

24/61



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

LA COLAGENA DE HERMODICE:

Un modelo en la evolución de las colágenas de invertebrados.

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

P r e s e n t a

GEORGINA R. GARZA RAMOS MARTINEZ

México, 1984



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 está 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.

I N D I C E

	Página
<u>INTRODUCCION</u>	1
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	22
1) EXTRACCION	22
2) PURIFICACION	23
3) DETERMINACION DE HIDROXIPROLINA	24
4) ELECTROFORESIS	27
5) DIGESTION CON TRIPSINA Y COLAGENASA BACTERIANA	27
6) CRISTALITOS SLS	27
<u>RESULTADOS</u>	29
EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA COLAGENA DE HERMODICE	29
PESO MOLECULAR Y COMPOSICION DE SUBUNIDADES	33
SUSCEPTIBILIDAD A ENZIMAS PROTEOLITICAS	35
CRISTALITOS SLS	35
<u>DISCUSION</u>	40
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	47

ABREVIATURAS

SLS	-	Segment Long Spacing
FLS	-	Fibrous Long Spacing
ATP	-	Tritosfato de Adenosina
NEM	-	N - etilmaleimida
EDTA	-	Etildiaminotetra - Acetato
PMSF	-	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro

I N T R O D U C C I O N

Todos los animales multicelulares contienen colágena; el componente protéico más abundante del tejido conectivo. En los mamíferos constituye el 30% del total de las proteínas del cuerpo.

Las moléculas de colágena, después de ser secretadas por las células, se unen formando fibras, que son los elementos responsables de la integridad funcional de tejidos como el hueso, piel y tendón y contribuyen al soporte estructural de vasos sanguíneos, glomérulos renales y membranas basales en general. (1)

Actualmente se habla de la colágena como una familia de moléculas especializadas, cada una como un producto de genes distintos y que han evolucionado hacia funciones estructurales particulares fuera de la célula.

La propiedad principal de todas las moléculas de colágena, es su estructura de triple hélice, dando una conformación protéica única a manera de rodillo, formada por tres subunidades polipeptídicas o cadenas alfa, compuestas de aproximadamente 1050 residuos de aminoácidos y con un peso molecular aproximado de 100 000. (2) Cada cadena alfa está enrollada en hélice hacia la izquierda, con tres residuos por vuelta, y las tres cadenas juntas, se enrollan a la derecha formando una molécula de 1.5 nm. de diámetro y 280 nm. de longitud. (1).

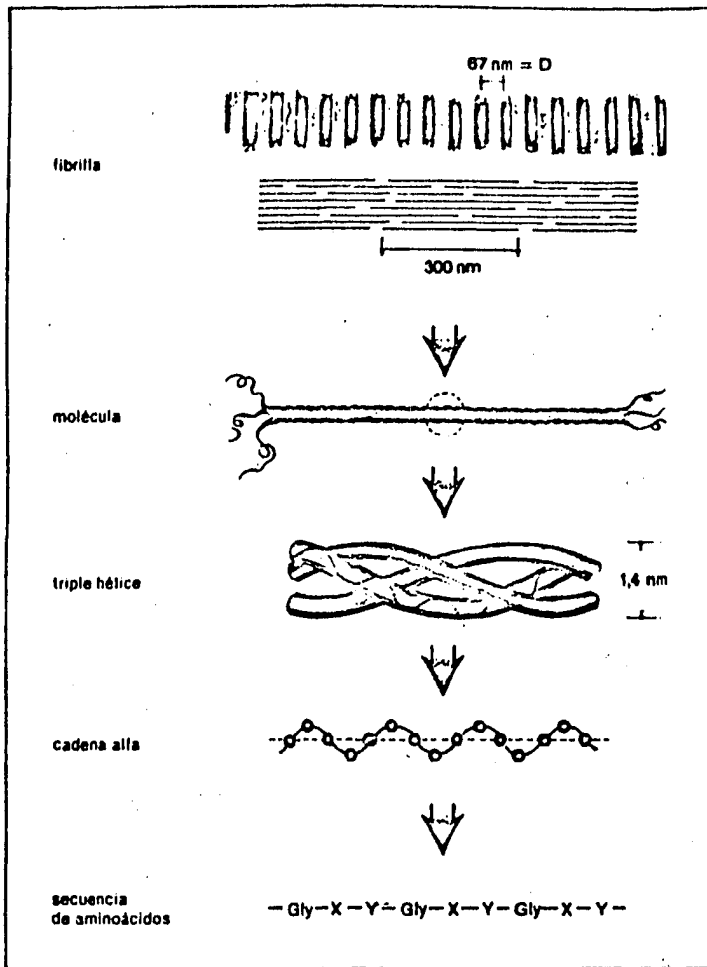


Fig. 1. La molécula de colágena es una triple hélice formada por el enrollamiento de tres cadenas alfa. Cada cadena alfa está enrollada en hélice hacia la izquierda, con tres residuos por vuelta y las tres cadenas juntas se enrollan a la derecha formando una molécula de 1.4 nm de diámetro y 300 nm de longitud. (según Trelstad, 1982)

Cada tipo diferente de colágena es una combinación única de tres cadenas alfa y cada una de las diferentes cadenas es el producto de un solo gen, con una secuencia de aminoácidos única; sin embargo encontramos características comunes a todas ellas como: la presencia de glicina en cada tercer residuo, determinando una repetición de tripéptido Gly - X - Y, como requerimiento absoluto para la formación de la triple hélice; y en donde X e Y son cualquier otro aminoácido. (3).

En ambos extremos de la molécula se encuentran las secuencias terminales o telopéptidos, que no están en triple hélice y carecen de glicina en cada tercer residuo; estos telopéptidos son sitios primarios de unión entre las moléculas. (2)

Otra característica común a todas las moléculas de colágena es el alto contenido de iminoácidos (150 a 250 residuos/1000 aminoácidos) que determina la estructura secundaria helicoidal de las cadenas alfa. Es frecuente encontrar que la posición X está ocupada por un residuo de prolina y la posición Y por un residuo de 4-hidroxiprolina (la presencia de la 3-hidroxiprolina es menos frecuente), de hecho el tripéptido Gly - pro - hy - pro forma aproximadamente el 10% de la molécula. (1)

Estos iminoácidos juegan el papel estabilizador de la triple hélice y en el caso particular de la 4-hidroxiprolina se ha propuesto que puede formar puentes de hidrógeno intercatenarios. Además es importante mencionar que la hidroxiprolina es un aminoácido casi

exclusivo de la colágena y que, por lo tanto se ha usado como indicador tanto de la presencia como del metabolismo de la misma.

En términos generales la proporción de prolina - que se encuentra hidroxilada en las colágenas intersticiales, guarda una relación directa con la temperatura de desnaturalización de la molécula de colágena y con la temperatura del medio ambiente donde se encuentra - (4). Por ejemplo la colágena tipo I de los mamíferos, que presenta una temperatura de desnaturalización de - alrededor de 37°C cuando se encuentra en solución tiene alrededor de 45 a 50% de sus prolinas hidroxiladas.

De manera similar, en todas las cadenas alfa, varios residuos de lisina son hidroxilados; posteriormente algunos de ellos son glicosilados con galactosa y/o glucosilgalactosa. Tanto la lisina como la hidroxilisina, son responsables de la formación de enlaces covalentes entre las moléculas.

Además de los aminoácidos ya mencionados, que - tienen un papel importante en la determinación de la - estructura y función de las moléculas de colágena, la distribución de los aminoácidos cargados parece ser - responsable de la forma en la que las moléculas de - - colágena se autoensamblan para formar fibras.

Las fibras de colágena se forman por la asocia - ción de moléculas en un arreglo escalonado en el que - cada una se encuentra desplazada $1/4.4$ de su longitud

(período D) con respecto a sus vecinas; este arreglo es responsable de la periodicidad de 68 nm que se observa en el microscopio electrónico. (Fig. 2).

El modelo más aceptado sobre la fibrilogénesis - propone una asociación de cinco moléculas de colágena - que se unen formando unidades llamadas microfibrillas; - éstas, a su vez, se agregan de manera lateral y por sus extremos dando la fibra como tal (1), (Fig. 3).

Las células involucradas en los procesos bisinté ticos de las moléculas de colágena son principalmente - los fibroblastos, células epiteliales, odontoblastos, - osteoblastos y condroblastos, las cuales sintetizan pri mero un precursor conocido como procolágena (2). Las - moléculas de procolágena presentan un segmento central- arreglado en triple hélice (conformación característica) y en ambos extremos extensiones globulares bien carac - terizadas, que juegan un papel importante en la asocia - ción trihelicoidal de la molécula de colágena; una vez que la molécula es completada y transportada al espacio extracelular, estas extensiones son removidas enzimáti - camente, permitiendo así la formación de las fibras.

Tanto el descubrimiento de las moléculas de pro - colágena, como el descubrimiento de las distintas for - mas de colágena en diferentes tejidos de una misma espe - cie, han ampliado los conocimientos sobre los eventos - que conducen a las síntesis de las moléculas de coláge - na. Hasta ahora han sido bien definidos cinco tipos di ferentes de colágena (I - V), los cuales representan se cuencias únicas de aminoácidos, codificadas por diferen - tes genes. (5).

