

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

López López Jesús Eduardo (1), Tavares Negrete Jorge Alfonso (2) Quintero Ortega Irais Amaranta (3)

1 [Ingeniería Biomédica, Universidad de Guanajuato] | [lopezlj2015@licifug.ugto.mx]

2 [Ingeniería Biomédica, Universidad de Guanajuato] | [tavaresnj2013@licifug.ugto.mx]

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

## Resumen

El colágeno tipo I es la proteína más abundante en el tejido conectivo, por lo que se puede obtener fácilmente de la piel, los tendones, el cartílago, etc. Existen múltiples protocolos para la extracción de colágeno de diferentes tejidos; sin embargo, la extracción a través de tendones de cola de rata es una de las técnicas más usadas por su simplicidad, costo y fiabilidad, lo que ha popularizado su uso en la investigación de nuevos biomateriales y en la ingeniería de tejidos. El objetivo del presente trabajo es extraer colágeno de tipo I por medio de descelularización e hidrólisis ácida usando como fuente de colágeno los tendones de cola de rata. Este biopolímero se comparó con colágeno comercial y se caracterizó por medio de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier y electroforesis en gel de poliacrilamida.

## Abstract

Type I collagen is the most abundant protein in connective tissue, which is why it can be easily obtained from skin, tendons, cartilage, etc. There's plenty of protocols for collagen extraction from diverse tissues, nevertheless, the use of rat tail tendons is one of the most used techniques since it's simple, inexpensive and reliable, which has favored its use in the investigation of new biomaterials and tissue engineering. The objective of this work is to extract type I collagen via acid hydrolysis using this supply of rat tail tendons. This biopolymer was compared against commercial collagen and was characterized by Fourier Transform infrared spectroscopy and polyacrylamide gel electrophoresis.

## Palabras Clave

1; Colágeno 2; Tendón 3; Descelularización 4; Hidrólisis

## INTRODUCCIÓN

El colágeno tipo I es el tipo más abundante y es expresado en casi todos los tipos de tejido conectivo. Es una de las proteínas más investigadas y se encuentra en un gran porcentaje en hueso, piel, tendones, ligamentos, esclerótica, córnea y vasos sanguíneos. Entre el 80 – 90% del colágeno en el cuerpo consiste en colágeno tipo I, II y III. [1]

Se trata de una molécula heterotrimérica de una masa aproximada de 360 kDa [2], la cual está conformada de dos cadenas  $\alpha 1$  y una cadena  $\alpha 2$ . Cada cadena está formada por más de 1000 aminoácidos. Tiene tres dominios, un dominio N-terminal, un dominio triple hélice central y un dominio C-terminal. El dominio triple hélice es posible debido a la presencia de repeticiones de glicina (G-X-Y) donde X generalmente es prolina e Y suele ser una hidroxiprolina.

Se conoce desde hace tiempo que el colágeno normalmente es insoluble [3] debido a la gran cantidad de entrecruzamiento covalente que presenta. A pesar de esto, el colágeno puede solubilizarse sin desnaturalizarse usando sales neutras [4] o soluciones ácidas [5].

Ya que el colágeno se puede encontrar en diferentes tejidos de muchas especies de organismos pluricelulares es muy fácil de obtener. Algunos estudios se han enfocado en estandarizar un protocolo para obtener colágeno de distintas fuentes como lo es el tendón de Aquiles bovino [6], pericardio bovino [7], tendones de cola de rata [8], entre otras.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Ácido acético, ácido clorhídrico, acrilamida, agua destilada, BCA kit, bromuro de potasio, butanol, cámara de electroforesis, colas de rata, EDTA, etanol 70%, liofilizadora, marcadores de peso molecular, PBS 1X, persulfato de amonio, SDS, TEMED, tritón 100X, ultra congelador, UV-Vis.

### Métodos

- *Extracción del colágeno*

Las colas de rata se diseccionaron utilizando un bisturí para cortar el ápice de la cola hasta exponer la columna y los tendones, tal y como se muestra en la Imagen 1. Los tendones se desinfectaron en etanol al 70% durante un minuto y se sumergieron en un vaso con PBS 1X hasta que se procesaran todos los tendones.

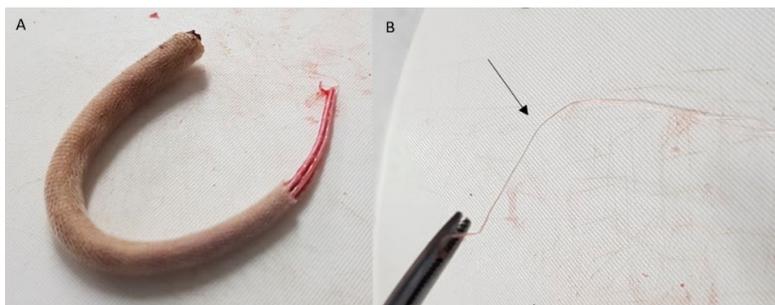


Imagen 1. Cola de rata con columna vertebral expuesta (A), a partir de ésta se pueden extraer los tendones (B).

