



*Universidad Nacional Autónoma  
de México*

---

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTRUCTURA, COMPOSICION Y PROPIEDADES  
DE LA ELASTINA Y SUS  
APLICACIONES EN  
COSMETOLOGIA**

**T E S I S**

*Que para obtener el Título de  
Químico Farmacéutico Biólogo  
p r e s e n t a*

*Jorge Bolaños Campos*



**FALLA DE ORIGEN**

*México, D. F.*

1989



## **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.

## INDICE

	Página
<b>CAPITULO I</b>	
Introducción.....	1
<b>CAPITULO II</b>	
Generalidades .....	2
Antecedentes .....	8
Tejido conjuntivo .....	12
<b>CAPITULO III</b>	
Elastina .....	15
a) Distribución .....	16
b) Aislamiento y purificación .....	18
c) Análisis .....	33
d) Biosíntesis y degradación .....	39
e) Composición .....	47
f) Secuencia .....	50
<b>CAPITULO IV</b>	
Estructura .....	53
<b>CAPITULO V</b>	
Aplicaciones en cosmetología .....	73
<b>CAPITULO VI</b>	
Propiedades .....	75
<b>CAPITULO VII</b>	
Parte experimental .....	84

**CAPITULO VIII**

Controles y resultados ..... 88

**CAPITULO IX**

Conclusiones ..... 92

**CAPITULO X**

Bibliografía ..... 93

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

En la evolución de la cosmetología se han estudiado un sin número de materias primas que ayuden al ser humano en la disminución del proceso de envejecimiento principalmente de su tejido conjuntivo, dando margen al estudio científico de los mismos.

Esta tesis tiene como finalidad exponer el uso de una proteína incorporada dentro de formulaciones cosméticas ya que, se ha comprobado que ésta se encuentra involucrada en el proceso de envejecimiento de la piel; refiriéndose a la Elastina, proteína que se encuentra distribuida en todo organismo del ser humano y que con el paso del tiempo se va degradando.

La cosmetología moderna con su afán de servir al hombre ha estudiado y analizado la Elastina, aislandola, purificandola, estudiando su biosíntesis, composición y estructura con el propósito de poder incorporarla a productos cosméticos que ayuden al hombre a mejorar su apariencia física.

La aplicación de la Elastina en productos cosméticos requiere de altos controles de calidad tanto fisicoquímicos como microbiológicos y es aquí donde el Químico Cosmólogo juega un papel preponderante así como en la elaboración de los mismos.

Espero que el presente estudio sea de gran utilidad a todos los interesados en la cosmetología.

## CAPITULO II

### GENERALIDADES

El ser humano siempre se ha resistido ha envejecer. La juventud "divino tesoro" es un tema que ha despertado un interés universal en todo tiempo. Muchos mitos así lo confirman.

La conquista de la península de Florida por Ponce de León, en busca de la "fuente de la juventud", no es más que otro ejemplo entre muchos; más atrás aún en la historia, en la edad media, cuando la misteriosa Alquimia era toda una ciencia, algunos alquimistas trataban de encontrar "brebajes" o "pociones" capaces de prolongar la juventud.

Han transcurrido muchos siglos desde entonces y la humanidad todavía muere. Esta verdad, sin embargo, no debe llevarnos a negar los progresos extraordinarios que se han logrado en todos los campos. No se ha descubierto aún la fórmula de la inmortalidad, ni tampoco la de "la eterna juventud", pero sí infinidad de recursos científicos que prolongan la juventud haciendo de ésta una etapa más duradera, modificando la calidad de vida y conservando la belleza humana.

¿Porque envejecemos? ¿que podemos decir sobre el envejecimiento? ¿cuales son las causas del envejecimiento? ¿como es que ocurre?.

La humanidad sabe a ciencia cierta que el envejecimiento es un proceso natural de los organismos vivos -animales y vegetales- y por lo tanto inevitable.

Practicamente cada parte del cuerpo sufre un cambio progresivo con la edad y cada especie presenta un síntoma característico y tiene una duración máxima de vida.

El envejecimiento se define como: "Un deterioro inherente, progresivo e irreversible de todas las funciones del cuerpo humano", esto no solo ocurre en los organismos superiores sino también, en organismos inferiores.

En años recientes se ha efectuado extensas investigaciones sobre las causas del envejecimiento del ser humano y se ha concluido que varias escapan del control humano (como ciertos factores hereditarios) y otras por el contrario, sí son susceptibles de regulación voluntaria (alimentación y cosméticos).

Los especialistas han enfocado sus estudios en:

- a) Los cambios con la edad en la producción de insulina u otras hormonas
- b) Los cambios en la composición y propiedades de las membranas celulares con la edad.
- c) Los cambios incluyendo mecanismo de enzimas y proteínas.
- d) Los cambios en los neurotransmisores del sistema nervioso.
- e) Cambios en el material genético DNA.
- f) Cambios sobre componentes celulares, tal como, el colágeno, la elastina y mucopolisacáridos presentes en la piel.

#### HIPOTESIS SOBRE LAS CAUSAS DEL ENVEJECIMIENTO.

##### 1.- Tomando en cuenta factores genéticos:

- a) Diferenciación celular. Las células del cuerpo tales como musculares, nerviosas y dérmicas tienen estructura y función altamente diferenciadas. Así que la diferenciación celular, per se, puede ser difícilmente una causa fundamental o general de envejecimiento.

b) Especialización. Es la causa del envejecimiento y muerte de las células corporales. Las células corporales son por supuesto, super especializadas y ejecutan ciertas funciones y no pueden llevar a cabo otras, las cuales son específicas para otras células definidas.

c) Envejecimiento. El cuál resulta simplemente del gasto y separación de las funciones debido al uso, tal como sucede tarde o temprano con una máquina. Esta hipótesis a niveles celulares puede ser factible y probablemente es válida para células tales como las células nerviosas de las cuales tenemos desde la gestación un número definido y únicamente se desarrollan, y no pueden ser regeneradas o sustituidas más tarde. Esta hipótesis se refiere a estructuras, células y partes del cuerpo que no son recursos renovables.

d) Limitada capacidad reproductiva. Se refiere a algunas clases de células corporales, tal como los fibroblastos.

e) Error Catastrophe. La idea central es que ciertos accidentes intracelulares en algunas clases de especies, podrían tener un efecto en cascada. Por ejemplo: errores en los mecanismos o procesos de síntesis de enzimas o proteínas, o la falta de ellas, podrían interferir en toda la actividad celular, generando acciones que afectarían a otras moléculas o bien sobre las células mismas.

f) Una sexta hipótesis es la mutación. Una forma especial de accidente o error. El envejecimiento se ha descrito por algunos investigadores como la acumulación de mutaciones en las células; tal acumulación podría acen- tuarse por el tipo especial de mutación, la que lleva a deficiencias en los mecanismos pudiendo ser capaz de reparar daños en el material genético.



El efecto de las mutaciones dentro del organismo para la síntesis de proteínas puede llevar a los efectos en cascada mencionados anteriormente. En otras palabras, el envejecimiento es parte del programa de desarrollo o evolución inscrito en el material genético DNA y se vé a este, como la solución al problema del envejecimiento, porque el envejecimiento es un factor hereditario de evolución normal en organismos que crecen.

## 2.- Causas del envejecimiento susceptibles de regulación voluntaria:

a) La alimentación. Se ha comprobado que la dieta inapropiada contribuye a la vejez prematura. Científica e históricamente está demostrado que la cuidadosa selección de alimentos, no solo retarda el envejecimiento natural del ser humano, sino que también influye (aunque en grado moderado), en lo que llamamos el rejuvenecimiento.

b) El ejercicio. Permite prolongar los años de vida saludable. La ciencia admite sin reserva el valor del ejercicio para prolongar la vida humana y reducir o retardar los cambios degenerativos que acompañan al proceso del envejecimiento, extendiendo considerablemente la vitalidad juvenil del ser humano.

c) El sueño. Se admite que el sueño adecuado es excelente para prevenir la vejez prematura.

d) El medio ambiente. Este viene a ser el factor más perjudicial para la piel, debido a las sustancias tóxicas presentes en dicho ambiente, este daño es ocasionado por la oxidación sufrida en las sustancias presentes en la piel

e) Los radicales libres. Son moléculas (con uno o más electrones desapareados) y que generalmente son inestables y ubicuos en sistemas vivos. Sus reacciones iniciales enzimáticas o no enzimáticas son reacciones oxidativas al azar y producen una multiplicidad de cambios, deteriorando los sistemas biológicos. Esto no es sorprendente, sin embargo, se han implicado a los radicales libres en el proceso de envejecimiento, no solo en términos de alteraciones acumuladas en el material cromosomal sino también, en otras grandes moléculas como: Elastina, Colágeno, Mucopolisacáridos y lípidos presentes en la piel.

Los investigadores, Montagna y Carlisle examinaron otra causa del envejecimiento de la piel: observaron que, durante el envejecimiento de la piel hay un abatimiento en la superficie de la epidermis que ocurre cuando la piel se expone a los rayos solares debido a los rayos ultravioleta emitidos.

Otros investigadores, Senma y Sasaki describen los grandes cambios que las moléculas de la piel sufren durante el envejecimiento:

- a) Los niveles de elastina son generalmente reducidos.
- b) El colágeno con el envejecimiento se caracteriza por un decremento en el número de enlaces.
- c) Los mucopolisacáridos decrecen por una reducción en la velocidad de síntesis.

Daly y Odian, describen algunos cambios en las propiedades mecánicas de la piel, las cuales son asociadas con el envejecimiento. Sus observaciones indican que, en el envejecimiento la piel pierde la habilidad para recobrar la elasticidad bajo pequeñas tensiones, comprobando que esto se da por degeneración de la Elastina presente en la dermis.

Estos investigadores también reportan que el tiempo requerido para recobrar la viscoelasticidad de grandes tensiones es más largo durante el envejecimiento y se cree que esto está asociado con cambios en las sustancias presentes en la dermis.

En 1946 fué parafraseado por Bogomeletz lo siguiente: "El hombre es tan viejo como su tejido conjuntivo" y en 1970 se dedujo que: "El hombre es tan viejo como sus fibras elásticas".

Se ha comprobado que las fibras elásticas de la dermis durante el envejecimiento son reducidas en número, aparecen fragmentadas y presentan degeneración granular.

El efecto de la edad sobre la Elastina ha sido de interés para muchos investigadores, un número determinado de autores han considerado que el envejecimiento de la piel resulta por la degeneración de fibras elásticas.

El Químico Cosmetólogo, convencido de que la longevidad saludable y la prolongación de la juventud dependen basicamente de las causas antes mencionadas, concidera que el uso de cosméticos también puede hacer mucho por el ser humano, retardando su envejecimiento y prolongando su juventud.

## ANTECEDENTES

El rol de las proteínas como un nutriente esencial, es bien entendido por el ser humano dedicado al estudio de éstas macromoléculas, - la inmediata aceptación de las proteínas en formulaciones cosméticas -- cuando estas fueron introducidas por primera vez, fué relacionada a los aspectos nutricionales de la piel.

Muchos consumidores aplican gran variedad de productos cosméticos en las capas más externas de la piel en forma de cremas, lociones, maquillajes, cremas limpiadoras, shampoos y acondicionadores. Estas formulaciones contienen miles de diferentes materiales, las cuales incluyen aceites vegetales, grasas, animales, miel de abeja, germén de trigo, vitaminas, hormonas, emolientes, emulsificantes, tensoactivos, humectantes, perfumes y preservativos.

Ya que estas formulaciones están en contacto directo con las capas más externas de la piel, es razonable preguntar, ¿que formulaciones pueden alterar las propiedades de la barrera de la piel? y ¿que con secuencias o alteraciones pueden tener dichas formulaciones?.

El objetivo primordial de los cosméticos es el proveer beneficios a la piel. Las capas de la piel más externas son las que tienen contacto directo con el medio ambiente y las influencias externas, las cuales tienen un efecto perjudicial o favorable sobre el proceso del envejecimiento.

Ya que las capas de la piel están formadas esencialmente de proteínas, la adición de éstas en cosméticos es relativamente reciente, alrededor de una década. Sin embargo, el uso de proteínas para tales propósitos se menciona desde la antigüedad, aunque no actualmente docu-

mentada.

En años recientes, se ha adicionado una gran variedad de materias primas a los productos cosméticos, los cuales actúan como humectantes, hidratantes o emolientes. Los efectos protectores o humectantes sobre la piel de los productos cosméticos son atribuibles, en ciertos casos a las proteínas debido a que dan sustantividad a la piel.

La leche, primer alimento del hombre se considera bien balanceada en aminoácidos y desde tiempo atrás ha sido reconocida como un hermoseador de la piel. En ese tiempo se desconocía (por supuesto), que la proteína de la leche "Caseína" es el ingrediente activo y que juega un rol mayor en los beneficios trópicos de la piel.

Otra fuente de proteína natural es el huevo, el cuál ha sido usado también por décadas. Los originales shampoos de huevo fueron usados para problemas del cabello extremadamente seco.

La albúmina también ha sido usada dentro de la cosmetología como ingrediente activo en mascarillas faciales, así como también la lacto albúmina.

Sin embargo la producción y aceptación de proteínas en cosméticos ha sido lenta, debido a la escasez de aplicación y a la calidad deficiente de hidrolizados introducidos inicialmente.

Cuando los productos cosméticos conteniendo proteínas se introdujeron en los Estados Unidos de Norteamérica alrededor de los años 70's se usaron los hidrolizados protéicos disponibles; por ejemplo, hidroliza dos de proteínas vegetales, los cuáles se aplicaron extensamente en productos para el cuidado del cabello, aunque tenían el inconveniente de dar un color obscuro, alto contenido en sales y presentaban un olor inde

seable en el producto final.

En años recientes, proteínas químicamente modificadas, tales - como hidrolizados parciales han sido extensamente estudiados y usados co mo ingredientes activos para productos destinados al cuidado de la piel.

Hoy, sin embargo, los hidrolizados proteicos de Elastina y Colágeno han obtenido una gran importancia dentro de la cosmetología debido a sus propiedades de sustentividad, disponibilidad, amplia compatibilidad y su acción benéfica sobre la piel, ya que muchos de los problemas tales como arrugas y sequedad de ésta, parecen estar relacionados con da ños y pérdidas de éstas proteínas presentes en la dermis.

Los hidrolizados proteicos son materiales higroscópicos y su - sustentividad en la piel y el pelo se debe a la formación de puentes sobre la superficie, que mantienen y ayudan al equilibrio del contenido de humedad.

Los altos niveles de sustentividad de los hidrolizados proteicos son probablemente atribuidos a su pequeño tamaño y a su habilidad de penetrar en las capas de la piel, ya que se ha demostrado que el tamaño molecular es importante para llevar a cabo una óptima absorción. Hidrolizados de muy bajo peso molecular presentan niveles de absorción bajos y lo mismo es aplicado a las grandes moléculas proteicas.

Los hidrolizados proteicos están siendo usados hoy en día en - una amplia gama de formulaciones para el cuidado de la piel; por ejemplo cremas de noche (principalmente), bases para maquillaje y lociones.

Los hidrolizados proteicos de Elastina y colágeno son de gran importancia dentro de la cosmetología, ya que estos ingredientes son los que proveen elasticidad y firmeza a los tejidos de la piel.

La Elastina tiene también propiedades muy interesantes desde el punto de vista de agente humectante así como la habilidad de minimizar las condiciones de la piel seca.

Todo esto parece indicar que la cosmetología continuará introduciendo nuevos productos proteicos para el cuidado de la piel, muchos de ellos proporcionarán excelentes beneficios a la misma, lo que implica un desafío a la tecnología cosmética.

Hay dos componentes principales de las sustancias intercelulares del tejido conjuntivo que son las siguientes: fibras y material amorfo.

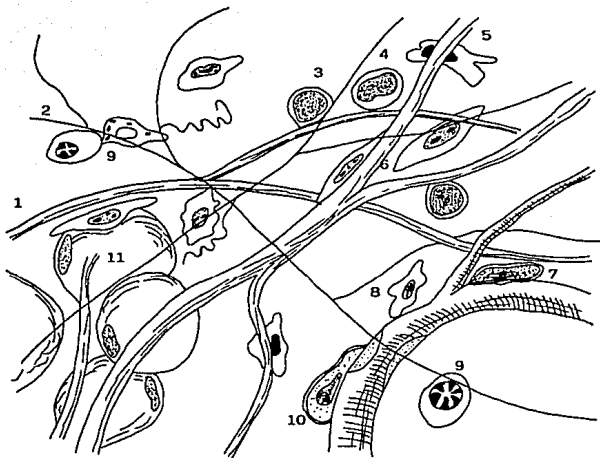
Las fibras son de 3 tipos:

- a) Colágenas. Compuestas por la proteína colágeno.
- b) Elásticas. Fisicamente elásticas y constituidas por la proteína muy resistente llamada elastina.
- c) Reticulares. Fibras muy delgadas que contienen un tipo de colágeno y también algo de material hidrocarbonado y que se denominan fibras reticulares porque suelen estar dispuestas en redes.

