

UNIVERSIDAD MOTOLINIA

INCORPORADA A LA U. N. A. M.

ESCUELA DE QUIMICA

**AISLAMIENTO PURIFICACION Y ANALISIS DE AMINO-
ACIDOS DE LOS PEPTIDOS QUE CONTIENEN LOS
ENLACES INTRAMOLECULARES DE LA COLAGENA.**



QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A

MARIA MAGDALENA AGUIRRE PINEDA

MEXICO, D. F.

1968



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

J U R A D O.

PRESDENTE:	Ma. Guadalupe Voles Pratt.
VOCAL:	Miguel Flores Aparicio.
SECRETARIO:	Graciela Zarate Duran.
1er. SUPLENTE:	Rosa Martha Gonzalez Nuñez.
2do. SUPLENTE:	Rosaura Lugo Arcos.

SITIO DONDE SE DESARROLLA EL TEMA:

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES DE LA NUTRICION.
BIOQUIMICA.**

ASESOR DEL TEMA:	Dr. Miguel Flores Aparicio.
ASESOR TECNICO:	Dr. Marcos Rojkind Matkuk.
SUSTENTANTE:	Ma. Magdalena Aguirre Pineda.

Para quien soy:

hija

hermana.

Para quien fui:

alguno

compañero.

INTRODUCCION

Las proteínas son macromoléculas constituidas por aminoácidos unidos a través de uniones de tipo amida, llamados enlaces peptídicos. La función de las proteínas depende en parte de su estructura tridimensional y ésta a su vez es consecuencia de la composición y secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica.

Las proteínas se han clasificado de diversas maneras, aunque casi siempre de acuerdo con sus características de solubilidad. En general se pueden clasificar en tres grandes grupos: simples, conjugadas y derivadas. Dentro del grupo de proteínas simples se encuentran las albúminas, globulinas, glutelinas, protaminas, albuminoides o escleroproteínas, histonas y protaminas. En el grupo de proteínas conjugadas están las glucoproteínas, metaloproteínas, fosfoproteínas y lipoproteínas. En el grupo de las derivadas se tienen productos obtenidos por hidrólisis parcial de las proteínas y abarca a las metaproteínas, proteosas, peptonas y péptidos.

La colágena, proteína que se estudia en el presente trabajo pertenece al grupo de las proteínas simples y al subgrupo de las albuminoides o escleroproteínas.

La colágena es la proteína más abundante del reino animal y se ha calculado que representa cerca del 25% del total de las proteínas en los mamíferos (1). Se ha demostrado también, que las clases inferiores como Porífera, Celenterados y Nematoelmin^{tes} contienen colágena (2).

En los animales superiores (mamíferos) la colágena se encuentra ampliamente distribuida en el tejido conjuntivo laxo, o formando parte de tejidos especializados como hueso, cartílago, dientes, etc. Sus propiedades físicas varían en diferentes partes del orga

nismo: es opaco y de color nacarado en el tendón, o es completamente transparente en la córnea, permitiendo la llegada de los rayos luminosos a la retina.

El tejido conjuntivo de diferentes partes del organismo se encuentra afectado en un número elevado de padecimientos, tanto adquiridos como hereditarios (3). El mejor conocimiento de la estructura integral de la colágena, de la relación entre su estructura y su función tal vez faciliten el entendimiento de las enfermedades que la afectan, así como los mecanismos de producción de esas alteraciones.

MÉTODOS GENERALES DE EXTRACCIÓN Y PRECIPITACIÓN DE COLÁGENA

La colágena puede ser extraída de los tejidos por diferentes métodos, sin embargo, la cantidad total que se obtiene en forma nativa es solamente un 10% del total; ésto indica, que la mayor parte de la colágena se encuentra agregada en los tejidos o asociada a otras estructuras como el ácido hialurónico (4). Las formas insolubles sólo se pueden obtener utilizando condiciones drásticas que deforecan la estructura de la proteína o la degradan.

Los métodos utilizados para la extracción se basan en la incubación del tejido por estudiar con soluciones salinas o ácidos diluídos por períodos de 24 hs. (5, 6). Jackson (7) y Lowther, Green y Chapman (8) demostraron que la colágena soluble en soluciones salinas diluídas es la recientemente sintetizada por los tejidos. La colágena soluble en ácido representa a la colágena en un estadio posterior de maduración (7).

La colágena solubilizada por cualquiera de los métodos anteriormente mencionados se puede reconstituir en tres diferentes formas fácilmente reconocibles con el microscopio electrónico (9). -

La forma llamada nativa (por ser idéntica a la estructura de la colágena en los tejidos) se puede obtener por diálisis de un extracto ácido contra soluciones diluidas de fosfato dibásico de sodio - (10). Esta forma de precipitado se caracteriza por la presencia de fibras agrupadas en forma longitudinal que muestran una periodicidad característica de 640 \AA (10).

La forma llamada "SLS" (del Inglés "Segment Long Spacing") se obtiene cuando a un extracto de colágena en ácido acético se le -- agrega una pequeña cantidad de ATP (9). Esta forma de reconstitución está caracterizada por agregados laterales de fibrillas que -- corren paralelamente una a la otra y tienen la misma polaridad; -- además, el principio y fin de cada una de las fibrillas coincide. Estos agregados tienen un diámetro variable y una longitud de --- $2\ 800 - 3\ 000 \text{ \AA}$ (9). Cuando se tiñen con ácido fosfotúngstico o -- acetato de Uranilo se demuestran numerosas bandas las cuales han -- sido estudiadas por Hodgo y Schmitt (10).

La tercera y última estructura se obtiene dializando un ex--- tracto ácido de colágena contra una solución que tenga una concen--- tración baja de glucoproteínas de tipo alfa 1. Este agregado se -- conoce con el nombre de "FLS" (del Inglés "Fibrous Long Spacing") y se caracteriza por el agrupamiento de las fibras en forma longi--- tudinal (11). Las tinciones con ácido fosfotúngstico o acetato de Uranilo han demostrado que las fibrillas se encuentran orientadas en forma antiparalela, es decir, que el principio de una fibra --- coincide con la cola de la segunda (10).

Por los estudios arriba mencionados se demostró que la tropo--- colágena (unidad básica de la proteína) tiene una longitud de --- $2\ 800 \text{ \AA}$ y un diámetro aproximado de 15 \AA . Se pudo también sugerir

que cuatro de los períodos de 700 Å corresponde al tamaño original de la fibra (10). Además, los estudios cristalográficos de ~~Amesbury~~ (12, 13), Rich y Crick (14), Cowman, McGavin y North (15) y Hoar (16, 17) han demostrado que la colágena tiene una estructura semejante a la poli-prolina de tipo II (13). Cada cadena polipeptídica (de las tres que tiene la tropocolágena) forman una hélice con giro en sentido contrario de las manecillas de un reloj. Las tres cadenas a su vez se enrollan sobre un eje común formando una super-hélice derecha (13).

ESTRUCTURA QUÍMICA

La tropocolágena está constituida por tres cadenas de polipéptidos, compuestas por cerca de mil residuos de aminoácidos y con un peso molecular de 300 000.