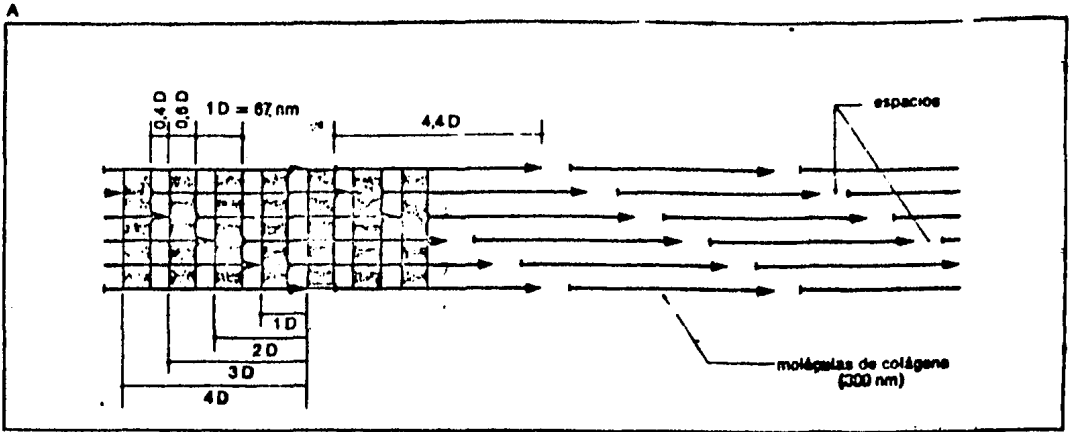


Fig. 2. Diagrama que esquematiza el arreglo escalonado de las moléculas de colágena que da como resultado la apariencia estriada de la fibra. El extremo de cada molécula está desfasado una distancia de 0, 1, 2, 3, 6 4 D, del extremo de las moléculas vecinas. (Según Trelstad, 1982)

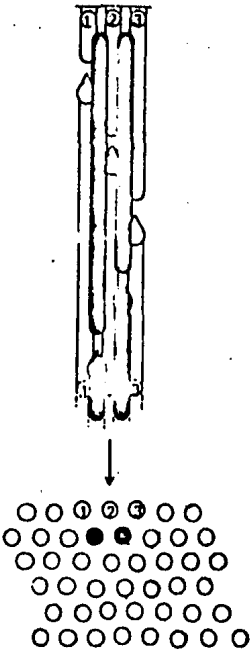


Fig. 3. Modelo propuesto para el arreglo tridimensional de las moléculas de colágena en fibras: cinco moléculas de colágena se unen en un arreglo escalonado para formar unidades llamadas microfibrillas, éstas a su vez se agregan de manera lateral y por sus extremos dando la fibra como tal.

El gen más estudiado es el que codifica para la cadena alfa 2 de la colágena tipo I; se sabe que es largo, 38 K.b., y está dividido en por lo menos 52 exones; la mayoría de estos exones están formados de 54 pb. o múltiplos de este número.

El hecho de encontrar tamaños iguales o múltiplos en la mayoría de los exones puede tener importantes implicaciones evolutivas, ya que esto sugiere que el gen ancestral de colágena fué formado por duplicaciones múltiples de unidades genéticas individuales que contienen un exón de 54 pb. (6).

Después de que el gen ha sido transcrito, se forma el ARN mensajero, que es trasladado al retículo endoplásmico rugoso donde es traducido, siendo una cadena proalfa el producto de traducción final. Estas subunidades sintetizadas son mayores a las encontradas en las fibras, ya que las prolongaciones que se encuentran a ambos extremos son más grandes. La extensión amino terminal tiene un peso molecular de 15 000 y la extensión carboxilo terminal un peso molecular de 30 a 35 000 (1), además contiene cisteína y por lo tanto, la capacidad de formar puentes disulfuro. (Fig. 4).

Se han propuesto algunas funciones importantes para estas prolongaciones o propéptidos: una es evitar la formación de fibras antes de que las moléculas de procolágena sean transportadas al espacio extracelular; otra es formar parte de un mecanismo de reconocimiento para la correcta alineación de las subunidades y después de ser removidas en el espacio extracelular probablemente sirven como señal para regular la secreción -

de colágena a través de receptores en la superficie celular (2).

Cada cadena proalfa es modificada postraduccionalmente, la lisina y la prolina aparecen en las posiciones que después ocuparán la hidroxilisina y la hidroxiprolina respectivamente. Las reacciones de hidroxilación en ambos casos requieren de oxígeno, Fe^{++} , alfa-cetoglutarato, ácido ascórbico y las enzimas correspondientes: prolil-hidroxilasa y lisilhidroxilasa. (fig.4). Estas modificaciones no ocurren al azar, sino en posiciones constantes para cada tipo de colágena.

Otra de las modificaciones postraduccionales es la glicosilación de residuos de hidroxilisina, en donde la adición de azúcares es catalizada por dos enzimas, la galactosiltransferasa y la glucosiltransferasa; la primera une galactosa a los residuos de hidroxilisina y la segunda añade glucosa a la galactosilhidroxilisina. (Fig. 4). Ambas enzimas son glicoproteínas que requieren la presencia de grupos sulfhidrilo y cationes divalentes como el Mn^{++} . En este caso el contenido de mono y disacáridos varía de tejido a tejido.

Una vez que se llevan a cabo estas modificaciones la formación de la triple hélice parece ser espontánea: tres cadenas proalfa se unen formando la molécula de procolágena, hay formación de puentes disulfuro tanto intra como intercatenarios, sólo a nivel de los propeptidos; ya que se formaron éstos, la molécula adquiere su conformación triple helicoidal. Del retículo endoplásmico pasa al aparato de Golgi, donde son secretadas,

a través de gránulos de secreción, derivados del aparato de Golgi y transportadas al espacio extracelular por movimientos citoesqueléticos. (Fig. 4).

Posteriormente se cortan las extensiones no helicoidales de los extremos amino y carboxilo terminal por medio de peptidasas específicas, convirtiendo finalmente a las moléculas de procolágena en moléculas de colágena en el espacio extracelular.

La alta resistencia a la tensión de las fibras de colágena es desarrollada por la formación de uniones covalentes entre las moléculas (3), en donde las microfibrillas recientemente formadas deben ser reconocidas por lisil oxidasa, que convierte ciertos residuos de lisina e hidroxilisina en aldehidos por dsanimación oxidativa de sus grupos amino; estos aldehidos se localizan generalmente en los extremos de la molécula, en las regiones no helicoidales o telopéptidos. Las uniones son esencialmente de dos tipos: productos de una condensación aldólica por la formación de bases de Schiff entre el grupo aldehído y el grupo amino de residuos de lisina o hidroxilisina de cadenas vecinas.

Experimentos in vitro han demostrado que la colágena soluble, extraída con ácido acético o amortiguador de citratos, es capaz de reagregarse en fibras con el patrón de estriación típico al de las fibras nativas, si regresamos a condiciones donde se tiene el pH neutro y temperaturas de 37°C.

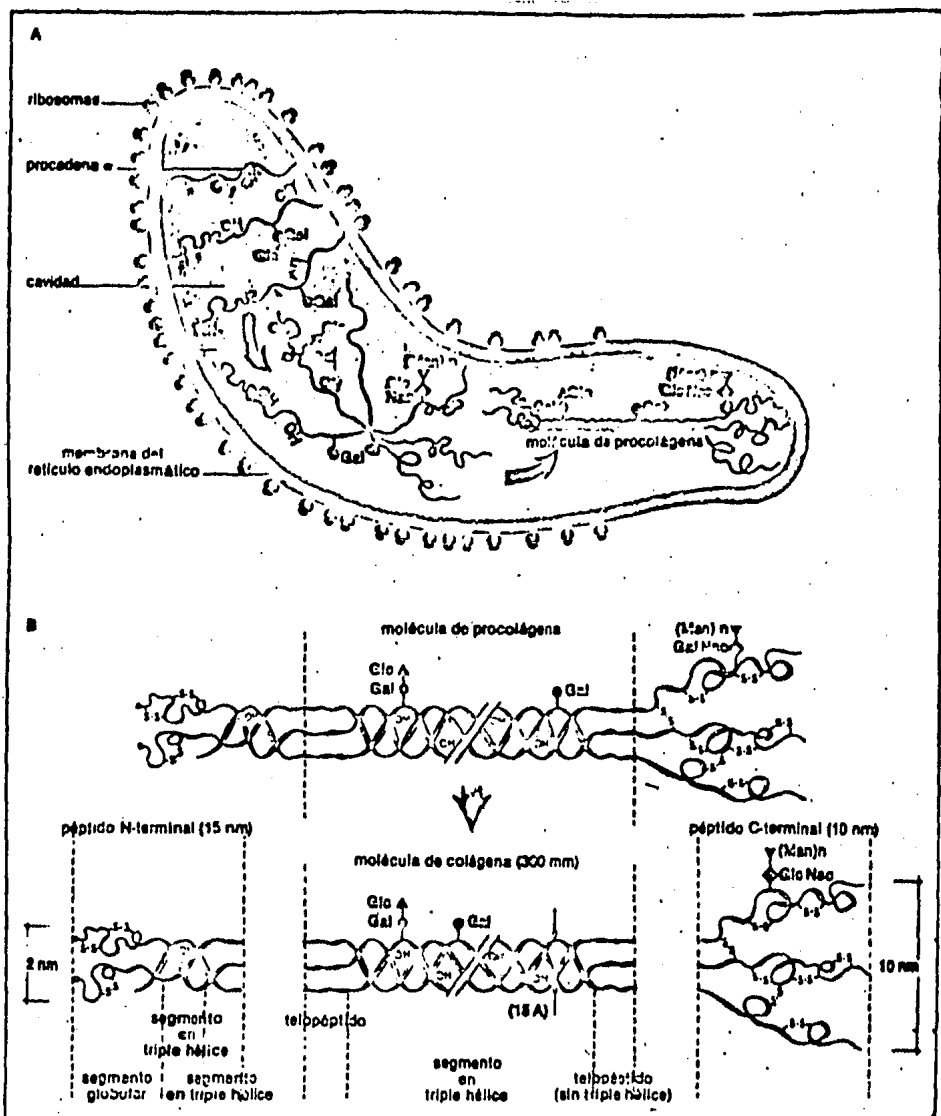


Fig. 4. Secuencia de eventos en la Biosíntesis de Colágena.