Las fibras colágenas aparecen como estructuras onduladas. Están formadas por una proteína fibrosa llamada colágeno (Kolla, cola), que recibió este nombre porque se emplea para preparar la cola, también se utiliza para preparar la gelatina.

Las fibras elásticas son más oscuras y delgadas, de un diámetro más constante que las fibras de colágeno, y a veces se encuentran ramificadas. Están formadas por la proteína elastina, que constituye un material no solo elástico sino también, extraordinariamente resistente y duradero (figura II.1).





**Fig. II.1. Diagrama de una sección transversal subcutánea del tejido con-  
juntivo. (1) Fibras colágenas. (2) Fibras elásticas. (3) Linfocitos. (4)  
Monocitos. (5) Macrófago. (6) Fibroblastos. (7) Células de sostén. (8)  
Células mesenquimales. (9) Células plasmáticas. (10) Vasos capilares. (11)  
Células grasas.**

### CAPITULO III

#### ELASTINA

La elastina es una protefna fibrilar insoluble que se encuen - tra en el tejido conjuntivo en unión con otros elementos tales como, el colágeno, lipoproteínas, mucopolisacáridos y proteoglicanos.

La elastina tiene un peso molecular elevado (alrededor de un millón de daltons). La elastina cuando se encuentra en la dermis, es el segundo constituyente más abundante después del colágeno. La elastina es responsable de mantener la flexibilidad y elasticidad de los tejidos, así como la de mantener el tono de la piel, asegurando la resistencia del colágeno. La elastina, debido a su configuración molecular es capaz de tensionarse por algún tiempo a una cierta longitud y cuando se libera de esa tensión tiene la habilidad de regresar a su tamaño y estado origi nal.

La elastina y el colágeno se encuentran íntimamente ligados en la dermis y son el principal soporte de los tejidos de la piel; el colágeno provee la estructura y la elastina la elasticidad y flexibilidad (figura III.1).

Bajo la epidermis, la elastina constituye alrededor de un 5% y el colágeno un 70%.

Claras evidencias indican que existe una gran distribución de elastina en el organismo; las concentraciones de elastina son altamente variables dependiendo del tipo de tejido que se trate. Su relativa concentración es más alta en la aorta y tejidos cardiovasculares, hay abundancia de ella en los pulmones, tendones y notablemente mayor en el "ligamentum nuchae" de bovino, el cuál es utilizado para la obtención de e-

lastina, ya que contiene alrededor de 80% de esta protefina. En contraste la elastina se encuentra en menor concentraci3n en la piel (tabla I.1).

Tabla I.1 Distribuci3n dela elastina en el tejido conjuntivo

<u>Tejido</u>	<u>Cantidad de elastina</u> <u>% en peso seco.</u>
Aorta (canino)	41.0
Aorta (humano)	33.0
Aorta (bovino)	52.0
Tend3n (humano)	0.3
Coronaria (canino)	16.0
Piel, dermis (humano)	4.8
Ligamentum nuchae (bovino)	80.0
Pulm3n (humano)	25.0
Utero Humano)	5.7

Como puede observarse, la elastina juega un papel muy importante dentro de los organismo y por lo tanto de la vida misma. La modificaci3n de la estructura y la disminuci3n de la producci3n de esta protefina durante el proceso de envejecimiento son en gran parte, responsables de ciertas enfermedades degenerativas, de la aparici3n de arrugas as3 como la p3rdida de la elasticidad y flexibilidad de la piel.

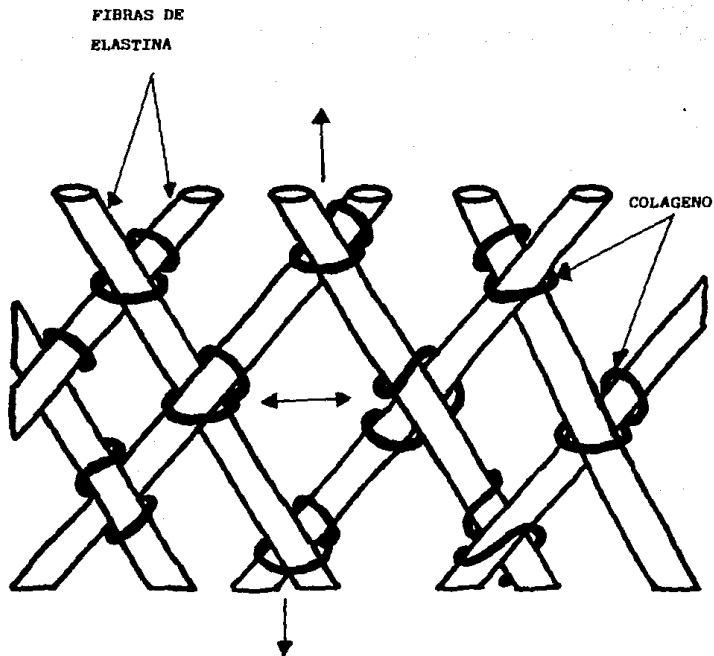


Figura III.1. La elastina provee la flexibilidad y el colágeno la estructura.

## AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ELASTINA

Entre los años 1950 y 1975 algunos químicos y bioquímicos tuvieron gran éxito en el aislamiento de elastina como proteína pura en forma de hidrolizados o en solución, así como en el estudio de sus aminoácidos.

La elastina, en su estado nativo, es raramente conveniente para uso cosmético debido a sus problemas de solubilidad y alto peso molecular. Para ello es requerido un tipo de tratamiento de hidrólisis para reducir sustancialmente el peso molecular.

En muchos casos la elastina se obtiene como un residuo después de que se han removido otros componentes del tejido conjuntivo. El componente más difícil de separar usualmente es el colágeno.

El tratamiento de hidrólisis es crítico, ya que el óptimo tamaño molecular es importante para obtener una eficiencia máxima

Los tratamientos de hidrólisis ácido-básicos son no específicos y resulta una distribución al azar y sin orden de tamaño molecular de los péptidos.

La hidrólisis enzimática es preferida, ya que las enzimas son específicas en su acción hidrolítica y por selección de la propia enzima se puede incrementar el rendimiento.

En el aislamiento y purificación de la elastina, han sido desarrollados varios métodos que a continuación se describen:

## METODOS DE EXTRACCION Y PURIFICACION DE ELASTINA

- I.- Extracción y purificación de elastina con ácido oxálico
- II.- Extracción de elastina con guanidina seguida por una digestión -- con la enzima colagenasa.
- III.- Extracción y purificación de elastina por medio de álcali caliente.
- IV.- Aislamiento y purificación de elastina por el uso de enzimas.
- V.- Extracción y purificación de elastina con piridina y  $\text{CaCl}_2$ .
- VI.- Aislamiento y purificación de elastina con cloruro de guanidina y una mezcla de ácido fórmico-bromuro de cianógeno.
- VII.- Aislamiento de una mezcla de elastina y colágeno.

## I.- EXTRACCION Y PURIFICACION DE ELASTINA CON ACIDO OXALICO

### Método:

El "ligamentum nuchae" de bovino se obtiene fresco del rastro y cuidadosamente se libra de tejidos grasos y membranas adheridas. Se corta en tiras delgadas y se tritura finamente. El producto se agita generosamente con un volumen de 20 ml. al 1% (w/v) de NaCl; el tratamiento continúa con solución salina recién preparada hasta que el extracto de prueba negativa de proteínas con solución de ácido tricloroacético. El triturado se lava con agua destilada para eliminar el NaCl y luego se extrae con una cantidad más de agua en un autoclave a 1 atmósfera de presión por un tiempo de 45 minutos. El autoclaveado se continúa con agua destilada recién preparada por períodos de 45 minutos hasta que el extracto sea negativo la prueba de "biuret". Usualmente se necesitan de 3 a 4 extracciones.

Después de lavar con agua destilada caliente, el material se deshidrata con etanol y se extrae cuidadosamente con etanol-éter al 50% (v/v) para remover los lípidos. Finalmente, esto se extrae con éter y se seca al vacío entre 30 - 40°C. El secado se retira del vacío sobre  $H_2SO_4$  y se muele hasta obtener un polvo fino a través de un molino de martillos de acero inoxidable.

El polvo fino, se trata otra vez en el autoclave a 1 atmósfera de presión por dos períodos de 45 minutos para remover trazas remanentes de colágeno y mucopolisacáridos. Después se lava con agua destilada caliente, se deshidrata con etanol y otra vez se extrae con etanol-éter. Después de secado y dejar un bajo contenido de agua se pasa a través del molino de martillos usando un tamiz de malla fina.

## HIDROLISIS PARCIAL DE ELASTINA CON ACIDO OXALICO

20 g. de polvo de elastina preparado por el método anterior, - se mezclan con un volumen de 150 ml. de ácido oxálico 0.25 M en un ma - tráz de bola de fondo plano provisto con un condensador de aire. La mezcla se calienta a baño maria por 1 hr. y después rapidamente se centrifuga y enfria. El precipitado se lava en la centrifuga con ácido oxálico 0.25 M y los lavados se adicionan al sobrenadante. El residuo se vuelve a tratar con ácido oxálico 0.25 M por 1 hr. a 100°C, el extracto y los lavados se recolectan como anteriormente se menciona; este procedimiento se repite por 5 veces. El polvo disuelto da una coloración amarillo claro, la cuál no requiere filtración. La solución se dializa en tubos de celofán cambiando constantemente el agua destilada hasta que este libre de oxalatos. La solución que contiene alrededor de 1.25% (peso/volumen) de proteína es determinada por refractometría y posteriormente se almacena en congelamiento a -10°C.

Los tratamientos sucesivos anteriores de la elastina del "ligamentum nuchae" con ácido oxálico 0.25 M a 100°C son capaces de solubilizar la proteína. Este procedimiento resulta en la formación de 2 componentes solubles designados  $\alpha$  y  $\beta$  elastina. La  $\alpha$  elastina se encontró que es una dispersión con un peso molecular promedio entre 60,000 y 84,000 D mientras que la  $\beta$  elastina es una monodispersión de un peso molecular promedio de 5500 d. El examen de los residuos terminales del grupo amino de estas 2 fracciones por el uso de fluorodinitrobenzenceno (FDNB) sugiere que la elastina contiene cadenas con un promedio de 35 residuos de aminoácidos por cadena, mientras que la  $\beta$  proteína está constituida por 2 cadenas con un promedio de 27 aminoácidos por cada una.



II.- EXTRACCION DE ELASTINA CON GUANIDINA SEGUIDA POR UNA DIGESTION CON  
LA ENZIMA COLAGENASA

Método:

Se obtiene una preparación de elastina pura del "ligamentum nu chae" de bovino fetal por extracción de un homogenizado del ligamento con guanidina seguida por una digestión con la enzima colagenasa.

. El "ligamentum nuchae" de bovino fetal de 2 a 9 meses se obtiene por disección en el matadero. Cada ligamento se envuelve y congela hasta el momento de su uso.

Procedimiento:

Aproximadamente 4 g. (peso húmedo) del tejido obtenido de "ligamentum nuchae", se tritura finamente con tijeras especiales y se homogeniza en un homogenizador de vidrio conteniendo clorhidrato de guanidina 5 M (ajustado a pH=7.0 con NaOH 0.1 N), hasta obtener una fina suspensión (se extraen el colágeno y otras sustancias contaminantes). A la suspensión se le adiciona guanidina 5 M hasta llegar a un volumen de 80 ml. y se agita por 24 hrs. a baja temperatura. Después se centrifuga a 2000 rpm. aproximadamente, el sobrenadante se descarta y el residuo se resuspende en el mismo volumen de guanidina 5 M recientemente preparada.

Este procedimiento se repite 3 veces por un periodo total de 72 hrs. La suspensión se centrifuga, el sobrenadante se descarta y el residuo se lava 3 veces con tris buffer (pH=7.4) 0.2 M y 3 veces con agua destilada.

La colagenasa (colagenase-CLSPA, Worthington) (1% peso en seco del material inicial) se adiciona al remanente en suspensión en tris buffer (pH=7.4) 0.2 M conteniendo 0.5% de penicilina-streptomicina, y la suspensión es incubada a 37°C por 24 hrs. en baño maría con agitación.

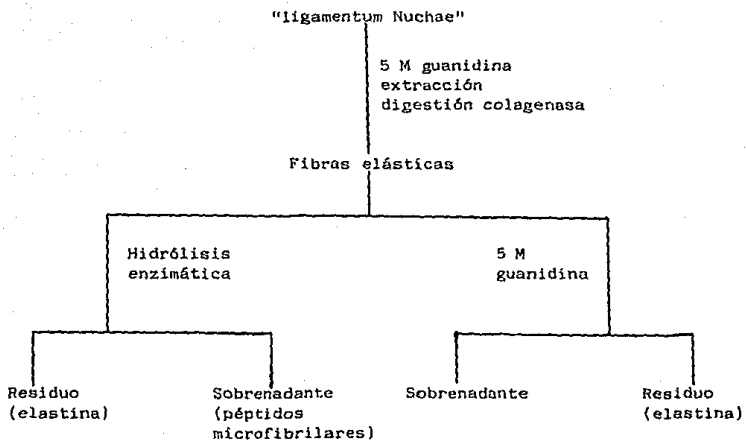
Esta suspensión se centrifuga, el sobrenadante se descarta y el residuo se lava como anteriormente se mencionó.

Antes del último lavado con agua destilada, se toma una alícuota representativa, se centrifuga para formar un residuo y se prepara una muestra para el microscopio electrónico. El residuo de la suspensión se usa para la hidrólisis con elastasa (esquema III.1).

#### HIDROLISIS DE ELASTINA CON ELASTASA

Un 0.01% de solución de elastasa Worthington code, ESFF) en tris buffer 0.2 M (pH=8.8) o en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH=7.8) se usa para la hidrólisis de elastina por intervalos de 15, 30 y 45 min. y 1 hr. a 37°C. Como control se usa buffer sin enzima. La hidrólisis parcial se observa después de 45 minutos.

Esquema III.1. Extracción de elastina con guanidina e hidrólisis



### III.- AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ELASTINA POR MEDIO DE ALCALI CALIENTE

#### Método:

De la autopsia de bovino fetal se obtienen muestras de "ligamentum nuchae". Después de remover todo el tejido adherido, la muestra se lava con agua destilada, se congela, se seca y finalmente se pesa.

Se mezcla con  $\text{CO}_2$  sólido, se tritura con un molino de martillos hasta formar un polvo fino. Este polvo se suspende en  $\text{NaCl}$  0.1 M homogenizándolo en un homogenizador Virtri 45 operado a alta revolución por 3 minutos. La fina suspensión cremosa se agita toda la noche a una temperatura de  $5^\circ\text{C}$ , el material insoluble se recupera por centrifugación a 2079 g/min. La extracción con solución salina se repite 2 veces más y el residuo se lava con agua hasta eliminar todo el  $\text{NaCl}$ , luego se suspende en etanol para eliminar los lípidos presentes, después es tratado toda la noche con cloroformo-metanol (2:1 v/v). Posteriormente se hace una separación por filtración a través de un embudo de vidrio con vacío, la preparación se lava sucesivamente con acetona y éter y después se seca en un desecador. El colágeno insoluble y otros contaminantes se extrajeron por tratamiento con  $\text{NaCl}$  0.1 M a  $98^\circ\text{C}$  por 45 minutos. El residuo de elastina se lava con agua caliente y se seca con solventes orgánicos.

#### IV.- AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ELASTINA POR EL USO DE ENZIMAS

##### Método:

El "ligamentum nuchae" se remueve y extrae con NaCl y solventes orgánicos como se describe en el método anterior. El colágeno se remueve mediante el método de Miller & Fullmer (1966).

1 g. de suspensión mezclada con los polvos de clorhidrato de guanidina 5 M (20 ml.) a pH=7.0 se agita toda la noche a baja temperatura. La suspensión se centrifuga y el residuo se extrae 2 veces más con clorhidrato de guanidina. El residuo se lava con agua destilada, se dispersa en tris-HCl buffer 0.2 M, pH=7.4 (20 ml.), posteriormente se le agrega colagenasa (5 mg. de tipo III fracción A, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A) con una gota de tolueno y la mezcla se incuba a 38°C por 48 hrs. con agitación. La suspensión se centrifuga y la elastina se lava con agua destilada y se seca con solventes orgánicos.