Las fuerzas que mantienen estas cadenas unidas son de diversos tipos: unas de ellas débiles y fácilmente destruibles con el calor. Estas uniones son del tipo de los puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas y uniones tipo sal. Conforme la proteína madura o envejece aparecen uniones covalentes que solo se rompen por hidrólisis ácida o alcalina de la proteína. Las tropocolágenas denominadas jóvenes (por ejemplo colágena soluble en NaCl 0.5 N), mantienen su conformación principalmente por uniones débiles que con el calentamiento moderado se disocian en sus componentes originales transformándose de estructuras helicoidales en estructuras lineales. La colágena en este estado recibe el nombre de gelatina y sus componentes pueden separarse por cromatografía en carboximetilcelulosa (18, 19, 20). Con este fraccionamiento se obtienen dos cadenas diferentes que han recibido el nombre de alfa 1 la más ácida y alfa 2 la más básica (18).

La proporción de alfa 1 y alfa 2 es de dos a uno, lo que indica -- que la unidad molecular o trolecolágena está formada por dos cadenas alfa 1 y una alfa 2. En la colágena obtenida de la piel de ba calas se ha demostrado claramente que la cadena alfa 1 representa en realidad una mezcla de dos cadenas polipeptídicas diferentes -- que se han denominado alfa 1 y alfa 3 (21). Esto indica que la mo léc ula en este caso está formada por tres cadenas diferentes (alfa 1, alfa 2, alfa 3). En la tabla I se muestra la composición de -- aminoácidos de los tres componentes alfa obtenidos por Ploz y col. (21).

La colágena más madura muestra dímeros de 200 000 de peso molecular, que se derivan de la unión covalente entre dos cadenas al fa, y reciben el nombre de componentes beta. Su separación en car boxim til cel ulosa muestra 2 componentes: beta 1,1 derivado de la -- unión de dos alfa 1, y beta 1,2 derivado de alfa 1 más alfa 2 (18). Por último, de la unión de las tres cadenas alfa se forman compo nen tes de 300 000 de peso molecular que reciben el nombre de compo nen tes (22). Las uniones covalentes entre alfa y alfa para formar betas pueden ser de dos tipos: 1) intramoleculares cuando se unen cadenas alfa de una misma molécula ó 2) intermoleculares cu an do la unión se realiza entre dos cadenas alfa de dos moléculas diferentes.

En el año de 1964 Bornstein y col. (23) encontraron en coláge na muy polimerizada, cadenas del tipo beta 2,2, las cuales se ori gin ar on por unión intermolecular de dos cadenas alfa 2.

T A B L A I
COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE COLAGENA DE PIEL DE BACALAO
Y SUS CONSTITUYENTES

(Residuos por 1000 residuos de aminoácidos)

AMINOACIDOS	COLAGENA	a1	a2	a3
Hidroxi prolina	56	56	60	61
Acido aspártico	51	50	56	51
Treonina	23.2	21.4	25.9	23.2
Serina	66	68	68	70
Acido glutámico	75	77	63	80
Prolina	98	99	97	95
Glicina	347	345	340	352
Alanina	111	125	109	101
Valina	98.8	14.6	21.1	20.8
Metionina	16.7	14.2	16.9	15.7
Isoleucina	11.0	10.3	10.8	9.1
Leucina	20.6	17.9	24.2	17.3
Tirosina	3.6	1.0	6.4	2.5
Fenilalanina	11.5	13.6	7.9	11.5
Hidroxilisina	6.6	5.0	8.3	4.8
Lisina	26.2	29.0	20.3	28.7
Histidina	7.7	4.6	11.6	6.5
Arginina	52.0	50.0	54.0	50.0

Ples (1965) (21).

La colágena es una proteína que se caracteriza por tener un contenido alto de glicina (33%), prolina e hidroxiprolina (25%) y por su contenido bajo en tirosina. Carece de triptofano y cisteína y tiene un aminoácido que es exclusivo de esta proteína, la hidroxilisina.

La secuencia de aminoácidos de la proteína aún no se conoce, sin embargo, se tiene información alada sobre algunas partes de la molécula. Los estudios realizados por Bear (16) sugirieron la presencia de dos zonas diferentes en la proteína; una cristalina y otra amorfa. Fraschlan y col. (24), mostraron que las zonas cristalinas corresponden a sitios de la proteína en los que predomina la secuencia Gly-Prol-X, en la cual X puede ser cualquier aminoácido, pero más frecuentemente hidroxiprolina o Alanina. Estas zonas, son fácilmente digeridas por colagenasa y el material se obtiene como tripéptidos con la secuencia arriba anotada.

Schroenleher y col. (25), Gallop y col. (26) y Gallop y Seifter (27), han demostrado que los tripéptidos Glicina, Prolina, Hidroxiprolina y Glicina, Prolina, Alanina se encuentran en concentraciones sumamente elevadas; contienen el 23% total de alanina, 14% de la glicina, 23% de la hidroxiprolina y 40% de la prolina. Las zonas amorfas corresponden a los sitios en donde se encuentran un mayor número de aminoácidos polares. Estas zonas son fácilmente atacables por enzimas proteolíticas; pero son resistentes a la digestión por colagenasa (24). En resumen, se puede considerar que la colágena está formada por la repetición alterna de una zona polar y una no polar.

El Dr. Gallop ha ilustrado en forma esquemática la distribución de aminoácidos de ambas zonas en la siguiente forma:

Zona cristalina (GII-Pro-X)

Zona amorfa GII-Pro (Glu₂ Glu₂ Asp₁ Lys₁ Ala₂ Ser₁ X) Pro-X.

Del análisis de algunas péptidos de ambas zonas se calculó un peso molecular aproximado de 2 000 a 3 000, tanto para la región amorfa como para la cristalina (28).

LOS ALDEHIDOS DE COLÁGENA

Lambucci en el año de 1936 (29), encontró que la gelatina comercial daba reacción positiva con el ácido tiobarbitúrico, indicando la presencia de grupos carbonilo. Años más tarde Lovenne -- (30) observó que la colágena purificada incubada con 2,4-dinitrofenilhidrazona formaba 2,4-dinitrofenilhidrazonas.

Rojkind, Blumentfeld y Gallop (31, 32) y Bornstein y col. (33, 34) han aislado por diferentes métodos, péptidos que contienen un aldehído alfa-beta no saturado unido en forma covalente a la colágena. Los péptidos aislados aunque son de especies diferentes -- muestran las siguientes características similares: la ausencia de aminoácidos básicos, hidroxiprolina, treonina, leucina, isoleucina y fenilalanina; los péptidos están enriquecidos en aspártico, serina, glutámico, y contienen además tirosina.

Bornstein y Pier (34), Rojkind y Juárez (35) y Page y Banditt (36), demostraron que la colágena obtenida de animales latiféricos (trastorno en la maduración), es deficiente en aldehidos.

OBJETO

La participación de los aldehidos en los fenómenos de maduración y envejecimiento de la protefina ha sido plenamente demostrado (33, 34, 35, 36, 37). Inclusive se ha estudiado la biosíntesis de

los compuestos se ha postulado (37) y confirmado el mecanismo de formación de los enlaces covalentes.

Debido a la importancia que tienen los fenómenos de maduración de colágeno, y la relación que existe entre las enfermedades que afectan a la proteína y su estado de maduración, se intentó desarrollar métodos que fueran útiles en la purificación del péptido con el enlace intramolecular. Además, se creyó pertinente hacer el estudio comparativo con dos especies diferentes de colágeno, para determinar la universalidad del fenómeno.

