

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE COLÁGENO TIPO I PARA APLICACIONES EN INGENIERÍA DE TEJIDOS

Durán Coronilla Brenda Guadalupe (1), Tavares Negrete Jorge Alfonso (2), Quintero Ortega Irais Amaranta (3)

1 [Estudiante de bachillerato, ENMS. San Luis de la Paz, Guanajuato, México] | [Dirección de correo electrónico: coronillabrenda@gmail.com]

2 [Ingeniería Biomédica, División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, Universidad de Guanajuato] | [Dirección de correo electrónico: tavaresnj2013@licifug.ugto.mx]

3 [Departamento Ingeniería Química, Electrónica y Biomédica, División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, Universidad de Guanajuato] | [Dirección de correo electrónico: iraisq@fisica.ugto.mx]

Resumen

El colágeno es la proteína más abundante en los animales forma fibras colágenas que constituyen parte primordial de la matriz extracelular; el colágeno tipo I está presente en huesos, piel, córnea y los tendones [1]. En este proyecto se probó un protocolo de extracción de colágeno, el cual puede ser utilizado en la elaboración de biomateriales. El colágeno extraído fue caracterizado químicamente por espectroscopia infrarroja y se verificó la presencia mayoritaria de proteína de colágeno por medio de una electroforesis SDS-PAGE.

Abstract

Collagen is the most abundant protein in animals, this which forms fibers that are a primary part of the extracellular matrix; Collagen type I is the most common and is present in bones, skin, cornea and tendons [1]. In this project a collagen extraction protocol was tested, which can be used in the elaboration of biomaterials. The extracted collagen was chemically considered by infrared spectroscopy and the majority presence of collagen protein was verified by SDS-PAGE electrophoresis

Palabras clave

Colágeno ; Biomateriales; Hidrolisis ;Electroforesis;

INTRODUCCIÓN

El colágeno es una proteína fibrosa que forma el tejido conectivo, y que en los mamíferos y aves constituye una proporción muy importante de las proteínas totales, aproximadamente un 25%. Una de las características más importantes del colágeno, es que tiene una gran flexibilidad, pero a la vez ofrece gran resistencia.

Existen 28 tipos diferentes de colágeno. El colágeno tipo I, es el más abundante, la unidad estructural constituyente es el tropocolágeno, una proteína de alrededor de 300.000 macromoléculas de peso molecular, constituida por tres cadenas del mismo tamaño, dos de ellas idénticas y otra ligeramente distinta. Está presente sobre todo en los huesos, en la piel, en la córnea y en los tendones; sus principales funciones son denotar al organismo la capacidad de estiramiento y resistencia.

El colágeno extraído de tendón de rata puede ser utilizado para investigación en la industria farmacéutica y cosmética.

Este colágeno puede ser usado para recubrir el interior de material de laboratorio como recipientes de cultivo de células. En la industria cosmética, el colágeno de cola de rata se utiliza como aditivos de jabones, también se utiliza en cremas o lociones [3]

En este trabajo se reporta un procedimiento para la obtención y caracterización de colágeno tipo I, empleando tendón de cola de rata. La extracción y purificación de colágeno se realizó con el protocolo establecido en el Laboratorio de Biomateriales de la División de Ciencias e Ingenierías.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Colas de rata, bisturí, tijeras, tabla de disección, kit de disección, solución desinfectante, agitadores magnéticos, tubos falcón 50ml, vasos de precipitados de 50ml, tubos Eppendorf, charolas desechables de pesaje, molde de silicón, marcadores, mortero de ágata, toallas de papel, espátulas, cepillo, kit formador de pastilla para IR, micro pipetas, pipeta Hamilton, puntas para micro pipeta, placa de 96 pozos, flotador para tubos Eppendorf, plato, espátula, recipiente de plástico.

Equipo:

Parilla de agitación, agitador orbital, potenciómetro, balanza digital, refrigerador, espectrofotómetro infrarrojo, PC, horno, UV-VIS, cámara de electroforesis, fuente de poder.

