



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PURIFICACION DE LA COLAGENASA
DE COBAYO**

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 :

NOEMI MERAZ CRUZ

MEXICO, D. F.

INVIERNO, 1988



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.

CONTENIDO

	Pag.
I. Introducción	1
II. Experimentos	
-Material y Método	21
-Resultados	33
III. Discusión	53
IV. Conclusiones	58
V. Referencias Bibliográficas	59

INTRODUCCION

Uno de los temas más fascinantes en la investigación actual en el campo de la Biología del Desarrollo, lo constituye el estudio de los factores que condicionan la morfogénesis de los sistemas biológicos, dentro de los cuales, las matrices extracelulares tienen un papel preponderante. Este papel se debe a que durante la diferenciación de un tejido, la formación de un órgano o el desarrollo de un organismo en un tiempo y espacio definidos, durante el ciclo de vida de un individuo, la expresión del genoma celular se ve modulada por las condiciones del microambiente extracelular.

No hace muchos años se consideraba que este microambiente extracelular, que constituye cerca del 50% de los organismos vertebrados adultos, era una entidad estática, y se creía que las moléculas ahí presentes servían únicamente como el cemento intercelular que proporcionaba soporte a las células. Este concepto se ha modificado sustancialmente y hoy en día contamos con suficientes evidencias, producto de los estudios realizados por diversos investigadores en los campos de la Biología Celular, la Embriología, la Bioquímica y la Patología

Experimental, que muestran que las matrices extracelulares, además de soporte, son un compartimento dinámico en constante y reciproca interacción con las células⁶³.

Las macromoléculas que constituyen las matrices extracelulares presentan la capacidad de asociarse entre sí, formando grandes agregados macromoleculares caracterizándose por ser polímeros iónicos lineales, tales como: glicosaminoglicanos, proteoglicanos, glicoproteínas y proteínas⁶⁷.

Una clase de glicoproteínas que se encuentran en todas las matrices extracelulares de animales multicelulares, lo constituyen las colágenas⁷. El contenido y el tipo de colágena cambia apreciablemente durante el crecimiento, desarrollo y morfogénesis, así como también en ciertos procesos patológicos. En los mamíferos adultos, las colágenas constituyen el 30% de las proteínas totales, está considerada como la proteína más abundante, siendo el constituyente mayor de algunos tejidos como los huesos, los tendones y la córnea, quienes presentan más del 70% del peso seco, en cambio, otros tejidos como el hígado contienen solo un 5% de colágena en condiciones normales⁷⁴.

Las colágenas son una familia de proteínas fibrilares catiónicas codificadas por diversos genes⁹, que poseen en común las siguientes características moleculares:

La cadena polipeptídica contiene cerca de un 30% de glicina, distribuida cada tercer residuo en grandes zonas centrales. Tiene además 20% de prolina e hidroxiprolina y un 15% de alanina, lo cual es poco usual en otras proteínas. Normalmente la presencia de prolina interrumpe la formación de la alfa hélice en una cadena polipeptídica, pero en la colágena, debido a su alto contenido y a la secuencia con que se presenta (glicina - prolina - y) o (glicina - x - hidroxiprolina) según sea el caso, permite que la molécula llegue a configurarse en una hélice con características muy propias: su giro es hacia la izquierda, carece de puentes de hidrógeno y tiene sólo tres residuos de aminoácidos por vuelta^{23.45}.

Geométricamente la unidad estructural de la colágena, se puede considerar como un cilindro de 300 nm de longitud y 1.4 nm de diámetro, con un peso molecular de 300 000 d⁷⁰. Además la composición particular de aminoácidos de la colágena también determina que se establezca la asociación de tres cadenas polipeptídicas (constituidas aproximadamente por 1050 residuos de aminoácidos) formando una triple hélice (Fig. No. 1), estabilizada por puentes de hidrógeno entre hidroxiprolina y glicina de cadenas adyacentes, así como entre aminoácidos polares y moléculas de agua que rodean a la microfibra. Los residuos de aminoácidos de los extremos amino y carboxilo terminal de la cadena polipeptídica (procolágena)- llamados péptidos de extensión- no forman parte de la triple hélice, pero intervienen en su formación, por los enlaces covalentes (-S-S-) que establecen con aminoácidos de otra procolágena (Fig. No. 1).

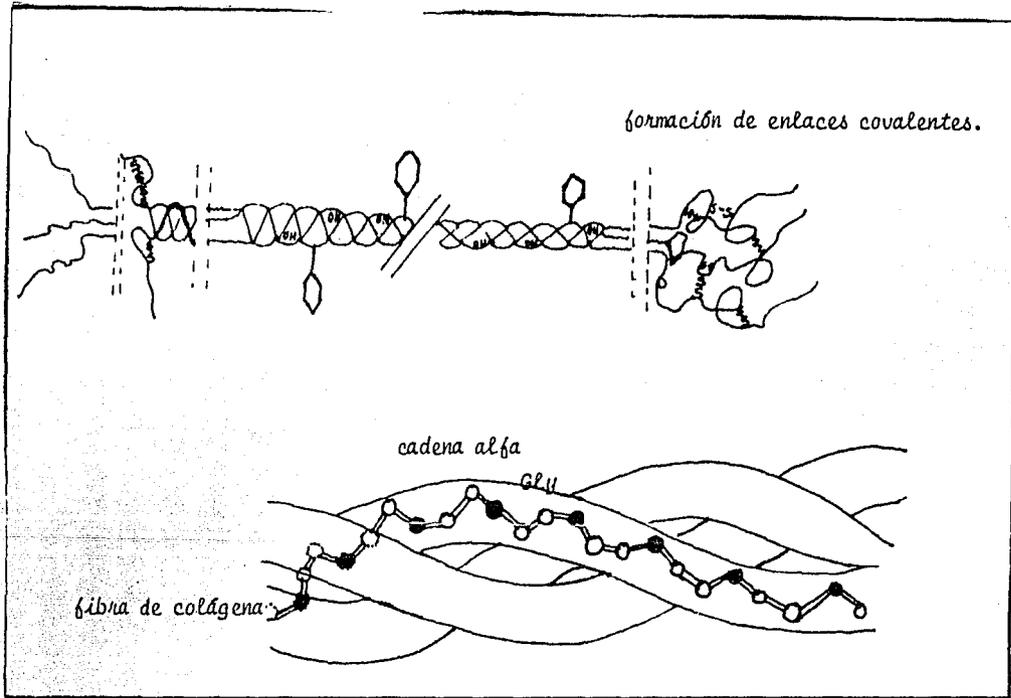


Fig. 1 Representación esquemática de una molécula de colágena.

El grupo hidroxilo de la hidroxiprolina permite el establecimiento de puentes de hidrógeno entre las cadenas que forman la triple hélice (dando rigidez y estabilidad). Por otra parte el hidroxilo de la lisina establece uniones covalentes -I con carbohidratos y éstos a su vez permiten la unión entre distintas moléculas para formar una fibra.

Los estudios moleculares de la colágena, revelan que los genes de las cadenas de esta proteína son de los más complejos que se conocen, con cerca de 50 exones separados, el gene es diez veces mayor que el RNA_m funcional*,

El trímero (procolágena) se sintetiza intracelularmente y es secretado al medio extracelular. La molécula de procolágena puede ser atacada por proteasas específicas, que le cortan los péptidos de extensión formando posteriormente, agregados macromoleculares más complejos en el medio extracelular como fibras, colágena tipo I, II y III, ~~mallas~~, colágena tipo IV o microfibrillas, colágena tipo V, VI y VII^{9.47.80} (tabla No.1).

El tipo de agregado macromolecular complejo que se formará va a depender, entre otras cosas, del tipo de cadena polipeptídica que integre la triple hélice. Estas cadenas pueden ser similares pero no idénticas en su estructura primaria, ya que son producto de transcripción de diferentes genes⁴⁷. Así por ejemplo se han podido identificar varios tipos de polipéptidos: $\alpha 1$ (I, II, III, IV, V), $\alpha 2$ (I, IV, V), $\alpha 3$ (V), $\alpha 4$ (V), que difieren en:

- a) Composición de aminoácidos.
- b) Secuencia de aminoácidos.
- c) Contenido de segmentos no helicoidales también llamados dominios no colagénicos.
- d) Modificaciones postraduccionales:

* Pérdida de fragmento aminopéptido de la procolágena.

Tipo	Fórmula	Agregados	Localización	Contenido de	Glicoproteínas
Colágena	Molecular	Macromoleculares		hidroxilisina	asociados
		Ultraestructura		y carbohidratos	
I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$	Se asocia en haces paralelos, constituyendo FIBRAS estriadas de diferentes diámetros.	intersticial, piel, tendón, huesos, córnea, ligamentos, vasos sanguíneos, músculo liso, 90% de la colágena total del organismo.	bajo	dermatán sulfato
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Forma una red de FIBRAS finas estriadas o no.	intersticial, cartílago, humor vítreo, notocorda.	alto	condroitin sulfato
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Pequeñas FIBRAS asociadas a colágena - tipo I.	intersticial, piel, aorta, hígado, pulmón, asociada a fibras reticulares.	bajo, pero de hidroxiprolina alto.	heparán sulfato
IV	$[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 2(IV)$	MALLA	Membranas basales, glomérulo de riñón, cápsula - del cristalino.	muy alto	
V	$[\alpha 1(V)]_2 \alpha 2(V) \alpha 3(V)$? desconocido	Pericelular, placenta, piel, estroma pericelular, intersticial.	alto	
VI	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$	Agregados MICROFIBRILARES de alto P. M. (dímero, tetramero, filamento) estabilizado por puentes disulfuro.	vasos sanguíneos, útero, placenta, ligamentos, piel, pulmón.		
VII	$\alpha 1(VII)$	Sola o en forma de dímero MICROFIBRILAR	Fibras de anclaje de membranas basales.		
VIII	$\alpha 1(VIII)$	hélices pequeñas.	Células endoteliales.		
IX	$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX), \alpha 3(IX)$	Especie menor de - cartílago.	Cartílago		
X	$[\alpha 1(X)]_3$	Especie menor de - cartílago.	Cartílago		
XI	$1 \alpha 2 \alpha 3 \alpha$	Especie menor de - cartílago.	Cartílago		

TABLA No. 1

Características de los tipos conocidos de colágena.

- * Pérdida del péptido de extensión carboxilo terminal.
 - * Grado de hidroxilación. El contenido de hidroxilisina es mayor en la cadena α_1 (IV) que en α_1 (II) < 2 (I) < (I y III).
 - * Grado de glicosilación. La colágena tipo IV es mas rica en glucosa y galactosa.
- e) Contenido de enlaces covalentes inter e intra moleculares.

En condiciones normales, el recambio de colágena es sumamente lento; y dependiendo de los estados fisiológicos, su vida media es larga, variando de 60 a 300 días, aunque existen algunos tejidos, como en el útero postparto que puede llegar a ser de 24 h²³. Se ha observado que existe un equilibrio entre la síntesis y la degradación de esta molécula; y que esta dinámica está asociada con la proporción célula-colágena, que es constante para cada tejido. En ciertos estados patológicos se ha visto que hay una alteración de esta proporción. Existen diferentes factores que determinan y regulan las variaciones cuantitativas de la colágena. A nivel de depósito, estos factores dependen de cada elemento que interviene en la biosíntesis de esta proteína. En lo que respecta a su degradación, la colágena en estado nativo no es susceptible a enzimas proteolíticas inespecíficas, salvo la elastasa de leucocitos polimorfonucleares²⁰ que tiene acción sobre la colágena tipo III y la Catepsina G que actúa a pH ácido, degradando a la molécula en sus regiones -no-helicoidales. También se ha observado que la colágena tipo III es susceptible a ser atacada por otras proteasas tales como la tripsina. Sin embargo la molécula de colágena puede ser

degradada por un grupo específico de enzimas: LAS COLAGENASAS.⁸

Diferentes tipos de colagenasas se han identificado. En base a sus propiedades físicas y por la especificidad del sustrato en diferentes tipos de colágena. Existen reportes de colagenasas que degradan colágenas intersticiales, tipo I, II y III, pero que no pueden degradar colágenas tipo IV y V⁹⁴, las cuales aparentemente son degradadas por otras proteasas.

A través del estudio de las colagenasas animales, se ha observado que comparten características comunes independientes de sus diferentes orígenes:

1. Estas enzimas no se almacenan sino que se liberan de novo, solo existen dos casos de almacenamiento: en leucocitos polimorfonucleares⁷⁷ y en placenta⁹¹.
2. Muestran mayor especificidad por el sustrato en estado nativo y poca afinidad por el sustrato desnaturalizado que es la gelatina⁴⁸.
3. La enzima corta a la molécula nativa de colágena en un locus específico, dando lugar a dos fragmentos que corresponden a tres cuartas partes de la molécula (amino terminal), que se denomina TC⁹⁷⁵ y el otro fragmento, que es carboxiterminal, vendría siendo la cuarta parte restante y se llama TC²⁵²⁵⁻⁹⁰ (Fig. No. 2).

-Modelo de la acción específica
de la colagenasa animal sobre
la molécula nativa de colágena.

