrapolación, 100gr de peso húmedo corresponden a 12000 mg de peso seco lo cual es 120 veces mayor respecto a la cantidad de 100 mg que se utilizó en las pruebas.

45 La codificación como FILT y RM se seguirá utilizando en los demás análisis.

46 Las concentraciones de proteína fueron medidas al finalizar la disolución con pepsina al 0,5% p/v. No obstante, para cargar los geles, el colágeno se continuó extrayendo conforme el protocolo descrito. Brevemente, la proteína se precipitó con sulfato de amonio al 70% de saturación, A continuación, esta se recuperó mediante centrifugación y se resuspendió en ácido acético al 0.5% v/v. Finalmente, la proteína resuspendida se dializó frente a fosfato disódico 0.02M.

Holothuria lubrica. Las condiciones experimentales fueron las siguientes y se reporta la concentración de proteína en mg/ml por medio de un ensayo con BCA⁴⁷ (ver tabla 12).

TEMPERATURA	TIEMPO (Horas)	CONCENTRACIÓN TOTAL mg/ml	CONCENTRACIÓN MENOS PEP 0,5% mg/ml
4°C	24	1,69	1,10
	36	1,51	0,92
	48	2,09	1,50
	72	2,03	1,44
25°C	24	2,13	1,54
	36	2,27	1,67
	48	2,58	1,99
	72	2,00	1,41
37°C	24	2,43	1,84
	36	2,72	2,13
	48	2,60	2,01
BLANCO		0,00019	
PEPSINA 0,5%		0,59	

Tabla 12. Concentración de proteína total medida por BCA en cada uno de los tratamientos con variables de temperatura (4, 25 y 36°C) y tiempo de digestión con pepsina al 0,5% p/v (24, 36, 48 y 72 horas)

Conforme con la tabla 12, la combinación de variables que produjeron una mayor concentración de proteína fueron las correspondientes a la disolución del colágeno con pepsina a 37°C en 36, 48 y 24 horas. Sin embargo, de acuerdo con el gel de este mismo experimento se observa que en dichos sistemas la intensidad de las bandas de alto peso molecular es menor (Ver figura 33):

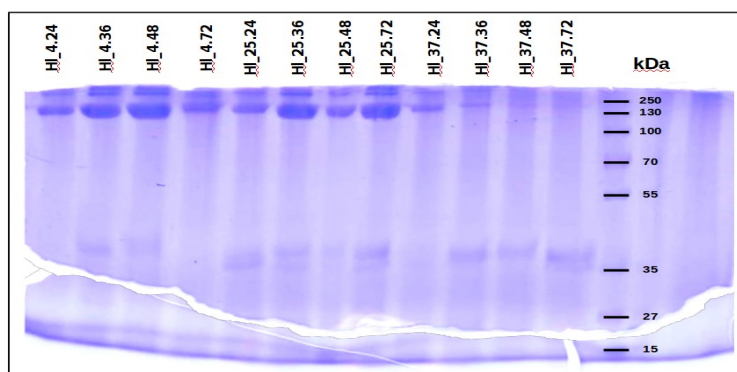


Figura 33. SDS-PAGE al 12% de los tratamientos con valores de temperatura (4, 25 y 37°C) y tiempo de disolución con pepsina 0,5% p/v (24, 36, 48 y 72 horas).

47 Las muestras sometidas a diferentes condiciones de disolución con pepsina al 0.5 % p/v se codificaron de acuerdo al siguiente sistema: HI 4.24 (4°C y 24 horas), HI 4.36 (4°C y 36 horas), HI 4.58 (4°C y 48 horas), HI 4.72 (4°C y 72 horas), HI 25.24 (25°C y 24 horas), HI 25.36 (25°C y 36 horas), HI 25.48 (25°C y 48 horas), HI 25.72 (25°C y 72 horas), HI 37.24 (37°C y 24 horas), HI 37.36 (37°C y 36 horas), HI 37.48 (37°C y 48 horas) y HI 37.72 (37°C y 72 horas).

Una posible explicación a este fenómeno es que en el ensayo de ácido bicinonónico produce un color más intenso a medida que quela los iones Cu⁺ reducidos por los grupos amida de los enlaces peptídicos. Por lo tanto conforme la pepsina disgrega la supraestructura y también inespecíficamente a las cadenas alpha del colágeno, los grupos amida se vuelven más abundantes incrementando por lo tanto la señal del BCA. Este efecto sería más evidente en los sistemas correspondientes a 25°C y 37°C ya que la actividad máxima de la pepsina ocurre a esta última temperatura (ver Tabla 12). Teniendo en cuenta lo anterior, la elección de la combinación de temperatura y tiempo de digestión por la pepsina estuvo orientada por la intensidad de las bandas de alto peso molecular y también por la concentración en mg/ml de proteína de acuerdo con el ensayo de BCA, por lo tanto se fijaron como condiciones de temperatura y tiempo de digestión 4°C y 48 horas respectivamente.