A continuación, estos se sumergieron en etanol absoluto con agitación durante una hora. Después se lavaron con agua destilada y se colocaron en PBS 1X que contenía EDTA 1.7 mM y Tritón 100X al 1% en agitación durante una hora para descelularizar. Se realizó otro lavado con agua destilada, los tendones se sumergieron en una solución de HCl 0.01M para hidrolizarse, esta solución se mantuvo en agitación y refrigeración durante 7 días. Después de este periodo de tiempo, se transfirió un volumen de 30 ml a un tubo Falcon de 50 ml para congelarse a -70°. Finalmente las muestras se colocaron en la liofilizadora (Bench-Top Freeze Dryer LBFD-A40 de Labtron) durante 3 días para obtener el colágeno seco.

- *Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier*

El colágeno liofilizado se caracterizó mediante espectroscopia infrarroja utilizando la técnica de reflectancia difusa en la región del medio infrarrojo (400-4000  $\text{cm}^{-1}$ ) con 32 muestreos, una resolución de 4 $\text{cm}^{-1}$  (Espectrofotómetro Nicolet iS5 de Thermo Fisher Scientific). Las principales bandas de vibración fueron identificadas en relación con los grupos químicos presentes.

- *Cuantificación de la concentración de colágeno*

La cuantificación de la concentración de proteína se llevó a cabo con el kit Pierce BCA Protein Assay, leyendo la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis (Espectrofotómetro Multiskan GO de Thermo Fisher Scientific) a 562 nm.

- *Preparación de muestras para electroforesis*

En un tubo Eppendorf se agregaron 15  $\mu\text{l}$  de la solución de colágeno y 4  $\mu\text{l}$  de BS 4X, para comparar se utilizó colágeno comercial de los cuales se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de este colágeno y 10  $\mu\text{l}$  de BS 4X. Posteriormente estas muestras se colocaron en ebullición (90°C) durante 5 minutos e inmediatamente se cargaron en el gel.

- *Electroforesis en gel de poliacrilamida*

Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida al 7.5%. Primero se preparó el gel separador añadiendo 2.81 ml de Acrilamida/Bisacrilamida 30%, 2.85 ml de Tris 1.5M pH 8.8 y 5.4 ml de agua destilada, se agitó suavemente y se agregaron 114  $\mu\text{l}$  de SDS al 10% (P/V), 10  $\mu\text{l}$  de TEMED y 51  $\mu\text{l}$  de Persulfato de Amonio al 10% (P/V). Esta mezcla se añadió al molde para gel y se agregaron 0.5 ml de 1-butanol para eliminar las burbujas y se dejó gelificar aproximadamente de 30 a 45 minutos. Una vez gelificado se retiró el 1-butanol y se agregó el gel concentrador preparado con 634.5  $\mu\text{l}$  de Acrilamida/Bisacrilamida 30%, 960  $\mu\text{l}$  de Tris 0.5M pH 6.8 y 2.16 ml de agua destilada, se agitó suavemente y se agregó 38.1  $\mu\text{l}$  de SDS al 10%, 4.5  $\mu\text{l}$  de TEMED y 20.25  $\mu\text{l}$  de Persulfato de Amonio al 10%, se colocó el peine para formar los pozos y se permitió que gelificara durante 20 a 30 minutos.

Una vez que el gel de poliacrilamida gelificó por completo, se retiró el peine y se transfirió a la cámara de electroforesis (SE250 Mini Vertical Protein Electrophoresis Unit de Hoefer) a la cual se le añadió amortiguador de corrida 1X. Las muestras previamente preparadas fueron cargadas en el gel junto con un marcador de peso molecular. Se aplicó un voltaje de 80 volts durante 30 minutos para permitir que las proteínas corrieran en el gel concentrador, después el voltaje se aumentó a 100 volts para separarlas durante 2 horas aproximadamente.

Terminado el tiempo de separación de las proteínas, se desmontó el gel del casete y se tiñó con azul de Coomassie durante 15 minutos con agitación lenta. Después de este tiempo se destiñó en una solución de metanol al 40% V/V y ácido acético al 10% V/V durante una hora y manteniendo en agitación. Posteriormente se utilizó una solución de metanol al 5% V/V y ácido acético al 7% V/V durante 24 horas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- *Extracción del colágeno*

Con el paso del tiempo se observó un cambio en la viscosidad de la solución, este cambio fue debido a la hidrólisis del colágeno.

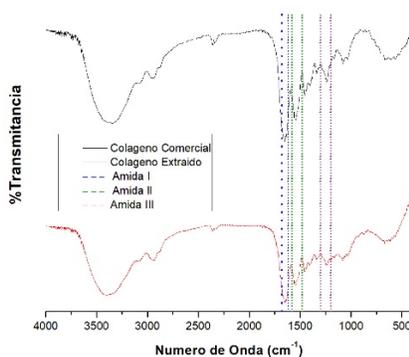
El colágeno liofilizado tenía una textura y apariencia muy similar a la una esponja como se puede apreciar en la imagen 2, este colágeno se almacenó para investigaciones futuras y puede ser almacenado hasta por seis meses.