## V.- EXTRACCION Y PURIFICACION DE ELASTINA CON PIRIDINA Y CaCl<sub>2</sub>

### Método:

El "ligamentum nuchea" de bovino fetal se tritura finamente en una solución acuosa de piridina al 50% a 4°C. La suspensión se centrifuga y el residuo se lava con agua destilada hasta que se encuentre libre de piridina y después se seca al vacío. Este material se pulveriza finamente en nitrógeno líquido por 3 minutos y luego se extrae 2 veces por períodos de 24 hrs. con CaCl<sub>2</sub> 2 M a 4°C seguido por 4 lavados con agua destilada. Al tejido remanente se le eliminan los lípidos y se deshidrata con alcohol por 20 min., se filtra a través de un embudo de separación de vidrio, se trata con cloroformo-metanol (2:1 v/v) por 20 min., se lava con éter y se liofiliza.

El material sin lípidos y seco, se extrae con una solución de ácido tricloroacético al 5% a 90°C por 30 min., para desnaturalizar y remover el colágeno remanente. Después de centrifugar el residuo, se lava con agua 3 veces para remover el exceso de ácido tricloroacético, después se incuba con colagenasa purificada (radio del ustrato-enzima aproximadamente 50:1) a pH=7.5 en presencia de CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM a 37°C toda la noche para remover el colágeno remanente.

El sobrenadante se separa por centrifugación y el residuo se pone otra vez en digestión con colagenasa. El residuo colagenasa-insoluble se lava con agua destilada y se extrae nuevamente con guanidina 5 M, ditioeritriol 0.05 M, EDTA 0.1% en tris buffer 0.1 M a pH=8.5 a 37°C toda la noche bajo atmósfera de nitrógeno en un frasco tapado para remover las microfibrillas y otras proteínas remanentes. El residuo obtenido se centrifuga y luego se lava 2 veces con agua destilada y se extrae con u-

rea 6 M, duodecil sulfato de sodio 1%, ditioeritriol 0.05 M en tris buffer 0.05 M a pH=7.7 a baja temperatura bajo atmosfera de nitrógeno en un frasco tapado. Esta última extracción se repite 2 veces. Después de centrifugarla, el residuo se dializa contra agua destilada hasta que el duodecil sulfato no sea detectable y finalmente se liofiliza. La elastina se convierte en polvo fino por medio de un molino congelador.

#### VI.- AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ELASTINA CON CLORURO DE GUANIDINA Y UNA MEZCLA DE ACIDO FORMICO-BROMURO DE CIANOGENO

El aislamiento de elastina de varios tejidos ha dependido de sus propiedades químicas inertes y su resistencia a la hidrólisis. Sin embargo, la mayoría de los procedimientos usados para obtener un producto puro son drásticos y tiene lugar la descomposición de la elastina.

A continuación se describe un método para el aislamiento de elastina con menos degradación que otros métodos.

Al tejido fresco o congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se le elimina la grasa y se corta en tiras delgadas. Estas tiras se congelan en nitrógeno líquido y subsecuentemente se muelen usando un molino Wiley provisto de una cámara con hielo seco.

5 g. de tejido molido se extraen en un tubo de centrifuga con agitación por 24 hrs. a  $25^{\circ}\text{C}$  conteniendo cloruro de guanidina 5.0-5.2 M conteniendo 1% de 2- mercaptoetanol.

La mezcla se diluye a 200 ml. con agua y centrifuga a 870,000 g/min.. El sobrenadante se descarta y el residuo se suspende en 100 ml. de agua y luego se autoclavea por 5 hrs. a 20 lbs/in<sup>2</sup> de presión a 120°C la mezcla se filtra, se lava con agua hirviendo (3 lavados de 100 ml.c/u y se seca sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

El producto seco se suspende en 50 ml. de ácido fórmico al 97% el bromuro de cianógeno se adiciona en exceso (aprox. 500 mg.) y el tratamiento se lleva a cabo por 24 hrs. en un cuarto a baja temperatura. - Después de esto, la mezcla se diluye con 50 ml. de agua hasta la neutralidad, luego se seca sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. El rendimiento de la elastina por este método es aproximadamente del 10% en peso húmedo.

La extracción con ácido fórmico ha sido utilizada por Hass, él encuentra que hay una pérdida de 2-4% de elastina durante cada extracción de 24 hrs. con ácido fórmico al 89% a 45°C. La extracción a 5°C no presenta pérdida de elastina y ayuda a remover completamente otras proteínas contaminantes. Subsecuentemente, el uso de ácido fórmico anhidro para extracción de proteínas no presenta evidencia de hidrólisis. Las ventajas adicionales del uso de ácido fórmico es que remueve rápidamente sales de calcio y la alta solubilidad de lípidos.

Este procedimiento ha combinado métodos más efectivos para la separación de elastina sin el uso de álcalis. La extracción con guanidina es efectiva para remover glicoproteínas por su alto número de residuos ácidos y la presencia de amino-azucars en el sobrenadante. La adición de un agente reductor a la guanidina es efectivo para la solubilización de componentes microfibrilares de elastina. El tratamiento con ácido fórmico remueve de 1 al 10% de colágeno, dependiendo de la edad y del tipo de material.



VII.- PROCEDIMIENTO SIMPLE PARA LA SEPARACION DE UNA MEZCLA DE ELASTINA  
Y COLAGENO

Entre los métodos descritos anteriormente para el aislamiento de protefnas fibrosas insolubles como son la elastina y el colágeno de tejido conjuntivo, han estado el uso de autoclaveado, álcali caliente, ácidos, digestión enzimática, etc..

Una opinión frecuente es que estos primeros métodos son bastante vigorosos y pueden causar daños en la estructura de las proteínas. - En tejidos tales como pulmones y vasos sanguíneos el problema es más complejo en el aislamiento, ya que estas proteínas se encuentran en cantidad insignificante.

El método aquí presente es relativamente fácil, pero la separación puede variarse si se desea y tiene la ventaja de permitir el aislamiento de las dos proteínas en la misma muestra. Esto es benéfico para el aislamiento de estas proteínas en pequeñas muestras de tejido. Los méritos adicionales a este método son que no requiere una labor intensa, que no es caro y que puede llevarse a cabo con una mínima cantidad de equipo.

**Material y Método:**

- Fenol
- Sales
- Acido Acético
- Dietil Eter
- Colágeno tipo I y II
- Elastina

- Albúmina Sérica Bovina
- Colagenasa
- Elastasa

#### Extracción preliminar:

Toda operación se lleva a 4°C. Después de que se removieron los tejidos, se lavan intensamente con agua destilada y se almacenan en refrigeración.

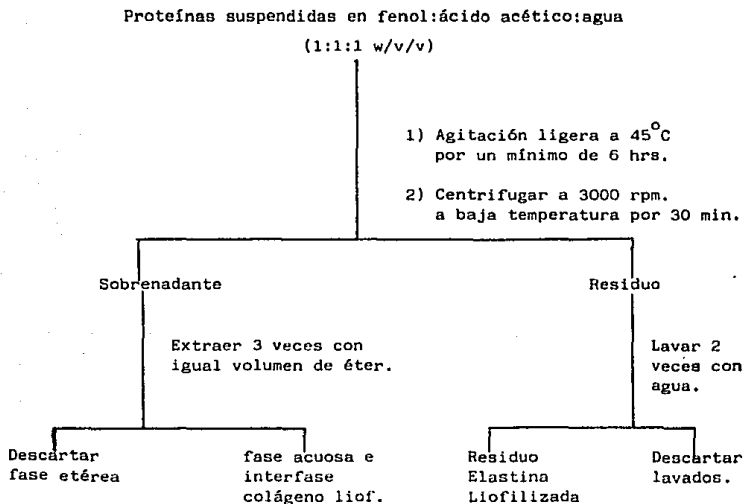
Las secciones se cortan en pequeñas piezas y se extraen por 16 hrs. con NaCl 0.2 M en fosfato de sodio pH=7.4 a 0.01-0.1 mg. de tejido por ml. Después de centrifugar a 22,000 g/30 min., el sobrenadante se ensaya para prueba de proteínas, mientras el residuo se suspende en solución salina y se reextrae. Este procedimiento se repite hasta que las proteínas solubles son menor de 0.2% de peso húmedo de tejido original.- El procedimiento de extracción se realiza similarmente primero con NaCl 0.5 M en fosfato de sodio 0.02 M a pH=7.4 y luego con EDTA 0.167 M en tris-HCl 0.01 M a pH=7.4. El residuo se lava 2 veces con agua destilada. En un cuarto a baja temperatura, el residuo se extrae 3 veces con cloroformo:metanol (2:1) por 16 hrs. a una concentración de 0.02-0.2 mg de tejido/ml.. El tejido se centrifuga por 30 min. a 300 rpm; finalmente el tejido se lava 2 veces con acetona y se seca con dietil éter.

#### Separación de elastina y colágeno:

El colágeno y/o elastina secos se suspenden en una solución recientemente preparada de fenol:ácido acético:agua (1:1:1, w/v/v) aproximadamente 8 mg/ml.. La extracción se lleva a cabo en condiciones asépti

cas. Después de la extracción, las proteínas solubles e insolubles se separan por centrifugación a 3000 rpm. por 30 min. a baja temperatura. - El colágeno soluble se recupera de la fase fenólica por extracción con igual volumen de dietil éter frío. Después de centrifugar, la fase etérea se descarta. La interfase y la fase acuosa se reextraen 2 veces más antes de ser liofilizadas. La fase insoluble de elastina se lava 2 veces con agua destilada para remover el fenol y el ácido acético, (procedimiento en el esquema III.2).

Esquema III.2. Separación de colágeno y elastina

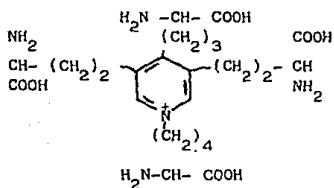


## ANALISIS DE ELASTINA

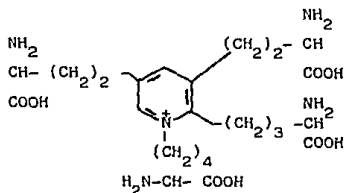
Químicamente, la elastina es una proteína muy interesante.

El análisis químico de hidrolizados de elastina revela la presencia de dos aminoácidos polifuncionales cuyas estructuras aparecen únicamente en esta proteína. Estos compuestos fueron identificados por Thomas y Col. en 1963 y se designaron como DESMOSINA E ISODESMOSINA, cuya fórmula empírica es  $C_{26}H_{45}N_5O_8$  y  $C_{26}H_{41}N_5O_8$  respectivamente.

Estos compuestos, son isómeros que se diferencian únicamente por la sustitución en posición del anillo. Estas estructuras tienen núcleos de piridina alquilatados en cuatro posiciones, incluyendo el nitrógeno del anillo. (figura III.2).

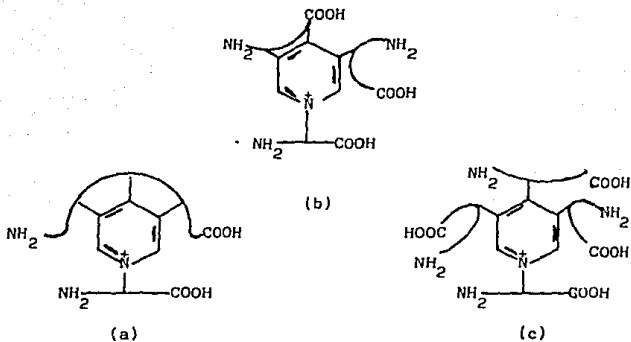


**DESMOSINA**



**ISODESMOSINA**

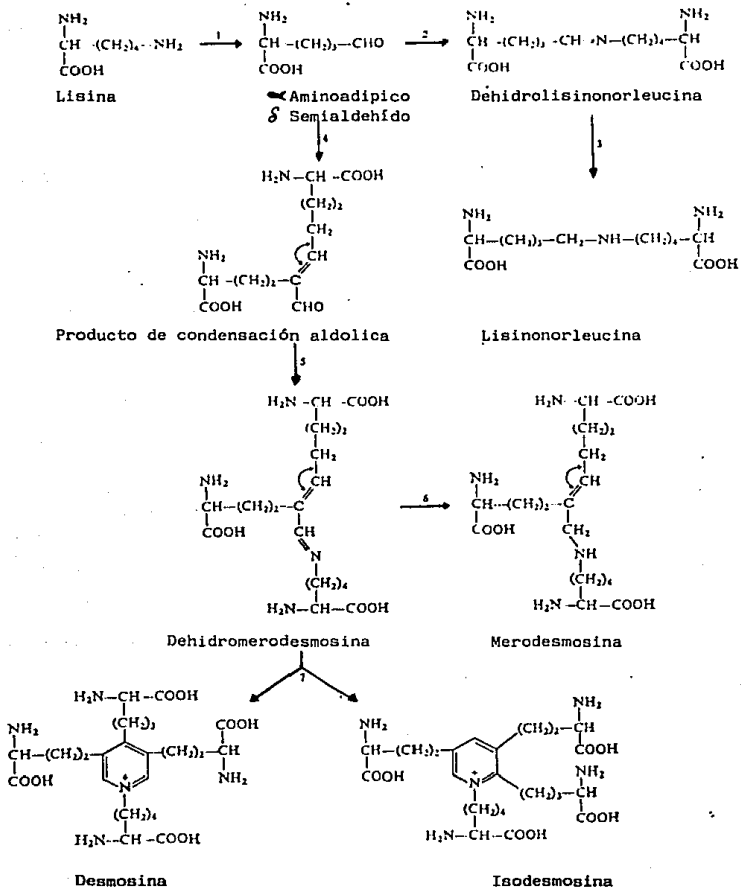
En base a sus estructuras y a la naturaleza de los péptidos en los cuales están contenidos, Patridge sugiere que la desmosina e isodesmosina e isodesmosina están involucradas en los enlaces de elastina. (figura III.3).



**Fig. III.3. Una molécula de desmosina o isodesmosina pueden enlazarse con: a) dos péptidos, b) tres péptidos, c) cuatro péptidos.**

La formación de desmosina e isodesmosina ocurre en el espacio - extracelular y son derivados de la oxidación y la condensación de cuatro residuos de lisina y una cantidad de lisinonorleucina que se deriva de - dos cadenas de lisina.

La posible ruta para la biosíntesis se presenta en el esquema siguiente:



Estructura de enlaces derivados de lisina en elastina, presentando su síntesis a partir de moléculas de lisina. Los grupos  $\alpha$  amino y  $\alpha$  carboxilo forman enlaces peptídicos en elastina.

La determinación de elastina, puede hacerse por la medición de desmosina e isodesmosina por cromatografía en papel.

A continuación se describe un método rápido y simple para la medición de elastina. Esta técnica hace uso de la insolubilidad de las desmosinas en butanol.

#### Método:

El tejido obtenido se homogeniza con buffer de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a pH= 7.6, conteniendo 1% de NaCl y 0.1% de EDTA. Estos homogenizados se extraen en frío por 48 hrs. con varios cambios de buffer.

El extracto de tejido se lava con agua destilada, se congela y se seca. Las muestras se pesan en tubos de 15 X 125 mm, se adiciona 4 ml. de HCl 6 N a cada muestra y la solución se enfría en hielo seco y  $\text{N}_2$  la hidrólisis se lleva a cabo por 72 hrs. a  $105^\circ\text{C}$ , tiempo después el hidrolizado color café se filtra cuantitativamente directamente sobre un matraz de evaporación de 50 ml. y se seca a vacío a  $50^\circ\text{C}$ .

El residuo se suspende en 0.1 ml. de agua y se coloca a lo largo de papel Whatman 3 mm-7 in, secándolo en corriente de aire caliente.- El matraz de evaporación se enjuaga 3 veces con 0.1 ml. de agua y cada enjuague se aplica sobre el papel, el cuál se seca posteriormente. El papel se coloca en una cámara para permitir el flujo continuo de solvente se revela con N-butanol:ácido acético:agua (4:1:1) por 48 hrs. y posteriormente se seca el cromatograma.

Ya que las desmosinas son insolubles en N-butanol y permanecen en el lugar de origen, la tira de papel se corta de tal manera que incluya y se extienda alrededor de 3 mm más allá de cada lado de la muestra original colocada. La tira resultante debe ser aproximadamente de 2.5 cm. de ancho.

Cada extremo de la tira se corta en un punto y es atada con un cordón por el otro extremo. La tira se eluye con agua en una cámara cerrada hasta que se colecten alrededor de 0.5 ml. en un pequeño matraz.

Para el análisis correspondiente, se aplican 0.2 ml. en el analizador.

El análisis de los aminoácidos se lleva a cabo en un equipo para análisis Bechman 116 para 30 muestras de columna simple.