III. Remoción de contaminantes orgánicos (pigmentos de la dermis)

La dermis de los holotúridos se caracteriza por presentar diferentes moléculas orgánicas como carotenos (Tsushima, Ikuno, Nagata, Kodama, & Matsuno, 2002), micosporinas (Bandaranayake & Des Rocher, 1999; Pangestuti & Arifin, 2018) y triterpenos glicosilados (Van Dyck et al., 2011) los cuales se pueden extraer también durante el aislamiento de la proteína, generando extractos pigmentados. Para prevenir lo anterior, se maceraron 100 mg de peso seco de la dermis de *H. inornata* en diferentes solventes orgánicos durante 24 horas luego de la disolución del colágeno con pepsina. La cuantificación de proteína se hizo mediante un ensayo de BCA y se muestran en la tabla Tabla 13⁴⁸:

TRATAMIENTO	PROTEÍNA (mg)
RM AGUA 100% (1:10)	0,43
RM ETANOL 100% (1:10)	1,55
RM ETANOL/AGUA (50:50) (1:10)	0,00
RM METANOL 100% (1:10)	0,00
RM METANOL/AGUA (80:20) (1:10)	0,34
RM AGUA/METANOL (50:50) (1:10)	0,39
RM AGUA/METANOL (80:20) (1:10)	0,00
RM DICLOROMETANO (1:10)	2,71
RM ACETATO DE ETILO (1:10)	0,13
RM HEXANO (1:10)	1,63
FILT AGUA 100% (1:10)	1,48
FILT ETANOL 100% (1:10)	5,65
FILT AGUA/ETANOL (50:50) (1:10)	1,03
FILT METANOL 100% (1:10)	0,21
FILT METANOL/AGUA (80:20) (1:10)	0,31
FILT METANOL/AGUA (50:50) (1:10)	2,02
FILT METANOL/AGUA (20:80) (1:10)	2,16

Tabla 13. Cuantificación de proteína para cada tratamiento de lavado con solventes orgánicos. En amarillo se señala aquel con el mayor rendimiento de proteína extraída.

48 No se llevó a cabo ningún análisis posterior de las moléculas orgánicas solubles. El propósito de esta serie de ensayos únicamente consistió en limpiar la muestra y también verificar que los solventes orgánicos no alteraran el rendimiento en la extracción de la proteína.

Conforme con la tabla 13, el etanol (100%) tuvo mejores rendimientos, por lo que en el protocolo final de extracción de colágeno fibrilar de *H. inornata*, se sugiere utilizar este paso como preparativo.

IV. Salting out

MUESTRA		30,00%	60,00%	100,00%
		CONCENTRACIÓN TOTAL mg/ml	CONCENTRACIÓN TOTAL mg/ml	CONCENTRACIÓN TOTAL mg/ml
MUESTRA	4,24	1,21	0,66	0,41
	4,36	1,53	0,84	0,46
	25,24	1,85	0,80	0,53
	25,36	1,75	1,27	0,56

Tabla 14. Concentración de proteína total precipitada a diferentes saturaciones con sulfato de amonio (30, 60 y 100%). El experimento se realizó saturando a 30% con sal, A continuación, la proteína se recuperó por centrifugación (12.000 RCF por 30 min) y se procedió a precipitar al 60% y Finalmente, al 100% recuperando proteína en cada paso.

Para la determinación del porcentaje de saturación de sal en el salting out se utilizaron las muestras de *Holothuria lubrica* HI-4.24, HI-4.36, HI-25.24 y HI-25.36 del sistema anterior. Estas se precipitaron con sulfato de amonio a diferentes porcentajes de saturación (30, 60 y 100%) y se recuperó la proteína por centrifugación al finalizar cada una de las precipitaciones. A continuación, se calculó la concentración de proteína mediante BCA para cada una de las saturaciones de sal de las muestras antes señaladas⁴⁹(Ver tabla 14).

