

Desplegamiento térmico de colágeno bovino tipo I

Tello Solís Salvador Ramón^{1*}, Schiavon Nieto Sandra¹,
Gómez Lizárraga Karla Karina², Piña Barba María Cristina²

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Química.
Avenida San Rafael Atlixco No. 186. Colonia Vicentina, México, D.F., CP 09340.

²Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Investigaciones en Materiales.
Ciudad Universitaria, México, D.F., CP 04510.

*srts@xanum.uam.mx

Fecha de aceptación: 06 de julio de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

En este trabajo se estudió el desplegamiento térmico del colágeno tipo I de tendón bovino, en solución ácida a pH_{final} 3.5, a diferentes velocidades de calentamiento, por el monitoreo de la elipticidad. Se observó que el desplegamiento térmico del colágeno tipo I, de forma global cumple con un proceso irreversible y se encuentra bajo control cinético. Las curvas de transición térmica, a diferentes velocidades de calentamiento, presentaron una forma bifásica que implica la existencia de un intermediario estable durante la desnaturalización, por lo que se propone que el mecanismo del desplegamiento térmico del colágeno tipo I, sigue un proceso en el que intervienen tres estados, podría ajustarse al modelo de Lumry-Eyring (Tello-Solís, 1995; Tello-Solís y Hernández-Arana, 1995): $\text{N}_3 \rightleftharpoons 3 \text{I} \rightarrow 3\text{D}$, donde N es el estado nativo, que en este caso es un trímero, I un estado intermediario y D el estado desnaturalizado irreversiblemente.

Palabras clave: colágeno, dicroísmo circular, desnaturalización térmica.

ABSTRACT

In this work the thermal unfolding of collagen type I bovine tendon was studied in acidic solution at pH_{final} 3.5, at different heating rates, by monitoring the ellipticity. It is observed that thermal unfolding of type I collagen, on a global basis meets an irreversible process and is under kinetic control. Thermal transition curves at different heating rates, showed a biphasic manner, which implies the existence of a stable intermediate during denaturation. It is proposed that the mechanism of the thermal unfolding of type I collagen, is a process in which three states are involved. The process is described by Lumry-Eyring model (Tello-Solís, 1995; Tello-Solís and Hernández-Arana, 1995): $\text{N}_3 \rightleftharpoons 3 \text{I} \rightarrow 3\text{D}$, where N is native state, I is an intermediary state and D is irreversible denaturated state.

Key words: collagen, circular dichroism, thermal denaturation.

INTRODUCCIÓN

Proteínas fibrosas

Las proteínas fibrosas contienen esencialmente estructuras secundarias regulares, como son, α -hélices y láminas plegadas β . Como consecuencia de sus formas de varilla o de láminas, muchas proteínas fibrosas tienen funciones estructurales más que dinámicas. Ejemplos de proteínas fibrosas son el colágeno, la fibroína de la seda y la α -queratina (Mathews *et al.*, 2002; McKee y McKee, 2003; Nelson y Cox, 2005).

Colágeno

El colágeno es la proteína más abundante de los vertebrados. La sintetizan las células del tejido conjuntivo que la segregan al espacio extracelular (Labastida-Pólito, 2009).

El colágeno incluye diversas proteínas que poseen diferentes funciones. Las moléculas de colágeno de la piel, los huesos, los tendones, los vasos sanguíneos y la córnea son genéticamente distintas y proporcionan a estas estructuras muchas de sus propiedades, por ejemplo, la fuerza tensora de los tendones y la transparencia de la córnea (Mathews *et al.*, 2002; McKee y McKee, 2003; Nelson y Cox, 2005).

El colágeno está formado por tres hélices polipeptídicas arrolladas hacia la izquierda, las cadenas se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno (Nelson y Cox, 2005).

Las moléculas de colágeno tipo I, que se encuentran en los dientes, el hueso, la piel y los tendones, tienen aproximadamente 300 nm de longitud y 1.5 nm de grosor. Existen 21 familias principales de moléculas de colágeno, siendo el más abundante el colágeno tipo I. Por ejemplo, en el ser humano el colágeno tipo I se encuentra aproximadamente en un 90 %.

La composición de aminoácidos del colágeno es característica. La glicina constituye aproximadamente un tercio de los residuos de aminoácido. La prolina y la 4-hidroxiprolina representan hasta el 30 % de la composición de los aminoácidos de una molécula de colágeno. La secuencia de aminoácidos del colágeno está formada principalmente por un gran número de tripletes que se repiten con la secuencia Glicina-X-Y, donde X y Y son frecuentemente prolina e hidroxiprolina.

