

Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino

Gómez-Lizárraga K. *, Piña-Barba C., Rodríguez-Fuentes N.
*Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México.
 Ciudad Universitaria, Circuito Exterior s/n, C.P. 04510 México D.F.*

Romero M.
*Hospital General "Dr. Manuel Gea González"
 Calzada de Tlalpan 4800, Toriello Guerra, C.P.1400, México D.F.
 (Recibido: 11 de enero de 2011; Aceptado: 8 de noviembre de 2011)*

La colágena como biomaterial aplicada en la rama de la medicina, proporciona soporte a diversos tejidos. La fuente de procedencia de esta proteína, así como las técnicas empleadas para su procesamiento resultan en biomateriales con diversas propiedades. En este trabajo se reporta un procedimiento adecuado para la obtención de colágena tipo I, empleando tendón de bovino. La extracción se hizo a partir de un tratamiento enzimático usando pepsina, lo cual permite obtener una gran cantidad de colágena en solución y reducir una respuesta inmunológica en el organismo. El proceso llevado a cabo permitió la extracción, caracterización, purificación y cuantificación mediante espectrofotometría, de la colágena.

Palabras clave: Colágena; Pepsina; Extracción; Caracterización; Electroforesis; Espectrofotometría

Collagen as a biomaterial applied in the field of medicine provides support to various tissues. The source of origin of this protein as well the processing techniques used derive in biomaterials with different properties. In this paper we reports a suitable procedure for obtaining collagen type I from bovine tendon. The extraction was using an enzymatic treatment using pepsin, which allows obtain great amount of collagen in solution and minimize the immunological response in the body. The process was carried out has allowed the extraction, characterization and purification of collagen and the collagen quantity was quantified using spectrophotometry.

Keywords: Collagen; Pepsin; Extraction; Characterization; Electrophoresis; Spectrophotometry

1. Introducción

Las colágenas forman parte de la familia de las proteínas fibrosas, su principal función es la de soporte estructural y celular. Particularmente la colágena tipo I es el componente más abundante en piel, tendón y hueso, constituyendo aproximadamente el 25% de la masa total de proteína en los mamíferos [1].

La molécula de colágena tipo I está constituida por tres cadenas polipeptídicas denominadas cadenas α , dos cadenas α idénticas designadas como $\alpha 1(I)$ y una cadena α diferente $\alpha 2(I)$ que se enrollan sobre sí mismas formando una superhélice con una longitud de 300 nm, un diámetro de 1.5 nm y un peso molecular de 300 kDa. La estructura a su vez, se divide en dos segmentos: la parte central (helicoidal) y la parte no helicoidal conocida como telopéptido correspondiente a los extremos terminales de la cadena (N-terminal y C-terminal). Las cadenas $\alpha 1(I)$ están conformadas por una secuencia de 1052 aminoácidos de los cuales 1011 corresponden a la parte central, 16 al extremo N-terminal y 25 al extremo C-terminal [2], mientras que la cadena $\alpha 2(I)$ está formada por 1029 residuos aminoácidos [3].

Su estabilidad se debe principalmente a los entrecruzamientos intermoleculares. Aún después de solubilizar la colágena, se conservan algunos

entrecruzamientos, por lo que generalmente las soluciones obtenidas contienen una mezcla de oligómeros. Los telopéptidos son los responsables de la posible respuesta inmunogénica que puede presentar un biomaterial a base de colágena, para eliminar este problema, se remueve los telopéptidos mediante el empleo de enzimas proteolíticas como la pepsina [4].

La extracción de la colágena a partir de un tejido es un proceso que debe ser controlado, ya que cualquier cambio en las condiciones de trabajo produce variaciones en la concentración de colágena, que está directamente relacionada con el rendimiento del producto final y en las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del biomaterial.

