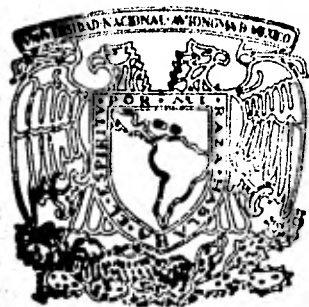


# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS



---

---

Aislamiento y Purificación de la Colágena  
del Musculo de Ascaris

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A:

Jesús Ayala Sanmartín

MEXICO, D. F.

1982



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	14
MATERIALES Y METODOS	16
1 DISECCION DE <u>ASCARIS</u>	16
2 CONCENTRACION DE COLAGENA	17
3 MICROSCOPIA DE TEJIDO MUSCULAR	17
4 METODOS DE EXTRACCION	18
5 ELECTROFORESIS	21
6 EXISTENCIA DE PUENTES DISULFURO	21
7 SUSCEPTIBILIDAD A COLAGENASA BACTERIANA	21
8 MEDIDAS DE VISCOSIDAD	21
9 CRISTALES SLS	22
RESULTADOS	23
1 MICROSCOPIA DE TEJIDO MUSCULAR	23
2 EXTRACCION Y AISLAMIENTO	25
3 COMPOSICION Y PESO MOLECULAR DE SUBUNIDADES	25
4 PUENTES DISULFURO	27
5 VISCOSIDAD INTRINSECA	27
6 TEMPERATURA DE DESNATURALIZACION	27
7 CRISTALES SLS	28
DISCUSION	30
REFERENCIAS	37

## INTRODUCCION

Una de las proteínas más importantes para los metazoarios es la colágena, ya que es el componente más abundante del tejido conectivo y les da forma y rigidez. Se encuentra desde la espongina, que funciona como un esqueleto en las esponjas, las cuales son consideradas como los metazoarios más primitivos, en donde parece tener además funciones de red de comunicación para la movilidad celular (Garrone and Rozenfeld, 1981), hasta los vertebrados, organismos relativamente recientes donde forma parte de cartilago, córnea, membranas basales, dientes y muchas otras estructuras (Gross, 1961; Trelstad, 1981).

Esta proteína es una molécula formada por tres subunidades denomi-

nadas alfa, compuestas de aproximadamente 1050 residuos de aminoácidos cada una y con un peso molecular aproximado de 100 000. Estas subunidades tienen en el espacio un giro hacia la izquierda en forma de tirabuzón abierto, y las tres se unen para formar un bastón triple helicoidal, en el que las subunidades alfa van girando una sobre otra hacia la derecha (figura 1). Este trímero tiene una longitud aproximada de 280 nm y un ancho de 1.5 nm, esta alta asimetría en la molécula hace que las soluciones en las que se encuentre sean muy viscosas, lo que da pie a que por medio de medidas de viscosidad se hagan estudios para caracterizar a la proteína. Además, esta estructura de hélice abierta es ideal para formar fibras que resistan tensiones (Riehl, 1980), ya que al tener la

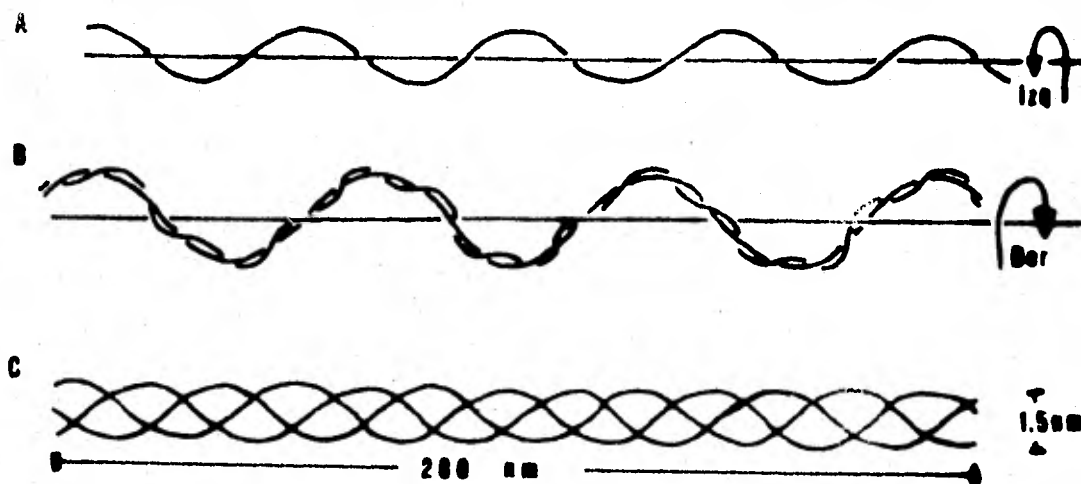


Figura 1. A) Cadena alfa con giro a la izquierda. B) Cadena alfa con su propio giro y mostrando su curvatura a la derecha cuando se encuentra formando el trímero. C) Molécula de colágeno. (Modificado de Gross, 1961).

hélice ten abierta, la molécula no sufre estiramientos considerables, a diferencia de la queratina, cuya conformación de hélice alfa, estabilizada por puentes de hidrógeno, puede sufrir estiramientos notables, esto último da propiedades diferentes a las fibras de queratina menos resistentes a tensiones pero más elásticas.

Como en todas las proteínas, la estructura tridimensional es la responsable de las características funcionales, pero a su vez, esta estructura está determinada por la secuencia de los aminoácidos que la componen, es decir por su estructura primaria, que en el caso de la colágena es la repetición del tripeptido Gly-X-Y, en el que Gly es el residuo del aminoácido glicina que juega un papel muy importante en la adquisición de la estructura triple helicoidal. X y Y son cualquier otro residuo de aminoácido, existiendo en la posición X gran cantidad del residuo de prolina y en la posición Y de hidroxiprolina. Ambos aminoácidos parecen tener un papel fundamental en la estabilización de la molécula. Existen modelos que proponen que estos aminoácidos le dan estabilidad térmica a la molécula; Al aumentar la temperatura a un determinado valor llamado temperatura de desnaturalización, la colágena pierde su conformación nativa, y parece haber una relación entre la cantidad de prolina e hidroxiprolina y la temperatura de desnaturalización (Josse and Harrington, 1964). Cabe decir que la hidroxiprolina es un aminoácido casi exclusivo de la colágena, particularidad útil cuando se trata de medir concentración de colágena mediante la cuantificación de este aminoácido. Otro aminoácido hidroxilado es la hidroxilisina a la que se le unen azúcares y la que junto con la lisina interviene en las uniones covalentes intra e intermoleculares.

Como ya se mencio  
 n6, la importancia fun  
 cional de la colágena  
 radica en que las molé  
 culas a modo de bastón,  
 pueden asociarse para  
 formar superestructuras  
 fibrilares que forman  
 parte del tejido conec  
 tivo. Estas fibras se  
 forman por la asociación  
 de moléculas que se so  
 brelapan con un despla  
 zamiento de  $1/4.4$  de la  
 longitud de la molécu  
 la, lo que provoca que

las fibras aparezcan  
 con un espaciamento de  
 67 nm que es aproxima  
 damente  $1/4.4$  de los  
 280 nm que mide la mo  
 lécula y que se ha lla

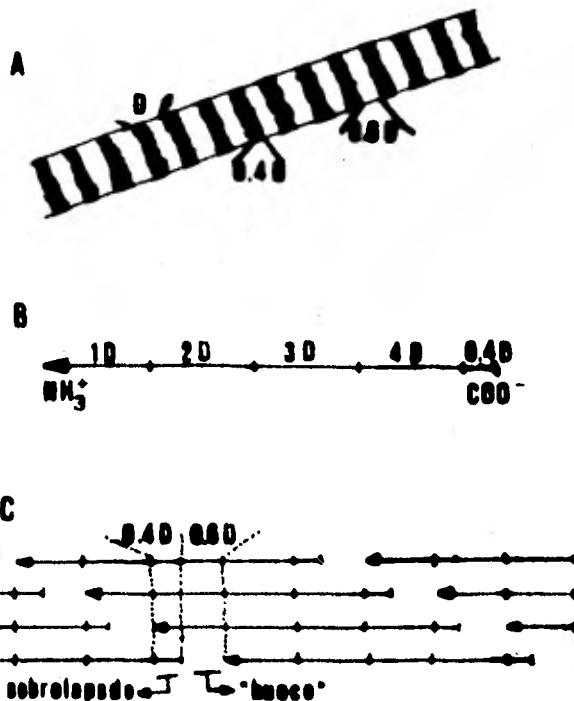


Figura 2. A) Fibra de colágena como se ve  
 ría en el microscopio electrónico mostran  
 do la periodicidad D. B) Representación de  
 la molécula de colágena que se usa en C)  
 para mostrar el arreglo de las moléculas  
 en la formación de fibras. La zona "hueca"  
 corresponde a  $0.6 D$  y la de sobrelapamien  
 to a  $0.4 D$ . Este arreglo provoca que se ve  
 an estriaciones en las fibras. (Modificado  
 de Trelstad, 1981).

mado periodicidad D. Cada periodo D está formado por una zona "hueca"  
 ( $0.6 D$ ), en la cual se encuentran "agujeros" que corresponden a la dis  
 tancia entre dos moléculas, y zonas de sobrelapamiento ( $0.4 D$ ), en las  
 cuales encontramos siempre sobrelapamiento (Gross, 1974; Trelstad, 1981).