A.- 1) Síntesis de las cadenas proalfa. 2) Hidroxilación de los residuos de prolina y lisina. 3) Glicosilación de algunos residuos de hidroxilisina y adición de glucosa a la galactosilhidroxilisina. 4) Liberación de las cadenas proalfa completas de los ribosomas y reconocimiento de tres cadenas proalfa a través del propéptido C-terminal. 5) Formación de la triple hélice dando lugar a la molécula de procólágena.

B.- Estructura de las moléculas de procólágena y de colágena (Según Trelstad, 1982)

Dependiendo de las condiciones experimentales - pueden observarse otros dos tipos de agregados que no - se encuentran normalmente en los tejidos (7): FLS - - (Fibrous long spacing) y SLS (Segment long spacing). (Fig. 5).

A pH neutro y en presencia de moléculas cargadas negativamente (polianiones), como las glicoproteínas alfa-1 derivadas del suero sanguíneo o glicosaminoglicanos, se forman los FLS, que son estructuras con un patrón de bandas centrosimétrico, que se repite cada 280 nm y en donde las moléculas se juntan paralelamente, pero no todas orientadas en la misma dirección (8).

Los cristaliticos SLS se forman al agregar ATP a una solución de colágena en ácido acético diluido; tienen un tamaño de 280 nm y presentan un patrón de bandas asimétrico, ya que a diferencia de los FLS, las moléculas unidas paralelamente se orientan todas en la misma dirección. (8).

Los cristaliticos SLS representan una imagen de la molécula de colágena, cuando se tiñen positivamente, en el microscopio electrónico se encuentra que el patrón de bandas asimétrico está formado por 58 bandas (9), que reflejan la distribución de los residuos de aminoácidos cargados. La tinción negativa facilita la medición de sus longitudes, ya que sus extremos se observan más claramente y corresponden a los extremos amino y carboxilo terminales de las moléculas. Esta correlación que existe entre el patrón de bandas de los SLS y la distribución de cargas a lo largo de la molécula, ha

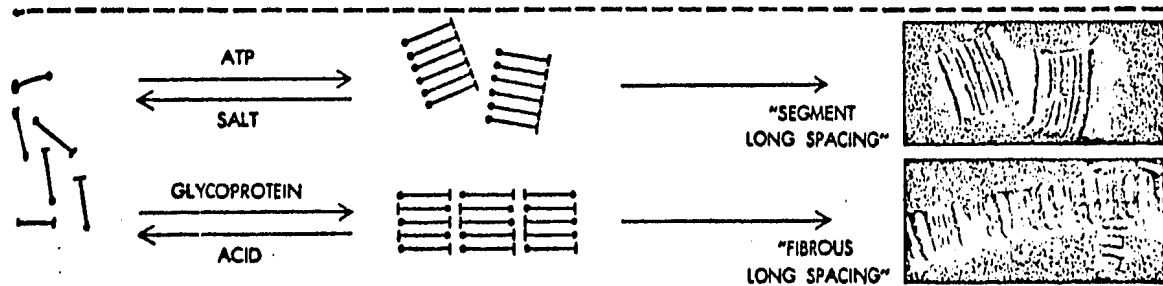


Fig. 5. Formación "in vitro" de los SLS y FLS.

- a) Cristalitos SLS en los que las moléculas se encuentran paralelas y orientadas en la misma dirección, dando un patrón de bandas asimétrico.
- b) Fibras FLS en donde las moléculas de colágena se juntan paralelamente pero orientadas en ambas direcciones, dando un patrón de bandas centrosimétrico.

permitido comparar las colágenas de diferentes especies o diferentes tipos de colágena entre sí (7-8).

En los tejidos de animales superiores han sido bien definidos cinco tipos diferentes de colágena y por lo menos nueve cadenas alfa, identificadas como productos de genes distintos (5). (Fig. 6).

Con base en su función y localización fuera de la célula, los distintos tipos de colágena pueden agruparse en dos grandes clases:

Colágenas intersticiales y fibrilares, son las más comunes y abundantes del tejido conectivo, representadas por los tipos I, II y III.

Colágenas no fibrilares que son menos abundantes y se localizan principalmente en el ambiente pericelular, como parte del esqueleto externo de la célula y formando parte de las membranas basales; estas últimas ó han sido bien caracterizadas.

De las colágenas intersticiales la más conocida es la tipo I; constituye el 90% de la colágena del cuerpo y se localiza principalmente en piel, tendón, hueso, córnea y varios tejidos más. Está compuesta de tres cadenas, dos idénticas llamadas alfa 1 (I) y una diferente denominada alfa 2 (I): $[(\alpha_1)_2 \alpha_2]$

En el cartílago hialino se encuentra exclusivamente colágena tipo II, molécula formada por tres cadenas alfa1(II) idénticas, con una composición de amino -

heterogeneidad genética			
polipéptidos o cadenas de colágena	moléculas de colágena en triple hélice	nombre	distribución en los principales tejidos
$\alpha 1 (I)$ $\alpha 2 (I)$	$[\alpha 1 (I)]_2; \alpha 2 (I)$	tipo I	piel, huesos, tendones, ligamentos, córnea, órganos internos, tejidos embrionarios e inflamación
$\alpha 1 (II)$	$[\alpha 1 (II)]_3$	tipo I trimero	
$\alpha 1 (III)$	$[\alpha 1 (III)]_3$	tipo II	cartilago, cuerpo vitreo
$\alpha 1 (III)$	$[\alpha 1 (III)]_3$	tipo III	vasos sanguíneos, piel, órganos internos
$\alpha 1 (IV)$ $\alpha 2 (IV)^*$	$[\alpha 1 (IV)]_?$	tipo IV	membranas basales
$\alpha 1 (V)$ $\alpha 2 (V)$ $\alpha 3 (V)^*$	$[\alpha 1 (V)]_2; 2 (V)$	tipo V	membranas basales, órganos internos

* no se ha establecido la configuración molecular de estas cadenas.

Fig. 6. Composición molecular y localización tisular de los diferentes tipos de colágena descritos en los vertebrados. (Según Trelstad, 1982).

ácidos diferente a las alfa 1 (I); por lo tanto, producto de un gen diferente. La colágena tipo III, formada también por tres cadenas idénticas, denominadas alfa 1 (III), se encuentra de manera predominante en los vasos sanguíneos y en la piel del feto, mientras que en la piel adulta constituye sólo el 10% (1). Asociada a colágena tipo I está presente en pulmón, músculo cardíaco, útero, hígado, placenta, cordón umbilical, bazo, riñón, tejido gingival y esclerótica.

Además de estos tipos genéticamente diferentes existe otra forma molecular de colágena, el trímero $(\alpha(I))_3$, formado por tres cadenas alfa (I) iguales. Se ha identificado como producto de varios cultivos celulares y de tumores y como componente, pero en pequeñas cantidades, de la piel, hueso embrionario y tendones.

La colágena tipo IV o de membrana basal, forma parte de la segunda clase de colágenas, no fibrilares, formada por tres cadenas alfa iguales: $[\alpha(IV)]_3$: presentando secuencias colagénicas y no colagénicas de tamaño variable; es particularmente abundantemente en glomérulos renales, cápsulas ópticas y en general en membranas basales de epitelios y endotelios especializados.

La colágena tipo V parece ser más abundante en tejidos vasculares, sintetizados principalmente por células musculares lisas; forma el exocitoesqueleto de las células que la sintetizan. Esta formada por tres cadenas denominadas $\alpha_1(V)$, $\alpha_2(V)$ y $\alpha_3(V)$.

Los patrones de cambio de la matriz del tejido conectivo durante el crecimiento, desarrollo y reparación requieren de un balance entre la síntesis y degradación de los diferentes tipos de colágena (1). La degradación se lleva a cabo por enzimas llamadas colagenasas y se encuentran en tejidos donde hay colágena presente.

La mayoría de las colagenasas estudiadas tienen un peso molecular de 25 a 60 000 dal., se sintetizan en su forma inactiva o latente generalmente; requieren de zinc y calcio para su actividad. Se caracterizan por romper en sitios específicos la molécula de colágena en estado nativo, bajo condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica; los fragmentos resultantes se desnaturalizan a la temperatura del cuerpo y son susceptibles a otras proteinasas.

A pesar de la heterogeneidad genética de esta proteína, existe un alto grado de homología en las distintas cadenas polipeptídicas que forman la molécula de colágena, la que hace que todas las colágenas y, en especial las intersticiales, sean similares entre sí. Estas similitudes se han hecho evidentes, incluso en las colágenas de Invertebrados hasta ahora estudiados; en éstas la estructura de triple hélice, el contenido de glicina (33%) y de hidroxiprolina y pesos moleculares de 300 000 se han mantenido constantes.

Los grupos de invertebrados más estudiados son: las esponjas, celenterados, platelmintos, moluscos, anélidos y artrópodos principalmente. Se ha descrito un gran número de proteínas del tipo colágena en diversas

especies, sin embargo sólo en muy pocas se ha hecho una caracterización detallada de sus colágenas; un ejemplo son las colágenas cuticulares de nemátodos y anélidos.

La colágena cuticular de los nemátodos es muy diferente a la de los vertebrados. Se han reportados pesos moleculares de la colágena cuticular de Ascaris Lumbricoide de 62 000 (11) o 52 000 (12) dal. y en contraste con otras colágenas no cambia después de ser desnaturada, indicando que la triple hélice probablemente surge del enrollamiento de una sola cadena polipeptídica. Se han aislado tres subunidades con pesos moleculares similares, con un contenido de 12 residuos de hidroxiprolina y 270 residuos de glicina por 1000 residuos de aminoácidos. Otra característica es la presencia de cisteína, la que parece contribuir a la formación de agregados moleculares.

La colágena cuticular de los anélidos es muy diferente a la de los nemátodos. La de la lombriz de tierra (12) tiene un peso molecular de 1.9 millones dal.; está formada por tres subunidades, cada una con un peso molecular de 600 000, el contenido de glicina es de 350 residuos por 1000 residuos de aminoácidos y la proporción de residuos de prolina hidroxilada es del 90%.