**Imagen 2. Apariencia del colágeno liofilizado**

- *Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier*

Los espectros obtenidos para el colágeno comercial y el colágeno extraído se muestran en la Imagen 3. Se pueden apreciar los picos característicos alrededor de 1680-1620 cm, 1580-1480 y 1300-1200, los cuales corresponden a los grupos amida I, amida II y amida III correspondientemente. Estos picos están presentes tanto en el colágeno comercial como el purificado y concuerdan con los reportados en la literatura.



**Imagen 3. Espectro infrarrojo del colágeno comercial y el colágeno extraído**

- *Cuantificación del colágeno*

Se determinó la concentración de colágeno en la solución usando el kit antes mencionado y se obtuvo la ecuación de la recta con una  $R^2$  de 0.992. La ecuación de la recta es:

$$y = 0.3113x + 0.0337$$

Y a partir de esto se determinó que la concentración de colágeno era de 5.3 mg/ml.

- *Electroforesis en gel de poliacrilamida*

En el gel de poliacrilamida desteñido (Imagen 4) se pueden observar las bandas del colágeno comercial (carril 2) y las bandas del colágeno purificado (carril 4). En ambas muestras es posible ver las bandas correspondientes a las cadenas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta$ , características del colágeno.

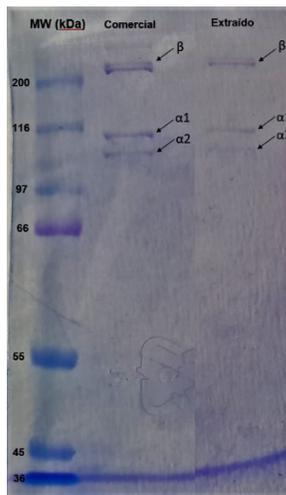


Imagen 4. Gel de poliacrilamida SDS PAGE teñido con azul de Comasie.

## CONCLUSIONES

La similitud de bandas entre el colágeno comercial y el extraído de tendones de cola de rata en el espectro infrarrojo confirma la composición química del colágeno, mientras la electroforesis muestra que la proteína mayoritaria extraída corresponde al colágeno. Con estos resultados se comprueba la factibilidad de extraer colágeno de cola de rata siguiendo el protocolo descrito por Rajan [8]; el contar con un protocolo sencillo para la extracción de colágeno favorecerá la investigación en el laboratorio de biomateriales de la División de Ciencias e Ingenierías.

## AGRADECIMIENTOS

Este verano de investigación ha sido una gran oportunidad para crecer académicamente y permitirme ampliar mis horizontes, pero no hubiera sido posible sin el apoyo de todo el grupo de trabajo que me acompañó durante mi estancia.

Agradezco a la Dra. Irais Amaranta Quintero Ortega, a la Dra. Argelia Rosillo de la Torre y a la Dra. Laura Edith Castellano Torres quienes forman parte de mi formación como Ingeniero Biomédico y que me brindaron su paciencia, entrega, apoyo y cariño, sin duda personas a las que les tengo mucha admiración y me motivan a seguir adelante.

A todos mis compañeros de trabajo con los que compartí esta experiencia: Karime Navarro, Úrsula Ruiz, Ale Cárcoba, Francisco Romero, Hugo Oñate y en especial a Jorge Tavares quien me guió cuando me sentía perdido y quien me dio ánimos para hacer esta estancia de investigación. Y finalmente a mi familia y mis amigos que siempre estuvieron conmigo.

## REFERENCIAS

- [1] Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Sección 22.3, Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix.
- [2] Voet, D., & Voet, J. G. (1995). *Biochemistry*. New York: J. Wiley & Sons.
- [3] F. H. Silver, R. L. Trelstad. (1980). Type I collagen in solution. Structure and properties of fibril fragments. *J. Biol. Chem.* 255, 9427–9433.
- [4] Chandrakasan, G., D.A. Torchia, and K.A. Piez. (1976). Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. *J. Biol. Chem.* 251: 6062 – 6067
- [5] Gross, J., Highberger, J. H., & Schmitt, F. O. (1955). Extraction of collagen from connective tissue by neutral salt solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 41(1), 1–7.
- [6] Santos, M.H., Silva, R.M., Dumont, V.C., Neves, J.S., Mansur, H.S. and Heneine, L.G.D. (2013). Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications. *Materials Science and Engineering: C* 33(2): 790-800.
- [7] Li, D., Mu, C., Cai, S. and Lin, W. (2009). Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen. *Ultrasonics Sonochemistry* 16(5): 605-609.
- [8] Rajan, N., Habermehl, J., Coté, M.-F., Doillon, C. J., & Mantovani, D. (2007). Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nature Protocols*, 1, 2753.