

218
24°

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Mecanismos Moleculares de la Implantación
Placentaria Humana

Purificación y Caracterización de una
Colagenasa de Trofoblasto

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A:

MIGUEL ANGEL TORRES VEGA

MEXICO, D. F.

PRIMAVERA, 1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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

INTRODUCCION	1
Implantación	1
La etapa de invasión	8
La colágena	11
El catabolismo de la colágena en vertebrados	16
Planteamiento del problema	27
Objetivo	28
MATERIALES Y METODOS	29
Homogenados de placenta	29
Extractos de células aisladas de placenta	30
Ensayos enzimáticos	31
Purificación de la colagenasa de trofoblasto	33
RESULTADOS	36
Actividad colagenolítica en extractos de células de citotrofoblasto	36
Purificación y caracterización de la colagenasa de trofoblasto	38
DISCUSION	40
REFERENCIAS	52

Introducción

EUTERIOS es una de las dos infraclases de la subclase Terios, que está enmarcada en la clase Mamíferos. Un hecho destacado de esta infraclase es que los descendientes de los euterios sufren un considerable desarrollo en el interior de la madre antes de su nacimiento y son alimentados mientras están dentro por un órgano especial llamado placenta. La infraclase Euterios comprende varios órdenes, uno de los cuales es el de los Primates, que incluye a los seres humanos.¹

El proceso biológico que establece las condiciones anatómicas y fisiológicas para que las crías puedan mantenerse albergadas dentro de la madre durante un período relativamente prolongado se conoce como implantación.

La forma más sencilla en que la implantación puede ser descrita consiste en definirla como la unión del *conceptus* y el útero. El término *conceptus* se utiliza para hacer referencia al huevo y a todos sus derivados desde el estado de fertilización hasta el nacimiento. Se ha determinado que la fertilización y el desarrollo del *conceptus* a través de los estados de cigoto, segmentación y mórula ocurren en el oviducto pero, cuando el *conceptus* humano se convierte en un blastocisto —aproximadamente al cuarto día después de la ovulación— éste es transferido al interior del útero.

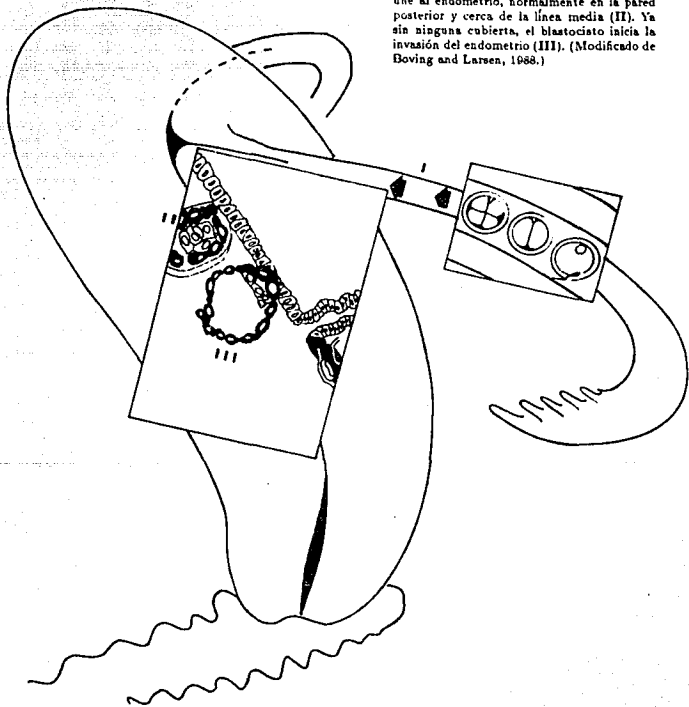
La serie de eventos de la implantación en el humano inicia con el contacto físico entre el blastocisto y el útero. Las células trofoblásticas interactúan con la capa de células epiteliales del endometrio y atraviesan la membrana basal que las sustenta, invaden el estroma —se desplazan o migran a través de él—, y establecen comunicación con el sistema circulatorio uterino, eliminando la pared de los vasos sanguíneos endometriales. Este proceso resulta en la formación de la placenta humana hemocorial en que los tejidos fetales están constantemente bañados por sangre materna. (Figura 1.)

La implantación y desarrollo de la placenta están limitados al embarazo temprano.

IMPLANTACION

Los elementos que participan en el establecimiento de la implantación son el blastocisto

Figura 1. Implantación blastocística. En este esquema, la parte anterior del útero está orientada hacia la izquierda. Las primeras etapas del desarrollo del concepto se manifiestan durante su recorrido por el oviducto (I). El blastocisto, en cambio, completa su formación en el útero, y envuelto aún por el coeloma, se une al endometrio, normalmente en la pared posterior y cerca de la línea media (II). Ya sin ninguna cubierta, el blastocisto inicia la invasión del endometrio (III). (Modificado de Boving and Larsen, 1988.)



y el útero.

El blastocisto es una de las etapas del desarrollo ontogénico del organismo. Se origina a partir de la mórula cuando se acumula fluido entre sus células, formándose una cavidad central conocida como blastocele. En el blastocisto aparecen las primeras líneas celulares diferenciadas; de hecho, las células blastocísticas se organizan en embrioblasto y trofoblasto.²

El embrioblasto es la masa celular interna localizada en un extremo del blastocele. Está destinado a formar el embrión. El trofoblasto está situado en la periferia del blastocisto, envolviendo al blastocele y al embrioblasto. El trofoblasto tiene como función contactar el tejido materno, invadir éste, y formar la placenta y otras estructuras extraembrionarias que apoyan al feto durante el embarazo, pero que son separadas de la descendencia y de la madre en el nacimiento.²

Por otra parte, el útero en el humano es un órgano pélvico ubicado en la línea media, inclinado un poco hacia adelante, constituido por una pared gruesa y una cavidad cilíndrica con un tenue aplanamiento anteroposterior. De la cima hacia abajo el útero presenta tres regiones principales: fundus, corpus y cervix. El fundus tapa al útero, el corpus inicia al nivel en que desembocan los oviductos, y el cervix, en la parte inferior del útero, que lo comunica con la vagina.³

La pared del útero está construida de tres capas concéntricas. La más interna, de cara al lumen uterino, de pocos milímetros de grosor, es el endometrio. La media, gruesa, formada por músculo liso y vasos sanguíneos que se orientan hacia la superficie del útero es el miometrio. La cubierta externa y delgada, constituye el perimetrio.³

La capa de la pared del útero que interviene en la implantación del blastocisto es el endometrio. El endometrio o mucosa uterina está compuesto de epitelio y estroma. El epitelio, que recubre al lumen uterino, es columnar simple. El estroma es el tejido conectivo y vascular que subyace al epitelio. El epitelio forma glándulas tubulares simples y ocasionalmente ramificadas, que se extienden dentro del estroma e inclusive, llegan hasta el miometrio. Las glándulas contribuyen a alimentar al *conceptus* durante su fase histotrófica. Las glándulas y el estroma varían de acuerdo a su profundidad en el endometrio. De acuerdo con esto, tres estratos endometriales pueden ser distinguidos: la zona compacta, la funcional y el estrato basal.^{2,3} (Figura 2.)

En el endometrio se efectúan un conjunto de fenómenos que permiten o facilitan

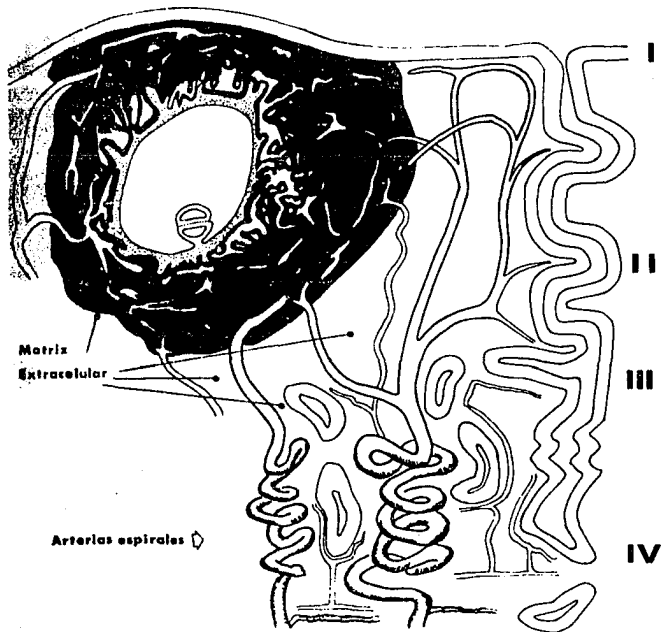


Figura 2. Estratificación del endometrio. El endometrio puede ser subdividido en cuatro zonas: La zona I está constituida por epitelio luminal y por una delgada capa de estroma. La zona II se distingue por un predominio de la matriz extracelular sobre las glándulas, que exhiben un trazo recto y perpendicular a la superficie. Los dos primeros estratos configuran la zona compacta. La zona III, en cambio, tiene glándulas de forma irregular, ramificadas y muy apiñadas. Esta zona es conocida como esponjosa, y junto con la zona II, recibe el nombre de funcional. En la zona IV, por último, la matriz extracelular es densa, y las arterias forman espirales. Es conocida como la zona o estrato basal. Durante la invasión, el trofoblasto debe atravesar los tres primeros estratos para alcanzar las arterias espirales, donde la presión y volumen sanguíneos pueden llenar los espacios intervellosos. (Tomado de Boving and Larsen, 1983.)

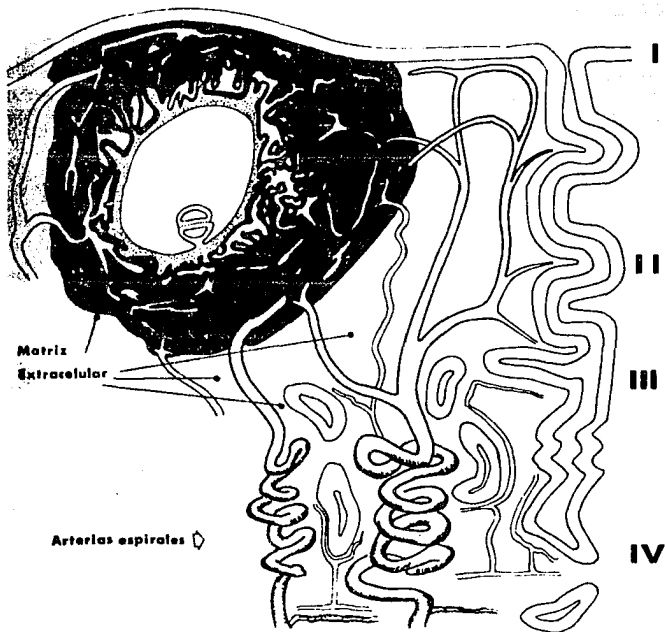


Figura 2. Estratificación del endometrio. El endometrio puede ser subdividido en cuatro zonas: La zona I está constituida por epitelio luminal y por una delgada capa de estroma. La zona II se distingue por un predominio de la matriz extracelular sobre las glándulas, que exhiben un trazo recto y perpendicular a la superficie. Los dos primeros estratos configuran la zona compacta. La zona III, en cambio, tiene glándulas de forma irregular, ramificadas y muy apiñadas. Esta zona es conocida como esponjosa, y junto con la zona II, recibe el nombre de funcional. En la zona IV, por último, la matriz extracelular es gruesa, y las arterias forman espirales. Es conocida como la zona o estrato basal. Durante la invasión, el trofoblasto debe atravesar los tres primeros estratos para alcanzar las arterias espirales, donde la presión y volumen sanguíneos pueden llenar los espacios intervellosos. (Tomado de Boving and Larsen, 1968.)

la implantación del blastocisto; estos acontecimientos son globalmente denominados como sensibilización o receptividad uterina. La sincronización entre la manifestación de la sensibilidad uterina y el desarrollo del blastocisto es imprescindible para que se establezca una comunicación o señalización adecuada que haga posible el desencadenamiento del proceso de implantación.^{4,6}

El período de tiempo durante el cual el endometrio es receptivo al blastocisto se denomina "ventana" de implantación. En el humano, la ventana de implantación se extiende desde el día 5 al día 7 después del incremento en los niveles de hormona luteinizante. Más allá de este límite el útero pierde su receptividad y llega a ser indiferente, refractario o tóxico al blastocisto, lo que con frecuencia se manifiesta en abortos.^{4,6,7}

La receptividad en el humano es controlada por la acción sinérgica de dos hormonas esteroideas: estrógeno y progesterona. Se ha determinado experimentalmente que la relación a la que estrógeno (E_2) y progesterona (P) deben someterse para estimular la sensibilización debe ser menor a 0.05, esto es, $E_2/P < 0.05$.⁸

Los rasgos morfológicos diagnósticos de receptividad uterina en el humano pueden detectarse en toda la capa endometrial. Las células epiteliales exhiben una mitocondria gigante rodeada por retículo endoplasmático rugoso, un sistema de canal nucleolar y separación de las interdigitaciones de las membranas en la parte media y basal de la pared lateral. En el estroma, casi la mitad de las células de tipo fibroblatoide modifican su forma, redondeándose, para convertirse en células "predeciduales", con núcleo vesicular y citoplasma claro y abundante. Otras células se contraen originando pequeños granulocitos endometriales esféricos. La zona compacta se vasculariza (de este modo la circulación materna es más accesible al *conceptus*). Simultáneamente, las células predeciduales quedan encerradas en "cestos" de fibras de colágena que también cubren densamente a glándulas y vasos.^{3,5,6}

El blastocisto humano entra en la cavidad uterina alrededor del día cuatro después de la ovulación. Es transferido al sitio de implantación por medio de ondas de contracción que se originan desde el cervix y desde la vecindad de la unión uterotubal. La implantación normalmente ocurre en el corpus con más frecuencia sobre la pared posterior que sobre la anterior y cerca de la línea media.⁷

Existen dos estructuras acelulares que cubren al blastocisto durante su estancia en

el útero. Estas envolturas son la zona pelúcida y el moco uterino.

La zona pelúcida u oolema es una corteza pálida que rodea por completo al *conceptus*, elaborada de mucoproteínas que se depositan mientras el óvulo está en el ovario. Esta envoltura le permite al blastocisto establecer una unión inespecífica primaria con el endometrio. Más tarde, el oolema es perforado o removido aparentemente por un factor proteolítico uterino dependiente de estrógeno denominado "factor iniciador de la implantación" (IIF).⁴

El fluido uterino o moco es considerado como un medio de intercambio y adhesión entre el blastocisto y el útero. En el humano es poco abundante, ya que apenas humedece al epitelio.²

Después de que la zona pelúcida es degradada, el blastocisto se fija al útero por el hemisferio abembrionario (polo en que se sitúa el embrioblasto).²

Por otra parte, durante el proceso de invasión del endometrio, el trofoblasto interacciona con el epitelio en forma particular dependiendo de la especie que se considere.⁹ Se cree que el área en que ocurre la invasión está relacionada con la presencia de vasos sanguíneos en la compacta (hemotropismo).⁵

La invasión continúa con la perforación de la membrana basal y el desarrollo de proyecciones trofoblásticas dentro del estroma.¹⁰ La horadación del endometrio ha sido atribuida a proteinasas secretadas por el trofoblasto.^{8,9,10,11,12}

Durante la invasión, la porción del trofoblasto que hace contacto con el endometrio prolifera y forma dos capas: una externa, en que varios núcleos comparten un citoplasma continuo denominada sincitiotrofoblasto, y otra interna, detrás del sincitio, que origina a éste, de células uninucleadas (células de Langhans), que recibe el nombre de citotrofoblasto.^{2,13}

Las células citotrofoblásticas producen la hormona gonadotropina coriónica (hCG), que se ha relacionado con el mantenimiento del cuerpo lúteo, que de esta forma continúa produciendo progesterona, habilitando al endometrio como un "lecho esponjoso".⁶

El último paso en la invasión blastocística consiste en el envolvimiento de los vasos sanguíneos del estroma y en la remoción de sus paredes (intravasación).¹⁴ En adelante, el trofoblasto procede a concretar la formación de la placenta (placentación).

Al inicio de la invasión aparecen algunos espacios dentro del sincitiotrofoblasto con el nombre de lagunas, que se originan durante la penetración de los vasos maternos. Las

lagunas son conductos desprovistos de sangre. Este fluido circula a través de las lagunas hasta que la invasión avanza a la región de las arterias espiraladas, donde la sangre corre con suficiente presión y volumen para llenar esos conductos. (Figura 2.) Mientras esto sucede, las lagunas aumentan sus dimensiones, se fusionan y constituyen los espacios intervellosos, que se establecen en la región media del trofoblasto, dividiéndolo en dos placas: la basal, que mantiene contacto con el estroma, y la coriónica, que se dirige a la cavidad amniótica. De aquí en adelante la sangre materna fluye a través de los espacios vellosos limitados por el trofoblasto, consolidándose el patrón básico de la circulación materna en la placenta.⁷

Algunas hebras de trofoblasto atraviesan el espacio intervelloso. Son conocidas como vellosidades de anclaje. A partir de ellas y también desde el plato coriónico crecen vellosidades libres dentro del espacio intervelloso.

Las vellosidades se desarrollan a través de tres estados. Una vellosidad primaria es un brote de sincitiotrofoblasto que contiene un centro de citotrofoblasto sólido. Una vellosidad secundaria se forma cuando crece un corazón mesoblástico laxo dentro de una vellosidad primaria. En la vellosidad terciaria persiste la adición de vasos sanguíneos. Simultáneamente con esta diferenciación, las vellosidades crecen, se ramifican y se entrelazan, anastomosándose, conformando un lóbulo placentar o cotiledón, en cuyo seno circula la sangre materna.

Las vellosidades de anclaje exhiben una proliferación secundaria, en que el citotrofoblasto crece hacia afuera a través del sincitio y dentro del estroma, formando las columnas celulares citotrofoblásticas, que de nuevo originan sincitio, que se desplaza al exterior como hebras o como células gigantes separadas, que tocan al miometrio.¹⁴

El piso del espacio intervelloso consiste del citotrofoblasto de las columnas celulares, además del sincitio periférico y de decidua.

Los vasos sanguíneos que proliferan dentro de las vellosidades se unen a vasos que crecen por fuera del embrión (capilares del saco alantoico), completándose así el patrón básico de circulación conceptual de la placenta.

A partir de que los patrones básicos de circulación han sido establecidos, se alcanza una aposición de circulaciones conceptual y materna por medio de vellosidades vascularizadas sumergidas en sangre materna que fluye a través de un espacio limitado por trofoblasto. De este modo se asientan las bases anatómicas para el intercambio

fisiológico.^{13,14} (Figura 3.)

La forma definitiva de la placenta humana es producto de la desaparición de vellosidades de todo el córion, excepto en la zona que mantiene contacto con la circulación materna. Debido a que el proceso de invasión termina al inicio del segundo trimestre, el incremento en grosor de la placenta se efectúa por un aumento en el tamaño de las vellosidades del córion frondosum con simultánea expansión del espacio intervelloso.

La placenta humana es un órgano en forma de disco, que al final del embarazo alcanza un diámetro de 15 a 20 cm. En términos generales, sus principales características morfológicas incluyen i. su diferenciación en dos caras: una fetal, donde se extiende la red de vasos sanguíneos que nace a partir de los vasos umbilicales o alantoicos, que suministran la sangre fetal —condición que la distingue como una placentación corialantoica—, y una cara materna, en la que es posible identificar a las vellosidades coriónicas en estrecha relación con la decidua basal —debido a la presencia de esta membrana, la placenta humana ha sido catalogada como deciduada—, y ii. su localización extracorpórea. En otro sentido, sus características funcionales implican i. crecimiento y desarrollo completos dentro de un período de vida limitado (que en el hombre llega a 36 ó 38 semanas), sin afectar la salud materna, y ii. adaptaciones anatómicas a diversas tareas que abarcan transporte de gases y metabolitos desde y hacia el feto, eliminación de productos de desecho, y elaboración de hormonas esteroideas y proteicas.¹⁵

A partir de un enfoque histológico (que evalúa la cantidad de tejidos maternos y fetales que entran en contacto directo en el órgano maduro) la placenta humana pertenece al tipo hemocorial, en que la capa celular externa de las vellosidades, el trofoblasto, es bañado directamente por sangre materna; es decir, se han eliminado todas las capas uterinas, por lo que los tejidos que se interponen entre las circulaciones fetal y materna, que conforman la "barrera placentaria", son solamente tres: trofoblasto, tejido conectivo y capilares vellosos (endotelio y membrana basal). De este modo, la placenta hemocorial del hombre representa una relación hemotrófica, desde que la nutrición es derivada de la sangre materna circulante.^{13,14,16}

Según Wynn (1975) "no es exacto que una reducción en el número de capas en la 'barrera placentaria' necesariamente es equivalente a un incremento en la eficiencia placentaria. Aunque la transferencia de sustancias que atraviesan la placenta por simple difusión probablemente es influida por el grosor de la barrera, no se ha tomado en cuenta

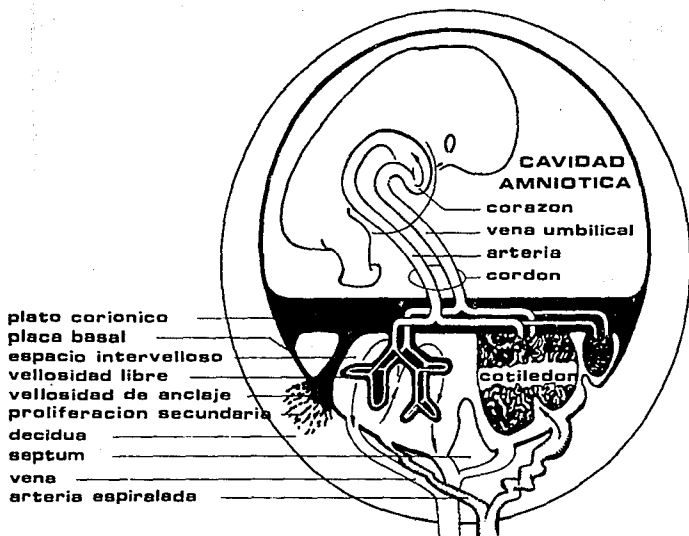


Figura 3. Las circulaciones conceptual y materna. En la especie humana, la placenta es el órgano que hace posible que las dos circulaciones lleguen a estar lo suficientemente cercanas para que el intercambio de gases y metabolitos entre ambas se efectúe, por medio de vellosidades vascularizadas sumergidas en sangre que fluye por los espacios intervelloso. (Según Boving and Larsen, 1988.)

la actividad fisiológica de las membranas placentales, particularmente con respecto a la facilitación enzimática del transporte y la pinocitosis."

