

Colágena tipo I. Obtención y Caracterización

Piña, M.C.¹, Romero, M.,², Tello, S.³,
Labastida, A.¹, Dávalos, K.¹, Rosales, D.¹, Fregoso, E.¹

1. Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, CU, Circuito Exterior s/n. C.P. 04510. México, D.F. mcpb@servidor.unam.mx
2. Hospital General Gea González. Dpto. de Biología Molecular e Histocompatibilidad.
3. Área de Biofísicoquímica, Departamento de Química. UAM-I

Proyecto DGAPA IN101606.

1. Resumen

La colágena es el material que “une” a las células de los diferentes tejidos biológicos y por ello se presenta con diferentes propiedades. La colágena del hueso es tipo I y es la mayor componente de la matriz orgánica. Para muchas de las aplicaciones de este material es necesario tenerlo en la forma más pura posible. Aquí se presenta un proceso para obtenerla a partir de hueso de bovino. Para determinar que efectivamente se trata de la colágena tipo I, se caracterizó empleando dicroísmo circular y electroforesis y también se presenta un estudio de sus propiedades térmicas.

2. Introducción

Debido a la creciente importancia de la Ingeniería de Tejidos en la medicina, para reparar o reemplazar un órgano o tejido del cuerpo humano, se buscan materiales adecuados para el transporte celular [1-4]. Este se lleva a cabo con soportes o andamios hechos de biomateriales. En este trabajo se propone emplear esponjas de colágena tipo I obtenidas a partir de hueso de bovino esponjoso. Las esponjas pueden ser usadas como transporte celular o andamios (scaffolds), en la separación de tejidos, en la liberación de medicamentos, como relleno de tejido suave, etc.

3. Condiciones Experimentales

Las esponjas de colágena fueron obtenidas a partir de hueso de bovino esponjoso, el cual fue cortado en cubos de aproximadamente 1cm³ y lavado con agua desionizada.

Posteriormente, los cubos fueron procesados con el fin de retirar toda la materia orgánica posible a través de tratamientos mecánicos y térmicos hasta conseguir únicamente la matriz ósea. Finalmente, esta se sumerge en una solución de HCl para promover su desmineralización y generar las esponjas de colágeno (figura 1).



Figura 1. a) Hueso fresco de bovino, proveniente del cóndilo de fémur. b) Cubos de matriz ósea, obtenidos limpiando el hueso fresco poroso. c) Esponjas de colágeno tipo I obtenidas a partir de la matriz ósea.

Las esponjas fueron caracterizadas por dicroísmo circular empleando un Spectropolarimeter Jasco J-715. Las mediciones se llevaron a cabo en el espectro lejano UV (190-240 nm) y la determinación de la estructura secundaria fue obtenida a 25°C. La concentración de proteínas utilizada fue de 18.92 µg/mL. Los valores DC se reportan como la elipticidad residual media [$\theta_{m.w.r}$], calculada usando una masa molecular residual media de 91 g/mol [5]. La colágena en solución fue cargada en un gel poliacrilamida y se llevó a cabo un análisis de electroforesis a 100 V por 5 h. A continuación, el gel fue teñido con azul de Coomassie y también con plata. Finalmente, la muestra fue comparada con colágena tipo I comercial (Sigma Aldrich), mediante la técnica de Western Blot, empleando anticuerpos como control. Las esponjas de colágeno fueron estudiadas mediante análisis termogravimétrico (TGA) desde 25°C a 1000°C empleando un calorímetro Hi-Tes TGA 2959 y a una velocidad de calentamiento de 5°C/min en atmósfera de N₂. Además, fue llevado a cabo un estudio de calorimetría diferencial de barrido (DSC) empleando un calorímetro DSC-Q-1000 con velocidades de calentamiento de 1, 3, 5 y 10°C/min en atmósfera de N₂, desde -20°C hasta 150°C.

4. Resultados y discusión

En la figura 2 se muestra el espectro de CD para la proteína estudiada. En el espectro es posible observar las principales las bandas características de la estructura de triple hélice de la colágena tipo I, con una banda positiva centrada en 223nm y un promedio residual de elipticidad de 2.9×10^3 grados·cm² /dmol y una banda negativa mas pronunciada en 198nm con un promedio residual de elipticidad de -10.6×10^4 grados·cm² /dmol.

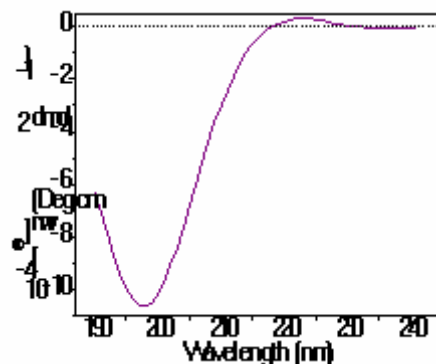


Figura 2. Espectro de dicroísmo circular (CD) para la muestra de colágena.