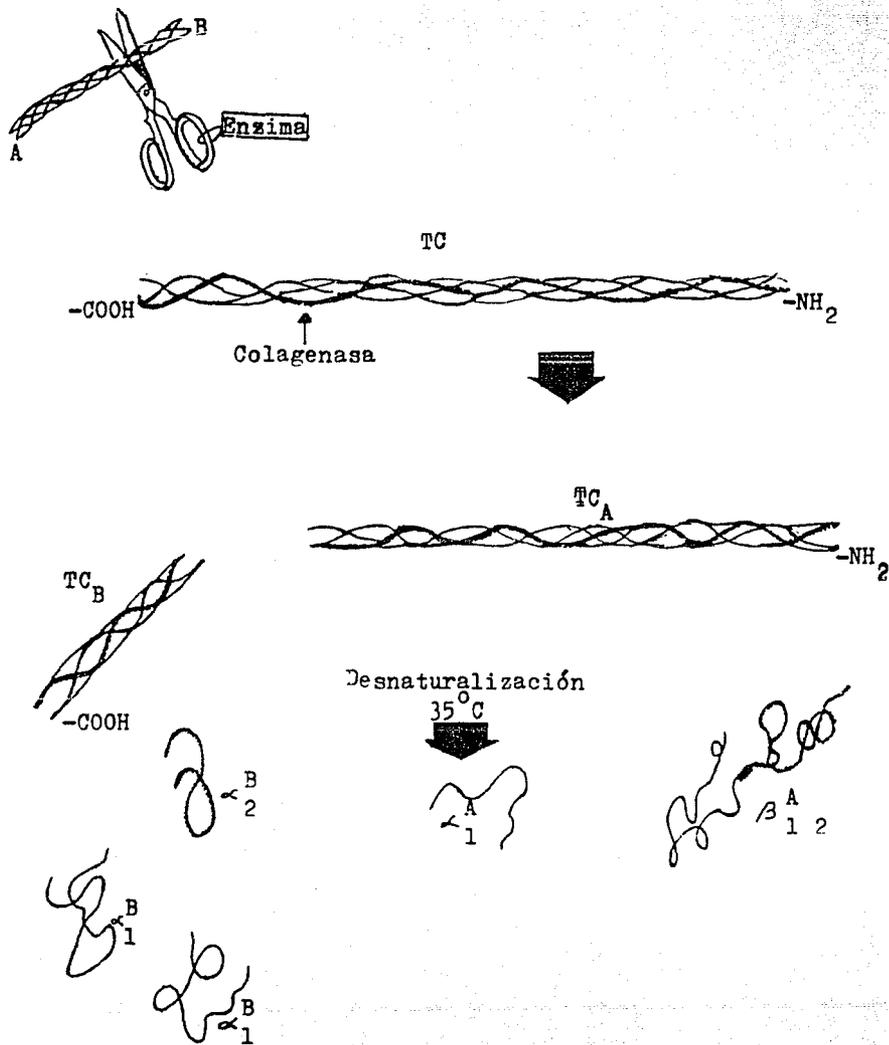


Fig. 2

4. Son metaloenzimas que actúan a un pH neutro.

5. Se ha reportado que las colagenasas pueden contener zinc en el sitio catalítico⁶⁶. Requieren calcio para su actividad, siendo sensibles a inhibidores como el EDTA, la cisteína, la ortofenantrolina y otros compuestos quelantes³²⁻⁶⁹. En el suero sanguíneo existen también proteínas inhibitoras de la colagenasa como la α_2 macroglobulina, que inhibe a la mayor parte de las proteasas, la β_1 y la β tromboglobulina²⁶⁻²⁹. Existen también otro tipo de inhibidores denominados "inhibidores de metaloproteasas de tejidos" (TIMP), que son glicoproteínas de alrededor de 30000 d. y que se unen estequiométricamente a la colágenasa activa así como a otras proteasas del tejido conjuntivo. Estos inhibidores se han encontrado en hueso de conejo, líquido sinovial y amniótico³¹, piel humana⁷¹ y otros tejidos.

6. El peso molecular de las colagenasas oscila generalmente de 25000 a 60000 daltones²⁴⁻²⁶, aunque existen reportes de colagenasas con peso molecular de 16500 d, el cual corresponde a la enzima de riñón de rata⁷⁹; 21000 d, para la del humor acuoso humano⁸²; 137000 d, para la de hueso de cobayo¹⁰; y de 158000 d, para la de córnea de conejo⁴⁰.

7. No todas las colagenasas intersticiales son iguales, un caso demostrativo es: la colagenasa proveniente de granulocito humano, que puede degradar colágenas intersticiales, difiriendo de otras con igual capacidad en

cuanto a: afinidad por el sustrato⁴¹, en peso molecular⁴² e inmunológicamente³⁵, lo cual indica que también existen diferencias entre colagenasas del mismo grupo.

8. Estudios inmunológicos sobre colagenasas reportan que:

-Las colagenasas obtenidas de diferentes fuentes de tejidos del mismo individuo revelan identidad inmunológica.

-Las colagenasas derivadas de diferentes individuos de la misma especie son también idénticas inmunológicamente.

-Hay algún grado de reacción cruzada entre colagenasas de especies muy relacionadas filogenéticamente, por ejemplo: la identidad interespecie entre las colagenasas de piel de rata y ratón⁴².

Gross y Lapière en 1962⁴⁴, reportaron el primer método in vitro para demostrar la existencia de una colagenasa específica endógena en tejidos animales (reabsorción de la cola del renacuajo). Este trabajo hizo dos aportaciones: una conceptual (primeros datos sobre la actuación de la enzima) y otra metodológica (cultivo de explantes de tejido sobre geles reconstituidos de colágena). Actualmente, se han identificado colagenasas de vertebrados en diferentes tejidos y tipos de células^{24, 25, 26, 27, 28, 29} (Tabla No. 2). Además, estudios

COLAGENASAS ANIMALES

ESPECIES	LUGAR DE ORIGEN (tejido, célula u órgano)
Bovino	Gingiva ⁷ .
Cabra	Hueso ⁶² .
Cangrejo	Hepatopáncreas ¹⁵ .
Cerdo	Synovia ⁶² .
Cobayo	Piel (normal y herida) ⁴² , hueso ³⁰ , granuloma ⁶⁶⁻⁶¹ , macrófagos ⁴⁶ .
Conejo	Piel herida ¹² , córnea ⁴⁰ , synovia ⁶³ , hueso ⁶² utero, colon, cartilago, granuloma ⁶⁰ , tumores ⁴⁷ , fibroblastos ⁴⁰ , macrófagos ⁶¹ .
Pollo	Piel (estado adulto y embrionaria), hueso ⁶⁴ .
Humano	Piel (adulto y estado embrionario) ¹⁴ , hueso ¹⁹ , synovia (líquido y células) ²² , gingiva ²⁰ , riñón, córnea ⁶ , estómago, articulaciones, tumores ² , granulocitos ⁵⁵ , macrófagos alveolares, fibroblastos ⁵ , nodulos ³¹ , leucocitos ⁵⁵ , oído medio ¹ .
Lagartija acuática	Regeneración de miembros ¹³ .
Perro	Brote de dientes ⁶² .
Pescado	Piloro ⁶² .
Rata	Piel ⁵⁴ , útero ⁵⁰ , hueso, córnea, hígado, riñón, granuloma ⁶² , tumores, células de Kupffer ¹⁰ , eosinófilos, neutrófilos.
Raton	Piel ⁶⁷ , hueso ⁷⁰ , utero, hígado ⁶² , macrófagos.
Renacuajo	Cola, piel ⁵³ .

Tabla No.2

moleculares revelan secuencias específicas de algunas colagenasas, por ejemplo: la secuencia de la colagenasa de fibroblastos de piel humana¹⁶, se ha determinado también la secuencia completa del clon DNA_c, representando el tamaño total del RNA_m de esta misma enzima. Observándose la estructura primaria de la colagenasa y su homología con diferentes oncogenes²¹.

Regulación:

El estado de agregación del sustrato es un factor regulador en la acción de la colagenasa²⁴; la colagenolisis es dependiente de la estructura de triple hélice y se ve disminuida en fibras insolubles estabilizadas por enlaces intermoleculares. Estudios *in vitro* han demostrado que la colágena llamada polimérica insoluble, rica en enlaces intermoleculares, no es susceptible al ataque por las colagenasas sin antes incubarse con enzimas lisosomales o proteasas del tipo de la catepsina D²⁵.

A través del estudio molecular de las colagenasas, se ha observado que existen diferentes niveles de regulación:

- a) Control de síntesis y subsecuente procesamiento de formas precursoras.
- b) Empaquetamiento y secreción de la proenzima.
- c) Activación de la procólagenasa.
- d) Actividad en el medio extracelular.
- e) Inhibición de la forma activa de la enzima²⁶.

Para abordar el primer nivel, en fenómenos inflamatorios o de remodelación extensa, se han reportado diferentes factores que modifican la cantidad de colagenasa que se sintetiza, tales como:

1. Hormonas, proteasas, prostaglandinas o linfoquinas

Se ha observado que la elevación de los niveles de progesterona previene la expresión de la colagenasa en el útero pre-parto de la rata y el descenso del nivel de la hormona después del parto puede ser la causa del comienzo de la degradación de la colagenasa³⁴.

En estudios de traducción de RNA_m en sistemas libres de células, se ha visto que las cadenas se sintetizan como pre-proenzima que contienen secuencias señal hidrofóbicas en el extremo amino terminal. Esta secuencia facilita su paso hacia el lumen del retículo endoplasmático rugoso, siendo hidrolizada posteriormente por endopeptidasas intramembranales^{4,75}.

2. También se ha visto que el factor celular mononuclear producido por macrófagos y monocitos, estimulan a los fibroblastos sinoviales o de córnea para aumentar la producción de colagenasa³⁴.

Las primeras formas precursoras de la colagenasa en vertebrados fueron identificadas independientemente por Harper en 1971 en tejido de renacuajo²⁹ y por Vaes en 1972 en medio de cultivo de osteocitos de conejo⁷⁶. Para dar una explicación a la latencia de la enzima que se reportaba en los diferentes tejidos, se han propuesto dos mecanismos principales de activación de la enzima, basándose en observaciones experimentales:

1) **ACTIVACION DE UNA PROENZIMA:** pudiéndose encontrar cualquiera de las siguientes situaciones:

a) **Activación espontánea de la proenzima:** Se basa en la observación de que la enzima latente se activa espontáneamente, sin que ocurra ningún cambio aparente en el peso molecular de la enzima al activarse^{26.69.70}.

b) **Activación de la proenzima por proteólisis:** En experimentos "in vitro", se ha observado que el ataque proteolítico de enzimas como la tripsina, activan a la enzima latente por la pérdida de un péptido de bajo peso molecular^{69.70}.

2) **ACTIVACION POR DISOCIACION DE UN COMPLEJO ENZIMA-INHIBIDOR:** Se ha observado que la activación de enzimas latentes "in vitro", puede llevarse a cabo por medio de agentes que interactúan con grupos sulfhidrilo; o bien por proteólisis; observándose cambios en el peso molecular de la enzima. Se han encontrado por otra parte, inhibidores específicos de la colagenasa, que al mezclarlos con colagenasas activas, establecen complejos que presentan características similares a las de las colagenasas latentes; siendo estos complejos reversibles²⁶.

Dada la importancia del proceso de activación como factor de regulación en la colagenolisis, muchos han sido los sistemas de cultivo de células y explantes donde se han descrito

activadores en diferentes medios de cultivo y se ha logrado activar a la proenzima in vitro mediante distintos tratamientos. En el modelo de reabsorción de la cola del renacuajo se reportó la existencia de un sistema proteolítico formado por diversos componentes capaz de convertir a la procólagenasa en su forma activa²⁰. También se ha observado que la colagenasa latente puede ser activada mediante una breve exposición a detergentes como el SDS en concentraciones del 1 o 2%, las cuales se consideran disociativas. Es probable que en este caso lo que está ocurriendo sea la separación de un complejo enzima-inhibidor²¹. La procólagenasa liberada por fibroblastos de piel humana puede activarse de manera espontánea que depende del tiempo y la temperatura y no manifiesta cambio en el peso molecular²². Grant, G. A. et al²², reporta que la enzima de fibroblastos de piel humana se sintetiza en forma de pre-proenzima con un peso molecular de 50092 d con un péptido señal de 19 aminoácidos de longitud. Los productos de secreción primaria de la enzima consisten en una forma glicosilada con un peso molecular de 57000 d y otro péptido que no sufre modificaciones con un peso molecular de 51900. La activación proteolítica de la enzima resulta de la remoción de 81 residuos de aminoácidos de la porción amino terminal de la enzima. Estudios realizados sugieren que la tripsina u organomercuriales pueden ser los responsables de activar a la procólagenasa, iniciando una reacción autoproteolítica intramolecular de la cual resulte la formación de la enzima activa. Otros reportes indican que, en medios de cultivo de sinovio de bovino existe un factor con actividad de interleucina 1 capaz de activar condrocitos para que sintetizen una proteasa involucrada en la activación de procólagenasa (CAP). Esta proteína es ácida, aparece como una doble banda de peso

molecular entre 56000 y 57000 d en electroforesis en SDS. La colagenasa es dependiente de la presencia de esta proteina para su activación; sin el activador no puede ser activada por tripsina o por APMA⁷⁴.

Colagenasa del Granuloma de Carragenina en Cobayo.

La Carragenina es un polisacárido sulfatado de alto peso molecular, obtenido de diferentes algas marinas, tales como: *Chondrus chispus*, *Gigartina millosa* y otras⁷⁵. Comercialmente se utiliza como estabilizador y gelificante de algunos alimentos. Se compone de dos diferentes polimeros conocidos como kapa () y lambda (). Al inyectarla subcutáneamente en el abdomen del cobayo *Cavia porcellus* (fig. 3) produce una reacción bifásica, que consiste en inflamación aguda y depósito de tejido conjuntivo en la etapa temprana y una posterior degradación que involucra aún al tejido circundante, este modelo experimental es: El granuloma de carragenina, útil en nuestro estudio sobre metabolismo de la colágena por ser un modelo sencillo y reproducible⁷⁶.

Este modelo ha permitido estudiar la regulación del metabolismo de colágena tanto en lo que se refiere a su biosíntesis como a la degradación. En el estudio del metabolismo de colágena, se ha dado un mayor énfasis en el laboratorio, a la regulación de la degradación de esta molécula, ya que su biosíntesis es mejor conocida y ha sido ampliamente estudiada. La degradación de colágena durante la remodelación de tejido conjuntivo es iniciada por una enzima específica llamada

Reino: Animalia
Filum: Vertebrata
Clase: Mammalia
Subclase: Theria
Infraclase: Eutheria
Orden: Rodentia
Superfamilia: Caviioidea
Familia: Caviidae
Genero: Cavia porcellus

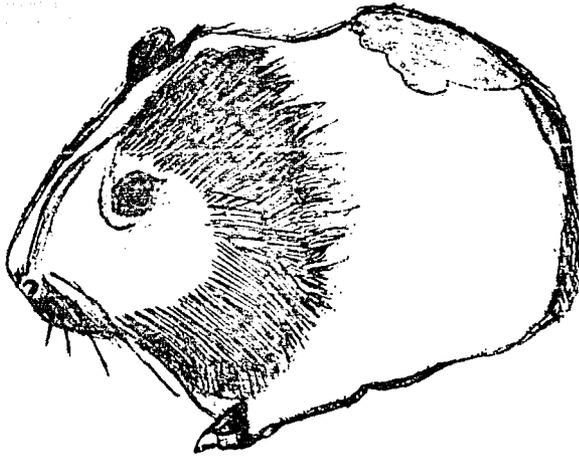


Figura No. 3

colagenasa. Esta proteasa neutra extracelular se aisló y caracterizó en el granuloma de carragenina⁶⁶. Se preparó un anticuerpo anticolagenasa y por técnicas inmunoenzimáticas, se demostró que la colagenasa se encuentra presente en el granuloma tanto en la etapa de acumulación de colágena como durante la reabsorción de la misma⁶⁶, asociada a las fibras de colágena en el espacio extracelular, esta observación confirmó hallazgos anteriores en relación a este tipo de asociación colágena-colagenasa⁶⁷. Al no encontrar diferencias en cuanto a la presencia de la enzima que permitieran explicar alguna de las posibles causas de este fenómeno bifásico, se procedió a estudiar la biosíntesis y degradación de colágena endógena en el granuloma, en ambas etapas de evolución. Los resultados de este estudio mostraron que en la fase inicial del granuloma la biosíntesis de colágena es mayor que durante la reabsorción y que aproximadamente la mitad de la actividad colagenolítica se encuentra en estado latente en la etapa de depósito mientras que toda la enzima está activa durante la reabsorción⁶⁷. La búsqueda de las células responsables de la síntesis de la enzima llevó al establecimiento de cultivos de fibroblastos del granuloma y a la estimulación de macrófagos peritoneales con carragenina, en este último sistema se demostró la liberación al medio de cultivo de colagenasa y gelatinasa⁶⁸.