Otras estructuras accesorias que se desarrollan a partir del *conceptus* son el saco de la yema, la alantoides y el amnios.¹⁴

Por otra parte, en el útero receptivo, el primer indicio de implantación es un incremento en la permeabilidad vascular endometrial alrededor del blastocisto —que marca el inicio de un fenómeno más complejo conocido como reacción decidual—. Su naturaleza localizada sugirió que ocurre en respuesta a una señal del blastocisto. Se ha indicado que esta señal puede ser física,^{4,17} o puede ser debida a dióxido de carbono,¹⁷ estrógeno¹⁸, histamina^{4,19} o prostaglandinas.^{4,7}

La transformación gradual del estroma endometrial, que se manifiesta debido al condicionamiento hormonal del útero durante la sensibilización y al estímulo de la implantación blastocística, desemboca en la formación de la decidua. La reacción decidual puede sintetizarse como la aparición de dos conjuntos de eventos, que por su naturaleza han sido catalogados como genómicos y no genómicos.¹⁸ El primero se distingue por una modificación en el patrón de expresión del DNA en las células endometriales. La serie de eventos no genómicos incluye la consolidación de la transformación de las células predeciduales en deciduales, de arquitectura poliédrica, junto con la aparición de reticulina (fibras delgadas de colágena Tipo III ^{20,21}) entre éstas, además de vasodilatación y permeabilidad capilar incrementadas, con lo cual el estroma llega a ser edematoso. Esas respuestas pueden resultar del efecto directo de la transmisión de una señal del blastocisto a través de la capa epitelial por medio de la liberación de otro mensaje y quizá, adicionalmente, con la amplificación del mensaje blastocístico original. La decidualización es considerada esencial para una implantación exitosa, aunque el papel preciso de la decidua es desconocido.⁷

La decidua, de acuerdo a su localización alrededor del *conceptus*, se ha clasificado en tres tipos: basal o serotina, capsular o refleja y vera o parietal. La decidua que está directamente debajo del sitio de implantación forma la decidua basal. Rodeando al embrión y separándolo del resto de la cavidad uterina en los primeros meses de gestación está la decidua capsular, que se produce como resultado de la implantación profunda del *conceptus* humano. El resto del útero en el embarazo está limitado por la decidua parietal. A medida que el embarazo continúa, el crecimiento del huevo llena

la cavidad uterina por lo que las deciduas capsular y parietal se fusionan, obliterando la cavidad endometrial. La decidua basal se incorpora pasivamente en la formación de la placenta ya que es invadida extensamente por células gigantes trofoblásticas, por lo que también es desprendida en el parto.¹⁷

LA ETAPA DE INVASION

Una placentación hemocorial presupone la existencia de una capacidad migratoria o invasiva de los tejidos embrionarios en el momento de la implantación.

La invasividad es posible gracias a la capa de células trofoblásticas en la periferia del blastocisto. El trofoblasto es una de las células conocidas más invasiva. Una de las mejores evidencias relacionada con esta aseveración está dada por el hecho de que en condiciones experimentales la implantación del huevo puede ocurrir por fuera de la cavidad uterina: el blastocisto logra invadir los tejidos de la cámara anterior del ojo, de los riñones, de los testículos, de la cavidad peritoneal, del hígado y del bazo. La implantación ectópica del blastocisto, en general, tiene un carácter mucho más invasivo que la implantación en la cavidad uterina. Esto último sugiere que la decidua podría tener un papel limitante sobre la capacidad invasora del trofoblasto.⁹

Entre los antropoides, el trofoblasto con mayores poderes invasivos pertenece al blastocisto humano.¹⁴

La unión del trofoblasto al epitelio uterino es un fenómeno que ocurre en todas las especies, inclusive en aquellas en donde no hay invasión del endometrio (implantación epiteliocorial).

Una vez que el blastocisto se ha adherido al endometrio, el trofoblasto penetra el epitelio; en el humano las células trofoblásticas se intercalan entre las células endometriales hasta hacer contacto con la membrana basal. Durante la invasión, la membrana basal representa una barrera que detiene temporalmente el avance del trofoblasto.²² El trofoblasto inicialmente se une a la membrana y después la degrada para continuar la invasión.

La unión del trofoblasto a la membrana basal es específica: observaciones inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos monoclonales contra varias integrinas han indicado la presencia de los heterodímeros $\alpha^4\beta_1$ y $\alpha^5\beta_1$, que corresponden al receptor para lami-

nina y fibronectina, respectivamente, sobre la superficie de citotrofblastos purificados, distribuyéndose a lo largo de placas de adhesión entre el sustrato y las células.²²

Por otra parte, a partir de la década de los 40's, se propuso la posibilidad de que enzimas proteolíticas de origen trofoblástico o uterino podrían intervenir durante el período en que se efectúa la fase de invasión. Sin embargo, la participación de proteasas en este evento ha sido escasamente documentada. En una visión retrospectiva de algunos trabajos que han sido publicados con este objetivo^{8,9,10,11,12}, puede observarse que, si se consideran en conjunto y en sentido cronológico, existe una serie de acercamientos progresivos que tratan de determinar la identidad de las moléculas involucradas.

En 1974, Dabich y Andary, ante la inquietud por la existencia de un "factor iniciador de la implantación" con habilidades proteolíticas en el ratón⁸, y ante la observación de que en el útero de rata los inhibidores de actividad enzimática disminuían el día en que se llevaba a cabo la implantación, demostraron que al ser aplicados inhibidores de proteínas sintéticos (L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketona [TPCK] y tosyl-L-lysine chloromethyl ketona [TLCK]) o naturales (inhibidor de tripsina pancreático básico) por medio de una inyección y/o alojando una cápsula de liberación lenta en una de las trompas del útero bicornado del ratón, el número de embriones implantados era casi nulo, "independientemente del día de tratamiento durante el período de preimplantación, la ruta de administración de los inhibidores o la preparación inhibitoria usada". No obstante, como ellos mismos apuntan "...no puede ser predicho de estos estudios si la bioquímica normal del embrión, del útero, del fluido uterino o alguna combinación de éstas fue alterada."¹¹

Strickland et al, en 1976, utilizando cultivos que contenían suero bovino fetal con plasminógeno (o suero bovino fetal sin plasminógeno enriquecido con plasminógeno purificado) sobre una placa de agar-fibrina (con o sin marca radiactiva de ¹²⁵I), encontraron producción de activador de plasminógeno por determinación de fibrinólisis (a través de la visualización directa de zonas de lisis o por medio de la determinación de la marca radiactiva asociada con los péptidos liberados de la placa de agar-fibrina en el medio de cultivo) a partir del trofoblasto o de células endodérmicas parietales de blastocistos de ratones. Como resaltan los autores, "...el patrón de producción enzimática por el trofoblasto (del sexto al noveno día de gestación) está cercanamente correlacionado con el período invasivo de estas células *in vivo* —que ocurre del sexto al décimo

día de embarazo— e implica que el activador del plasminógeno está involucrado en la implantación embrionaria." Sin embargo, como ellos mismos previenen, "...no conocemos si los efectos del activador del plasminógeno en la embriogénesis sean mediados por la formación de plasmina, o si puede producir efectos biológicos significativos por acción directa sobre otros sustratos."¹²

Más recientemente, Martin y Arias en 1982, utilizando una metodología similar a la desarrollada por Strickand *et al*¹², realizaron un estudio comparativo de producción de activador de plasminógeno entre células trofoblásticas humanas, células de coriocarcinoma BeWo y fibroblastos de piel humana, y determinaron que sólo las células trofoblásticas humanas y las de coriocarcinoma eran capaces de sintetizar y liberar esta enzima. La secreción del activador de plasminógeno estuvo limitada a sólo 2 días en las células de trofoblasto, y durante casi siete días (hasta el término del cultivo) con un incremento constante en las células del coriocarcinoma. Además, se descartó la posibilidad de que la progesterona tuviera algún efecto modulador sobre la capacidad de las células trofoblásticas y las de coriocarcinoma para producir el activador del plasminógeno.⁹

Fisher *et al* (1985) utilizó una matriz extracelular marcada con tritio (³H), aislada de las líneas celulares PF HR9 y PYS-2, como sustrato de vellosidades terminales ramificadas de placentas humanas de primero y segundo trimestre, así como de placentas a término. En la matriz se determinó por medio de fluorogramas, la presencia de laminina y de colágena tipo IV, que son componentes específicos de las membranas basales. En esta forma observaron, utilizando microscopía de luz y electrónica, que las vellosidades de primero y segundo trimestre se adherían rápidamente a la matriz, mientras que las vellosidades de placentas a término mostraban poca adherencia. Enseguida notaron que solamente en el material de primer trimestre se efectuaba migración de células trofoblásticas desde la superficie de las vellosidades sobre la matriz, con disolución simultánea de ésta. La degradación de la matriz fue confirmada por un incremento en la cantidad de radiactividad liberada en el medio (³H-leucina) y por la documentación de componentes de bajo peso molecular cuando éste fue cromatografiado a través de una columna de Sephadex G-50. La disolución de la matriz fue progresiva hasta el día 21 del cultivo (término del experimento) y fue atribuible a células citotrofoblásticas. De acuerdo con los autores, la disolución focal gradual de la matriz y la liberación en el

medio de cultivo de componentes de bajo peso molecular marcados con leucina tritiada, que acompañan a la migración trofoblástica, indica que la degradación de la matriz por parte de estas células "...es un proceso activo y no el resultado de una simple ruptura o penetración mecánica." "Para que esto ocurra, estas células presuntamente deben producir una amplia variedad de proteasas y glicosidasas que estén degradando los componentes de las dos matrices examinadas..."¹⁰

Woessner (1982) ha señalado que en la implantación o nidación del blastocisto, "...el tejido conectivo del endometrio ofrece una barrera a la implantación. Después de que el blastocisto se adhiere a las células epiteliales, el trofoblasto en desarrollo debe penetrar varias estructuras colagénicas: la membrana basal de la capa de células epiteliales, las fibras colágenas del estroma y adventicia alrededor de los vasos sanguíneos a los que tiene que conectarse, y finalmente la membrana basal de la capa endotelial de los vasos."³ (Figura 4.)

Por la importancia que la colágena tiene como un elemento estructural que representa un obstáculo para que la invasión ocurra, ofresco una descripción de algunas propiedades fundamentales de esta proteína y del mecanismo enzimático por el cual se ha determinado cómo en varios tejidos de diferentes especies puede ser removida.

LA COLAGENA

La colágena es la principal proteína estructural del tejido conectivo de los metazoarios. La matriz extracelular del tejido conectivo es una unidad estructural que otorga el soporte y mantiene la agrupación de las células que constituyen a todos los tejidos. La trascendencia evolutiva de la matriz radica en que su aparición contribuyó significativamente al desarrollo de la pluricelularidad.²³

La colágena establece relaciones estrechas con los diferentes elementos de la matriz tales como proteoglicanos, ácido hialurónico, elastina y otras glicoproteínas de localización restringida como fibronectina y laminina. Sin embargo, la colágena constituye el armazón de la matriz al que se unen todos los demás integrantes.¹⁴

Paralelamente a sus funciones estructurales, la matriz cuenta con atributos informacionales que se manifiestan principalmente en las primeras etapas del desarrollo ontogenético de los animales, promoviendo la diferenciación celular y "moldeando" te-

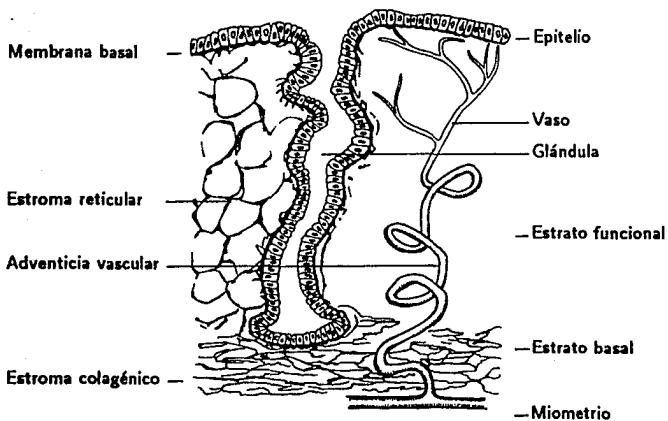
COLÁGENA**RASGOS ANATÓMICOS**

Figura 4. Estructuras colagénicas en el endometrio. La colágena es la proteína que forma el armazón de la matriz extracelular. En el endometrio se localiza en asociación con algunos rasgos anatómicos que deben ser librados por el trofoblasto en un sitio por hacer contacto con la circulación sanguínea materna. (Tomada de Woessner, 1982.)

idos y órganos durante la morfogénesis.^{19,24}

La colágena es la proteína más abundante en los vertebrados superiores, ya que constituye cerca del treinta por ciento de toda la proteína de su cuerpo.^{25,26} Es una familia de proteínas estructurales que difieren genética, química e inmunológicamente, pero que comparten la presencia de uno o varios dominios triple helicoidales, en los que cada cadena exhibe una secuencia aminoácida donde se repite el triplete Gly-X-Y, además de contener los aminoácidos hidroxiprolina e hidroxilisina.^{20,21} (Figura 5.)

En la actualidad se han identificado trece tipos diferentes de colágenas.^{20,21,26,27,28} (Tabla 1.)

La forma funcional de estas proteínas en el medio extracelular es un agregado polimérico insoluble que, dependiendo del tipo de colágena, se manifiesta como fibras, hojas, microfibrillas y bandas de inserción cortas.²⁹ (Figura 6.)

Las características relativas a la estructura, biosíntesis y ensamblaje de los agregados poliméricos en el medio extracelular se conoce con mayor claridad en las colágenas intersticiales.

A grandes rasgos, las moléculas de las colágenas fibrilares (Tipos I, II y III) parecen bastoncitos que miden 300 nm de longitud y 1.4 nm de diámetro, con un peso molecular de 300 KDa. Están formadas por tres cadenas polipeptídicas de 1050 aminoácidos distribuidos en tripletes repetidos de secuencia Gly-X-Y, donde X es casi siempre prolina y la posición Y es ocupada frecuentemente por hidroxiprolina. Las cadenas son conocidas como cadenas α . Los iminoácidos prolina e hidroxiprolina no permiten que los péptidos adopten una estructura globular. Cada cadena forma una hélice enrollada sobre sí misma de izquierda a derecha, con tres residuos por vuelta, mientras que las tres cadenas se enrollan entre sí formando una superhélice de derecha a izquierda. Esta estructura tridimensional aumenta la resistencia de las fibras a la tensión.^{24,26,29}

Las cadenas α terminan en ambos extremos con cortas secuencias pobres en glicina y en prolina, por lo que al integrarse en la molécula originan fragmentos sin configuración triple helicoidal, llamados telopéptidos.

La colágena se sintetiza y se secreta como un precursor soluble, que se transforma en insoluble al llegar a su destino en el espacio extracelular.

Las subunidades son construidas como preprocadenas α en los polisomas unidos al retículo endoplasmático rugoso. Una vez que los polipéptidos precursores inician el

PROCOLAGENA

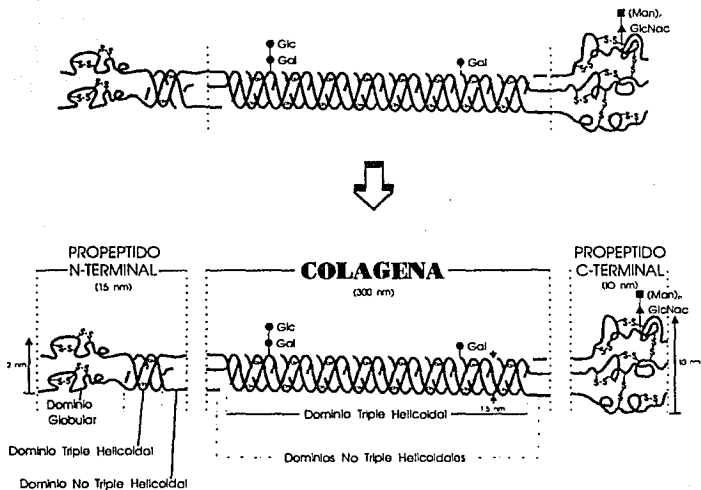


Figura 5. Estructura y forma precursora de las colágenas fibrilares. La molécula de colágena de los Tipos I, II y III es una proteína alargada constituida a partir de tres cadenas o que casi en toda su extensión se enrollan unas con otras para formar un gran dominio triple helicoidal. La porción de las cadenas o que puede plegarse para formar la triple hélice presenta una secuencia aminoácida en que el triplete Gly-X-Y se repite consecutivamente. La colágena es sintetizada como un precursor soluble (procólágena) que posee un dominio globular en cada extremo. (Tomada de Pérez-Tamayo, 1981.)

ingreso a las vesículas cruzando las membranas, el péptido "senäl" es separado.

En el interior de las cisternas, las procadenas α experimentan varias modificaciones: algunos residuos de prolina y de lisina son hidroxilados por hidroxilasas específicas. Tanto la prolil-hidroxilasa como la lisil hidroxilasa actúan mientras no se enrola la triple hélice.²⁹

Cuando tres procadenas α se unen en el seno de la cavidad del retículo endoplasmático se forma una molécula de procolágena.²⁴ El ensamblaje de la molécula inicia por la asociación de las tres procadenas en sus extremos C-terminales, a través del establecimiento de enlaces disulfuro. Debido al plegamiento que experimentan los péptidos durante la formación de la triple hélice, la glicina ocupa el lumen de la molécula. Una vez armada, la procolágena se compone por una porción central triple helicoidal extensa, limitada en los dos extremos por dominios globulares conocidos como propéptidos N- y C-terminales.^{24,25,30}

La triple hélice se mantiene estable mediante la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidróxilo de los residuos de 4-hidroxiprolina de cadenas polipeptídicas vecinas en el monómero.

El grupo hidroxilo del quinto átomo de carbono de la hidroxilisina es utilizado para incorporar a la molécula los azúcares galactosa y glucosilgalactosa, reacción que es ejecutada por las enzimas galactosil transferasa y glucosilgalactosil transferasa, en el interior del retículo y del aparato de Golgi. La unión covalente de galactosa y glucosilgalactosa hacen de la colágena una glicoproteína.¹⁶ Estos azúcares son los que permitirán establecer enlaces entre las distintas moléculas de colágena que constituyen una trama.²⁴

Después de que esta serie de modificaciones postraduccionales e intracelulares ha ocurrido, la molécula de procolágena es exportada hacia el ambiente extracelular.

Luego de haber sido expulsadas de la célula, los dos propéptidos de las moléculas de procolágena son atacados por las enzimas peptidasas de N-procolágena y peptidasas de C-procolágena³¹ o por las metaloproteinasas de la matriz del tipo 3³², con lo cual las moléculas se transforman de solubles en insolubles, concretándose al fin la formación de los monómeros de colágena.

No se conoce aún el mecanismo por el que se originan las fibrillas en el espacio extracelular. Por un lado, se cree que los monómeros se van agregando individual y

TABLA 1. LOS INTEGRANTES DE LA FAMILIA DE LA COLAGENA

Tipo	Cadenas constitutivas	Fórmula molecular	Designación común y estructura molecular	Longitud (nm)	Asociaciones macromoleculares	Localización
I	$\alpha 1(I)$ $\alpha 2(I)$	$[\alpha 1(I)]_2, \alpha 2(I)$	Fibrillas o intersticias. Triple hélice continua en forma de "varillas", con un tramo corto no helicoidal en cada extremo, de 6 y 26 nm respectivamente, denominados telopeptidos	300	Fibrillas bandeadas cada 67 nm, por el empaquetamiento de monómeros paralelos, con diámetros de 20 a 300 nm. En los Tipos II y III las fibrillas son más bien delgadas, y en el tipo III constituyen la red de "reticulina"	Es la más abundante. Se encuentra en la mayoría de los tejidos, principalmente en piel, hueso, tendón y córnea
II	$\alpha 1(II)$	$[\alpha 1(II)]_3$				Cartilago, humor vítreo, núcleo pulposo de discos intervertebrales
III	$\alpha 1(III)$	$[\alpha 1(III)]_3$				Es la más abundante en los tejidos felinos. En el adulto mantiene asociación con el tipo I, excepto en hueso, tendón y córnea. En grandes cantidades en piel, vasos sanguíneos y órganos internos
IV	$\alpha 1(IV)$ $\alpha 2(IV)$	$[\alpha 1(IV)]_2, \alpha 2(IV)$ $\alpha 1(IV)]_3$ $\alpha 2(IV)]_3$	De membranas basales. Triple hélice interrumpida en varios puntos, con un fragmento globular en el extremo C-terminal, y un coque de 60 nm a partir del extremo amino	390	Malla no fibrilar en que cuatro moléculas se unen por un fragmento helicoidal en el extremo N, sobrepasándose 30 nm, mientras que dos moléculas se conectan entre sí en forma sinéctica por el dominio globular C-terminal	En las membranas basales que subyacen a las células epiteliales y que rodean a las células musculares esqueléticas, nerviosas, simpáticas y del músculo liso

Tipo	Cadenas covalentes	Fórmula molecular	Designación común y estructura molecular	Longitud (nm)	Asociaciones macromoleculares	Localización
V	$\alpha 1(V)$ $\alpha 2(V)$ $\alpha 3(V)$ $\alpha 1'(V)$	$[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ (más común)	Particular. Semejante a las colágenas "fibrilares", pero con un segmento no colágeno adicional en el lazo N-terminal.	300	Fibrillas de 12 nm de ancho, con un entrelazamiento similar al de los tipos "fibrilares", que se asocian en una red laxa.	Se extiende desde la membrana basal en el intersticio de tejidos paraquitosales como plicatura.
VI	$\alpha 1(VI)$ $\alpha 2(VI)$ $\alpha 3(VI)$		Microfibrilar. Solo un tercio de la proteína es triple helicoidal; este segmento es flanqueado por sendos dominios globulares que constituyen los otros dos tercios de la masa.	105	Dos monómeros asociados antiparalela y ocasionalmente encimando 75 nm sus dominios helicoidales, que giran uno alrededor del otro formando dímeros enrollados. Estos se ensamblan simétricamente en tetrameros que se agrupan con otros originales microfibrilas bandeada cada 100 nm.	En casi todos los tejidos intersticiales.
VII	$\alpha 1(VII)$	$[\alpha 1(VII)]_3$	De cadena larga. La triple hélice abarca el 90% de la molécula, que cuenta con un dominio globular de tres brazos en el extremo C-terminal y con un globulo pequeño en el N-terminal.	450	Un monómero se une a otro antiparalelamente con un solapamiento de 60 nm, por lo que estos dímeros son paralelos a FLS. Los dímeros se asocian lateralmente con otros dímeros creando un entrelazado que da lugar a fibras de tejido.	Piel, músculo y membrana corneal, uniendo la membrana basal al tejido conectivo.
VIII	$\alpha 1(VIII)$		EC. Compuesta de pequeñas hélices unidas en LDM.	150		Producida por células endoteliales.