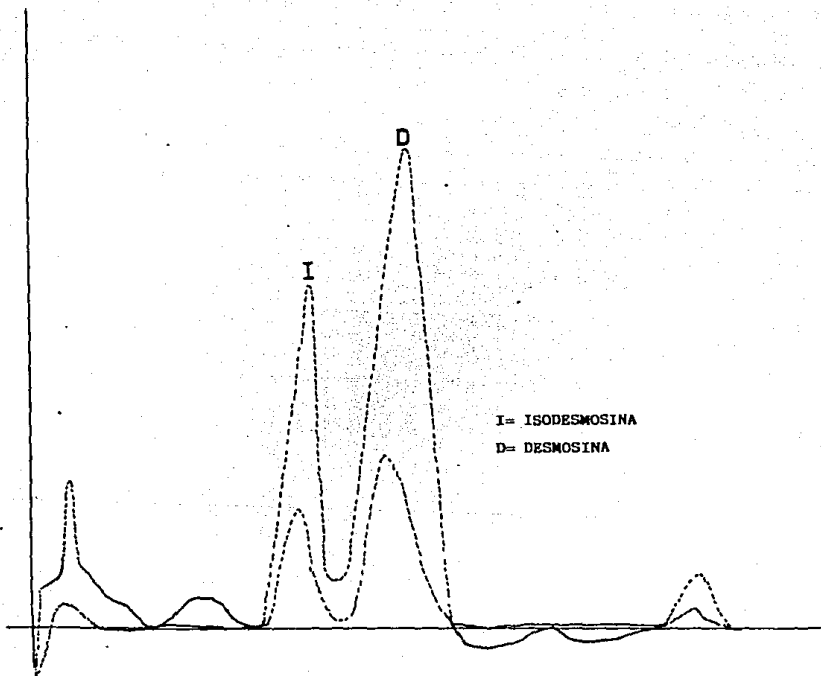
Para cuantificación de las desmosinas se programa el analizador.

La isodesmosina eluye después de 98 min. aproximadamente y la desmosina después de 106 min.. Esta última se usa para cuantificar la cantidad de elastina en % basados en 3.4 equivalentes/mol. de leusina.

La ventaja de este método es que es un análisis reproducible, a la vez que tiene la habilidad de cuantificar pequeñas concentraciones de elastina.

En el siguiente dibujo se presenta un cromatograma típico para el análisis de desmosina e isodesmosina después de la elución en papel.





## BIOSINTESIS Y DEGRADACION DE ELASTINA

Se ha designado a un componente precursor de elastina en fibras elásticas como tropoelastina. La tropoelastina parece ser secretada de las células en forma de una proteína con un peso molecular promedio de 72,000 daltons. Este componente se ha determinado como precursor de acuerdo a 3 criterios:

- 1) Los análisis para elastina y tropoelastina son los mismos excepto para lisina y enlaces derivados de ella.
- 2) Cuando la lisina marcada con  $C^{14}$  de la tropoelastina se adiciona a un cultivo de células de músculo liso no marcadas, el marcado aparece en desmosina e isodesmosina dentro de cierto tiempo.
- 3) Los anticuerpos para elastina reaccionan también con tropoelastina.

El tipo de células de mayor importancia para la síntesis de elastina son las células de músculo liso; además las células endoteliales también son capaces de sintetizar elastina.

Kantor y col. reportaron la síntesis de elastina de cultivo de células endoteliales de pulmón. Carnes, Jaffe y col. también han reportado que los cultivos de tejidos endotelial sintetizan elastina. Incluyendo a lo anterior también implica la síntesis de elastina en fibroblastos (figura III.4) y "ligamentum nuchae".

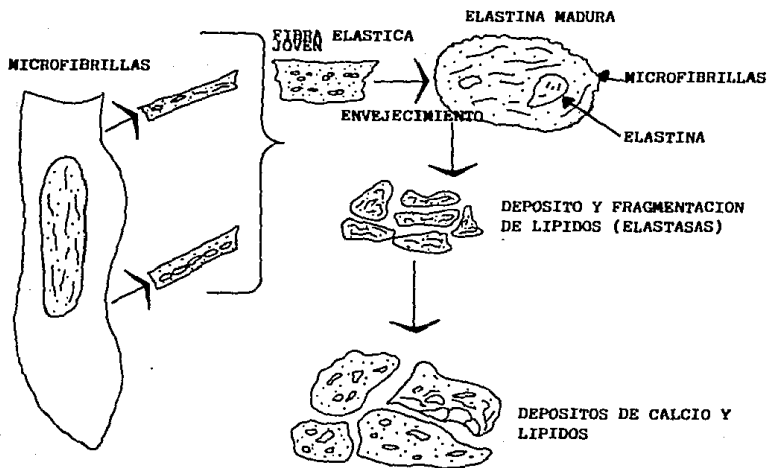


Fig. III.4.

La biosíntesis de elastina por las células sigue en general, - el mismo principio básico para la síntesis de proteínas en general, (tabla III.1).

Tabla III.1. Biogénesis y degradación de elastina

1.- Expresión de genes para péptidos de elastina

- |  |  |
|--|--|
| a) Selección del gene:   | Determinar el isotipo que va a ser sintetizado.  |
| b) Transcripción:  | Formación de RNAm precursor.                     |
| c) Preparación de RNAm precursor:  | Formación de RNAm funcional.                     |
| d) Traslación:   | Ensamblamiento de cadenas peptídicas             |
| e) Control de la vel. de transcripción, preparación y traslación de RNAm : | Determinar la cantidad de péptidos sintetizados. |

2.- Modificaciones Co-traslación y post-traslación intracelular

- |  |   |
|--|---|
| a) Supresión de la secuencia:                    | Puede ser necesaria para la secreción.                                  |
| b) Formación de 4-hidroxiprolina.                |   |
| c) Degradación intracelular de algunos péptidos: | Renovar los péptidos defectivos y modulación de producción de elastina. |

- 3.- Secreción: Transportación a través del aparato de Golgi o vacuolas hacia el espacio extracelular.
- 4.- Modificación post-traslación extracelular
- a) Deaminación oxidativa de algunos residuos lisil: Necesario para la formación de enlaces.
- 5.- Formación de fibras
- a) Ensamblamiento con la proteína microfibrilar: Formación de fibras elásticas.
- b) Formación de enlaces covalentes: Estabilización de las fibras.
- c) Interacción con otras células y macromoléculas celulares: Determinación de propiedades físico-químicas de los tejidos.
- 6.- Degradación extracelular
- a) Descomposición por elastinas específicas y otras enzimas proteolíticas: Renovación de fibras extracelulares.

La traslación del RNAm para los péptidos de elastina tiene lugar en los polirribosomas del retículo endoplásmico y el crecimiento de las cadenas de los péptidos se lleva a cabo dentro del retículo endoplásmico.

El mecanismo de la secreción, desde el retículo endoplásmico hacia el espacio extracelular, no ha sido claramente estudiado. Esto es posible, sin embargo, ya que la elastina se secreta vía aparato de Golgi o vesículas similares (figura III. 5)

Siguiendo una relación, las cadenas de los nuevos péptidos sintetizados sufren una modificación post-traslacional llevándose a cabo la formación de 4-hidroxiprolina, la cual se cataliza enzimáticamente.

Bajo situaciones normales, el contenido relativo de hidroxiprolina en elastina es altamente variable, variando de 7 a 25 residuos por 1,000 aminoácidos. En contraste con el colágeno, la hidroxiprolina no juega un papel crítico en cuanto a la estabilidad de la conformación de la proteína; esto ha sido demostrado, ya que la inhibición de la formación de hidroxiprolina no interfiere con la síntesis o secreción de elastina.

Una modificación importante post-traslacional de elastina, la deaminación oxidativa de ciertos residuos lisil para formar aldehídos, tiene lugar en el espacio extracelular; subsecuentemente, estos aldehídos participan en la formación de enlaces.

La deaminación oxidativa de residuos lisil se cataliza por lisiloxidasas, la cual requiere cobre y oxígeno molecular como co-factores (figura III. 6). La lisil oxidasa se sintetiza y secreta por los fibroblastos en cultivos de piel humana; estas células son, presumiblemente,

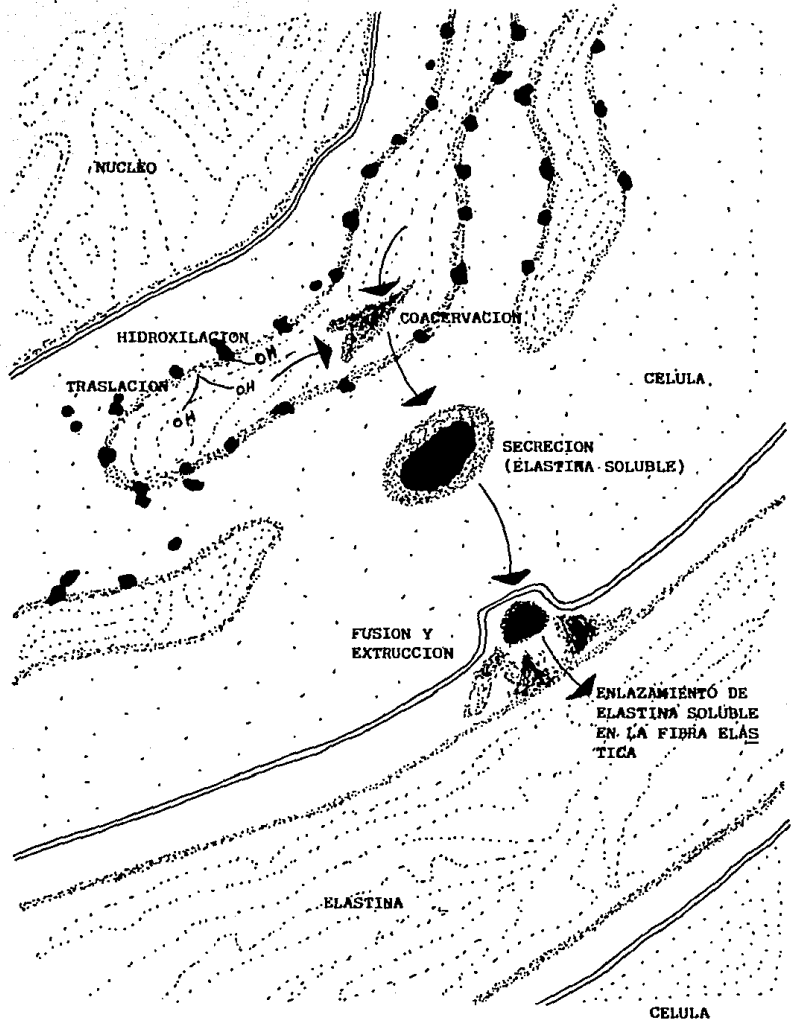


FIG. III.5

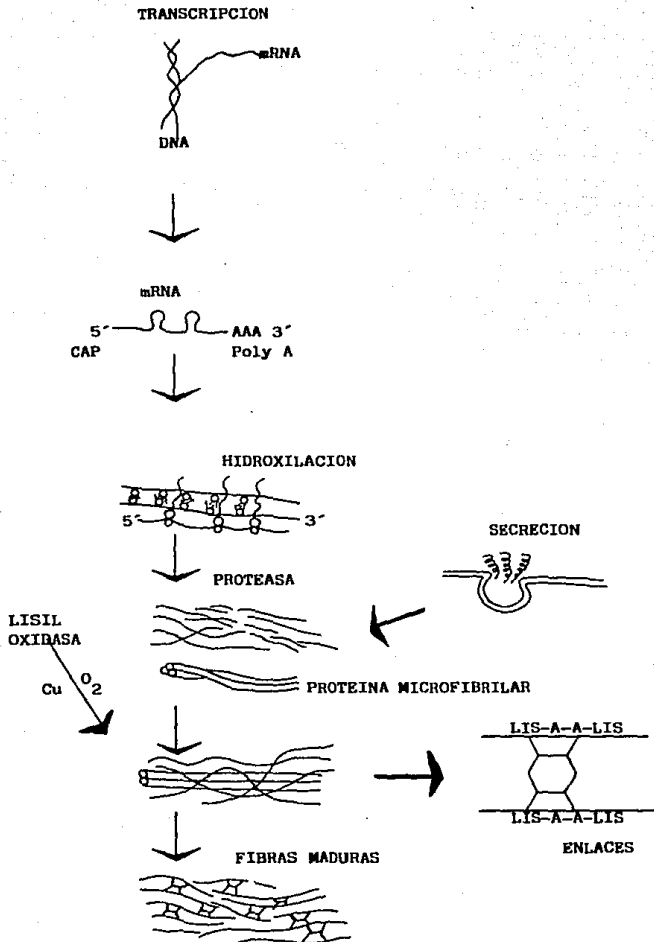


Fig. III.6. Deaminación oxidativa y biosíntesis de elastina.



un recurso de la enzima en vivo.

### DEGRADACION

Aunque el metabolismo de proteínas de tejido conjuntivo y especialmente de elastina es relativamente lento en comparación a otras proteínas en general, es claro que una proporción de elastina se degrada - continuamente y es reemplazada por proteína nuevamente sintetizada. Además, la degradación por elastina se incrementa por una variedad de condiciones patológicas.

Así, los tejidos que contienen elastina presentan enzimas proteolíticas y elastasas, las cuales son capaces de degradar las fibras - elásticas. En general, las enzimas elastasa y serina proteinasa degradan la elastina a pH neutro o ligeramente alcalino.

La actividad de estas enzimas puede inhibirse por factores del suero tales como  $\alpha$ 1-anti-proteinasa y  $\alpha$ 2-macroglobulina.

## COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE ELASTINA

La elastina tiene una composición de aminoácidos altamente característica y única en comparación con el colágeno, que es otra proteína del tejido conjuntivo.

La elastina tiene un alto contenido de aminoácidos no polares tales como: glicina, prolina, alanina, valina y leucina, los cuáles forman la mayoría de los residuos, mientras que los aminoácidos con grupos polares como: ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, triptofano y tirosina, solo se encuentran en pequeñas concentraciones y cisteína y metionina parecen estar ausentes.

La predominación de aminoácidos no polares en ésta proteína ofrece una buena herramienta para su identificación.

Para el análisis de los aminoácidos de elastina del "ligamentum Nuchae", se partió de una muestra de 10mg. de tejido la cual se colocó en tubos de vidrio conteniendo 5 ml. de HCl y se puso a temperatura constante de 110°C por 72 hrs. para llevar a cabo la hidrólisis.

El análisis se llevó a cabo en un analizador Beckman modelo - 120 C.

La tabla III. 2, presenta la composición de aminoácidos de elastina aislada por 4 diferentes métodos del "Ligamentum Nuchae".

Tabla III. 2. Los métodos incluyen el uso de álcali, autoclaveado, enzimas y ácido fórmico. Los resultados se expresan como residuos de aminoácidos /1000 residuos.

Método de Aislamiento	Colagenasa	Autoclaveado	Acido Fórmico	Alcali
Hidroxiprolina	10.5	11.0	9.0	9.6
Ac. Aspártico	7.1	7.3	5.4	5.4
Treonina	8.0	8.1	7.5	6.3
Serina	6.7	6.9	5.6	5.3
Ac. Glutámico	14.4	15.7	13.9	15.5
Prolina	125.0	120.0	122.5	116.0
Glicina	338.0	334.0	343.0	334.0
Alanina	220.0	224.0	224.0	223.0
Valina	140.0	142.5	144.0	145.8
Isoleucina	26.0	25.4	24.5	27.6
Leucina	58.4	60.8	57.7	64.0
Tirosina	7.2	6.5	6.0	7.5
Fenilalanina	28.8	27.5	27.6	32.4
Lisina	3.9	3.8	3.5	3.5
Arginina	6.8	6.9	6.4	4.3
TOTAL	1000.8	1000.4	1000.6	1000.2

El análisis de aminoácidos de elastina resulta casi idéntico en los 4 diferentes métodos de aislamiento.

Las pequeñas diferencias encontradas pueden deberse a contaminación de la proteína, la cuál puede removerse por otro método dentro de los 4.

También se puede concluir que el análisis de aminoácidos de elastina, extraída por método enzimático ofrece mayor rendimiento debido a que este método es más selectivo, como ya se mencionó en el capítulo anterior.

## SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE ELASTINA

La secuencia de aminoácidos de las cadenas de los péptidos de elastina ya se ha determinado. En 1976 algunas investigaciones concideran alrededor de 730 residuos de la cadena, la cuál debería tener una longitud de aproximadamente 850-870 residuos, basados en el peso molecular de 68,000 a 72,000 daltons. Esto parece claramente que el péptido T 15 representa los  $\text{NH}_2$  terminales de la proteína.

Los péptidos: T1, T2, T4, T6, T7a, T7b, T9a, T9b, T9c, T12, T13a T14a, T14b, T14c y T15 han sido secuenciados individualmente (tabla III.3)

La figura contiene la secuencia de todos los péptidos con la porción no secuenciada de cada uno. Los péptidos T13 y T14a no se incluyen en la tabla, ya que estos representan el pequeño péptido tríptico Ala-Ala-Ala-Lis y Ala-Ala-Lis.