El hecho de que en la etapa de depósito hubiera enzima latente y en reabsorción solo se presentara la forma activa, hizo sospechar la presencia de un mecanismo responsable de la activación.

OBJETIVO

Existen reportes contradictorios en cuanto al peso molecular de las colagenasas de cobayo, entre los que se citan: la colagenasa de piel con un peso molecular de 130000 d y 40000 d⁴² y la colagenasa de hueso de 137000 d y 29000 d¹⁰. El objetivo de este estudio es: caracterizar adecuadamente a la colagenasa del granuloma de carragenina en el cobayo y obtener un buen nivel de purificación, para la obtención de un anticuerpo.

Si tomamos en cuenta datos que en nuestro laboratorio sugieren además de la existencia de la enzima, la presencia de un activador, el objeto de esta tesis también es: separar el activador de la enzima del granuloma.

Además de utilizar las técnicas usuales de purificación (como son: centrifugación diferencial, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, filtración molecular, entre otras)³³, se explorará la posibilidad de usar colágena polimérica insoluble como soporte para cromatografía de afinidad.

METODOLOGIA

OBTENCION DE LA ENZIMA

1. Obtención de Granulomas de Carragenina:

Cuatro cobayos de ambos sexos, con peso de 400 a 500 g. se inyectaron subcutáneamente en la región abdominal con 5 ml de una solución de Carragenina (Viscarin 4.02, lot. No. 201508 Marine Colloids, Inc., Springfield, New Jersey) al 1% en NaCl 0.15 M. previamente dializada contra el mismo NaCl y esterilizada.

Para la obtención de granulomas se dejaron evolucionar siete días para la etapa de depósito, y catorce días para la etapa de reabsorción. Dos animales de cada etapa se anestesiaron ligeramente con éter y se sacrificaron por exsanguinación cardíaca⁵⁹. Se rasuró la piel del abdomen y se extrajo el granuloma; separándose cuidadosamente el tejido adiposo. Posteriormente, se cortaron fragmentos de aproximadamente 2 mm.

2. Cultivo de explantes:

Explantes de granuloma tanto de depósito como de reabsorción fueron cultivados por el método desarrollado por Gross, J.J. y Lapiere, C.M.²⁴; que consiste en conservar vivos fragmentos de tejido durante siete días, en un medio de cultivo ausente de suero. El cultivo de explantes, se llevó a cabo en condiciones estériles, utilizando cajas de petri de vidrio de 5 cm de diámetro con 5 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (Gibco lab. cat. No. 430-2100, Chagrin Falls Ohio) más antibióticos (penicilina sódica, 100 u/ml., estreptomina 100 ug/ml y Fungizone (Anfotericina B) 50 ug/ml). Los cultivos se mantuvieron durante siete días a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% aire. El medio de cultivo se colectó cada 24 h. y se substituyó por medio fresco. Una vez colectado, se centrifugó y ajustó pH y concentración de Ca²⁺ con Tris-HCl 1 M. y CaCl₂ 1 M para llevar a una concentración final de 0.05 M. y 0.01 M. respectivamente.

3. Concentración del Medio:

El medio colectado se precipitó con sulfato de amonio al 60% de saturación a una temperatura de 4°C, se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos a la misma temperatura. El precipitado obtenido fue resuspendido en amortiguador Tris HCl 0.05 M (pH=7.4), CaCl₂ 0.01 M, y se dializó exhaustivamente contra el mismo buffer.

PURIFICACION DE LA ENZIMA

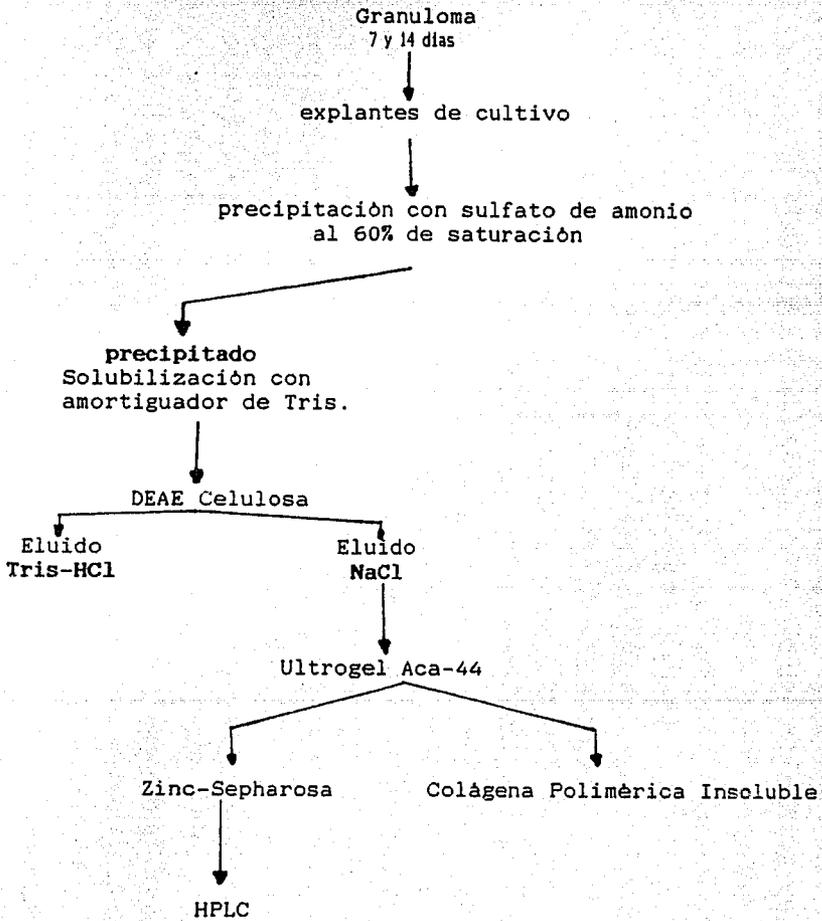


fig. 4

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

El medio concentrado se pasó por una columna de DEAE Celulosa , de 2 cm de diámetro por 10 cm de altura y se equilibró con amortiguador Tris HCl 0.05 M (pH=7.4), CaCl_2 0.01 M. 30 ml de la fracción total tanto de depósito como de reabsorción se corrió a un flujo constante de 30 ml/h colectando fracciones de 7 ml. La columna se lavó con el mismo amortiguador hasta que la absorbancia de las fracciones leídas a 230 nm fuera cero. Posteriormente se aplicó NaCl 0.25 M en 400 ml del amortiguador inicial para eluir la proteína unida a la resina.

Se determinó la actividad colagenolítica de las fracciones eluidas con Tris HCl 0.05M (pH=7.4), CaCl_2 0.01 M ; y de las fracciones eluidas con NaCl (muestras: depósito y reabsorción).

CROMATOGRAFIA EN ULTROGEL Aca - 44.

La fracción con actividad colagenolítica se concentró en una bolsa de dialisis con azúcar glass y se pasó a través de una columna de Filtración Molecular (Ultrogel ACA-44)de 2 x 95 cm, equilibrada con amortiguador Tris HCl 0.05 M (pH=7.4), CaCl_2 0.01 M, a un flujo de 60 ml/h. Se colectaron fracciones de 2.9 ml en un colector marca Gilson, midiéndose la densidad optica de cada fracción a 230 nm hasta que disminuyó a cero. Se determinó actividad colagenolítica del eluido.

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.

Las muestras con actividad colagenolítica eluidas de ultrogel Aca - 44, se dividieron en dos fracciones. Una de ellas se trató por cromatografía de afinidad con Zinc-Sepharosa y la otra por adsorción a colágena polimérica insoluble.

1. Columna de Zinc (Chelating Sepharosa 6B -Pharmacia-).

Se usó una columna de 1.4 cm de diámetro y 3 cm de altura, la cual una vez empacada se preparó con EDTA 0.25 M (pH=7.5), agua destilada y una solución de Zn 5 mg/ml en ácido acético 0.01 M. La columna se lavó con amortiguador Tris-HCl 0.05M (pH=7.4), CaCl_2 0.01 M y se aplicó un flujo constante de 60 ml/h.

La fracción que no se pegó a la columna, se lavó con Tris-HCl 0.05 M (pH=7.4), CaCl_2 0.01M hasta que la lectura a 230 nm fue cero. Después se agregó imidazole 0.1 M, CaCl_2 0.01 M (pH=7) con el objeto de eluir la fracción que tenía afinidad por el Zinc.

2. Colágena polimérica insoluble.

La colágena polimérica fue obtenida de tendón de vaca de acuerdo al método de Steven, F. S.²⁶, el cual es resumido en la fig. 5. Se colocó en Tris-HCl 0.05 M (pH=7.4), CaCl₂ 0.01M, durante 24 h, para después ser centrifugada a 2500 rpm. al sobrenadante obtenido se le determinó proteína de acuerdo a la técnica de Groves²⁷; la colágena polimérica se lavó con el mismo buffer, verificando que su lectura fuera cero.

La fracción con actividad colagenolítica proveniente de Ultrogel AcA 44, se incubó en "batch" con la colágena polimérica insoluble y un control con Tris-HCl 0.05 M (pH=7.4), CaCl₂ 0.01 M. sin muestra (Fig 6). Después de 24 h se lavó con el mismo buffer y se aplicó NaCl 0.15 M., se incubó de igual manera y por el mismo tiempo. De los sobrenadantes obtenidos, se determinó proteína de acuerdo a la técnica de Groves y se corrió electroforesis.

Polimerización con glutaraldehído.

La colágena polimérica se trató con glutaraldehído de acuerdo a la técnica de Ternynck, T. y Avrameas, S., 1976²⁸. Se probaron diferentes amortiguadores, que combinados con el glutaraldehído al 2%, fueron el medio en el cual se incubó la colágena por un lapso de 3 h. a temperatura ambiente.
Distribución de las muestras:

OBTENCION DE COLAGENA POLIMERICA

TENDON

- 1 + Limpiar de tejido adiposo y músculo.
- 2 + Cortar en pequeños fragmentos.
(1 mm x 0.5 mm)
- 3 + Colocar en acetona.
- 4 + Agitar la muestra, constantemente.
- 5 + Equilibrar con 4% (w/v) de EDTA a 20 C, pH 7.5
- 6 + Lavar con agua destilada.
- 7 + Homogenizar con ácido acético 0.2 M.
- 8 + Agitarlo durante 24 horas. ←-----
- 9 + Centrifugar a 2500 rpm durante 20 minutos.

Residuo-----

Sobrenadante
(Colágena dispersada)

- 10 + Sobrenadantes obtenidos (unirlos).
- 11 + Agregar gota a gota NaOH 1M a pH: 7

▼
Fibrillas de colágena.

Figura No. 5

PURIFICACION DE LA ENZIMA CON COLAGENA POLIMERICA

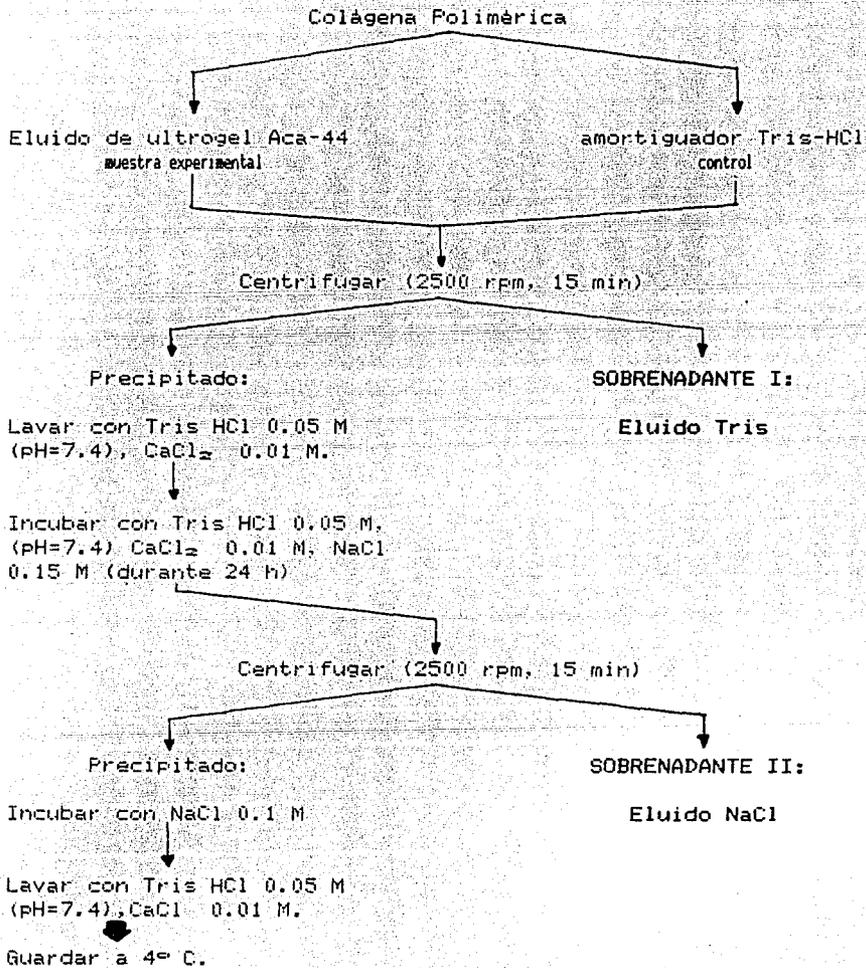


Figura No. 6

1. Col. polimérica en PBS (buffer salino de fosfatos, pH=7.4) + glutaraldehído al 2%.
2. Colágena polimérica en amortiguador de acetatos (pH=5) + glutaraldehído al 2%.
3. Control: colágena polimérica únicamente en presencia del amortiguador.