Características similares presentan las colágenas cuticulares de los poliquetos marinos Nereis virens y Nereis japonica (13), sus pesos moleculares son de 1.4 y 1.7 millones dal., respectivamente. Formada por dos subunidades distintas A y B en una proporción molar de 1:2, cada cadena polipeptídica tiene un peso molecular de 470 000, la proporción de residuos de prolina hidroxilados es del 89% y del 74%, respectivamente, y tiene 354 residuos de glicina por 1000 residuos de aminoácidos.

Además carecen de hidroxilisina, encontrando carbohidratos unidos a residuos de serina y treonina (14).

Las colágenas aisladas de otras especies de in - vertebrados presentan características más parecidas a - las colágenas intersticiales de vertebrados; tal es el caso en las anémonas de mar Actinia equina y Metridium (15), en el platelminto Fasciola hepática (15-16), en el molusco Helix promotia (16-17), y en los insectos - Locusta migratoria (18) y el Periplaneta americana (19).

Las colágenas de todas estas especies presentan características comunes, como son: Peso molecular de - 280 a 300 000, presencia de fibras con una periodicidad de 57 a 65 nm., presencia de un solo tipo de cadena alfa; su composición de aminoácidos es muy parecida a la de colágenas intersticiales de vertebrados y hacen cris talitos SLS con un tamaño de 280 nm y con el mismo núme ro y patrón de bandas al que se observa en la colágena tipo I de vertebrados, indicando una distribución simi lar de sus residuos de aminoácidos cargados.

Por otro lado se ha reportado la presencia de co lágenas formadas por subunidades distintas, parecidas a las colágenas tipo I: , en pulpo, calamar, lan gosta, cangrejo (19-20) y en el platelminto Cysticercus cellulosas (22-23).

En el caso de la colágena del cisticerco, se han encontrado varias peculiaridades: forma fibras muy del gadas sin una aparente periodicidad, carece de hidroxipro lina, sin embargo, tiene una temperatura de desnatura lización de 36°C. Además un patrón de bandas en sus cristalitos SLS completamente diferente al observado en

colágenas de vertebrados y otros invertebrados, pero se mantienen igual en las especies adultas: Taenia solium y Taenia saginata (datos no publicados).

Estudios de microscopía electrónica y análisis de aminoácidos han demostrado la presencia de colágena en esponjas (24), animales multicelulares más primitivos. Estas fibras de colágena se encuentran formando la esponjina que forma el esqueleto orgánico de estos organismos.

En varias especies más de invertebrados se ha encontrado hidroxiprolina, que como se mencionó anteriormente, se considera un aminoácido exclusivo de la colágena; sin embargo su caracterización no ha podido llevarse a cabo.

La existencia de diferentes tipos de colágena en una misma especie fue reportada por primera vez en nemátodos y anélidos (12). Estudios más detallados demostraron que Ascaris lumbricoides presenta tres tipos diferentes de colágena:

Colágena cuticular (11), colágena de la capa muscular (25) y colágena de membrana basal en intestino (26). Estas dos últimas se parecen más a las de vertebrados que a la cuticular, incluso la colágena de la capa muscular puede agruparse dentro de las colágenas intersticiales. (27).

En el caso de los anélidos se han reportado por lo menos dos tipos diferentes de colágena: la cuticular -

ampliamente estudiada, tanto en poliquetos marinos como en oligoquetos (lombriz de tierra) y otra extraída del cuerpo de la lombriz de tierra, libre de cutícula, cuya composición de aminoácidos muestra diferencias significativas si se compara con la de la cutícula (12), pero hasta la fecha no se conoce la estructura de esta colágena.

Dado que las colágenas cuticulares cumplen una función diferente a las del tejido conjuntivo, hemos propuesto que en los anélidos y en los nemátodos debe haber un tipo de colágena, además de la cuticular, que cumpla la función de las colágenas intersticiales y que estructuralmente esté más cercanamente relacionada con éstas, que con su propia colágena cuticular.

Con base en lo anterior nos hemos fijado como objetivo de este estudio el investigar si en un representante de los anélidos se encuentra un tipo de colágena funcional y estructuralmente relacionada con las colágenas intersticiales de los vertebrados y de otros invertebrados.

Para llevar a cabo el presente trabajo se escogió como modelo a un poliqueto marino Hermodice sp., perteneciente al phylum de los anélidos y cercanamente relacionado a Nereis cuya colágena cuticular es bien conocida, y establecer así posibles relaciones evolutivas comparando los tipos de colágena presentes en estos organismos, con las colágenas tanto de vertebrados como de otros invertebrados. Para cumplir dicho objetivo decidimos aislar, purificar y caracterizar la colágena de -

la capa muscular, tejido en el que esperamos encontrar - colágena tipo intersticial.

El estudio de la bioquímica comparativa de las co lágenas de los invertebrados es interesante, porque nos permite ampliar ampliar el espectro de las relaciones entre la estructura y la función de la molécula, ya que en estos organismos diferentes moléculas de colágena cumplen funciones que no encontramos en los vertebrados. Además, este tipo de estudios nos permitirá entender la evolu - ción y filogenia de la colágena en los metazoarios.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

Ejemplares de Hermodice sp. fueron colectados en la zona litoral de Isla Sacrificios, en Veracruz y congelados a -30°C hasta su uso. Identificados en laboratorio de invertebrados de la Facultad de Ciencias.

1) EXTRACCION:

Después de descongelar los gusanos, se llevó a cabo una disección separando a la capa muscular de la cutícula y de los órganos internos. El músculo se lavó varias veces con agua destilada fría y se centrifugó a 35 800 g. - durante 30 min. El precipitado se puso a extraer en una - solución de ácido acético 0.5 M con inhibidores de protei - nasas a las siguientes concentraciones: EDTA 0.025 M, - - NEM 0.01 M y PMSF 0.001 M, agitando continuamente durante 48 horas a 4°C .

La suspensión resultante se centrifugó a 184 000 g. 30 min. y el precipitado fue resuspendido en ácido acético 0.5 M, se le agregó pepsina a una concentración de 0.2 - mg/ml, se dejó agitando toda la noche a 4°C y fue centrifugado a 184 000 g. 30 min. El sobrenadante se guardó y el precipitado se redisolvió en ácido acético 0.5 M, agregan - do pepsina a una concentración mayor(0.5 mg/ml) y se repi - tió el procedimiento anterior.

Los sobrenadante de los extractos con pepsina se - juntaron y fueron dializados a 4°C contra una solución de Na_2HPO_4 0.01 M a pH 9, después de lo cual se centrifugaron durante 60 min. para obtener la colágena precipitada la - cual se redisolvió en ácido acético 0.5 M y se procedió a su purificación

2) PURIFICACION

La purificación de esta colágena consistió principalmente en precipitaciones secuenciales con Na_2HPO_4 y NaCl . (Fig. 7).

Las muestras en solución de ácido acético 0.5 M se centrifugaron a 45 000 rpm 30 min.; a los sobrenadantes colectados se les agregó una solución de NaCl 4.0 M hasta obtener una concentración de la sal de 2.0 M. La colágena precipitada se centrifugó a 1500 g. durante 90 min. y en precipitado se redisolvió en ácido acético 0.5 M; el material insoluble se eliminó por centrifugación 30 min. a 45 000 rpm y la solución resultante fue dializada contra varios cambios de Na_2HPO_4 0.01 M a 4°C durante dos días. El precipitado colectado por centrifugación se redisolvió en ácido acético 0.5 M.

Finalmente se hizo una precipitación diferencial con NaCl . Se dializó primero el extracto contra un amortiguador de fosfatos pH 7.6 y fuerza iónica 0.4; como en estas condiciones la colágena precipitó, se centrifugó a 15000 g. 60 minutos y el precipitado se redisolvió en ácido acético 0.5 M.

La colágena fue precipitada agregando una solución de NaCl 4.0 M hasta las siguientes concentraciones: 1.0 M, 1.5M y 2.0 M., los precipitados obtenidos se centrifugaron a 1500 g. y se redisolvieron en ácido acético 0.5 M.

Se hizo una segunda purificación siguiendo prácticamente el mismo método, con las modificaciones siguientes (Fig. 8):

La precipitación diferencial con NaCl se llevó a cabo añadiendo una solución de NaCl 4.00 M hasta obtener concentraciones de la sal de 0.6 M, 0.75 M y 1.2 M. Los precipitados obtenidos se centrifugaron a 1500 g 30 minutos y se redisolvieron en ácido acético 0.05 M. A los sobrenadantes se les agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado hasta formar un precipitado, que se colectó por centrifugación y se redisolvió en ácido acético 0.5 M.

3) DETERMINACION DE HIDROXIPROLINA:

Para medir el contenido de hidroxiprolina, tanto en el tejido como en las soluciones problema, se utilizaron los métodos de Woessner (28) y Rojkind y González (29). Ambos métodos involucran la oxidación de hidroxiprolina libre con cloramina T. Se forma un complejo colorido agregando p-dimetil-amino-benzaldehído y se mide la absorción en el espectrofotómetro a 557 nm.

Aunque el método de Woessner es más sensible, no puede ser utilizado con extractos crudos, ya que varias sustancias interfieren en el desarrollo de la reacción, por lo que en estos casos se utilizó el método de Rojkind y González en el que el pirrol formado por la oxidación de la hidroxiprolina se separa de otras sustancias mediante una extracción con tolueno.

Las muestras se hidrolizaron en HCl 6.0 N a 110°C durante 20 a 24 horas.