El análisis representa el siguiente aspecto:

1.- Los residuos de lisina aparecen regularmente en pares. En una zona del péptido T14b, se encuentra un grupo de 4 residuos de glicina.

2.- Ocurren las siguientes secuencias repetidas:

Un tetrapéptido Pro-Gli-Val-Gli-Val en T15.

Un pentapéptido Gli-Gli-Val-Pro en T1.

Un hexapéptido Pro-Gli-X- Gli-Val-Ala en T2.

X=(Val o Isoleu)

La secuencia Gli-Val-Pro-Gli se encuentra frecuentemente.

Una importante secuencia es: Lis-Ala-Ala-Lis y Lis-Ala-Ala-Ala-Lis.

3.- Se pueden distinguir dos regiones de la molécula de elastina:

Regiones en las cuales existen los enlaces y regiones en las cuales los enlaces están ausentes y son, por lo tanto, especialmente extensas.

En las regiones en las cuales los enlaces existen, es típico encontrar el potencial de enlace de lisina, enriquecida con alanina, especialmente el C de la porción terminal.

En el péptido T7b se encuentra un alargamiento de 8 alaninas seguidas una de otra.

En las regiones en las cuales los enlaces están ausentes, es posible distinguir entre tres tipos de modelos repetidos en la secuencia:

- a) Repeticiones de aminoácidos vecinos: Aquí la regla básica es que prolina está situada generalmente antes de glicina. Los grandes residuos alifáticos generalmente siguen después de residuos de glicina.
- b) Repetición de cadenas cortas de péptidos.
- c) Repetición de cadenas grandes de péptidos: Para esta región hay una carencia de firme evidencia. En la literatura aparece que la elastina posee 6 o 8 regiones, cada una de las cuales consiste de una región de enlace y una región de elasticidad.

Tabla III.3 Secuencia de aminoácidos en elastina

Grandes péptidos tripticos*		1	5	10	15	20	25	30	35	40	45
T15 (88 residuos)	Proteína completa	G	G V P G A V P	G G V P G G V F	F P G A G L G G L G						
T1 (85 residuos)	(K)Y G A A G G L V P G A P G F G P G V G V P G V G V P G V G V P G V s V p G V g V P G V g v										
T4 (110 residuos)	(K)Y G A P C A G V L P G V G V G G V g v p g										
T9c (30 residuos)	(K)Y G A A G A L G G V G B L G G A G I P g x V A G										
T2 (60 residuos)	A A Q F G L G P G I G V A P G V G V A P G V g V A P G V G V a P G V G V A P x I										
T9b (36 residuos)	A A E F G V G G V G G L x V G G L G A V x G A G										
T6 (40 residuos)	A G A G L G G V G G V G G L G V s T G A V V P										
T14b (39 residuos)	A P G G G G A F A G I P G V G G P F G G Z Z P G V P L x G p										
T7a (58 residuos)	(R)G G V G V G G I P T F G V G A G G F P G F G V G V G G V p G A A L										
T12 (24 residuos)	V P G V G L P G V Y P G										
T14c (17 residuos)	(R)F P G V G V L P G V P T G T G V K										
T7b (21 residuos)	A G Y P T G T G V G T Z A A A A a A A A K										

Pequeños péptidos tripticos

A A A K  
A A K  
S A K

Fragmentos de C-terminal de grandes péptidos tripticos

A K (7.3)	G K (0.5)
A A K (4.5)	G V K (1.2)
A A A K (0.9)	G P K (0.5)
G A K (0.8)	G A R (1.3)

Abreviaciones; G, glicina; A, alanina; p, prolina; P, hidroxiprolina; V, valina; I, isoleucina; L, leucina; T, tirosina; F, fenilalanina; R, arginina; B, asparagina; Z, glutamina; x, desconocido. Los principales sitios de hidroxilación se indican como P.

\* Son secuencias parciales excepto T14c y T7b.

## CAPITULO IV

### ESTRUCTURA DE ELASTINA

La literatura ha descrito varias hipótesis concernientes a la estructura de elastina. La hipótesis de D.W. Urry se funda en la secuencia repetida de la estructura primaria:

El tetrapéptido  $(\text{Gli-Gli-Val-Prol})_n$

El pentapéptido  $(\text{Val}_1\text{-Pro}_2\text{-Gli}_3\text{-Val}_4\text{-Gli}_5)_n$

El hexapéptido  $(\text{Ala}_1\text{-Pro}_2\text{-Gli}_3\text{-Val}_4\text{-Gli}_5\text{-Val}_6)_n$

El pentapéptido y hexapéptido unidos contienen puentes de hidrógeno entre  $\text{Gli}_3\text{-NH}$  y  $\text{Gli}_5\text{-C-O}$  y un puente más limitado entre  $\text{Gli}_3\text{-C-O}$  y  $\text{Gli}_5\text{-NH}$ . Hasta la fecha no hay detalles de la interacción entre puentes de hidrógeno y los péptidos unidos en el polipentapéptido.

En contraste, el polihexapéptido contiene un anillo de 23 átomos de hidrógeno. El anillo forma puentes de hidrógeno  $\text{Val}_6\text{-NH}$  y  $\text{Val}_6\text{-C-O}$  entre las sucesivas repeticiones de la  $\beta$ -Giro o Rotación (fig.IV.1 y 2)

El  $\beta$ -Giro puede existir en dos modificaciones estructurales; - en la fig. 1, el péptido residual se representa simplemente por líneas - rectas conectando los átomos  $\beta$ -C; las líneas punteadas indican puentes de hidrógeno entre segmentos de cadena.

El aspecto de la estructura formada que parece ser común, en elastina, es cuando una cadena de segmento se enlaza y cruza antiparalela al segmento de la cadena anterior y al cuál se denomina  $\beta$ -Giro (fig.IV.2) Esta estructura se llama también  $\beta$ -lámina plisada antiparalela, porque resulta una forma laminar cuando las grandes cadenas se alinean de una manera antiparalela.



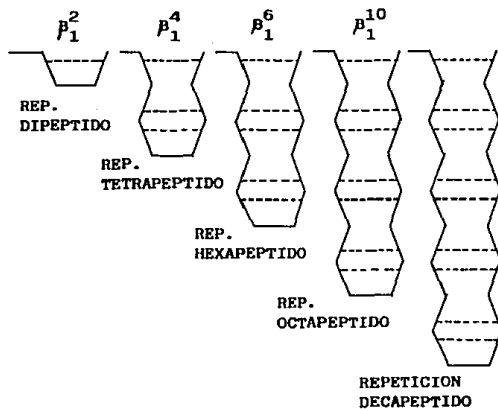


Fig. IV.1. Conformación  $\beta$

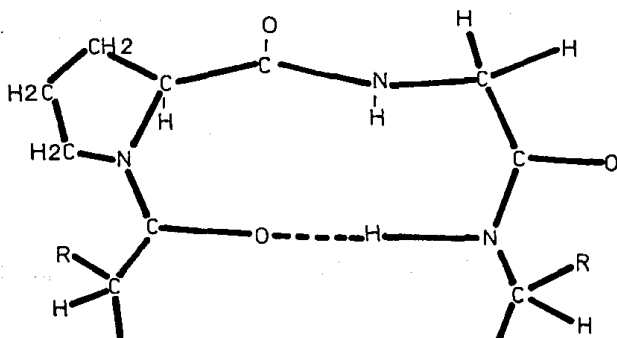


Fig. IV.2.  $\beta$ -Giro de residuos repetidos de elastina

El  $\beta$ -Giro permite a la cadena de elastina enrollarse sobre sí misma. Cuando regularmente una sola cadena gira o se enrolla sobre sí misma, haciendo una estructura en forma de banda y la longitud de la cadena no es muy larga, la estructura comunmente termina en una  $\beta$ -conformación cruzada.

Cuando el  $\beta$ -Giro se repite varias veces sobre el eje helicoidal, resulta una estructura conocida llamada  $\beta$ -helice. Esta es una estructura única y maravillosa que no ocurre en ninguna otra protefna (fig. IV.3).

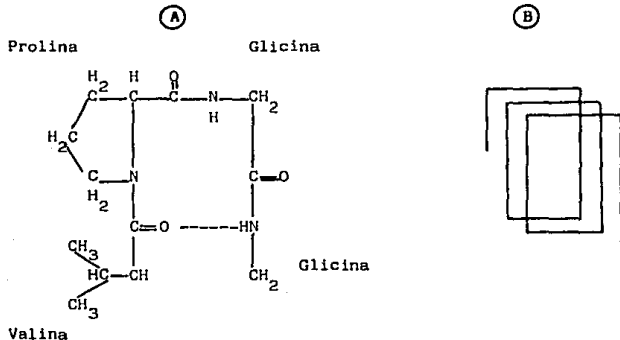


Fig.IV.3. Estructura basada en el tetrapéptido repetido, Val-Pro-Gli-Gli.

(A) un  $\beta$ -Giro formado de una unidad de tetrapéptido. (B) una  $\beta$ -helice o espiral formada de varias sucesiones de  $\beta$ -Giro.

La  $\beta$ -espiral es muy importante en la elastina para su funcionamiento y probablemente también en la formación de fibras.

Clearly y Cliff han demostrado en fibras elásticas reconstituidas de hidrolizados, filamentos enrollados de 1.8nm y de 0.9nm dando la apariencia de intervalos regulares, el último teniendo la misma dimensión que la  $\beta$ -espiral.

Investigación de la estructura primaria de la elastina junto con residuos de lisina indican la única propiedad de alanina: Los pares de lisina son separados de uno a tres residuos de alanina y son procedidos de algo así como 8 alaninas en secuencia continua (figura IV. 4).

Estos pares de lisina son destinados cada uno a obtener la mitad de uno de los enlaces de desmosina e isodesmosina; esto aparenta que la alanina limitada es esencial para la formación de enlaces. La alanina es ciertamente peculiar para la molécula de elastina. La alanina sugiere que exista un tipo especial de estructura en el área de enlaces, posiblemente la  $\alpha$ -helice, aunque este concepto no ha sido aún demostrado.

Así, la elastina parece tener una naturaleza dual: Una porción extensa conteniendo residuos de aminoácidos de naturaleza hidrofóbica y una porción más compacta (rica en alanina), conteniendo los residuos de lisina que forman la porción de enlaces de la elastina.

Para secuencias regularmente repetidas, la estructura de elastina requiere un número constante de residuos en la unidad repetida (figura IV. 5). Las líneas sólidas conectan los átomos de  $\alpha$ -C y las líneas punteadas C-o.....H-N-puentes de hidrógeno.

Esto debe visualizarse para péptidos lineales, en la posición interrumpida en el ciclo, la continuada cadena de péptidos de la estructura indicada puede formar una espiral arriba o abajo formando una  $\beta$ -espiral hacia el lado derecho o hacia el lado izquierdo (fig. IV.6). Dependiendo también de la estructura real formada, podría haber un número fraccional de residuos por cada vuelta de espiral.

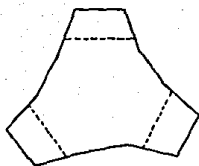
Además de la alta frecuencia de lisina, se encuentra un grupo de alaninas a lo largo de la cadena del péptido en las regiones en las cuales se forman los enlaces. El caso del poli-l-alanina en las regiones de enlace es significativo. Esto ha demostrado que la poli-l-alanina puede formar  $\alpha$ -helices y que la estructura es muy estable. De esto, se deduce que las regiones de enlace poseen la configuración  $\alpha$ -helice.

La regularidad de las secuencias repetidas en la estructura primaria fué examinada por Foster, Gray y Sandberg, para dar un conocimiento de las regularidades y de las características estructurales de la estructura secundaria.

En la región de enlace, ocurren en secuencias pares de lisina tales como:

Ala-Ala-Ala-Ala-Lis-Ala-Ala-Ala-Lis-Tir-Gli-Ala-Ala (fig. IV.7)

Tales regiones podrían favorecer una configuración  $\alpha$ -helice con las lisinas que sobresalen del mismo sitio de la helice; esto podría facilitar la condensación intercadena entre lisinas oxidadas. Las condensaciones intercadena subsecuentes permiten a la desmosina e isodesmosina enlazarse a dos cadenas  $\alpha$ -helice con muy poca fuerza. Estimaciones de la proporción del espiral de elastina hidratada, varía de 10 a 25% dependiendo del modelo del sistema usado y sobre los factores de corrección.



REPETICION  
DECAPEPTIDO  
O PENTAPEPTIDO



REPETICION  
HEXAPEPTIDO  
O TRIPEPTIDO

Fig. IV.5. Conformacion  $\beta$  espiral

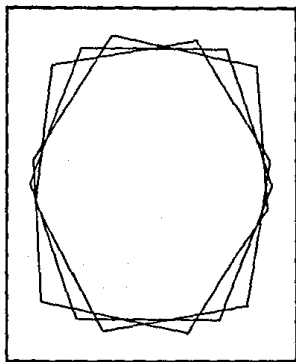


Fig. IV.6.



Fig.IV.7. Representación de regiones de enlace (composición de los péptidos S19 y S20). (Ala) indica que probablemente la Ala. se encuentra en esa posición aunque no puede concluirse definitivamente. Lis en conjunción con la abreviación DES indica un sitio de enlace. (X) indica que el residuo es desconocido.

---

Se podría tomar en cuenta áreas enlazadas para contribuir en un 15-20% de la  $\alpha$  helice. Las regiones entre enlaces contienen menos Alanina y son ricas en glicina, prolina y valina. Esta región es probablemente responsable de la extensibilidad de la proteína.

Dos puntos de vista extremos para la conformación de esta región son:

- a) Las cadenas son casualmente enrolladas y cinéticamente libres p.ej.; en la forma elástica "clásica".
- b) Las cadenas tienen una conformación preferida, para la cuál ellas retornan a su estado original después de ser liberadas de una fuerza de tensión.

La entidad presentada como presunta responsable de la elasticidad en la cadena de péptidos, se designa "oiled coil" (espiral engrasada). Esta consiste de un espiral extenso en el cuál las glicinas ocupan la posición exterior expuesta hacia el solvente, mientras que la prolina y valina y otros residuos hidrofílicos están ocultos. La mayor parte de la estructura del péptido está hidratada.

El  $\beta$ -Giro (fig.IV.8), forma un bloque compacto con los voluminosos grupos hidrofóbicos en un lado de la terminación y las glicinas en el otro extremo. Cuando varios de estos bloques se enlazan, se forma una extensa helice hacia el lado izquierdo, con el voluminoso sitio de las cadenas hacia el centro y la glicina hacia el otro lado. Esto origina un exterior y un interior en condiciones acuosas, quedando hidratadas las cadenas del péptido expuestas.

### ESTRUCTURA TERCIARIA

En vista de lo ya conocido, respecto a la forma en las cuales las cadenas de elastina se arreglan en relación de una a otra para formar subunidades intactas no es sorprendente, ya que es difícil diferenciar entre las estructuras de las fibras elásticas y aquellas estructuras mayormente organizadas, las cuales llegan hasta el fibrilar.

Un modelo para la estructura terciaria podría explicar la interacción no-covalente entre cadenas individuales junto con las subunidades.

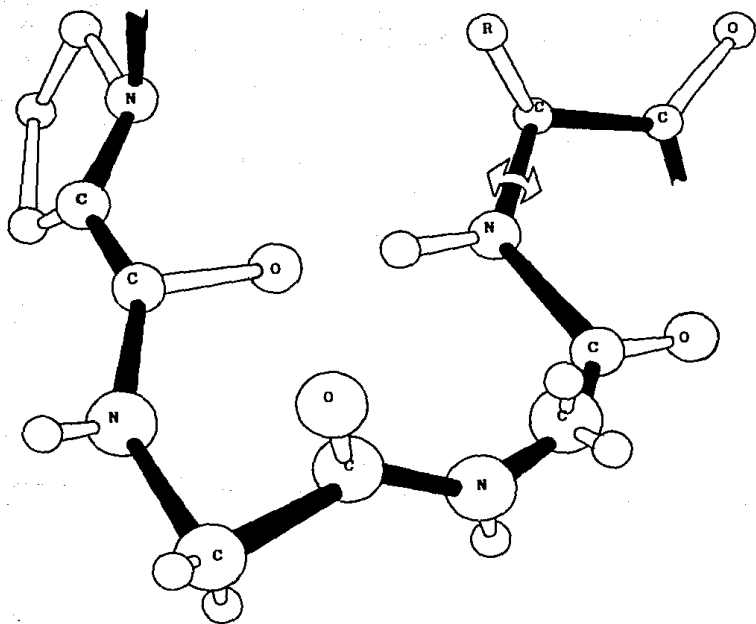


Fig. IV.8. Un  $\beta$ -Giro de el péptido PRO-GLI-GLI-VAL.