Uno de los tipos celulares más típicos que sintetizan colágena son los fibroblastos, que fueron las primeras células utilizadas para estudiar la síntesis de esta proteína, aunque también es sintetizada por otros tipos como células epiteliales, odontoblastos, condroblastos, etc. (Gross, 1974; Prockop et al, 1979). La colágena se empieza a sintetizar en los ribosomas en el retículo endoplasmático, ahí se forma la cadena polipeptídica. En un principio se sintetizan subunidades mayores que las que encontramos en las fibras, esto se debe a que tienen más aminoácidos en ambos lados (figura 3), el lado amino terminal tiene una prolongación con un peso molecular de 20 000 y el lado carboxilo terminal uno de 30 a 35 mil dependiendo de que subunidad sea; a estas prolongaciones de los extremos se les llaman propéptidos; entre otras características, estos propéptidos tienen cisteína y por lo mismo la capacidad de formar puentes disulfuro. A la cadena alfa junto con esos propéptidos se le llama cadena proalfa, y tres cadenas proalfa unidas forman la procolágena. Cada cadena proalfa es modificada postraduccionalmente de la siguiente manera: muchos de los residuos de prolina en la posición Y son hidroxilados por una enzima llamada prolil-4-hidroxilasa, que requiere como cofactores para su funcionamiento de ión ferroso, oxígeno, alfa-cetoglutarato y ácido ascórbico. Otra enzima, la lisil-hidroxilasa, requiere de los mismos cofactores, pero hidroxila a los residuos de lisina en la posición Y. Además de estas modificaciones, hay una adición de azúcares a los residuos de hidroxilisina, catalizada por dos enzimas, la galactosil transferasa que agrega galactosa, y la glucosil transferasa que une glucosa. Ambas transferasa requieren de un catión divalente para su funcionamiento. Estas enzimas, como las hidroxilasa, necesitan que las ca-



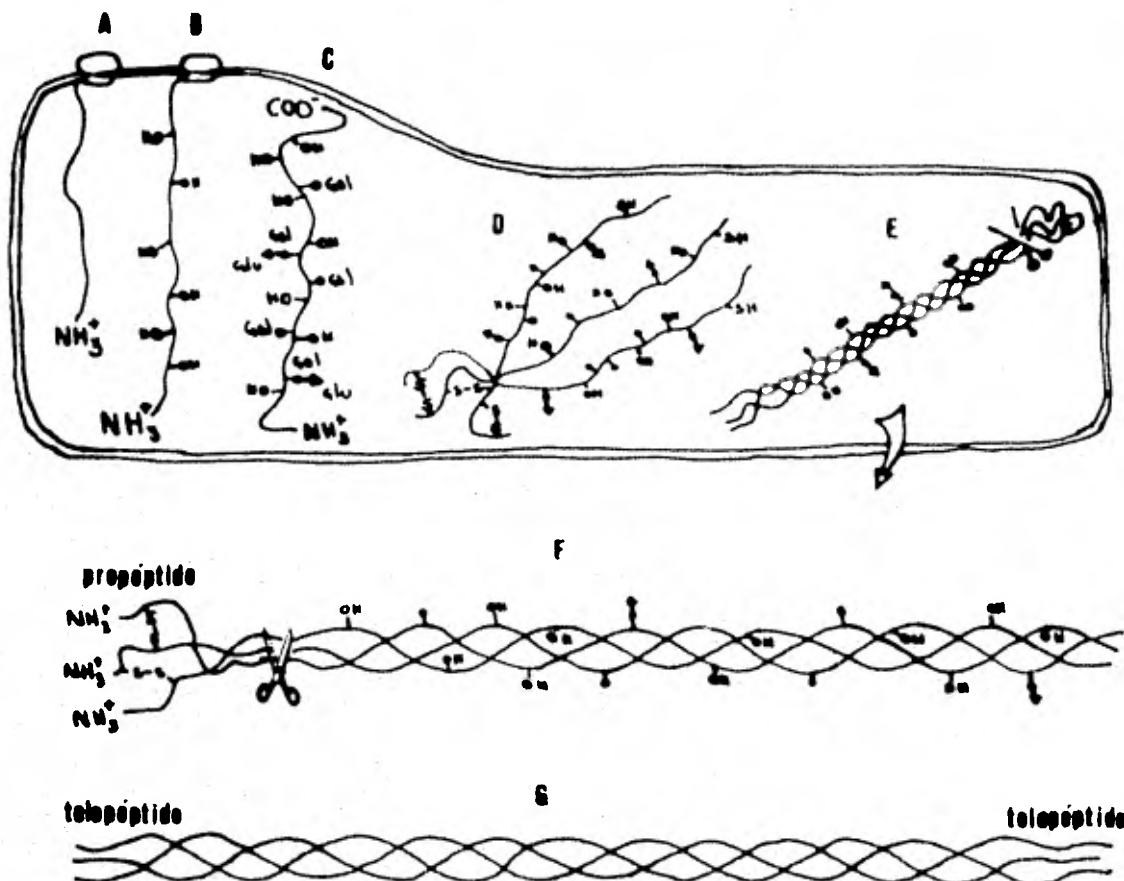


Figura 3. Síntesis de colágena. Se observa que en el retículo endoplasmático se efectúa la A) síntesis de las cadenas proalfa, B) hidroxilación de los residuos de lisina y de prolina para formar hidroxilisina e hidroxiprolina, C) adición de azúcares (galactosa y glucosa) a los residuos de hidroxilisina. D) Unión de los propéptidos para formar la triple hélice de procología en E), a la cual se le corta el extremo carboxilo terminal, es secretada, y se le corta el extremo del amino terminal F) para dar origen a la molécula de colágena G) que posteriormente se unirá con otras moléculas para formar superestructuras fibrilares. (Modificado de Prockop et al, 1979).

denas proalfa no estén en la forma triple helicoidal, para poder llevar a cabo las reacciones. Es probable que los procesos que se mencionan o-

curran en las cisternas del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi (figura 3).

Existe la formación de puentes disulfuro tanto intra como intercatenarios pero sólo a nivel de los propeptidos, pues como ya se mencionó, es la única región donde hay cisteína. Ya que se formaron estos, la molécula adquiere su conformación triple helicoidal, se le corta el propeptido del extremo carboxilo terminal por medio de una enzima, y entonces es secretada vía gránulos de secreción que parten del aparato de Golgi. Aparentemente la molécula sale en forma de agregados (Cho and Garant, 1981; Trelstad, 1981) y posteriormente se le corta el propeptido del extremo amino terminal por medio de una enzima, que requiere de metales divalentes como el calcio. Posteriormente, ocurren uniones covalentes entre las moléculas que están formando las fibras y entre las cadenas de la misma molécula. La formación de estas uniones procede de la siguiente manera: primeramente la lisil oxidasa modifica algunos residuos de lisina e hidroxilisina formando aldehidos, los cuales reaccionan espontáneamente con el grupo amino de lisina o hidroxilisina de cadenas vecinas para formar bases de Schiff.

Cuando las fibras no tienen demasiadas uniones, las moléculas se pueden solubilizar si cambiamos el pH hacia la zona ácida y así obtenemos colágena soluble, que puede volver a formar fibras in vitro si regresamos a pH neutro y a 37°C. Gross y sus colaboradores encontraron que podían hacer otros dos tipos de asociaciones de moléculas de colágena in vitro a las que llamaron SLS (Segment Long Spacing) y FLS (Fibrous Long Spacing). Los SLS son cristalitas con un bandeo característico, asimétrico y de aproximadamente 280 nm de largo, lo que hace pensar que en es

tas estructuras las moléculas de colágena están juntas como líneas paralelas y orientadas en la misma dirección sus extremos amino y carboxilo terminales (figura 4). Las bandas de estos cristales son un reflejo de las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas, por lo que una comparación entre

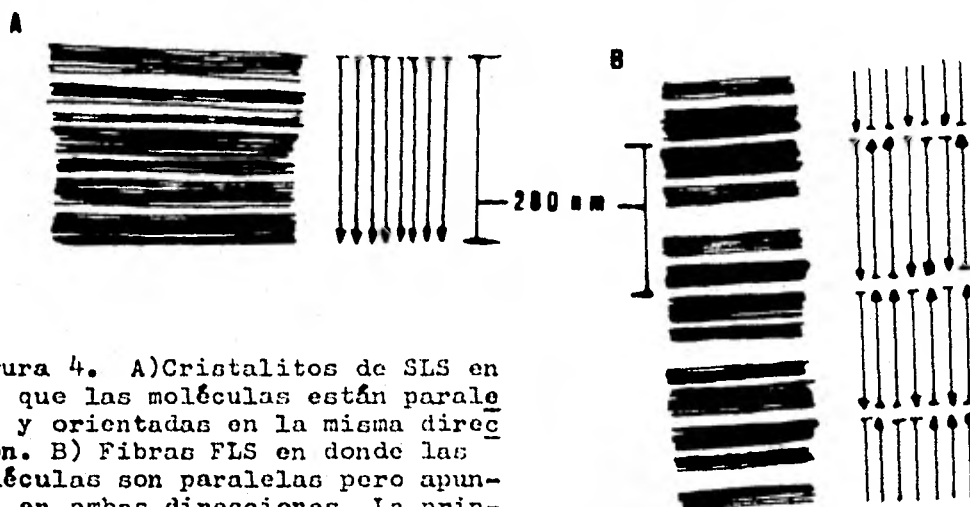


Figura 4. A) Cristales de SLS en los que las moléculas están paralelas y orientadas en la misma dirección. B) Fibras FLS en donde las moléculas son paralelas pero apuntan en ambas direcciones. La principal diferencia entre estas estructuras, radica en la orientación de las moléculas, que en los SLS provoca un bandeo asimétrico y en los FLS uno centrosimétrico (Modificado de Gross, 1961).

cristales nos da una idea gruesa de su similitud en el patrón de aminoácidos (Bruns and Gross, 1973), estos cristales pueden hacerse agregando ATP a una solución de colágena en ácido acético. Los FLS son estructuras con un patrón de bandas centrosimétrico repetido cada 280 nm, lo que hace proponer que las moléculas se unen a modo de líneas paralelas pero no orientadas en la misma dirección, lo que da la simetría del bandeo (figura 4), y bloques de estos se unen para formar la fibra. Este tipo de a

gregados se forman cuando adicionamos una molécula grande y cargada negativamente, como la glicoproteína alfa-1 derivada del suero sanguíneo, a una solución de colágena en ácido acético.