Tipo	Cadenas constitutivas	Fórmula molecular	Designación común y estructura molecular	Longitud (aa)	Asociaciones macromoleculares	Localización
IX	$\alpha 1(I\text{X})$ $\alpha 2(I\text{X})$ $\alpha 3(I\text{X})$	$\alpha 1(I\text{X})\alpha 2(I\text{X})\alpha 3(I\text{X})$	M o de alto peso-bajo peso. Formada por tres dominios covalentícos y cuatro no covalentícos. Contiene uniones glucosaminoglicanas y asparagina.	200		Pericostura en cartilago, humor vítreo y discos intervertebrales
X	$\alpha 1(X)$	$[\alpha 1(X)]_3$	C o de cadena corta. La molécula es casi totalmente triple hélice.	150		En cartilago hipercóncavo y mineralizante
XI	$\alpha 1(XI)$ $\alpha 2(XI)$ $\alpha 3(XI)$	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	Con dominios no triple hélice.	300		Cartilago
XII	$\alpha 1(XII)$					Tendon
XIII	$\alpha 1(XIII)$			variable		Producida por fibroblastos

progresivamente a polímeros constituidos previamente. Otra opinión es la de que dentro de las vesículas secretoras de la célula los monómeros se reúnen integrando fragmentos de fibrillas, que son los que en realidad se incorporan al polímero extracelular después de haber sido convertidos de solubles en insolubles²⁹

Las fibrillas son estabilizadas por uniones covalentes entre los monómeros de colágena. Estos enlaces son producidos a través de la desaminación oxidativa de grupos ϵ -amino (sexto carbono) de residuos de lisil y de hidroxilisil en las cadenas por la enzima lisil oxidasa, para formar aldehídos. Los enlaces son formados entre los aldehídos de las cadenas de una molécula y otros residuos lisina o hidroxilisina en moléculas vecinas. Estos enlaces también ocurren entre las subunidades de una misma molécula.

La estabilidad de la fibrilla es reforzada por enlaces disulfuro entre los monómeros.²³ Muchos de los enlaces intermoleculares se distribuyen en las regiones telopeptídicas.³³

La fibrilla de colágena es un polímero paracrystalino en que unos monómeros se unen con otros espontáneamente cabeza con cola y lado a lado en filas paralelas (autoensamblaje).

Las fibrillas muestran un bandeo transversal repetitivo que resulta del hecho de que axialmente cada molécula es desplazada de todas sus vecinas por 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 periodos de 67 nm, denominados D. Puesto que las moléculas de colágena miden 300 nm, sólo pueden comprender 4.4 periodos D, por lo que hay un hueco de 0.6 D entre una molécula y la siguiente. Como resultado de este hueco, el extremo N-terminal de una molécula desfasada por un período D sobrelapa el extremo C-terminal de otra molécula asociada lateralmente sólo por 27 nm, en lugar de por la total unidad repetida de 67 nm. El metal pesado que se deposita en los "huecos" durante la tinción negativa para microscopía electrónica, forma las bandas oscuras o estriamientos de las fibrillas. (Figura 6.)

El escalonamiento por periodos D maximiza las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas entre las triples hélices.³⁴

Las fibrillas, de igual forma, se reúnen y constituyen una fibra.

Los genes de las colágenas intersticiales de los vertebrados son copias únicas³⁵ que organizan su secuencia codificadora en aproximadamente 50 exones, la mayoría de los cuales contiene 54 pares de bases (pb).

Se ha propuesto que el gene ancestral para colágena fue ensamblado por duplica-

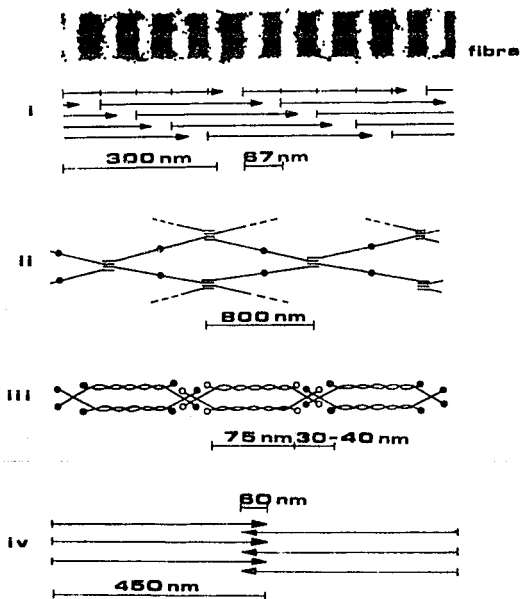


Figura 6. Agregados poliméricos extracelulares de las colágenas. Se han identificado cuatro estructuras macromoleculares que son específicas al tipo de colágena: i. la fibrilla, con su patrón de bandeo característico, en los tipos intersticiales; ii. la red o membrana de la colágena Tipo IV; iii. La microfibrilla, en el Tipo VI, y iv. la banda de inserción en la colágena Tipo VII. La descripción de la estructura y del ensamblaje de estos polímeros está en la tabla 1. La estructura agregada de los tipos de colágena restantes no ha sido identificada. (Modificado de Martín, *et al.* 1985, y Piez, 1986.)

ciones múltiples de esta unidad genética de 54 pb. Del mismo modo, se cree que el exón de 54 pb fue construido a partir de un módulo primario de nueve pb que codificaba para el triplete Gly-Pro-Pro por repetición en tándem, es decir, (GGTCCTCCT)_n. La formación de un péptido formado por glicina y prolina de 18 aminoácidos fue importante debido a que probablemente contaba con la mínima longitud necesaria para formar una estructura triple helicoidal estable^{23,26,37}

La subsecuente repetición en tándem de 13 segmentos de 54 pb para producir un módulo terciario de 702 pb posibilitó la formación de un dominio con 234 aminoácidos, semejante al fragmento D de las colágenas fibrilares de los vertebrados.

En el ínterin, las secuencias del exón de 54 pb evolucionaron por mutaciones puntuales pero también, en algunos casos, por deleciones o adiciones de nueve pb o múltiplos de nueve, ya que son las únicas que pueden ser toleradas para preservar la continuidad de la triple hélice.³⁷

La expresión del módulo terciario aparentemente siguió dos vías: la más inmediata fue la conversión de uno o más codones de glicina en codones para cisteína, con lo que se produjeron polipéptidos capaces de desarrollar puentes disulfuro intermoleculares, dando origen a un material estructural extracelular primitivo parecido a las redes de colágena Tipo IV de los vertebrados o a las de las colágenas de invertebrados.

El módulo terciario, por otro lado, también pudo amplificarse en tándem hasta 5 veces. Posiblemente debido a que el producto de este gene era capaz de formar fibras con moléculas escalonadas, pero que presentaban "hoyos" en todas las posiciones y, por lo tanto, eran mecánicamente débiles, el acortamiento de los genes de 5 a 4.4 módulos terciarios permitió la formación de fibras en que zonas "huecas" alternan con zonas de solapamiento, incrementándose así la resistencia de las mismas.²³

En palabras de Runnegar (1985): "Fue la aparición de esta clase de colágenas fibrilares un poco antes de 800 millones de años lo que permitió a los animales multicelulares desarrollar cuerpos más grandes y más resistentes..."

Por lo tanto, es probable que todos los genes de colágena sean homólogos y que las diferencias entre los varios tipos de colágenas de vertebrados e invertebrados sean producto de desarrollos distintos subsecuentes a su divergencia.

Mutaciones estructurales de los genes de colágena o alteraciones en alguno de los pasos postraduccionales, así como en la regulación de la expresión de los mismos, conduce

a varias patologías.^{30,31}

EL CATABOLISMO DE LA COLAGENA EN VERTEBRADOS

Durante el crecimiento y el desarrollo normales, así como en la reparación de los tejidos, tanto la biosíntesis como el catabolismo de la colágena son modulados con precisión.^{39,40,41}

La tasa media fraccional de recambio de las fibras de colágena en algunos tejidos de rata adulta ha sido determinada después de la inyección de [¹⁴C]-prolina junto con una dosis excesiva ("flooding") de prolina sin marca, evaluando la cantidad de hydroxy [¹⁴C]-prolina incorporada en las fibras de colágena, libre o en péptidos pequeños. De este modo, la fracción de la masa total de colágena que está siendo sintetizada y degradada *in vivo* en el *steady-state* es: en corazón, $5.2 \pm 0.7\%$ /día; en pulmón, $9.0 \pm 0.7\%$ /día; en músculo esquelético, $2.2 \pm 0.3\%$ /día, y en piel, $4.4 \pm 1.3\%$ /día.⁴² Además, se ha determinado que las colágenas recién sintetizadas son más rápidamente degradadas, por lo que la tasa de recambio de estas colágenas es: en corazón, $53 \pm 5\%$ /día; en pulmón, $37 \pm 2\%$ /día; en músculo esquelético, $38 \pm 7\%$ /día, y en piel, $8.8 \pm 0.5\%$ /día.⁴²

Gross ha señalado que el desmantelamiento de la colágena debe de ser considerado tomando como referencia diferentes clases de procesos biológicos: i. morfogénesis constructiva o formación de estructuras nuevas y remodelado de estructuras viejas para funciones diferentes; ii. reparación o reemplazo de tejido en que una porción grande deba primero ser removida para que tejido fresco llegue a establecerse —esta categoría concuerda con lo que ocurre durante la implantación, donde tejido endometrial es removido durante la invasión del trofoblasto, creandose un espacio que es ocupado por la placenta—; iii. destrucción de tejido indiscriminada, patológica.⁴³

Las fibras de colágena a temperatura y pH fisiológico son resistentes a ser degradadas dentro del dominio molecular helicoidal por cualquiera de las proteasas neutras comunes.³⁹

Gross y Lapiere en 1962, realizando estudios sobre la metamorfosis de anuros, detectaron en medio de cultivo de tejidos de cola de renacuajo de la *Rana caesbiana* (rana toro), un "factor" colagenolítico capaz de degradar fibras de colágena nativa reconstruidas bajo condiciones de pH y temperatura fisiológicas.³⁹ A partir de entonces,

un sinnúmero de colagenasas han sido aisladas de una gran diversidad de tejidos y especies animales.^{44,45,46,47,48,49,50,51,52}

Las colagenasas forman parte del grupo de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) o matrixinas que son las principales enzimas implicadas en la remodelación del tejido conectivo en procesos tales como la migración celular durante el desarrollo, la reparación de las heridas, la ovulación, la angiogenesis y la involución del útero post-partum, o en situaciones patológicas tales como la artritis reumatoide y la osteoartritis, la periodontitis o la invasión tumoral y la metástasis.

Las matrixinas son una familia de enzimas que tienen actividad a pH neutro, contienen Zn^{2+} y requieren Ca^{2+} para exhibir actividad total, son inhibidas por agentes quelantes pero no por inhibidores para proteinasas de serina, cisteína o aspártico y tienen la habilidad para degradar uno a más componentes de la matriz extracelular. Al menos MMP-1 (colagenasa intersticial), MMP-2 (gelatinasa de 72 KDa) y MMP-3 (estromelinasa) son secretadas en una forma de proenzima inactiva o simógeno y pueden ser activadas por tratamiento con proteinasas o con organomercuriales, sufriendo una pérdida de 10 a 12 KDa en la masa molecular. Estas enzimas son sintetizadas por células mesenquimáticas tales como fibroblastos y también por ciertos tipos endoteliales y epiteliales, así como por células tumorales. Las matrixinas son inactivadas específicamente por los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) producidos por las mismas células. Las secuencias del cDNA de todas las metaloproteinasas muestran gran homología.^{32,33,34}

En particular, las colagenasas intersticiales (MMP-1) son endopeptidasas que hidrolisan la triple hélice de la molécula de colágena nativa en un solo enlace peptídico, Gly-Ile o Gly-Leu, en el mismo lugar en las tres cadenas polipeptídicas, a un cuarto de distancia del extremo terminal COOH de las colagenas fibrilares, esto es, en las posiciones 775-776 de la secuencia aminoácida, lo que provoca la liberación de dos productos de reacción: uno que constituye el 75% de la molécula, llamado TC^A , y otro que sólo representa el 25%, el fragmento TC^B .^{44,45,53,54} (Figura 7.) Excepcionalmente, las colagenasas intersticiales pueden romper la molécula de colágena tipo X en dos lugares: i. el enlace Gly-Leu, residuos 142-143, y ii. el enlace Gly-Ile, residuos 470-471.

Al igual que otras matrixinas utilizan Ca^{2+} extrínseco como activador y termoestabilizante de la conformación espacial de la molécula⁵⁷ y contienen Zn^{2+} en su estructura.⁵⁸

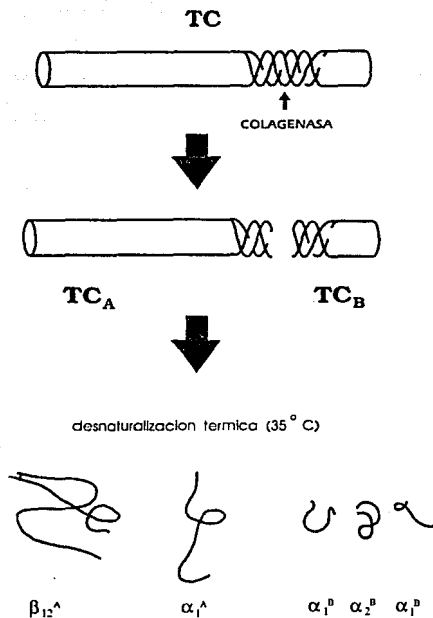


Figura 7. Degradación específica de la colágena por colagenasa. Las colágenas fibrilares son divididas en el dominio helicoidal por una metaloproteínasa neutra denominada colagenasa, que produce dos fragmentos: TC^A, que representa el 75% de la longitud de la molécula, y TC^B, que comprende el 25% faltante. A temperatura corporal estos fragmentos se desnaturalizan espontáneamente y son atacados por proteasas inespecíficas. (Según Woolley, 1984.)

Las colagenasas pertenecen al grupo de las glicoproteínas, como ha sido demostrado por su habilidad para unirse a concanavalina A durante cromatografía de afinidad^{48,50} o por exhibir tinción con el reactivo ácido periódico de Schiff⁵². Operan significativamente mejor a temperatura fisiológica⁵³ y sobre el rango de pH neutro de 7.0-8.0.^{45,46,48,50,60} Los pesos moleculares de las colagenasas intersticiales usualmente caen dentro del rango de 30 KDa a 80 KDa.⁴¹ (Algunos ejemplos de pesos moleculares determinados por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida o por cromatografía de filtración en gel son: colagenasa de riñón de rata⁴⁹, 16 500; de líquido sinovial humano⁶¹, 25 000 y 30 000; de piel de cobayo⁶², 40 000 y 130 000; de tejido sinovial de cerdo⁶⁰, 44 000; de piel humana⁴⁸, 42 000 y 52 000; de células sinoviales de conejo⁶⁷, 49 000; de células tumorales metastásicas de murino⁴⁵, 60 000; de leucocitos neutrofilos polimorfonucleares humanos^{48,50}, 64 000-68 000; de conjuntiva de conejo⁶¹, 65 000; de aleta de cola de renacuajo⁴⁴, 100 000.)

Estructuralmente las colagenasas intersticiales están integradas por 5 dominios que comparte con otros miembros de la familia de las matrixinas. (Figura 8.)

Además de su capacidad para hidrolizar la molécula de colágena nativa, algunas colagenasas cuentan con actividad proteolítica sobre gelatina y sobre otros sustratos naturales o sintéticos, pero ésta es realizada a una tasa mucho más lenta que la mostrada sobre su sustrato específico.^{54,62,63} Una observación que corrobora este comportamiento ha sido producida utilizando colagenasa de fibroblastos humanos, donde la K_m medida para colágena nativa es menor que para las cadenas de gelatina $\alpha 1(I)$ y $\alpha 2(I)$, lo que indica que la enzima demuestra mayor afinidad por la estructura triple helicoidal de la molécula nativa.⁶³

Por medio de tinción inmunohistoquímica indirecta de granulomas de carragenina en cobayo con un anticuerpo policlonal anti-colagenasa se determinó que la colagenasa se localiza *in situ* primordialmente asociada a las fibras de colágena.⁶⁴

Esta enzima no es almacenada en el interior de las células, excepto en los leucocitos neutrófilos polimorfonucleares humanos, donde se mantiene albergada en los gránulos específicos⁶⁶, sino que es necesaria síntesis *de novo* para su producción-secreción. En fibroblastos sinoviales de conejo se ha determinado *in vitro* que el tiempo que la colagenasa ocupa mientras es sintetizada es de 15 min y el que es consumido hasta su liberación al medio es de 35 min.⁶⁵

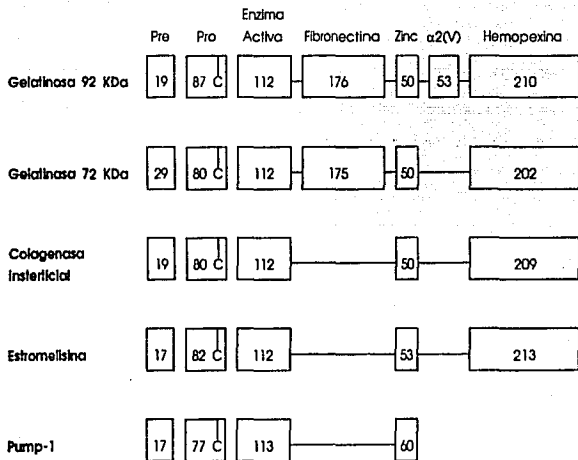


Figura 8. Dominios estructurales de las matrixinas de origen humano. Las cajas representan regiones de similitudes aminoacídicas entre los varios miembros de la familia de las matrixinas. El número de residuos aminoacídicos es mostrado dentro de cada dominio. El dominio *pre* es el dominio del péptido señal. El dominio *pro* es dividido cuando la enzima es convertida a la forma activa y contiene la secuencia altamente conservada PRCGVDPV. Se cree que el residuo de cisteína juega un papel esencial en el mantenimiento de la enzima en forma latente. La región catalítica está constituida por el dominio de la *enzima activa* y el dominio de *unión al sustrato*; éste último contiene la secuencia consenso altamente conservada Ala-Ala-His-Glu-hidrofóbico-Gly-His. Se piensa que los dos residuos de histidina están involucrados en la unión al Zn. El dominio de tipo *fibronectina* es similar al dominio de unión a colágena de la fibronectina; se cree que facilita la unión de las dos gelatinasas a sus sustratos. El dominio de tipo *colágena* tiene similitud de secuencia a la cadena $\alpha 2$ de la colágena tipo V; su función es desconocida. El dominio de tipo *hemopexina* se cree que ayuda a determinar la especificidad del sustrato. (Según Matrisian, 1990, y Woessner, Jr., 1991.)

Las células con potencial para liberar colagenasa pueden ser inducidas *in situ* para producirla en grandes cantidades con cristales de urato⁴⁷, acetato de forbol miristato⁴⁸ o heparina⁴⁹. Por otra parte, macrófagos peritoneales de cobayo han sido estimulados *in situ* con carragenina para que secreten colagenasa *in vitro*.⁴⁷

La producción de colagenasa por una línea celular puede ser modificada por otra estirpe que no sintetiza la enzima o lo hace en muy poca cantidad cuando se cultivan simultáneamente, es decir, un tipo celular libera un factor que estimula o inhibe la secreción de colagenasa por el otro tipo.^{45,48,49} Para que el modulador y la colagenasa sean liberados se requiere de un inductor adicional como la citocalasina B en la mezcla de células epiteliales-estromales de la córnea de conejo^{45,48}, o bien, IgG agregada, fragmentos Fc de IgG o concanavalina A en el cocultivo macrófagos monocitos-células sinoviales de pacientes con artritis reumatoide⁴⁹, que han sido analogados con estímulos ambientales o internos que desencadenan la síntesis de colagenasa *in situ* en los tejidos de los vertebrados.

Además de las interacciones celulares, factores humorales tales como hormonas, prostaglandinas, proteínas y mensajeros intracelulares regulan la producción de colagenasa por varias células efectoras. Por ejemplo, la activación de macrófagos peritoneales de cobayo con lipolisacaridos conduce a un aumento en la síntesis de prostaglandina que, por su parte, produce una elevación del nivel intracelular de cAMP que promueve la secreción de colagenasa.⁷⁰

Los factores que hasta el momento se ha descrito que inducen y/o estimulan, o bien inhiben la producción de colagenasa están colocados en la Tabla 2.