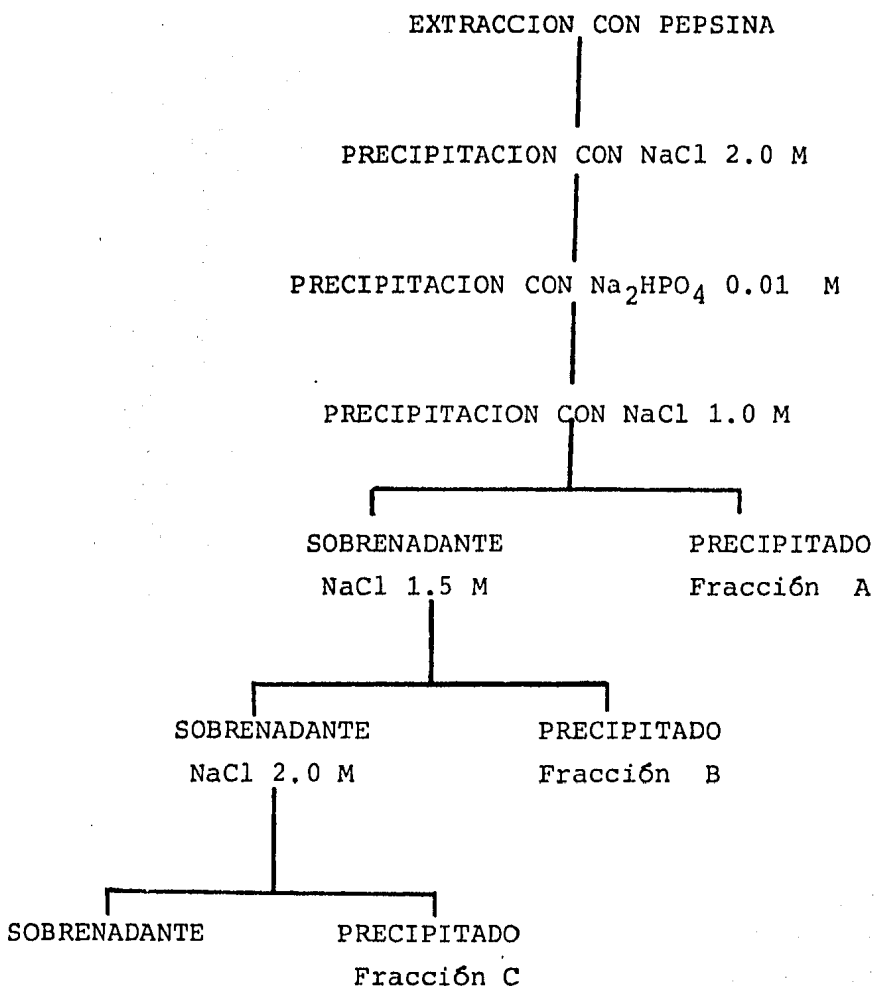


Fig. 7 Primer método de purificación de la colágena de Hermodice sp.

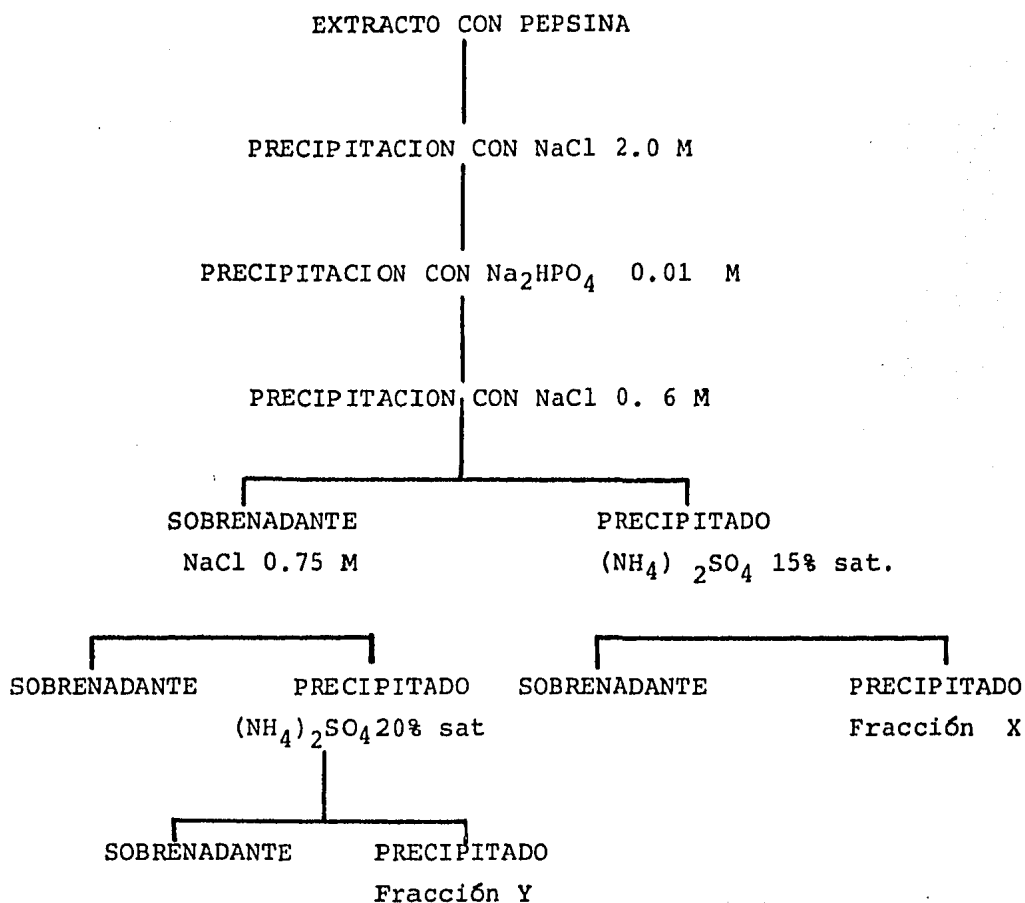


Fig. 8 Segundo método de purificación de la colágena.
de Hermodice sp.

4) ELECTROFORESIS :

Con el objeto de conocer el grado de pureza, composición de subunidades y el peso molecular de la colágena de Hermodice se usaron tres métodos de electroforesis en geles de poliacrilamida: el sistema Laemmly (30), que es con SDS y acrilamida al 7%, el método de Hayashi y Nagai (31), con acrilamida al 5%, SDS y urea, este último diseñado para favorecer la separación de las cadenas alfa y el método de Sakai y Gross (32), a pH 5.5., con acrilamida al 10% y sin SDS.

5) DIGESTION CON TRIPSINA Y COLAGENASA BACTERIANA:

Se prepararon soluciones de colágena de Hermodice y de colágena purificada de piel de cobayo en Tris-HCl 0.05 M con NaCl 0.15 y Ca Cl₂ 5mM a pH 7.2 (amortiguador de colagenasa).

La tripsina y colagenasa (750 μ g/ml) se disolvieron en amortiguador de colagenasa y se añadieron 5 μ l de una u otra enzima a 100 μ l de las muestras y se incubaron a 25°C durante 0, 1, 2, 4, 8 y 20 horas. Se añadieron 5 μ l de inhibidor para detener la reacción: PMSF (1 mM) para tripsina y EDTA (20 mM) para colagenasa. Después de la incubación se corrieron las muestras en electroforesis con SDS.

6) CRISTALITOS SLS:

Se hicieron soluciones de colágena purificada de Hermodice y de colágena de piel de cobayo en ácido acético 0.5 M y fueron dializadas en el cuarto frío durante

toda la noche contra una solución de ATP al 0.4% en ácido acético 0.05 M. Después de diluir ligeramente la suspensión resultante, los cristallitos fueron depositados en rejillas de cobre, cubiertas con una película de - - Formvar y estabilizadas con carbón.

La tinción positiva de los cristallitos se llevó a cabo con acetato de uranilo 0.01% y ácido fosfotúngstico 0.1% de acuerdo al método de Bruns y Gross (9). La tinción negativa se llevó a cabo con un fosfotungstato de Sodio al 2% (pH7) durante 4 min.

Las rejillas se examinaron en un microscopio - electrónico Carl Zeiss EM 10 y se fotografiaron a un aumento de 50 000 X. Para calcular la amplificación real se utilizó una réplica en carbón de una rejilla de dí-fracción que tiene 54 800 líneas por pulgada (E. Full - man Inc.).

R E S U L T A D O S

EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA COLAGENA DE HERMODICE

La extracción de la colágena de la capa muscular de Hermodice se llevó a cabo en dos pasos: primero una incubación del músculo con acético 0.5 M e inhibidores de proteinasas, seguido de una digestión limitada con pepsina en la cual se disolvió la mayor parte de la colágena; después de dializar esta solución contra Na_2HPO_4 0.01 M apareció un precipitado que se redisolvió fácilmente en acético 0.5 M formando una solución muy viscosa.

El contenido de hidroxiprolina del músculo de Hermodice fue de 13.05 mg/g de tejido; de ésta el 22% se recuperó en forma soluble después de la digestión con pepsina, mientras que la incubación con acético e inhibidores proteolíticos sólo produjo una cantidad mínima de hidroxiprolina soluble.

Posteriormente se corrió con electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS (Fig. 9) donde se muestran diferencias significativas entre ambas muestras: en la muestra del primer paso de extracción no se observó ninguna banda que migrara como la colágena tipo I de piel de cobayo, mientras que este patrón se hizo evidente en el extracto con pepsina. A partir de estos resultados se trabajó únicamente con las muestras extraídas con pepsina.

