

Estudios de la Ensamblaje y Desensamblaje de colágeno

Jochen Ammenn¹, Volker Bach¹, Nora Haufe², Doreen Naumberger², Michael Mertig^{2,3}
1BASF SE, Ludwigshafen, Germany, Phone: +49-621-6099786, Fax: +49-621-6099381, e-mail:
jochen.ammenn@basf.com

2Technische Universität Dresden, Physikalische Chemie, Dresden, Germany, Phone: +49-351-47940290, Fax:
+49-351-47949299, e-mail: michael.mertig@tu-dresden.de

3Kurt-Schwabe-Institut für Mess- und Sensortechnik Meinsberg e.V., Meinsberg, Germany

1 Introducción

El Colágeno del tipo I es el principal componente de la piel. Existen todavía cuestiones sin responder sobre el mecanismo de curtición, las cuales hacen necesario continuar investigando sobre este tema, además de comprender mejor la interacción entre colágeno y el agente curtiente que tiene lugar durante la curtición.

2. Materiales y métodos

Estudiamos el auto-ensamblaje *in vitro* del colágeno de piel vacuna partiendo de los monómeros hasta las fibrillas mediante espectroscopía de UV-VIS y microscopía de fuerza atómica (AFM). La fibrilación en una solución de monómero en condiciones ácidas se inicia al aumentar la temperatura a 30

°C y manteniendo el pH a condiciones neutras [1].

La figura 1 muestra la formación esquemática de fibrillas a partir de monómeros vía microfibrillas. En la figura 2 se muestra el proceso de ensamblaje a partir del espectro cinético obtenido mediante espectroscopia UV-VIS. En espectroscopia, se usa el efecto del tamaño medible a longitudes de onda entre 200 nm y 400 nm. A 340 nm los monómeros no dispersan la luz, mientras que las fibrillas sí lo hacen. La pendiente desplazada demuestra que hay un estado de transición entre monómeros y fibrillas.

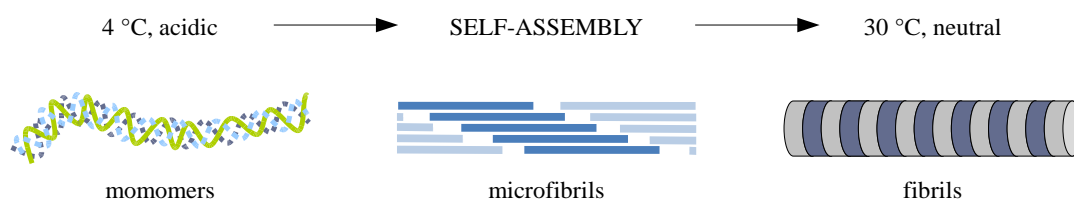


Figura 1. Representación esquemática del ensamblaje del colágeno.

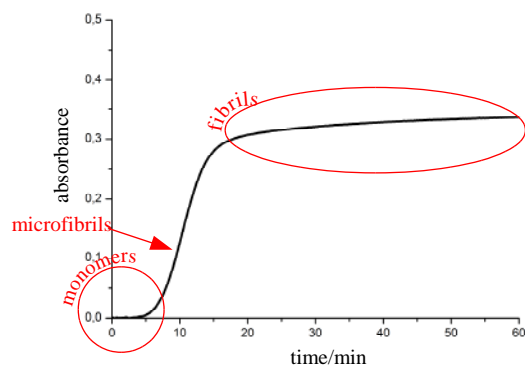


Figura 2. Dependencia del tiempo del ensamblaje del colágeno desde los monómeros hasta las fibrillas.

Las medidas espectroscópicas de turbidez permiten sacar conclusiones de la interacción entre el agente curtiente y el colágeno a

Los resultados obtenidos se analizan por medio de un modelo simple, asumiendo que las microfibrillas se comportan como un intermedio esencial. Se estudian los cambios de morfología de las fibrillas a través de AFM como información complementaria del proceso.

Además, hemos desarrollado un método adicional para estudiar el desensamblaje de fibrillas, en el cual los monómeros se separan de las fibrillas a valores de pH bajos. Los datos de turbidez obtenidos dependientes del tiempo, proporcionan información acerca de la astringencia de la unión del aditivo al colágeno [3].

3. Resultados y discusión

Los agentes curtientes afectan considerablemente al autoensamblaje y al

desensamblaje del colágeno. En procesos de curtición se usan polímeros basados en acrilatos. En particular, estudiamos la influencia del ácido poliacrílico y ácido polimetacrílico los cuales se diferencian solamente por un grupo metilo de la cadena lateral de su estructura y también en sus propiedades curtientes. El Polimetacrilato tiene un gran impacto en la cinética, mientras que el uso del poliacrilato conduce a cambios considerables en la morfología de las fibrillas ensambladas [2].