Desnaturalización estructural

Al proceso por el cual es alterada la conformación nativa de una proteína se le denomina desnaturalización, y puede ser inducido por: pH, fuerza iónica, sales inorgánicas, disolventes orgánicos y variación en la temperatura (Tello-Solís, 1995). El proceso de desnaturalización puede estudiarse observando los cambios que ocurren en diferentes propiedades de la proteína, tales como características espectroscópicas (por ejemplo, disminución de la elipticidad por cambio de pH o aumento de temperatura), o actividad biológica.

En el estudio de la estabilidad estructural de las proteínas, los principales resultados obtenidos indican que la desnaturalización de polipéptidos globulares pequeños (masa molecular menor a 35 000 Da), es generalmente un proceso reversible de una sola etapa, que involucra dos estados termodinámicos estables, el estado nativo (N) y el estado desnaturalizado (D): $N \rightleftharpoons D$ (Tello-Solís, 1995; Tello-Solís y Hernández-Arana, 1995; Tello-Solís y Romero-García, 2001).

En estos casos es posible caracterizar termodinámicamente el proceso de desnaturalización a través de la determinación de los cambios de entalpía, energía libre, entropía y capacidad calorífica.

El proceso de desnaturalización puede estudiarse en condiciones de equilibrio, bajo las cuales la transición es reversible; la información que se obtiene a partir de estos estudios se utiliza también, para interpretar el proceso de adquisición de la estructura nativa.

Para proteínas de masa molecular mayor a 35 000 Da se ha observado que el proceso de desnaturalización térmica es más complejo, ya que se pueden detectar especies intermediarias estables. Además, dicho proceso incrementa su complejidad en el caso de proteínas fibrosas u oligoméricas.

Hoy en día, se ha determinado que enfermedades originadas por el sistema inmunológico, tales como, artritis reumatoide, esclerodermia, lupus eritomatoso sistémico, se conocen como enfermedades del colágeno o colagenosis. No se conoce cura para ellas porque es el propio sistema inmunológico del paciente el que las produce. Algunas hipótesis plantean que el sistema inmunológico afecta la estructura molecular del colágeno dando origen a la enfermedad, de ahí la importancia de la caracterización y estabilidad estructural de esta proteína.

En este trabajo se estudió el desplegamiento térmico del colágeno tipo I de tendón bovino, en solución ácida, a diferentes velocidades de calentamiento, por el monitoreo de la elipticidad, seguido por dicroísmo circular. Basados en los resultados experimentales, se propone la existencia de un intermediario estable durante el proceso de desplegamiento.

METODOLOGÍA

Colágeno de tendón bovino

Se utilizó colágeno de tendón bovino, la extracción se llevó a cabo según el método reportado por Gómez Lizárraga, 2010. Todos los demás reactivos utilizados, fueron de grado reactivo. Se usó rutinariamente agua destilada y desionizada.

Determinación de proteína

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Komsa-Penkova *et al.*, 1996).

Espectroscopía de dicroísmo circular (DC)

Los espectros de DC se obtuvieron en un espectropolarímetro JASCO J-715 equipado con un controlador de temperatura tipo Peltier PTC-348. Los espectros de la disolución de colágeno en ácido acético a un pH_{final} 3.5 (0.100 mg/mL), en la región del UV-lejano de 190-260 nm (zona de estructura secundaria), se realizaron en una celda 0.2 cm de trayectoria óptica.

El espectro de dicroísmo circular es reportado como elipticidad por residuo medio [$\theta_{m.w.r}$] en función de la longitud de onda. [$\theta_{m.w.r}$] fue calculada utilizando una masa molar de 91 g/mol por residuo (Ogawa *et al.*, 2003).

Desplegamiento térmico a diferentes velocidades de barrido

El desplegamiento térmico del colágeno bovino en ácido acético a un pH_{final} 3.5 (0.100 mg/mL), se siguió por el cambio en la elipticidad a 197 nm. El cambio de temperatura en la muestra (de 25 a 70 °C), fue controlado con el sistema Peltier, a velocidad de barrido constante. Se seleccionaron velocidades de calentamiento de 1 a 5 °C/min (con una precisión de ± 0.02 °C/min). La reversibilidad de la transición se estudió, también, por el cambio en la elipticidad a 197 nm, enfriando en cada caso la muestra, a la misma velocidad que se realizó el calentamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dicroísmo circular

En la figura 1, se presenta el espectro de DC del colágeno de tendón bovino, a pH_{final} 3.5 a 25 °C.