Todas las proteínas de la familia de la colágena (Solomon, 1980), se apegan al patrón descrito. En esta familia de proteínas hay diferentes genes que codifican para diferentes tipos de colágena, tanto a nivel de especies como a nivel de tejidos en un individuo, y se han dado ciertos criterios para poder decir si una proteína es colagénica o no. Algunos de estos criterios son: el característico ángulo de difracción de ra yo s X dado por su estructura triple helicoidal, la repetición del tripéptido Gly-X-Y, así como también el alto contenido en prolina e hidroxiprolina.

Las colágenas que más se han estudiado son las de los vertebrados, y en particular cinco tipos específicos (Eyre, 1980): La de tipo I, que se encuentra en hueso, tendón, piel, dentina, etc., que posee dos cadenas alfa iguales y una diferente; la de tipo II de cartilago hialino, con tres cadenas alfa iguales y gran cantidad de hidroxilisina; la de tipo III en piel, arterias y útero que como peculiaridad posee cisteína. Estas colágenas se apegan muy bien al modelo descrito, mientras que las de las membranas basales (tipo IV), y la del exocitosqueleto (tipo V), además de estar poco estudiadas, parecen poseer otras peculiaridades.

En los otros grupos de metazoarios, es decir los invertebrados, también se han encontrado proteínas del tipo de la colágena (Adams, 1978), triples hélices con aproximadamente el 33% de glicina y las otras características como el tener hidroxiprolina y pesos moleculares de alrededor de 300 000. Se han estudiado en esponjas, celenterados, platelmintos, mo

lucos, artrópodos y otros. Claro está que se observan diferencias importantes en cada Phylum debidas a la separación filogenética que se ha efectuado a través de la evolución, por ejemplo: Las de moluscos como el pulpo, calamar, abulón y ostra, y crustaceos como el cangrejo azul y la langosta, tienen en promedio tres veces más hidroxilisina que las de vertebrados, pero menos lisina (Kimura et al, 1969) y la de pulpo y calamar una temperatura de desnaturalización baja, de 27.4 y 27.2°C respectivamente, en relación a otros invertebrados marinos. La temperatura de desnaturalización de una ascidia (Halocynthia roretzi), es de 22°C, realmente muy baja, y tiene una viscosidad intrínseca de 9 dl/g, en contraste con los valores de 11 a 16 de la mayoría de las colágenas (Kimura et al, 1972). La del músculo del nemátodo Ascaris contiene cisteína (Fujimoto, 1968), al igual que la de la membrana basal de sus intestinos (Hung et al 1980), que además parece formar unidades estructurales constituidas por dos triples hélices unidas por puentes disulfuro y otros péptidos (Hung et al, 1981). La de mesenterio de cucaracha (Periplaneta americana) con temperatura de desnaturalización de 38.5°C (François et al, 1980). La de Cisticercus cellulosa que corresponde a un estado de vida de la tenia, que no contiene hidroxiprolina (Torre Blanco and Toledo, 1981). La de una anémona (Actinia equina) y la de Fasciola hepática, parásito del hígado, tienen un porcentaje en peso de hexosas más alto que en los vertebrados (14.1 y 12.8 % respectivamente) (Nordwig and Hayduk, 1969).

Cuando se empezaron a extender los estudios sobre colágenas de invertebrados, los investigadores se dieron cuenta que las cutículas que revisten el cuerpo de anélidos y de nemátodos, estaban constituidas en gran parte por colágena y empezaron a aislarla y caracterizarla, y se en

contraron que eran triple helicoidales pero con diferencias notables que a continuación se mencionan (Adams, 1978; Tanzer, 1978).

La colágena cuticular de los anélidos tiene un peso molecular de aproximadamente 1 400 000 a 1 700 000 dependiendo de la especie, en contraste con los 300 000 de las colágenas comunes. Parece estar formada por dos tipos de subunidades de 470 000 de peso molecular (Kimura and Tanzer, 1977), no tiene hidroxilisina, muy poca lisina, apenas 1.9 residuos por mil, y su relación hidroxiprolina/prolina es de 7.6 a 20, dependiendo de la especie (Kimura, 1971; Kimura, and Tanzer, 1977), que es muy alta si la comparamos con la relación en los vertebrados que es de aproximadamente 0.7 a 1.7 y a otras de invertebrados que se encuentran entre 0.6 y 2. Tiene un 33 % de glicina y no contiene cisteína. Tiene una viscosidad intrínseca muy alta, de 62 a 70 dl/g, y para algunas especies de 109 dl/g, como es de esperar de una molécula tan larga, ya que se estima que tiene una longitud de 950 nm y un ancho de 1.6 nm. Además se ha detectado un disacárido muy especial, el glucuronosil manitol, unido a residuos de treonina (Spiro and Bhoyroo, 1980).

La colágena cuticular de los nemátodos posee peculiaridades muy diferentes a la de los anélidos; Tiene un peso molecular aproximado de 52 000 (Evans et al, 1976) y cuando se desnaturaliza no se observa cambio en el peso molecular, lo que hace pensar que la triple hélice está formada por una sola cadena que se enrolla sobre sí misma, parece haber más de un tipo de cadenas (Evans et al, 1976; Ouazana and Herbage, 1981). El análisis de aminoácidos revela que en lugar de el 33 % de glicina, ésta se encuentra sólo en un 27 %, lo que daría como el 20 % de regiones no formadoras de triple hélice, que serían necesarias para el doblez de

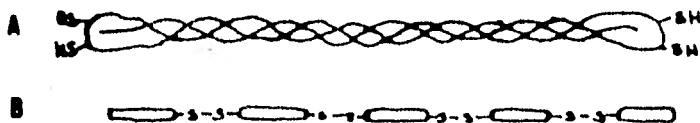


Figura 5. A) Molécula de colágena cuticular de Ascaris. Se observa que es una triple hélice formada por una sola cadena enrollada sobre sí misma, para tal efecto existen regiones que no contienen glicina para formar las zonas extremas que se doblan. B) Esquema de la formación de agregados en la cutícula de Ascaris. Las moléculas se unen por medio de enlaces disulfuro.

la cadena al auto enrollarse (figura 5). Otra característica es que esta colágena tiene cisteína, la cual parece contribuir a la formación de agregados moleculares.

Tiene mucha prolina, al rededor de 200 residuos por mil (Evans et al, 1976; Fujimoto and Adams, 1964), y muy poca hidroxiprolina, entre 10 y 12 residuos por mil, por lo que su relación hidroxiprolina/prolina es bajísima (0.05) y aparenta poseer una unión intracadena que produce un aminoácido muy especial: la isotritirosina (Fujimoto et al, 1981).

Antes de pasar adelante, es necesario familiarizarse con el organismo con el que trabajamos (Barnes, 1977; Cockrum y McCauley, 1967). Es un nemátodo llamado comunmente lombriz intestinal, que parasita al cerdo y al hombre. Sus sexos se diferencian por que la hembra es más grande y el macho tiene el extremo posterior recurvado. En sus caracteres externos, encontramos cuatro líneas longitudinales, una ventral, una dorsal y dos laterales. La boca se abre en el extremo anterior con tres labios redondeados, y el ano se abre cerca del extremo posterior del cuerpo en la parte ventral. La pared del cuerpo está formada del exterior hacia el interior por: Una cutícula de colágena y algunas otras proteínas; una epidermis que es una capa celular en forma de sincitio; y una capa final de

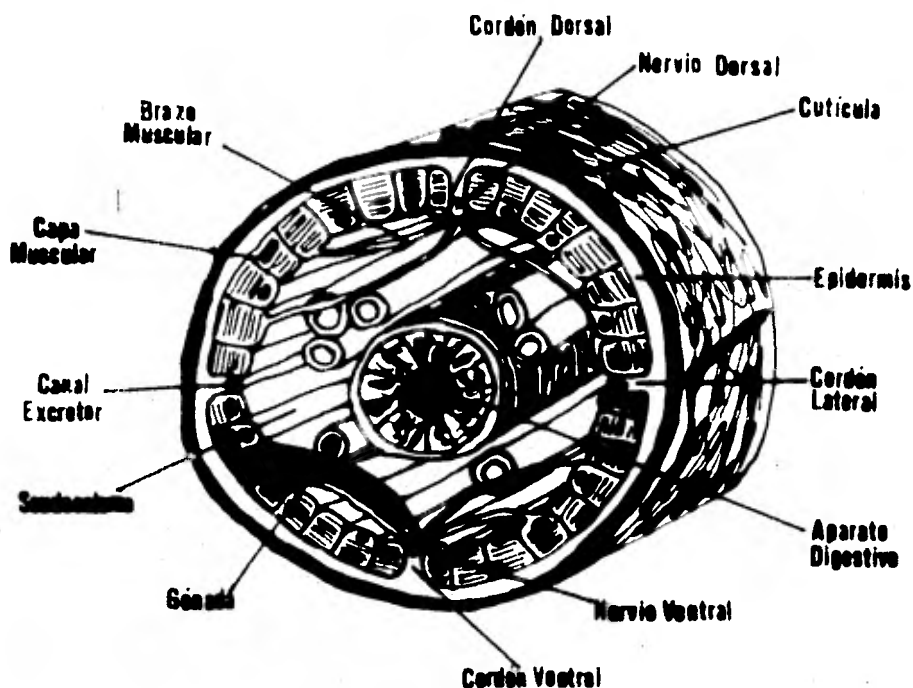


Figura 6. Corte transversal de nemátodo (Modificado de Barnes, 1977).

músculos longitudinales estriados oblicuamente y dispuestos en bandas, en las cuales la base de la célula que contiene la fibra contráctil, está situada junto a la hipodermis, y el lado de la célula con el núcleo está dirigido hacia el pseudoceloma, en el que se encuentran los órganos internos que pertenecen básicamente a los aparatos digestivo y genital (figura 6).