Debido a lo anterior, el objetivo de este estudio consistió en determinar las variables que influyeron en las propiedades arriba mencionadas al introducir cambios en las condiciones del proceso de extracción de colágena a partir de tendón bovino.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales y reactivos químicos

Tendón bovino (se obtuvo del rastro Tipo TIFF de la Cuenca del Papaloapan). Pepsina proveniente de mucosa gástrica porcina (Sigma-Aldrich). Acetona, agua

*karlagomliz@hotmail.com, mcpcb@unam.mx

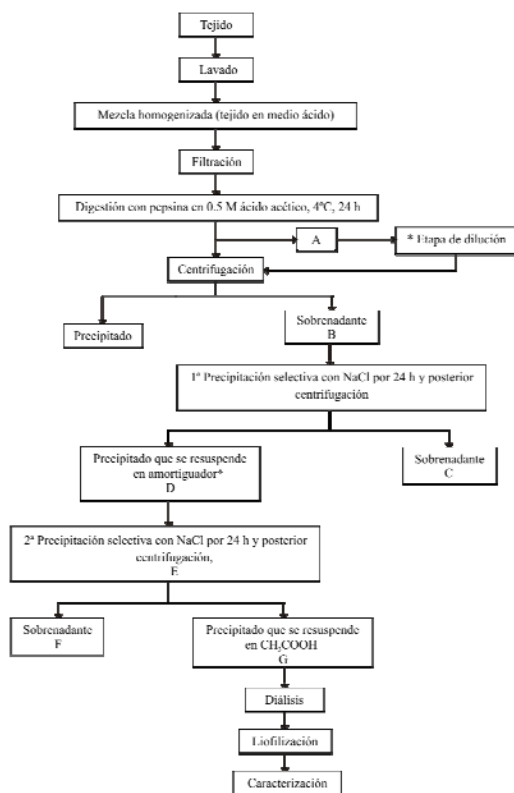


Figura 1. Esquema del proceso realizado para la obtención de colágena tipo I.

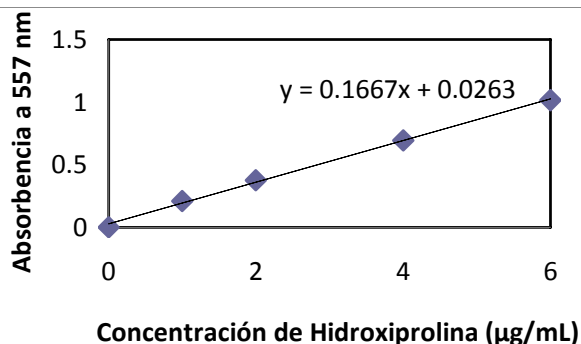


Figura2. Curva Estándar de hidroxiprolina.

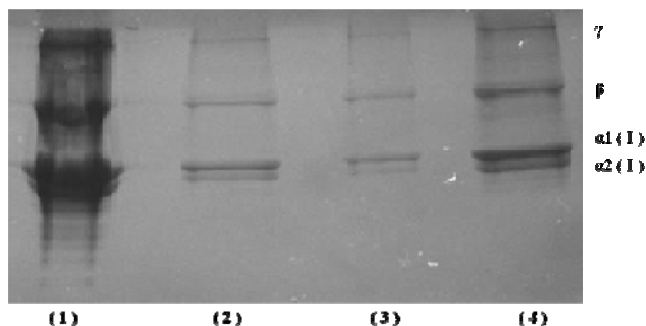


Figura3. Patrón electroforético de: (1) 20 µL de muestra control; (2) y (3) 20 µL y 10 µL muestra G, respectivamente; (4) 20 µL de muestra A

desionizada, ácido acético, ácido clorhídrico, Cloruro de sodio, Refrigerador, Homogenizador Polytron HSIANGTAI.

2.2. Metodología

La extracción de colágena se hizo modificando el proceso reportado por Miller y Rhodes [5], mediante el uso de acetona en lugar de la solución de NaCl (0.15-1 M) para retirar del tendón el tejido adiposo y otras proteínas diferentes a la colágena, con lo que se evita la disolución de la colágena del tendón.