Patridge sugiere un modelo estructural para elastina basado en evidencias bajo microscópio electrónico y resultados obtenidos por experimentos de filtración en gel en columna; esto se hizo con fibras de elastina finamente divididas. De acuerdo a este modelo, él propone una estructura terciaria específica. La elastina es un sistema de dos fases y está compuesta de moléculas globulares con grupos hidrofóbicos en el interior y grupos hidrofílicos en la superficie donde son expuestos a la fase acuosa, los cuales ocupan el espacio entre los glóbulos; estos glóbulos son interlazados por medio de varios enlaces, los cuales han sido determinados.

En la elastina, el número de residuos de aminoácidos los cuales llevan cadenas con sitios hidrofílicos, son usualmente pequeños (solo 5% del total).

Si se asume que todos los grupos hidrofílicos se localizan en la interfase, el área que ellos ocupan es también completamente pequeña para cubrir la superficie de los glóbulos, asumiendo un peso molecular de 67,000 d. similar al de tropoelastina. En el nuevo modelo funcional, la interfase entre glóbulos y agua debería, por lo tanto, contener grupos hidrofílicos e hidrofóbicos.

Un diagrama de módulo de elastina en estado relajado y en estado de tensión se presenta en la fig. IV.9.

Cuando cada sistema de dos fases se tensiona, es posible que la fuerza recuperada sea causada por un decremento en la entropía configuracional de las cadenas como en "elastómeros clásicos" y por la tensión interfasial entre los glóbulos y el solvente interglobular por alguna deformación de los glóbulos conduciendo a una área incrementada de la interfase. Tal incremento en el área significa que los grupos hidrofóbicos

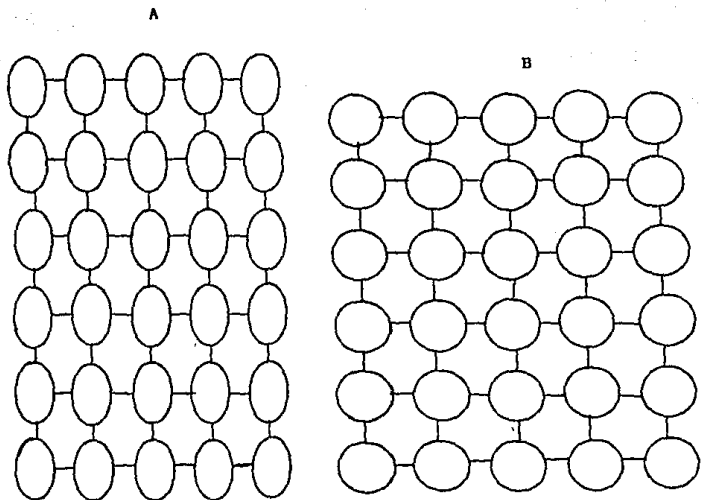


Fig. IV.9. Estructura de elastina propuesta por Patridge. Unidades -  
 corpusculares las cuales, tienen un interior hidrofóbico y grupos hidro-  
 fílicos sobre la superficie. A) Cuando la molécula está relajada, y B)  
 Cuando la molécula está tensionada en un 35%.

cos son llevados desde el interior de las esferas hacia la superficie - donde llegan a ser expuestos al agua circundante. La transferencia de grupos hidrofóbicos de un medio hidrofóbico hacia el agua, se sabe que involucra un decremento considerable en la entropía del sistema. Las de formaciones aquí discutidas en la estructura globular, pueden ser la causa de un decremento en la entropía más grande que la encontrada en "elastómeros clásicos", la cuál está basada unicamente en cambios de entropía configuracional.

Laurent y Siegel, aplican un análisis matemático para el gel - hidratado y enlazado, el cuál es tratado como una red tridimensional dis tribuida casualmente en rutas. Sus resultados indican que el agua hace que se "hinche" la elastina para que exista como un gel conteniendo po - ros de 32 nm de diámetro o como una estructura que consiste en rutas al - rededor de 16 nm de diámetro, la cuál arrastra agua de hidratación en - una proporción de 0.20-0.25 g/g. de proteína seca (fig.IV.10). Con esta hipótesis, cada cadena individual es capaz de formar una subunidad globu lar.

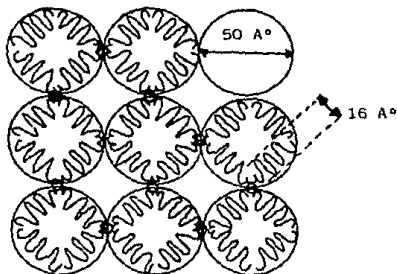


Fig.IV.10. Representación en dos dimensiones de un modelo de la estructura de elastina.

Urry no está de acuerdo con esta observación en cuanto a la estructura terciaria. Su hipótesis está basada en resultados de análisis cualitativos obtenidos en base a los estudios de coservación. Aquí los cambios de conformación que ocurren durante el ascenso de temperatura en una solución acuosa de elastina y la temperatura del cuerpo son casi enteramente dependientes de las concentraciones.

En cuanto a las interacciones hidrofóbicas, son muy pocas. Esto no es compatible con una subunidad de estructura globular donde una cadena de polipéptido forma un glóbulo con un exterior hidrofílico y un interior lipofílico, pero es compatible con una multicadena de redes filamentosas.

Un último modelo propuesto por Foster y col., consiste de una unidad monomérica fibrilar hecha de segmentos alternados, de regiones enlazadas y "oiled coils" (espirales engrasadas). Cada monómero tiene distintas propiedades mecánicas disponiendo de una región rígida (la región de enlace) y la región flexible (oiled coils).

Cada monómero es enlazado a muchos otros formando una red tridimensional. Las cadenas pueden estar enlazadas a varios ángulos o curvas, así que la red podría ser isotrópica, a pesar de la naturaleza fibrilar de los monómeros.

El diámetro de las "espirales engrasadas" es de aproximadamente 12-14 nm y el centro hidrofóbico puede acomodar moléculas no-polares, especialmente compuestos alifáticos de cadena recta (fig. IV.11).

De la composición de elastina, se estima que un 20-25 % de la molécula podría ser regiones de enlace y el resto como espiral; las dos formas contribuyen igualmente a la longitud del monómero relajado.

La extensión de las espirales se extiende fácilmente hasta que la molécula completa es de 2.0-2.5 más grande que la longitud original.

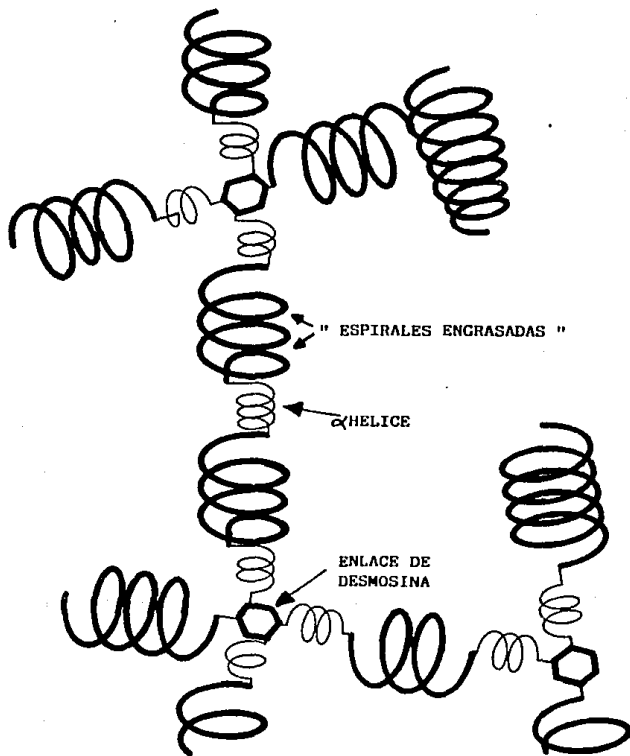


Fig. IV.11. Representación de regiones de enlace y regiones "oiled coils"

## ESTRUCTURA CUATERNARIA

### MODELO URRY

Urry se basa en teñido negativo en microscópio electrónico de alta resolución sobre los coaservados de  $\alpha$  elastina y tropoelastina como evidencia ordenada de filamentos paralelos de unidades de proteína - con periodicidad similar a las fibras elásticas. El propone una estructura cuaternaria fibrosa basada en el comportamiento de coaservación, la cuál involucra una temperatura de transición inversa, requiriendo fuer - zas predominantemente hidrofóbicas, dando origen a una asociación ordenada entre las unidades de la proteína.

El concidera a la elastina como una forma filamentosa y no a - morfa dentro de los niveles de cadenas individuales de los péptidos. La fibra elástica formada está siendo vista como un centro central de casi puras fibras de elastina, rodeada de una glicoproteína microfibrilar externa.

Las interacciones proteína-proteína dentro del corazón central podrían ser predominantemente hidrofóbicas, debido principalmente a los sitios hidrofóbicos en las cadenas de prolina y valina. De este modo, - la glicoproteína proporciona los lípidos y agua requeridos en la interfa se.

El enlazamiento intercadena a través de desmosina e isodesmosi na se visualiza a lo largo de la misma línea que la propuesta por Foster y col. favoreciendo un enlace uniendo 2 cadenas (fig. IV.12).

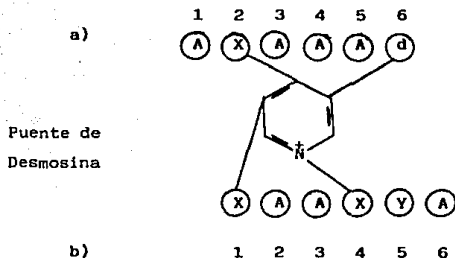


Fig. IV.12. Posibles enlaces de dos cadenas de péptido a través de un puente de desmosina. A=alanina. Y=tirosina.

Urry considera al mecanismo de la elasticidad como una propiedad de la  $\beta$ -espiral y  $\alpha$ helice de las cadenas individuales ordenadas de las fibras elásticas. En las fibras elásticas, las  $\beta$ -espirales ocurren en la repetición y secuencia del pentapéptido y hexapéptido, y la  $\alpha$ helice ocurre en la ruta de alanina asociada con las regiones de enlace.

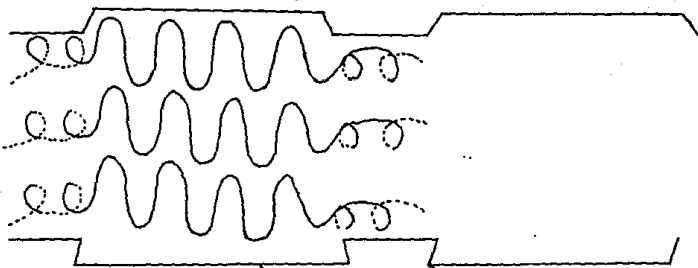
Las cadenas individuales pueden asociarse por medio de enlaces o por medio de interacciones hidrofóbicas para dar un alineamiento de cadenas. Esto da origen a una serie de arreglos paralelos de segmentos elásticos. Las interacciones para dar dicha elasticidad están representadas en la fig. IV.13.



VISTA LATERAL



VISTA DEL  $\beta$  - GIRO TERMINAL



ASOCIACION DE CADENAS Y ENLACES

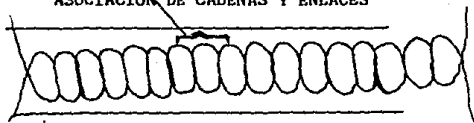


Fig. IV.13. Modelo para la elasticidad de elastina.



Se sabe que las fibras elásticas cuando están deshidratadas no son elásticas, pero llegan a serlo cuando son rehidratadas. En términos de  $\beta$ -espiral, los puentes de hidrógeno entre  $\beta$ -Giro prevendría la extensión. La hidratación permitiría la ruptura de estos puentes de hidrógeno y daría lugar a la extensión de la proteína.

El modelo representado en la fig. IV.13 para la conformación de la elastina, esta basado en un arreglo secuencial de  $\beta$ -espirales y  $\alpha$  helices a lo largo de las cadenas individuales. Los segmentos se de terminan a través de secuencias de aminoácidos.

Las  $\beta$ -espirales se forman por la secuencia repetida del penta- y hexapéptido y la  $\alpha$  helice se forman por las secuencias de alanina, las cuales son también el potencial de las regiones de enlace.

Las cadenas del polipéptido de elastina, una vez enlazadas, forman una red tridimensional. Cuando se observan las fibras elásticas, estas se encuentran ramificadas y unidas en forma muy compleja.

En tejidos tales como "ligamentum nuchae", las fibras de elastina están organizadas en dirección hacia la tensión; la orientación de las fibras es paralela a la orientación de la tensión.

Las fibras parecen estar ramificadas e interconectadas en gran proporción. Una representación de elastina se presenta en la fig. IV.14.

Así como un segmento blando se extiende, un segmento rígido -- puede empezar a extenderse antes del segmento blando, dando origen a un orden dinámico.

Las interacciones hidrofóbicas intercadena pueden ocurrir a través de los sitios hidrofóbicos de los residuos de las cadenas de valina y prolina, manteniendo la integridad de la estructura.

Sobre la extensión de la  $\beta$ -espiral, los sitios hidrofóbicos de las cadenas llegarían a ser expuestos a un medio acuoso. El proceso de extensión causa un cambio en la energía del sistema, la cuál se refleja por un decremento en la entropía, de tal manera que la relajación conduce al regreso de la conformación favorable (no-tensionada).

90 - 70 RESIDUOS

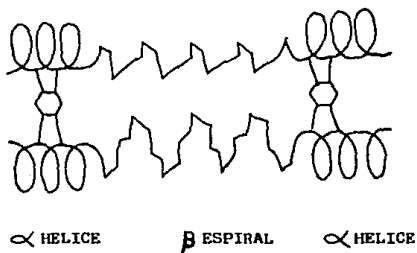


Fig. IV.14. Modelo fibrilar de elastina. Las regiones de enlace son propuestas para ser  $\alpha$  helice. La glicina, valina y prolina en secuencia, son llamados  $\beta$ -espiral. Las cadenas de aminoácidos en los sitios hidrofóbicos de la espiral se extienden hacia el exterior. Las regiones  $\beta$ -espiral se propone que tienen de 70 a 90 residuos de aminoácidos de longitud.

## CAPITULO V

### APLICACIONES DE LA ELASTINA EN COSMETOLOGIA

Utilizando los descubrimientos más recientes en cosmetología, el químico cosmólogo ha elaborado productos cosméticos conteniendo -- elastina, cuyo objetivo esencial es el de luchar contra el envejecimiento de la piel.

En el mercado existen cosméticos que realmente en su formulación contienen como principio activo "elastina" en forma de hidrolizados parciales.

Este tipo de cosméticos se recomiendan para el tratamiento de celulitis y arrugas en la piel. Los hidrolizados de elastina tienen una influencia directa sobre el tejido conjuntivo elástico, mejorando la -- elasticidad.

La eficacia de este tipo de cosméticos se atribuye a los hidrolizados de elastina, los cuales inducen al mejoramiento de la elasticidad de la piel. Se ha demostrado que la aplicación de cosméticos conteniendo elastina sobre la piel acelera el alivio de heridas y estimula la síntesis de elastina. Estudios histoquímicos sobre piel de ratas tratadas diariamente por 4 semanas con péptidos de elastina marcados radiactivamente presentan un incremento de elastina marcada en la dermis.

En preparaciones para el pelo, especialmente shampoos, la elastina ha sido usada recientemente, ya que esta tiene una afinidad por el pelo y además una fuerte sustantividad. Esta proteína protege al pelo de las influencias del medio ambiente y de los detergentes alcalinos. -- Como agente protector y acondicionador, los hidrolizados parciales de -- elastina tienen el mismo efecto que los derivados del colágeno, reducen

do la alcalinidad del cabello.

Deben tomarse en cuenta los siguientes requerimientos para que los hidrolizados de elastina sean aceptables para uso cosmético:

- a) Amplia escala de pH (4.0-10.0).
- b) Compatibilidad con los ingredientes de la formulación.
- c) Compatibilidad con tensoactivos catiónicos, aniónicos y no iónicos.
- d) Peso molelucalar dentro de 1000-5000, preferentemente de bido a los problemas de solubilidad, además de que algunas investigaciones han revelado que el tamaño molecular es importante para llevar a cabo una óptima absorción.- Los hidrolizados con muy bajo peso molecular presentan niveles bajos de absorción y lo mismo se aplica a las grandes moléculas.
- e) Claridad y color claro en soluciones acuosas.
- f) Bajos niveles de olor.
- g) Bajo contenido de bacterias.
- h) Contenido bajo de sales, ya que estas frecuentemente afec tan a las emulsiones.