### OBJETIVOS

Al empezar a encontrar tantas novedades en las colágenas cuticulares, las investigaciones se centraron en éstas, y se ignoró un poco a las colágenas de los tejidos internos de estos organismos, de las cuales se han hecho relativamente pocos trabajos.

El objetivo de este trabajo es aislar y caracterizar a la colágena de la capa muscular de Ascaris, es decir realizar varios estudios que nos den información sobre la molécula. Para tal efecto, es necesario obtener la proteína con alto grado de pureza, y posteriormente estudiar por métodos electroforéticos su peso molecular y su composición en subunidades, por viscosimetría su temperatura de desnaturalización y viscosi

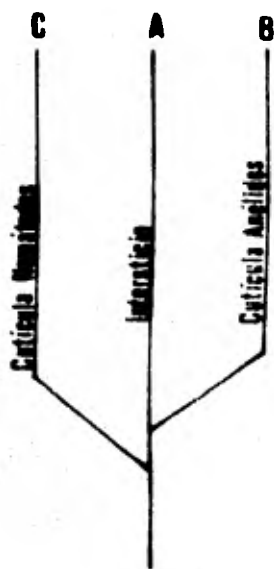


Figura 7. Ramas filogenéticas de la colágena. A) Rama evolutiva de las colágenas intersticiales de todos los metazoarios. B) y C) Separaciones de las colágenas cuticulares de anélidos y nemátodos.

dad intrínseca, y por microscopía electrónica el tamaño de la molécula y su arreglo en la capa muscular del organismo.

Sabemos que las colágenas intersticiales de todos los organismos hasta ahora estudiados son, a pesar de sus diferencias dadas por modificaciones individuales, muy semejantes entre sí y que han seguido una línea a través de la evolución, mientras que las colágenas cuticulares de los anélidos por un lado, y de los nemátodos por otro, parecen ser unas especializaciones muy diferentes que forman dos líneas separadas, quizás sin relación estrecha (figura 7).

Por estas razones, propusimos la hipótesis de que la colágena del músculo de Ascaris, pertenece a la línea evolutiva de las colágenas intersticiales, y no a la de su cutícula.

## MATERIALES Y METODOS

### 1 DISECCION DE ASCARIS

Los Ascaris se colectaron de cerdos infestados, en el rastro municipal de Xochimilco. Se congelaron a  $-17^{\circ}\text{C}$  y se descongelaron conforme se iban requiriendo para la disección. Esta última consiste en lo siguiente: ya descongelado el animal, se cortan los extremos anterior y posterior, pues tanto la faringe como el ano tienen un recubrimiento de cutícula, y de este modo eliminamos una posibilidad de contaminación con colágena cuticular. Después se hace un corte longitudinal a través del verme y se extraen los órganos internos, los aparatos digestivo y genital. Al final se separan de la cutícula las capas de la pared del cuerpo, la epidermis y en su mayor parte tejido muscular.

## 2 CONCENTRACION DE COLAGENA

Para medir la concentración de colágena se utilizó el método de Woessner para hidroxiprolina (Woessner, 1961). Este es un método colorimétrico que sirve para medir la cantidad de este aminoácido, que como ya se dijo es casi exclusivo de la colágena, así que al medirlo, sabremos la cantidad de proteína. Como el método mide hidroxiprolina libre, primero hay que hidrolizar la proteína poniendo la solución o tejido problema a una concentración 6 N de HCl en una ampolleta cerrada. Se incubaba a 110°C durante 20 a 24 horas, después se abre y se seca. Ya que se secó, se redisuelve el contenido con agua destilada para tener así una solución de aminoácidos.

El método de Woessner consiste en oxidar la hidroxiprolina con cloramina T, para dar como producto el ácido pirrol,2-carboxílico. Después se forma un compuesto colorido al agregar p-dimetil, amino, benzaldehído, y se mide la intensidad del color en un espectrofotómetro, que es proporcional a la concentración.

## 3 MICROSCOPIA DE TEJIDO MUSCULAR

Se cortaron pedazos de aproximadamente 1 mm de lado de la pared del cuerpo de un ejemplar de Ascaris vivo y se fijaron en glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de cacodilatos 0.15 M pH 7.2. Se postfijaron con tetraóxido de ósmio en el mismo amortiguador. Se deshidrataron en alcoholes graduales y se incluyeron en EPON. Se hicieron cortes semifinos con un ultramicrotomo MT1 Sorvall, y se observaron en un microscopio óptico para escoger una zona adecuada. Se hizo una pirámide muy pequeña en cuya cúspide se encontraba la zona elegida de la que se obtuvieron cortes fi-

nos. Los cortes se recogieron en un portaespecímenes provisto de una película de Formvar como soporte. Finalmente se contrastaron con acetato de uranilo al 3 % y citrato de plomo al 0.3 % y fueron observados en un microscopio electrónico Carl Zeiss EM 9 o EM 10.

#### 4 METODOS DE EXTRACCION

Se utilizaron cuatro métodos de extracción de colágena, que a continuación se describen.

A) El primer método que se utilizó (figura 3.A) fue el siguiente: Se cortó en pedazos la capa muscular y se suspendió en una solución de ácido acético 0.5 M a 4°C y agitando durante toda la noche. Esa suspensión se centrifugó a 12 000 rpm 20 minutos, el sobrenadante se guardó y el precipitado se resuspendió en ácido acético 0.5 M y se le agregó pepsina a una concentración de 0.01 g de pepsina por gramo de músculo utilizado, y se dejó agitando durante la noche en el cuarto frío (4°C) y se centrifugó para obtener el sobrenadante. Ambos sobrenadantes, tratado y no tratado con pepsina, se dializaron contra una solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.01 M y pH de 9, y se centrifugaron para obtener la colágena precipitada, la cual se redisolvió en ácido acético 0.5 M. A esta solución se le agregó NaCl hasta tener una solución de la sal al 5 % y se dejó precipitar la colágena. Este precipitado se empacó por centrifugación y se redisolvió y dializó contra un amortiguador de fosfatos de potasio pH 7.6 y fuerza iónica de 0.4. Se centrifugó y disolvió el precipitado en ácido acético 0.5 M para posterior análisis del contenido de colágena, y el sobrenadante se trató con cloruro de sodio hasta una concentración del 20 % y se centrifugó. Este último sobrenadante se guardó y el precipitado se redisolvió