La región espectral estudiada (190 a 260 nm) corresponde a la zona en la que el espectro de DC de una proteína es un reflejo de su estructura secundaria. Las principales características espectrales observadas: una banda positiva centrada a 223 nm y una banda negativa más pronunciada a 197 nm, indican que la proteína presenta el patrón estructural típico de colágeno tipo I, es decir, colágeno triple hélice (Labastida-Pólito *et al.* 2009). El colágeno triple hélice es una estructura lineal compuesta de tres hélices polipeptídicas tipo poliprolina II orientadas a izquierdas, que están enrolladas una sobre la otra para formar una triple hélice a derechas (Frank *et al.*, 2003). Las estructuras primarias de las cadenas tipo poliprolina II se caracterizan por la unidad tripeptídica repetitiva Gly-X-Y. Donde X y Y puede ser cualquier residuo de aminoácido, aunque la formación de la triple hélice es favorecida por la presencia de residuos de prolina e hidroxiprolina en las posiciones X y/o Y (Feng *et al.*, 1997)

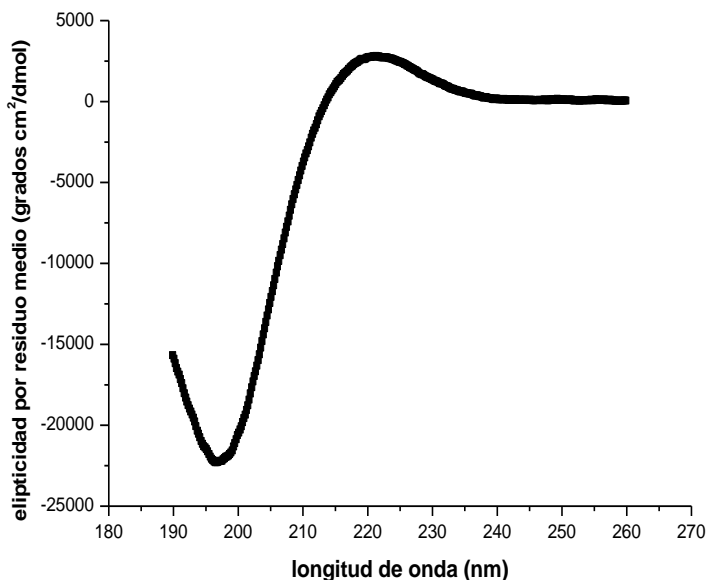


Figura 1. Espectro de dicroísmo circular a 25 °C de colágeno tipo I de tendón de bovino en ácido acético pH_{final} 3.5.

En la figura 2, se presentan los espectros de DC del colágeno tipo I de tendón bovino, a pH_{final} 3.5 a diferentes temperaturas, se puede observar que al incrementar la temperatura, hay cambios importantes en la elipticidad de las dos bandas espectrales principales, 223 y 197 nm, lo que implica que hay una pérdida de la estructura secundaria. La desnaturalización térmica es irreversible, ya que no se recuperó la estructura secundaria después de calentar a 80 °C y enfriar a 25 °C.

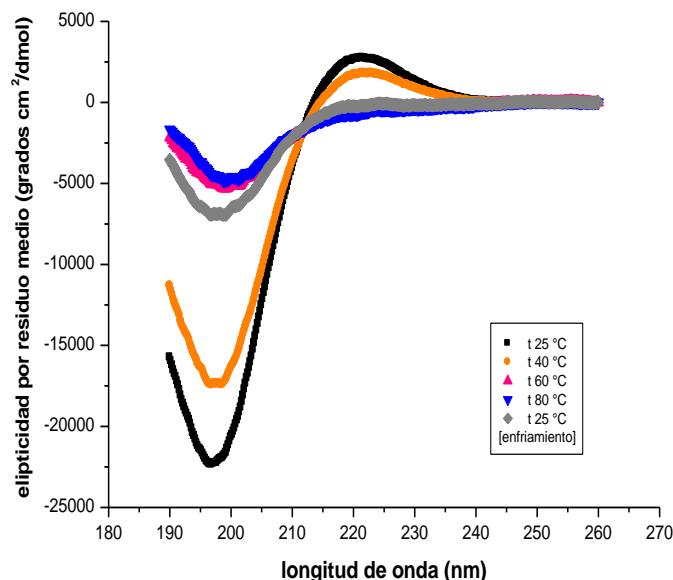


Figura 2. Espectros de dicroísmo circular, en función de la temperatura, de colágeno tipo I de tendón de bovino en ácido acético pH_{final} 3.5.