El figura 34 muestra la intensidad de las bandas en cada uno de los porcentajes de saturación de sal:

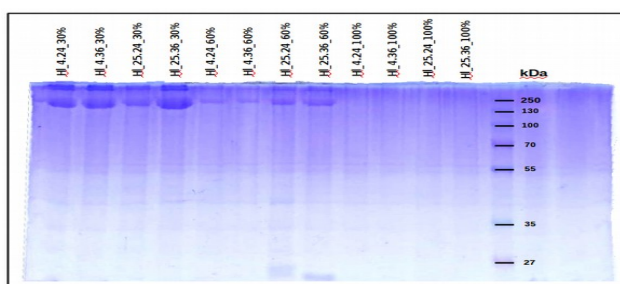


Figura 34. SDS-PAGE al 12% de las diferentes saturaciones de proteína total a diferentes saturaciones con sulfato de amonio (30%, 60% y 100%).

49 El sistema de nomenclatura para las muestras en este caso corresponde a: HI_4.24_30% (4°C, 24 Horas y 30% de sal), HI_4.36_30% (4°C, 36 Horas y 30% de sal), HI_25.24_30% (25°C, 24 Horas y 30% de sal), HI_25.36_30% (25°C, 36 Horas y 30% de sal), HI_4.24_60% (4°C, 24 Horas y 60% de sal), HI_4.36_60% (4°C, 36 Horas y 60% de sal), HI_25.24_60% (25°C, 24 Horas y 60% de sal), HI_25.36_60% (25°C, 36 Horas y 60% de sal), HI_4.24_100% (4°C, 24 Horas y 100% de sal), HI_4.36_100% (4°C, 36 Horas y 100% de sal), HI_25.24_100% (25°C, 24 Horas y 100% de sal) y HI_25.36_100% (25°C, 36 Horas y 100% de sal).

Conforme con los datos de la tabla anterior y también el gel, se identifica que la saturación de sal al 30% (± 1.2 M) es donde la mayor parte de las proteínas de alto peso molecular precipitan, sin embargo, al 60% (± 2.7 M) aún se identifican bandas pero con una intensidad menor. Finalmente, al 100% de saturación de sal no se observan bandas de alto peso y se reporta muy poca proteína según los resultados el BCA. Este ensayo permitió determinar un porcentaje de saturación de sal del 70% (± 3.2 M) con sulfato de amonio como parte de la estandarización del protocolo de extracción de colágeno.

Finalmente, con las condiciones de extracción estandarizadas (disolución con pepsina 0.5% p/v por 48 horas y 4°C y de precipitación con sulfato de amonio al 70% [± 3.2 M] de saturación) se llevo a cabo una extracción partiendo de tejido fresco de *Holothuria inornata* y *Holothuria lubrica*:

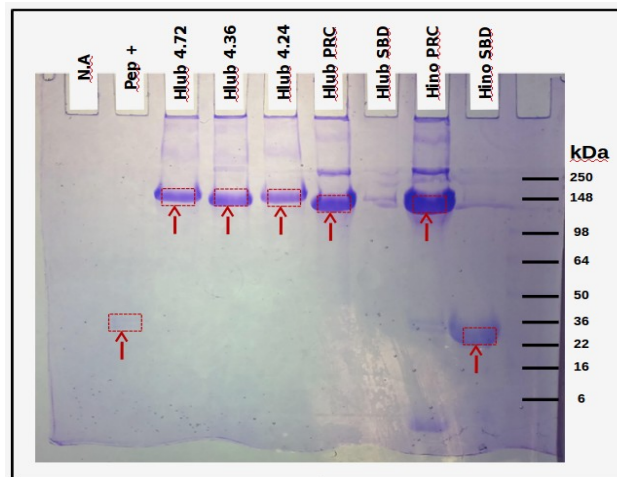


Figura 35. SDS-PAGE al 10% de las extracciones con tejido fresco. Hlub 4.72 (control positivo), Hlub 4.36 (control positivo), Hlub 4.24 (control positivo), Hlub PRC (*Holothuria lubrica* precipitado con sal), Hlub SBD (*Holothuria lubrica* sobrenadante luego de la precipitación con sal), Hino PRC (*Holothuria inornata* precipitado con sal) y Hino SBD (*Holothuria inornata* sobrenadante luego de la precipitación con sal).

En la figura 35, se utilizaron como controles positivos de colágeno las muestras Hlub 4.72, Hlub 4.36, Hlub 4.24 y también un control positivo para pepsina en el segundo carril. Como puede verse, en el gel se encuentran bandas de alto peso molecular las cuales se encuentran en el rango de las cadenas alpha del colágeno reportadas para diferentes especies de holotúridos.