Las gráficas presentadas en la figura 3 muestran la cinética de ensamblaje llevadas a cabo con aditivos de hasta 2 μmol de ácido poliacrílico (izquierda) y ácido polimetacrílico (derecha). En negro, se muestra una curva estándar como referencia. En dichas figuras se pueden observar intervalos de tiempo más largos causados tanto por el poliacrilato como por el polimetacrilato. Las flechas en rojo muestran dicho efecto. Cuando se añade ácido polimetacrílico el efecto de extensión es mucho más fuerte.

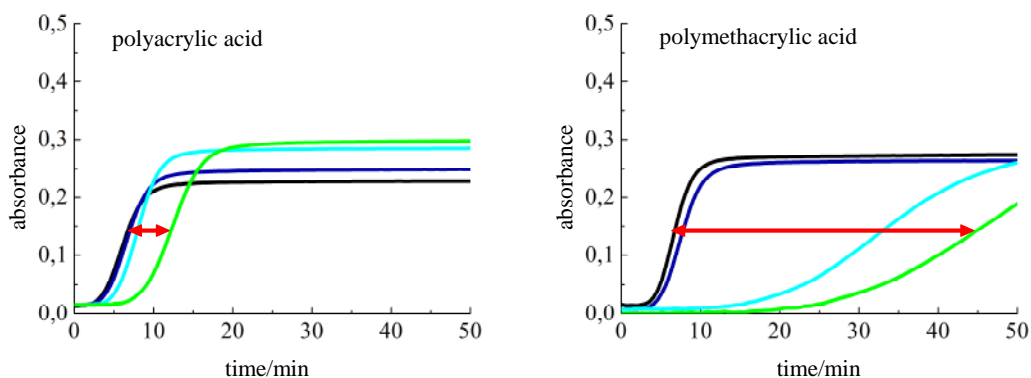


Figura 3. Espectro UV/Vis del ensamblaje del colágeno en presencia de: sin producto (negro), 0.1 μmol (azul marino), 1 μmol (azul claro) and 2 μmol (verde claro) ácido poliacrílico (izquierda) y ácido polimetacrílico (derecha).

Como un segundo resultado, presentamos en la figura 4 imágenes de AFM que muestran los resultados del ensamblaje. A diferencia de la fibrilla mostrada en la imagen de la izquierda que fue ensamblada en condiciones standard, se puede ver como el relieve acaba en la fibrilla formada en presencia de poliacrilato (imagen derecha) [3]. Al usar ácido

poliacrílico, se produce repulsión o ensamblaje defectuoso que da lugar a centros de dispersión adicionales lo que explica los mayores niveles de curvas planas en los espectros de UV/VIS.



Figura 4. Imágenes AFM de las fibrillas de colágeno ensambladas sin (izquierda) y con 1 μmol de ácido poliacrílico (derecha).

Los datos obtenidos en los experimentos de desensamblaje se presentan la figura 5. Al aumentar el tiempo de proceso, la concentración de colágeno aumenta debido a que hay más monómeros separados de la matriz de fibrilla al añadir el ácido clorhídrico 100 mM. Este incremento en la concentración de colágeno se mide en continuo por medio de la intensificación del pico a 200-220 nm causado por el enlace peptídico.

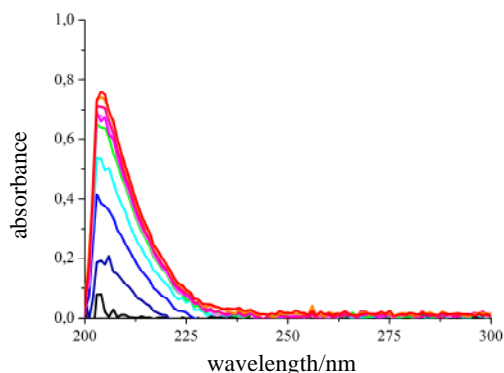


Figura 5. Incremento del pico de péptidos durante el desensamblaje del colágeno.

4. Conclusiones

La alternativa de estudiar ensamblaje y desensamblaje de colágeno con compuestos adicionales proporciona un mejor entendimiento en la interacción a nivel molecular del agente curtiente y matriz de colágeno y así ayuda a entender mejor el proceso de curtición. Para casos particulares, hemos discutido resultados obtenidos en este estudio combinado teórico-experimental.

5. Referencias

- [1] J.-H. Bradt, M. Mertig, B. Winzer, U. Thiele, W. Pompe: Collagen assembly from acid solution to networks on solid surfaces and to fibrils, Proc. SPIE, Vol. 2779, 78-82 (1996)
- [2] D. Naumburger, N. Haufe, S. Garnier, T. Taeger, V. Bach, M. Mertig: The influence of non-covalently binding polymers on the *in vitro* fibrillogenesis of collagen type I, submitted
- [3] N. Haufe, D. Naumburger, S. Garnier, V. Bach, M. Mertig: De-assembly of collagen type I, submitted

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado y apoyado científicamente por BASF SE.