Desplegamiento térmico

Se estudió el despliegamiento térmico del colágeno tipo I de tendón bovino a un pH_{final} 3.5, seguido por el cambio en la elipticidad a 197 nm, a diferentes velocidades de barrido. En la figura 3, se muestran las curvas de despliegamiento térmico para velocidades de barrido en un intervalo de 1 a 5 °C/min, se puede observar con claridad una dependencia de las curvas de transición con respecto a la velocidad de barrido, lo que implica que el proceso se encuentra bajo control cinético. El proceso despliegamiento-replegamiento fue irreversible.

Las curvas de transición térmica, del colágeno tipo I de tendón bovino obtenidas a diferentes velocidades de calentamiento, y seguidas mediante el registro continuo de la elipticidad a 197 nm, se transformaron en fracciones de proteína desnaturalizada (f_D), mediante el uso de la ecuación (1) (ver figura 4):

$$(1) \quad f_N = \frac{\theta_T - \theta_N}{\theta_D - \theta_N}$$

Donde θ_T es la elipticidad de la muestra a la temperatura T y θ_N y θ_D son las elipticidades del estado nativo y del estado desnaturalizado, respectivamente. Con:

$$(2) \quad f_N + f_D = 1$$

Usando la ecuación (2) se calcula f_D , y se grafica en función de la temperatura para cada una de las velocidades de calentamiento (figura 4).

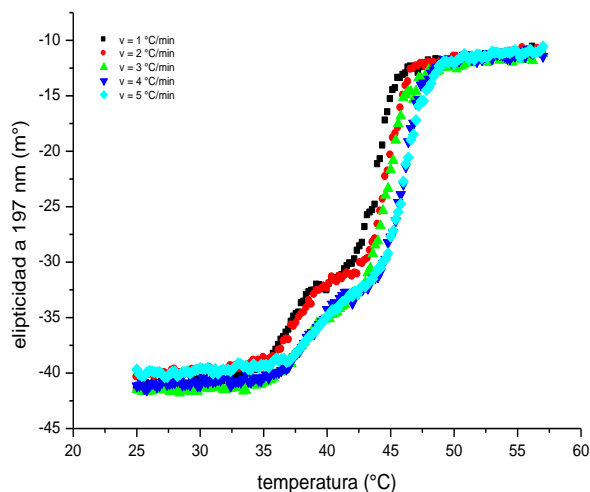


Figura 3. Curvas de desnaturalización térmica (datos crudos), colágeno tipo I de tendón bovino en función de la temperatura, a diferentes velocidades de calentamiento, seguidas por el monitoreo de la elipticidad a 197 nm.

En la figura 4, se puede observar una curva bifásica, en cada velocidad de calentamiento, por lo que, el desplegamiento térmico del colágeno tipo I de tendón bovino, ocurre mediante un mecanismo que consta de dos etapas, lo que implica la presencia de un intermediario en el proceso de desplegamiento. La primera etapa se presenta entre 35 y 45 °C y la segunda etapa entre 39 y 46 °C. La pérdida total de la estructura secundaria ocurre a 46 °C para una velocidad de calentamiento de 1 °C/min y 49 °C para 5 °C/min. Se observa una pequeña meseta en las curvas de transición, después de terminar la primera etapa, que implica la presencia de un intermediario estable. Entonces, el desplegamiento térmico del colágeno bovino tipo I, sigue un proceso en el que intervienen tres estados: un estado nativo (N), que en este caso es un trímero helicoidal, un estado intermediario estable (I) y el estado desnaturalizado irreversiblemente (D).