2.2.1. Preparación del tendón

El tendón fue lavado con agua desionizada y se cortó en pequeños fragmentos, después se sumergió en acetona y se dejó en refrigeración por 12 h, para disolver el tejido no deseado. Luego se retiró la acetona y se lavó nuevamente con agua desionizada con el fin de retirar por completo el tejido adiposo. Una vez ya limpio el tendón se liofilizó y guardó hasta su uso.

2.2.2. Extracción de la colágena y digestión enzimática

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

Se tomó una muestra de 10 g de tendón liofilizado el cual se mezcló en 50 volúmenes de ácido acético al 0.5 M, con un pH 2.5 (ajustado con HCl 1M) usando un homogenizador Polytron HSIANGTAI de 100 RPM, Modelo HG300D, con lo que se forma una masa gelatinosa debido al hinchamiento de las fibras de colágena por la intromisión de las moléculas de ácido acético que provocan la pérdida de la estructura secundaria de la proteína. Esto dificulta la solubilización de la mezcla. Se tomaron 50 g de la masa gelatinosa y se agregó ácido acético hasta su completa homogenización, esta solución se filtró empleando gasas y decantación. El tejido que se retuvo en la gasa nuevamente se solubilizó en ácido acético. Posteriormente, se adiciona la pepsina con una relación en peso de 1:10 (enzima/tejido) y se agita por 24 h con objeto de que la proteína se desprenda de los aminoácidos terminales para eliminar una posible respuesta inmunológica. Finalizado el tratamiento con la enzima, se agrega a la solución viscosa obtenida (A) un volumen igual de ácido acético con el fin de diluirla (B) para poder tener un mejor manejo de la misma antes de ser centrifugada, ver Figura 1. Con objeto de retirar la proteína no solubilizada, se centrifugó en un equipo Sorvall, modelo RC-5B y rotor SS34, y únicamente consideramos el sobrenadante.

2.2.3. Purificación de colágena

En esta etapa se aisló la colágena tipo I del sobrenadante obtenido durante el proceso de extracción. Primero el sobrenadante obtenido antes se somete a una primera

Tabla 1. Absorbencia promedio y concentración de las alícuotas tomadas durante el proceso de extracción.

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

precipitación selectiva (salting out) adicionando cristales de NaCl con agitación constante durante un periodo de 24 h. Luego, se centrifugó a 11, 500 g x 2 h, desechándose el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en ácido acético con la finalidad de volver a disolver proteínas no deseadas, durante 24 h. Se llevó a cabo una 2ª precipitación selectiva con las mismas condiciones arriba descritas. Una segunda centrifugación, eliminándose el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en ácido acético 0.5 M. Finalmente se dializó la solución en membranas semipermeables de la marca Spectra/Por a fin de retirar las sales que pudieran haberse quedado durante la precipitación contra un amortiguador de acetatos 5 mM. Se liofilizó para su caracterización.

En la figura 1 se observa el diagrama de flujo del desarrollo experimental arriba mencionado. Para dar seguimiento al cambio en la concentración de colágena durante el proceso se tomaron alícuotas para su cuantificación. Estas alícuotas se designaron con letras: A, B, C, D, E, F y G, siendo la muestra de mayor interés para este trabajo la G. Se empleó una muestra de colágena pura comercial obtenida a partir de piel porcina proporcionada por la empresa ASPID, como muestra control.

2.3. Caracterización de la colágena

2.3.1. Cuantificación de colágena

La colágena esta conformada por tres cadenas α y a su vez cada cadena α , esta constituida por una secuencia única de aminoácidos. La anterior secuencia esta compuesta por unidades repetitivas de tres aminoácidos, esta unidad repetitiva es Gly-X-Y, en donde la posición X esta ocupada por el aminoácido prolina y en la posición Y generalmente se encuentra el aminoácido hidroxiprolina. La hidroxiprolina constituye aproximadamente el 10 % de

la composición en la colágena y se encuentra exclusivamente en este tipo de proteínas (colágenas). Por lo anterior, es posible cuantificar la concentración de colágena a partir de la determinación de hidroxiprolina.