MATERIAL Y METODOS

Reactivos empleados

Todos los reactivos utilizados fueron del mejor grado existente en el mercado; la Piridina se obtuvo de J. T. Baker; Ninhidrina de Pierce Chemical Company; Carboximetilcelulosa (CMC) y Bio-Gel P-2 se obtuvieron de Rio-Rad; DEAE-celulosa de Serva Entwicklungslabor, Heidelberg; 2,6-Dinitrofenilhidrazina (2,6-DNFH) se compró en Matheson Coleman y Bell. La colagenasa bacteriana purificada, fué un obsequio del profesor Sam Seifter y del doctor Elvin Harper, del Departamento de Bioquímica, Albert Einstein College of Medicine, New York.

Métodos

Cincuenta ratas machos de la cepa Mister con un peso entre 75-100 gr. se sacrificaron por decapitación. La piel se rasuró, se cortó en pequeños fragmentos y se almacenó a 4°C.

Una piel de becerro de un animal recién sacrificado: se rasuró y se cortó en pequeños fragmentos. La piel se guardó a 4°C en lotes de 500 gr. cada uno.

Extracción de colágena soluble en citrato

La colágena de piel de rata o de becerro se obtuvo según el método de Gallop (6). A un lote de 500 gr. de piel (de rata o de becerro), se le agregaron dos volúmenes de solución amortiguadora de citrato 0.1 M a pH 5.3; el material se guardó en una botella de plástico, se cerró herméticamente y se dejó agitando por 24 hs. a 4°C en un agitador marca Burrell. Las pieles se separaron del sobrenadante por filtración a través de una gasa y el sobrenadante se centrifugó a 20,000 r.p.m. durante una hora en una centrifuga - MSE 40. El sobrenadante se diálizó durante 48 a 72 hs. contra una solución de fosfato monobásico 0.02 M cambiando la solución cada 24 hs. La colágena se precipitó en forma de agregados de color blanco nacarado. La colágena purificada, se disolvió en ácido acético 0.5 M se liofilizó y se guardó a 4°C en un ambiente libre de humedad. Toda la manipulación de las pieles hasta la obtención de la colágena se llevó a cabo a una temperatura de 4°C. El procedimiento de extracción se repitió 3 veces.

Cromatografía en Carboximetilcelulosa (CMC)

Las cadenas alfa y beta se obtuvieron por cromatografía en -- carboximetilcelulosa utilizando el procedimiento de Pies y col. -- (10). La CMC se lavó sucesivamente con NaOH-NaCl 0.5 M, H₂O y una solución amortiguadora de acetato 0.06 M pH 4.5 siguiendo la técnica descrita por Peterson y Sauer (28). La resina se empacó a presión en una columna de 2.5 x 18 cm. a 45°, utilizando una bomba -- Sigmator. La temperatura de las columnas se mantuvo constante a 40°C recirculando agua de un baño a 45°C.

Todas las soluciones utilizadas para lavar o llevar a cabo la cromatografía se calentaron a 60°C con objeto de desincrustar el lí-

quido y evitar la aparición de burbujas en las resinas. Cien a --
ciento cincuenta mg. de colágena se dejaron toda la noche agitando
con 50 ml. de amortiguador de acetatos 0.06 N pH 4.4; y después se
gelatinizaron en un baño de agua a 70°C durante 30'. Las particu-
las no disueltas se eliminaron después de centrifugar a 100,000 x
g. La muestra (a 60°C) se inyectó en la columna a 200 ml/hora con
la ayuda de una bomba Sigmator. Inmediatamente después de apli-
cada la muestra se comenzó la elución con un gradiente lineal de -
NaCl de 0 a 0.1 N en un volumen de 800 ml. de solución amortiguado
ra de acetatos 0.06 N pH 4.4. Se graficó la D.O. contra el volu-
men de elución y los tubos que contenían las cadenas alfa₁, beta₁₁,
beta₁₂, alfa₂ se juntaron por separado y se dializaron contra agua
destilada hasta que quedaron libres de sales. Las cadenas purifi-
cadas se liofilizaron y se guardaron en una atmósfera libre de hu-
medad. La pureza de las fracciones se verificó por electroforesis
en geles de acrilamida, utilizando la técnica de Nagai y col. (39).

Purificación del péptido con el aldehído alfa-beta no saturado

Treientos cincuenta mg. de beta₁₁ y beta₁₂ obtenidos de ---
piel de rata o de becerro se disolvieron en 50 ml. de agua, calen-
tando en baño de agua a 70°C. Una vez disuelta la colágena, se en-
frió a temperatura ambiente y se agregaron dos ml. de una solución
al 0.2% de 2,4-dinitrofenilhidrazina en HCl y el pH se ajustó inme-
diatamente a 3.0. La muestra se agitó durante 30 minutos a tempe-
ratura ambiente y se dializó contra 4 lts. de agua destilada, cam-
biando el agua 4 ó 5 veces durante 24 hs. La colágena marcada con
2,4-dinitrofenilhidrazina (con el procedimiento anterior se forma
la 2,4-dinitrofenilhidrazona del aldehído alfa-beta no saturado) -
se ajustó a una molaridad de 0.005 N en CaCl₂ y el pH se llevó a -

8.0 con NaOH 0.1 N. La muestra se mantuvo en el potenciómetro con agitación constante y se le agregaron 0.2 ml. de una solución de colagenasa al 0.1% en agua destilada. El pH se mantuvo constante en 8.0, agregando pequeñas cantidades de NaOH 0.1 N; cuando el pH no varió (aproximadamente una hora después de agregar la colagenasa), la muestra se transfirió a una botella de plástico y se incubó durante 24 hs. en un baño de agua a 39°C, agitando constantemente.

La muestra digerida con colagenasa se cromatografió en una columna de DEAE-celulosa de 2.5 x 20 cm. utilizando la técnica que se describe a continuación:

La DEAE-celulosa se lavó sucesivamente con HCl 1 N, NaOH 1.0 N, H₂O y se suspendió en una solución amortiguadora de Tris. HCl 0.05 N pH 8.3 (Tris-hidroximetilaminometano). Se empacó la columna a presión utilizando una bomba Sigmanotor con un flujo de 100 ml/hora; después de lavar la columna durante tres horas con la solución amortiguadora arriba anotada, los 50 ml. del digerido enzimático se inyectaron en la columna con la bomba Sigmanotor. Los péptidos se eluyeron con 300 ml. de la solución amortiguadora Tris HCl 0.05 N pH 8.3 y después de un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1 M en un volumen de 600 ml. de solución Tris. HCl 0.05 N pH 8.3. Se colectaron fracciones de 9 ml. y la absorbancia de cada fracción se determinó a 230, 280, 390 mμ. La fracción más ácida que contenía el material que absorbe a 390 mμ (2,4-dinitrofenilhidrazo del aldehído alfa-beta no saturado) se liofilizó, se disolvió en ácido acético 0.25 N y se desalificó en una columna de Bio-Gel P-2 (2.2 x 35 cm.) equilibrada con acético 0.25 N. La columna se corrió a 40 ml/hora y se colectaron fracciones de 4 ml. cada una. La absorbancia de cada fracción se determinó a 230, 280, 390 mμ.

El pico que contenía la 2,4-dinitrofenilhidrazona del aldehído se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio y se disolvió en un pequeño volumen de agua. La purificación final se logró llevando a cabo una electroforesis en papel Whatman 3 MM por tres horas a 10 v/cm. en una solución amortiguadora de piridina acetato 0.1 M pH 4.0. La banda que contenía la 2,4-dinitrofenilhidrazona del aldehído alfa-beto no saturado, se eluyó del papel con agua destilada y se evaporó a sequedad. La muestra se disolvió en agua destilada y se determinó la concentración del aldehído a 390 m μ utilizando un coeficiente de extinción molar de 20,000 (31, 32).