Se ha determinado que la estimulación de la síntesis de colagenasa *in vitro* es acompañada por un aumento en la síntesis del RNA mensajero, por lo que se ha planteado que la regulación de la expresión de esta enzima ocurre al nivel de la transcripción. En una región río arriba del extremo 5' del cDNA genómico para la colagenasa humana está localizada la unidad de respuesta a forbol y oncogenes (TORU), integrada por el elemento de respuesta a forbol (TRE), el sitio de unión AP-1 y el sitio de unión PEA3, que controlan la producción de la enzima. Algunos factores de crecimiento y promotores de tumores estimulan la formación de los productos proto-oncogénicos c-Jun y c-Fos, que se unen entre sí por medio del mecanismo de cierre de leucina para originar la proteína activadora AP-1. Esta proteína actúa como un factor de transcripción con-

TABLA 2

FACTORES QUE INDUCEN/ESTIMULAN
LA PRODUCCION DE COLAGENASA

FACTORES QUE ACTÚAN EN LA SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS	AGENTES FÍSICOS QUE ACTÚAN SOBRE LA CÉLULA
Ionóforo de calcio A23187	Choque térmico
Fusión celular	Irradiación UV
Tipos de colágena en el sustrato	
Concanavalina A	CITOCINAS/FACTORES DE CRECIMIENTO
Cristales	Factor de crecimiento epidérmico
<i>Urato</i>	Factor de crecimiento fibroblástico b
<i>Hidroxiapatita</i>	Interferones α , β , γ
<i>Pirofosfato de calcio</i>	Interleucina 1α , β
Anticuerpo anti-integrina	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
Hierro	Factor de necrosis tumoral α
Fagocitosis	
Polihidroxietilmetacrilato	OTROS
	Transformación viral, oncogenes
AGENTES QUÍMICOS	Agentes autocrinos
AMP cíclico	Envejecimiento de fibroblastos
Colchicina	
Citocalasina B, D	FACTORES REPRESIVOS
Lipopolisacárido	Acido retinoico
Mitomicina C	Glucocorticoides
Pentoxifilina	Gene E1A del adenovirus-5
Diesteres forbol	Estrógeno
Prostaglandina E	Progesterona
Trifluoperasina	Factor de crecimiento transformante β

Tomada de Woessner, Jr. J, 1991

tactando a TRE/AP-1. Nueve pares de bases río arriba de AP-1 se localiza el sitio de unión para el factor de transcripción PEA3; esta proteína actúa sinérgicamente con AP-1 después de la inducción de colagenasa por los factores de crecimiento o forbol.^{53,54}

Una vez que se ha generado el RNA mensajero, la colagenasa es traducida en los polisomas como una sola cadena polipeptídica en forma de proenzima que pierde su péptido "señal" al ingresar a las vesículas microsomales, donde la proenzima que resulta es glicosilada con oligosacáridos.^{57,58}

Se cree que muy poca colagenasa activa está libre en el tejido durante el remodelado fisiológico⁴³, debido a que es liberada en forma latente^{45,47,50,71} (aunque se ha reportado que macrófagos estimulados con carragenina liberaran una colagenasa activa⁶⁷) o ha sido bloqueada por inhibidores libres en el tejido (p. ej. TIMP), formando un complejo enzima-inhibidor.^{44,59,72,73}

Se ha propuesto el modelo del "switch" de cisteína para explicar el mecanismo de activación del precursor inactivo o zimógeno (procolagenasa).⁷⁴

En este modelo se hace la suposición de que el dominio pro del zimógeno se pliega de tal modo que el grupo sulfhidrilo de la cisteína en la región conservada PRC⁷³GVPDV está coordinado al átomo de zinc en el centro activo para mantener la latencia de la enzima. Sin embargo, debido a que la colagenasa de fibroblastos humanos (HFC) nunca ha sido aislada totalmente latente (más allá del 95%), se cree que el precursor inactivo existe en equilibrio con una pequeña fracción de enzima activa en que la Cys⁷³ está disociada del zinc.

La colagenasa latente puede ser activada por varias maneras (Tabla 3). Las bases para esas activaciones es la disociación de la Cys⁷³ del átomo de zinc en el sitio activo y su remplazamiento por agua, con la concomitante exposición del sitio activo. La disociación de la Cys⁷³ del átomo de zinc en la enzima latente "switches" el papel del zinc de uno no catalítico a uno catalítico.

El residuo de Cys⁷³ es completamente liberado por pérdida proteolítica del dominio pro después de activación autolítica, o activación por tripsina u otras proteasas. Esta disociación también puede conseguirse por agentes caotrópicos tales como NaSCN o surfactantes tales como SDS, que estabilizan conformaciones de la proteína en que la Cys⁷³ es espacialmente removida del átomo de zinc en el sitio activo.

TABLA 3

ACTIVADORES DE LA COLAGENASA

PROTEASAS	REACCIÓN CON SULFHIDRILLO
<p>Proteasas de serina</p> <p><i>Tripsina</i>^{66,65,68}</p> <p><i>Quimiotripsina</i>⁶⁵</p> <p><i>Plasmina</i>^{76,67}</p> <p><i>Kalikeína</i>^{76,67}</p> <p>Proteasas lisosomales</p> <p><i>Catepsina G</i>⁶⁹</p> <p><i>Catepsina B</i>⁶⁷</p> <p>Metaloproteinasas</p> <p><i>Estromeliasina</i>⁷⁶</p>	<p>Organomercuriales</p> <p><i>4-cloromercuibenzoato (PCMB)</i>^{66,65,65,91}</p> <p><i>Acetato 4-aminofenilmercurico (APMA)</i>^{66,69,65,92}</p> <p><i>Mersali</i>^{69,65}</p> <p><i>p-hidroziomercuribenzoato (PHMB)</i>^{65,93}</p> <p>Disulfuros</p> <p><i>Glutation oxidado (GSSG)</i>⁹⁰</p> <p><i>Acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB)</i>⁷⁴</p> <p>Alquilantes</p> <p><i>N-etilmaleimida (NEM)</i>⁹⁴</p> <p>Sales de Au(I)</p> <p><i>Tiomalato sódico auroso (GST)</i>^{95,96}</p> <p><i>Tioglucona aurosa (GTG)</i>⁹⁶</p> <p>Oxidantes</p> <p><i>Acido hipocloroso (HOCl)</i>⁹⁷</p> <p><i>Hipoclorito sódico (NaOCl)</i>⁷⁴</p>
<p>PERTURB. CONFORMACIONALES</p> <p><i>Isoiocianato de sodio</i>^{87,88,89}</p> <p><i>SDS</i>⁹⁰</p>	
<p>VARIOS</p> <p><i>Autódia</i>^{75,76}</p>	

Los compuestos que reaccionan con el sulfhidrilo aparentemente modifican este residuo de cisteína durante los momentos en que es transitoriamente disociado del átomo de zinc, así impidiendo la reasociación y cambiando el equilibrio a la forma activa por acción de masas. De este modo se cree que la liberación de la Cyn⁷⁵ de su enlace al átomo de zinc con la consecuente formación de un sitio activo es el evento primario que precede a las divisiones autocatalíticas que se manifiestan después de la aparición de la actividad colagenolítica.⁷⁴ (Figura 9.)

La participación de enzimas o de compuestos químicos en la activación del precursor se observa con mayor claridad si se considera la secuencia de la colagenasa de

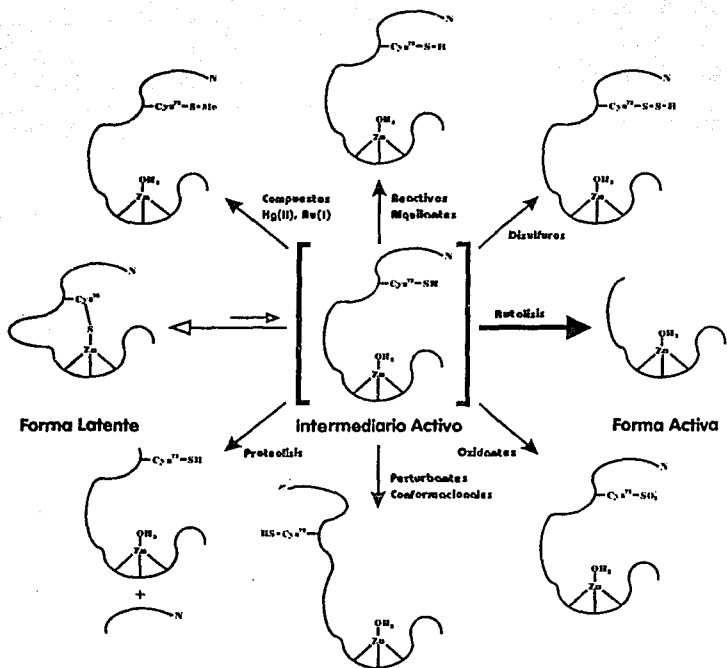
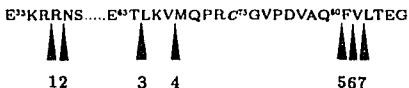


Figura 9. El modelo del "switch" de cisteína. En la procollagenasa el átomo de zinc del centro activo está coordinado con el grupo sulfhidrilo de la Cys⁷³ para mantener la latencia de la enzima. Los *activadores* (Tabla 3) favorecen la disociación de la Cys⁷³ del átomo de zinc, de tal modo que el zinc puede ahora actuar como catalizador. Más tarde ocurren una o varias divisiones autocatalíticas con lo cual la collagenasa alcanza su estado de mayor actividad. (Modificado de Springman *et al*, 1990)

fibroblastos reumatoides humanos alrededor de la cisteína conservada:



Proteasas de serina tales como la kalikreína efectúan una primera escisión a la derecha de Arg³³ o Arg³⁶; tripsina y plasmina cortan en la posición 2. Con esta digestión se remueve suficiente cantidad de péptido para que la cisteína ya no continúe sostenida en estrecha aposición al átomo de zinc, por lo que el centro activo llega a estar expuesto y produce un ataque autocatalítico en la posición 3. La collagenasa que se origina está ahora activa, pero no del todo. La máxima actividad es alcanzada sólo después de que ocurre una hidrólisis adicional más allá del residuo de Cys⁷³ en la posición 5, que expone un grupo Phe NH₂-terminal. Esta escisión es producida sólo por estromelisina (MMP-3), que por esta razón se considera como una enzima de suma importancia en la activación de la collagenasa *in vivo*.

Una activación alternativa de la enzima con APMA o con agentes caotrópicos causa que la cisteína llegue a disociarse del zinc y la collagenasa entonces se hidrolice por sí misma en la posición 4. La incubación prolongada con APMA conduce a una autólisis intermolecular adicional con hidrólisis en las posiciones 6 y 7. Sin embargo, la remoción de la Phe⁴¹ resulta en una enzima con sólo 40% de actividad máxima. Por lo tanto, hasta el momento la estromelisina produce la forma de collagenasa con la más alta actividad específica.^{73,74}

En las células del ascitis de Ehrlich la activación de la procollagenasa ocurre en la superficie de las mismas por una proteasa neutra parecida a tripsina (TLNP),⁷⁷ aunque ésta puede lograrse en el medio extracelular como en el caso del simógeno secretado por las células del carcinoma de seno humano, que es activado por el sistema activador de plasminógeno-plasmina.⁷¹

El simógeno de la collagenasa de aleta de cola de renacuajo no se une a colágena ni la degrada, pero la activación descubre ambas propiedades.⁴⁴ En cambio, la procollagenasa de hueso de ratón sí se adhiere a colágena (aunque en menor grado que la enzima activa), por lo que se ha sugerido que presenta sitios de unión al sustrato que difieren del sitio catalítico. Por este motivo se ha expuesto la idea de que la enzima puede ser

almacenada extracelularmente en su estado latente sobre las fibras de colágena.⁷⁸

Por otra parte, se han descrito dos principales fuentes naturales de actividad inhibitoria: los inhibidores del plasma del sistema vascular como α_2 -macroglobulina⁷⁹ y β_1 -anticolagenasa⁸⁰, y aquellos producidos por ciertas células para controlar la actividad local de la enzima^{46,72,73,81}, como la familia de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP). TIMP-1 es una familia de glicoproteínas con un peso molecular de 28.5 KDa, que forman un complejo estequiométrico 1:1 con la colagenasa intersticial y con las matrixinas del grupo 3. Esta unión es reversible y de gran afinidad ($K_D = 10^{-10}$ M).⁷³ La colagenasa tipo IV (gelatinasa de 72 KDa) es inhibida por otro miembro de la familia denominado TIMP-2, que comparte el 38% de homología con TIMP-1.^{82,83} Un inhibidor parecido a TIMP (LIMP) de 76 KDa, secretado por fibroblastos en cultivo, puede unirse a las MMPs 1, 2 y 3.⁸⁴

Los compuestos químicos que quelan Ca^{2+} (EDTA y EGTA, entre otros) son utilizados tradicionalmente en ensayos en tubo de inhibición de actividad colagenolítica con gran éxito. Recientemente se han elaborado inhibidores sintéticos tales como el SC-40827, un péptido Leu-Tyr modificado con una función propil carboxy en el lado amino de la leucina, que fueron elaborados con el propósito de inhibir procesos patológicos tales como metástasis y osteoartritis.⁸⁵

Los complejos enzima-inhibidor no se unen a colágena⁸⁶

Se ha postulado que la activación de los complejos enzima-inhibidor puede ocurrir gracias a una reacción de intercambio tiol/disulfuro, por lo que *in vivo* la activación puede ser regulada por el potencial redox en el medio.⁸⁷

No obstante, existe otra opinión sobre las enzimas latentes que plantea que las colagenasas que ya han cumplido con su función son combinadas con un inhibidor para ser removidas del tejido⁷², lo que obviaría la necesidad de reactivar el complejo.

Debido a que en el tejido conectivo prácticamente la mayor cantidad de colágena está presente como fibras de colágena polimérica,⁸⁸ se ha propuesto la hipótesis de que un sistema multiensimático es requerido para degradarlas. A éste se le ha dado el nombre de sistema colagenolítico.^{33,43,86,98} Abundando al respecto, una proteasa neutra atacaría a las moléculas de colágena que se localizan en la superficie de la fibra, en sus extremos amino y carboxilo, separando a los telopéptidos (que mantienen unidas lateralmente a dos moléculas) de la triple hélice, por lo que este dominio podría

abandonar la fibra como una entidad aislada. Los monómeros solubles serían entonces degradados específicamente por la colagenasa en dos fragmentos que se desnaturalizarían espontáneamente, que bajo este estado continuarían siendo digeridos por proteasas inespecíficas. Así se permitiría el acceso de este conjunto armónico de proteasas al interior de la fibra, en donde de nuevo liberarían y degradarían a otras moléculas de colágena hasta terminar con la fibra. La degradación por colagenasa de la triple hélice de colágena es considerada el paso limitante durante la colagenólisis.⁴⁰

Como evidencia de enzimas que escinden telopeptidos están la proteasa neutra de leucocitos polimorfonucleares humanos³³ y la metaloproteínasa de hueso de conejo.⁹⁹ La telopeptidasa (MMP-4) de fibroblastos gingivales humanos remueve el C-telopeptido de la cadena α_1 de la colágena tipo I.¹⁰⁰

Los péptidos desnaturalizados pueden ser degradados por proteasas neutras⁹⁹, gelatinasas^{66,67} o catepsinas.¹⁰¹

Algunos tipos de colágena pueden ser atacados por proteasas de serina. La colágena tipo III es digerida específicamente por la elastasa de leucocitos polimorfonucleares humanos haciendo un corte a través de la triple hélice, en un enlace Ile-Thr localizado 4 residuos hacia el extremo carboxilo del sitio de división de la colagenasa.¹⁰² Ante la posibilidad de que este tipo de colágena también pueda ser hidrolizado por tripsina, fue incubada colágena Tipo III simultáneamente con concentraciones equimolares de colagenasa o tripsina con lo que pudo evaluarse que la degradación del sustrato por colagenasa fue de 500 a 1000 veces más rápida que con tripsina, por lo que ha sido descartado que esta proteinasa actúe durante el recambio fisiológico de colágena en la matrix extracelular.⁶³

En el útero de rata en involución, particularmente, se han observado macrófagos que contienen vacuolas citoplásmicas llenas de fragmentos de fibras de colágena (identificados por el bandeo característico), en las que se comprobó actividad de fosfatasa, de lo cual fue atribuido a las hidrolasas ácidas un papel activo en la reabsorción de colágena.¹⁰³

Adicionalmente, en las enzimas lisosomales catepsina B1 y catepsina colagenolítica se ha identificado la propiedad de atacar colágena nativa soluble e insoluble (polimérica) a un pH ácido de 3.5, que sigue un patrón sinérgico cuando las dos enzimas integran la muestra de ensayo.¹⁰¹

De éstos y de otros datos se ha elaborado una vía alternativa de degradación de colágena, intracelular, que involucra fagocitosis y digestión por enzimas lisosomales. Sin embargo, ha sido puntualizada la necesidad de degradación extracelular parcial de las fibras de colágena, que produzca fragmentos de un tamaño adecuado que puedan ser ingeridos por las células. (Figura 10.) Por otra parte, se ha sugerido que moléculas de procología pueden ser digeridas intracelularmente antes de que sean secretadas de la célula.¹⁰⁴

La degradación específica de la colágena por las colagenasas intersticiales depende de un conjunto de características que aún no son plenamente identificadas, pero que aparentemente están centradas en la molécula de colágena. Las peculiaridades de la región susceptible a colagenasa son: i. una secuencia aminoácida mínima Gly-[Ile o Leu]-[Ala o Leu],⁶² ii. una baja estabilidad helicoidal como consecuencia de un reducido número de iminoácidos,¹⁰² y posiblemente iii. la adopción de una estructura secundaria específica distinta de la triple hélice.⁶²

Las colagenasas intersticiales atacan únicamente los tipos de colágena I, II, III, VII y X, aunque también muestran actividad sobre las gelatinas. Varios tipos de colágena son degradados por diferentes miembros de la familia del gene de la colagenasa, que también muestran actividad sobre otros componentes de la matriz. Además, las colágenas con dominios no triple helicoidales pueden ser degradadas por proteasas inespecíficas.^{43,53,63} (Tabla 4.)

En breve, el catabolismo de la colágena o colagenólisis es regulado en múltiples etapas desde la transcripción de mRNA colagenasa hasta la inhibición de la enzima activa en el tejido. Estas incluyen: i. biosíntesis de procología (incluyendo inducción y procesamiento de las formas precursoras), ii. empaquetamiento y secreción de procología, iii. activación del simógeno, iv. interacciones colágena-colagenasa, y v. inhibición de colagenasa.

Cualquier desequilibrio en la regulación de alguna de estas etapas puede proyectarse como una alteración patológica del tejido conectivo.^{40,58}

Con una visión pragmática Woolley (1984) señala que "...debido a las variaciones en la química de las colagenasas de vertebrados, no es posible usar un sólo método de purificación para todas las enzimas."⁴¹

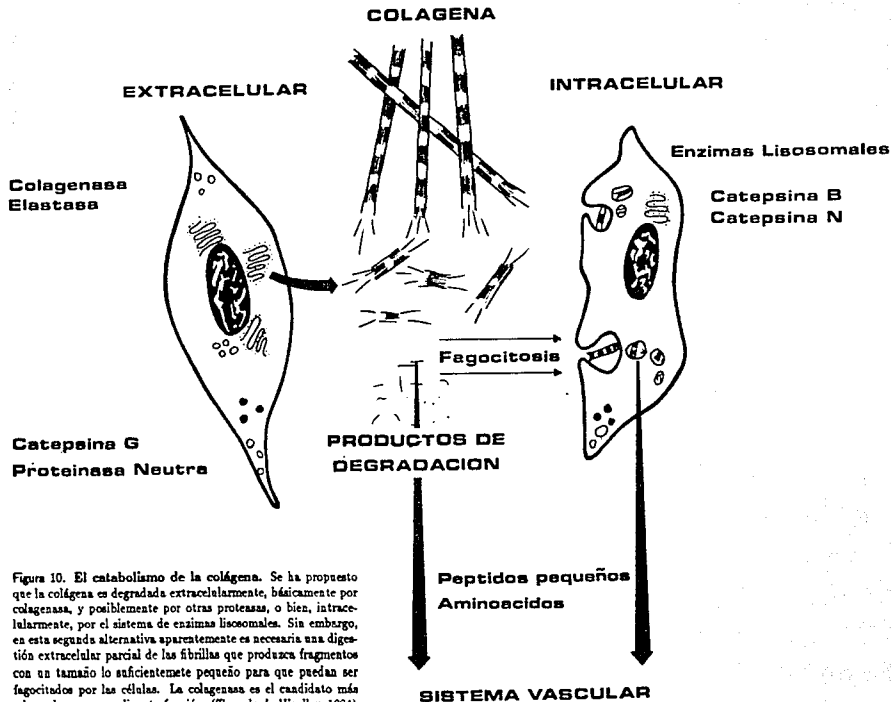


Figura 10. El catabolismo de la colágena. Se ha propuesto que la colágena es degradada extracelularmente, básicamente por colagenasa, y posiblemente por otras proteasas, o bien, intracelularmente, por el sistema de enzimas lisosomales. Sin embargo, en esta segunda alternativa aparentemente es necesaria una digestión extracelular parcial de las fibrillas que produzca fragmentos con un tamaño lo suficientemente pequeño para que puedan ser fagocitados por las células. La colagenasa es el candidato más adecuado para cumplir esta función. (Tomado de Woolley, 1984)

TABLA 4. NOMENCLATURA Y SUSTRATOS NATURALES DE LAS METALOPROTEINAS DE LA MATRIZ*

Grupos	Nombres de las enzimas	Masa molecular, KDa	Sustratos de la enzima
I	Colagenasa intersticial MMP-1 (EC 3.4.24.7) Colagenasa de vertebrados Colagenasa de fibroblastos	52 Deducida (57)/52 Latente (45)/42 Activa 24 Modificada	Colagenasa de los tipos I, II, III, VII, X Gelatinas
	Colagenasa de neutrófilos MMP-8	53 Deducida 55 Latente 65 Activa	Colagenasa I, II, III
II	Gelatinasa de 72 KDa MMP-2 Colagenasa tipo IV	72 Deducida 72 Latente 66 Activa	Gelatina tipo I Colagenasa IV, V, VII, X Fibronectina, elastina
	Gelatinasa de 92 KDa MMP-9 Colagenasa tipo V	90 Deducida 92 Secretada 84 Activa	Gelatinas I, V Colagenasa IV, V
III	Estromeliaina MMP-3 (EC 3.4.24.17) Tripsina Proteoglicanasa Activador de procollagenasa Proteína activadora de colagenasa	52 Deducida (60)/57 Secretada (50)/48 Activa 28 Activa	Proteoglicano, proteína de unión Fibronectina, laminina Gelatinas I, III, IV, V Colagenasa III, IV, V, IX Péptido de procollagenasa Activa procollagenasa Débil digestión de elastina
	Estromeliaina-2 MMP-10 Tripsina-2	53 Deducida 53 Secretada 47 Activa 25 Activa	Gelatinas I, III, IV, V Débil sobre colagenasa III, IV y V Activa procollagenasa Fibronectina
	Metaloproteinasa uterina MMP-7 Pump-1	28 Deducida 28 Secretada (21)/19 Activa	Gelatinas I, III, IV, V Proteoglicano Fibronectina Activa procollagenasa

*Esta tabla presenta los nombres recomendados para las enzimas y sus isoenzimas. Los pesos moleculares corresponden al deducido a partir del DNA (en el péptido señal), o la forma secretada (variable glicosilada) y la forma activa (o forma). Las formas más abundantes están entre paréntesis. (Tomada de Woessner, Jr., 1991)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La implantación del blastocisto en un evento biológico fundamental para la perpetuación de los euterios sobre la Tierra. A pesar de su trascendencia, el conocimiento sobre el conjunto de fenómenos que convergen promoviendo la interacción íntima entre el concepto y el útero es fragmentario. Una de las etapas en las que se acentúa la escases de información es en la de invasión: se desconoce como es inducida, los recursos moleculares que permiten al concepto incrustarse en el endometrio, y el control al que está sometida para que ocurra exclusivamente en un intervalo de tiempo definido, por mencionar los más evidentes... La carencia de datos sobre la invasión blastocística en el humano es sorprendentemente notoria.