En la literatura existen varios métodos para cuantificar la colágena, todos ellos emplean la técnica de espectrofotometría. En este estudio se empleó el método de Woessner [6], el cual consiste en hidrolizar las muestras con HCl 6N a 105°C durante 18 h en ampollitas selladas. Las ampollitas se abrieron y el contenido se vertió en matraces aforados, lavándose las ampollitas con NaCl 0.2M y se ajustó el pH de la solución a un valor entre 6 y 7, con NaOH 1N y HCl 0.1N correspondiendo a una coloración ligeramente naranja. De la solución anterior se tomaron 0.2 mL que se colocaron en un tubo de ensayo de 16x150 mm, se agregaron 0.8 mL de NaCl 0.2M, solución oxidante 0.05 M (cloramina T, 2-metoxietanol, amortiguador de citratos), y ácido perclórico 3.15 N para eliminar la cloramina T y se mezcló durante 5 minutos, finalmente se agregó una solución de p-dimetilamino-benzaldehído al 20%. La solución anterior se mezcla y se calienta a 60°C durante 20 min. en un baño maría. Al término del cual se dejó enfriar por 5 min. La absorbancia de las soluciones fue medida por espectrofotometría a 557nm, se consideró una solución estándar de hidroxiprolina con concentraciones de 0 a 6 $\mu\text{g/mL}$.

Como se había mencionado anteriormente, la unidad repetitiva por las que están conformadas las cadenas α poseen un aminoácido de hidroxiprolina que se repite a lo largo de las cadenas en n veces, es a partir de este razonamiento que se hace uso de un factor de conversión con valor de 7.46, para calcular la concentración de colágena [7].

2.3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

La pureza de las soluciones de colágena fue analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, basándose en el método de Laemmli [8]. Las muestras se mezclaron con un amortiguador de muestra (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, SDS al 10%, glicerol, azul de bromofenol, agua desionizada) en relación 1:1, se calentó durante 10 min a ebullición y se dejó enfriar a temperatura ambiente, se cargaron 20 μl de muestra al gel de poliacrilamida. Un sistema discontinuo de gel de poliacrilamida fue empleado con una concentración de 7.5% para el gel separador y 4% para el gel concentrador y se realizó la corrida a 20mV durante 2 h. Al término de ésta se retiró el gel de la cámara (Dual Mini-Vertical Units Z37240-4 de Sigma-Aldrich), se tiñó en una solución de azul de Comassie R-250, ácido acético, isopropanol durante toda la noche, para finalmente desteñir con una solución de metanol 40%(v/v), ácido acético 10% (v/v) y agua desionizada 50 % (v/v). Dentro de la corrida también se anexo una muestra estándar (H) y un marcador de peso molecular (Kaleidoscope Prestained Standards de Bio-rad).

3. Resultados y discusión

3.1. Determinación del contenido de colágena

Se determinó la cantidad de hidroxiprolina a partir de la medida de la absorbancia (ver Figura 2), mediante el factor de conversión adecuado se calculó el contenido de colágena en cada muestra tomada durante el proceso de extracción y de purificación.

Durante cada etapa del proceso se extrajo una alícuota, la cual posteriormente fue analizada. Como se observa en la tabla 1, la concentración de cada una de estas muestras fue disminuyendo conforme se tiene un avance en el proceso, sin embargo no pudo determinarse una concentración para la muestra F, se presume que lo anterior se debe a la ausencia de colágena tipo I en solución. La concentración de interés de este trabajo recae en la muestra G (concentración de 0.38 mg/mL y un rendimiento de 54.3 %) que se encuentra muy por debajo de la concentración representativa de la muestra control con un valor de 7.13 mg/mL. Sin embargo, el rendimiento obtenido en este trabajo es mayor que el obtenido por otros autores [9] con un rendimiento del 41.02%.