Terminada la incubación, a cada una de las muestras se les aplicó etanolamina 1 M. (pH=7.4), se lavaron con el amortiguador que las contenía sin glutaraldehído y fueron centrifugadas a 2600 rpm. Finalmente se determinó concentración de proteína en cada una de estas.

La colágena polimérica se colocó en "batch" con EDTA 0.4 M. (pH=7.4), teniendo también un control incubado en Tris-HCl 0.05 M. (pH=7.4), CaCl₂ 0.01 M. Se determinó concentración de proteína.

CROMATOGRAFIA DE FILTRACION MOLECULAR. H P L C (Cromatografía líquida de alta presión).

La muestra con actividad colagenolítica eluida de la columna de Zinc, se pasó por una columna de filtración en gel, cuya matriz es de sílice (Glas Pac Column TSK G 3000 SW 8x300 mm), donde se colocaron 200 μ l de muestra para separarse, colectándose fracciones de 1 ml a un flujo constante de 0.5 ml/min., a las que se les determinó proteína y corrió electroforesis.

PRUEBA DE ACTIVIDAD COLAGENOLITICA.

Se han reportado diferentes técnicas para demostrar actividad, y en este caso la actividad de la colagenasa se determinó de acuerdo al método de Terato y Nagai, 1976². Usando como sustrato radiactivo ³H colágena con una actividad específica de 109 044 cpm/mg de colágena. El método consistió en incubar colágena H³ soluble con la enzima a una temperatura de 33°C, durante 12 h., al término de la incubación, la reacción se detuvo con ortofenantrolina, los productos de degradación enzimática se separaron precipitando con dioxano:metanol (4:1), en virtud de que la colágena nativa precipita, mientras que la colágena degradada permanece soluble. Se centrifugó y se determinó radiactividad al sobrenadante en un contador de centelleo líquido Minaxi B Tri-carb (United Technologies Packard). Los resultados se expresan como el % que representan los péptidos solubles en dioxano-metanol con respecto a la radiactividad total incubada, restando a cada preparación su control inhibido.

Activación de las preparaciones.- La presencia de actividad colagenolítica latente se reveló mediante proteólisis limitada con tripsina o tratamiento con compuestos organomercuriales. Para la activación con tripsina se incubaron 100 ul. de medio concentrado con diferentes concentraciones de tripsina (0.5, 1.5 y 3 ug/ml) disuelta en el amortiguador de reacción, a temperatura ambiente, durante diez minutos;

posteriormente se agregó inhibidor de tripsina del frijol de soya³¹ (SBTI) cinco veces más concentrado que la enzima y se procedió a determinar la actividad colagenolítica de la muestra activada. La relación de concentración fue variable, el rango estuvo entre 1:100 y 1:75.

Los resultados se expresan de la siguiente forma:

$$\begin{array}{l} \% \text{ de actividad} \\ \text{colagenolítica} \end{array} = \frac{\text{cpm(experimentales - blanco) } \times 100}{\text{cpm de la gelatina (totales)}}$$

ELECTROFORESIS SDS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

El grado de pureza obtenido después de cada uno de los pasos mencionados se siguió por electroforesis. La Técnica se realizó de acuerdo a Laemmli, 1970⁴⁴ en geles de poliacrilamida al 10% con SDS. Las preparaciones se diluyeron con el amortiguador de la muestra, ajustando la concentración de proteína entre 5 y 60 ug. Todas las muestras fueron corridas con mercaptoetanol.

De manera simultánea se corrieron patrones de peso molecular (que incluyeron albúmina serica bovina, ovoalbúmina, pepsinógeno, tripsinógeno, beta lactoglobulina y lisozima) y patrones de albúmina y ovoalbúmina.

Al final de la corrida los geles se tifieron con colorante azul de Coomasie R durante una hora y se destifieron en una solución de ácido acético-metanol.

Se prepararon según Laemmli⁴⁴, pero adicionando 1 mg/ml de gelatina o de caseína según el gel que se tratara, más 2.5 veces la cantidad usual de persulfato de amonio para el gel de caseína, de acuerdo a Chin, J. R. et al, 1985¹¹. Las muestras antes de correrse no se hirvieron, además de colocar el SDS al 30%

Tinción con plata.

Además de la tinción con azul de Coomassie, algunos geles se tificaron con nitrato de plata de acuerdo a la técnica de Heukeshoven, 1985³⁹. Para obtener una mayor definición de bandas en los patrones electroforéticos.

Actividad Gelatinolítica.

Para probar si la muestra con actividad colagenolítica, presentaba también actividad gelatinolítica, se incubó la muestra enzimática con gelatina durante 3 h. a 37°C. deteniéndose la reacción con TCA al 100%. Se centrifugó y contó el sobrenadante.

RESULTADOS.

1. Presencia de actividad colagenolítica durante el desarrollo del granuloma (fase depósito y reabsorción), obtenida en los medios de cultivo.

Mediante el cultivo de explantes de tejido conectivo del granuloma, se obtuvieron los siguientes datos:

1. Tanto en la fase de depósito como en la de reabsorción, los explantes liberaron colagenasa al medio.

2. En la fase de depósito, la actividad aumenta si se preincuba con tripsina, verificando que en esta etapa del granuloma, parte de la enzima se encuentra latente (fig. 7).

3. En la fase de reabsorción, la tripsina no mostró ningún efecto sobre las muestras de esta etapa del granuloma. Lo cual confirma el estado activo de la enzima durante esta fase (fig.8).

2. Localización de la fracción enzimática en las preparaciones totales de depósito y reabsorción del granuloma de carragenina.

Al pasar la muestra por DEAE Celulosa la actividad

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA - FASE DEPOSITO

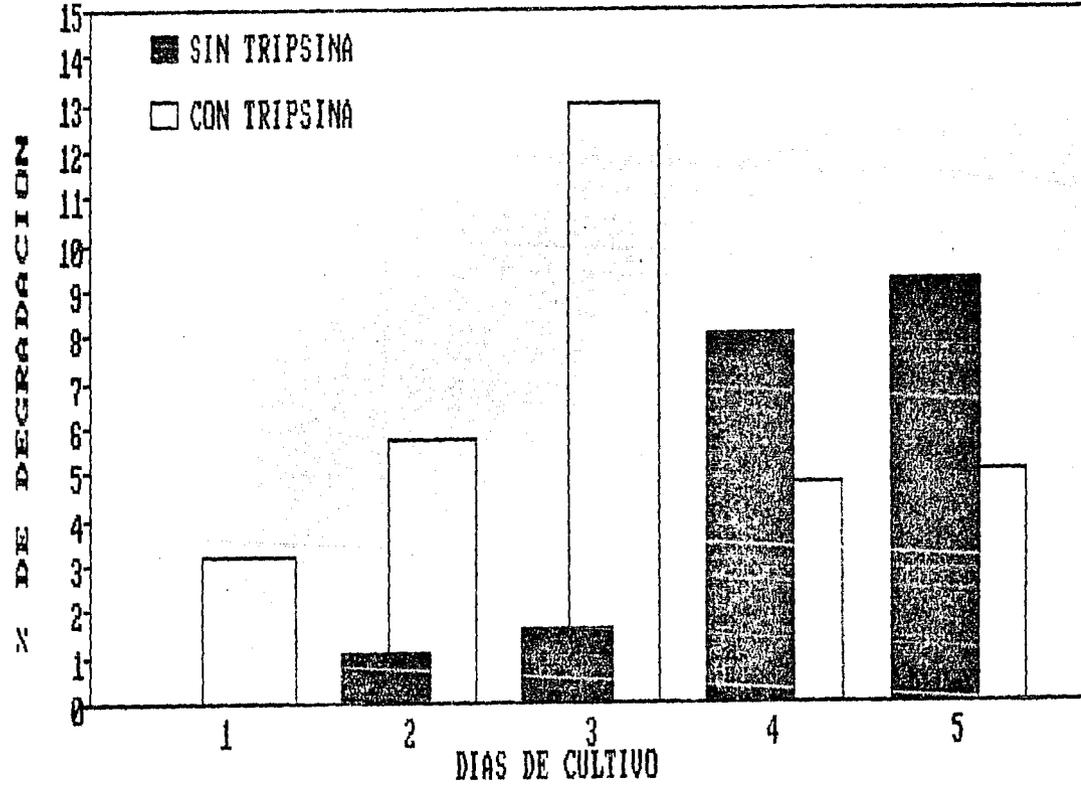


Fig. 7: Presencia de Actividad Colagenolítica durante la etapa de depósito, obtenida en los medios de cultivo.

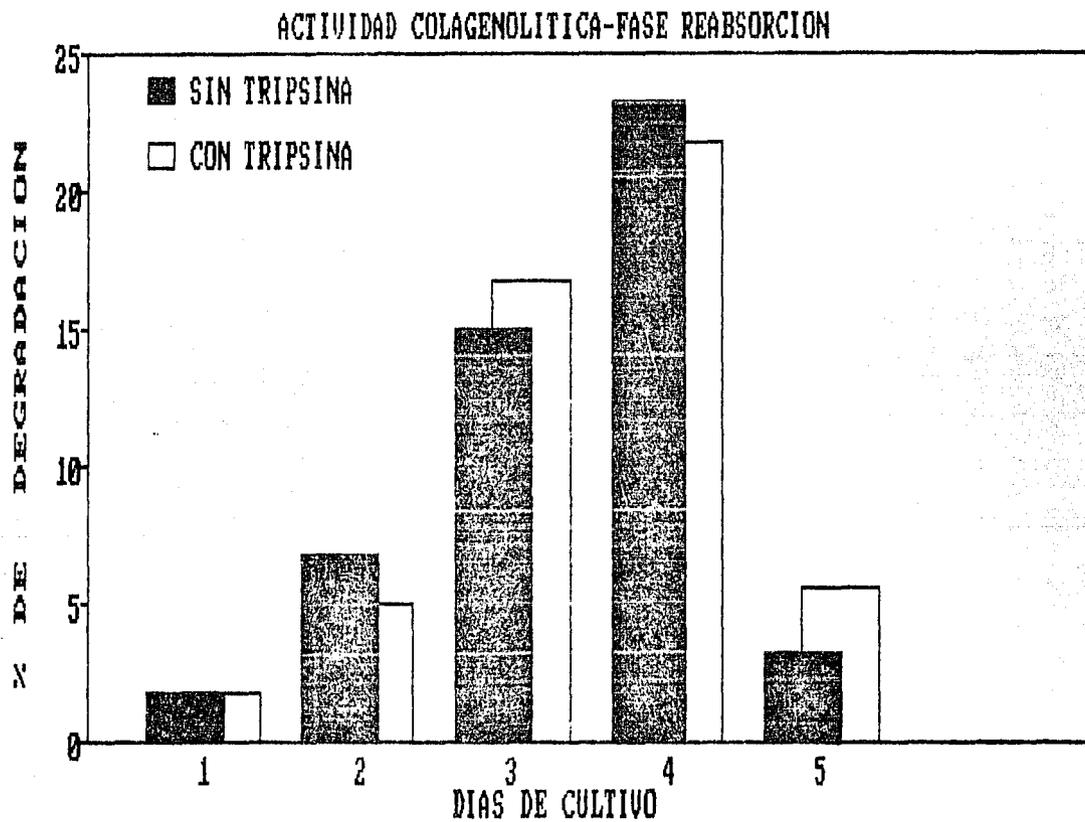


Fig. 8: Presencia de Actividad Colagenolítica durante la etapa de reabsorción, obtenida en los medios de cultivo.

colagenolítica tanto de la fase de depósito como de reabsorción quedó unida a la resina, y se eluyó con NaCl, mientras que la fracción eluida con Tris-HCl 0.05 M (pH=7.4), CaCl_2 0.01 M prácticamente no presentó actividad colagenolítica en alguna de las dos fases (figs.9 y 10).

La figura 11, muestra los resultados de actividad colagenolítica específica obtenidos [los cuales se expresan como: ug de colágena degradada en 12 h/ug de proteína incubada] en las distintas fracciones, ya sea antes ó después de pasar las muestras por la columna de DEAE celulosa. Los resultados indican que los valores más altos de actividad se encuentran en las fracciones de ambas fases que se pegaron a la resina y que se eluyeron con NaCl.

3. Cromatografía de filtración molecular en Ultrogel Aca-44.

Las fracciones con actividad colagenolítica que se eluyeron con NaCl en la columna de DEAE-Celulosa, provenientes tanto de la etapa de depósito, como de reabsorción, se pasaron por una columna de filtración molecular de ultrogel Aca-44. El perfil cromatográfico de la muestra de depósito (la cual en adelante se llamará MD) se observa en la fig.12, así como la muestra de reabsorción (que en adelante se llamará MR) es mostrada en la fig. 13.