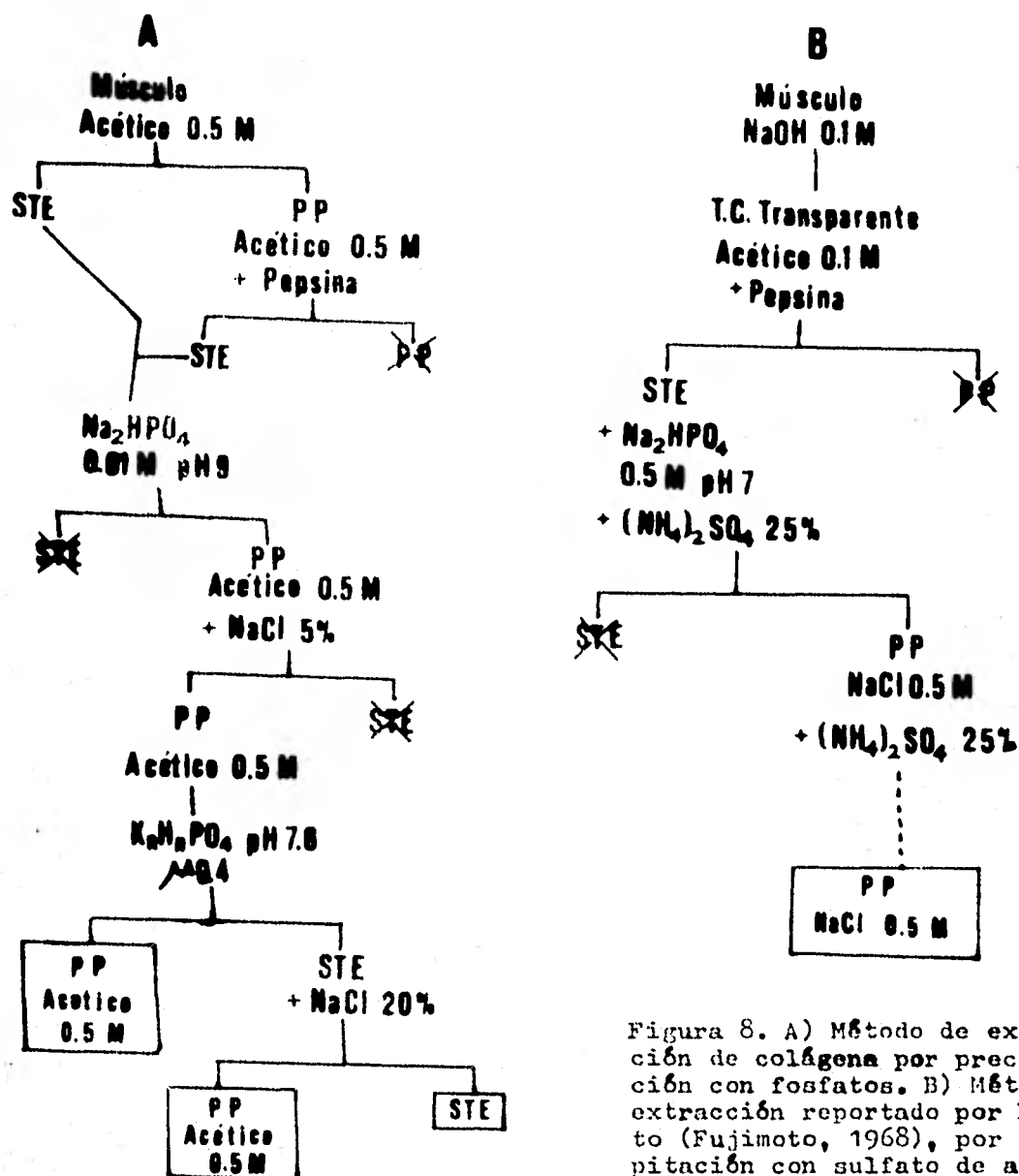


Figura 8. A) Método de extracción de colágena por precipitación con fosfatos. B) Método de extracción reportado por Fujimoto (Fujimoto, 1968), por precipitación con sulfato de amonio.

en ácido acético. A ambos se les midió el contenido en colágena.

B) El segundo método de extracción que se utilizó fue el reportado por Fujimoto (Fujimoto, 1968) (figura 8.B), que consiste en lo siguiente:

La capa muscular se cortó en pedazos pequeños que se resuspendieron en NaOH 0.1 M a 4°C, 25 cm<sup>3</sup> por gramo de músculo y se mantuvo agitando por 30 minutos. Se decantó el líquido y se repitió el procedimiento varias veces hasta que se obtuvo un tejido transparente que se lavó con agua destilada. El tejido así obtenido se suspendió en ácido acético 0.1 M y se incubó con pepsina a una concentración de 1 mg cm<sup>-3</sup>, a 4°C por 16 horas. Se centrifugó y el sobrenadante se mezcló con 12 cm<sup>3</sup> de una solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 M, ajustando el pH a 7 con NaOH. A dicha solución se agregó lentamente (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturado hasta llevar la solución a un 25 % de saturación. El precipitado se colectó por centrifugación y se disolvió en NaCl 0.5 M, agitando y a 4°C por 16 horas, después la solución se centrifugó para quitar el material insoluble y se volvió a precipitar con sulfato de amonio otras tres veces como se describió.

C) El tercer método usado fue básicamente el de Fujimoto pero con las modificaciones siguientes: El músculo se trató directamente en una solución de NaCl 0.5 M y 2-mercaptoetanol 0.02 M, sin lavarlo con NaOH y sin tratarlo con pepsina, además de que cada vez que se redisolvió en la solución de NaCl 0.5 M, esta solución contenía 2-mercaptoetanol a una concentración 0.02 M.

D) En el cuarto método que también es básicamente el de Fujimoto, se lavó el músculo con NaOH 0.1 M hasta obtener el tejido transparente y se siguió el procedimiento como en "C".

En todos los métodos se centrifugaron las soluciones que se obtienen al redissolver el precipitado, con el fin de limpiarlas del material no soluble. Las cantidades de colágena se median por el método de Woessner para hidroxiprolina, y en general los procedimientos se hacían a 4°C.

## 5 ELECTROFORESIS

Con el objeto de ver el grado de pureza, la composición de subunidades y el peso molecular de la colágena, se hicieron dos sistemas de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS: El sistema de Laemmli (Laemmli, 1970) que es con SDS y acrilamida al 7 %, y el de Hayashi y Nagai (Hayashi and Nagai, 1979) con acrilamida al 5 %, SDS y urea.

## 6 EXISTENCIA DE PUENTES DISULFURO

Para ver si existían puentes disulfuro, se corrieron electroforesis on presencia y ausencia de 2-mercaptoetanol.

## 7 SUSCEPTIBILIDAD A COLAGENASA BACTERIANA

Se incubó una muestra de colágena de Ascaris a una concentración de aproximadamente  $0.3 \text{ mg cm}^{-3}$  en un amortiguador de Tris 0.05 M, NaCl 0.15 M y  $\text{CaCl}_2$  0.005 M a pH 7.2 y a una concentración de colagenasa de  $0.1 \text{ mg cm}^{-3}$ , durante una hora a  $30^\circ\text{C}$ , después de la incubación se corrió la muestra en electroforesis con SDS.

## 8 MEDIDAS DE VISCOSIDAD

Las medidas de viscosidad son una relación entre el tiempo que tarda en pasar por un capilar un volumen determinado de solución de proteína, y el tiempo que tarda en pasar la misma solución pero sin la proteína, y así se obtiene un estimado de lo que aporta la molécula a la viscosidad. Estas medidas se usaron para encontrar la temperatura de desnaturalización y la viscosidad intrínseca. Esta última nos da un estimado de la asimetría molecular. Para las colágenas de vertebrados, los valores de viscosidad intrínseca oscilan entre 14 y 17 dl/g aproximadamente.



Antes de cada experimento de viscosidad, las soluciones de colágena se centrifugaron a 40 000 rpm durante una hora, para obtener una solución cristalina, y así evitar agregados que interfieren en estas mediciones. La temperatura es un factor que influye en la viscosidad, por lo que todos los experimentos se hicieron dentro de un baño de agua con un regulador de temperatura que la puede mantener constante con una variación de  $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ .

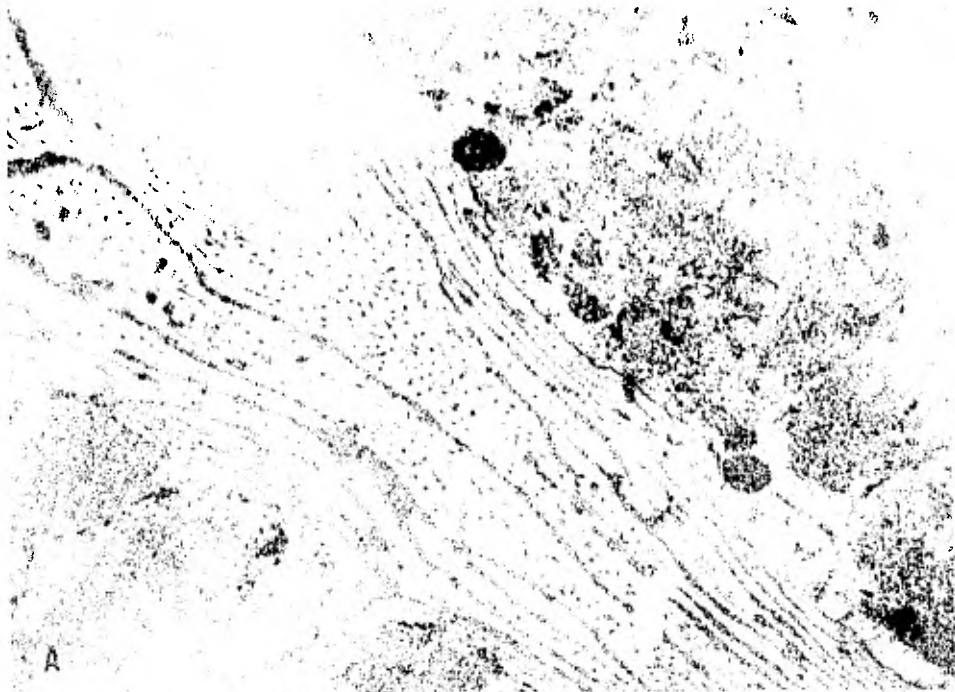
## 9 CRISTALES SLS

Soluciones de colágena en ácido acético 0.5 M, en algunos casos previamente centrifugadas a 40 000rpm durante una hora, se dializaron durante toda la noche en el cuarto frío, contra soluciones de ATP a concentraciones de 0.2, 0.4 y 2 % en ácido acético 0.05 M y 0.1 M. Se incluyó otra variante que consistió además en agregar 2-mercaptoetanol en la solución de ATP, a una concentración 0.02 M. Los preparados se depositaron sobre rejillas portaespecímenes cubiertas con Formvar y carbón, y se tiñeron positivamente con ácido fosfotúngstico 0.1 % y acetato de uranilo 0.01 % siguiendo la técnica de Bruns y Gross (Bruns and Gross, 1973). La tinción negativa se llevó a cabo con fosfotunstate de sodio al 2 % y pH 7 durante 4 minutos. Las rejillas se observaron en el microscopio electrónico y se fotografiaron a un aumento de 50 000 x.