Métodos

Tratamiento de las colas de rata y extracción de colágeno

Se siguió el protocolo para la obtención de colágeno reportado por Rajan con algunas modificaciones descrito a continuación [2] : Después de ser disecadas las colas, se preparó el área de trabajo, donde se les realizó un corte en piel de la parte distal de la cola hasta encontrarse con una zona blanquecina, la cual corresponde a los tendones; al extraer los tendones se colocaron en etanol para desinfectar durante un minuto, a continuación se colocaron en PBS hasta terminar por completo la extracción de tendones. Al finalizar las colas se lavaron en dH₂O, para la descelularización de los tendones estos se sumergieron en una solución compuestas por tritón x100, EDTA y PBS 1x para que actuase como un surfactante durante una hora y después de volverse a lavar, se sometieron a la hidrólisis en HCl y manteniéndose en agitación por 7 días.

Cumplidos los 7 días se transfirieron las soluciones de ácido con colágeno hidrolizado al molde de silicón y se pusieron en congelación por 24 horas.

Procesamiento del colágeno hidrolizado en un horno de secado al vacío.

El colágeno hidrolizado se puso a secar durante 4 días en un horno al vacío a 35°C, para evitar que el colágeno obtenido se desnaturalizara, permitiendo separar la solución ácida y obtener colágeno seco [4].

Caracterización del colágeno.

- *Espectroscopia Infrarroja (IR)*

La espectroscopia infrarroja (IR) ayudo a detectar las vibraciones características de los grupos funcionales químicos presentes en el colágeno.

Para comenzar con la caracterización se preparó primero una pastilla “blanco” pulverizando un poco de KBr y colocándolo en el kit formador de pastillas para IR. Una vez que se midió la muestra, se retiró y con la ayuda del cepillo y acetona se limpió el kit para poder realizar la siguiente prueba.

Del colágeno seco se tomó una muestra y se formó una pastilla con un poco de KBr pulverizado. Con una espátula se vertió en el kit formador de pastillas para IR y se preparó la pastilla que se colocó en el lector del espectrómetro infrarrojo el cual tomo la muestra blanca y arrojó las lecturas del colágeno seco y de la misma manera con el colágeno comercial.

- *Electroforesis proteica*

La electroforesis sobre gel de SDS-poliacrilamida es el método empleado para el análisis cualitativo de proteínas. Particularmente es útil para monitorear la purificación de una proteína, ya que el método está basado en la separación de las subunidades proteicas según su tamaño, este puede ser usado para determinar el peso molecular relativo de las proteínas. [5]

La electroforesis proteica consta de las siguientes etapas, la primera es la obtención de la proteína recogiendo las muestras del colágeno hidrolizado; la segunda es la cuantificación de la concentración de la proteína con ayuda del kit Pierce BCA Protein Assay, lo que permite identificar la cantidad de muestra a cargar en el gel para la electroforesis; la siguiente etapa es la preparación y corrimiento del gel de acrilamida 7.5%. En este gel se desarrolló la corrida de las proteínas gracias al gradiente eléctrico generado por la fuente de poder.

Formado el gel, se transfirió a un recipiente de plástico, donde se tiñó y después fue lavado con las soluciones preparadas para poder observar las subunidades de la proteína.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo una cantidad de 5154.00 mg de colágeno.

El secado al vacío colágeno se realizó de manera correcta, puesto que el colágeno no se desnaturalizó a la temperatura de 35°C, ya que se pudo percibir en la espectroscopia infrarroja

Ya terminado de ejecutar el protocolo de obtención del colágeno se caracterizó la proteína para eliminar la posibilidad de que haya estado contaminada y/o contenera alteraciones de las cadenas proteicas.