En esa electroforesis se observa además que no hay diferencias al correr las muestras en presencia del

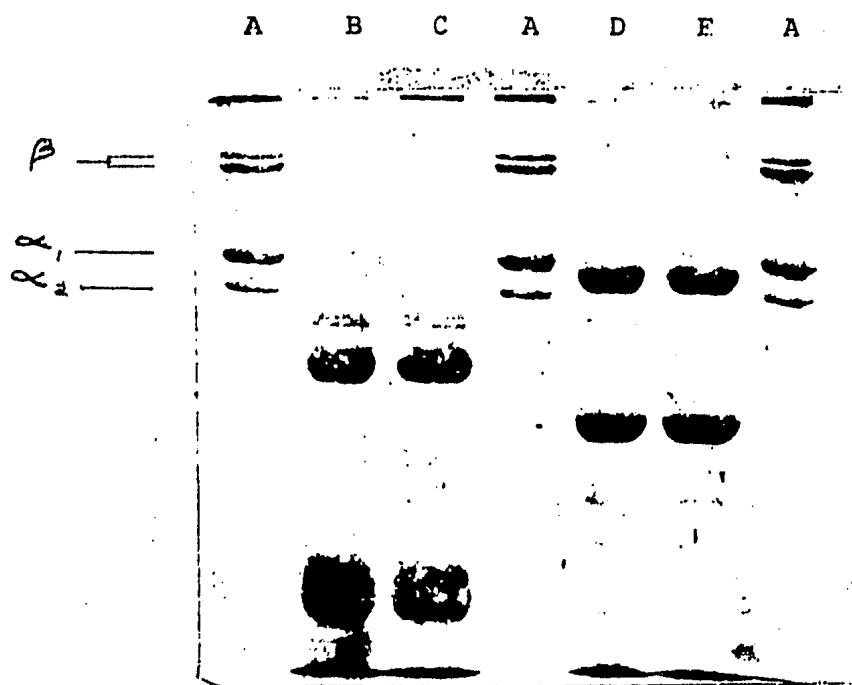


Fig. 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de colágena tipo I de piel de cobayo (A), extracto de músculo de Hermodice en acético 0.5 M sin pepsina, corrido en ausencia de β -mercaptoetanol (B) y en presencia de β -mercaptoetanol (C). Extracto de músculo de Hermodice con acético 0.5 M y pepsina, corrido en ausencia (D) y presencia (E) de β -mercaptoetanol.

reductor 2-mercaptoetanol, eliminando así la posibilidad de que la colágena de Hermodice presente enlaces disulfuro entre las moléculas.

Al aplicar el primer método de purificación (ver - Materiales y Métodos) al extracto de colágena solubilizada con pepsina se obtuvieron tres fracciones:

- Fracción A: que precipitó con NaCl 1.0 M y que contenía 0.11 mg Hpro/ml. ($V_T=10$ ml)
- Fracción B: precipitada con NaCl 1.5 M y con un contenido de hidroxiprolina de 0.062 mg/ml. ($V_T= 10$ ml)
- Fracción C: que precipitó con NaCl 2.0 y que contenía 0.08 mg Hpro/ml. ($V_T=5$ ml)

Al correr las muestras anteriores en electroforesis en SDS (Fig. 10) no se observaron diferencias aparentes entre las tres fracciones, ambas mostraron una sola banda que migra entre $\alpha 1(I)$ y $\alpha 2(I)$, así como dos bandas a la altura de los dímeros beta de colágena tipo I. Los experimentos posteriores se llevaron a cabo con la fracción A (Pp. con NaCl 1.0M) por ser la más abundante.

El segundo método de purificación dió finalmente los siguientes resultados: una fracción que precipitó con NaCl 0.06 M (fracción X) y otra precipitada con NaCl 0.75 M. (fracción Y). La electroforesis resultante de estas fracciones mostró bandas contaminantes por lo que se hizo una precipitación con una solución de Sulfato de Amonio al 15% de saturación, en el caso de la fracción X y al 20% de saturación en la fracción Y.

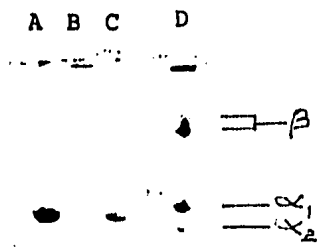
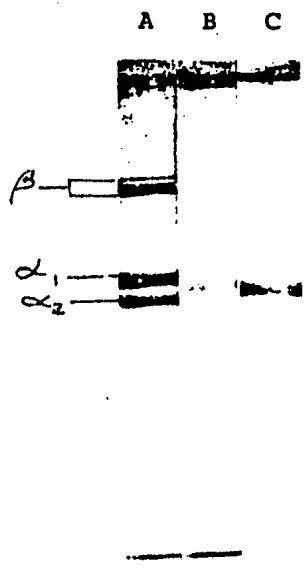


Fig. 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las fracciones obtenidas en la primera purificación: Fracción precipitada con NaCl 1 M (A). Fracción precipitada con NaCl 1.5 M (B) Fracción precipitada con NaCl 2 M (C) y Colágena tipo I de piel de cobayo (D)

Fig. 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las fracciones obtenidas en la segunda purificación: Fracción precipitada con NaCl 0.6 M (B). Fracción precipitada con NaCl 0.75 M (C) y Colágena tipo I de piel de cobayo (A).



En la Fig. 11 se muestra la electroforesis en SDS de estas fracciones, en donde se observa que ambas presentan un patrón semejante: una sola banda que migra a la altura de los dímeros beta de la colágena tipo I de piel de cobayo y una sola banda entre las cadenas alfa 1 (I) y alfa 2 (I). La movilidad electroforética de las subunidades en ambas fracciones es la misma (tabla 1). La fracción X (NaCl 0.6 M) presenta además un contaminante que migra entre las subunidades α y los dímeros β

PESO MOLECULAR Y COMPOSICION DE SUBUNIDADES :

Las electroforesis en SDS de la colágena solubilizada de Hermodice revelaron la presencia de un solo componente en la región revelaron la presencia de un solo componente en la región de las cadenas alfa que migra entre las cadenas alfa 1 y alfa 2 de la colágena tipo I de vertebrados (figs. 10-11). Las muestras resultantes del primer método de purificación presentaron, además de este componente, dos bandas muy tenues con un peso molecular aparente de 200 000; sin embargo, al correr las muestras obtenidas en la segunda purificación, aparece una sola banda a la altura de los dímeros beta de la colágena de piel de cobayo.

Usando otros dos sistemas de electroforesis en geles de poliacrilamida: Hayashi y Nagai, en presencia de urea (30) y el de Sakai y Gross, sin SDS (31), se obtuvieron resultados semejantes (datos no presentados). El patrón electroforético de la colágena de Hermodice mostró la presencia de un solo tipo de subunidad que migra entre alfa 1 (I) y alfa 2 (I), con un peso molecular de 100 000.

T A B L A I

Movilidad electroforética de las subunidades de la colágena tipo I y de la colágena de Hermodicc.

SUBUNIDAD	MOVILIDAD ELECTROFORETICA
β_{1-1} (I)	0.21
β_{1-2} (I)	0.24
β_X (0.6M)	0.22
β_Y (0.75M)	0.22
α_1 (I)	0.42
α_2 (I)	0.46
α_X (0.6M)	0.44
α_Y (0.75M)	0.44

SUSCEPTIBILIDAD A ENZIMAS PROTEOLITICAS:

Cuando se prepararon las soluciones de colágena de Hermodice y de piel de cobayo en el amortiguador de colágenasa a pH 7.2, la colágena de Hermodice se precipitó, probablemente formando fibras, por lo que la incubación se llevó a cabo en dichas condiciones y no con la colágena en forma soluble como en el caso de la de cobayo.

La susceptibilidad de la colágena de Hermodice a tripsina y colagenasa se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamidasas (Fig. 12). La colágena de Hermodice, al igual que la colágena de piel de cobayo, fue resistente al efecto de la tripsina, sobre todo en tiempos de incubación cortos. La digestión con colagenasa bacteriana, en el caso de la colágena de Hermodice, requirió de tiempos de incubación más largos, encontrando que a las 20 horas de incubación las bandas desaparecieron completamente.

Se observó además que la banda que migra entre las cadenas alfa y beta fue resistente a estas enzimas, aún después de incubar por 20 horas.

CRISTALITOS SLS :

Se hicieron cristallitos SLS dializando colágena soluble de Hermodice, contra ATP. La fracción que precipitó con NaCl 1.0 M (fracción A), con el primer método de purificación, produjo cristallitos que al teñirlos positivamente, presentaron un patrón de bandas diferentes a cualquiera de los reportados; además de los cristallitos

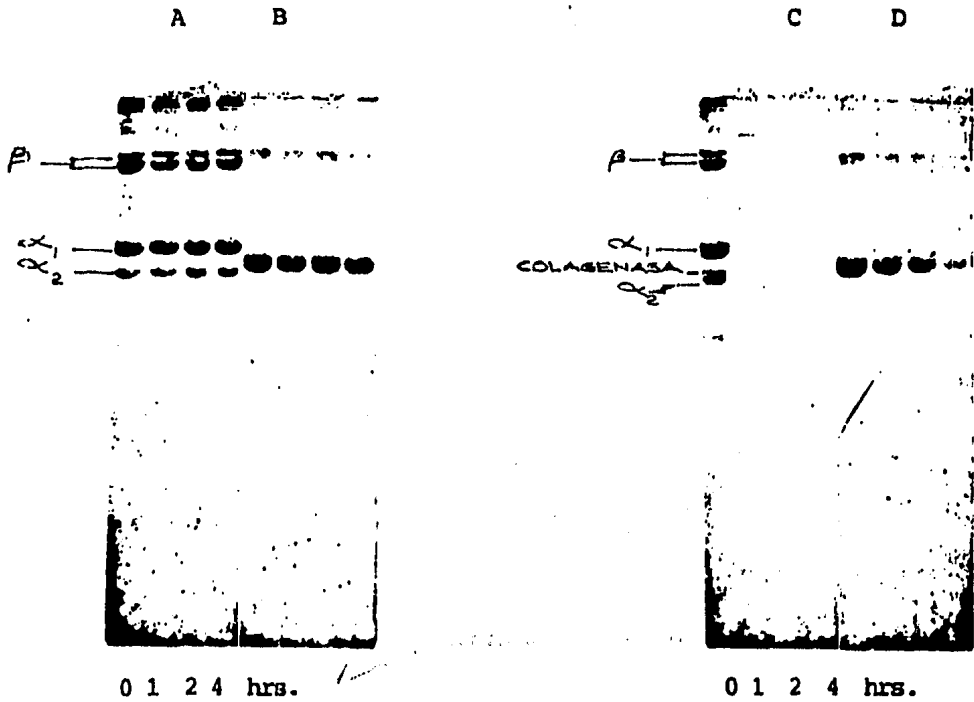


Fig. 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de colágena tipo I incubada durante 0, 1, 2 y 4 hrs. en presencia de tripsina (A) o colagenasa bacteriana (C) Colágena de Hermodice sp. in cubada a los mismos tiempos en presencia de tripsina (B) o colagenasa bacteriana (D).

tos con un patrón de bandas asimétrico, característica -
distintiva de estos agregados, observamos cristalitas -
que mostraron un bandeo aparentemente centrosimétrico.
(Fig. 14).