V. Rendimiento de las extracciones

Se llevaron a cabo las extracciones del colágeno fibrilar de *Holothuria lubrica* y *Holothuria inornata* implementando las condiciones definidas por los experimentos antes descritos y los volúmenes y buffers señalados en los protocolos de extracción de Adibzadeh et al., 2014 & Zhong et al., 2015. Respecto a la cantidad de muestra susceptible de ser procesada para la extracción de colágeno, las modificaciones aquí introducidas permiten utilizar menor cantidad de tejido a la vez que se obtiene mayor cantidad de proteína (ver tabla 15).

	Protocolo original	Protocolo modificado		Protocolo para Falcon® de 50ml
	1° muestra (<i>H. lubrica</i>)	1° muestra (<i>H. lubrica</i>)	2° muestra (<i>H. inornata</i>)	1° muestra (<i>H. inornata</i>)
Peso original (peso húmedo)	30 gr	14,32 gr	18,83 gr	+/- 5,83 gr
Peso seco	3600 mg	1718 mg	2259 mg	700 mg
Concentración de proteína mg/ml (BCA)	1,50 mg/ml	1,35 mg/ml	1,6 mg/ml	2,20 mg/ml
Mejoramiento del protocolo en Falcon® 50 ml	1,5x	1,6x	1,4x	-

Tabla 15. Rendimientos en los protocolos de extracción.

Otra de las modificaciones del protocolo de extracción de colágeno fibrilar original, consistió en ajustar los volúmenes y condiciones de extracción a un volumen de 50 ml en un tubo Falcon®; permitiendo de esta forma tener mejor manejo y menor gasto de recursos durante la extracción de las proteínas. Para ver una versión detallada de esta modificación, por favor revisar la sección 7.3.3.

Las extracciones de proteína se resuspendieron en un buffer Na₂HPO₄ 20 mM pH 8.0 y se dializaron frente a una membrana de corte de 14 kDa frente al mismo amortiguador para remover las sales y se liofilizaron. Finalmente, una última modificación se llevó a cabo para verificar el estado de agregamiento del colágeno, la cual consistió en resuspender los extractos proteicos en diferentes Buffers (ver sección 9.6.1).

Anexo 4

Amida I (1600-1700 cm⁻¹) Fracciones Hino FPLC 8-11, 15-17, 18-23.

Pico	AMIDA I (1600-1700 cm ⁻¹)								
	Hino FPLC 8-11			Hino FPLC 15-17			Hino FPLC 18-23		
	Centro	Porcentaje del área total	Asignación	Centro	Porcentaje del área total	Asignación	Centro	Porcentaje del área total	Asignación
1	1615	24,4	Cadenas agregadas (Jackson & Mantsch, 1995)	1612	13,6	Cadenas agregadas (Jackson & Mantsch, 1995)	1613	13,2	Cadenas agregadas (Jackson & Mantsch, 1995)
2	1627	3,0	Cadenas agregados (Barth, 2007), Hoja β (Kong & Yu, 2007; Barth, 2007)	1625	32,9	Cadenas agregados (Barth, 2007), Hoja β (Kong & Yu, 2007; Barth, 2007)	1634	26,6	Hoja β (Jackson & Mantsch, 1995; Kong & Yu, 2007; Barth, 2007)
3	1634	3,5	Hoja β (Jackson & Mantsch, 1995; Kong & Yu, 2007; Barth, 2007)	1636	8,6	Hoja β (Jackson & Mantsch, 1995; Kong & Yu, 2007; Barth, 2007)	1654	14,7	α Hélice (Jackson & Mantsch, 1995; Kong & Yu, 2007; Barth, 2007)
4	1642	2,2	Desordenada (Jackson & Mantsch, 1995; Barth, 2007)	1645	12,7	Desordenada (Jackson & Mantsch, 1995; Barth, 2007)	1674	45,5	Cadenas agregadas (Jackson & Mantsch, 1995), Giro