## RESULTADOS

### 1 MICROSCOPIA DEL TEJIDO MUSCULAR

Con el microscopio óptico se observaron fibras musculares rodeadas por láminas de tejido conectivo. En el microscopio electrónico a bajo aumento, se observa el mismo patrón, pero con más detalles en las células musculares como gránulos de glucógeno etc., más definidas las láminas que se encuentran en número de 10 o más entre cada fibra y que se ramifican y anastomosan. El espesor de las láminas está entre 20 y 90 nm con un promedio de 54 nm, y entre estas láminas hay estructuras que parecen cordones cortados transversalmente (figura 9.A). A mayores aumentos se ve una ultraestructura en las láminas a modo de microfibrillas de alrededor de 8 nm, las cuales presentan una forma reticular y a veces una



A

B

Figura 9. A) Capa muscular de *Ascaris* a 7 500 aumentos, se notan entre las fibras musculares una serie de estructuras a modo de láminas y cordones. Láminas intermusculares a 45 000 aumentos, se observa una ultraestructura microfibrilar.

orientación preferente hacia un paralelismo, rodeando a la fibra muscular (figura 9).

## 2 EXTRACCION Y AISLAMIENTO

Con los métodos de extracción "A", "C" y "D", se obtuvieron cantidades muy pequeñas de colágena, mientras que con el "B" obtuvimos 49 mg a partir de 160 g peso húmedo de músculo, lo que equivale a 0.3 mg/g, razón por la cual casi la totalidad de los estudios que se hicieron fueron con colágena extraída por este método. Los métodos "C" y "D", fueron diseñados para tratar de solubilizar la colágena sin usar pepsina, después de que sabíamos de la existencia de puentes disulfuro. Para conocer la pureza de la colágena se corrieron electroforesis de las muestras tratadas con colagenasa bacteriana, que hace desaparecer todas las bandas, indicando su naturaleza colagénica.

## 3 COMPOSICION Y PESO MOLECULAR DE SUBUNIDADES

Para saber cuantas subunidades componen esta colágena, y cual es su peso molecular, se corrieron geles de poliacrilamida con SDS, con y sin urea. Se observan dos cadenas alfa diferentes (figura 10), como en la colágena tipo I de vertebrados y otras de invertebrados. Para conocer el peso molecular de las subunidades, se hicieron medidas de movilidad a partir de los datos electroforéticos en SDS, ya que en estos sistemas, el SDS rodea a la molécula dándole carga negativa, y debido a este efecto, las moléculas sólo migran en función de su peso molecular. Así se obtuvieron valores de peso molecular para las cadenas alfa de aproximadamente 80 000, y para los dímeros beta de 180 000 a 160 000.

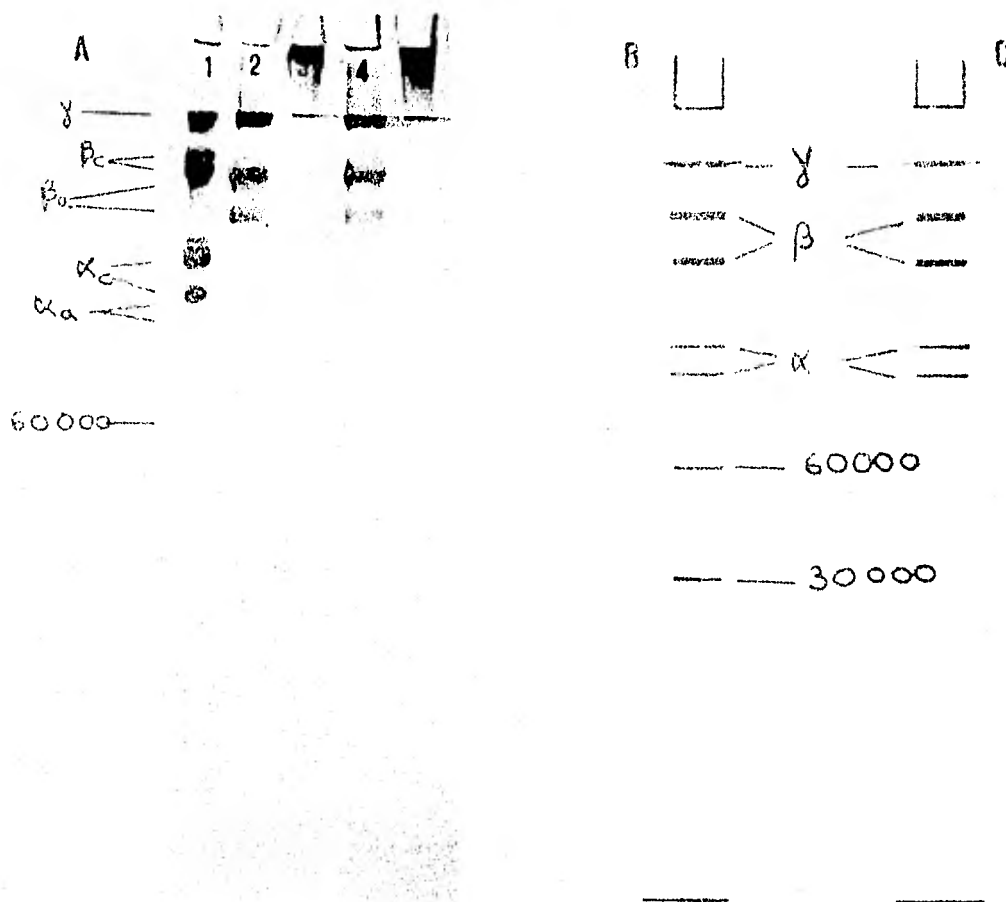


Figura 10. A) Electroforesis en poliacrilamida con SDS. (1) Colágena de cobayo. (2) y (4) Colágena del músculo de Ascaris en presencia de 2-mercaptoetanol. (3) y (5) Colágena del músculo de Ascaris sin el reductor. (la colágena fue extraída por el método de Fujimoto("B")). B) Esquema del patrón electroforético de la colágena del músculo de Ascaris extraída por el método "B". C) Esquema de colágena de Ascaris extraída por el método "D" que es sin pepsina. Nótese que las alfas y betas de Ascaris ( $\alpha_a$ ,  $\beta_a$ ) aparentan tener un peso molecular menor que las de cobayo ( $\alpha_c$ ,  $\beta_c$ ). Encontramos alfas de Ascaris con y sin 2-mercaptoetanol, además de que cuando se trata con pepsina, aparecen péptidos con un peso molecular aparente de 60 y 30 mil.

Las variaciones en el peso molecular de la colágena extraída sin pepsina fueron despreciables, más no el hecho de que la colágena extraída con pepsina, presenta por electroforesis dos bandas más, de aproximada

mente 60 y 30 mil de peso molecular.

#### 4 PUENTES DISULFURO

Por electroforesis se observa que cuando se corren muestras con 2-mercaptoetanol, entra mucha más colágena, betas y gammas principalmente, que en ausencia del reductor, sin el cual sólo entran alfas (figura 10.A). Esto indica la existencia de puentes disulfuro entre las moléculas.

#### 5 VISCOSIDAD INTRINSECA

El valor de viscosidad intrínseca que se obtuvo fue de 14.4 dl/g (figura 11). Este valor da una medida indirecta de la longitud de la molécula y en este caso se acerca a los valores típicos que corresponden a colágenas de 280 nm. Hay que hacer notar que la viscosidad reducida, depende de la concentración, pues al aumentar esta última, se forman agregados moleculares que aumentan la viscosidad, y si extrapolamos la concentración a cero, eliminamos el efecto de esos agregados.

#### 6 TEMPERATURA DE DESNATURALIZACION

La temperatura de desnaturalización se midió por viscosimetría, tanto en presencia de 2-mercaptoetanol 0.02 M, como sin él. Esto se hizo con el fin de saber si las uniones disulfuro contribuían a dar mayor estabilidad térmica a la molécula. Como se ve en la figura 12, la viscosidad disminuye al aumentar la temperatura en las dos curvas, que son prácticamente iguales, con una temperatura de desnaturalización de 38.8°C. Estas medidas se hicieron en soluciones de NaCl 0.5 M, con una hora de incubación a cada temperatura. Hay que hacer notar que en las

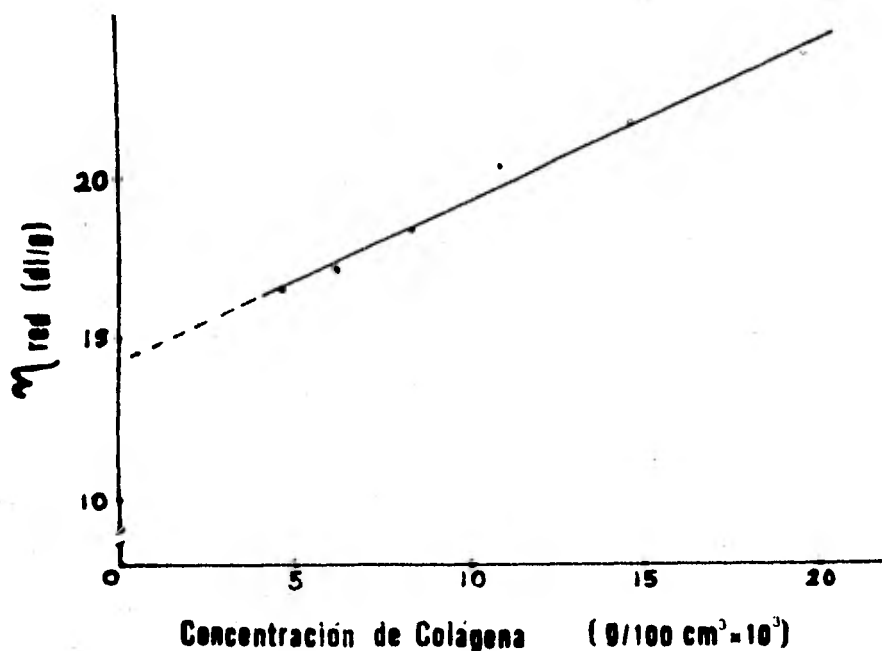


Figura 11. Gráfica de la viscosidad reducida en función de la concentración de colágena. La extrapolación a concentración cero, da el valor de viscosidad intrínseca que en este caso es de 14.4 dl/g para la colágena del músculo de Ascaris. El experimento se efectuó a temperatura constante (23.5°C).

condiciones experimentales utilizadas, la solución de colágena del músculo de Ascaris permaneció cristalina y sin agregados visibles, a diferencia de lo que ocurre con la colágena tipo I, que al elevar la temperatura se agrega en forma de fibras.