Es un lugar común atribuir a proteinasas un papel esencial durante la invasión.^{2,8,9,10,11,12} Las enzimas proteolíticas con capacidad de disolver a las membranas basales son secretadas aparentemente por células citotrofobásticas.¹⁰ Sin embargo, no se han identificado especies moleculares ni se ha elaborado un esquema que explique cómo estas enzimas logran digerir los elementos de la matriz extracelular del endometrio.

También es una tradición comparar a la metástasis cancerosa con la fase invasiva de la implantación.^{2,8,12} La comparación es justificada: ambos fenómenos manifiestan una proliferación celular intensa y migración activa de sus células dentro de los tejidos adyacentes. Por supuesto, la invasión de las células cancerosas es incontrolable.

Algunas células tumorales metastásicas producen colagenasas⁴⁸ que se supone son utilizadas durante la invasión, cuando las células deben atravesar la membrana basal que limita el estroma de un tejido, los componentes estructurales del estroma, y la membrana basal de la pared de los vasos sanguíneos durante la intravasación-extravasación.^{105,106,107}

En este trabajo se estudia el mecanismo molecular que utiliza el trofoblasto humano para penetrar la pared uterina. Se propone que la fase invasiva de la implantación placentaria depende de la capacidad del trofoblasto para degradar los componentes de la matriz extracelular del endometrio mediante la síntesis de proteasas específicas.

OBJETIVO

Identificar y aislar proteínas con actividad colagenolítica asociadas al trofoblasto, utilizando tejidos placentarios humanos.

Materiales y métodos

HOMOGENADOS DE PLACENTA

Se utilizaron cuatro placentas humanas normales a término que se colectaron en el Instituto Nacional de Perinatología. De las placentas se separaron las vellosidades coriónicas que se desmenuzaron en fragmentos de aproximadamente 0.5 cm³. Cien gramos de fragmentos de vellosidades se sumergieron en 250 ml de Solución Salina Balanceada de Hank (HBSS) con agitación suave durante 5 minutos. La suspensión se centrifugó a 1 000 g durante 5 minutos a 4 °C; el sobrenadante se desechó. Este procedimiento de lavado se realizó diez veces con cada muestra. Los fragmentos se homogeneizaron en HBSS con un Polytron. El homogenado se centrifugó a 2 500 g durante 30 minutos a 4 °C; el sobrenadante se le denominó *primer sobrenadante de homogenado*. La homogeneización y centrifugación se repitió en dos ocasiones más (en las mismas condiciones) con el precipitado, por lo que en total se obtuvieron tres sobrenadantes de homogenados. En cada sobrenadante de homogenado se hizo la determinación de actividad colagenolítica por el método de Terato y Nagai.¹⁰⁴

Fraccionamiento de homogenados de placenta

El fraccionamiento se hizo a partir del primer sobrenadante de homogenado que se centrifugó a 7 500 g durante 1 h. El sobrenadante obtenido se dializó contra un amortiguador de Tris 0.05 M pH 7.4 con CaCl₂ 0.005 M, NaCl 0.15 M y NaN₃ 0.02% (amortiguador de Tris-HCl pH 7.4). El sobrenadante dializado fue precipitado por salado con sulfato de amonio al 20% y 60% de saturación. Los precipitados se colectaron por centrifugación a 2 500 g durante 30 minutos, se solubilizaron en el amortiguador de Tris-HCl pH 7.4 y se examinaron para detección de actividad colagenolítica por los métodos de Terato y Nagai¹⁰⁴ y por el de actividad sobre un péptido sintético.¹⁰⁹

Activación con isotiocianato de sodio

Las fracciones del sobrenadante de homogenado al 20% y 60% de saturación se dializaron contra isotiocianato de sodio 3 M en el amortiguador de Tris-HCl pH 7.4, y

luego se dializaron contra el mismo amortiguador sin isotiocianato de sodio. También con estas muestras se realizó determinación de actividad colagenolítica.

EXTRACTOS DE CELULAS AISLADAS DE PLACENTA

El aislamiento de células trofoblásticas se realizó con algunas modificaciones al método de Cotte.¹¹⁰ De once placentas humanas normales de segundo y tercer trimestre un fragmento de vellosidades coriónicas de 10 g se cortó en trocitos de 1-2 mm³ que se lavaron exhaustivamente con HBSS. Los fragmentos se colocaron en frascos de tripsinización (constituidos por cuatro paredes con superficies planas) que contenían tripsina disuelta en HBSS al 0.0625%, con agitación durante 45 min a temperatura ambiente. El tripsinado se hizo pasar a través de cuatro capas de gasa y el líquido filtrado se centrifugó en tubos cónicos de centrifuga a 1000 g durante 5 min. El sobrenadante se descartó y el botón celular se resuspendió en HBSS y de nuevo se centrifugó; este proceso se llevó a cabo en dos ocasiones más. El tejido que no atravesó la gasa se colocó de nuevo en tripsina durante 1 h y se sometió a los procedimientos descritos. Los botones celulares obtenidos de la primera y segunda tripsinizaciones se reunieron y se solubilizaron en HBSS.

Las células obtenidas se examinaron por microscopía óptica para valorar el rendimiento, la pureza y la viabilidad (a través de la exclusión del colorante azul de tripán).

También se exploró la presencia de actividad colagenolítica en las células intactas y en extractos de ellas que se obtuvieron colocando células en Tritón X-100 al 0.1% en el amortiguador de Tris-HCl pH 7.4, durante 2 min, a temperatura ambiente. El ensayo de actividad colagenolítica se realizó por el método de Terato y Nagai¹⁰⁸ con alícuotas de 20 µl que contenían una muestra equivalente a 1000 - 10 000 células.

Ruptura de las células aisladas de placenta por congelamiento-descongelamiento

Un método alternativo para la ruptura de las células trofoblásticas purificadas fue el congelamiento y descongelamiento repetidos en tres ocasiones del botón celular en HBSS. El congelamiento se consiguió sometiendo las células a -70 °C durante 10 min. Los lisados celulares se centrifugaron a 10 000 g por 5 min; el sobrenadante se filtró con una membrana millipore de 0.22 µm mientras que el precipitado se resuspendió

en el amortiguador de Tris-HCl pH 7.4. Tanto el precipitado solubilizado como el sobrenadante filtrado se evaluaron para determinación de actividad colagenolítica. En esta serie de ensayos se utilizaron como controles el precipitado y el sobrenadante obtenidos por congelamiento-descongelamiento disueltos en Tritón X-100 al 0.1% en el amortiguador de Tris-HCl pH 7.4.

La determinación de la cantidad de proteínas en los diferentes homogenados, fracciones y extractos de células aisladas de placenta se realizó por el método de Bradford.¹¹¹

ENSAYOS ENZIMATICOS

Para efectuar las determinaciones de actividad colagenolítica se utilizaron dos procedimientos:

ACTIVIDAD SOBRE COLÁGENA RADIACTIVA

El método de Terato y Nagai¹⁰⁸ utiliza como sustrato colágena con marca radiactiva. Para obtener el sustrato se purificó colágena Tipo I de placenta humana a término con el método de Miller¹¹², que utiliza pepsina para su extracción y ácido acético 0.5 M para la solubilización, seguida por numerosas precipitaciones con sales. La acetilación de la colágena se hizo por medio de la técnica de Lefevre *et al*¹¹³, que consiste en agregar anhídrido acético tritiado (³H) a una razón de 25 mCi/200 mg de colágena en medio alcalino y eliminar la marca que no se pega por diálisis exhaustiva contra agua. La actividad específica de la colágena acetilada fue de 250 000 dpm por mg de proteína.

El método de Terato y Nagai consiste en incubar 20 µg del sustrato acetilado con la enzima o fracción en el amortiguador de Tris-HCl pH 7.4 a 30 °C por 20-24 h o a temperatura ambiente durante 48 h. La reacción se para agregando ácido etilendiaminotetracético (EDTA), un inhibidor de metaloproteasas, de tal modo que se obtenga una concentración final de 80 mM. Posteriormente la muestra se precipita (1:1 V/V) con una mezcla de dioxano-metanol (4:1 V/V) fría y se centrifuga a 10 000 g por 10 minutos; después el sobrenadante se mezcla con 5 ml Bray y se pasa a un contador de centelleo (figura 11). En este ensayo se aprovecha que los fragmentos producidos por la acción de la enzima permanecen solubles, en cambio la colágena intacta precipita en la mezcla de dioxano. La actividad se calcula restando las cuentas liberadas en los tubos

Actividad Colagenolítica (Terato-Nagai)

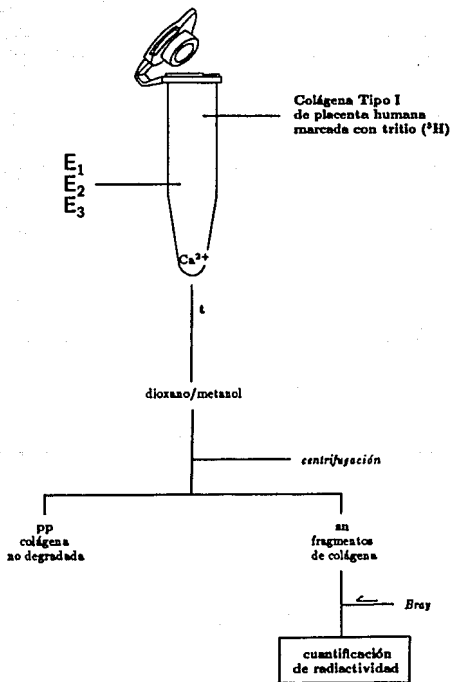


Figura 11

que contenían EDTA desde el inicio del ensayo de las cuentas liberadas en los tubos sin EDTA. En las incubaciones se utilizaron controles que contenían alguno de los siguientes inhibidores: N- etilmaleimida (NEM, 2 mM), inhibidor de tiol proteasas; fluoruro fenil metilsulfonilo (PMSF, 1 mM), inhibidor de proteasas de serina; inhibidor de tripsina de frijol de soya (SBTI, 1 mg/ml). Para determinar el máximo de colágena degradable bajo las condiciones del ensayo se emplearon 50 μ g de colagenasa de *Clostridium histolyticum* en amortiguador de Tris-HCl pH 7.4 a 30 °C.

Cuando se ensayaron para determinación de actividad colagenolítica los sobrenadantes de los homogenados de vellosidades placentarias y las fracciones de los sobrenadantes de los homogenados, en las incubaciones se emplearon activadores de la colagenasa como el acetato 4-aminofenilmercuríco (APMA, 1 mM), p-hidroximercuribenzoato (PHMB, 1mM) y tripsina (1:10 y 1:100 en relación a la proteína en el homogenado).

Todas las determinaciones de actividad colagenolítica fueron hechas empleando este método, en ensayos por duplicado, al menos que otra cosa sea indicada. Los resultados se expresan como unidades de colagenasa, donde una unidad (U) representa la cantidad de enzima necesaria para degradar 1 μ g de colágena por minuto a 30 °C.

ACTIVIDAD SOBRE UN PÉPTIDO SINTÉTICO

El DPN-III es un péptido sintético con la secuencia DPN-Pro-Gli-Gli-Ile-Ala-Gli-Gli-D-Arg-OH; como puede observarse, contiene la unión Gli-Ile que es el sitio de corte de la colagenasa que degrada a la colágena Tipo I.

El péptido se disolvió a una concentración de 5×10^{-4} M en un amortiguador de Tris 0.05 M pH 7.4 con CaCl₂ 0.005 M, NaCl 0.15 M y albúmina 0.2%. La incubación con la muestra se hizo por espacio de 24 h a 37 °C y la reacción se paró con HCl 1.0 M. Los fragmentos cortos que contienen el DPN-III se extrajeron con una mezcla de acetato de etilo-butanol (1:0.15 V/V), que después se centrifugó a 3000 g durante 15 minutos, y la fase orgánica se leyó a 365 nm. El coeficiente de extinción molar del compuesto es de 1.22. Las incubaciones realizadas incluyeron siempre tubos controles con EDTA 80 mM (concentración final) al inicio del experimento. La actividad inhibible con EDTA se expresa como porcentaje del péptido degradado.¹⁰⁹

PURIFICACION DE LA COLAGENASA DE TROFOBLASTO

A partir de extractos de células aisladas de trofoblasto rotas con Tritón X-100 y con actividad colagenolítica se estableció una estrategia de purificación de la enzima que consistió de dos pasos cromatográficos: una columna de afinidad seguida por una columna de intercambio iónico.

Cromatografía de afinidad

El primer paso en la purificación de la enzima con actividad colagenolítica consistió en pasar los extractos de células aisladas de trofoblasto a través de una columna de Sepharosa-Colágena.

El procedimiento para la obtención de la resina acoplada con colágena se ejecutó con algunas modificaciones a las recomendaciones del fabricante (Pharmacia Fine Chemicals). Una cantidad de la resina Sepharosa 4B activada con CNBr (7.88 g para rendir un volumen aproximado de 30 ml) se colocó en HCl 1 mM por 15 min; luego se lavó en 7 ocasiones con la misma solución. El gel de Sepharosa se lavó una vez con un amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M pH 7.4 (amortiguador de acoplamiento), que se utilizó también para formar una suspensión con la resina. Este gel de Sepharosa activada se combinó con 200 mg de colágena Tipo I de tendón de cola de rata disuelta en amortiguador de acoplamiento, con agitación suave a 4 °C toda la noche. Los grupos activos libres se bloquearon transfiriendo la resina de Sepharosa-Colágena en un amortiguador Tris 0.2 M pH 8.0 durante 16 h. El exceso de proteína adsorbida se eliminó por medio de lavados con amortiguador de acoplamiento seguido de amortiguador de acetato de sodio 0.1 M pH 4.0 con NaCl 0.5 M y de amortiguador Tris 0.05 M pH 7.4 con NaCl 0.15 M. La resina de Sepharosa-Colágena se almacenó a 4 °C en amortiguador Tris 0.05 M pH 7.4 con NaCl 0.15 M hasta que se utilizó.

Los extractos de células aisladas de trofoblasto por ruptura con Tritón X-100 se filtraron a través de una membrana millipore de 0.22 μ m y se incubaron con la resina de Sepharosa-Colágena en Tris 0.05 M pH 7.4 con NaCl 0.15 M, con agitación suave a 4 °C toda la noche.

Al día siguiente la resina incubada con el extracto se empaquetó en una columna de 1.6 cm de diámetro en la que se hicieron circular 100 ml de un amortiguador de Tris 0.05 M pH 7.4 con NaCl 0.15 M a un flujo de 30 ml/h; el material unido a la resina se

depegó con un amortiguador de Tris 0.05 M pH 7.4 con NaCl 1.5 M aplicado a razón de 30 ml/hr, mientras que el eluido se colectó en fracciones de 1 ml. Las fracciones se agruparon de tres en tres y se realizaron determinaciones de la concentración de proteínas en cada grupo. Las fracciones con proteína se reunieron en una sola y se dializaron contra un amortiguador de Tris 0.05 M pH 7.4; la muestra dializada se examinó para actividad colagenolítica y se determinó su concentración de proteínas. El eluido que se obtuvo al circular los 100 ml del amortiguador de Tris 0.05 M pH 7.4 con NaCl 0.15 M se incubó por segunda ocasión con la resina de Sepharosa-Colágena y después se repitió todo el procedimiento anteriormente descrito.

Cromatografía de intercambio iónico

La muestra con actividad colagenolítica proveniente de la cromatografía de afinidad se introdujo en un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) equipado con una columna de intercambio iónico (TSK-DEAE 5PW), previamente equilibrada con un amortiguador de Tris 0.05 M pH 7.4. La elución del material que no interaccionó con la columna se realizó también con el amortiguador Tris 0.05 M pH 7.4 a un flujo de 0.5 ml/min. Para despegar el material que se unió a la columna se utilizó un gradiente de NaCl de 0 a 1.5 M al mismo flujo de 0.5 ml/min. Se colectaron fracciones de 1 ml que se analizaron para concentración de proteínas y actividad colagenolítica (figura 12).

La determinación de la concentración de proteínas en las muestras eluidas de la columna de afinidad y de la columna de intercambio iónico se hizo mediante el método de Groves et al¹⁴, que utiliza las lecturas espectrofotométricas con luz ultravioleta de las muestras a longitudes de onda de 224 nm y 233 nm, que se relacionan por medio de la siguiente expresión:

$$(\text{abs}_{224} - \text{abs}_{233}) (220) = \mu\text{g de proteína / ml}$$

Purificación de Colagenasa de Trofoblasto

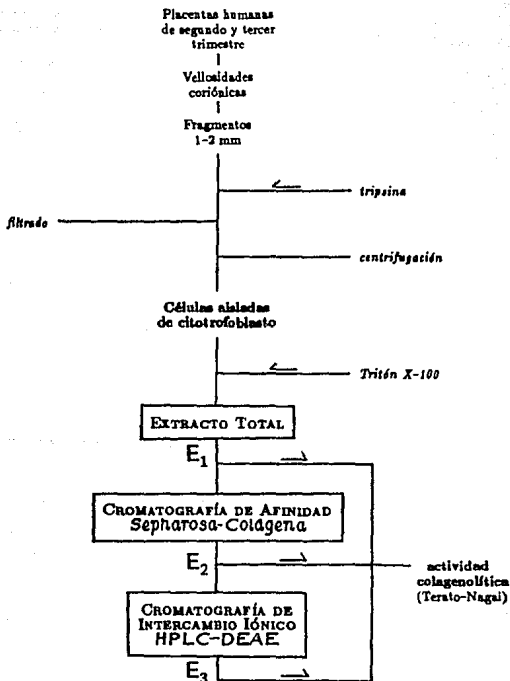


Figura 12

Electroforesis con SDS sobre gel de poliacrilamida

El grado de pureza obtenido en cada una de las preparaciones de Extracto Total de Células, Sephatosa-Colágena y DEAE se siguió por electroforesis en un sistema ligeramente modificado al de Laemmli¹¹⁴ en geles de poliacrilamida al 15% con SDS. Las muestras se dialisaron durante 1 h contra el amortiguador de cámaras diluido 1:10 y después se desnaturalizaron a 100° C por 2 min en presencia del amortiguador de la muestra que contenía azul de bromofenol como indicador; posteriormente las muestras se aplicaron en geles bifásicos, esto es, con una zona concentradora al 3% de poliacrilamida y otra separadora al 15%. Se corrieron entre 0.05 y 50 μ g de proteína por carril. En ocasiones se agregó al sistema mercaptoetanol.

De manera simultánea se corrieron patrones de peso molecular que incluyeron albúmina sérica bovina, ovoalbúmina, pepsinógeno, tripsinógeno, β -lactoglobulina y lisozima. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie o con plata.^{116,117}

Elución de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida

Un gel dividido verticalmente en dos partes con carriles equivalentes para las preparaciones de Extracto Total, Sephatosa-Colágena y DEAE fue corrido normalmente. Al término de la electroforesis el gel se separó en dos secciones siguiendo la línea divisoria virtual original. Una mitad fue teñida con plata mientras que la otra se introdujo en Tritón X-100 al 2.5% en amortiguador de Tris-HCl pH 7.4 durante 1 h (en la que ocurrieron dos cambios con la misma solución) a temperatura ambiente.⁹⁰ Siguiendo el patrón electroforético desarrollado en la mitad de gel teñida con plata se seccionó la mitad de gel no teñida de abajo hacia arriba en siete fragmentos (21 fragmentos en total), que se trituraron en el amortiguador de Tris-HCl pH 7.4 y se dejaron en éste toda la noche. Al día siguiente se tomó una alícuota del líquido en cada preparación de fragmento siendo examinada para actividad colagenolítica.

Resultados

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA EN EXTRACTOS DE CELULAS DE CITOTROFBLASTO

La homogeneización es un procedimiento que a través de interacciones mecánicas logra la fragmentación de los componentes que integran a un tejido —células y elementos de la matriz—, modificando las relaciones naturales de éstos y permitiendo que afloren los constituyentes intracelulares. La obtención de sobrenadantes de homogenados de vellosidades placentarias, sin embargo, no aportó evidencias sobre la manifestación de actividad colagenolítica en el tejido: el primero, segundo y tercer sobrenadantes de homogenados de placenta tuvieron actividad colagenolítica nula.

Las fracciones de sobrenadantes de homogenados de placenta obtenidas por precipitación con sulfato de amonio al 20 y 60% de saturación tampoco mostraron actividad colagenolítica cuando se utilizó el método de Terato y Nagai para su evaluación. Ante la posibilidad de que la actividad colagenolítica estuviera oculta debido a que la enzima se encontrara como un precursor o porque estuviera interactuando con un inhibidor se emplearon la proteasa tripsina y los compuestos organomercuriales APMA y PHMB para revelar la actividad. Una vez más no hubo éxito. Por otra parte, cuando las fracciones de sobrenadantes de homogenados al 20 y 60% de saturación fueron examinadas para actividad enzimática utilizando como sustrato el péptido DPN-III se obtuvo aproximadamente el 100% de degradación en las dos fracciones (0.019 y 0.018 μg de péptido degradados / mg de proteína en un minuto, respectivamente).

Al observar que existía degradación del péptido DPN-III por las fracciones de los sobrenadantes de homogenados se especuló que la enzima estaría inhibida por la proteína sérica α_2 -macroglobulina, de tal modo que era necesario anular al inhibidor para revelar la actividad colagenolítica. Por esta razón las fracciones de sobrenadantes de homogenados se incubaron con el agente caotrópico isotiocianato de sodio, pero después del tratamiento ni la fracción de los sobrenadantes de homogenados al 20% de saturación ni la fracción al 60% exhibieron resultados positivos.

Puesto que utilizando los sobrenadantes de homogenados de placenta fue imposible

demostrar actividad colagenolítica, y dado que los resultados positivos de degradación del péptido DPN-III sugerían que la enzima estaba presente pero unida a α_2 -macroglobulina, se planteó que debido a que la placenta es un órgano extraordinariamente irrigado era posible que aún después de lavados con HBSS los fragmentos de vellosidades coriónicas que se ocupaban para llevar a cabo los homogenados estaban contaminados con sangre, de tal modo que durante el proceso de homogeneización la enzima establecía contacto con los inhibidores séricos, inactivándose, por lo cual no se registraba actividad colagenolítica.