Análisis de Aminoácidos

Alícuota que contenía entre 0.03-0.1 micromoles de aldehído se neutralizó con un volumen igual de HCl 12 N y se depositaron en el fondo de una ampollita de vidrio. Las ampollitas se cerraron al vacío y se hidrolizaron durante 24 hs. a 104°C.

Los hidrolizados se evaporaron a sequedad en un evaporador rotatorio, se disolvieron en agua y se volvieron a evaporar hasta eliminar por completo el HCl de la muestra. El hidrolizado se disolvió en un mililitro de agua y su composición de aminoácidos se determinó en un analizador Beckman Spinco 120 utilizando la técnica de Spackman, Moore y Stein (40).

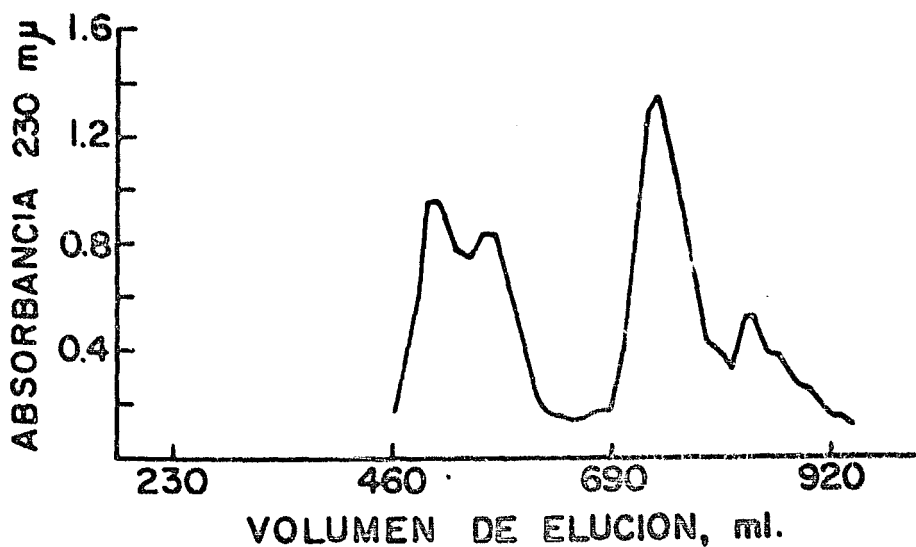
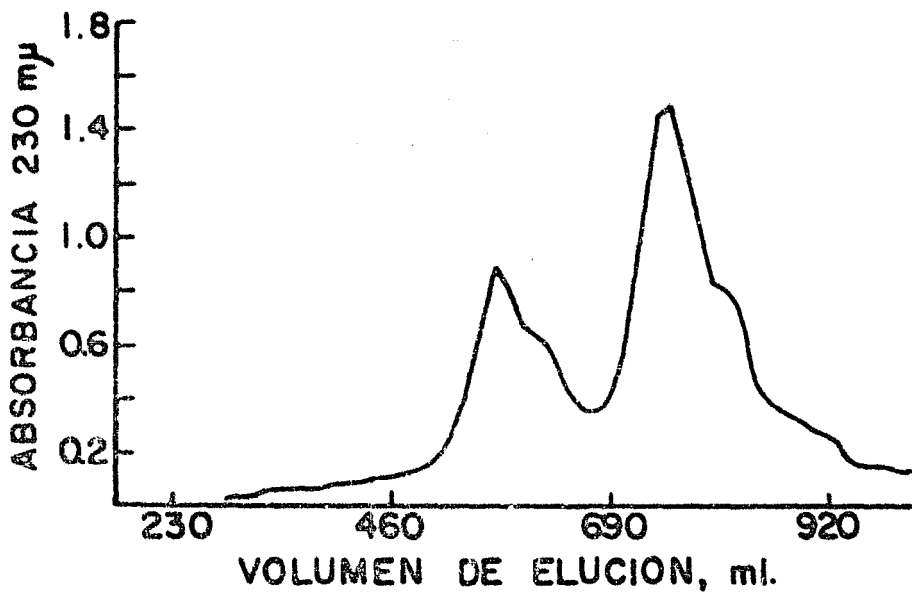
RESULTADOS

Cromatografía en CMC

Los resultados obtenidos en la cromatografía de colágena en CMC fueron idénticos a los encontrados por Pize y col. (18). Como se observa en la gráfica 1; el primer pico de rata o de becerro es

GRAFICA # 1

Cromatografía en carboximetilcelulosa (CMC) de 150 mg. de colágena desnaturalizada de piel de buey (gráfica superior) y piel de rata (gráfica inferior). La elución se llevó a cabo con una solución amortiguadora de acetato de sodio 0.06 N, pH 4.4, con un gradiente lineal de 0.0-0.12 M de NaCl en un volumen total de 100 ml.



está constituido por dos fracciones, la primera corresponde a α_1 y la segunda a β_{11} . El segundo pico representa a la β_{12} y el último a α_2 . Fracciones purificadas de cada uno de los cuatro picos se corrieron en geles de acrilamida, para determinar su grado de pureza. Sin embargo, como es muy difícil separar la β_{11} de α_1 en la piel de becerro, se utilizó el pico contaminado tomando en cuenta que el péptido con el aldehído alfa-beta no saturado sólo se encuentra en las cadenas beta.

Purificación del péptido con el aldehído alfa-beta no saturado

La incubación de β_{11} o β_{12} de colágena de rata o de becerro con 2,6-dinitrofenilhidrazina, dió origen a un solo componente con longitud de onda máxima a 390 m μ en ácido y 450 m μ a pH 12.0. Esta absorción a pH ácido y alcalino es característico de las 2,6-dinitrofenilhidrazonas de aldehídos alfa-beta no saturados en soluciones acuosas (31). Estos resultados son semejantes a los encontrados por Rajind, Blumenfeld y Gallop (31, 32) con colágena de la vejiga natatoria de la carpa (ichthyocol). A pesar de existir un aldehído simple en la proteína, no es posible detectarlo -- por este método, ya que los derivados de los aldehídos simples son inestables en soluciones acuosas (41).

La proteína marcada con 2,6-dinitrofenilhidrazina se digirió fácilmente con colagenasa y después de 24 hs. de incubación con la enzima, la proteína estaba completamente degradada. Aún cuando no se determinó el número de péptidos obtenidos con cada una de las cadenas, la colágena total marcada de la misma manera da un número de péptidos semejante a los que se obtienen con ichthyocol (27). Los grupos amino libres aumentaron de cinco a seis veces, después de 24 hs. de incubación.