#### 7 CRISTALES SLS

En una ocasión se obtuvieron cristales de SLS de colágena muscular de Ascaris, y se tiñeron positivamente, revelando un patrón de bandas igual al de los SLS de colágena de piel de cobayo, sin embargo, no hemos podido reproducir este resultado, aún cuando se manipularon algunas va-

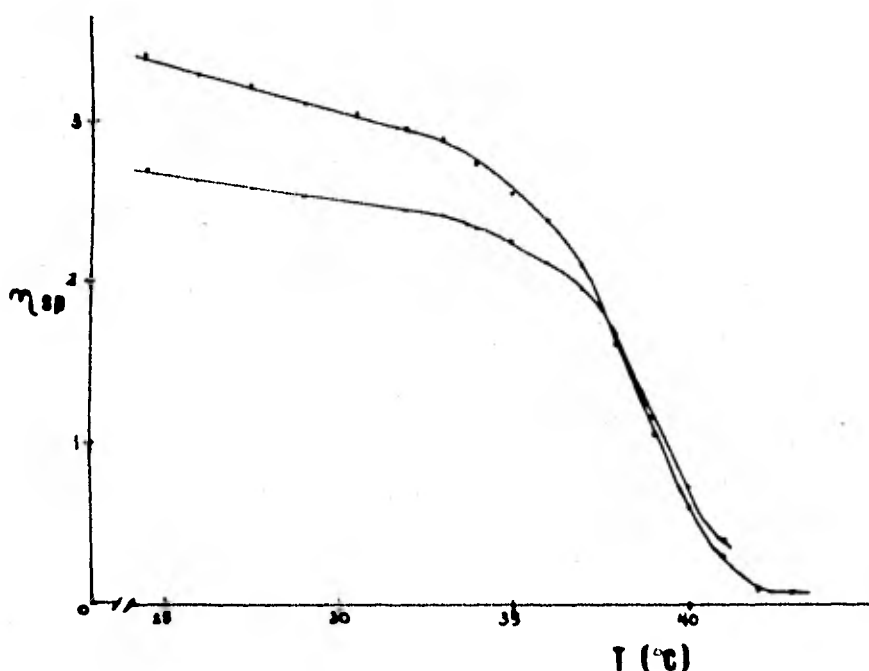


Figura 12. Temperatura de desnaturalización de la colágena del músculo de *Ascaris*. (●) En presencia de 2-mercaptoetanol 0.02 M y a una concentración de  $1.3 \text{ mg cm}^{-3}$ . (▲) Sin el reductor a una concentración de  $1 \text{ mg cm}^{-3}$ . La temperatura de desnaturalización media en ambos casos es de  $38.8^{\circ}\text{C}$ .

riables como se indicó en métodos. Resulta claro que en lugar de los SLS se forman agregados fibrilares o fusiformes sin un patrón de bandas evidente, y en una ocasión aparecieron fibras muy cortas con un bandeo simétrico como el de los FLS, con repetición aparente de 560 nm. Los datos sugieren que en este caso las fibras están formadas por cristales SLS asociados uno frente a otro, sin embargo deben ser reproducidos para su confirmación. Se ha reportado un hallazgo semejante en la colágena de *Helix pomatia* (Nordwig, 1970).



## DISCUSION

La información que obtenemos por microscopía electrónica, nos muestra diferencias en la forma de agregación de la colágena de la capa muscular de Ascaris, al compararla con la colágena del músculo de muchos otros metazoarios; no se ven las típicas fibras con sus estriaciones periódicas de 67 nm, sino una serie de láminas y cordones parecidos a membranas basales, con una ultraestructura microfibrilar.

Por lo que respecta a la extracción, obtuvimos muy poca colágena con tres de los métodos utilizados: Con el método que utilizó pepsina y precipitaciones con fosfatos, no se obtuvieron cantidades apreciables a pesar de tratar de solubilizar con pepsina, y en los dos métodos modificados de Fujimoto que usan 2-mercaptoetanol para la extracción, tampoco

se obtuvo mucha colágena, al parecer por no haber utilizado pepsina para solubilizarla. Se sabe que cuando tratamos la colágena con pepsina, esta no es degradada salvo en sus extremos donde se le cortan pedazos muy pequeños denominados telopéptidos, esto parece indicar que existen muchas uniones covalentes intermoleculares a nivel de los extremos de la molécula, y por eso sólo al tratar con la enzima, logramos solubilizar una cantidad apreciable de colágena.

Un fenómeno que se presentó con esta extracción, es la aparición de dos bandas electroforéticas de aproximadamente 60 y 30 mil de peso molecular y que no aparecieron en las muestras de extracciones sin pepsinizar. No se puede descartar la posibilidad de que la pepsina sea la responsable de la aparición de los péptidos, pero es poco probable que la proteasa haya roto a la colágena. Otra posibilidad es que la aparición de los péptidos se deba a la acción de una colagenasa activable que se encontrara pegada a la colágena (Pardo and Pérez-Tamayo, 1975). Cabe aclarar que estos péptidos son de colágena, pues al tratar las muestras con colagenasa son degradados.

Los datos electroforéticos revelan la existencia de enlaces disulfuro, ya que sólo en presencia de 2-mercaptoetanol aparecen las bandas correspondientes a los dímeros beta y a los trímeros gamma, sin embargo curiosamente parece no aumentar la cantidad de subunidades alfa que penetran al gel, esto pudiera indicar que los puentes disulfuro son principalmente intermoleculares.

Por otro lado siempre observamos dos tipos de subunidades alfa, esto puede ser interpretado de dos maneras: O tenemos dos tipos de colágena diferentes formadas por subunidades iguales, o bien es un solo tipo

de colágena compuesta por subunidades diferentes. Los estudios realizados en este trabajo no nos proporcionan la suficiente información para saberlo, sin embargo existe un sistema para encontrar cual de las dos opciones es correcta. Este sistema se fundamenta en el hecho de que al agregar formaldehído a la colágena, los residuos de lisina, se unen covalentemente por medio de un grupo metileno, al grupo -amino de algún otro aminoácido vecino como la asparagina, glutamina o arginina (Veis and Drake, 1962). Si tratamos con formaldehído una solución de colágena, lo suficientemente diluida para que esta reacción sólo ocurra intramolecularmente, obtendremos una solución constituida únicamente por trimeros (Hold et al, 1970), los cuales pueden ser analizados cromatográficamente como una o dos especies moleculares.

Por lo que respecta al peso molecular de las subunidades, las electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, que resultan muy eficientes para proteínas globulares, dan ciertos problemas para la colágena, en donde aún subunidades con el mismo peso molecular, tienen una movilidad diferente debido a su conformación. Por este sistema, usando patrones de colágena de cobayo, obtuvimos valores promedio de 80 000 de peso molecular para las subunidades alfa de la colágena del músculo de Ascaris.

Para saber si esta molécula es más pequeña que la colágena típica, otros estudios dan cierta información, por ejemplo, la viscosidad intrínseca (14.4 dl/g), nos dice que el tamaño de esta molécula está dentro de un rango aceptable para una colágena de más o menos 280 nm. Los cristales de SLS informan objetivamente del tamaño molecular.

Los resultados obtenidos con los SLS y los agregados fibrilares

con estriaciones, sugieren que esta molécula mide alrededor de 280 nm. Como los datos electroforéticos parecen indicar que esta colágena tiene un peso molecular aproximado de 80 000, esperaríamos encontrar una molécula de alrededor de 224 nm en lugar de los aparentes 280 nm, lo que es una contradicción en los datos, por lo que hay que reproducir los resultados para poder confirmar este dato, ya que como se dijo la viscosidad intrínseca no da datos precisos sobre la longitud, y sólo los SLS lo hacen. Hay que hacer notar que cuando se corrieron geles con muestras sin pepsinizar, no existían diferencias significativas en la movilidad de las bandas, lo que hace suponer que la pepsina corta en los extremos pedazos muy pequeños que prácticamente no alteran las medidas de peso molecular.

Para hacer cristales de SLS se usaron soluciones diluidas y concentradas, centrifugadas y no centrifugadas a alta velocidad para tratar de evitar la formación de fibras. También se cambiaron concentraciones de ATP y de ácido acético, pero aún así se formaron las fibras en todas las condiciones experimentales. Esto parece indicar que esta colágena forma agregados que funcionan como centros de cristalización al agregar el ATP, y resultan fibras en lugar de cristales. También se exploró la influencia de los enlaces disulfuro en la formación de fibras, pero parece que estos no son determinantes en ello, pues no se lograron formar cristales en presencia de 2-mercaptoetanol, un agente reductor de estos enlaces, y se formaron fibras.

La temperatura de desnaturalización de esta colágena resultó ser la esperada para un organismo que parasita a un mamífero, y por lo mismo, se encuentra continuamente en un medio a 37°C. Es lógico suponer

que su colágena se desnaturalizara a temperaturas mayores, como los 38.8°C que obtuvimos. También hay que mencionar que si existen puentes disulfuro intramoleculares, estos no afectan apreciablemente la estabilidad térmica de la molécula. Ya Fujimoto había encontrado una temperatura de desnaturalización de 40°C en las mismas condiciones sin 2-mercaptoetanol, exepcto que nosotros hicimos el experimento con tiempos de incubación mayores, y por eso mismo nos encontramos más cerca del equilibrio.