## CAPITULO VI

### PROPIEDADES COSMETICAS DE LA ELASTINA

Las principales propiedades de la elastina para uso cosmético son las siguientes:

- I) Capacidad de enlazamiento con moléculas de agua (propiedad directamente unida al peso molecular) de aquí la función sobre la piel y sobre el cabello como agente hidratante.
- II) Sustantividad sobre el cabello que confirma la propiedad anterior.
- III) Estimulación de células de la epidermis, devolviendo así a la piel un aspecto más joven.
- IV) Fortalecimiento y devolución de la tersura a los rasgos.
- V) Mantenimiento de la flexibilidad característica de la piel, atenuando las arrugas y retardando su evolución.
- VI) Mejoramiento de la piel maltratada debido a los efectos y agresiones del medio ambiente como sol, aire y agua.

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA ELASTINA

---

Solución de elastina soluble, parcialmente hidrolizada con una actividad del 30%.

---

Los siguientes datos analíticos son valores promedio, controles determinados "en proceso" durante la manufactura de hidrolizados de elastina o sobre producto terminado. Los métodos analíticos corresponden, - en su mayoría, a los descritos en las farmacopeas.

Aspecto: Solución ligeramente amarilla al 5%, no-viscosa, libre de materia extraña.

Apariencia: Solución ámbar oscura.

Olor: Ligero, propio.

pH:(Sol. al 10%) 5.5 - 6.5 (electrôdo de vidrio USP XX) (791)  
(como es) 4.5 - 7.5

Solubilidad: Miscible con agua, con alcohol 60%, con isopropanol 50%, con glicerina y propilenglicol sobre - 80%, e igualmente con ácidos diluidos tales como ácido acético, ácido cítrico y ácido láctico.

Solventes orgánicos: Ninguno.

Agentes solubilizantes  
o emulsificantes: Ninguno.

Contenido proteico: Mínimo 20% (Kjeldahl USP XX) (461).

Sólidos totales: Mínimo 25.

Cenizas (600°C): 3 - 6%

Densidad 20°C: 0.998 - 1.004 g/ml.

Índice de refracción:  $n_D^{20^\circ C}$  1.334 - 1.336

Metales pesados: menor de 10 ppm.

Espectro UV absorción: Máx. aprox. 210 nm.

Contenido de hidroxil -  
prolina: 1 Máx.

Peso molecular promedio: 4,000 d.

Parabenos : Positivo.

### DATOS MICROBIOLÓGICOS

Después de la manufactura del hidrolizado de elastina, esta se filtra a través de membrana Millipore y se almacena en contenedores esterilizados. La cantidad de gérmenes debe ser inferior a 100 gérmenes/g. y no debe contener ningún patógeno.

### FABRICACION Y DOSIS DE ELASTINA

Los hidrolizados de elastina son termoestables; sin embargo, se recomienda adicionar este agente activo en la manufactura de preparaciones emulsificadas después de que la mezcla se encuentra entre 35-40°C. La razón de esta recomendación es que en el curso de enfriamiento (dependiendo del valor de pH de la fase acuosa) puede causar una turbidez, la cuál es provocada por la reasociación de elastina, este proceso es irreversible.



Los siguientes valores aproximados son los recomendados por la dosis de elastina en productos para el cuidado de la piel:

Cremas de tratamiento: 5 - 10%

Cremas para el cuerpo y manos: 5 - 15%

Cremas bronceadoras: 5 - 15%

En productos para el cuidado del cabello se recomienda usar:

Shampoos: 3 - 15%

Acondicionadores: 5 - 10%

Lociones capilares: 0.5 - 3%

PROPIEDADES QUE DEBEN PROPORCIONAR E IMPARTIR LOS HIDROLIZADOS DE  
ELASTINA A LOS PRODUCTOS FINALES

- a) Capacidad de dar lugar a soluciones claras y limpias.
  
- b) Capacidad de buena retención de agua.
  
- c) Poder estabilizante de la emulsión O/W.
  
- d) Formación de una capa protectora y lustrosa en el producto.
  
- e) Agente regulador de la viscosidad (propiedad muy importante).

lución al 2% de glucosa. La solución bien mezclada se colocó para alimentación de los animales en una mamila por un periodo de 48 hrs. Durante la prueba, los ratones fueron metidos juntos en una caja. No se les proporcionó ningún otro tipo de comida durante la prueba.

#### RESULTADO:

Los animales se observaron durante 7 días, todos los ratones permanecieron vivos y se comportaron completamente normal. No hubo síntomas de intoxicación.

#### c) PRUEBA DE IRRITACION SUBCRONICA EN PIEL:

se utilizaron para esta prueba 5 coballos adultos con un peso de alrededor 500 g. cada uno. La piel de los animales se depiló y luego se lavó. Se marcaron 4 cuadros sobre la superficie depilada. Dos cuadros de cada animal se trataron diariamente con elastina, excepto sábados y domingos. Los otros dos sitios se trataron con solución salina 0.9% para comparación.

Las áreas de aplicación se rasuraron mecánicamente 2 veces a la semana y posteriormente se secaron. Para evitar irritaciones de la piel, no se utilizaron cremas depilatorias durante el periodo de prueba; esta se llevó a cabo por un periodo de 3 semanas.

## RESULTADOS:

Los animales se observaron regularmente durante la prueba que consistió de 2 semanas. En el periodo de observación no hubo cambios en la condición de la piel; no se detectaron irritaciones locales o algún tipo de alteración general. Llegando a la conclusión de que la elastina es tan bien tolerada como la solución salina usada para comparación.

### d) PRUEBA DE IRRITACION OCULAR

Se usaron 5 conejos albinos para la prueba. Se administró - 0.1 ml. de elastina sin diluir dentro del ojo izquierdo, mientras que en el ojo derecho se trató de la misma manera con 0.1 ml. de solución salina 0.9% para comparación. Los ojos no se limpiaron después de la aplicación de las dos soluciones.

En esta prueba se evaluaron la irritación u otros cambios en la condición normal de la córnea, iris, conjuntiva y el ojo completo.

## RESULTADOS:

Durante el periodo completo de observación ninguno de los conejos presentó irritación u otros cambios patológicos en los tejidos arriba mencionados. Después de cada minuto, 30 min. y después de 1 hr., no se observó ninguna anomalía en cuanto al flujo de lágrimas. Por lo tanto, la elastina se consideró como sustancia inocua ocular.

## CAPITULO VII

### PARTE EXPERIMENTAL

Una vez expuestas las propiedades generales de la elastina y sus aplicaciones en cosmetología, se procedió a elaborar las formulaciones cosméticas que cubrieran con las necesidades del consumidor, como son:

- La hidratación de la piel
- La estimulación de las células fibroblastos
- La regeneración de la flexibilidad y
- Como una protección contra las agresiones del medio-ambiente.

Para llegar a las formulaciones definitivas se fabricaron varios lotes piloto y finalmente se llegó a los siguientes productos:

- Crema para reafirmar el cuello y busto
- Crema enriquecida humectante para cara
- Gel refrescante para el cuerpo para después del baño.

FORMULACIONES:

CREMA PARA REAFIRMAR EL CUELLO Y BUSTO (TIPO O/W)

Fase A

Monoestearato de glicerilo .....	10.1 %
Cetil estearil sulfato de sodio .....	2.0 %
Alcohol cetoestearílico B1 .....	1.5 %
Alcohol cetoestearílico B2 .....	1.5 %
Oleato de decilo .....	9.0 %

Fase B

Agua destilada .....	60.0 %
Glicerol .....	5.0 %
Metil parabeno .....	0.3 %
Propil parabeno .....	0.1 %
Imidazolidinurea .....	0.2 %

Fase C

Elastina .....	10.0 %
----------------	--------

Fase D

Perfume .....	0.3 %
---------------	-------

MANUFACTURA:

Calentar y mezclar Fase A hasta 75°C aproximadamente; calentar Fase B hasta 75°C aproximadamente y añadir a la Fase A con agitación.

Continuar agitando hasta que la emulsión enfrie aproximadamente a unos 35°C, añadir Fase C con agitación y finalmente perfumar.

CREMA ENRIQUECIDA HUMECTANTE PARA CARA (TIPO O/W)

Fase A

Alcohol cetearílico/ceteareth 20 .....	10.0 %
Monoestearato de glicerilo .....	3.0 %
Aceite mineral .....	10.0 %
Miristato de isopropilo .....	8.0 %
Petrolato sólido .....	3.0 %
Triglicérido capríco/caprílico .....	3.0 %

Fase B

Agua deionizada .....	47.0 %
Sorbitol .....	4.6 %
Alantoína .....	0.5 %
Metil parabeno .....	0.3 %
Propil parabeno .....	0.1 %
Imidazolidinurea .....	0.2 %

Fase C

Elastina .....	5.0 %
Colágeno .....	5.0 %

Fase D

Perfume .....	0.3 %
---------------	-------

MANUFACTURA:

Calentar y mezclar Fase A hasta 70°C aproximadamente; calentar Fase B hasta 70°C aproximadamente y añadir a la Fase A con agitación.

Continuar agitando hasta que la emulsión se enfríe a unos 30°C aproximadamente; añadir Fase C con agitación y finalmente perfumar y homogenizar.

GEL REFRESCANTE PARA EL CUERPO PARA DESPUES DEL BAÑO

Fase A

Etanol 96% v/v .....	20.0 %
Agua deionizada .....	50.0 %
Carbopol 940 .....	0.5 %
Imidazolidinurea .....	0.2 %

Fase B

Agua deionizada .....	23.5 %
Trietanolamina .....	0.5 %

Fase C

Elastina .....	10.0 %
----------------	--------

Fase D

Perfume .....	0.3 %
---------------	-------

MANUFACTURA:

Dispersar con agitación rápida el carbopol en el agua, disolver el conservador en etanol y agregar lentamente a la dispersión; agregar la Fase B a la Fase A hasta homogenizar; posteriormente añadir Fase C y continuar con la agitación y finalmente perfumar.



**CAPITULO VIII**

**CONTROLES Y RESULTADOS**

A continuación se presentan los controles y resultados físico-químicos y microbiológicos de cada una de las formulaciones cosméticas elaboradas.

**PRODUCTO:** Crema para reafirmar el cuello y busto.

**DESCRIPCION:** Emulsión tipo O/W.

<b>CONTROLES</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>METODO</b>
Color	Blanco	
Olor	Agradable (floral)	
Apariencia	Cremosa, suave, sin grumos y libre de partículas extrañas	
pH a 25°C	6.0	Potenciómetro
Viscosidad	10,000 cps.	Brookfield (aguja #3 12 rpm/1 min).
Gravedad específica	0.790	
Contenido de H <sub>2</sub> O	66.06 %	Azeotrópico (dest. con tolueno)
Estabilidad	OK	Centrifuga 30"/2,000 rpm. 45°C/72 hrs.; temp. amb./72h. 4°C/72 hrs.
Cuenta Microbiana	0 colonias	Tricaseína y Sabouraud

PRODUCTO: Gel refrescante para el cuerpo para después del baño

DESCRIPCION: Dispersión homogénea

CONTROLES	RESULTADOS	METODO
Color	Ligeramente verde	
Olor	Agradable (floral)	
Apariencia	Gel suave, libre de partículas extrañas	
pH a 25°C	6.5	Potenciómetro
Viscosidad	3278 cps.	Brookfield Tf/6rpm/ 1 min.
Gravedad específica	0.974	
Contenido de H <sub>2</sub> O	74.13 %	Azeotrópico (dest. con tolueno)
Estabilidad	OK.	Centrifuga 30"/2000 rpm. 45°C/72 hrs.; Temp. amb. 72 hrs. y 4°C/72 hrs.
Cuenta microbiana	0 colonias	tricasefina y Sabouraud.

PRODUCTO: Crema enriquecida humectante para cara

DESCRIPCION: Emulsión tipo O/W.

CONTROLES	RESULTADOS	METODO
Color	Lig. amarilla	
Olor	Agradable (floral)	
Apariencia	Cremosa, suave, sin grumos y libre de partículas extrañas	
pH a 25°C	6.0	Potenciómetro
Viscosidad	9213 cps.	Brookfield Tf/6rpm/1 min.
Gravedad específica	0.9148	
Contenido de H <sub>2</sub> O	50.1 %	Azeotrópico (dest. con tolueno)
Estabilidad	OK.	Centrifuga 30'/2000 rpm 45°C/72 hrs.; Temp. amb. 72 hrs.; 4°C/72 hrs.
Cuenta microbiana	0 colonias	Tricasefina y Sabouraud

## RESULTADOS

Una vez finalizado la fabricación, hecho los controles necesarios y envasado los productos; se procedió a realizar pruebas "in vivo" sobre pieles de individuos entre 30 y 50 años de edad.

Se distribuyeron cada uno de los 3 productos fabricados a 25 personas y se les pidió que los usaran por un periodo de 3 meses; al transcurrir ese tiempo, se les interrogó a cada uno de los individuos obteniéndose los siguientes resultados:

### 1.- ABSORCION:

El 100% declaró que era rápida

### 2.-TONO DE LA PIEL:

El 100% notó mejoría

### 3.- IRRITACION

En el 99% no se presentó ninguna

Un 1% presento ligera irritación, la cuál desapareció a los 3 días del tratamiento

### 4.- ASPECTO GENERAL DE LA PIEL:

El 100% notó mejoría

### 5.- TIEMPO EN APARECER EFECTO:

1 a 3 semanas.

## CAPITULO IX

### CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se comprobó que los - productos cosméticos que contienen elastina dentro de su formulación son efectivos para la piel, ya que estos productos le proporcionan las pro - piedades y características perdidas durante el proceso normal de enveje - cimiento o bién por las agresiones del medio ambiente; lo cuál indica - que la teoría acerca de las propiedades cosméticas de la elastina sí son aplicables a la práctica.

De esta manera se puede concluir que debido a sus cualidades, el uso y aplicación de la elastina en el ramo de la cosmetología se ve - ran cada día incrementadas como un principal ingrediente activo en cosmé - ticos, ya que ésta satisface algunas de las necesidades del ser humano de verse y sentirse cada vez mejor sin riesgo alguno y con resultados fa - vorables.

## CAPITULO X

### BIBLIOGRAFIA

- 1.- A. SAMPATH NARAYANAN and ROY C. PAGE  
"Demonstration of a precursor-product relationship between soluble and cross-linked elastin, and the biosynthesis of the desmosines - in vitro".  
The Journal of Biological Chemistry 25, No.4, 1125-1130, (1976).
- 2.- ALEXANDER BERG, ZDENEK ECKMAYER, and SUSAN SMITH  
"elastin"  
Cosmet. & Toilet. 94, 23-38, (oct. 1979).
- 3.- ANNE-MARIE HULT, M.S. and ROBERT W. GOLTZ, M.D.  
"The measurement of elastin in human skin and its quality in relation to age"  
The Journal of Investigative Dermatology 44, No.6, 408-412, (1975)
- 4.- ARTHUR W. HAM  
"tejido conjuntivo"  
Tratado de histología 7a. Edición (1977).
- 5.- "Avances recientes sobre Cosmetología"  
Educación continua y cursos especiales. Facultad de Química  
Curso (1988).
- 6.- B.B. AARON & J.M. GOSLINE  
"Optical properties of single elastin fibres indicate random prote in conformation"  
Nature 287, 865-867, (oct. 1980).
- 7.- B.C. STARCHER and D.W. URRY  
"Elastin coacervate as a matrix for calcification"  
Biochem. and Biophysical Research communication 53, No.1, 210-216 (1973).
- 8.- B.L. RASMUSSEN, E. BRUENGER, and L.B. SANDBERG  
"A new method for purification of mature elastin"  
Analytical Biochemistry 64, 225-259, (1975).

- 9.- BALSAM & SAGARIN  
Cosmetics Science and Technology  
Vol. 1, 2a. Edición  
Ed. Board (1972).
- 10.- BARBARA FARIS, ROCCO FERRERA, MICHAEL GLEMBOURTT & col.  
"Rapid quantitation of desmosine content in tissue hydrolysates by  
high-performance liquid chromatography"  
Analytical Biochemistry 114, 71-74, (1981).
- 11.- BARRY C. STARCHER  
"Determination of the elastin content of tissues by measuring des-  
mosine and isodesmosine"  
Analytical Biochemistry 79, 11-15, (1977).
- 12.- BERNARD IDSON  
"Natural moisturizers for cosmetics"  
Drugs & Cosmetics 24-26, (may 1985).
- 13.- C.A.J. HOEVE  
"The elastic properties of elastin"  
Biopolymers 13, 677-686, (1974).
- 14.- C.FRANZBLAU, F.M. SINEX and B. FARIS  
"Isolation of an unknown component from hydrolysates of elastin"  
Nature 205, 802-803, (1975).
- 15.- CARL FRANZBLAU and RICHARD W. LENT  
"Studies on the chemistry of elastin"  
Brookhaven Symposia in Biology No. 21, 358-377 (1969).
- 16.- CELESTE B. RICH and JUDITH ANN FOSTER  
"Isolation of tropoelastin a from lathyrctic chick aortae"  
Bioche. J. 217, 581-584, (1984).
- 17.- COLIN H. DALY Ph. D.  
"Biomechanical properties of dermis"  
The Journal of Investigative Dermatology 79, 17-20, (1982).
- 18.- D.E.ALGUIRE and A.C. YEUNG  
"Making cosmetics microbiologically safe"  
Cosmet. & Toilet. 94, 77-80, (1979).