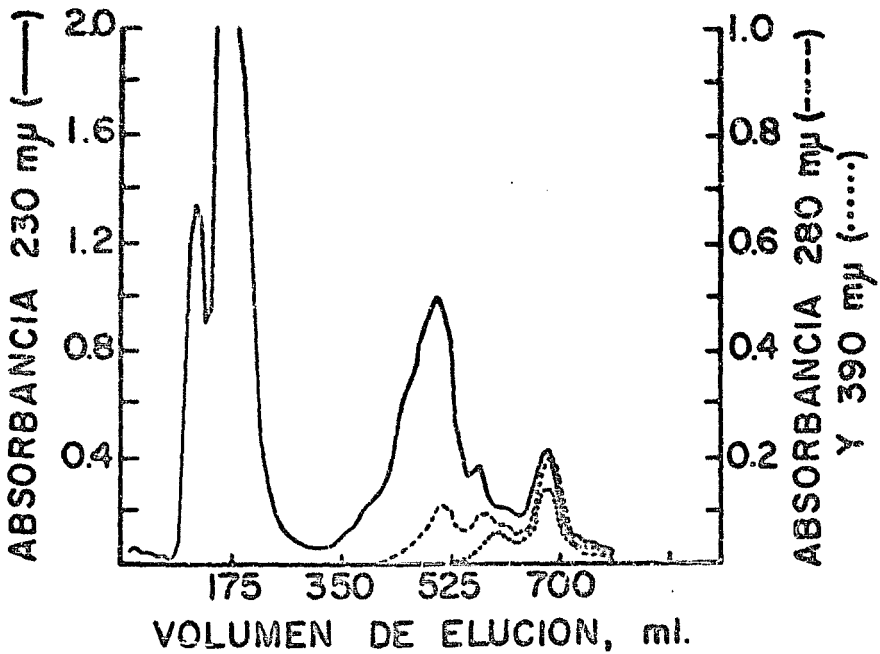
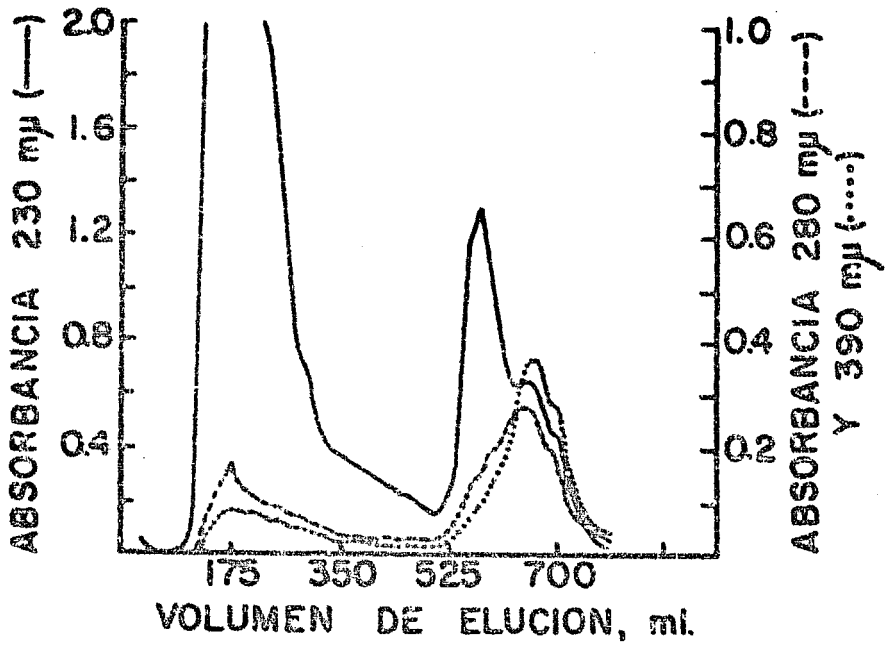
Cada una de las fracciones digeridas con colagenasa se cromatografiaron en una columna de DEAE-celulosa y los resultados obtenidos se muestran en las gráficas 2 y 3 como se aprecia en las cuatro gráficas diferentes, el patrón es bastante semejante y está -- constituido por una fracción básica que se eluyó de la columna con la solución amortiguadora inicial y que contiene una concentración elevada de carbohidratos. Este dato está de acuerdo con los hallazgos de Connelaghan y Butler (42) quienes demostraron que la mayor parte de los carbohidratos se encuentran ligados a OH-lisina - en fracciones básicas de la proteína original.

El último componente (Fracción IV) que es el de mayor interés para el presente trabajo, contiene aproximadamente el 6 y el 11% de la proteína total, el 36-45% de la tirosina y del 70-94% del material que absorbe a 390 m μ y que corresponde a la 2,4-dinitrofenilhidrazona del aldehído alfa-beta no saturado (ver Tabla II). - El valor elevado de tirosina y de aldehído en una sola fracción está de acuerdo con los datos de Rojkind, Blumenfeld y Gallop (31, - 32) y Bornstein y Piez (33, 34), quienes demostraron que el péptido con el aldehído contiene también tirosina. La fracción intermedia contiene péptidos neutros y ácidos, tiene una pequeña proporción de tirosina y carece de material que absorbe a 390 m μ .

La fracción enriquecida con aldehído alfa-beta no saturado se desalificó en una columna de Bio-Gel P-2 y los resultados se muestran en la gráfica 4. El primer pico que sale con el volumen de exclusión de la columna contiene el 50% del aldehído, está libre de sales y se purifica fácilmente por electroforesis en papel. El péptido con la 2,4-dinitrofenilhidrazona del aldehído alfa-beta no saturado, se mueve hacia el ánodo con un desplazamiento de 2 - 3 -

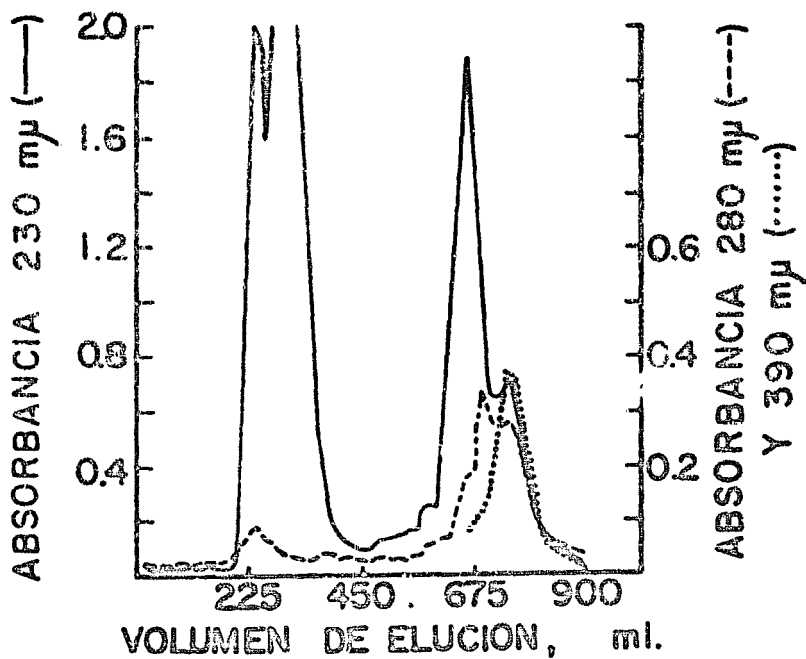
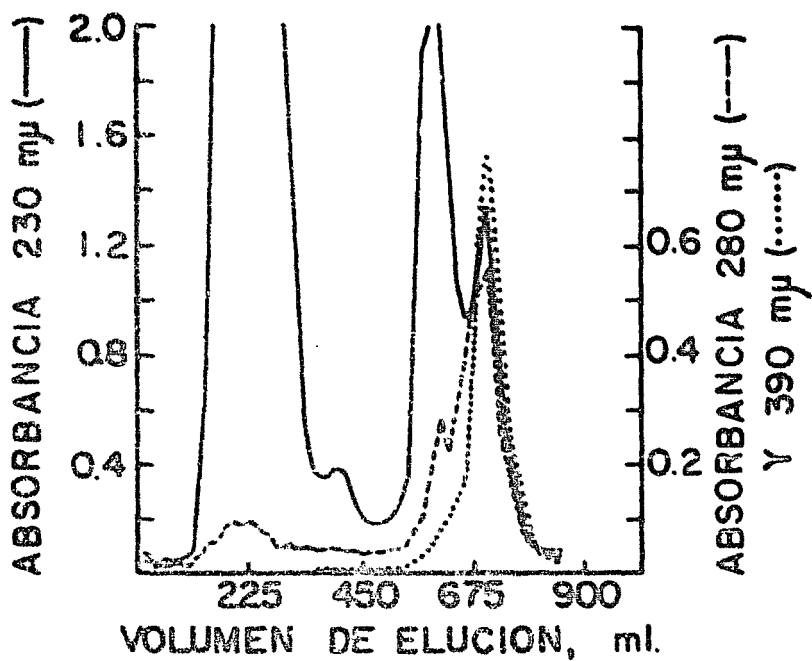
GRAFICA # 2