			2007)						β (Kong & Yu, 2007), Giros (Barth, 2007)
5	1652	0,3	α Hélice (Jackson & Mantsch, 1995; Kong & Yu, 2007; Barth, 2007)	1653	2,2	α Hélice (Jackson & Mantsch, 1995; Kong & Yu, 2007; Barth, 2007)	-	-	
6	1661	0,1	α Hélice (Jackson & Mantsch, 1995; Kong & Yu, 2007; Barth, 2007)	1661	18,8	α Hélice (Jackson & Mantsch, 1995; Kong & Yu, 2007; Barth, 2007)	-	-	
7	1662	65,4	3.10 Hélice (Jackson & Mantsch, 1995; Kong & Yu, 2007), Giro (Barth, 2007)	1669	1,8	3.10 Hélice (Jackson & Mantsch, 1995), Giro β (Kong & Yu, 2007), Giros (Barth, 2007)	-	-	
8	1682	0,2	Hoja β antiparalela /cadenas agregadas (Jackson & Mantsch, 1995), Giro	1674	3,1	Cadenas agregadas (Jackson & Mantsch, 1995), Giro β (Kong & Yu, 2007),	-	-	

			β (Kong & Yu, 2007), Hoja β (Barth, 2007)			Giros (Barth, 2007)			
9	1697	1,0	N.A	1682	6,3	Hoja β antiparalela/ cadenas agregadas (Jackson & Mantsch, 1995), Giro β (Kong & Yu, 2007), Hoja β (Barth, 2007)	-	-	

Amida III (1250-1400 cm-1) Fracciones Hino FPLC 8-11, 15-17, 18-23.

Pico	AMIDA III (1200-1350 cm-1)								
	Hino FPLC 8-11			Hino FPLC 15-17			Hino FPLC 18-23		
	Centro	Porcentaje del área total	Asignación	Centro	Porcentaje del área total	Asignación	Centro	Porcentaje del área total	Asignación
1	1210	11,0	N.A	1203	1,7	N.A	1237	89,8	Hoja β (Kaiden, Matsui, & Tanaka, 1987; B R Singh, Fuller, & Schiavo, 1990; B R Singh, De Oliveira, Fu, & Fuller, 1993)
2	1224	6,4	N.A	1226	1,0	Hoja β (Kaiden, Matsui, & Tanaka, 1987)	1341	10,2	N.A
3	1249	16,1	Random Coil (B R Singh, Fuller, & Schia	1244	7,2	Random Coil (B R Singh, Fuller, & Schiavo, 1990; B R Singh, De Oliveira,	-	-	

			vo, 1990; B R Singh, De Olivei ra, Fu, & Fuller , 1993), α Hélic e (Kaid en, Matsu i, & Tanak a, 1987), Hoja β (Kaid en, Matsu i, & Tanak a, 1987)			Fu, & Fuller, 1993), α Hélice (Kaiden, Matsui, & Tanaka, 1987), Hoja β (Kaiden, Matsui, & Tanaka, 1987)			
4	1261	51,6	Rand om Coil (Kaid en, Matsu i, & Tanak a,	1256	23,4	Random Coil (Kaiden, Matsui, & Tanaka, 1987; B R Singh, Fuller, & Schiavo,	-	-	

			1987; B R Singh, Fuller, & Schiavo, 1990; B R Singh, De Oliveira, Fu, & Fuller, 1993), α Hélice (Kaiden, Matsui, & Tanaka, 1987)			1990; B R Singh, De Oliveira, Fu, & Fuller, 1993)			
5	1309	0,9	α Hélice (Kaiden, Matsui, & Tanaka, 1987)	1271	43,0	Random Coil (Kaiden, Matsui, & Tanaka, 1987; B R Singh, Fuller, & Schiavo, 1990; B R Singh, De Oliveira,	-	-	

						Fu, & Fuller, 1993)			
6	1318	4,0	α Hélice (Kaiden, Matsuji, & Tanaka, 1987)	1339	16,3	N.A	-	-	
7	1339	7,5	N.A	1317	3,5	α Hélice (B R Singh, Fuller, & Schiavo, 1990; B R Singh, De Oliveira, Fu, & Fuller, 1993)	-	-	
8	1347	2,6	N.A	1339	3,9	N.A	-	-	
9	-	-		-	-		-	-	

Amida I (1600-1700 cm⁻¹) y III (1250-1500 cm⁻¹) para la muestra Hino Filt Ac. Acético 0.1M