Espectroscopia Infrarroja (IR)

Al comparar el colágeno comercial y el colágeno extraído, se observaron espectros similares, obteniendo bandas de absorción que correspondían a la amida I en 1650 cm^{-1} , la amida II a 1560 cm^{-1} y la vibración de bandas características de la amida III a 1245 cm^{-1} . También se muestra un aumento notable a 3400 cm^{-1} en el espectro debido a la formación de puentes de hidrógeno, que se unen a las moléculas de colágeno. [6]

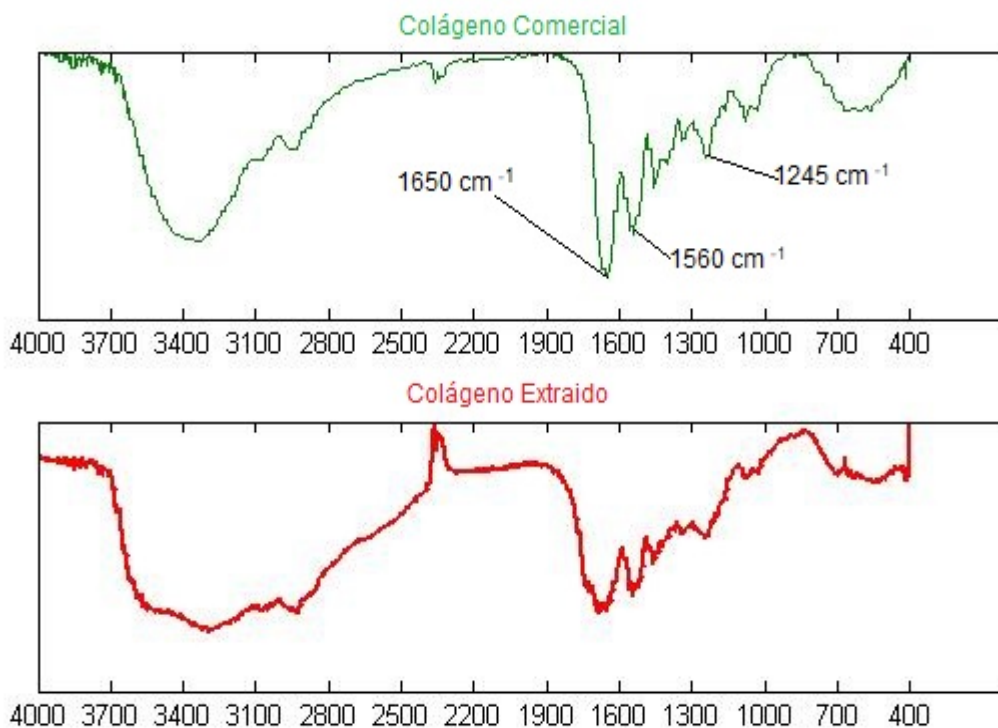


Imagen 1. Espectro infrarrojo del colágeno. Grafica comparativa entre colágeno comercial y el colágeno extraído.

Por medio de la electroforesis se percibió que la proteína no estaba contaminada y el colágeno obtenido era mayormente puro

CONCLUSIONES

Al finalizar la ejecución del protocolo mencionado anteriormente, en base a las técnicas de caracterización, el colágeno obtenido conserva la presencia de las amidas I, II, y III sin embargo, la diferencia del espectro en el intervalo de 2500 a 3700 cm⁻¹ sugiere que el colágeno extraído sufrió algún cambio en su composición química.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Irais Amaranta Quintero Ortega y Jorge Alonso Tavares Negrete por el apoyo brindado en la realización de este proyecto.

Al M. en C. Luis Armando Ibarra Manzano por su apoyo y motivación durante la realización del proyecto.

A la División de Ciencias e Ingenierías, Campus León por el uso de las instalaciones y equipos.

A la Universidad de Guanajuato por el apoyo brindado al proyecto.

REFERENCIAS

- [1] Fratzl, P. (2001). Collagen Structure and Mechanics. Alemania: Springer
- [2] Rajan, N., Habermehl, J., Cote, M.F., Doillon, J. C., Mantovani, D. (2006). Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. Nature protocols, 1, pp. 2753-2258.
- [3] Ramachandran, G. N. Sasisekharan, V. (1961). Structure og collagen. Current Science. 30, pp. 127-130
- [4] Holmes, R. Kirk, S. Tronci, G. Yang, X. Wood, D. (2017). Influence of telopeptides on the structural and physical properties of polymeric and monomeric acid-soluble type I collagen. Materials Science and Engineering. 1. pp.115-122
- [5] García Pérez, H. M. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Laboratorios Beterá, 1, pp. 31-41.
- [6] S. Mello, Maria Luiza. (2011). Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. Micron. 42, pp. 283-289.