Una segunda estrategia para demostrar actividad colagenolítica en el tejido trofoblástico fue la de purificar células y luego practicar los ensayos enzimáticos. Con el método utilizado, se obtuvieron células con características morfológicas de citotrofoblasto (figura 13), con una pureza y una viabilidad del 90%. La cantidad de células que se colectó de placentas a término fue de 80 000 células/g de tejido. El rendimiento en el número de células fue el doble cuando se utilizaron placentas de segundo trimestre.

En la tabla 5 se muestra que las células de citotrofoblasto enteras sí exhibieron actividad colagenolítica ($0.235 \pm 0.09 \mu\text{g}$ de colágena/ 10^3 células) pero ésta se hizo más aparente cuando las células fueron tratadas con Tritón X-100 ($1.196 \pm 0.60 \mu\text{g}$ de colágena/ 10^3 células). La actividad colagenolítica fue completamente inhibida con EDTA ($0.050 \pm 0.001 \mu\text{g}$ de colágena/ 10^3 células) pero en ningún caso con los otros inhibidores de proteasas.

Como he señalado, en las células rotas con Tritón X-100 la actividad colagenolítica fue más evidente; no obstante, aún no se conocía con certeza la localización celular de la enzima. El Tritón X-100 es un detergente neutro que solubiliza las membranas celulares alterando las asociaciones hidrofóbicas y destruyendo la bicapa. Al mezclarlo con la membrana, el extremo hidrofóbico del tritón se fija a las regiones hidrofóbicas de la parte exterior de las proteínas de membrana, desplazando con ello a las moléculas lipídicas. Puesto que el otro extremo de la molécula de detergente es polar, esta unión tiende a disolver las proteínas de membrana en forma de complejos detergente-proteína. De tal modo que la enzima con actividad colagenolítica bien podría formar parte de la membrana de las células citotrofoblásticas siendo únicamente solubilizada por el tritón o tener un origen citoplásmico logrando manifestar su actividad al alcanzar el exterior (en este caso el sustrato radiactivo) por la ruptura del plasmalema. De aquí

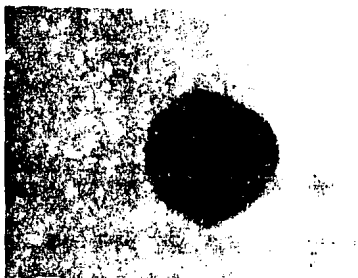


Figura 13. Célula de citotrofolasto humano. Por tripsinización de fragmentos de vellosidades coriónicas de placentas humanas de segundo y tercer trimestre, se aislaron células de citotrofolasto que fueron utilizadas para obtener extractos con actividad colagenolítica.

TABLA 5

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA EN CELULAS DE CITOTROFOBLASTO

MUESTRA	MICROGRAMOS DE COLAGENA DEGRADADA POR 1000 CELULAS
Células enteras	0.235 ± 0.09
Células rotas*	1.196 ± 0.60
Células rotas + EDTA	0.050 ± 0.001
Células rotas + NEM	1.216 ± 0.72
Células rotas + PMSF	1.170 ± 0.53
Células rotas + SBTI	1.070 ± 0.55

*Se utilizó Tritón X-100 al 0.1%

EDTA: ácido etilendiaminetetracético (80mM). Inhibidor de metaloproteasas.

NEM: N-etilmaleimida (2mM). Inhibidor de tiol-proteasas.

PMSF: Fluoruro fenil metilsulfonilo (1 mM). Inhibidor de proteasas de serina.

SBTI: Inhibidor de tripsina de frijol de soya (1 mg/ml).

que se aplicara un método de ruptura como el de congelamiento-descongelamiento, en el que no se disuelve la membrana, para conocer si la enzima se almacena en el citoplasma o forma parte de la estructura de la membrana. (Tabla 6)

La ruptura de las células de citotrofoblasto por congelamiento-descongelamiento produjo actividad colagenolítica de tan solo 41.2% de la que se obtuvo con tritón; de esa actividad aproximadamente el 67% se encontró en la fracción soluble del extracto, mientras que el 8% apareció en la fracción con los fragmentos de membrana.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA COLAGENASA DE TROFOBLASTO

Una vez demostrada la presencia de actividad colagenolítica en las células de citotrofoblasto, los extractos obtenidos a partir de la ruptura celular con Tritón X-100, que representan la fuente con mayor actividad enzimática (Tabla 5), fueron cromatografiados a través de una columna de afinidad de Sepharosa-Colágena, con el propósito de que al presentarle su sustrato —colágena— a la enzima, ésta fuera retenida en la columna por unión específica con el ligando, en tanto que el material contaminante sería excluido sin interactuar con la matriz de Sepharosa-Colágena. La figura 14 muestra el perfil cromatográfico del material eluido de la columna después de la aplicación de un choque iónico con NaCl 1.5 M para despegar las moléculas o compuestos que se adsorbieron a la matriz. La proteína disociada se distribuyó principalmente entre las fracciones 12 a 33, que fueron agrupadas y dializadas contra un amortiguador sin NaCl ya que en el siguiente paso de purificación se emplearía un gradiente de NaCl que partiría de una concentración igual a cero para separar el material unido a una matriz de DEAE. Todas las muestras que fueron purificadas por cromatografía de afinidad exhibieron actividad colagenolítica. El material que eluyó con el amortiguador de Tris 0.05 M pH 7.4 con NaCl 0.15 M y que fue cromatografiado por segunda ocasión a través de la matriz de Sepharosa-Colágena no exhibió actividad colagenolítica (datos no mostrados).

La inspección de la purificación del extracto se llevó a cabo mediante del examen visual en geles de poliacrilamida con SDS de las muestras con actividad obtenidas en cada etapa. Utilizando esta técnica, el extracto crudo de citotrofoblasto manifestó múltiples bandas con muy diversos pesos moleculares: sin embargo, la muestra purificada por cromatografía en Sepharosa-Colágena únicamente exhibió siete bandas (figura

TABLA 6

ORIGEN DE LA ACTIVIDAD COLAGENOLITICA EN CITOTROFOBLASTO

RUPTURA CELULAR	ACTIVIDAD ESPECÍFICA*
Tritón	0.119
Congelamiento-descongelamiento**	0.049
<i>Precipitado</i>	0.004
<i>Sobrenadante</i>	0.033
<i>Precipitado + tritón</i>	0.000
<i>Sobrenadante + tritón</i>	0.024

*Microgramos de colágena degradados por un miligramo de proteína /minuto/30 °C.

**Después de la ruptura por congelamiento-descongelamiento se centrifugó a 10 000 g como es descrito en Materiales y Métodos.

CROMATOGRAFIA EN SEPHAROSA-COLAGENA

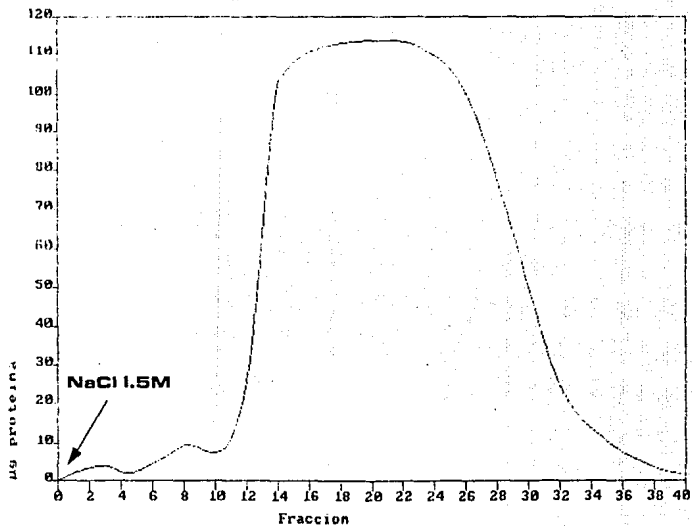


Figura 14

16). Puesto que la pureza lograda durante la cromatografía de afinidad no fue satisfactoria, fue necesario emplear un procedimiento de purificación adicional.

Las muestras con actividad provenientes de la cromatografía en Sepharosa-Colágena fueron introducidas en una columna de intercambio aniónico (DEAF), en la que se aplicó un gradiente de NaCl de 0 a 1.5 M. La actividad colagenolítica apareció como dos picos: el primero estuvo localizado en la fracción 16 con una actividad de 11.86% mientras que el segundo, el pico principal, tuvo un despliegue que inició en la fracción 21 y se extendió hasta la fracción 33, con actividad máxima de 57.37% en la fracción 21 que eluyó con 0.95 M de NaCl. (Figura 15.) Las fracciones 21 a 26 fueron reunidas para constituir la muestra de DEAE.

Por SDS-PAGE de la muestra de DEAE se observó una sola banda que migró a una posición de 40 KDa (figura 16). Para confirmar que esta banda era de la enzima con actividad se eluyó la proteína de un gel que fue corrido electroforéticamente en forma similar a como se hizo con los geles que se utilizaron para tinción, pero sin fijar ni teñir, y sí enjuagado con Tritón X-100 (que desplaza al SDS que de otra manera mantendría desnaturalizada a la proteína).

Cómo se aprecia claramente en la figura 17, el material eluido de la sección de gel siete, que comprendía una zona en la que debería estar localizada una banda de proteína equivalente a la que apareció en el carril con la muestra de DEAE del gel teñido, exhibió la mas alta actividad colagenolítica en comparación con el material de las seis zonas restantes, en los tres carriles con las distintas etapas de purificación, alcanzando en el carril de DEAE una actividad de 100%.

En la tabla 7 se resumen los datos sobre la purificación de la colagenasa de citotrofoblasto. La actividad específica de la muestra de extracto crudo de células fue de 0.005 u. que aumentó 37.6 veces (0.188 u) después de la cromatografía en Sepharosa-Colágena, hasta incrementar 20640 veces (103.2 u) luego de la cromatografía en DEAE.

CROMATOGRAFIA EN DEAE

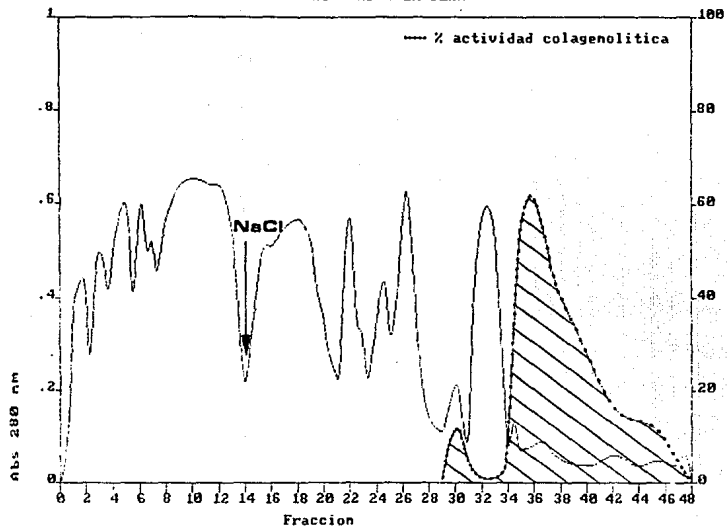


Figura 15



Figura 16. Electroforesis en gel de los extractos con actividad colagenolítica en diferentes etapas de purificación. En un gel de poliacrilamida al 15% con SDS se corrieron 1) marcadores de peso molecular, 2) extracto total, 3) extracto purificado por cromatografía en Sepharosa-Colágena, y 4) extracto purificado por cromatografía en DEAE. En el carril 4 se observa una sola banda con un peso molecular aproximado de 40 KDa.

ELUCION DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

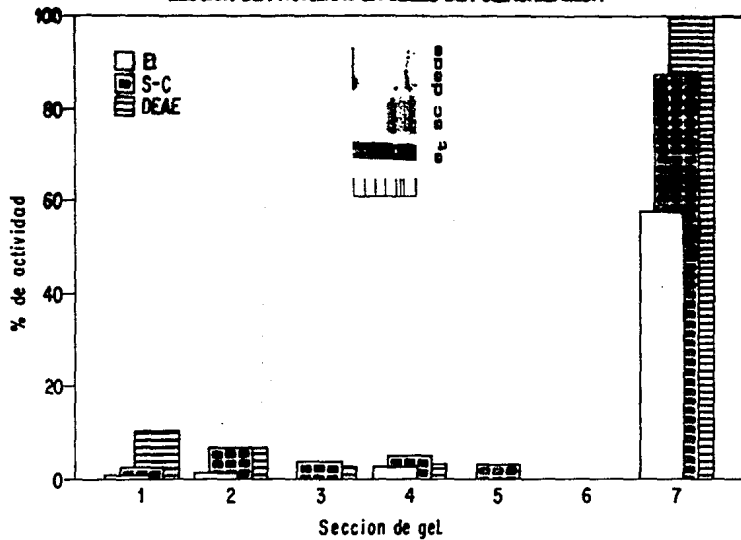


Figura 17

ELUCION DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

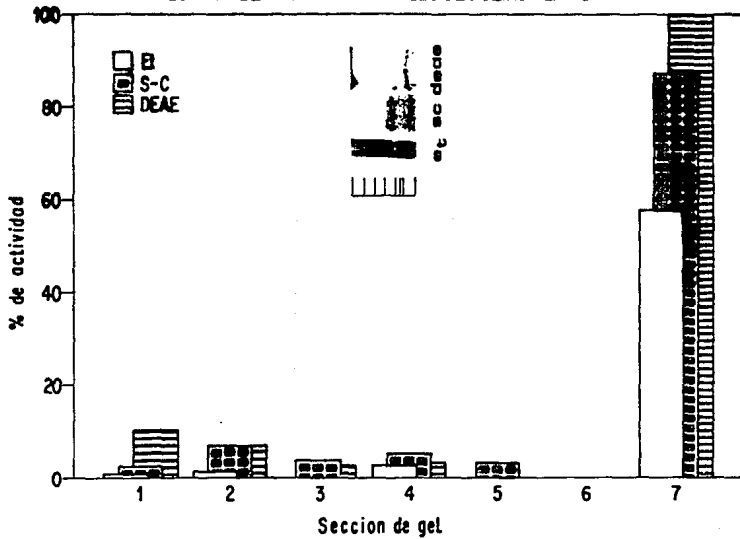


Figura 17

TABLA 7

PURIFICACION DE LA COLAGENASA DE CITOTROFOBLASTO

ETAPA	PROTEINA (mg)	UNIDADES TOTALES*	ACTIVIDAD ESPECIFICA**	CRITERIO DE PUREZA	RENDIMIENTO %
Extracto de Células	25.68	0.128	0.005	1	100
Sepharosa Colágena	0.2772	0.052	0.188	37.6	40.6
DEAE	0.00264	0.381	103.2	20640	297.7

*Una unidad de colagenasa es la cantidad de enzima necesaria para degradar un microgramo de colágena/minuto/25 °C.

**Microgramos de colágena degradados por un miligramo de proteína en un minuto.

Discusión

EN este trabajo se presentaron evidencias de que el trofoblasto humano de placentas de segundo y tercer trimestres tiene una enzima con actividad colagenolítica que comparte las características de las colagenasas de vertebrados, ya que degrada colágena a temperatura y pH fisiológicos, y es inhibible por EDTA. La enzima aparentemente se localiza en el interior de células de citotrofoblasto. Utilizando extractos de estas células, la enzima fue purificada a homogeneidad como una sola banda de 40 KDa en geles de SDS-poliacrilamida. El esquema de purificación consistió de dos pasos: cromatografía de afinidad en Sepharosa-Colágena y cromatografía de intercambio iónico en DEAE utilizando un equipo de HPLC.

La colagenasa purificada de células de citotrofoblasto es una colagenasa que está asociada con la degradación de los tipos intersticiales de colágena, ya que para detectar su actividad se utilizó colágena tipo I marcada radiactivamente.

Como en el caso de la colagenasa de leucocitos neutrófilos polimorfonucleares humanos, que se almacena en los gránulos específicos⁴⁶, la colagenasa de citotrofoblasto se acumula en el interior de las células como pudo deducirse del incremento de 5 veces en la actividad colagenolítica después de que las células aisladas fueron lisadas con Tritón X-100. En un intento por establecer una localización más precisa de la enzima y descartar la posibilidad de que ésta se encontrara distribuida en la superficie del citotrofoblasto asociada a la membrana plasmática, se empleó un método de ruptura celular que no utiliza detergentes ni disuelve la membrana plasmática, sino que solamente realiza grietas a través de ésta permitiendo que los fragmentos de membrana o dominios se separen y el contenido celular sea liberado. Con el método de congelamiento-descongelamiento se pudo observar que la mayor parte de la actividad colagenolítica (67%) estuvo asociada a la fracción soluble del extracto. Sin embargo, debido a que al exponer las células enteras ante colágena tritiada existió liberación de marca radiactiva, sería conveniente realizar un estudio histoquímico con anticuerpos anti-colagenasa acoplados a un indicador, para determinar el sitio exacto de residencia de la enzima. Es probable que la enzima se encuentre asociada a un organelo o gránulo específico, como en el caso de los

leucocitos polimorfonucleares humanos. Un anticuerpo monoclonal dirigido contra el sitio catalítico de una colagenasa que degrade los tipos intersticiales de colágena puede ser útil en esta empresa.

Qué significado fisiológico en el catabolismo de la colágena representa el hecho de que la colagenasa se encuentre albergada en el citoplasma de la célula o sea liberada al espacio extracelular sin almacenarse? La interpretación más sencilla radica en el tiempo que transcurre para la manifestación de la actividad colagenolítica. Cuando existe inducción de síntesis de colagenasa, a la expresión del RNA mensajero prosiguen la formación de la cadena polipeptídica, el procesamiento de las formas precursoras, el empaquetamiento, y finalmente, la secreción de procologenasa. En estudios *in vitro* se ha determinado que la colagenasa de fibroblastos sinoviales de conejo utiliza aproximadamente 50 minutos en llevar a cabo todas estas etapas.⁶³ En células que cuentan con una reserva de colagenasa almacenada en su citoplasma las etapas de síntesis del RNA mensajero, de ensamblaje de la cadena polipeptídica, el procesamiento de los precursores y el empaquetamiento, ocurrieron en un momento previo al de la inducción de la liberación de la enzima, por lo que el intervalo de tiempo entre la manifestación del estímulo y la secreción de la enzima al medio debe ser necesariamente más corto que en la inducción *de novo*. Hasta el momento se desconoce con qué propósito las células de citotrofoblasto de la placenta humana cuentan con un mecanismo de respuesta rápida de liberación de colagenasa.

Uno puede especular que la degradación enzimática de la colágena placentar y de otros componentes de la matriz extracelular llega a ser importante cerca del parto cuando la placenta debe separarse de la pared uterina.

La inspección de actividad colagenolítica en sobrenadantes de homogenados de ve-
llosidades placentarias y en fracciones de sobrenadantes de homogenados precipitadas con sulfato de amonio no tuvo éxito, aún cuando se emplearon los activadores APMA, PHMB o tripsina. Sin embargo, al utilizar el compuesto DPN-III, que es un derivado 2,4- dinitrophenyl de un octapeptido sintético basado sobre la secuencia aminoácida alrededor del sitio de división de la colágena y que contiene el enlace Gly-Ile, como sustrato de las fracciones de sobrenadantes de homogenados precipitadas con sulfato de amonio, se detectó actividad enzimática. Hori y Nagai han demostrado que la colagenasa en complejos con α_2 -macroglobulina aún tiene un sitio activo no enmas-

carado al que el péptido sintético DPN- III tiene acceso.¹¹⁶ Por lo tanto, suponiendo que en las fracciones de sobrenadantes de homogenados de vellosidades placentarias la actividad colagenolítica se encontraba inhibida por α_2 - macroglobulina, se utilizó el agente caotrópico isotiocianato de sodio para desestabilizar a esta proteína y revelar la actividad de degradación de colágena. A pesar de que se realizaron varios intentos de activación con el compuesto isotiocianato de sodio, no se encontró actividad colagenolítica. Es necesario efectuar un mayor número de experimentos de detección de actividad enzimática con el péptido DPN- III y de activación con agentes caotrópicos tales como el isotiocianato de sodio o el yoduro de sodio para determinar si en los homogenados de vellosidades placentarias existe actividad colagenolítica bloqueada por α_2 -macroglobulina.

Más tarde se pensó que las enzimas con actividad colagenolítica que probablemente estaban localizadas en las vellosidades placentarias podrían hacer contacto con la α_2 -macroglobulina (distribuida en restos de sangre) durante la ruptura del tejido por homogeneización. Tratando de encontrar una fuente de colagenasa se seleccionaron las células de citotrofoblasto por sus características invasivas y nos propusimos purificarlas, para después hacer la determinación de la actividad colagenolítica. Esta estrategia tuvo excelentes resultados. Se obtuvo una enzima con la propiedad de degradar colágena, que es exclusivamente inhibida por EDTA. No obstante, uno de los principales inconvenientes de esta aproximación radica en que la cantidad de enzima que puede conseguirse es poca, debido a que la muestra inicial de tejido está limitada por diferentes factores tales como la cantidad de tripsina necesaria para practicar la disgregación del tejido. Además de este factor, existe uno ligado a la naturaleza misma del procedimiento de purificación de células, en el que necesariamente existe una pérdida enorme de los citotrofoblastos que componen la población original. Una de las soluciones al problema del rendimiento en el número de células sería aumentar su número por expansión *in vitro*. No obstante, en estas condiciones las células al cabo de unas cuantas generaciones mueren. Para evitar este problema se han desarrollado técnicas que "inmortalizan" líneas celulares. Una de estas técnicas consiste en infectar a las células con el virus de Epstein-Barr o en inocular oncogenes como el antígeno T de SV40 (Tag)¹¹⁹, de tal modo que se habilita a las células para crecer en cultivo en forma permanente. Durante el proceso de transformación pueden ocurrir algunas modificaciones genéticas.

bioquímicas y morfológicas en las células, con lo cual la cualidad de interés en nuestro estudio puede perderse o alterarse dramáticamente. Este mismo fenómeno ocurre en las células malignas, por lo que en la mayoría de las ocasiones resulta indeseable utilizar este tipo de células para inferir algún proceso o característica normal del organismo. Sin embargo, cuando las células transformadas no han modificado significativamente sus propiedades, son de gran utilidad para conocer cualquier evento biológico. El cultivo *in vitro* resulta insustituible cuando se desean analizar los estímulos adecuados que desencadenan alguna actividad celular. Por ejemplo, sería conveniente conocer los factores que inducen la liberación de la colagenasa en las células de citotrofoblasto. En leucocitos neutrófilos polimorfonucleares humanos la liberación de la colagenasa puede ser estimulada por esteres de forbol.¹²⁰ Esto podría ayudarnos a discernir en qué fenómenos interviene directamente la colagenasa de trofoblasto y cuáles son sus mecanismos de regulación.