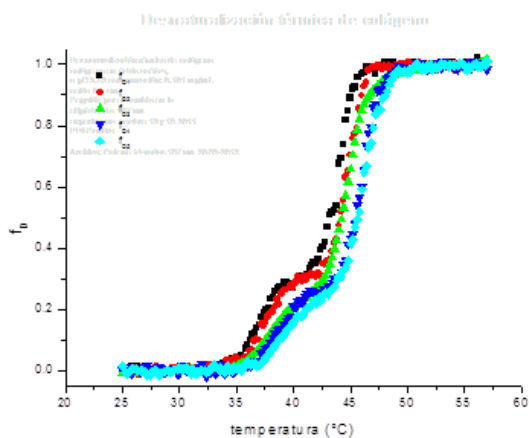
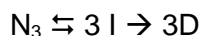


Figura 4. Curvas de fracción desnaturalizada, de colágeno tipo I de tendón de bovino en función de la temperatura a diferentes velocidades de calentamiento.

CONCLUSIONES

El desplegamiento térmico del colágeno tipo I de tendón bovino en ácido acético $\text{pH}_{\text{final}} 3.5$, de forma global cumple con un proceso irreversible y se encuentra bajo control cinético. Las curvas de desplegamiento térmico, a diferentes velocidades de calentamiento, presentaron una forma bifásica que implica la existencia de un intermediario estable durante la desnaturalización, por lo que se propone que el mecanismo del desplegamiento térmico del colágeno tipo I, sigue un proceso en el que intervienen tres estados, que podría ajustarse al modelo de Lumry-Eyring (Tello-Solís, 1995; Tello-Solís y Hernández-Arana, 1995):



donde N, es el estado nativo, que en este caso es un trímero; I, un estado intermediario reversible con el estado nativo, esto es, la formación de 3 monómeros que corresponde a cada una de las cadenas alfa y D, el estado desnaturalizado irreversiblemente. Los resultados obtenidos para el desplegamiento térmico de colágeno tipo I de tendón bovino, en solución ácida, presentan el mismo comportamiento, esto es, el mismo mecanismo observado para la desnaturalización térmica de la matriz sólida (estudiado por calorimetría diferencial de barrido) (Gómez Lizárraga, 2010).

REFERENCIAS

- Feng Y., Taulane J. P., Goodman M. (1997). Characterization of Triple Structures of Synthetic Collagen Analogs by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Macromolecules*, 30: 2947-2952.
- Frank S., Boudko S., Mizuno K., Schulthess T., Engel J., Bächinger H. P. (2003). Collagen Triple Helix Formation Can Be Nucleated at Either End. *J. Biol. Chem.*, 278: 7747-7750.
- Gómez Lizárraga K. K. (2010). Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino. Tesis de Maestría en Ciencia e Ingeniería de Materiales. UNAM, Instituto de Investigaciones en Materiales, México.
- Komsa-Penkova R., Spirova R., Bechev B. (1996). Modification of Lowry's Method for Collagen Concentration Measurement. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 32: 33-43.
- Labastida-Pólito A., Piña-Barba C., Romero-Valdovinos M. G., Tello-Solís, S. R. (2009). Physicochemical Properties of Collagen Sheet from Bovine Femur. *J. Applied Biomaterials & Biomechanics*, 7: 200-204.
- Mathews C. K. van Holde K. E., Ahern, K. G. (2002). Bioquímica. 3ª edición. Pearson Addison-Wiley. España.
- McKee T., McKee J. R. (2003). Biochemistry. The molecular basis of life. 3th edition McGraw-Hill Co., New York, USA.
- Nelson D. L., Cox M. M. (2005). Lehninger principles of Biochemistry. 4th edition. Freeman Co, New York, USA
- Ogawa M., Moody M. W., Portier T. J., Jon Bell J., Schexnayder M. A., Losso J. N. (2003). Biochemical Properties of Black Drum and Sheepshead Seabream Skin Collagen. *J. Agric. Food Chem*, 51: 8088-8092.
- Tello Solís S.R. (1995). Conformación y Estabilidad de Proteinasas Ácidas de: *Aspergillus*. Discriminación de la Irreversibilidad en la Desnaturalización Térmica de la Proteínasa Ácida de *Aspergillus saitoi*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México

Tello-Solís S. R., Hernández-Arana A. (1995). Effect of Irreversibility on the Thermodynamic Characterization of the Thermal Denaturation of *Aspergillus saitoi* Acid Proteinase. *Biochemical Journal*, 311: 969-974.

Tello-Solís S. R., Romero-García B. (2001). Thermal Denaturation of Porcine Pepsin: A Study by Circular Dichroism. *Int. J. of Biol. Macrom*, 28: 129-133.