Cromatografía en DEAE-celulosa de un digerido de colágena de piel de rata (marcada con 2,4-dinitrofenil hidrasina) con colagenasa bacteriana purificada. Gráfica superior A₁₂; gráfica inferior -- A₁₁. La elución se llevó a cabo con 300 ml. de solución amortiguadora Tris. HCl 0.05 M y un gradiente de NaCl 0.0-0.5 M en un volumen total de 600 ml. de la solución amortiguadora.



GRAFICA # 3

Cromatografía en DEAE-celulosa de un digerido de colágena de piel de becerro (marcada con 2,4-dinitrofenil hidrasina) con colagenasa bacteriana purificada. Gráfica superior β_{12} ; gráfica inferior β_{11} . La elución se llevó a cabo con 100 ml. de solución amortiguadora Tris. HCl 0.05 M y un gradiente de NaCl 0.0-0.5 M en un volumen total de 600 ml. de la solución amortiguadora.



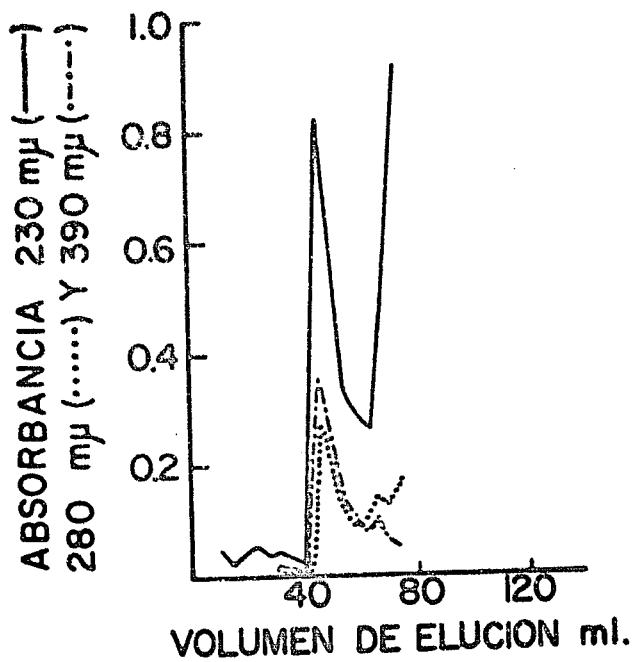
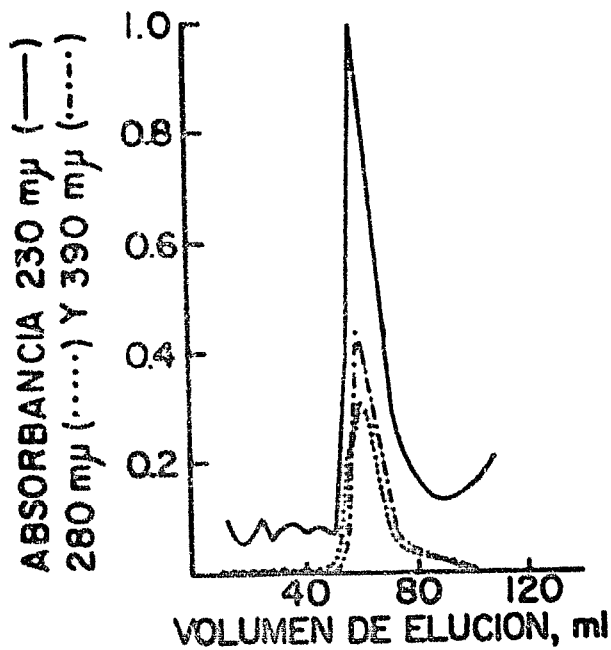
T A B L A II

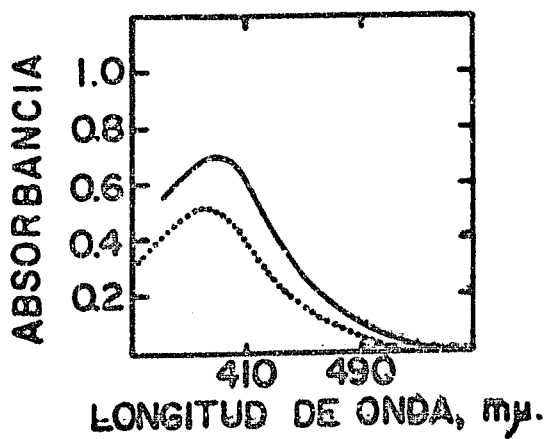
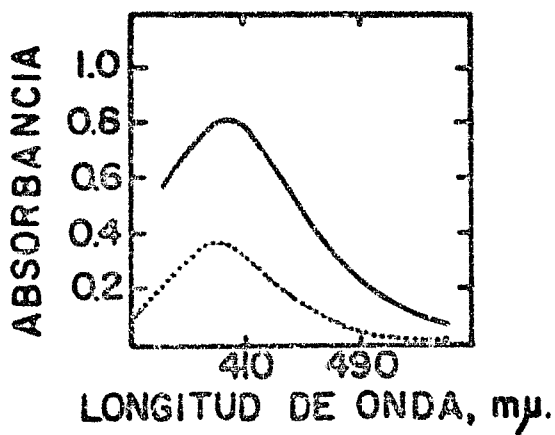
RECUPERACION DE PROTEINA (ABSORBIANCIA A 230 m μ), TIROSINA
(ABSORBIANCIA 280 m μ), ALDEHIDO ALFA-BETA NO SATURADO (AD-
SORBIANCIA 390 m μ) EN EL PICO IV OBTENIDO POR CROMATOGRA-
FIA EN BEAN-CELULOSA

ESPECIE	D.O. TOTALES			% DE RECUPERACION EN EL PICO IV		
	230 m μ	280 m μ	390 m μ	230 m μ	280 m μ	390 m μ
RATA						
Heta ₁₁	44.3	2.9	1.2	6.9	36.3	89.3
Heta ₁₂	38.9	7.3	4.9	10.1	36.5	72.2
DECENRO						
Heta ₁₁	97.0	11.8	5.3	10.8	35.5	81.5
Heta ₁₂	166.4	15.5	15.6	10.6	44.6	94.5

GRAFICA 4 b

Cromatografía en Bio-Gel P-2 de la fracción rica en el péptido con el aldehído ($m_{r} = 190$ eu), obtenida de la columna de DEAE-celulosa. Gráfica superior S₁₁; gráfica inferior S₁₂.





cm. para el de rata y de 4 - 5 cm. para el de becerro.