De acuerdo a los "picos" obtenidos al leer su absorbancia a 230 nm de cada uno de los tubos, estos se juntaron,

Cromatografía de intercambio ionico -DEAE celulosa

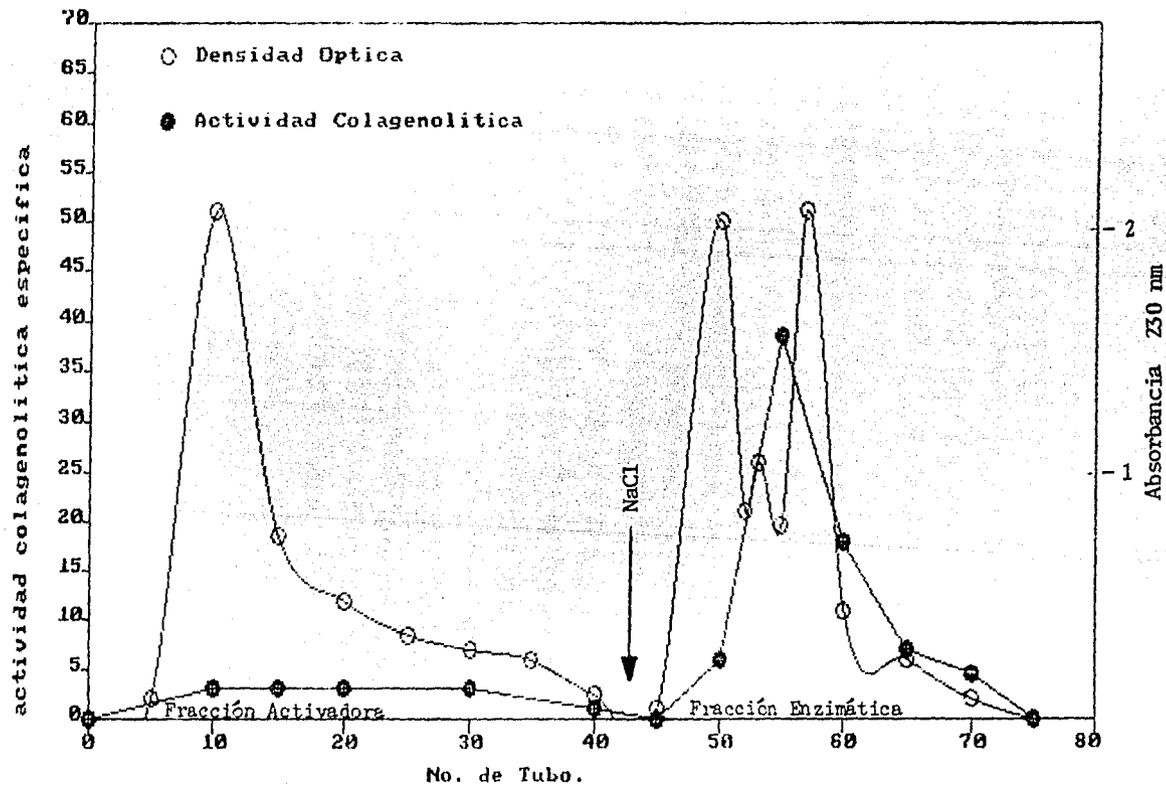


Fig. 9: Perfil Cromatográfico de la muestra total de Depósito en DEAE-Celulosa, presentando las fracciones eluidas de acuerdo a la actividad colagenolítica obtenida.

Cromatografía de intercambio ionico-DEAE celulosa-

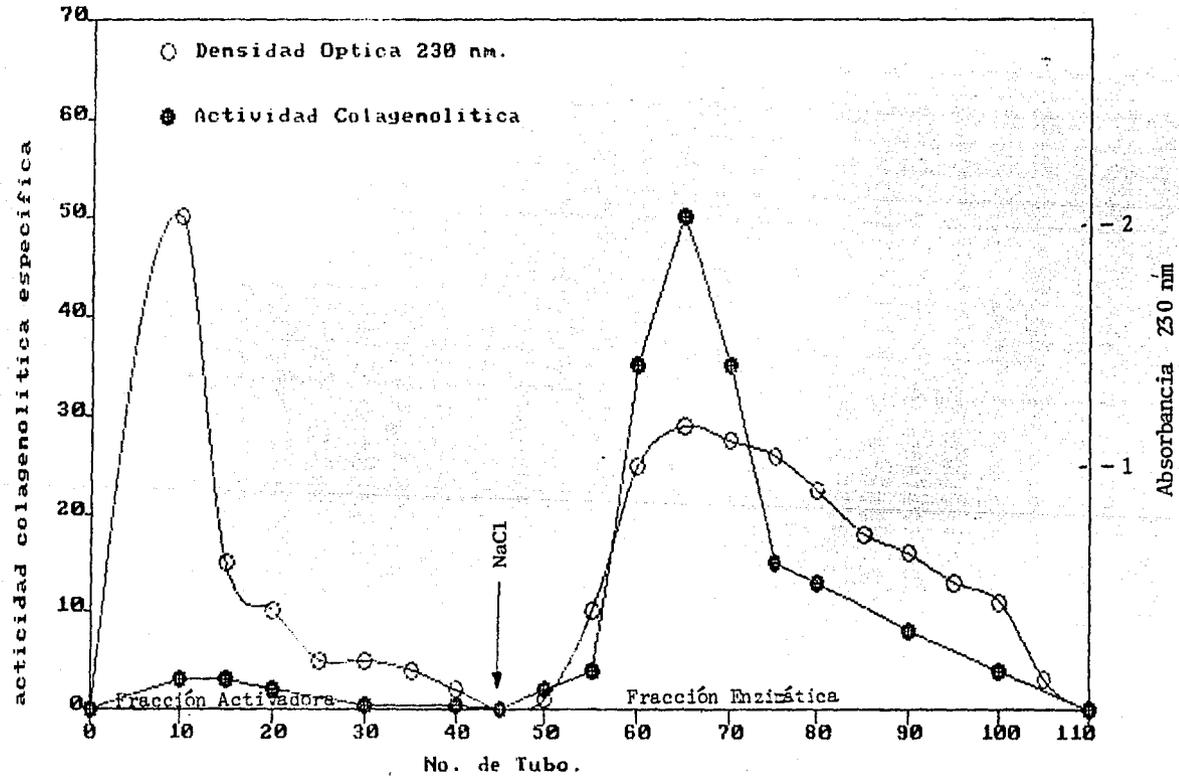


Fig. 10: Perfil Cromatográfico de la muestra total de Reabsorción en DEAE-Celulosa, presentando las fracciones eluidas de acuerdo a la actividad colagenolítica obtenida.

Actividad colagenolítica de las muestras.

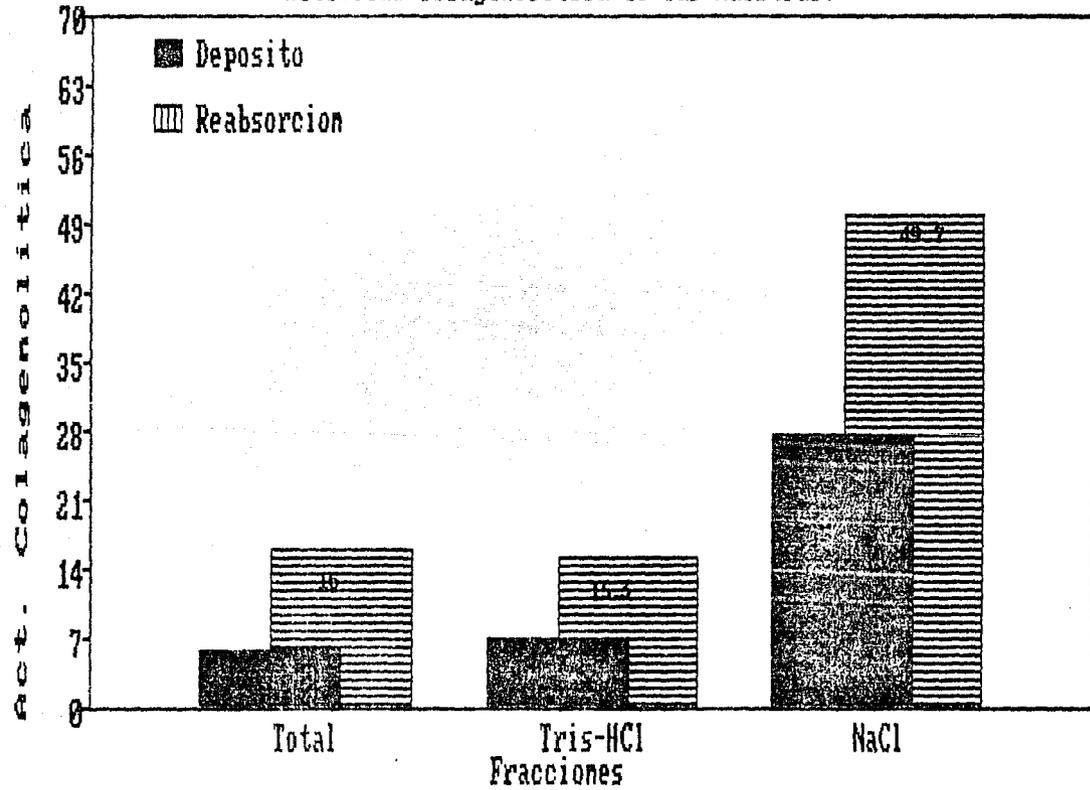


Fig. 11: Actividad colagenolítica específica, de las muestras totales de ambas etapas del granuloma y eluciones obtenidas en la columna de DEAE - Celulosa.

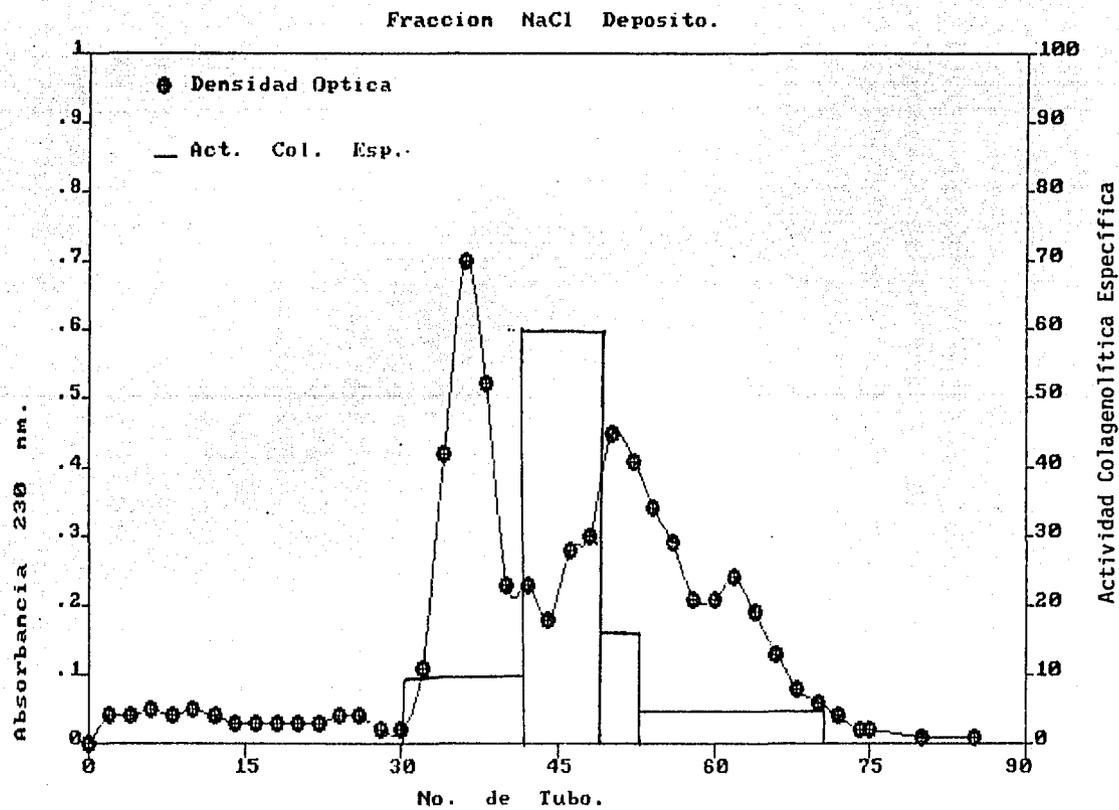


Fig. 12: Perfil cromatográfico de MD. El histograma presenta la distribución de las fracciones obtenidas, con su actividad colagenolítica correspondiente.

FRACCION NaCl REABSORCION.

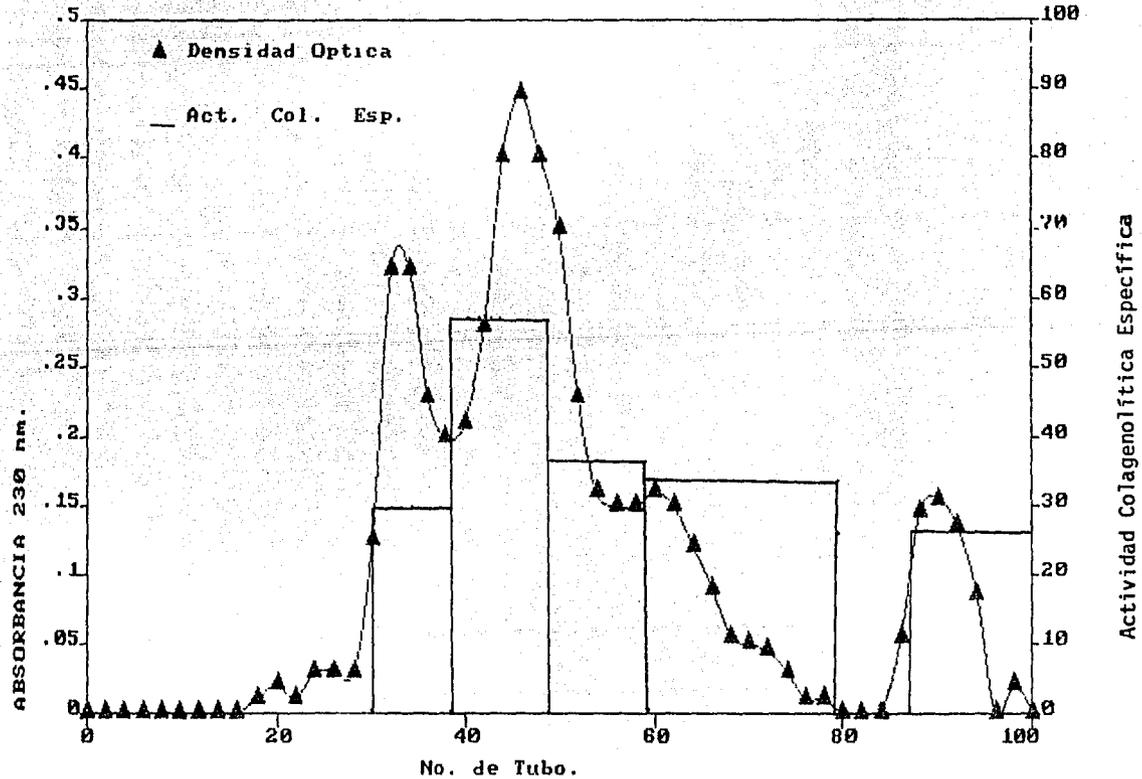


Fig. 13: Perfil cromatográfico de MR. El histograma presenta la distribución de las fracciones obtenidas, con su actividad colagenolítica correspondiente.

determinándoseles concentración de proteína y se les probó su actividad colagenolítica. Los resultados se muestran en los histogramas de las figuras 12 y 13.

Los porcentajes de actividad colagenolítica específica, muestran que es en la fracción correspondiente a los tubos 43-48, de MD, donde se observa mayor actividad de la enzima, con 60.9% de actividad colagenolítica específica y 56.6% para la fracción MR, correspondiente a los tubos 39-50. Ambas fracciones fueron separadas, eligiéndose como las fracciones que contenían a la enzima, con la que se continuaría la purificación.