Las muestras resultantes de la segunda purifica -
ción, se obtuvieron cristalitas SLS que han mostrado ser
de dos tipos distintos. La fracción que precipitó con -
NaCl 0.6 M (fracción X), produjo cristalitas cuyo patrón
de bandas es similar al de las colágenas intersticiales:
tipos I, II, III (7) y al de varias colágenas de inverte
brados (14), (Fig. 13). Mientras que la fracción que -
precipita con NaCl 0.75 M (fracción Y) produjo cristali
tos con un patrón de bandas igual al de los cristalitas
obtenidos en la primera purificación: " Cristalitas tipo
H", (Fig. 13).

En la fig. 15 se muestra un cristalito de colágena
de Hermodice con tinción negativa. La longitud promedio
de estos cristalitas es de 277 nm, similar a la de los -
cristalitas obtenidos de las colágenas intersticiales de
vertebrados.

Algunos cristalitas obtenidos con la fracción A y
la fracción Y, teñidos negativamente, presentaron un pa
trón de bandas mixto y en ciertos casos se hizo aparente
la superposición de cristalitas orientados en sentido -
contrario. (datos no mostrados).

Además de los cristalitas SLS aislados, las prepa
raciones de colágena de Hermodice frecuentemente mostra
ron cristalitas unidos por sus extremos: cabeza-cabeza o
cola-cola, formando largas fibras de cristalitas.



Fig. 13. Cristalitos SLS con tinción positiva.

- A.- SLS tipo H de colágena de Hermodice
(fracción precipitada con NaCl 0.75 M)
- B.- SLS tipo I de colágena de piel de caba
yo.
- C.- SLS tipo I de colágena de Hermodice
(fracción precipitada con NaCl 0.6 M)

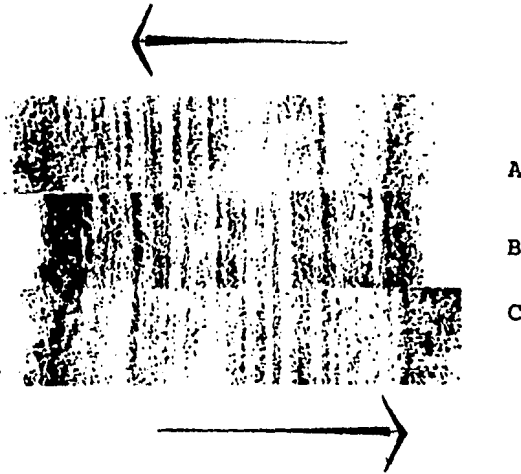
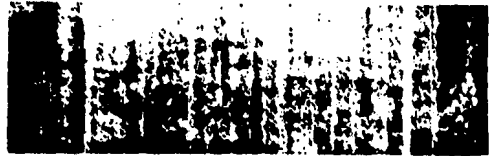


Fig. 14. Cristalitos SLS de colágena de Hermodice con un bandeo centrosimétrico. A) SLS tipo H asimétrico. B) SLS tipo H centrosimétrico. C) SLS tipo H asimétrico. Las flechas indican la orientación de los SLS asimétricos.

Fig. 15. Cristalitos SLS de colágena de Hermodice con tinción negativa.



D I S C U S I O N

Los resultados de los estudios bioquímicos realizados en las colágenas de invertebrados conocidas hasta el momento han revelado que éstas, presentan una mezcla de diferencias y semejanzas cuando se comparan entre sí o con respecto a las colágenas de vertebrados. La mayoría de estas colágenas, a excepción de las colágenas cuticulares de Anélidos y Nemátodos, han mantenido constantes una serie de características comunes de la estructura de la molécula de colágena.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo no se apartan de dicha descripción; tal como lo indican el tamaño de la molécula, el peso molecular de las subunidades que la componen, la susceptibilidad a colagenasas y la capacidad de agregarse en forma de cristalitas SLS.

El éxito en la extracción de la colágena de Hermodice se debió principalmente al uso de pepsina, ya que esta enzima permite una mayor solubilización de las moléculas de colágena sin degradarlas, salvo en sus extremos, donde corta a los telopéptidos, sitio en el que usualmente se localizan los enlaces covalentes. Además cabe mencionar que esta colágena se agrega espontáneamente a pH neutro, lo que indica que probablemente se encuentra en estado activo, ya que se sabe que mientras menos degradada se encuentre una colágena, más fácilmente se agrega.

Por lo que respecta a la purificación, el patrón electroforético de la colágena de Hermodice sp, obtenida

en la primera purificación, muestra dos bandas que migran a la altura de los dímeros beta y una sola banda que migra a la altura de las subunidades alfa. Estos resultados son aparentemente contradictorios, ya que la presencia de dos bandas de dímeros beta sugiere que pudiera haber dos tipos de colágenas, mientras que la presencia de una sola banda a la altura de las cadenas alfa indicaría un único tipo de colágena.

Por lo anterior, decidí llevar a cabo una nueva purificación de la colágena de Hermodice, en la cual varié las concentraciones empleadas de NaCl en la precipitación diferencial para tratar de separar de esta manera los posibles tipos de colágena presentes.

Al correr las electroforesis de las muestras resultantes (Fracciones X e Y) se encontró que en ambas había una sola banda a la altura de los dímeros beta, con una migración igual y una sola banda entre las cadenas alfa con la misma migración aparente; estos datos indicarían la existencia de un mismo tipo de colágena en las dos fracciones.

Sin embargo, los cristalitos SLS obtenidos en una y otra muestra fueron diferentes. La fracción X, precipitada con NaCl 0.6 M, hace cristalitos SLS tipo I con un patrón de bandas igual al de las colágenas intersticiales de vertebrados, mientras que la fracción Y, precipitada con NaCl 0.75 M, hace cristalitos tipo M con un patrón de bandas igual a los cristalitos obtenidos en la primera purificación.

El hecho de encontrar cristaliticos SLS diferentes, nos indicaría la existencia de tipos de colágena distintos con una composición de aminoácidos diferentes para cada uno, ya que sabemos que los cristaliticos SLS representan una imagen de la molécula de colágena y su patrón de bandas un reflejo de la distribución de aminoácidos cargados.

Para corroborar esta posibilidad hemos planeado llevar a cabo análisis de aminoácidos de las fracciones X e Y así como de cada una de las subunidades alfa aisladas mediante un sistema electroelución en gel de poli acrilamida; con estos estudios esperamos obtener la suficiente información para saber si en el músculo de Hermodice existen dos tipos diferentes de colágena intersticial.

Otra manera de encontrar si esta opción es la correcta, sería utilizar un sistema que se fundamente 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, arginina o glutamina (33). Si tratamos con formaldehído una solución de colágena lo suficientemente diluída para que esta reacción sólo ocurra intramolecularmente, se obtendría una solución constituída únicamente por trímeros (34), los cuales en principio podrían ser resueltos mediante una cromatografía de intercambio iónico como una o dos especies moleculares.

La posibilidad planteada por este trabajo: que es el músculo de Hermodice coexistan dos tipos diferentes de colágena intersticial; resultaría un hallazgo de

sumo interés ya que, hasta ahora, esta situación ha sido descrita exclusivamente en tejidos de vertebrados. - Actualmente se asume que la gran complejidad de los tejidos de los organismos superiores (vertebrados) a diferencia de los invertebrados, requiere de la presencia - de varios tipos distintos de colágena intersticial, cuya diferente distribución en el organismo tiene que ver - con la función y desarrollo de cada tejido u órgano en particular; si se corrobora la existencia de más de un tipo de colágena intersticial en los tejidos de invertebrados habría que reconsiderar estas suposiciones.

Los datos de peso molecular y composición de subunidades para la colágena de Hermodice se obtuvieron - por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, tomando como patrón a la colágena tipo I de - cobayo, encontrando que esta colágena está formada por un solo tipo de subunidades alfa, cada una con un peso molecular aproximadamente de 100 000.

Existe una estrecha correlación entre el peso molecular de las subunidades y el tamaño de la molécula - revelado por el microscopio electrónico, sugiriendo una estructura de la colágena de Hermodice similar a la de las colágenas intersticiales de vertebrados: una molécula de 277 nm. de longitud formada por tres subunidades con un peso molecular de 100 000 cada una.

Una de las propiedades generales de cualquier tipo de colágena es la susceptibilidad a colagenasas, enzimas que degradan colágena nativa en solución y colágena en fibras bajo condiciones fisiológicas de pH y temperatura.

La colágena del músculo de Hermodice, fue susceptible a la colagenasa bacteriana; sin embargo, para este ensayo se requirieron tiempos de incubación hasta de 20 horas, para que se degradara completamente, ya que a pH neutro esta colágena precipita, probablemente formando fibras. Se sabe que la velocidad de degradación por colagenasa es dependiente del estado de agregación del sustrato, siendo mayor para el sustrato soluble y menor para las formas agregadas.

El hallazgo de encontrar cristalitos SLS con un patrón de bandas centrosimétrico es poco frecuente, ya que un bandeo centrosimétrico es característico de los FLS, patrón que resulta de la agregación de moléculas de colágena que no se orientan en la misma dirección. La presencia de este tipo de cristalitos SLS podría haberse debido a la exacta superposición de cristalitos orientados en sentido contrario; superposición que se hizo aparente en algunos cristalitos teñidos negativamente.

