

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ESTRUCTURALES
DE LA COLAGENA DE PIEL DE *ROMEROLAGUS DIAZI*

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO

RICARDO LOPEZ ESCALERA ROMANO

MEXICO, D.F. 1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CONTENIDO

| | | |
|------|------------------------------------------------|----|
| 1. | INTRODUCCION | 1 |
| 1.1 | ESTRUCTURA GENERAL DE LA MOLECULA | 2 |
| 1.2 | BIOSINTESIS | 4 |
| 1.3 | EL ARREGLO EXTRACELULAR | 7 |
| 1.4 | HETEROGENEIDAD MOLECULAR | 11 |
| 2. | MATERIAL Y METODOS | |
| 2.1 | EXTRACCION Y PURIFICACION DE COLAGENA DE PIEL | 15 |
| 2.2 | DETERMINACION DE LA PUREZA DE LAS MUESTRAS | 17 |
| 2.3 | DETERMINACION DE HIDROXIPROLINA | 17 |
| 2.4 | ELECTROFORESIS SDS EN GEL DE POLIACRILAMIDA | 18 |
| | 2.4.1 COMPARACION DE MOVILIDADES | 18 |
| | 2.4.2 SUSCEPTIBILIDAD A ENZIMAS PROTEOLITICAS | 18 |
| 2.5 | ELECTROFORESIS SDS EN PRESENCIA DE UREA | 19 |
| 2.6 | ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA pH 5.5 | 19 |
| 2.7 | VISCOSIMETRIA | 20 |
| | 2.7.1 TEMPERATURA DE DESNATURALIZACION | 20 |
| | 2.7.2 VISCOSIDAD INTRINSECA | 20 |
| 2.8 | CRISTALITOS SLS | 21 |
| | 2.8.1 TINCION POSITIVA | 21 |
| | 2.8.2 TINCION NEGATIVA | 22 |
| 2.9 | FORMACION DE FIBRAS | 22 |
| 2.10 | ANALISIS DE AMINOACIDOS | 22 |

| | | |
|-------|-------------------------------------------------------|----|
| 3. | EXPERIMENTOS Y RESULTADOS | 23 |
| 3.1 | MOVILIDAD EN ELECTROFORESIS | 23 |
| 3.2 | SUSCEPTIBILIDAD A ENZIMAS PROTEOLITICAS | 24 |
| 3.3 | TEMPERATURA DE DESNATURALIZACION | 26 |
| 3.4 | VISCOSIDAD INTRINSECA | 27 |
| 3.5 | CAPACIDAD DE FORMACION DE AGREGADOS DE ORDEN SUPERIOR | 28 |
| 3.5.1 | CRISTALITOS SLS | 28 |
| 3.5.2 | FORMACION DE FIBRAS | 29 |
| 3.6 | ANALISIS DE AMINOACIDOS | 31 |
| 4. | DISCUSION | 33 |
| - | REFERENCIAS | 40 |

1. INTRODUCCION

El paso a la vida multicelular marcó el desarrollo de notables transformaciones y procesos constructivos acompañados evolutivamente por la aparición de un conjunto de especies moleculares, de naturaleza protéica, con funciones estructurales. Dentro de los metazoarios estas moléculas han desempeñado un importante papel arquitectónico, llegando a constituir en la clase de los mamíferos del 20 al 30% del contenido protéico total⁽¹⁾; además de desempeñar un papel activo tanto en la morfogénesis como en las interacciones de los tejidos embrionarios, en donde un tejido induce la subsecuente diferenciación de otro⁽²⁾.

El nombre genérico de colágena, agrupa a estas proteínas extracelulares cuya distribución es amplia en los distintos phyla de reino animal, en donde integran los armazones de soporte intercelulares proporcionando un diseño estructural de gran permanencia, coherente con la plasticidad característica en la vida multicelular y de gran resistencia mecánica, resultado de las propiedades estructurales intrínsecas a cada molécula. Iniciaremos nuestro análisis en el nivel de las características de cada unidad para lograr una visión más amplia en relación al papel que desempeñan estas proteínas en los organismos multicelulares.