3.2. Caracterización de las muestras por SDS-PAGE

En el patrón electroforético de las figura 3, se observa que todas las muestras, así como el control presentan como principales constituyentes las cadenas $\alpha 1$, $\alpha 2$, dímeros y trímeros (β y γ) a partir de lo cual se asume que se obtiene colágena tipo I. Los entrecruzamientos entre las moléculas de colágena se concentran en la región telopéptida, impidiendo una completa solubilización de la proteína. Una incisión de esta zona mediante el uso de pepsina facilita la solubilización sin alterar la integridad de la molécula y en consecuencia se obtiene una disminución en el peso molecular y una mayor intensidad de las bandas α y β , correspondiente a los péptidos que se desprendieron de la región telopéptida. Del patrón electroforético se puede observar una desnaturalización en la muestra control (1), es decir, bandas con un peso molecular inferior a la cadena $\alpha 2$ (128, 941 Da). En las columnas (2) y (3) se muestra el patrón de la muestra G (producto final), siendo la única variable la cantidad de proteína insertada en el gel y perceptible en el espesor de las bandas correspondiendo a una menor cantidad de moléculas en la columna (3). El grado de pureza de las muestras aumenta conforme progresa el proceso de extracción, ya que durante la trayectoria se pierde material no colagenoso e inclusive colágena de un tipo diferente a la I en cada una de las centrifugaciones y precipitaciones. En el patrón electroforético, este fenómeno se exhibe como la ausencia de bandas entre las bandas α , β y β , γ . Con base a lo anterior es evidente que en la columna (4) se tiene una muestra impura, siendo esperado este resultado, debido a

que corresponde a una muestra (A) que no ha sufrido ningún proceso físico que contribuya en la separación de sus componentes.

4. Conclusiones

El proceso propuesto para la obtención de colágena tipo I proporcionó un rendimiento alto, no es superior al de la muestra control pero si es significativo al compararse con los obtenidos por otras vías. Por otro lado, la adición de pepsina a pesar de mejorar la compatibilidad del biomaterial, puede presentar desventajas al hidrolizar por completo la proteína (colágena), esto se puede prevenir desactivando la pepsina al llevar el pH de la solución de 2.5 a 6.

Se obtuvieron muestras con un alto grado de pureza cuya determinación fue posible a través del patrón electroforético de la figura 3, lo anterior indicó que la metodología empleada fue adecuada para la obtención de colágena en solución. La solución anterior posteriormente puede ser tratada químicamente tanto físicamente para dar forma a otro de tipo de biomateriales a base de colágena, como son membranas y andamios celulares.

Agradecimientos

Al Dr. Fernando Edgar Krötzsch Gómez por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales-UNAM, DGAPA por apoyo al proyecto IT104011; al CONACYT por el apoyo otorgado, y al Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) por el uso de sus equipos.

Referencias

- [1]. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson, *Biología Molecular de la Célula*. 3ª Edición. (Barcelona, 2002).
- [2]. A. Viidik and J. Vuust, *Biology of collagen*. (London, United Kingdom, 1980).
- [3]. J.B. Park and J.D. Bronzino, *Biomaterials: principles and applications*. (Florida, USA, 2003).
- [4]. J. M. Walker, *The Protein Protocols Handbook*. (New Jersey, USA, 1996).
- [5]. E.J. Miller and R.K. Rhodes, *Methods in Enzymology*. **82**, 33 (1982).
- [6]. J.F. Woessner, *Arch. of Biochem. and Biophys.* **93**, 440 (1961).
- [7]. F.E. Krötzsch, *Método modificado para extracción de colágena nativa a partir de piel de ovino no-nato*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. (D.F., México, 1992).
- [8]. T.E. Creighton, *Protein Structure: A practical approach*. (Oxford, United Kingdom, 1989).
- [9]. S. Nalinanon, S. Benjakul, W. Visessanguan and H. Kishimura, *Food Chem.* **104**, 593 (2007).