Pico	Hino Ac. Acético 0.1M					
	AMIDA I (1600-1700 cm ⁻¹)			AMIDA III (1200-1350 cm ⁻¹)		
	Centro	Porcentaje del área total	Asignación	Centro	Porcentaje del área total	Asignación
1	1634	56,9	Hoja β (Jackson & Mantsch, 1995; Kong & Yu, 2007; Barth, 2007)	1230	21,8	Hoja β (Kaiden, Matsui, & Tanaka, 1987; B R Singh, Fuller, & Schiavo, 1990; B R Singh, De Oliveira, Fu, & Fuller, 1993)
2	1633	3,2	Hoja β (Jackson & Mantsch, 1995; Kong & Yu, 2007; Barth, 2007)	1249	70,8	Random Coil (B R Singh, Fuller, & Schiavo, 1990; B R Singh, De Oliveira, Fu, & Fuller, 1993), α Hélice (Kaiden, Matsui, & Tanaka, 1987)
3	1682	1,9	Cadenas agregadas/h	1313	4,9	α Hélice (B R Singh,

			ojas β antiparalelas (Jackson & Mantsch, 1995 ; Barth, 2007), Giro β (Kong & Yu, 2007)			Fuller, & Schiavo, 1990; B R Singh, De Oliveira, Fu, & Fuller, 1993)
4	1664	35,9	Hélice 3.10 (Jackson & Mantsch, 1995; Kong & Yu, 2007), Giro (Barth, 2007)	1339	2	N.A
5	1694	1,9	Cadenas agregadas/hojas β antiparalelas (Jackson & Mantsch, 1995 ; Barth, 2007), Giro β (Kong & Yu, 2007)	-	-	-

Anexo 5

Hoja de producto de la columna de exclusión molecular Shodex KW 802.5.

Shodex® CERTIFICATE OF ANALYSIS

Column : PROTEIN KW-802.5
Column size : 8.0mmID×300mmL
Gel lot number : 130405

(Inspection certificate)



Acceptance criterion
Plate count(1/2 Peak height): ≥ 21000
Fas(10% Peak height) : 0.70 - 1.4

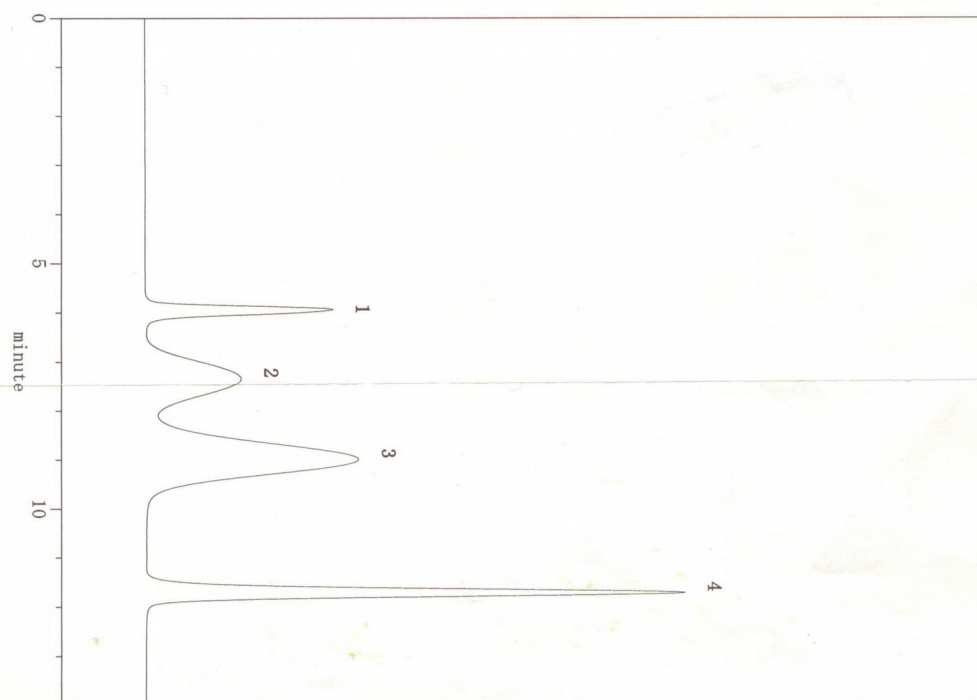
(Analysis condition)

Eluent : H2O
Flow rate : 1.0 ml/min
Detector : RI
Temperature : Ambient (ca. 25°C)
Sample size : 30 μ l
Sample : 1. Pullulan MW 380000 (0.05%)
 2. Pullulan MW 23700 (0.1%)
 3. Pullulan MW 5800 (0.2%)
 4. Ethylene glycol (0.2%) 67.068
Pressure : 2.1 MPa

Column number : E1340124

No.	Rt (minute)	Plate Count	Fas
4	11.700	24200	0.89

Approved by	Tested by
 73.4.30 TANAKA	



Hoja de producto de la columna de exclusión molecular Superdex 200 HiLoad 16/60