Haciendo un análisis general de los resultados obtenidos en este trabajo, es claro que la colágena aislada del músculo de Hermodice pertenece al grupo de las colágenas intersticiales y que funcional y estructuralmente está más relacionada a las colágenas intersticiales de los vertebrados que a su propia colágena cuticular; más aún, la posibilidad de que en un mismo tejido puedan coexistir dos tipos de colágena cumpliendo ambas una función intersticial, daría un nuevo enfoque en el estudio de las colágenas de Invertebrados y en la evolución de esta proteína.

Hasta ahora la línea evolutiva de la colágena no es clara. Diferentes autores han orientado de manera - distinta los aspectos filogenéticos de la molécula de - colágena. En los trabajos de Pikkarainen (35), se su - giere que la colágena estaba compuesta originalmente - por un solo tipo de cadenas alfa. El gen primordial de las cadenas alfa pudo haberse duplicado posteriormente, - quizá a nivel de peces óseos y mutaciones individuales - de estos genes dieron lugar a las cadenas alfa 1 y alfa 2.

Sin embargo, se han encontrado colágenas forma - das por subunidades alfa distintas, parecidas a las colá - genas tipo I de vertebrados en grupos tan primitivos - como los platelmintos: Cysticercus c. (22), en varias es - pecies de moluscos como el pulpo y el calamar y algunos - artrópodos, como la langosta y el cangrejo. (20).

Kimura y colaboradores (36) han interpretado la presencia de colágenas tipo I o similares al tipo I de - vertebrados en grupos de Protostomados y Deuterotómados indistintamente, como el resultado de una evolución de - líneas filogenéticas independientes. Y han propuesto - una clasificación de las colágenas de invertebrados ba - sándose en el peso molecular y composición de subunida - des, subdividiéndolas en :

- Colágenas Intersticiales: en las cuales encon - tramos colágenas for - madas por subunida - des alfa iguales y - otras constituídas - por dos cadenas alfa distintas.

- Colágenas de Membrana Basal.

- Colágenas Cuticulares.

Otras clasificaciones propuestas para estas colágenas se basan en la morfología y función que desarrollan las fibras de colágena (37), teniendo colágenas de la matriz intercelular, colágenas de revestimiento y colágenas esqueléticas (esponjina de algunos Poríferos).

A pesar de la variabilidad de criterios, es conclusión general resaltar la persistencia de las colágenas intersticiales en todos los grupos de metazoarios, como consecuencia del papel fundamental que juega la matriz intercelular en todos los fenómenos de coordinación celular; la presencia de colágenas especializadas, tanto en vertebrados como en Invertebrados, es probablemente un reflejo de requerimientos tisulares específicos.

No es sino a nivel de secuencia primaria donde se encuentran diferencias significativas en todos los tipos de colágena, por lo tanto, es fundamental conocer la estructura primaria de las distintas especies de colágena, comparar sus secuencias y, de esta manera, tener un punto de partida en la construcción de árboles filogenéticos. Probablemente se encontrará que durante la evolución de las colágenas intersticiales, fueron necesarios pequeños cambios conservativos para adaptar esta proteína fibrilar a una misma función en diferentes grupos animales.

BIBLIOGRAFIA

1. Nimni, M.E., Collagen: Structure, Function and metabolism in Normal and Fibrotic Tissues. Seminaris in Arthritis and Rheumatism. 13: 1-86, 1983.
2. Eyre, D. R., Collagen: Molecular Diversity in the Body's Protein Scaffold. Science 207: 1315, 1980.
3. Minor, R. R., Collagen Metabolism. Ame. J. Pathol. 98: 228-267, 1980.
4. Prockop, D.J., R.A. Berg, K.I. Kivirikko y J. Vitto, en: - Biochemistry of Collagen (Ramachandran, G.N., y A.H. Reddi Eds.). Plenum, New York, 1976.
5. Bornstein, P y H. Sage, Structurally Distinct collagens types. Ann. Rev. Biochem. 49: 957-1003, 1980.
6. Yamada Y., E. Awechmento, M. Mudrys, H. Ohkubo y G. - Vogeli, The Collagen Gene: Evidence for its - Evolutionary Assembly by Amplification of a - DNA segment containing an Exon of 54 bp. Cell 22: 887-892, 1980.
7. Kuhn. K., Segment Long Spacing Cristallites, a powerful tool in collagen research. Collagen Rel Res. 2:61-80, 1982.
8. Gross, J., Collagen. Scientific American 204: 120-130, 1961.
9. Bruns, R y J.Gross, Band pattern of segment-long-spacing - form of collagen. Its use in the analysis of primary structure. Biochemistry 12:808-815. 1973.

10. Adams, E., Invertebrate collagens. Science, 202: 591 - 597, 1978.
11. Evans, J.H. C.E. Sullivan y K.A. Piez, The resolution - of Ascaris cuticle collagen into three chain types. Biochemistry 15: 1435-1439, 1976.
12. Fujimoto D. y E. Adams., Intraspecies composition difference in collagen from cuticle and body of - - Ascaris and Lumbricus. Biochem. Biophys. - Res. Comm. 17: 437-442, 1964.
13. Kimura, S. y M. Tanzer, Nereis cuticle collagen: Isolation and characterization of two distinct subunits Biochemistry. 16:2554-2560, 1977.
14. Spiro, R.G. y V.D. Bhoyroo, Studies on the carbohydrate of collagens.Characterization of a glucuronic - acid-mannose disaccharide unit. J. Biol. - Chem. 255: 5347-5354, 1980.
15. Nordwig, A y U. Hayduk, Invertebrate Collagens: Isolation - Characterization and Philogenetic Aspects. - J. Mol. Biol. 4: 161-172, 1968.
16. Norwig, A. F. Rogall y U. Hayduk, The Isolation and charac-terization of collagen from three invertebra-te tissues. En: Chemistry and Molecular Bio-logy of Intercellular matrix (Balazs, E.A. - Ed.) Vol. I Academic Press, 1970.
17. Schumt, O., P. Roll y M.E. Reich. Biochemical and Electron-microscopic Investigations on Helix pomatia Collagen: 1980.

18. Ashhurst, D. y A. Bailey. Locust collagen: Morphological - and Biochemical Characterization. Eur. J. Biochem. 103: 75-83, 1980.
19. Francois, J., D. Herbage y S. Junqua, Cockroach Collagen : Isolation Biochemical and Biophysical Characterization. J. Biochem. 112: 389-396, 1980.
20. Kimura S., y Takema y M. Kubota, Octopus Skin Collagen. - Isolation and Characterization of collagen-comprising two distinct alfa chains. J. Biol. Chem. 256: 13230-13234, 1981.
21. Takema, Y. y S. Kimura, Two genetically distinct molecular species of octopus muscle collagen. Biochem. Biophys. Acta 706: 123-128, 1982.
22. Torre Blanco, A y I. Toledo The Isolation, Purification and Characterization of the Collagen of - - - - Cysticercus cellulosae, J. Biochem. 256:5926-5930, 1981.
23. Torre Blanco, A. The collagen of Cysticercus cellulosae: - a study in the comparative biochemistry of - collagen. En: Cysticercosis: Present state - og Knowledge and perspectives (Academic Press Inc.) 423-436, 1982.
24. Junqua, S., L. Robert, R. Garrone y J. Vacelet, Biochemical and Morphological studies on collagens of - horny sponges. Ircinia filaments compared to spongines. En: Connective Tissue Research. (Gordon and Breach Science Publishers LTD) Vol. 2: 193-203, 1976.

25. Fujimoto, D., Isolation of collagens of high hidroxyproline, hidroxylysine and carbohydrate content from muscle layer of Ascaris lumbricoides and pig kidney. Biochem. Biophys. Acta. 169: 537-543, 1968.
26. Chung-Ho, H., R. Burkawski y B. Hudson, Intestinal Basament Membrane of Ascaris suum. Properties of - - collagenous domain. J. Biol. Chem. 252: 4964-4971, 1980.
27. Ayala S.J., Aislamiento y purificación de la colágena de la capa muscular de Ascaris. Tesis profesional Fac. Ciencias, UNAM. 1982.
28. Woessner, J.F., The determination of Hidroxiproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. Archives of Biochem. and Biophys. 93: 440-447, 1961.
29. Rojkind, M y E. González, And improved method: for determining specific radioactives of Proline-14 C - and Hidroxiproline-14 C in collagen and in - noncollagenous proteins. Analitical Biochemis try 57: 1-7, 1974.
30. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the - assembly of the head of bacteriophage T4, - Nature, 227: 680-685, 1970.
31. Hayashy, T. y Y. Nagai, Separation of the alfa Chains of type I and III collagens by SDS-Polycrylamide Gel Electrophoresis. J. Biochem. 86: 453-459, 1979.

32. Sakai, P. y J. Gross, Biochemistry 6: 51 p. 1967.
33. Veis, A. y M.P. Drake, The introduction of Intramolecular covalent cross-linkages into ichthyocol - tropocollagen with monofunctional aldehydes. J. Biol. Chem. 238: 2003-2011, 1962.
34. Nold G. J., Kang A.H., and Gross J. Collagen molecules: - Distribution of alpha chains. Science, 170: 1096-1098, 1970.
35. Pikkarainen, J. y E. Kilonen, Scand, J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 95: p. 40, 1967.
36. Kimura, S., y T. Kuroyuki, Annelid skin collagen: occurrence of collagen with structure of (1) 2 in - - - Urechis Unicinctus. Comp. Biochem. Physiol. 75B: 681-684, 1983.
37. Garrone, R., Le collagene des Invertebres: Matrice intercellulaire, squelette ou revetement ?. Extrait du bulletin de la Societe Zoologique de France. Tome 107, No. 3, p. 387. 1982.
38. Trelstad R. L. Le collagene, La recherche, 12: 312-321, 1981.