Por lo que respecta a las relaciones evolutivas de esta colágena, los datos obtenidos hasta ahora, indican que es casi típica de la línea de las intersticiales, y prácticamente no se parece en nada a la cuticular, salvo en que contiene cisteína. Hay que mencionar que existen colágenas de vertebrados como la de tipo III y de membranas basales, que contienen ese aminoácido. Esto indica que podría pertenecer a la línea general de evolución representada en la figura 7, más que a algún tipo intermedio posible entre la de intersticio y cutícula.

Por otro lado, por su forma de agregarse en láminas y por contener cisteína, se parecería a las colágenas de membranas basales. Además se parece a estas en su composición general de aminoácidos, incluyendo a la colágena de la membrana basal del intestino de Ascaris. Ambas colágenas de esta especie, tienen el mismo contenido de ocho residuos de cisteína por mil, y aproximadamente el mismo de glicina y otros. En colágenas de membranas basales de vertebrados, aparecen gran cantidad de péptidos (17 de 78 a 340 mil de peso molecular), mientras que en la membrana basal del intestino de Ascaris, sólo tres subunidades alfa de aproximadamente 150 000 de peso molecular, y en la capa muscular sólo 2

	capa muscular de <u>Ascaris</u>	membrana basal del intestino de <u>Ascaris</u> (7)	cutícula de <u>Ascaris</u>	cutícula de anélidos (2)	tipo I rata (3)
Hypro	122(4)	126	20 (5)	175.9	91
Pro	103 (4)	87	357 (5)	23	115
cis	8 (4)	8	30 (5)	0	0
Lis	19 (4)	17	30 (5)	0.5	18
Hylis	40 (4)	36	0 (5)	0	20
Peso molecular de la subunidad alfa	80 000 (6)	160 a 140 000	52 000(7)	470 000	100 000
número de subunidades	2 (6)	3	3 (7)	2	2
Peso molecular de la triple hélice	-	420 000	52 000(7)	1 700 000 1 900 000	300 000

Tabla I. Comparación entre colágenas de Ascaris, cutícula de anélidos, y tipo I de mamíferos. Nótese que tanto en la cantidad de aminoácidos por mil, como en la composición y peso molecular, la colágena del músculo de Ascaris, es más parecida a las intersticiales (tipo I) y de membranas basales que a las cuticulares.

(1) Hung et al, 1980.

(2) Kimura and Tanzer, 1977.

(3) François et al, 1980.

(4) Fujimoto, 1968.

(5) Adams, 1978.

(6) De este trabajo.

(7) Evans et al, 1976.

subunidades de peso molecular de alrededor de 80 000 (Tabla I).

En la membrana basal del intestino de Ascaris, existen además péptidos no colagénicos, aproximadamente un 70 % que se unen a la colágena de una manera compleja, para formar la matriz extracelular, situación característica de las membranas basales. Por lo que respecta a las lámi

nas de tejido conectivo que rodean a los músculos de Ascaris. nosotros no sabemos si existen péptidos no colagénicos que esten unidos a la colágena.

Cuando se extrae colágena de la membrana basal del intestino de Ascaris, Hung y colaboradores (1981), encuentran que posiblemente exista en forma de dos triples hélices de 420 000 de peso molecular cada una, unidas por puentes disulfuro, el extremo amino de una con el extremo carboxilo de la otra, y a otros péptidos formando un componente de peso molecular de 2 200 000, y las dos triples hélices uno de 820 000, arreglo que parecería ser diferente al modo en que pudieran agregarse las moléculas de la colagena de la capa muscular.

## REFERENCIAS

- Adams E. (1978), Invertebrate collagens, *Science*, 202:591-198.
- Barnes D. (1977), *Zoología de los invertebrados*, 3<sup>a</sup> Edición, Interamericana, pp: 204-220.
- Bruns R. R. and Gross J. (1973), Band pattern of the segment-long-spacing form of collagen. Its use in the analysis of the primary structure, *Biochemistry*, 12:808-815.
- Cho H. and Garant P. R. (1981), Sequential events in the formation of collagen secretion granules with special reference to the development of segment-long-spacing-like aggregates, *Anatomical Record*, 119:309-320.
- Cockrum E. McCauley W. (1967), *Zoología*, Interamericana, pp:204-206.



- Evans H. J., Sullivan C. E. and Piez K. A. (1976), The resolution of Ascaris cuticle collagen into three chain types, *Biochemistry*, 15:1435-1439.
- Eyre D. R. (1980), Collagen: Molecular diversity in the body's protein scaffold, *Science*, 207:1315-1322.
- François J., Herbage D. and Junqua S. (1980), Cockroach collagen: Isolation biochemical and biophysical characterization, *Eur. J. Biochem.*, 112:389-396.
- Fujimoto D. (1968), Isolation of collagens of high hydroxyproline, hydroxylysine and carbohydrate content from muscle layer of Ascaris lumbricoides and pig kidney, *Biochim. Biophys. Acta*, 168: 537-543.
- Fujimoto D. and Adams E. (1964), Intraspecies composition difference in collagen from cuticle and body of Ascaris and Lumbricus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 17:437-442.
- Fujimoto D. Horiuchi K. and Hirama M. (1981), Isotriptyrosine, a new crosslinking aminoacid isolated from Ascaris cuticle collagen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99:637-646.
- Garrone R. and Rozenfeld F. (1981), Electron microscope study of cell differentiation and collagen synthesis in hydroxyurea treated freshwater sponges, *J. Submicrosc. Cytol.*, 13:127-134.
- Gross J. (1961), Collagen, *Sci. Am.*, 204:120-130.
- Gross J. (1974), Collagen biology: Structure, degradation and disease, The Harvey Lectures, Ac. Press, N.Y.. pp:351-342.
- Hayashi T. and Nagai Y. (1979), Separation of the  $\alpha$  chains of type I and III collagens by SDS-poliacrilamide gel electrophoresis, *J. Biochem.*, 86:453-459.

- Hung Chung-Ho, Butkowsky R. J. and Hudson B. G. (1980), Intestinal base-  
ment membrane of Ascaris suum. Properties of the collagenous do-  
main, J. Biol. Chem., 255:4964-4971.
- Hung Chung-Ho, Noelken M. E. and Hudson B. G. (1981), Intestinal base-  
ment membrane of Ascaris suum. Physical properties of the collage-  
nous domain, J. Biol. Chem., 256:3822-3826.
- Josse J. and Harrington W. F. (1964), Role of pyrrolidine residues in  
the structure and stabilization of collagen, J.Mol. Biol., 9:269-  
287.
- Kimura S., Kobayashi H. and Kubota H. (1972), Studies on marine inverte-  
brate collagens-VI. Some properties of collagen from an ascidian,  
Halocynthia roretzi, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 38:1163-1169.
- Kimura S. (1971), Studies on marine invertebrate collagens-IV. Structu-  
ral differences in collagens from cuticle and intestines of Nean-  
thes diversicolor, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 37:432-440.
- Kimura S., Nagaoka Y. and Kubota M. (1969), Studies on marine inverte-  
brate collagens-I. Some collagens from crustaceans and molluscs,  
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 35:743-748.
- Kimura S. and Tanzer M. L. (1977), Nereis cuticle collagen: Isolation  
and characterization of two distinct subunits, Biochemistry,  
16:2554-2560.
- Laemmli U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assem-  
bly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227:680-685.
- Hold G. J., Kang A. H. and Gross J. (1970), Collagen molecules: Distri-  
bution of alpha chains, Science, 170:1096-1098.
- Nordwig A. (1970), Chemistry and molecular biology of the intercellular

- matrix Vol I, E. A. Balazs Editor, Ac. Press, N.Y., pp:27-41.
- Ouazana R. and Herbage D. (1981), Biochemical characterization of the cuticle collagen of the nematode Caenorhabditis elegans, Biochim. Biophys. Acta, 669:236-243.
- Pardo A. and Pérez-Tamayo R. (1975), The presence of collagenase in collagen preparations, Biochim. Biophys. Acta, 392:121-130.
- Prockop D. J., Kivirikko K. I., Tuderman L. and Guzman N. A. (1979), The biosynthesis of collagen and its disorders, Medical Progress, 301:13-23.
- Riehl R. (1980), Giant collagen fibres in the gonopodium of the mosquitofish Heterandria formosa Agassiz, 1853 (Pisces, Poeciliidae), Experientia 36:961-962.
- Solomon E. (1980), The collagen gene family, Nature, 286:656-657.
- Spiro R. G. Bhoyroo V. D. (1980), Studies on the carbohydrate of collagens. Characterization of a glucuronic acid-mannose disaccharide unit from Nereis cuticle collagen, J. Biol. Chem., 255:5347-5354.
- Tanzer M. L. (1978), The biological diversity of collagenous proteins, Trends In Biol. Sci., 3:15-17.
- Torre B. A. and Toledo I. (1981), The isolation, purification and characterization of the collagen of Cysticercus cellulosae, J. Biol. Chem., 256:5926-5930.
- Trelstad R. L. (1981), Le collagène, La Recherche, 12:312-321.
- Veis A. and Drake H. P. (1962), The introduction of intramolecular covalent cross-linkages into ichthyocol tropocollagen with monofunctional aldehydes, J. Biol. Chem., 238:2003-2011.

Woessner J. F. (1961), The determination of Hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this aminoacid, Arch. Biochem. Biophys., 93:440-447.