Tiras de un cm. de diámetro recortadas de cada extremo del pa pel se revelaron con ninhidrina al 0.2% en acetona y muestran que el péptido con el aldehído está completamente puro y no da reac--- ción con la ninhidrina. Este dato sugiere la ausencia de grupos - amino libres en estos péptidos y también indica que provienen de - la región amino - terminal de la colágena que tiene sus grupos ami no bloqueados (33). Los pequeños contaminantes se desplazan hacia el cátodo, dan reacción positiva con la ninhidrina y no tienen aldehídos detectables. Los espectros de absorción de los péptidos - purificados se muestran en la gráfica 3. Se puede apreciar que -- las curvas obtenidas son idénticas a las previamente informadas pa ra ichthyocol (31, 32) y rata (33, 34).

La composición de aminoácidos de los péptidos obtenidos de be ta₁₁ y beta₁₂ de rata y de becerro, y de la colágena sin fraccio--- nar, se muestran en la tabla III. Se puede apreciar que existe po ca diferencia en la composición de aminoácidos de los péptidos ob- tenidos de cadenas purificadas de rata. Ambos péptidos tienen ti- rosina, aminoácidos ácidos, serina, valina y carecen de hidroxipro- lina, treonina, isoleucina y fenil-alanina. Esta información es - idéntica a la obtenida por Bornstein y Pica para péptidos de ---- beta₁₁ y beta₁₂, después de romper la proteína con bromuro de cian- ógeno (33, 34). Sin embargo, es notoria la diferencia entre la - colágena de becerro y de la rata. Aunque ambas proteínas muestran semejanzas importantes, la colágena de becerro contiene además --- treonina, isoleucina, leucina y fenil-alanina.

T A B L A III

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DEL PEPTIDO QUE CONTIENE EL ALDEHIDO ALFA-BETA NO SATURADO, CONTENIDO DE YCHTIVOCOL Y DE LAS CADENAS AISLADAS DE PIEL DE RATA Y PIEL DE BUEYERRO

COMPONENTES	RATA		BUEYERRO		YCHTIVOCOL (a)
	Beta ₁₁	Beta ₁₂ (b)	Beta ₁₁ (b)	Beta ₁₂ (b)	
Aldehido (c)	1	1	1	1	1
Metionina (d)	2	2	1	1	2
Acido aspártico	2	2	2	2	2
Treonina (e)	0	0	1	1	0
Serina (e)	3	3	3	3	3
Prolina	4	4	3	3	4
Acido glutámico	2	2	3	3	4
Glicina	6	6	8	8	10
Alanina	2	2	1	1	4
Valina	4	3	1	2	1
Leucina	0	0	1	1	trazas
Isoleucina	0	0	1	1	0
Tirosina (e)	2	2	1	1	1
Fenilalanina	0	0	1	1	0

(a) Tomado de Rajkind y col. (31)

(b) Promedio de dos o más preparaciones.

(c) Determinado como 2,4-dinitrofenilhidrazona max a 390 m μ , asumiendo un coeficiente de extinción molecular de 20,000 (31).

(d) Determinado como Metionina y sulfóxidos de metionina.

(e) No se corrigió para la cantidad destruida durante la hidrólisis.

DISCUSION

El trabajo realizado en los últimos 5 años por diferentes grupos de investigadores ha permitido esclarecer algunos aspectos importantes de la maduración y envejecimiento de la colágena, así como los grupos responsables de este proceso.

En el año de 1956 (29) Lamducci ofreció la primera indicación de la presencia de aldehídos en colágena, sin embargo, la colágena por él utilizada era desnaturalizada y extraída con medios alcalinos. Se sabe en la actualidad, que la exposición prolongada de cualquier proteína a medios alcalinos produce la desaparición de serina y treonina y la formación de compuestos con grupos carbonilo. Años más tarde, Leveno observó que un grupo de compuestos que producen alteraciones en la maduración y envejecimiento de la colágena (nitrilos, hidrazinas y semicarbazidas) (33) tenían como característica común, la de ser reactivos para aldehídos. Pensando que la proteína pudiera tener grupos carbonilo, la incubó con 2,6-dinitrofenilhidrazina y mostró que se formaban productos (30). Algunos años más tarde, Rojkind, Blumenfeld y Gallop (31) purificaron un péptido de un digerido de colágena con colagenasa que tenía un aldehído alfa-beta insaturado. Por la reactividad de los grupos aldehído y por los defectos causados con los agentes estudiados por Leveno, se sugirió que estos compuestos podrían participar en la formación de enlaces covalentes en colágena y ser los responsables de la maduración y envejecimiento de la proteína.

Bornstein y Piez (34) se encontraban estudiando la manera de romper las cadenas de colágena en un número pequeño de fragmentos para así intentar caracterizar mejor la proteína y observaron lo siguiente: La incubación de cadenas alfa₁ o beta₁ con PABA (este

reactivo rompo las uniones peptídicas donde se encuentre un carbono de cetona) producía un número de péptidos de peso molecular entre 15 y 27,000 que eran idénticos en ambas cadenas, sin embargo en la fracción de peso molecular bajo encontraron algunos péptidos diferentes. Tomando en cuenta que estas diferencias podrían deberse a el enlace covalente que tienen las cadenas beta, modificaron los péptidos y encontraron que ambos tenían grupos aldehídos. El péptido obtenido de la cadena alfa tenía 14 aminoácidos y un aldehído de cadena simple mientras que el péptido de la cadena beta₁ tenía 28 aminoácidos y mostraba un aldehído alfa-beta in saturado. Esta fue la primera demostración directa de la participación de los aldehídos en la formación de los enlaces intramoleculares. Además, los autores sugirieron que la condensación aldólica de dos aldehídos simples (es decir dos cadenas alfa) daban origen a un aldehído alfa-beta no saturado (cadenas beta). Los mismos autores demostraron que la administración de lisina marcada -- con carbono 14 era seguida de la incorporación de la marca en los péptidos, a pesar que el análisis de aminoácidos no mostraba lisina. Reduciendo los péptidos con Borohidruro de sodio u oxidándolos con ácido perbórico demostraron que el compuesto radioactivo era lisina después de una desaminación oxidativa de su grupo -amino.

Recientemente, Rojkind, Rhi y Aguirre (37) utilizando lisina marcada homogéneamente con C¹⁴ y tritiada en posiciones específicas, lograron demostrar que el péptido de las cadenas beta tienen el equivalente de 2 lisinas modificadas (medido como C¹⁴) y por la cantidad de tritio eliminado se demostró que el mecanismo propuesto por Bornstein y Piez (34) para la formación del aldehído alfa-beta no saturado era el correcto.

Estos y otros datos de la literatura demuestran claramente la participación de los aldehídos en la formación de los enlaces covalentes y por lo tanto en la maduración y envejecimiento de la colágena.

Los estudios comparativos realizados en el presente trabajo muestran que) tipos diferentes de colágenas tienen características semejantes y por lo tanto sugieren que es un fenómeno universal, es decir, que posiblemente éste sea el mecanismo de envejecimiento de todas las colágenas. Por otro lado, las semejanzas y diferencias entre la composición de aminoácidos de las diferentes especies animales puede servir como un criterio más en la clasificación y origen de las diversas especies animales que tengan colágena.

Como se observa en los párrafos anteriores, los datos existentes en la literatura muestran ya alguna información en relación a los mecanismos de maduración de colágena. Sin embargo, faltan muchos problemas que aguardan ser resueltos en los próximos años. - Por ejemplo, aún no se conoce si los mecanismos de formación de enlaces intra e intermoleculares son los mismos, ni se tiene la estructura exacta del aldehído. El método sencillo de purificación del péptido con el aldehído alfa-beta no saturado, seguramente permitirá estudiar la relación entre los enlaces intra e intermoleculares, asimismo, facilitará la purificación y determinación de la estructura del aldehído alfa-beta no saturado.