1.1 ESTRUCTURA GENERAL DE LA MOLECULA

Geoméricamente, la unidad estructural de la colágena se puede considerar como un cilindro de 300 nm de longitud y 1.4 nm de diámetro⁽³⁾, con un peso molecular de 300 000⁽⁴⁾. Está integrada por tres subunidades denominadas cadenas α , constituidas aproximadamente por 1050 residuos de aminoácidos, característica que sitúa a esta proteína entre los polipéptidos más largos del reino animal⁽³⁾, y que asociada a la rigidez de su estructura, le da la propiedad de formar soluciones de alta viscosidad. Individualmente, cada subunidad presenta como estructura secundaria una conformación helicoidal que gira hacia la izquierda, y en conjunto las tres cadenas se asocian espontáneamente en triple hélice al enrollarse entre sí hacia la derecha en la misma dirección con los grupos amino terminales en un extremo de la molécula y los carboxilo terminales en otro; esta estructura aparece tanto en la forma fibrilar como en solución⁽⁵⁾.

Es un hecho conocido, el que cada nivel de las estructuras protéicas es dependiente de las propiedades fisicoquímicas de los niveles inferiores, y en último término, la comple-

ja estructura tridimensional a la cual se asocia la función biológica, es el resultado de la secuencia particular de los residuos de aminoácidos que constituyen la molécula. En esta proteína, la estructura primaria es especialmente interesante, como se puede apreciar en el alto contenido de glicina que ocupa casi el 33% del número total de residuos⁽⁶⁾; este hecho se puede explicar mediante el reducido tamaño del radical de este aminoácido, que le permite incorporarse en el interior de la triple hélice, en donde las interacciones entre las cadenas son muy cercanas, permitiendo el ensamble característico de la molécula⁽⁷⁾; un tercio del total de los residuos está representado por la glicina, esto permite que en su estado nativo la colágena presente el carácter helicoidal esencialmente a todo lo largo de la molécula. Por esta razón se considera a las subunidades de la molécula de colágena, como polímeros integrados por la repetición del tripéptido Gly-X-Y, en donde por regla general la prolina aparece en posición X y la 4-hidroxiprolina en posición Y^(4,8). La presencia de estos iminoácidos en la molécula provee de rigidez a la cadena, debido a las restricciones estéricas que impone el anillo pirrólico⁽⁴⁾. Adicionalmente se ha demostrado que la 4-hidroxiprolina es esencial como elemento de estabilización, aparentemente mediante la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares que involucran moléculas de agua⁽⁹⁾.

Las modificaciones enzimáticas de hidroxilación de prolina, no son comunes en las proteínas a excepción de la elastina, la proteína Clq del complemento inmunológico y la acetil colinesterasa de la anguila eléctrica⁽³⁹⁾, esta situación permite determinar la concentración de colágena en relación al contenido de hidroxiprolina. Es interesante además el hecho de que la molécula, con algunas excepciones como la colágena tipo III y determinadas especies presentes en los invertebrados, carece de cisteína, por lo cual no se encuentran puentes de disulfuro; además el contenido de aminoácidos aromáticos es bajo en relación a otras proteínas globulares.

La molécula de colágena es quizá en toda la naturaleza, la proteína sometida al mayor número de modificaciones post-traduccionales. Analizaremos entonces algunos aspectos de su estructura siguiendo el esquema de su proceso biosintético.

1.2 BIOSINTESIS

Se ha mencionado anteriormente que la unidad estructural de la colágena está integrada por tres cadenas polipeptídicas; en algunos tipos de colágena estas cadenas son diferentes en estructura primaria, esta situación ha llevado al planteamiento de hipótesis acerca de los mecanismos de regulación del ensamble de diferentes cadenas para formar la molécula, habiéndose sugerido la posibilidad de la presencia de RNAs (ácidos ribonucléicos) mensajeros policistrónicos^(10,41); esta posibilidad no concuerda con algunos resultados experimentales⁽¹¹⁾ en donde se ha detectado que los polisomas que llevan a cabo la síntesis de cadenas pro-alfa 1, son diferentes a los que producen las cadenas pro-alfa 2 (que son los precursores de las subunidades constituyentes de un tipo especial de colágena). Esta evidencia sugiere que cada procadena alfa se sintetiza en forma separada y que por tanto los RNAm para colágena son monocistrónicos⁽⁶⁾.