Para la detección de la actividad colagenolítica en los extractos de células de citotrofoblasto no fue necesario utilizar ningún activador. Puesto que las colagenasas son sintetizadas como zimógenos, la activación de la colagenasa de citotrofoblasto pudo haber ocurrido por la interacción de ésta con otras proteasas de la célula en el extracto.

Una de las estrategias que han revolucionado el proceso de purificación de proteínas es la cromatografía de afinidad. Esta técnica consiste en acoplar a una matriz inerte una molécula o cualquier cosa que reaccione con gran afinidad y alta especificidad con la proteína que deseamos purificar. De este modo, únicamente la proteína en cuestión se une a la matriz mientras que otras proteínas contaminantes son eliminadas durante el lavado del conjugado. En condiciones óptimas, puede obtenerse la purificación de cualquier proteína utilizando como único procedimiento la cromatografía de afinidad.

Fue precisamente la cromatografía de afinidad el método que se aplicó para purificar la enzima con actividad colagenolítica de los extractos de células de citotrofoblasto. A una matriz de Sepharosa se acopló colágena tipo I de tendón de cola de rata que sirvió como sustrato en la purificación de la enzima. El empleo de esta técnica fue de gran utilidad ya que el número elevado de bandas que originalmente estaba presente en el patrón electroforético del extracto de células se redujo solamente a siete después de incubar el extracto con la matriz de Sepharosa-Colágena. Entre estas bandas de proteína algunas tuvieron un arreglo similar al patrón electroforético de la colágena.

por lo que probablemente parte de la proteína acoplada a la matriz se desprendió durante la elución de la enzima. Sin embargo, no se realizó ninguna prueba adicional para tratar de identificar estas bandas. Por otra parte, la utilización de la colágena como sustrato de captura de enzimas con actividad colagenolítica en cromatografía de afinidad tiene la desventaja de que a ésta pueden unirse otras proteínas además de la colagenasa, tales como fibronectina y laminina.^{105,106,107} Estas y otras proteínas pudieron haber permanecido unidas a la superficie de las células si el proceso de digestión de la matriz extracelular de las vellosidades con tripsina fue incompleto.

Entre las metodologías que se han desarrollado para purificar con gran especificidad cualquier tipo de proteína está la cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales reconocen un solo epítipo de la molécula a la cual están dirigidos. Hoyhtya *et al* (1990) han obtenido anticuerpos monoclonales contra la colagenasa tipo IV de células de melanoma humano, que acoplaron a columnas de Sepharosa-Proteína A. De este modo, los investigadores lograron la purificación de la enzima en un sólo paso cromatográfico.¹²¹ Sería recomendable utilizar esta estrategia como un procedimiento alternativo en la purificación de la colagenasa de trofoblasto.

Como se observa en la figura 12, después de la cromatografía en DEAE se obtuvo una muestra homogénea que migró como una sola banda de 40 KDa en un gel de SDS-PAGE. Esta banda representa la proteína con actividad colagenolítica, como lo demuestran los experimentos de elución de proteína del gel de poliacrilamida. Sin embargo, persiste la duda de si la actividad colagenolítica es ocasionada por una o por varias especies moleculares (isoenzimas) que migran en la misma posición. Esta incógnita no podrá ser disipada hasta que se lleve a cabo una electroforesis bidimensional del extracto cromatografiado por DEAE. Por otra parte, estudios preliminares han demostrado que la proteína de 40 KDa también exhibe actividad de gelatinasa, pero es incapaz de degradar asoproteínas¹²² tales como azocoll, azoalbúmina y azocaseína (datos no mostrados).

La pureza alcanzada por la colagenasa de citotrofoblasto fue de 20640 veces. La actividad específica que se ha reportado en la purificación de otras colagenasas es de 3 884, 16 310 y 53 400 para la de piel de cobayo, para la de riñón de rata, y para la colagenasa sinovial de cerdo, respectivamente.^{49,50,77} Por lo tanto, la actividad específica de la colagenasa de citotrofoblasto purificada es aceptable. Por otra parte, la cantidad

de enzima purificada fue de solo 2 μ g. Esta es una de las principales deficiencias del método de purificación que estamos proponiendo. La cantidad de enzima purificada es tan pequeña que sólo puede utilizarse en unos cuantos ensayos de actividad enzimática, pero no en una caracterización más completa de la enzima, ni puede ser empleada en estudios de secuenciación o en la producción de anticuerpos. Este problema enfatiza la importancia de incrementar la cantidad de muestra inicial o de llevar a cabo métodos de purificación alternativos.

La tabla 5 exhibe una disminución del 60% en el rendimiento de la proteína con actividad colagenolítica después de pasar la muestra por la cromatografía de afinidad. Este es uno de los factores que contribuyen a la obtención de muy poca cantidad de enzima al final del proceso de purificación. En el material que eluyó de la columna de afinidad con el amortiguador de lavado no se detectó actividad colagenolítica (datos no mostrados). Probablemente una de las razones de la pérdida radica en que la colagenasa es degradada por otras enzimas en la muestra (a pesar de que se mantiene a 4° C), por lo que resultaría conveniente añadir al extracto de células inhibidores tales como NEM, PMSF y SBTI que no disminuyen la actividad de degradación de colágena (Tabla 4) y sí pueden proteger a la colagenasa de proteólisis. Sería recomendable que estos inhibidores estén presentes, inclusive, desde el momento de lisar las células con tritón.

Después de la cromatografía en DEAE el rendimiento aumentó a 297.7%. Este incremento puede deberse a la activación de colagenasa latente que probablemente estaba presente en la muestra derivada de la cromatografía en Sepharosa-Colágena. Esto es posible ya que se ha descrito que la procólagenasa de hueso de ratón puede unirse a colágena, aunque en menor grado que la enzima activa.⁷⁴ Por lo tanto, si en una muestra de proteína existen colagenasa activa y latente, ambas pueden adherirse a una matriz de Sepharosa-Colágena y eluir juntas. Posteriormente, la interacción de la colagenasa latente con la columna de DEAE posiblemente promovió la activación de la enzima. De haber ocurrido esto, el aumento en el rendimiento ocasionado por la activación de la enzima latente enmascararía la disminución en el rendimiento de la enzima que ya se encontraba activa.

Rajabi *et al* en 1990, lograron extraer una colagenasa de placentas humanas a término por homogeneización de tejido de los lados materno y fetal en Tritón X-100 al 0.1% y CaCl₂ 10 mM, con un peso molecular de 60 KDa. Además del extracto con-

seguido por homogeneización, estas personas lograron obtener un "extracto caliente" colocando el tejido residual en un amortiguador de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. con CaCl₂ 100 mM a 60° C por 4 min. La proporción de colagenasa que se obtuvo en el extracto caliente fue mayor que la del extracto con Tritón. La activación de la colagenasa latente se realizó con APMA 0.5 mM. Después de reducir el extracto placental con dithiothreitol 2 mM y de alquilarlo con iodoacetamida 5 mM para inactivar al inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP), la actividad de la colagenasas activa y latente aumentó significativamente. También por medio de cromatografía de filtración en Ultrogel ACA-34, Rajabi *et al* pudieron separar al inhibidor de metaloproteinasas de tejido de la colagenasa, de tal manera que la forma latente de la enzima mostró un peso de 65 KDa, mientras que la activada con APMA tuvo un peso de 60 KDa.¹²³

Existe la posibilidad de que la colagenasa extraída por Rajabi *et al* de placentas humanas a término sea la misma enzima que nosotros logramos purificar. Sin embargo, hay una diferencia en el peso molecular de estas dos enzimas, ya que la enzima reportada por Rajabi *et al* tiene un peso de 60 KDa, mientras que nuestra colagenasa sólo pesa 40 KDa. No obstante, es probable que nuestra colagenasa sea un producto de degradación de la enzima de 60 KDa, que conserva el sitio de reconocimiento y el sitio catalítico de la enzima (que pueden ser uno sólo). Una manera de disipar esta duda sería a través de un análisis de *Western blot* con un anticuerpo policlonal anti-colagenasa, utilizando las muestras logradas de cada uno de los pasos de purificación. Si el anticuerpo reconoce una banda adicional a la de 40 KDa, pueden existir tres posibilidades: i. se ha identificado una colagenasa diferente a la de 40 KDa, ii. se ha reconocido la colagenasa de citotrofoblasto completa, de la cual deriva la colagenasa de 40 KDa, o bien, iii. se ha identificado otro fragmento que junto con la colagenasa de 40 KDa constituyen una colagenasa con un peso molecular más elevado. Otra posibilidad es que la colagenasa de 60 KDa sea la forma glicosilada de la enzima de 40 KDa.

Por otra parte, en un órgano tan complejo como la placenta es factible que varias colagenasas intersticiales contribuyan al recambio metabólico de la colágena, por lo que es plausible que la colagenasa extraída por Rajabi *et al* y la nuestra sean distintas. Además, la obtención de la colagenasa de Rajabi *et al* se hizo a partir de fragmentos de tejido de los lados materno y fetal, en tanto que la colagenasa de 40 KDa que nosotros purificamos se recobró del interior de las células de citotrofoblasto aisladas.

Dos aspectos importantes en el reporte de Rajabi *et al* son, por un lado, que la extracción de la colagenasa de placenta se hizo por homogeneización del tejido, y por el otro, el aumento de doce a diecisiete veces conseguido en la actividad colagenolítica después de reducción del extracto placentar con ditioneitol 2 mM y alquilación con iodoacetamida 5 mM para inactivar al inhibidor tisular de metaloproteinasas. Además, Rajabi *et al* obtuvieron un "extracto caliente" del tejido residual de los homogenados de placenta, del mismo modo que como se realizó en la extracción de la colagenasa del útero de rata en involución.¹²⁴ Este método se basa en la suposición de que la colagenasa permanece en los precipitados que se forman después de centrifugar a los homogenados de los tejidos, debido a que se mantiene unida a las fibras de colágena. En estas condiciones la extracción de la enzima se ejecuta calentando la colágena a su temperatura de desnaturalización, que es de 58-62° C, ya que se cree que un cambio conformacional del sustrato facilita el desalojamiento de la enzima. De este modo, posiblemente una de las razones para que no detectáramos actividad colagenolítica en los sobrenadantes de homogenados de vellosidades placentarias es que la colagenasa se mantuvo unida a las fibras de colágena en el precipitado.

Por lo tanto, sería oportuno realizar los ensayos de extracción de colagenasa por homogeneización de vellosidades placentarias utilizando el método de Weeks *et al*²⁴, e intentar descubrir actividad colagenolítica en los precipitados de homogenados reduciéndolos con ditioneitol y alquilándolos con iodoacetamida. En caso de que se detectara actividad colagenolítica, sería interesante conocer si ésta se encuentra asociada a la especie de 40 KDa.

También es interesante que Rajabi *et al* señalan que el tratamiento de los extractos placentales con isotiocianato de potasio 3M para inactivar a la α_2 -macroglobulina no incrementó la actividad colagenolítica.

Ya se mencionó la posibilidad de que el incremento en el rendimiento de la colagenasa de trofoblasto después de la cromatografía en DEAE (Tabla 5) puede ser ocasionado por la activación de colagenasa latente presente en la muestra. Es probable que esta activación se produzca como consecuencia de la liberación de un inhibidor unido a la colagenasa, apareciendo como un fuerte candidato el inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP).

Qué probabilidad existe de que la colagenasa de 40 KDa aislada de células de citro-

foblasto de placentas a término participe en los procesos de invasión blastocística durante la implantación temprana? Como ya se mencionó, una de las diferencias entre el trabajo desarrollado por Rajabi *et al* y el nuestro es que aquel toma tejidos de los lados materno y fetal de la placenta para extraer la colagenasa, en tanto que nosotros solamente consideramos las vellosidades coriónicas para realizar los extractos. La razón para efectuar esta discriminación se basa en el hecho de que las vellosidades de las placentas a término derivan directamente del tejido trofoblástico que participa en la invasión del endometrio durante el primer tercio del embarazo. Nosotros hemos establecido la suposición de que la colagenasa de citotrofoblasto de placentas a término puede mantener una relación estrecha con las enzimas que participan en la invasión blastocística. Hasta el momento nosotros no contamos con ninguna evidencia directa de que una enzima con actividad colagenolítica participe en el proceso de implantación.

Debido a que en México la práctica de abortos aún es considerada ilegal, resulta imposible obtener placentas humanas normales en el primer trimestre del embarazo en un hospital del sector público como el Instituto Nacional de Perinatología. Sin embargo, Mueller *et al* (1990) han desarrollado una técnica para aislar células trofoblásticas de la sangre periférica de mujeres con 8 a 12 semanas de embarazo. La técnica consiste en utilizar los anticuerpos monoclonales FDO66Q y FDO338P, que reaccionan exclusivamente con una proteína de la superficie de la membrana de células de sincitiotrofoblasto veloso y de citotrofoblasto no veloso (células en la decidua), acoplados a esferas de poliestireno preferradas con anticuerpos de oveja anti-IgG de ratón (fragmento Fc).¹²³ De este modo, ahora es posible obtener células de trofoblasto de la sangre de mujeres en el primer trimestre del embarazo, que pueden examinarse en su capacidad para producir colagenasa. Debido a que éstas células deben estar participando activamente en el proceso de invasión, sería conveniente cultivarlas y examinar la presencia de colagenasa en el medio condicionado de cultivo.

Hoyhtya *et al* (1990) han producido anticuerpos monoclonales anti- colagenasa Tipo IV de células de melanoma humano (A2058) que inhiben la actividad de la enzima y la invasividad de las células de melanoma a través de una membrana basal reconstituida. Estos investigadores también obtuvieron anticuerpos que, por el contrario, aumentan la actividad enzimática e incrementan la capacidad invasiva de las mismas células.¹²⁴ Por lo tanto, existe la posibilidad de que una vez que el problema de la escasa producción

de la colagenasa de 40 KDa purificada de células de cincitiotroblasto sea superado, esta enzima sea utilizada para la producción de anticuerpos monoclonales. Estos anticuerpos podrían emplearse en estudios inmunocitoquímicos con células de trofoblasto aisladas de la sangre de mujeres en el primer trimestre del embarazo, para conocer si la colagenasa de 40 KDa se encuentra en estas células. En caso de que las células de trofoblasto aisladas de la sangre de mujeres embarazadas mostraran capacidad invasiva, los anticuerpos también serían útiles en experimentos de inhibición o aumento de la invasión. Todos estos ensayos contribuirían a rechazar o a aceptar la posibilidad de que la colagenasa de 40 KDa tenga una contribución importante en el proceso de implantación placentaria humana.

Los anticuerpos que se generen contra la colagenasa de 40 KDa también podrían ayudarnos a determinar la localización *in situ* de la enzima en el tejido placentario. Esto resulta importante para conocer las modificaciones en la distribución de la colagenasa en diferentes etapas del embarazo, después del parto, o en alteraciones patológicas que involucren la remodelación de la matriz extracelular de la placenta.

En 1988, Yagel *et al* documentó la participación de la colagenasa como uno de los mecanismos que facilitan la invasión de membranas por el trofoblasto. Estos investigadores midieron y compararon la habilidad de trofoblastos humanos de primer trimestre con la de varias líneas tumorales metastásicas, etiquetadas metabólicamente con ^{125}I -deoxyuridina (^{125}I -dUR), para invadir una membrana amniótica humana libre de epitelio (constituida por membrana basal y estroma) que fue colocada en una "cámara de invasión", en la que, después de un período de incubación, cuantificaron la fracción de radiactividad retenida. De este modo determinaron que la invasión en las células trofoblásticas fue superior a la invasión producida por las células tumorales metastásicas. Además, cuando utilizaron inhibidores de proteasas o anticuerpos contra plasminógeno, plasmina o colagenasa no hubo invasión; en cambio, al utilizar mersalyl (activador de procolagenasa) observaron que, tanto en las líneas trofoblásticas como en las tumorales metastásicas, la habilidad invasiva aumentaba. También lograron cuantificar producción de colagenasa y de laminina en los medios condicionados de las células trofoblásticas. Debido a que se ha reportado que el trofoblasto produce grandes cantidades de activador de plasminógeno¹² "... que pueden conducir a la producción de plasmina y eventual activación de procolagenasa", Yagel *et al* sugieren "...un papel directo de la

colagenasa promoviendo la invasión en estos tipos celulares..."¹²⁶

Brenner *et al* (1989) utilizando transcritos aislados de embriones de ratón, que fueron procesados por medio de la técnica de transcripción inversa para luego efectuar la amplificación de secuencias específicas por la reacción en cadena de la polimerasa (TC-PCR), determinaron por *Southern blot* de estas secuencias que los RNA mensajeros de colagenasa, colagenasa/gelatinasa de 68 y 92 KDa y estromelisinina están presentes en huevos no fertilizados y en embriones en preimplantación, incrementando significativamente su nivel en el estado de blastocisto. También fueron detectados transcritos para el inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) en el huevo no fertilizado y en todas las etapas de desarrollo del embrión. Adicionalmente, por medio de la técnica de simografía sobre geles de SDS-gelatina o SDS-caseína, y por inmunoprecipitación de proteínas biosintéticamente marcadas con [³⁵S]metionina, Brenner *et al* detectaron las mismas metaloproteinasas en el medio condicionado de cultivos sin suero de embriones, cuya actividad fue inhibible por TIMP.¹²⁷

Por su parte, Moll y Lane (1990) en un estudio inmunohistoquímico con el anticuerpo anti-pColl que reconoce procólagenasa y colagenasa humana de los tipos intersticiales, identificaron tinción de la capa trofoblástica en la superficie de vellosidades coriónicas de placentas humanas de primer trimestre. También detectaron colagenasa en algunos fibroblastos dentro del estroma veloso y en el citoplasma de células trofoblásticas extravelosas. Posteriormente, a nivel ultraestructural empleando la técnica de *immunogold*, Moll y Lane localizaron la colagenasa en las microvellosidades de la superficie de células trofoblásticas extravelosas en cultivo y en fibras extracelulares del tipo de la colágena.¹²⁸

Un modelo que puede ser utilizado para tratar de obtener una idea más completa de los fenómenos que se desarrollan durante la implantación del blastocisto es el erizo de mar. Este organismo produce una proteasa específica activada por Ca^{2+} (enzima de brote) que es secretada por la blástula joven para digerir una envoltura protectora derivada de la matriz extracelular del huevo, permitiendo al embrión nadar libremente. La enzima tiene un peso de 51 KDa y comparte varias propiedades estructurales y funcionales con las colagenasas de mamíferos. Empleando un análisis *Northern blot* no se detectaron transcritos del gene de la enzima de brote en el RNA preparado de huevos no fertilizados, por lo que el mRNA de ésta enzima no pertenece al conjunto materno

de mRNAs. Por medio de ensayos run-on con núcleos aislados de embriones en estados sucesivos de desarrollo se midió la tasa relativa de síntesis del mensajero. Estos fueron apenas detectables en los estados más tempranos examinados (estado de 8 células); su abundancia incrementó agudamente hasta el estado de 128 células, después declinó rápidamente y retornó a niveles indetectables en el estado de blástula nadadora.¹⁷⁹

No obstante que la participación de enzimas del tipo de las colagenasas parece ser esencial en la migración celular durante la invasión metastásica, la implantación blastocística de los uterios o el brote del erizo de mar, todavía no se conocen los mecanismos que regulan la activación del genoma para la síntesis de colagenasa en estos eventos. En la implantación la inducción de la colagenasa puede estar mediada por estímulos externos que inciden sobre el blastocisto o puede estar regulada por mecanismos asociados con la división celular del embrión. Los estudios que se llevaran a cabo en los próximos años tendrán que estar dirigidos a identificar estos procesos, así como los factores que bloquean la expresión de la colagenasa, que pueden ser de utilidad para el desarrollo de estrategias involucradas con el control terapéutico de algunas enfermedades o en la planeación de métodos más eficaces para el control de la natalidad. Por otra parte, ya que sólo 3 a 5 de cada 100 embriones que son transferidos después de la fertilización *in vitro* completan la implantación e inician el embarazo¹⁸⁰, el aumento en el entendimiento sobre la regulación de la expresión de la actividad de la colagenasa y de otras proteinasas en la implantación tendrá un impacto inmediato en el mejoramiento de este índice, puesto que estará a nuestro alcance la posibilidad de manipular la actividad invasiva del embrión. Estos estudios también representarán un avance en el conocimiento de la metástasis cancerosa, puesto que los mecanismos moleculares comprometidos con la invasión blastocística aparentemente son los mismos que se manifiestan durante la invasión metastásica.