BIBLIOGRAPHY

- 1.- Neuberger, A., Richards, V. F.: *Mammalian Protein Metabolism*. H. E. Munro y J. H. Allison Eds. Vol. 1, p. 26). Academic Press, New York.
- 2.- Gross, J.: *Comparative biochemistry of collagen*; In *Comparative Biochemistry. A Comprehensive Treatise*, M. Florkin and H. S. Mason, Eds. Vol. 9, p. 107, 1963. Academic Press, New York.
- 3.- He Kusick, V.: *Heritable disorders of connective tissues*. The Williams & Wilkin Co, Baltimore, 1958.
- 4.- Mathews, M.H.: The interactions of collagen and acid mucopolysaccharides. *Biochem. J.* 96: 710, 1965.
- 5.- Gross, J.: Studies on the formation of collagen. *J. Exper. Med.* 107: 247, 1958.
- 6.- Gallop, P. M.: Particle size and shape in a citrate extract of ichthyosol. *Arch. Biochem. Biophys.* 59: 484, 1955.
- 7.- Jackson, D. S.: The formation and removal of collagen in the carrageenan granuloma. *Biochem. J.* 64: 8, 1956.
- 8.- Loether, D. A., Green, W. M. and Chapman, J. A.: Morphological and chemical studies of collagen formation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10: 373, 1961.
- 9.- Gross, J., Highberger, J. H. and Schmitt, F. O.: Collagen structures considered as states of aggregation of a kinetic unit the tropocollagen particle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 40: 679, 1954.
- 10.- Hodge, A. J. and Schmitt, F. O.: The charge profile of the tropocollagen macromolecule and the packing arrangement in native-type collagen fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 46: 186, 1960.
- 11.- Schmitt, F. O., Gross, J. and Highberger, J. H.: A new particle type in certain connective tissue extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 42: 459, 1953.
- 12.- Ramachandran, G. N. and Kartha, G.: Structure of collagen. *Nature* 174: 269, 1954.
- 13.- Ramachandran, G. N. and Kartha, G.: Structure of collagen. *Nature* 176: 593, 1955.
- 14.- Rich, A. and Crick, F. H. C.: The structure of collagen. *Nature* 176: 915, 1955.
- 15.- Cowman, P. H., McGavin, S. and North, A. C. T.: The polypeptide chain configuration of collagen. *Nature* 176: 1602, 1955.

- 16.- Bear, P. S.: The structure of collagen fibrils. *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 7, pág. 69, 1952. Academic Press, Inc., New York.
- 17.- Bear, P. S.: The structure of collagen molecules and fibrils. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 163, 1956.
- 18.- Pios, E. A., Leite, W. S., Martin, G. R. and Green, J.: Subunits of the collagen molecule. *Biochim. Biophys. Acta* 11: 398, 1961.
- 19.- Kessler, A., Aron, H. and Lervenson, S. M.: Chromatographic fractionation of rat tail tendon collagen. *Nature* 194: 1540, 1962.
- 20.- Kessler, A., Aron, H. and Lervenson, S. M.: Chromatographic fractionation of acetic anhydride-labeled rat tail tendon collagen. *J. Biol. Chem.* 235: 219, 1960.
- 21.- Pios, E. A.: Characterization of a collagen from collagen skin containing three chromatographically different chains. *Biochemistry* 2: 2520, 1963.
- 22.- Voss, A., Ansey, J. and Cohen, J.: The characterization of the α component of gelatin. *Arch. Biochem. Biophys.* 26: 109, 1959.
- 23.- Bernstein, P. and Pios, E. A.: A biochemical study of human skin collagen and relation between intra- and inter-molecular cross-linking. *J. Cytol. Invest.* 5: 1817, 1966.
- 24.- Fransblau, C., Seifter, S., Gallop, P.M.: The "Nucleolytic" fraction obtained from iodoxycol digested with collagenase. *Biopolymers* 2: 105, 1964.
- 25.- Schrenkloher, H. E., Ogil, J. D. and Logan, H. A.: No tripeptides from an enzymatic digest of collagen. *J. Biol. Chem.* 234: 50, 1959.
- 26.- Gallop, P. M., Seifter, S., Michaels, L., Klein, L. and Hellman, E. Proc. 1st. Conf. Connective Tissue. Princeton, pág. 96, 1958. Helen Hay Whitney Foundation, New York.
- 27.- Gallop, P. M. and Seifter, S.: In *Collagen*, J. Ramakrishnan, Ed., pág. 249. Wiley Interscience, New York.
- 28.- Gallop, P. M.: Concerning some special features of the collagen molecule. *Biophys. J.* 4: 79, 1964.
- 29.- Landucci, J. M.: Recherche Sur les aldehydes existant dans les gelatines. *Bull. Soc. Chem. (France)* 21: 120, 1954.

- 30.- Levene, C. I.: Studies on the mode of action of lathyrogenic compounds. *J. Exptl. Med.* 116: 119, 1963.
- 31.- Rojkind, M., Blasenfeld, O. O. and Gallop, P. M.: Isolation of an aldehyde containing peptide from tropocollagen. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 17: 326, 1964.
- 32.- Rojkind, M., Blasenfeld, O. O. and Gallop, P. M.: Localization and partial characterization of an aldehydic component in tropocollagen. *J. Biol. Chem.* 241: 1530, 1966.
- 33.- Bornstein, A., Zaag, H. and Piez, K. A.: The nature and location of intramolecular cross-links in collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 55: 917, 1965.
- 34.- Bornstein, P. and Piez, K.A.: The nature of the intramolecular cross-link in collagen: The separation and characterization of peptides from the cross-link region of rat skin collagen. *Biochemistry* 5: 3803, 1966.
- 35.- Rojkind, M. and Juárez, M.: The nature of the collagen defect in lathyrism. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 25: 981, 1966.
- 36.- Page, R. C. and Benditt, E. P.: Molecular diseases of connective and vascular tissues. III. The aldehyde content of normal and lathyrotic soluble collagen. *Lab. Inv.* 18: 124, 1968.
- 37.- Rojkind, M., Rhi, L., Aguirre, M.: Biosynthesis of the intramolecular cross-links in rat skin collagen. *J. Biol. Chem.* 243: 2266, 1968.
- 38.- Peterson, E. A. and Sebor, H. A.: Column chromatography of proteins. Substituted celluloses in *Methods in Enzymology*, S. P. Colowick and V. C. Kaplan Eds. Vol. V, pág. 3, 1962. Academic Press, New York.
- 39.- Nagai, Y., Gross, J., Piez, K. A.: Disc electrophoresis of collagen components. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121: 494, 1964.
- 40.- Spackman, D. H., Stein, V. H. and Moore, S.: Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 20: 1190, 1958.
- 41.- Rojkind, M. and Gutiérrez, A.: The binding of thiosemicarbazide to collagen "in vitro". En preparación.
- 42.- Butler, V. T. and Cunningham, L. W.: Evidence for the linkage of a disaccharide to hydroxylysine in tropocollagen. *J. Biol. Chem.* 241: 3882, 1966.

- 43.- Pica, E. A., Martin, G. R., Kang, A. H. and Bornstein, P.
Heterogeneity of the chains of rat skin
collagen and its relation to the biosynthesis
of cross-links. *Biochemistry* 5: 3813, 1966.
- 44.- Levene, C. I. Structural requirements for lathyrogenic
agents. *J. Exper. Med.* 116: 295, 1961.



QUIMIO