4. Cromatografía de Afinidad (Sepharosa Quelante).

Las fracciones con actividad colagenolítica eluidas de Ultrogel Aca-44, tanto de MD (tubos 43-48), como de MR (tubos 39-50), se pasaron por la columna de Sepharosa Chelada 6B (Zinc²⁺). La fracción que se adhiere a la resina, fue separada con imidazole. Debido a que no puede seguirse la lectura de elución de proteína a 230 nm, ya que el imidazole absorbe a esta misma longitud de onda. Se decidió separar fracciones de 3 ml cada una, las cuales se dializaron exhaustivamente contra Tris-HCl 0.05 M (pH=7.4), CaCl₂ 0.01 M, para eliminar el imidazole. Se determinó posteriormente concentración de proteína y actividad colagenolítica. Los resultados aparecen en las figs. 14 y 15. Hay que hacer notar que también se le determinó actividad colagenolítica a la fracción que no se pegó a la columna y su

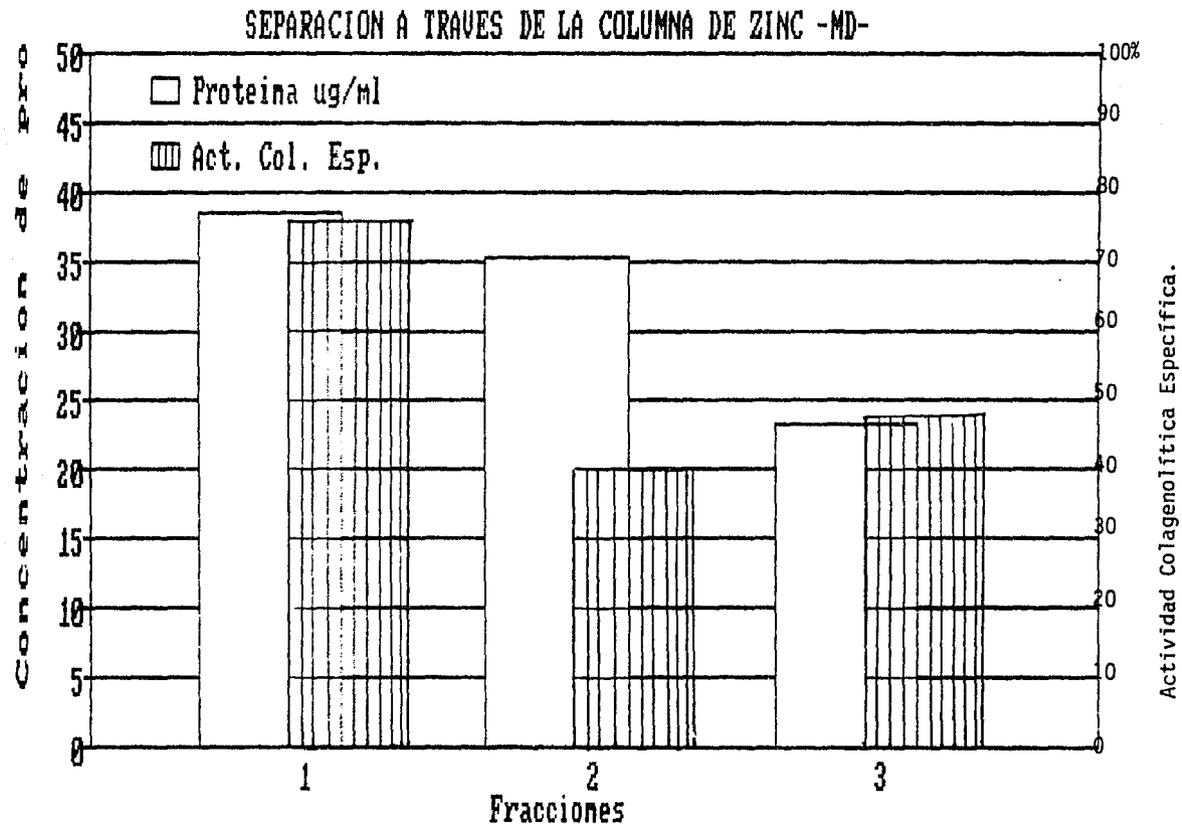


Fig. 14: Concentración de proteína y actividad colagenolítica, presentes en las fracciones eluidas de la columna de Sepharosa Quelada.

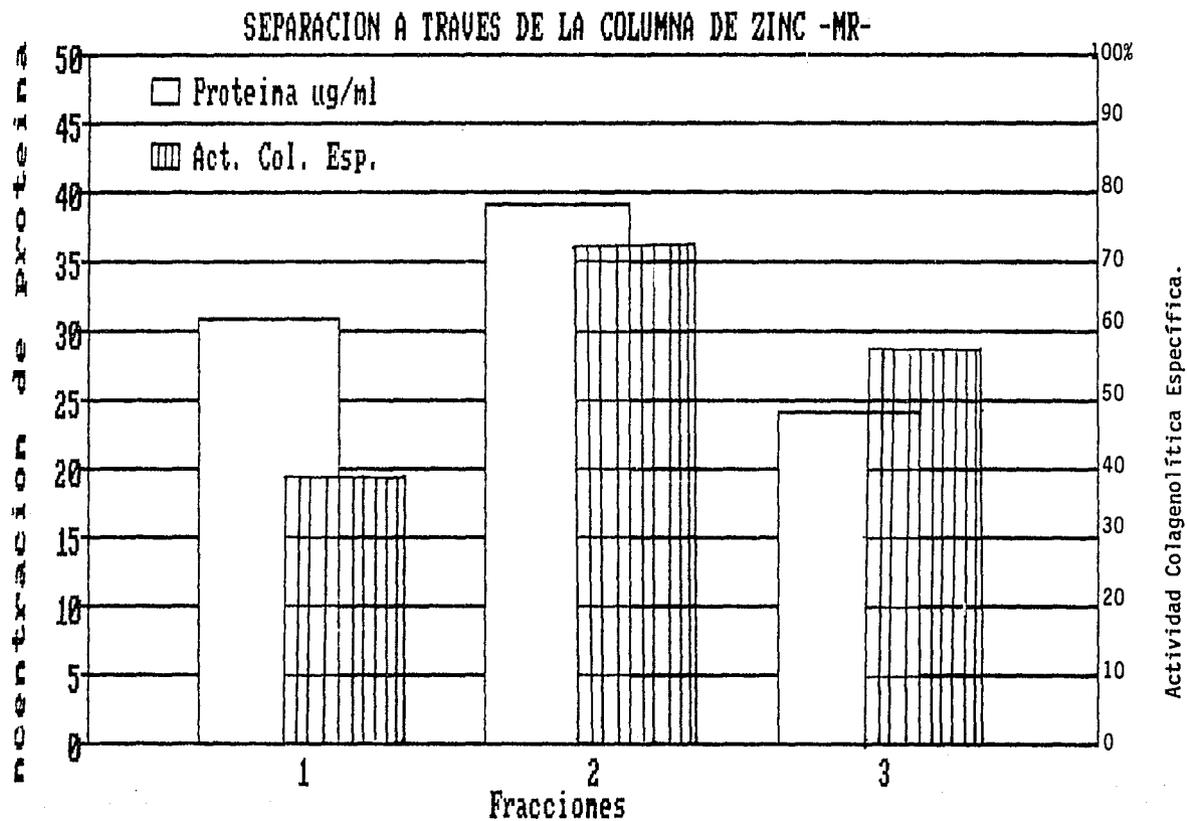


Fig. 15: Concentración de proteína y actividad colagenolítica, presentes. en las fracciones eluidas de la columna de Sepharosa Quelada.

45
resultado fue de 3% de actividad, lo cual observando los resultados obtenidos (fig. 14 y 15), demuestra que la enzima se quedó adherida a la columna, afirmando su comportamiento de metaloenzima. Las fracciones con mayor actividad colagenolítica específica: 76.3% para MD y 71.8% para MR, se corrieron en geles de poliacrilamida al 10 % con SDS. Los resultados revelaron que la fracción MD y MR (fig.19) presentaban tres bandas con igual peso molecular, por lo que ambas fracciones desde ese momento se unieron, para trabajarse en adelante como una sola muestra, a la cual nos referiremos llamándola Fracción Enzimática.

La fig. 16 muestra los resultados de actividad colagenolítica específica obtenidos después de cada uno de los pasos realizados en la purificación de la enzima, hasta antes de unirse la fracción MD y MR.

Prueba de purificación de la fracción enzimática, utilizando colágena polimérica insoluble, como cromatografía de afinidad.

I. Se pensó que una alternativa a la columna de Zinc- Sepharosa podría ser la colágena polimérica insoluble. Esta se incubó en "batch" con una fracción eluida de ultrogel con actividad colagenolítica durante 24 h. más un control (colágena polimérica en Tris-HCl 0.05 M (pH=7.4), CaCl₂ 0.01 M). Posteriormente se centrifugaron y se lavaron con el mismo

RESULTADOS DE LA PURIFICACION DE LA ENZIMA.

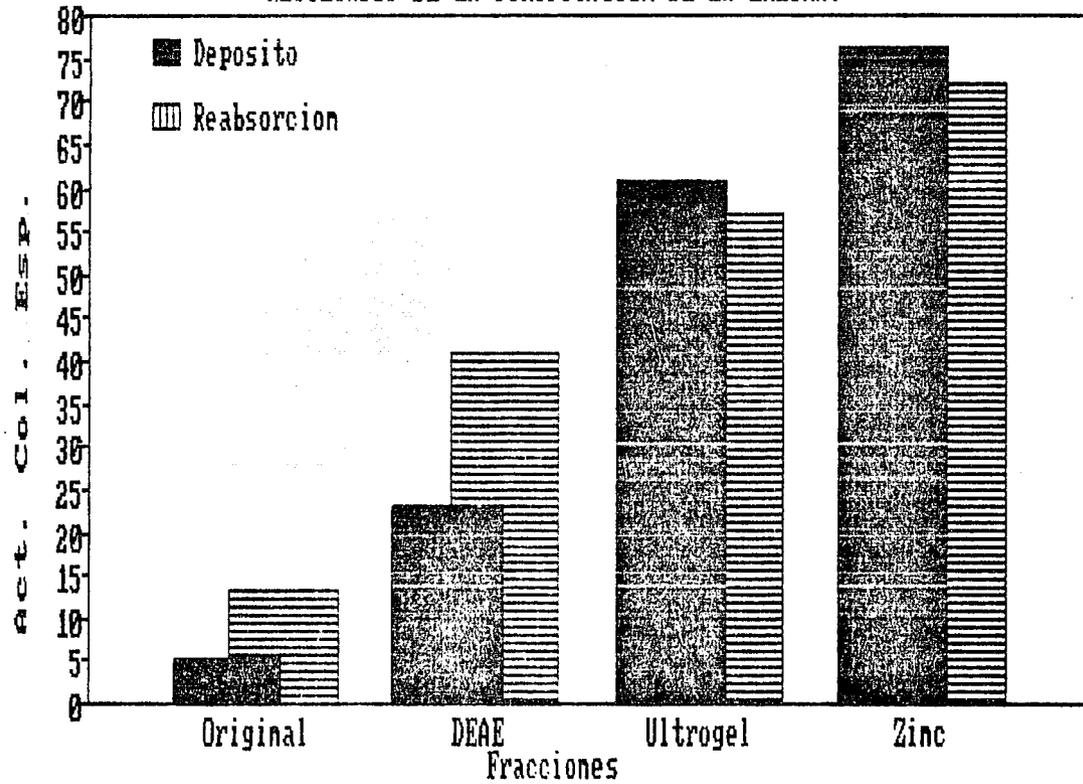


Fig. 16: Actividad colagenolítica específica de cada una de las fracciones obtenidas después de cada etapa, en la purificación de la colágenas de cobayo.

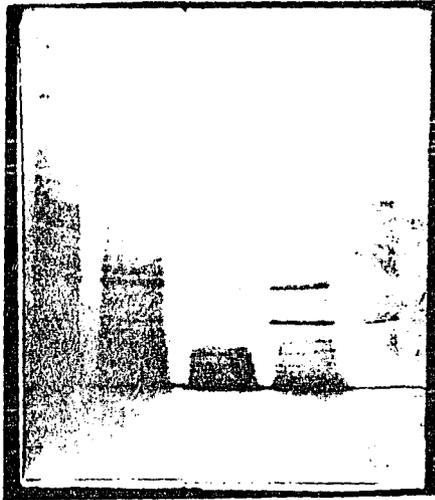
amortiguador ambas colágenas, hasta que su lectura fue cero. Se incubaron posteriormente con NaCl 0.015 M. Se centrifugaron, tomándose lectura de los sobrenadantes obtenidos, los resultados fueron los siguientes:

a) Determinación de la concentración de proteína (ug/ml).

Muestra	Concentración de la muestra incubada	Fracción eluida con Tris	Fracción eluida con NaCl
Control	0	50.6	11.0
Muestra con actividad enzimática eluida de ultrogel	52.8	77.0	43.3

b) Geles de Poliacrilamida.

Se tomaron alícuotas de cada una de las fracciones obtenidas y se corrieron en electroforesis, en gel de poliacrilamida al 10% con SDS (fig 17). Se observa que la colágena polimérica está liberando proteína al medio, es decir la colágena polimérica "insoluble", se solubiliza en el amortiguador (muestra control), y en la muestra en lugar de disminuir el número de bandas con la purificación, se le unieron proteínas provenientes de la colágena polimérica, ya que las preparaciones incubadas con NaCl, presentan más



1 2 3 4 5

Fig. 17: Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS de eluidos de la incubación de colágena polimérica.

Carriles 1 y 2 -Controles-

1. Tris-HCl 0.05M, CaCl_2 0.01M, NaCl 0.15M (pH=7.4)
2. Tris-HCl 0.05M, CaCl_2 0.01M (pH=7.4)

Carriles 3, 4 y 5 -Experimentales-

3. Muestra con Tris-HCl 0.05M, CaCl_2 0.01M NaCl 0.15M (pH=7.4)
4. Muestra con Tris-HCl 0.05M, CaCl_2 0.01M (pH=7.4)
5. Muestra original (sin incubación).

bandas que la preparación original (carril No. 3).