Los patrones de electroforesis para la colágena se muestran en la figura 3, estos mostraron que los pesos moleculares para la colágena obtenida a partir de hueso bovino (CHB) fueron idénticos a los de la colágena comercial (CC), tanto con la tinción de azul de Coomassie como con plata, indicando la proteína como colágena tipo I. Adicionalmente, no fueron detectadas otro tipo de proteínas, incluso después de concentrar el sistema con Amicon.

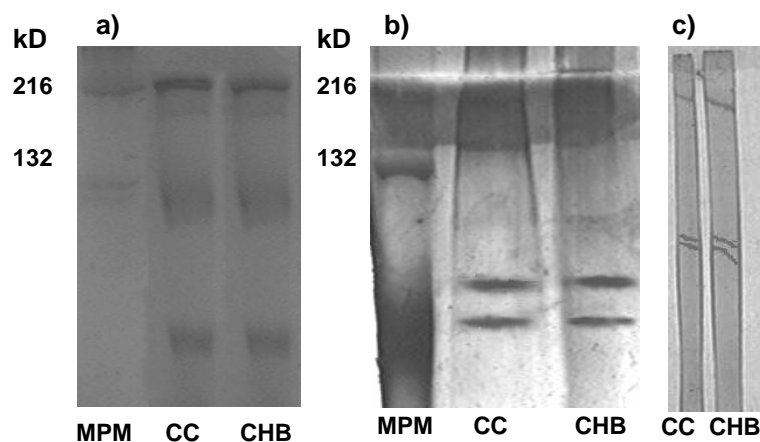


Figura 3. Patrones de electroforesis de colágena. a) Muestra teñida con azul de Coomisse, b) Muestra teñida con plata y c) Western blot con anticuerpos de colágena comercial. MPM es el marcador de peso molecular, CC y CHB.

En la figura 4 se presentan los termogramas obtenidos para la muestra de colágena por TGA (4a) y DSC (4b). El estudio por TGA reveló dos eventos térmicos durante el calentamiento de la colágena: el primero es atribuido a la remoción de agua del material (25°C–150°C) y el segundo (250°C–700°C) corresponde a la descomposición de la colágena. Los termogramas obtenidos por DSC mostraron un evento endotérmico relacionado a la desnaturalización de la colágena, el cual depende la velocidad de calentamiento, es decir, se encuentra bajo control cinético.

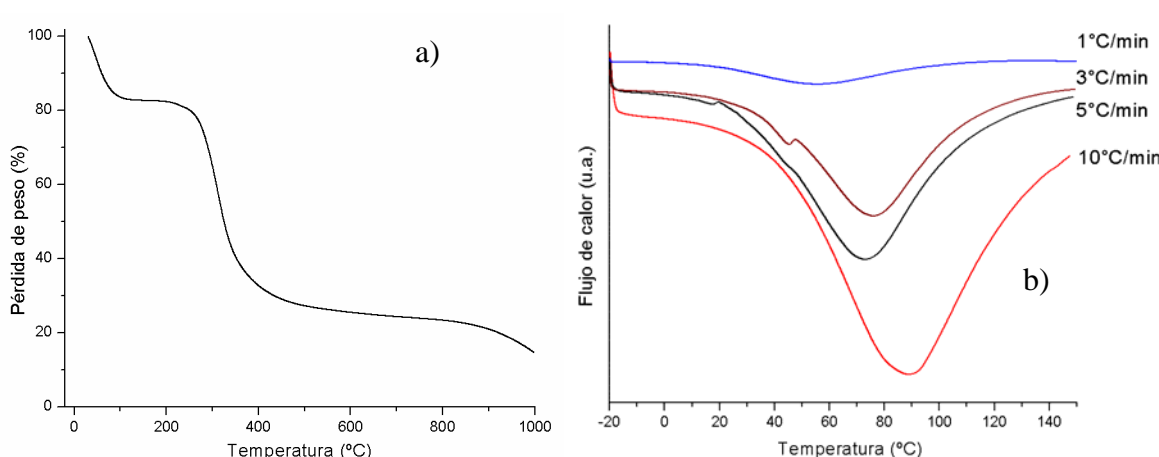


Figura 4. Termogramas de colágena de hueso bovino. a) TGA y b) DSC.

5. Conclusiones

Las esponjas obtenidas a partir de la desmineralización de hueso bovino corresponden a colágena tipo I pura lo cual indica que poseen un gran potencial para ser empleadas como andamios celulares o como relleno de tejido suave debido a su excelente biocompatibilidad.

6. Referencias

1. Langer R., Vacanti J.P., Science 1993; **260**: 920-926.
2. S. J. Lee, G. J. Lim, J.W. Lee, A. Atala, J. J. Yoo. Biomaterials 2006; **27**: 3466–3472.
3. Nimni ME. In: Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering. New York: Marcel Dekker Inc; 1995. p. 1229–43.
4. J.C. Horng, A. J.Hawk, Q.Zhao, E.S. Benedict, et al. Organic Letters 2006; **8**: 4735-4738.
5. Y. Feng, J. P. Taulane, M. Goodman. Macromolecules 1997; **30**: 2947-2952.
6. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. J. Biol. Chem. 1951; **193**: 265-275.

7. Protein Electrophoresis. Technical manual. Amersham Biosciences. USA 1999.
www.amershambioscience.com