El fibroblasto y algunos otros tipos celulares, sintetizan a la colágena en forma de un precursor soluble en las condiciones intracelulares, la procolágena, que comprende tres subunidades constituidas por un poco más de 1500 residuos de aminoácidos⁽³⁾. La solubilidad de esta estructura se debe a la presencia de extensiones polipeptídicas denominadas propéptidos, que se presentan en los extremos amino y carboxilo terminales de cada una de las tres cadenas α ⁽¹⁰⁾. Los propéptidos unidos al extremo amino, tienen un peso molecular que oscila alrededor de 20 000⁽³⁾ y están integrados aproximadamente por 200 residuos, estos fragmentos presentan en su estructura

primaria a los aminoácidos tirosina y cisteína no comunes en la forma procesada. Por el otro lado, los propéptidos unidos al extremo carboxilo que se extienden integrando una secuencia de 300 residuos⁽³⁾, contienen también cisteína y tirosina, así como gran cantidad de residuos ácidos⁽¹³⁾. El papel de los propéptidos durante la biosíntesis de la colágena no ha sido aclarado, sin embargo se ha sugerido que permiten el transporte de la molécula al espacio extracelular además de participar en su ensamblaje, por lo que se les conoce como péptidos de coordinación; es probable además que intervengan en la regulación de la síntesis y secreción de las cadenas sintetizadas por una célula⁽³⁾.

Después de iniciada la biosíntesis de esta proteína, los polisomas se unen a la membrana de retículo endoplásmico rugoso, de manera que los productos son transportados a las cisternas de este organelo (Fig.1), a lo largo del proceso biosintético. Algunos residuos de prolina, son hidroxilados enzimáticamente por la prolil hidroxilasa a medida que se desarrolla el proceso de traducción, la localización de esta enzima parece ser la membrana de retículo endoplásmico y la posición de la hidroxiprolina en todas las colágenas de mamíferos es Y, en relación al tripéptido Gly-X-Y⁽¹²⁾. Otro aminoácido modificado durante la biosíntesis es la lisina, mediante una hidroxilación enzimática llevada a cabo por la lisil hidroxilasa, que de la misma forma, actúa sobre algunos residuos de lisina localizados en posición Y⁽¹⁴⁾. En ambos casos las reacciones de hidroxilación requieren oxígeno molecular, hierro, ácido ascórbico y alfa cetoglutarato como aceptor electrónico.

En vista de que las reacciones de hidroxilación no se encuentran sometidas al mismo tipo de control que regula el proceso de traducción, se presenta una heterogeneidad entre las moléculas terminadas⁽¹²⁾, que lógicamente puede establecerse entre individuos de una misma especie. Una vez efectua-

das las reacciones de hidroxilación, se adicionan algunos carbohidratos a los residuos de hidroxilisina, principalmente glucosa y galactosa en la parte helicoidal, y en los propéptidos manosa y n-acetil glucosamina, situando a la colágena en el grupo de las glicoproteínas⁽³⁾.

Las cadenas nacientes que se introducen en las cisternas del retículo endoplásmico rugoso, presentan una conformación distinta a la nativa, y a medida que los péptidos de coordinación comienzan a interactuar, se alinean y enrollan correctamente, como se ha evidenciado por el hecho de que anticuerpos preparados contra colágena y procolágena son capaces de reconocer a la molécula en este estado, así como por la resistencia que presentan las cadenas a la acción de la tripsina⁽¹³⁾, lo cual se considera una característica del estado nativo triple helicoidal de esta proteína. En este punto, se detiene el proceso de hidroxilación (Fig.1).

Una vez hidroxilada, la procolágena es exportada al espacio intercelular. El mecanismo de este proceso es materia de discusión, sin embargo se ha sugerido la participación del complejo de Golgi y de unas vesículas secretorias detectadas en células epiteliales de la córnea⁽¹³⁾.

El último evento de la biosíntesis de esta proteína es la conversión del precursor soluble a la forma insoluble, lo que involucra la separación enzimática de los péptidos de coordinación, llevada a cabo por dos enzimas distintas cuya actividad es extracelular, la amino peptidasa de procolágena, rompe las extensiones del extremo amino en sitios cercanos a la superficie celular casi en el momento en que la molécula es exportada; secuencialmente y con actividad extracelular claramente definida, la carboxilo peptidasa de procolágena rompe las extensiones del extremo carboxilo, dando lugar finalmente a la molécula de colágena⁽¹³⁾ (Fig.2).