II. Al observar que la colágena polimérica, estaba solubilizándose en el medio que se colocaba. Se colocó en PBS más glutaraldehído al 2%, para aumentar los enlaces intermoleculares de la colágena, sin embargo continuó liberando proteína, se adicionó posteriormente EDTA suponiendo que en la colágena polimérica se tuviera enzima responsable de la solubilización de la colágena²⁷, y si este fuera el caso, inhibir a la posible enzima. El resultado fue negativo y la colágena polimérica después de ser varias veces lavada con el amortiguador, seguía liberando proteína.

5. Cromatografía de Filtración Molecular: HPLC.

Con el objeto de continuar la purificación e identificar la banda o bandas de nuestra fracción enzimática. Se pasó una alícuota de la muestra eluida de la columna de Zinc-Sepharosa por una columna TSK G 3000 SW (LKB) en un sistema de HPLC (filtración molecular), recogiendo fracciones de 1 ml, obteniéndose su absorbancia a 230 nm de longitud, y probándoseles actividad colagenolítica, tal como se muestra en la fig. 18.

Al observar que en algunos tubos se presentaba casi el mismo porcentaje de degradación, y que los valores a partir del tubo No. 8 revelaban mayor actividad, se juntaron los tubos en dos "picos": del tubo 1 al 7, y del 8 en adelante. Estos "picos" fueron concentrados a un volumen total de 3 ml cada uno, con azúcar glass. Se dializaron y se les determinó actividad

CROMATOGRAFIA DE FILTRACION MOLECULAR -HPLC-

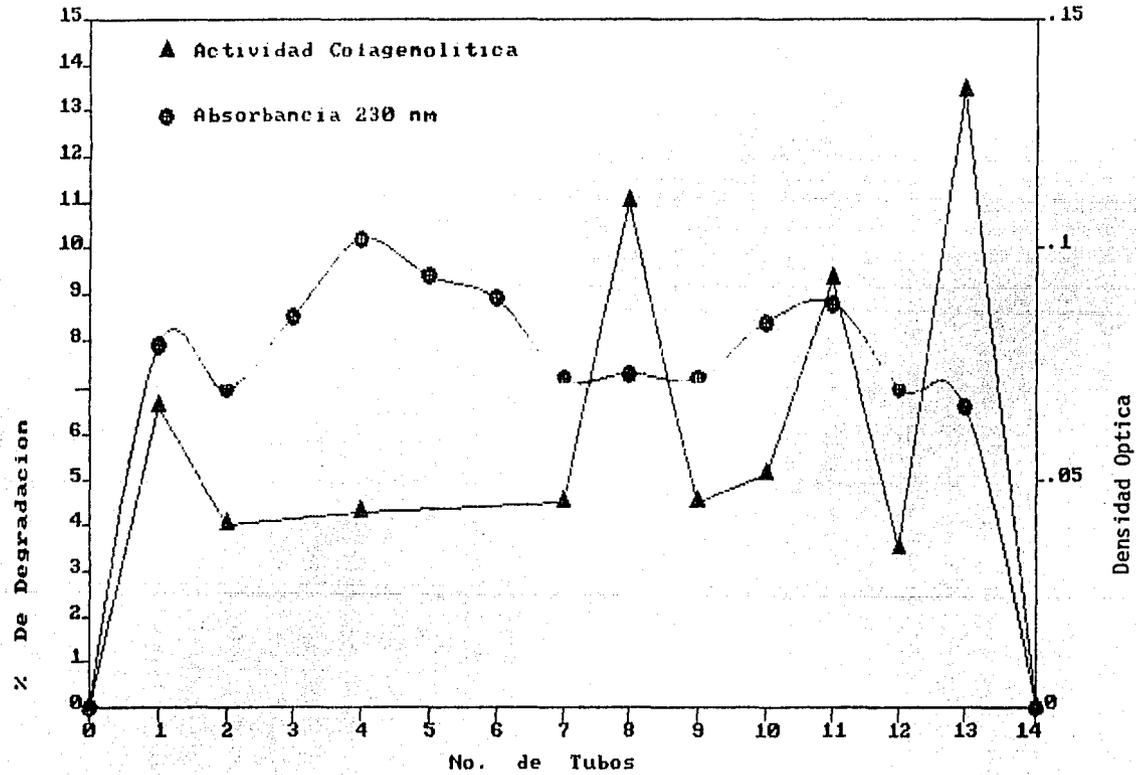


Fig. 18: Presentando los valores obtenidos de actividad colagenolitica y Densidad Optica de los tubos obtenidos de la columna de HPLC.

colagenolítica específica, los resultados fueron los siguientes:

Fracción	Actividad Colagenolítica Específica
Pico I	29.6
Pico II	68.0

Ambas fracciones junto con la muestra original (muestra que no fue pasada por la columna del HPLC), se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% con SDS, tiñéndose primeramente con azul de Coomasie y después con nitrato de plata. Lo cual permitió una mayor definición de las bandas, ya que la concentración de las muestras al correrse era muy baja (fig 19).

Finalmente obtuvimos la presencia de dos bandas con peso molecular muy cercano, con lo cual podemos concluir que la actividad enzimática está fundamentalmente asociada a dos bandas con peso molecular de 46000 d para la banda superior y de 38000 d para la banda inferior.

6. Geles de gelatina y caseína.

La muestra enzimática fue corrida en geles de poliacrilamida al 10% con SDS incorporándosele gelatina o caseína como sustrato. No se obtuvo degradación en ninguno de los dos geles (no se muestran). También se midió la actividad gelatinolítica usando gelatina marcada radiactivamente. Los resultados muestran que la preparación eluida del HPLC, con actividad colagenolítica no tiene actividad gelatinolítica.

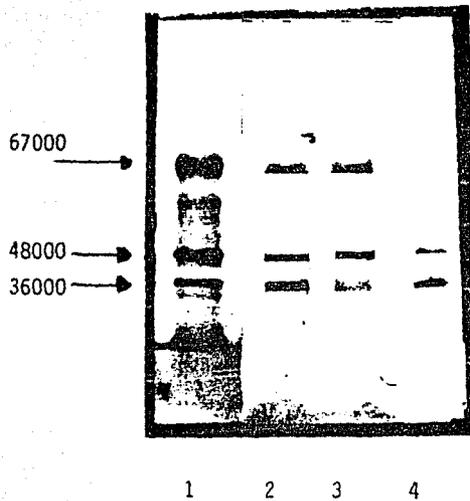


Fig.19: Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS de las fracciones obtenidas después de cada una de las etapas de purificación.

1. Fracción eluída de ultrogeI Aca - 44.
2. Fracción eluída de chelating-sepharosa -MD-.
3. Fracción eluída de chelating-sepharosa -MR-.
4. Fracción eluída de glas pac column TSK -HPLC-.

Discusión

La carragenina inyectada subcutáneamente en la región abdominal del cobayo, produce como la mayoría de los biomateriales, inflamación en el tejido del hospedero, dando lugar a síntesis y depósito de colágena alrededor del material implantado²⁴. El granuloma que se forma tiene un periodo de depósito de tejido conectivo, seguido por reabsorción del mismo hasta su completa desaparición. Los primeros resultados que se reportaron del modelo revelaron que la degradación de la colágena del granuloma es realizada por una colagenasa²⁵ que comparte las características de las colagenasas de vertebrados, y que está presente tanto en la etapa de depósito como en la de reabsorción, demostrado por inmunofluorescencia²⁶. En el presente trabajo se observó que en explantes de cultivo, parte de la colagenasa de cobayo se encuentra latente y parte activa, mientras que en la etapa de reabsorción toda la enzima se encuentra activa (fig.7 y 8). Estos datos concuerdan con los obtenidos de homogenados de tejido de granuloma¹⁷, los cuales demostraban la presencia de la enzima latente y activa a los siete días, y solo enzima activa a los catorce días que representan la etapa de reabsorción del granuloma.

Es interesante hacer notar que esta enzima extraída de explantes de granuloma, es capaz de autoactivarse durante el proceso de purificación. Datos en nuestro laboratorio, demuestran la presencia de un activador que es separado de la

enzima durante el proceso de purificación.

La cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa reveló que la actividad colagenolítica observada en los medios de cultivo de explantes, se encontraba en la fracción que se une a la resina, y fue eluida con NaCl, lo cual permitió separarla de la fracción que contiene al activador en el granuloma, ésta última se eluyó solo con el amortiguador (las figuras 9 y 10 mostraron ambas fracciones encontradas tanto en la etapa de depósito como en la etapa de reabsorción).

La fracción con actividad colagenolítica, obtenida en ultrogel Aca - 44, eluye entre 120000 y 68000 d, según la calibración previa de la columna. Dato que se podría cuestionar observando los pesos moleculares obtenidos finalmente para la enzima (fig. 19). Más este fenómeno fue descrito por otros autores también⁴⁶, explicándose como: posibles interacciones entre la enzima y la matriz de que está hecha la columna usada, lo cual puede modificar su paso a través de ella.

Una observación que es importante comentar es que durante el proceso de purificación en ultrogel, se obtuvo una fracción entre los tubos 30 al 40 en la etapa de depósito, que probablemente contenga un inhibidor, ya que esta fracción al incubarse con la fracción enzimática, baja su actividad colagenolítica específica hasta un 42%, (resultados no mostrados), en la etapa de reabsorción parece observarse el mismo caso, pero no es tan evidente como en la de depósito.

No se descarta que la posibilidad de latencia en la

etapa de depósito, se deba a presencia de inhibidores, los cuales pueden ser eliminados durante la propia purificación de la enzima.

La fracción con actividad colagenolítica que se pasó por cromatografía de afinidad, confirma el comportamiento de metaloenzima de la colagenasa y permitió obtener bandas por electroforesis con un peso molecular de 67000 d, 46000 d y 38000 d. (fig.19). Diferentes fracciones que siguieron esta metodología de purificación, revelaron el hallazgo que después de ser pasada la fracción con actividad por Zinc-Sepharosa, al ser corridas posteriormente en electroforesis, revelan únicamente la banda superior de 46000d y la banda inferior de 38000d. Cabe la posibilidad que la banda de 67000 d sea una forma de transición molecular de la enzima ó que sea una banda cuya concentración de proteína sea mínima, lo cual evite que se revele en la electroforesis.

No se ha descrito que las colagenasas animales se encuentren constituidas por subunidades, sin embargo, existe la posibilidad de que las colagenasas de bajo peso se puedan asociar en especies moleculares mayores. La colagenasa purificada de piel de cobayo, se ha reportado como dos picos con actividad, con peso molecular de 130000 d y 40000 d⁴², Heard, 1976³⁸, reporta pesos moleculares de 137000 d y 29000 d, para la colagenasa de hueso de cobayo, así como también la colagenasa de rata se ha reportado como un doblete de alto peso molecular⁴³. En algunas preparaciones de nuestra enzima, observamos bandas de alto peso molecular.

Una de las enzimas más estudiadas, es la colagenasa

de fibroblastos de piel humana⁶⁶, que es secretada como un doblete de 57000 d y 52000 d. La forma de 57000 d, es el resultado de una modificación postraducciona de la proenzima de 52000 d, a la cual se unen oligosacáridos. Esta proenzima se transforma a peso molecular de 47000 a 42000 d, con la acción de tripsina. En nuestro caso, hemos encontrado un doblete con actividad colagenolítica con peso molecular de 46000 y 38000 d.

Un hallazgo interesante es que esta enzima una vez purificada, al ser corrida nuevamente en electroforesis, muestra además de las dos bandas ya reportadas, bandas tenues de diferente peso molecular. Es muy posible que esto sea producto de una autodegradación de la enzima, lo que ha sido reportado en otros laboratorios.

La máxima actividad específica que se encontró fue de 76.3, lo cual podría indicar que existe algún contaminante que no detectamos, ó que parte de la proteína enzimática ha perdido actividad durante el proceso de purificación. Existen datos que permiten suponer esto, ya que la enzima es mas inestable conforme está más purificada.

Por otra parte, hasta ahora los activadores reportados son de un peso molecular muy semejante a la colagenasa. En nuestro laboratorio, donde se continuó trabajando con la fracción activadora presente en el granuloma, se ha observado que el peso molecular del activador es de alrededor de 60000 d⁶⁷. El cual, hasta el momento se sigue estudiando.

Los resultados obtenidos de la colágena polimérica permitieron observar que las muestras que fueron incubadas con ésta, presentaban mayor número de bandas que las muestras originales (Fig. 17). De lo que podemos afirmar que:

1. La colágena polimérica "insoluble", desprende al medio proteína, aún en amortiguador Tris-HCl 0.05 M (ph=7.4), CaCl_2 0.01 M.
2. El tratamiento con glutaraldehído, aunque disminuyó la proporción de colágena que se desprende, no la eliminó.
3. La posterior incubación con EDTA no reportó diferencias en la concentración de proteína liberada.

Por lo tanto la colágena polimérica no pudo ser de utilidad, como cromatografía de afinidad .

Conclusiones

La caracterización de la enzima y del activador presentes en el granuloma de carragenina del cobayo (Cavia porcellus), representa hoy, un logro más, en el entendimiento del modelo propuesto.

Si logramos caracterizar el inhibidor (si es que realmente existe) presente en la etapa de depósito del granuloma, podríamos quizás, aclarar la latencia de la enzima en ésta fase, ó complicarnos aún más la respuesta al respecto.

Más esto probablemente, es lo interesante del trabajo que se ha desarrollado a lo largo de éstas páginas. Ya que además de contribuir en el conocimiento de la enzima de éste modelo, se ha sembrado la semilla para plantear problemas y buscar sus soluciones, el pensar lo que nadie ha pensado, el analizar y criticar los experimentos ya realizados y no caer en los mismos errores, el tener creatividad en la investigación.