REFERENCIAS

1. Margulis L. y Schwartz K. (1981) Cinco Reinos. Guía Ilustrada de los Phyla de la Vida en la Tierra. *Ciencias*. México: 239
2. Boving B. and Larsen J. (1988) Implantation. In *Mechanisms Concerned with Contraception*. Hartman C. ed. *Pergamon Press*, New York: 471
3. Woessner J. (1982) Uterus, Cervix and Ovary. In *Collagen in Health and Disease*. Weiss J. and Jayson M. eds. *Churchill Livingstone*, London: 506
4. Kennedy T. (1983) Embryonic Signals and the Initiation of Blastocyst Implantation. *Aust. J. Biol. Sci.* **36**: 531
5. Yoshinaga K. (1988) Uterine Receptivity for Blastocyst Implantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **541**: 424
6. Lejeune B., Dehon M. and Leroy F. (1986) Tentative Extrapolation of Animal Data to Human Implantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **476**: 63
7. Moulton B. and Koenig B. (1986) Biochemical Responses of the Luminal Epithelium and Uterine Sensitization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **476**: 95
8. Pinsker M., Sacco A. and Mintz B. (1974) Implantation-Associated Proteinase in Mouse Uterine Fluid. *Dev. Biol.* **38**: 285
9. Martin O. and Arias F. (1982) Plasminogen Activator Production by Trophoblast Cells *In Vitro*: Effect of Steroid Hormones and Protein Synthesis Inhibitors. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **142**: 402
10. Fisher S., Leitch M., Kantor M., Basbaum C. and Kramer R. (1985) Degradation of Extracellular Matrix by the Trophoblastic Cells of First-Trimester Human Placentas. *J. Cell. Biochem.* **27**: 31
11. Dabich D. and Andary T. (1974) Prevention of Blastocyst Implantation in Mice with Proteinase Inhibitors. *Fertil. Steril.* **28**: 934
12. Strickland S., Reich E. and Sherman M. (1976) Plasminogen Activator in Early Embryogenesis: Enzyme Production by Trophoblast and Parietal Endoderm. *Cell* **9**: 231
13. Brown R. (1988) Placenta. In *Physiology of Reproduction*. Knobyl E. ed. Raven Press, New York: 456
14. Wynn R. (1975) Principles of Placentation and Early Human Placental Development. In *The Placenta (and Its Maternal Supply Line)*. Gruenwald P. ed. *University Park Press*, Baltimore: 18
15. Beconsfield P., Birdwood G. y Beaconsfield R. (1980) The Placenta. *Sci. Am.* **243**: 95
16. Hay E. (1981) Extracellular Matrix. *J. Cell Biol.* **91**: 205a
17. Weitlauf H. (1979) Implantation. In *Animal Models for Research on Contraception and Fertility*. Alexander N. ed. *Harper and Row Publishers*, Hagerstown: 238
18. Dey S. and Johnson D. (1986) Embryonic Signals in Pregnancy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **49**
19. Shelenyak M. (1986) A History of Research on Nidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **5**
20. Martin G., Timpl R., Muller P. and Kuhn K. (1985) The Genetically Distinct Collagens. *TIBS-July*: 285
21. Piez K. (1986) Collagen Types: A Review. *J. Cell. Biochem.* **S10B**: 101
22. Contifaris C., Babalola G., Abisogun A., Kao L.-C., Chin U., Vadillo-Ortega F., Osheroff J., Kliman H. and Strauss III, J. (1991) *In Vitro* Systems for the Study of Human Trophoblast Implantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **622**: 191
23. Rannegar B. (1985) Collagen Gene Construction and Evolution. *J. Mol. Evol.* **22**: 141
24. Trelstad R. (1981) La Colágena. *La Recherche* **10**: 312
25. Pérez-Tamayo R. (1981) Enfermedades Moleculares de la Colágena. *Ciencia* **32**: 147

26. Morris N. and Bachinger H. (1987) Type XI Collagen Is a Heterotrimer with the Composition (1 α ,2 α ,3 α) Retaining Non-triple-helical Domains. *J. Biol. Chem.* **262**: 11345
27. Dublet B. and van der Rest M. (1987) Type XII Collagen Is Expressed in Embryonic Chick Tendons. Isolation of Pepsin-Derived Fragments. *J. Biol. Chem.* **262**: 17724
28. Tikka L., Pihlajaniemi T., Henttu P., Prockop D. and Tryggvason K. (1988) Gene Structure for the $\alpha 1$ Chain of a Human Short-Chain Collagen (Type XIII) with Alternatively Spliced Transcripts and Translation Termination Codon at the 5' End of the Last Exon. *P. N. A. S. USA* **85**: 7491
29. Eyre D. (1980) Collagen: Molecular Diversity in the Body's Protein Scaffold. *Science* **207**: 1315
30. Vuorio E. (1986) Connective Tissue Diseases: Mutations of Collagen Genes. *Ann. Clin. Res.* **18**: 234
31. Kadler K., Hojima Y. and Prockop D. (1987) Assembly of Collagen Fibrils *de Novo* by Cleavage of the Type I PC-Collagen with Procollagen C-Proteinase. *J. Biol. Chem.* **260**: 15696
32. Emonard H. and Grimaud J. (1990) Matrix Metalloproteinases. A Review. *Cell. Mol. Biol.* **36**: 131
33. Steven F., Torre-Blanco A. and Hunter J. (1975) A Neutral Protease in Rheumatoid Synovial Fluid Capable of Attacking the Telopeptide Regions of Polymeric Collagen Fibrils. *Biochim. Biophys. Acta* **408**: 188
34. Miller A. (1982) Molecular Packing in Collagen Fibrils. *Trends. Bioch. Sci.* **7**: 13
35. Frischauf A., Lehrach H., Rosner C. and Boedtker H. (1978) Procollagen Complementary DNA, a Probe for Messenger RNA Purification and the Number of Type I Collagen Genes. *Biochemistry* **17**: 3243
36. Boedtker H. and Aho S. (1985) Collagen Gene Structure: the Paradox May Be Resolved. *Biochem. Soc. Symp.* **49**: 57
37. De Crombrugge B. and Pastan I. (1982) Structure and Regulation of a Collagen Gene. *Trends. Bioch. Sci.* **7**: 11
38. Taipouras P. and Ramirez F. (1987) Genetic Disorders of Collagen. *J. Med. Gen.* **24**: 2
39. Gross J. and Lapiere C. (1962) Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues: A Tissue Culture Assay. *Proc. N. A. S.* **48**: 1014
40. Harris, Jr. E., Welgus H. and Krane S. (1984) Regulation of the Mammalian Collagenases. *Collagen Rel. Res.* **4**: 493
41. Woolley D. (1984) Mammalian Collagenases. In *Extracellular Matrix Biochemistry*, Piez K. and Reddi A. eds. *Elsevier*, New York: 119
42. McAnulty R. and Laurent G. (1987) Collagen Synthesis and Degradation *In Vivo*. Evidence for Rapid Rates of Collagen Turnover with Extensive Degradation of Newly Synthesized Collagen in Tissues of the Adult Rat. *Collagen Rel. Res.* **7**: 93
43. Gross J. (1981) An Assay on Biological Degradation of Collagen. In *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Hoy E. ed. *Plehum*, New York: 217
44. Harper E., Bloch K. and Gross J. (1971) The Zymogen of Tadpole Collagenase. *Biochemistry* **10**: 3035
45. Liotta L., Tryggvason K., Garbisa S., Robey P. and Abe S. (1981) Partial Purification and Characterization of a Neutral Protease Which Cleaves Type IV Collagen. *Biochemistry* **20**: 100
46. Murphy G., Bretz U., Baggiolini M. and Reynolds J. (1980) The Latent Collagenase and Gelatinase of Human Polymorphonuclear Neutrophil Leucocytes. *Biochem. J.* **192**: 517
47. Nagase H., Jackson R., Brinckerhoff C., Vater C. and Harris, Jr. E. (1981) A Precursor Form of Latent Collagenase Produced in a Cell-free System With mRNA from Rabbit Synovial Cells. *J. Biol. Chem.* **256**: 11951
48. Stricklin G., Bauer E., Jeffrey J. and Eisen A. (1977) Human Skin Collagenase: Isolation of Precursor and Active Forms from Both Fibroblast and Organ Cultures. *Biochemistry* **16**: 1607

49. Vadillo F. (1986) Colagenasa de Riñón de Rata. Extracción y Purificación. *Tesis de Maestría*. Fac. de Medicina. UNAM, México: 90
50. Cawston T. and Tyler J. (1979) Purification of Pig Synovial Collagenase to High Specific Activity. *Biochem. J.* **183**: 647
51. Bloomfield S. and Brown S. (1974) Conjunctival Collagenase: Partial Purification. *Invest. Ophthalmol.* **13**: 547
52. Haang Ch. and Abramson M. (1975) Purification and Characterization of Collagenase from Guinea Pig Skin. *Biochim. Biophys. Acta* **384**: 484
53. Woessner, Jr. J. (1991) Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors in Connective Tissue Remodeling. *FASEB J.* **5**: 2145
54. Matriain L. (1990) Metalloproteinases and their Inhibitors in Matrix Remodeling. *Trends Genet.* **6**: 121
55. Pardo A. and Pérez-Tamayo R. (1974) The Collagenase of Carrageenin Granuloma. *Connect. Tissue Res.* **2**: 243
56. Jeffrey J. and Gross J. (1970) Collagenase from Rat Uterus. Isolation and Partial Characterization. *Biochemistry* **9**: 265
57. Seltzer J., Welgus H., Jeffrey J. and Eisen A. (1976) The Function of Ca^{2+} in the Action of Mammalian Collagenases. *Arch. Biochem. Biophys.* **173**: 355
58. Seltzer J., Jeffrey J. and Eisen A. (1977) Evidence for Mammalian Collagenases as Zinc Ion Metalloenzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **485**: 179
59. Macartney H. and Tachee H. (1983) Latent and Active Human Polymorphonuclear Leukocyte Collagenases. Isolation, Purification and Characterisation. *Eur. J. Biochem.* **130**: 71
60. Shimizu M., Glimcher M., Travis D. and Goldhaber. (1969) Mouse Bone Collagenase: Isolation, Partial Purification, and Mechanism of Action. *P. S. E. B. M.* **130**: 1175
61. Harris E., Dibona D. and Krane S. (1969) Collagenases in Human Synovial Fluid. *J. Clin. Invest.* **48**: 2104
62. Fields G., Van Wart H. and Birkedal-Hansen H. (1987) Sequence Specificity of Human Skin Fibroblast Collagenase. *J. Biol. Chem.* **262**: 6221
63. Welgus H., Jeffrey J. and Eisen A. (1981) The Collagen Substrate Specificity of Human Skin Fibroblast Collagenase. *J. Biol. Chem.* **256**: 9511
64. Pardo A., Rosenstein I., Moatfort I. and Pérez-Tamayo R. (1983) Immunohistochemical Identification of Collagenase in Carrageenin Granuloma. *J. Histochem. Cytochem.* **31**: 641
65. Johnson-Muller B. and Gross J. (1978) Regulation of Corneal Collagenase Production: Epithelial-Stromal Cell Interactions. *P. N. A. S. USA* **75**: 4417
66. Nagase H., Brinckerhoff C., Vater C. and Harris, Jr. E. (1983) Biosynthesis and Secretion of Procollagenase by Rabbit Synovial Fibroblast. *Biochem. J.* **214**: 281
67. López-Escalera R. and Pardo A. (1987) Carrageenin-Stimulated Peritoneal Macrophages Release *In Vitro* Collagenase and Gelatinase. *Collagen Rel. Res.* **7**: 249
68. Johnson-Wint B. (1980) Regulation of Stromal Cell Collagenase Production in Adult Rabbit Cornea: *In Vitro* Stimulation and Inhibition by Epithelial Cell Products. *P. N. A. S. USA* **77**: 5331
69. Dayer J., Passwell J., Schneeberger E. and Krane S. (1980) Interactions Among Rheumatoid Synovial Cells and Monocyte-Macrophages: Production of Collagenase-Stimulating Factor by Human Monocytes Exposed to Concanavalin A or Immunoglobulin Fc Fragments. *J. Immunol.* **124**: 1712
70. McCarthy J., Wahl S., Rees J., Olsen Ch., Sandberg A. and Wahl L. (1980) Mediation of Macrophage Collagenase Production by 3'-5' Cyclic Adenosine Monophosphate. *J. Immunol.* **124**: 2405

71. Paranjpe M., Engel L., Young N. and Liotta L. (1980) Activation of Human Breast Carcinoma Collagenase Through Plasminogen Activator. *Life Sciences* **26**: 1223
72. Sellers A., Cartwright E., Murphy G. and Reynolds J. (1977) Evidence that Latent Collagenases are Enzyme-Inhibitor Complexes. *Biochem. J.* **163**: 303
73. Cawston T. (1986) Protein Inhibitors of Metallo- Proteinases. In Proteinase Inhibitors. Barrett A. and Salvesen G. eds. *Elsevier*, Amsterdam: 589
74. Springman E., Angleton E., Birkedal-Hansen H. and Van Wart H. (1990) Multiple Modes of Activation of Latent Human Fibroblast Collagenase: Evidence for the Role of a Cys⁷³ Active-Site Zinc Complex in Latency and a "Cysteine Switch" Mechanism for Activation. *P. N. A. S. USA* **87**: 364
75. Grant G., Eisen A., Marmor B., Roswit W. and Goldberg G. (1987) The Activation of Human Skin Fibroblast Procollagenase. Sequence Identification of the Major Conversion Products. *J. Biol. Chem.* **262**: 5886
76. Suzuki K., Enghild J., Morodomi T., Salvesen G. and Nagase H. (1990) Mechanisms of Activation of Tissue Procollagenase by Matrix Metalloproteinase 3 (Stromelysin). *Biochemistry* **29**: 10261
77. Steven F., Griffin M., Itzhaki S. and Al-Habib A. (1980) A Tripsin-Like Neutral Protease on Ehrlich Ascites Cell Surfaces: Its Role in the Activation of Tumour-Cell Zymogen of Collagenase. *Br. J. Cancer* **42**: 712
78. Gillet C., Eeckhout Y. and Vaes G. (1977) Purification of Procollagenase and Collagenase by Affinity Chromatography on Sepharose-Collagen. *FEBS Lett.* **74**: 126
79. Werb Z., Burleigh M., Barrett A. and Starkey P. (1974) The Interaction of α_2 -Macroglobulin with Proteinases. Binding and Inhibition of Mammalian Collagenases and Other Metal Proteinases. *Biochem. J.* **139**: 359
80. Wooley D., Roberts D. and Evanson J. (1976) Small Molecular Weight β_1 Serum Protein Which Specifically Inhibits Human Collagenase. *Nature* **261**: 325
81. Murphy G., Cawston T. and Reynolds J. (1981) An Inhibitor of Collagenase from Human Amniotic Fluid. *Biochem. J.* **195**: 167
82. Stetler-Stevenson W., Krutzsch H. and Liotta L. (1989) Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP-2). A New Member of the Metalloproteinase Inhibitor Family. *J. Biol. Chem.* **264**: 17374
83. Boone T., Johnson M., De Clerck J. and Langley K. (1990) cDNA Cloning and Expression of a Metalloproteinase Inhibitor Related to Tissue Inhibitor of Metalloproteinase. *P. N. A. S. USA* **87**: 2800
84. Cawston T., Curry V., Clark I. and Hazelman B. (1990) Identification of a New Metalloproteinase Inhibitor that Forms Tight-Binding Complexes with Collagenase. *Biochem. J.* **269**: 183
85. Stricklin G., Jeffrey J., Roswit W. and Eisen A. (1983) Human Skin Fibroblast Procollagenase: Mechanisms of Activation by Organomercurials and Tripsin. *Biochemistry* **22**: 61
86. Vaes G. (1972) The Release of Collagenase as an Inactive Proenzyme by Bone Explants in Culture. *Biochem. J.* **126**: 275
87. Eeckhout Y. and Vaes G. (1977) Further Studies on the Activation of Procollagenase, the Latent Precursor of Bone Collagenase. Effects of Lysosomal Cathepsin B, Plasmin and Kallikrein and Spontaneous Activation. *Biochem. J.* **166**: 21
88. Abe S. and Nagai Y. (1972) Evidence for the Presence of a Latent Form of Collagenase in Human Rheumatoid Synovial Fluid. *J. Biochem.* **71**: 819
89. Abe S., Shinmei M. and Nagai Y. (1973) Synovial Collagenase and Joint Diseases: The Significance of Latent Collagenase with Special Reference to Rheumatoid Arthritis. *J. Biochem.* **73**: 1007
90. Birkedal-Hansen H. and Taylor R. (1962) Detergent- Activation of Latent Collagenase and Resolution of Its Component Molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**: 1173

91. Werb Z. and Barleigh M. (1974) A Specific Collagenase from Rabbit Fibroblast in Monolayer Culture. *Biochem. J.* 137: 373
92. Birkedal-Hansen B., Moore W., Taylor R., Brown A. and Birkedal-Hansen H. (1988) Monoclonal Antibodies to Human Fibroblast Procollagenase. Inhibition of Enzymatic Activity, Affinity Purification of the Enzyme, and Evidence for Clustering of Epitopes in the NH₂-terminal End of the Activated Enzyme. *Biochemistry* 27: 6751
93. Werb Z. and Reynolds J. (1974) Stimulation by Endocytosis of the Secretion of Collagenase and Neutral Proteinase from Rabbit Synovial Fibroblasts. *J. Exp. Med.* 140: 1462
94. Callaway J., Garcia, Jr. J., Hersh C., Yeh R. and Gilmore-Hebert M. (1986) Use of Lectin Affinity Chromatography for the Purification of Collagenase from Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Biochemistry* 25: 4757
95. Lindy S., Sorsa T., Suomalainen K. and Turto H. (1986) Gold Sodium-Thiomalate Activates Latent Human Leukocyte Collagenase. *FEBS Lett.* 208: 23
96. Sorsa T., Suomalainen K., Turto H. and Lindy S. (1987) Latent Human Leukocyte Collagenase Can be Activated by Gold Thioglucose (GTG) and Gold Sodium Thiomalate (GST), but not by Aurofin. *Biosect. Rep.* 7: 965
97. Weiss S., Peppin G., Ortiz X., Ragsdale C. and Test S. (1985) Oxidative Autoactivation of Latent Collagenase by Human Neutrophils *Science* 227: 747
98. Harper E. (1980) Collagenases. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 1063
99. Murphy G., Cawston T., Galloway W., Barnes M., Banning R., Mercer E., Reynolds J. and Burgeson R. (1981) Metalloproteinases from Rabbit Bone Culture Medium Degrade Types IV and V Collagens, Laminin and Fibronectin. *Biochem. J.* 199: 807
100. Nakano T. and Scott P. (1987) Partial Purification and Characterization of a Neutral Proteinase with Collagen Telopeptidase Activity Produced by Human Gingival Fibroblasts. *Biochem. Cell. Biol.* 65: 286
101. Etherington D. (1976) Bovine Spleen Cathepsin B1 and Collagenolytic Cathepsin. *Biochem. J.* 155: 199
102. Mainardi C., Haas D., Seyer J. and Kang A. (1980) Specific Cleavage of Human Type III Collagen by Human Polymorphonuclear Leukocyte Elastase. *J. Biol. Chem.* 255: 12006
103. Parakkal P. (1969) Involvement of Macrophages in Collagen Resorption. *J. Cell. Biol.* 41: 345
104. Laurent G. (1987) Dynamic State of Collagen: Pathways of Collagen Degradation *In Vivo* and their Possible Role in Regulation of Collagen Mass. *Am. J. Physiol.* 252 (Cell Physiol. 21): C1
105. Liotta L., Rao C. and Barsek S. (1983) Tumor Invasion and the Extracellular Matrix. *Lab. Invest.* 49: 636
106. Liotta L., Rao C. and Wewer U. (1986) Biochemical Interactions of Tumor Cells with the Basement Membrane. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 1037
107. Terranova V., Hujanen E. and Martin G. (1986) Basement Membrane and the Invasive Activity of Metastatic Tumor Cells. *J. Nat. Cancer Institute* 77: 311
108. Terato K., Nagai Y., Kawachi K. and Yamamoto S. (1976) A Rapid Assay Method of Collagenase Activity Using ¹⁴C-Labeled Soluble Collagen as Substrate. *Biochim. Biophys. Acta* 445: 753
109. Kobayashi S. and Nagai Y. (1978) Human Leucocyte Neutral Proteinases with Special Reference to Collagen Metabolism. *J. Biochem.* 84: 559
110. Cotte C., Easty G., Neville A. and Monaghan P. (1980) Preparation of Highly Purified Cytotrophoblast from Human Placenta with Subsequent Modulation to Form Syncytiotrophoblast in Monolayer Cultures. *In Vitro* 16: 639

111. Bradford M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Bioch.* 72: 248
112. Miller E. and Rhodes R. (1982) Preparation and Characterization of the Different Types of Collagen. *Meth. Enzym.* 82: 33
113. Lefevre M., Slegers G. and Claeys A. (1979) Evaluation of a Rapid, Sensitive and Specific Assay for the Determination of Collagenolytic Activity in Biological Samples. *Clin. Chim. Acta.* 92: 167
114. Groves W., Davis Jr., F. and Sells B. (1968) Spectrophotometric Determination of Microgram Quantities of Protein without Nucleic Acid Interference. *Anal. Bioch.* 22: 195
115. Laemmli U. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680
116. Heukeshoven J. and Dernick R. (1985) Simplified Method for Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels and the Mechanism of Silver Staining. *Electrophoresis* 6: 103
117. Hempelmann E. and Kaminsky R. (1986) Long Term Stability of Colors After Silver Staining. *Electrophoresis* 7: 481
118. Hori H. and Nagai Y. (1979) Purification of Tadpole Collagenase and Characterization Using Collagen and Synthetic Substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 566: 211
119. Hanahan D. (1985) Cell Specific Expression of Recombinant Insulin/SV40 Oncogenes to Produce Deta-Cell Tumors in Transgenic Mice. *Nature* 315: 115
120. Hasty K., Hibbs M., Kang A. and Mainardi C. (1986) Secreted Forms of Human Neutrophil Collagenase. *J. Biol. Chem.* 261: 5645
121. Hoyhtya M., Hujanen E., Turpeenniemi-Hujanen T., Thorgeirsson U., Liotta L. and Tryggvason K. (1990) Modulation of Type-IV Collagenase Activity and Invasive Behavior of Metastatic Human Melanoma (A2058) Cells *In Vitro* by Monoclonal Antibodies to Type-IV Collagenase. *Int. J. Cancer* 46: 282
122. Woessner, Jr. J. and Taplin C. (1988) Purification and Properties of a Small Latent Matrix Metalloproteinase of the Rat Uterus. *The J. Biol. Chem.* 263: 16918
123. Rajabi M., Deann D. and Woessner, Jr. J. (1990) Changes in Active and Latent Collagenase in Human Placenta Around the Time of Parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 163: 499
124. Weeks J., Halme J. and Woessner, Jr. F. (1976) Extraction of Collagenase from the Involuting Rat Uterus. *Biochim. Biophys. Acta* 448: 205
125. Mueller U., Hawes C., Wright A., Petropoulos A., Deboni E., Firgaira F., Murley A., Turner D. and Jones W. (1990) Isolation of Fetal Trophoblast Cells from Peripheral Blood of Pregnant Women. *Lancet* 336: 197
126. Yagel S., Parhar R., Jeffrey J. and Lala P. (1988) Normal Nonmetastatic Human Trophoblast Cells Share *In Vitro* Invasive Properties of Malignant Cells. *J. Cell. Physiol.* 136: 455
127. Brenner C., Adler R., Rappolee D., Pedersen R. and Werb Z. (1989) Genes for Extracellular Matrix-Degrading Metalloproteinases and their Inhibitor, TIMP, are Expressed During Early Mammalian Development. *Genes. Dev.* 3: 848
128. Moll U. and Lane B. (1990) Proteolytic Activity of First Trimester Human Placenta: Localization of Interstitial Collagenase in Villous and Extravillous Trophoblast. *Histochemistry* 94: 555
129. Lepage T. and Gache C. (1990) Early Expression of a Collagenase-like Hatching Enzyme Gene in the Sea Urchin Embryo. *EMBO J.* 9: 3003
130. Flamigni C., Bulletti C., Polli V., Ciotti P., Prefetto R., Galassi A. and Di Cosmo E. (1991) Factors Regulating Interaction between Trophoblast and Human Endometrium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 622: 176