- 19.- D. VOLPIN and A. CIFERRI  
 "Thermoelasticity of elastin"  
 Nature 225, 382, (jan. 1970).
- 20.- DAN W. URRY, TINA L. TRAPANE, HIROSHI SUGANO, and KARI U.  
 "Sequential polypeptides of elastin"  
 J. Am. Chem. Soc. 103, 2080-2089, (1981).
- 21.- DON W. SMITH, DOUGLEAS M. BROWN, and WILLIAM H. CARNES  
 "Preparation and properties of salt-soluble elastin"  
 The Journal of Investigative Dermatology 247, No.8, 2427-2432 -  
 (1972).
- 22.- ELAINE S. STERN and VERNON I. JOHNSEN  
 "Studies on the molecular weight distribution of cosmetics prote -  
 in hydrolysates"  
 J. Soc. Cosmet. Chem. 28, 447-455, (august 1977).
- 23.- G.F. SECCHI  
 "Il controllo e la classificazione dei derivati proteici per uso -  
 cosmetico"  
 Prodotto Chimica e Aerosol Selezione 26, No. 10, 20-25, (1985).
- 24.- G.J. BROOKS  
 "Use of protein in bath and shower products"  
 Cosmetics & Toilet. 94, 82-84, (july 1979).
- 25.- G. SCHUSTER and L. ANDREAS DOMSCH  
 "Protein Chemistry as related to cosmetics and toiletries"  
 Cosmet. & Toilet. 99, 63-74, (dec. 1984).
- 26.- GILLIAN FRANCIS, RHYS JOHN and JOHN THOMAS  
 "Biosynthetic pathway of desmosine in elastin"  
 Biochem. J. 136, 45-55, (1973).
- 27.- GILLIAN FRANCIS and JOHN THOMAS  
 "Isolation and chemical characterization of collagen in bovine pul  
 monary tissues"  
 Biochem. J. 145, 287-297, (1975).
- 28.- HELENE SAGE, Ph. D.  
 "Structure-function relationships in the evolution of elastin"  
 The Journal Invetigative Dermatology 79, 146-153, (1982).



- 29.- IRVING R. SCHMOLKA  
 "So you want to prepare an emulsion"  
 Cosmet. & Toilet. 96, 59-66, (feb. 1981).
- 30.- J. GRAHAM SMITH, EUGENE A. DAVIDSON and ROBERT L. HILL  
 "Composition of normal and pathological cutaneous elastin"  
 Nature 197, 1108-1109, (march 1963).
- 31.- J.O. CANTOR, S. KELLER, M.S. PARSHLEY, T.V. and col.  
 "Synthesis of crosslinked elastin by an endothelial cell culture"  
 Biochem and Bioph. Research Communications 95, 1381-1386, (1980).
- 32.- J. THOMAS, D.F. ELSDEN and S.M. PATRIDGE  
 "Degradation products from elastin"  
 Nature 200, 651-652, (nov. 1963).
- 33.- JEFFREY M. DAVIDSON, KENT SMITH, SHIGEKI SHIBAHARA and PAUL T.  
 "Regulation of elastin synthesis in developing sheep nuchal liga-  
 ment by elastin mRNA levels"  
 The Journal of Biological Chemistry 257, No.2, 747-754, (1982).
- 34.- JEFFREY M. DAVIDSON, PH.D., and RONAL G. CRYSTAL, M.D.  
 "The molecular Aspects of elastin gene expression"  
 The Journal of Investigative Dermatology 79, 133-137, (1982).
- 35.- JITSUHIKO SHIKATA, HIROYUKI SANADA, TAKAO YAMAMURO and TOSHIO T.  
 "Experimental studies of the elastic fiber of the capsular liga --  
 ment: influence of ageing and sex hormones on the hip joint capsu-  
 le of rats"  
 Connective Tissue Research 7, 21-27, (1979).
- 36.- JOEL ROSENBLUM, MARGARET HARSCH, and ANITA CYWINSKI  
 "Evidence that tropoelastin is the primary precursor in elastin"  
 The Journal of Biological Chemistry 255, No.1, 100-106, (1980).
- 37.- JOEL ROSENBLUM  
 "Elastin: biosynthesis, structure, degradation and role in diseaese  
 processes"  
 Connective Tissue Research 10, 73-91, (1982).
- 38.- JOHN J. HARDIN G  
 "Elatin"  
 Advances in protein chemistry 37, 280-283, (1985)

- 39.- JOHN M. GOSLINE  
 "The physical properties of elastic tissue"  
 Int. Rev. Connect. Tissue Res. 7, 211-249, (1976).
- 40.- JOHN M. GOSLINE  
 "Hidrophobic interaction and a model for the elasticity of elastin"  
 Biopolymers 17, 677-695, (1978).
- 41.- JOUNI UITTO, M.D., Ph.D.  
 "Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues -  
 and its alterations in diseases"  
 The Journal of Investigative Dermatology 72, 1-10, (1979).
- 42.- JOUNI UITTO, M.D., Ph.D., DANIEL J. SANTA CRUZ, M.D., and BARRY C.  
 "Biochemical and ultrastructural demonstration of elastin accumula-  
 tion in the skin lesions of the Buschke-Ollendorff syndrome"  
 The Journal of Investigative Dermatology 76, 284-287, (1981).
- 43.- JOUNI UITTO, M.D., Ph.D., LASSE RYHANEN, M.D. Ph. D. and ANDREA J.  
 "Elastin in diseases"  
 The Journal of Investigative Dermatology 79, 160-168 (1982).
- 44.- JUDITH ANN FOSTER, EVELINE BRUENGER, WILLIAN R. GRAY  
 "Isolation and amino acid sequences of tropoelastin peptides"  
 The Journal of Biological Chemistry 248, No.8, 2876-2879, (1973).
- 45.- JUDITH ANN FOSTER, LISA RUBIN, HERBERT M. KAGAN and CARL FRANZBLAU  
 "Isolation and characterization of crosslinked peptides from elas-  
 tin"  
 The Journal of Biological Chemistry 249, No.19, 6191-6196, (1974).
- 46.- JUDITH ANN FOSTER, SU CHEN WU, and CELESTE B. RICH  
 "A sensitive assay for the quantitation of soluble elastin"  
 Analytical Biochemistry 101, 310-315, (1980).
- 47.- K.P. WITTERN, A. ANSMANN, R. HUTTINGER, and col.  
 "Stability testing of cosmetic emultions"  
 Cosmetics & tiolet. 100, 33-39, (oct. 1985).
- 48.- KOUSER M. BAIG, MARIANNA VLAOVIC and RASHID A. ANWAR  
 "Amino acid sequences C-terminal to the cross-links in bovine elas-  
 tin"  
 Biochem. J. 185, 611-616, (1980).

- 49.- L.GOTTE, PENELOPE STERN, D.F. ELSDEN and S.M. PATRIDGE  
 "The composition of elastin from three bovine tissues"  
 Biochem. J. 87, 344-351, (1963).
- 50.- L.B. SANDBERG, N. WEISSMAN, and D.W. SMITH  
 "The purification and partial characterization of a soluble elastin-like protein from copper-deficient porcine aorta"  
 Biochemistry 8, No7, 2040-2945, (1969).
- 51.- LAWRENCE B. SANDBERG  
 "Elastin structure in health and disease"  
 Int.Review of Connective Tissue Research 7, 159-207, (1976).
- 52.- LAWRENCE B. SANDBERG, M.D., Ph.D., NORMAN T SOSKEL, M.D., and John G  
 "Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease states"  
 The New england Journal of Medicine 34, No.10, 566-579, (1981).
- 53.- LAWRENCE B. SANDBERG, M.D., Ph.D., NORMAN T SOSKEL, M.D., and TERRIL  
 "Structure of the elastic fiber: An overview"  
 The Journal of Investigative Dermatology 79,128-132, (1982).
- 54.- M.A. GIBSON and E.G. CLEARLY  
 "A collagen-like glycoprotein from elastin-rich tissues"  
 Biochem. and Bioph. Res. Commun. 105, No.4, 1288-1295, (1982).
- 55.- M. MOCZAR, E.MOCZAR and L.ROBERT  
 "Peptides obtained from elastin by hydrolysis with aqueous ethanolic potassium hydroxide"  
 Connective Tissue Research 6, 207-213 (1979).
- 56.- MAISON G. DE NAVARRE, Ph. C., B.S., M.S.  
 "Protein, protein hydrolysates, and amino acids"  
 The Chemistry and Manufacture of Cosmetics. 2a Edición. Vol.II  
 Ed. Van Nostran, New york.
- 57.- MERCEDES A. PAZ, DAVID A. KEITH, HECTOR P., and PAUL M. GALLOP  
 "Isolation, purification, and cross-linking profiles of elastin from lung and aorta"  
 Biochemistry 15, No.22, 4912-4918, (1976).
- 58.- OLIVER H. LOWRY, D. ROURKE GILLIGAN, and EVELYN M. KATERSKY  
 "The determination of collagen and elastin in tissues, with results obtained in various normal tissues from different species"  
 The Journal of Biological Chemistry 139, 795-804, (1941).

- 59.- PATHRAPAMKEL A. ABRAHAM and WILLIAN H. CARNES  
 "Isolation of a cross-linked dimer of elastin"  
 The Journal of Biological Chemistry 253, No.22, 7993-7995, (1978).
- 60.- PATRICIA MARCHASE, M.D., KAREN HOLBROOK, and SHELDON R. PINNELL  
 "A familial cutis laxa syndrome with ultrastructural abnormalities  
 of collagen and elastin"  
 The Journal of Investigative Dermatology 75, 399-403, (1980).
- 61.- PAUL F. DAVIS and ZENA M. MACKLE  
 "A simple procedure for the separation of insoluble collagen and -  
 elastin"  
 Analytical Biochemistry 115, 11-17, (1981).
- 62.- P.G. LAUFFER  
 "New keys to cosmetic chemistry -Elastin"  
 Cosmet. & Toilet. 100, No.5, 63-80, (1985).
- 63.- PAUL M. GALLOP, OLGA O. BLUMENFELD, and SAM SEIFTER  
 "Structure and metabolism of connective tissue protein"  
 Ann Review of Biochemistry 41, 617-664, (1972).
- 64.- PETER V. HAUSCHKA and PAUL M. GALLOP  
 "Valil-proline as a index of elastin biosynthesis"  
 Analytical Biochemistry 92, 61-66, (1979).
- 65.- R. HENZE and D.W. URRY  
 "Dielectric relaxation studies demonstrate a peptide librational mo  
 de in the polypentapeptide of elastin"  
 J. Am. Chem. Soc. 107, 2991-2993, (1985).
- 66.- R. JOHN and J. THOMAS  
 "Chemical compositions of elastins isolated from aortas and pulmo-  
 nary tissues of humans of different ages"  
 Biochemical J. 127, 261-269, (1972).
- 67.- R.JONES e D. PARISH  
 "Alcuni aspetti del ruolo delle proteine e dei derivati proteici  
 nei prodotti cosmetici"  
 Rivista Italiana E.P.P.O.S. Croda Chem. N.1, 27-37, (1981).

- 68.- RICHARD L. KORNBERG, M.D., SHELDON S. HENDLER, and JOUNI UITTO  
 "Elastoderma-Disease of elastin accumulation within the skin"  
 The New England Journal of Medicine 312, No.12, 771-774, (1985).
- 69.- ROBERT B. BUCKER and MICHAEL A. DUBICH  
 "Elastin metabolism and chemistry: Potential roles in lung develop-  
 ment and structure"  
 Environmental Health Perspectives 55, 179-191, (1984).
- 70.- ROBERT C. SIEGEL, SHELDON R. PINNELL, and GEORGE R. MARTIN  
 "Cross-linking of collagen and elastin. Properties of lysyl oxida -  
 se"  
 Biochemistry 9, No.23, 4486-4492, (1970).
- 71.- ROBERT E. NEUMAN and MILLAN A. LOGAN  
 "The determination of collagen and elastin in tissues"  
 Journal of Biological Chemistry 186, No.1, 549-556, (1950).
- 72.- RUSSELL ROSS and PAUL BORNSTEIN  
 "The elastic fiber"  
 J. Cell Biology 40, 366-381, (1969).
- 73.- S.M. PATRIDGE, H.F. DAVIS and G.S. ADAIR  
 "Soluble proteins derived from partial hydrolysis of elastin"  
 The Biochemical Journal 61, 11-32, (1955).
- 74.- S.M. PATRIDGE, C.B. ANFINSEN, JR., KENNETH B., JOHN T. EDSOLL  
 "Elastin"  
 Advances in Protein Chemistry 17, 227-297, (1962).
- 75.- S.M. PATRIDGE, D.F. ELSDEN, and J. THOMAS  
 "Constitution of the cross-linkages in elastin"  
 Nature 197, 1297-1298, (1963).
- 76.- S.M. PATRIDGE, D.F. ELSDEN and J. THOMAS  
 "Incorporation of labelled lysine into the Desmosine cross-bridges  
 in elastin"  
 Nature 209, 399-380, (1966).
- 77.- S.M. PATRIDGE, B.L.O'DELL, D.F. ELSDEN, and J. THOMAS  
 "Inhibition of the biosynthesis of the cross-links in elastin by a  
 lathyrogen"  
 Nature 209, 401-402, (1966).

- 78.- SAMUEL GOLDSTEIN, M.D.  
 "The biology of aging"  
 The New England Journal of Medicine 285, 1120-1124, (1971).
- 79.- STEPHEN KELLER, INES MANDL, and GERARD M. TURINO  
 "Determination of the relative amounts of elastin in lung"  
 Biochemical Medicine 24, 74-80, (1981).
- 80.- TORSEL WEIS-FOGH, S.O. ANDERSEN  
 "New molecular model for the long-range elasticity of elastin"  
 Nature 227, 718-721, (aug. 1970).
- 81.- TRACY M. SONNEBORN  
 "The origin, evolution, nature, and causes of aging"  
 A Publication of the American Institute of Biological Science  
 Edited by John A. Behnke. Ed. Bioscience. New York  
 361-374, (1978).
- 82.- URBAN J. LEWIS, DONAL E. WILLIAMS, and NORMAN G. BRINK  
 "Pancreatic elastase: Purification, properties, and function"  
 J. Biol. Chem. 222, 705-719, (1955).
- 83.- VERNON L. JOHNSEN and RAYMOND F. CHIOSTRI  
 "Protein hydrolysates as moisturizers"  
 Cosmet. & Toilet. 93, 83-85, (1978).
- 84.- VERNON L. JOHNSEN  
 "protein in cosmetics and toiletries"  
 Drug & Cosmet. 36-39, 136-138, (june 1980).
- 85.- WILLIAM BURNETT, Ph.D., KYONGGEUN YOON, Ph. D. and JOEL R.  
 "Control of elastin synthesis"  
 The Journal of Investigative Dermatology 79, 138-145, (1982).
- 86.- WILLIAM J. COOK, HOWARD EINSPAHR, TINA L. TRAPANE, and CHARLES E.  
 "Crystal structure and conformation of the cyclic trimer of a re --  
 peat pentapeptide of elastin, cyclo-(L-valyl-L- prolylglycyl-L-va --  
 lylglycyl)<sub>3</sub>"  
 J. AM. Chem. Soc. 102, 5502-5505, (1980).
- 87.- WILLIAM R. GRAY, LAWRENCE B. SANDBERG and JUDITH A. FOSTER  
 "Molecular model for elastin structure and function"  
 Nature 246, 461-466, (dec. 1973).

- 88.- YVES A. DE CLERCK and PETER A. JONES  
"The effect of ascorbic acid on the nature and production of collagen and elastin by rat smooth-muscle cell"  
Biochem.J. 186, 217-225, (1980).
- 89.- Z.DEYL, M.HORAKOVA and K. MACEK  
"Change in elastin composition in aorta of spontaneously hypertensive rats (SHR)"  
Biochem. and Bioph. Research Commun. 129, 179-186, (1985).
- 90.- ZENA WERB, Ph.D., MICHAEL J. BANDA, Ph.D., and ROBERT A. SANDHAUS  
"Elastases and elastin degradation"  
The Journal of Investigative Dermatology 79, 154-159, (1982).