ESTA TESTS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

1. Abramson, M., Gross, J.: Further studies on a collagenase in middle ear cholesteatoma. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 80: 177, 1971.
2. Abramson, M., Huang, C. C., Schilling, R. W., Salome, R.G.: Collagenase activity in epidermoid carcinoma of the oral cavity and larynx. Ann. Otol. Rhino. Laryngol. 84: 158, 1975.
3. Adams, E.: Invertebrate Collagens. Science. 202: 591, 1978.
4. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.: **Molecular Biology of the Cell**. Garland Publishing, Inc. N. Y. London. p. 692, 1983.
5. Bauer, E. A., Stricklin, G.P., Jeffrey, J.J., Eisen, A. Z.: Collagenase production by human skin fibroblast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 64:232,1975.
6. Berman, M. B., Manabe, R.: Corneal collagenases: Evidence for zinc metalloenzymes. Ann. Ophthalmol. 5:1193,1973.
7. Birkedal-Hansen, H., Cobb, C. M., Taylor, R. E., Fullmer, H. M.: Bovine gingival collagenase. Demonstration and initial characterization . J. Oral Pathol. 3: 232,1974.
8. Birkedall - Hansen, H., Taylor, R. E.: Detergent activation of latent collagenase and resolution of its components, Biochem, Biophys. Res. Commun. 44: 1173, 1982.
9. Boedtker, H., Aho, S.: Collagen Gene Structure: The Paradox May Be Resolved. Biochem. Soc. Symp. 49: 67, 1986.
10. Bryan, H. S.: Collagenase studies in bones of guinea pigs. J.of Oral Path. 5: 17,1976.
11. Chin, J. R., Murphy, G. and Z. Werb: Stromelysin, a conective Tissue - degrading Metalloendopeptidase Secreted by Stimulated Rabbit Synovial Fibroblasts in Paralled with Collagenase. J. Biol. Chem. 260: 22, 1985.
12. Donoff, R. B., Mc Lennan, J. E., Grillo, H. C.: Preparation and properties of collagenases from epithelium and mesenchyme of healing mammalian wounds. Biochem. Biophys. Acta 227: 639,1971.
13. Dresden, M. H., Gross, J.: The collagenolytic enzyme of the regenerating limb of the newt, Triturus viridescens. Develop. Bid. 22: 129, 1970.
14. Eisen, A. Z.: Human skin collagenase: Localization and distribution in normal human skin. J. Invest. Dermatol. 52: 442, 1969.
15. Eisen, A. Z., Henderson, K. D., Jeffrey, J. J.: A collagenolytic protease from the Hepatopancreas of crab Uca pugilator:

- purification and properties. *Biochem.* 12: 1814, 1973.
16. Fields, G. B., Van Wart, H.E., Birkedal-Hansen, H.: Sequence Specificity Human Skin Fibroblast Collagenase. *J. of Biol. Chem.* 262: 6221, 1987.
 17. Figueras, T., Pardo, A.: Collagen biosynthesis and degradation during deposit and resorptive phases of Carrageenin Granuloma. *Collagen Rel. Res.* 6: 379, 1986.
 18. Fujiwara, K., Sakai, T., Oda, T., Igarashi, S.: The presence of collagenase in Kupffer cells of the rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54: 531, 1973.
 19. Fullmer, H. M., Lazarus, G.S.: Collagenase in bone of man. *J. Histochem. Cytochem.* 17: 793, 1969.
 20. Fullmer, H. M., Taylor, R. E., Guthrie, R. W.: Human gingival collagenase. Purification, molecular weight and inhibitor studies *J. Dent. Res.* 48: 646, 1969.
 21. Goldberg, G.I., Wilhelm, S. M., Kronberger, A., Bauer, E. A., Grant, G.A., Eisen, A.: Human Fibroblast Collagenase. *J. of Biol. Chem.* 261: 6600, 1986.
 22. Grant, G. A., Eisen, A. Z., Marmer, B. L., Roswit, W. T., Goldberg, G. I.: The activation of Human Skin Fibroblast Procollagenase. *J. of Biol. Chem.* 262(12): 5886, 1987.
 23. Gross, J. Collagen. En: The Chemical Basis of life. Readings from the Scientific American. W. H. Freeman and Co. Sn. Fco. p.67 - 75 (May. 1961).
 24. Gross, J., Lapiere, C. M.: Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 40: 1014, 1962.
 25. Gross, J.: Aspects of the animal collagenases. In Ramachandran, G. N. and Reddi, A. H.: *Biochem. of coll.* Plenum Press. New York, p.275, 1976.
 26. Gross, J., Highberger, J. H., Johnson - Wint, B., Biswas, C.: Mode of Action and Regulation of Tissue Collagenases. En: *Collagenase in Normal and Pathological Connective Tissues* (ed. D.E. Woolley and Evanson, J. M.) John Wiley and Sons Ltd., Chichester, 1980.
 27. Groves, W. E., Davis, F., Sells, B.: Spectrophotometric determination of microgram quantities of protein without nucleic acid interference. *Anal. Biochem.* 22: 195, 1968.
 28. Harper, E., and Gross, J.: Collagenase, procollagenase and activator relationships in tadpole tissue cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48: 1147, 1972.
 29. Harper, E.: Collagenases. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 1063, 1980.
 30. Harris, E. D., DiBona, D. R., Krane, S.: Collagenases in human synovial fluid. *J. Clin. Invest.* 48 2104, 1969.

31. Harris, E. D.: A collagenolytic system produced by primary cultivates of rheumatoid nodule tissue. *J. Clin. Invest.* 51: 2973, 1972.
32. Harris, E. D., Krane, S. M.: Collagenases. *New Eng. J. Med.* 291: 557, 1974.
33. Harris, E. D. Jr., Vater, C. A.: Vertebrate Collagenases. in *Methods in Enzymology*. 82: 423, 1982.
34. Harris, E. D. Jr., Welgus, H. G., Krane, S.: Regulation of the Mammalian Collagenases.: *Col. Rel. Res.* 4: 493, 1984.
35. Harvey, L. G.: Classification and the Kinds of mammals. En: Mammalogy. Mc Graw Hill Book Com. p.115, 1976,
36. Hasty, K. A., Hibbs, M. S., Kang, A. H., Mainardi, C. L.: *J. Exp. Med.* 159: 1455, 1984.
37. Hay, E. D.: *Cell Biology of Extracellular matrix*. Plenum Press. New York. 1981.
38. Heard, S. B.: Collagenase studies in bones of guinea pigs. *J. Oral Pathol.* 5: 17, 1976.
39. Heukeshoven., Dernick.: Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Elec.* 6: 103, 1985.
40. Hook, C. W., Bull, F. G., Iwanij, V., Brown, S. I.: Purification of corneal collagenases. *Inv. Opth.* 11: 728, 1972.
41. Horwitz, A. L., Hance, A. J., Crystal, R. G.: Granulocyte collagenase: selective digestion of type I relative to type III collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 897, 1977.
42. Huang, C. C., Abramson, M.: Purification and Characterization of collagenase from guinea pig skin. *Bioch, et. Bioph. Acta* 384: 484, 1975.
43. Jeffrey, J. J., Roswit, W. T., Halme, J.: Purification and Properties of Rat Uterine procollagenase. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 225: 285, 1983.
44. Laemmli, V. K.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* 227: 680, 1970.
45. Lehninger, A.: *Biochemistry*. Worth Publishers, Inc. N. Y. 2nd ed. p. 135. 1975.
46. Lopez Escalera, R., Pardo, A.: Carrageenin. Stimulated Peritoneal Macrophages release in vitro Collagenase and Gelatinase. 7: 249, 1987.
47. Martin, G. R., Timpl, R, Muller, K., Kuhn, K.: The genetically distinct collagens. *TIBS*, July, p. 285, 1985.
48. Mc. Croskery, P. A., Wood, S. Jr., Harris, E. D. Jr., *Science*.

182: 70-71, 1973.

49. Mc Croskery, P. A., Richards, J. F., and Harris, E. D. Purification y Characterization of a collagenase extracted from rabbit tumors. *Biochem. J.* 152: 131, 1975.
50. Montfort, I., Perez-Tamayo, R.: The distribution of collagenase in the rat uterus during postpartum involution. *Conn. Tiss. Res.* 3: 245, 1975.
51. Murphy, G., Cawston, T. E., Reynolds, J. J.: An inhibitor of collagenase from human amniotic fluid. *Biochem. J.* 195: 167,1981.
52. Murphy, G., Reynolds, J.J., Bretz, U., Baggioloini, M.: *Biochem. J.* 203:209, 1982.
53. Nagai, Y., Lapiere, C., Gross, J.: Tadpole collagenase: Preparation and purification, *Biochem.* 5: 3123, 1966.
54. Nagai Y, Hori H: Vertebrate Collagenase: Direct extraction from animal skin and human synovial membrane. *J. Biochem (Tokyo)* 72:. 1147, 1972.
55. Ohlsson, K., Olsson, I. : The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of two granulocyte collagenases. *Eur. J. Biochem.* 36: 473,1973.
56. Pardo A., Perez-Tamayo, R.: The Collagenase of Carrageenin Granuloma. *Conn. Tiss. Res.* 2: 243, 1974.
57. Pardo. A., Soto. H., Montfort, I., Pérez-Tamayo, R.: Colligen-bound Collagenase.*Conn. Tiss. Res.*7: 253,1980.
58. Pardo, A., Rosenstein, Y., Monfort, I., Pérez-Tamayo, R.: Immunohistochemical Identification of collagenase in Corrageenin Granuloma. *J. of Histochem and Cytochem.* 31: 641, 1983.
59. Percival, E., Mc Dowell, R. H.: Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides. New York, Academic Press, Inc.. 1967.
60. Pérez-Tamayo, R.: Collagen resorption in Carragenin Granulomas. I. Collagenolitis activity in "in vitro" explants. *Lab. Invest.* 22: 137, 1970.
61. Pérez-Tamayo, R.: Collagen resorption in carragenin granulomas. II Ultrastructura of collagen reserption *Lab. Invest.* 22: 142, 1970.
62. Pérez-Tamayo, R.: Pathology of collagen degradation. *Am. J. Pathol.* 92: 509, 1978.
63. Reddi, A. H.: Extracellular Matrix and Development. En: *Extracellular Matrix Biochemistry.* pag. 375, 1984.
64. Sakamoto S, Sakamoto M, Goldhaber P, Glimcher M J : Isolation of tissue collagenase from homogenates of embryonic chick bones. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 53: 1102, 1973.

65. Seltzer, J. L., Welgus, H. G., Jeffrey, J. J., Eisen, A. Z.: The function of Ca^{2+} in the action of mammalian collagenases Arch. Biochem. Biophys. 173: 355, 1976.
66. Seltzer, J. L., Jeffrey, J. J., Eisen, A. Z.: Evidence for Mammalian collagenases as Zinc ion metalloenzymes. Biochem Biophys. Acta 485: 179, 1977.
67. Servin, M., Arguello, C.: La matriz extracelular en los procesos celulares del desarrollo. en: Temas selectos de Biología Celular. pag. 109, 1986.
68. Steven F. S.: The effect of Chelating Agentes on Collagen Interfibrillar matrix interactions in Connective Tissue. Bioch. Biophys. Acta 140: 522, 1967.
69. Stricklin, G. P., Bauer, E. A., Jeffrey, J. J., Eisen, A. Z.: Human skin collagenase: isolation of precursor and active forms from fibroblast and organ cultures. Biochem. 16: 1607, 1977.
70. Stricklin, G. P., Eisen, A. Z., Bauer, E. A., Jeffrey, J. J.: Human skin fibroblast collagenase: chemical properties of precursor and active forms. Biochem. 17: 2331, 1978.
71. Stricklin, G. P., Welgus, H. G.: Human skin fibroblast collagenase inhibitor: purification and biochemical characterization. J. Biol. Chem. 258: 12252, 1983.
72. Terato, K., Nagai, Y., Kawanishi, K., Yamamoto, S.: A rapid assay method of collagenase activity using ^{14}C labeled soluble collagen as substrate. Bioch. Bioph. A. 445: 753, 1976.
73. Ternynck, T., Avrameas, S.: Polymerization and Immobilization of Proteins using ethylchloroformate and Glutaraldehyde. Scand. J. of Immunol. Supp. 3: 29, 1976.
74. Treadwell, B. V., Neidel, J., Pavia, M., Towle, C. A., Trice, M. E., Mankin, H. J.: Purification and Characterization of Collagenase Activator Protein Synthesized by Articular Cartilage. Arch. of Biochem. and Bioph. 251(2): 715, 1986.
75. Trelstad, R.: La Colagena. La Recherche. 10: 312, 1981.
76. Trelstad, R. L. The role of extracellular matrix in development. New York: Alan R. Liss. Inc. 1984.
77. Tschsche, H., Mc Cartney en Collagen Degradation and Mammalian Collagenase (Tsuchiya, M., et, a l, eds.): 27-40 Excerpta Medica, Amsterdam, 1982.
78. Vaes, G.: The release of collagenase as an inactive proenzyme by bone explants in cultive. Biochem. J. 126: 275, 1972.
79. Vadillo, O.F., González, A.G., Montfort, H.I., Pérez-Tamayo R.: A low molecular weight collagenase from rat kidney. Extraction and partial characterization. 1988.
80. Vuorio, E.: Connective Tissue Diseases: Mutations of Collagen

Genes. Ann. Cli. Res. 18: 234, 1986.

81. Wahl, L. H., Wahl, S. M., Mergenhagen, S. E., Martin, G. R.: Collagenase production by endotoxin-activated macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 3598, 1974.
82. Wahl, L. M., Blaudan, R. J., Page, R. C.: Effect of hormones on Collagen Metabolism and Collagenase Activity in the Pubic Symphysis Ligament of the Guinea Pig. End. 100: 571, 1977.
83. Weeks, J. G., Halme J. Woessner JF Jr: Extration of collagenase from the involuting rat uterus. Biochem. Biophys Acta 445: 205, 1976.
84. Welgus, H. G., Jeffrey, J.J., Eisen, A. Z.: The Collagen substrate specificity of human skin fibroblast collagenase. J. Biol. Chem. 256: 9511, 1981.
85. Werb, Z., Reynolds, J. J.: Stimulation by endocytosis in controlling the secretion of collagenase and neutral proteinase from rabbit synovial fibroblasts. J. Exp. Med. 140: 1482, 1974.
86. Wilhelm, S.M., Eisen, A. Z., Teter, M., Clark, S. D., Kronberger, A., Goldberg, G.: Human Fibroblast collagenase: Glycosylation and tissue-specific levels of enzyme synthesis. Biochem. 83: 3756, 1986.
87. Wirl, G: Extraction of collagenase from the 6000xg sediment of uterine and skin tissues of mice: A comparative study. Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 356: 1289, 1975.
88. Woessner, J. F.: Biological mechanisms of collagen resorption. In Gould, B.: Treatise on collagen. Biology of collagen. Academic Press, London, II: 253, 1968.
89. Woessner, Jr., F. Jr.: Mammalian Collagenases. Clin. Orth. 96: 310, 1973.
90. Woolley, D. E.: Collagenases Mammalian. In: Extracellular Matrix Biochemistry. 119, 1984.

COMUNICACIONES PERSONALES.

91. Vadillo, F. Comunicación Personal
92. Vadillo, F. Comunicación Personal
93. Pardo, A. Comunicación Personal.