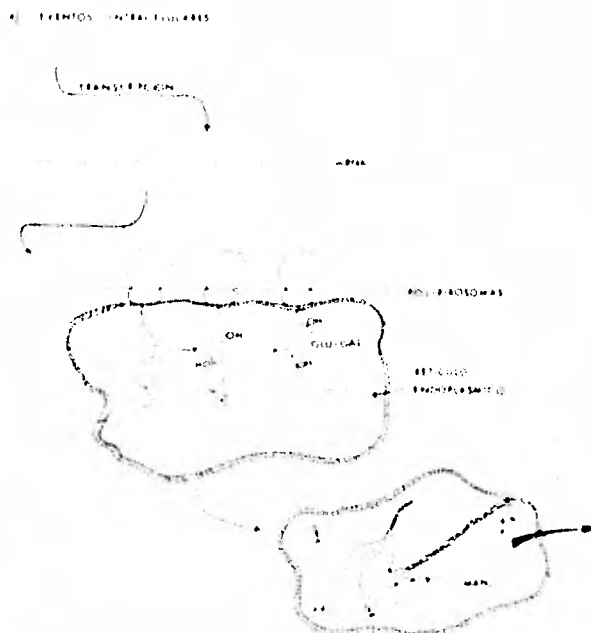


Fig.1 Eventos intracelulares de la biosíntesis de colágena. Se esquematiza la hidroxilación y glicosilación de los productos de traducción y su ensamblaje para formar la triple hélice. (basado en Trelstad, R.L. 1981).

Las propiedades de la colágena como el elemento estructural primordial de los organismos multicelulares, dependen de la capacidad de asociación espontánea que tienen estas moléculas para integrar estructuras de mayor complejidad. Continuaremos el análisis a este nivel.

1.3 EL ARREGLO EXTRACELULAR

La estructura primaria de las cadenas α es el factor

que determina su acoplamiento para formar estructuras de orden superior, una vez que la molécula ha sido exportada al espacio extracelular; también en la estructura primaria residen los elementos que intervienen en las uniones intermoleculares eventualmente presentes⁽⁸⁾, y que le dan a las fibras de colágena la propiedad de ser resistentes a la tensión.

Linealmente, la manera en que se produce la asociación más frecuente no se ha establecido con precisión, pero las moléculas se encuentran en orientación amino-carboxilo; paralelamente la unión es escalonada, es decir, cada molécula se asocia lateralmente y recorrida a un cuarto de su longitud con respecto al monómero de agregación anterior (Fig.2-a). Un efecto que produce esta asociación es la periodicidad característica de 70 nm observada en las fibras de colágena al microscópio electrónico⁽¹⁵⁾. Las fibras que resultan de esta agregación lateral de moléculas tienen una baja resistencia a la tensión, que aumenta debido a la formación de enlaces covalentes intermoleculares producidos por una secuencia de eventos, en donde el primer paso es la desaminación oxidativa de los grupos ϵ -amino de ciertos residuos de lisina e hidroxilisina presentes en las regiones no helicoidales de la molécula, esta reacción se lleva a cabo enzimáticamente por la lisil oxidasa, que es una enzima de localización extracelular que requiere como cofactores Cu^{++} y fosfato de piridoxal.

Una vez formados los aldehídos, el enlace se lleva a cabo espontáneamente mediante alguno de los siguientes mecanismos: el primero de ellos, puede ser una condensación aldólica entre residuos de alisina apropiadamente cercanos, o bien mediante la formación de una base de Schiff entre un aldehído y un grupo ϵ -amino de una lisina o hidroxilisina cercana⁽¹²⁾.

Las moléculas de colágena se pueden inducir artificialmente para formar estructuras de orden superior distintas al arreglo escalonado típico, tal es el caso de los cristali-

tos SLS (segment long spacing), en donde las moléculas se asocian lateralmente en la misma dirección alineadas en un registro transversal, de tal forma que la longitud del cristal coincide con la de la molécula; esta forma de agregación se ha detectado en las vacuolas que participan en la exportación de la proteína al espacio extracelular⁽¹⁶⁾ (Fib.2-b). Suspensiones de estos cristales se obtienen mediante la incorporación de polianiones como el adenosín trifosfato (ATP), a soluciones diluidas de colágena solubilizada en bajas concentraciones de ácido acético^(17,18). Una característica interesante de este arreglo es que al teñir las preparaciones de cristallitos SLS con sales de metales pesados, se obtiene un patrón de bandas particular, que refleja la distribución de residuos polares y no polares a lo largo de la molécula, esta propiedad proporciona información de gran reproducibilidad e importancia en el análisis estructural de la proteína y de los mecanismos de acción de las enzimas encargadas de su degradación.

Finalmente, un tercer tipo de agregación de moléculas de colágena denominado FLS (Fibrous Long Spacing), se caracteriza por la asociación lateral de moléculas, pero a diferencia de los cristallitos SLS, en las fibras las colágenas se encuentran en direcciones opuestas, lo que produce una simetría de las bandas producidas por los residuos polares y no polares. Este ensamble se produce experimentalmente al poner en contacto soluciones ácidas de colágena con glicoproteínas (Fig.2-c).

El otro aspecto metabólico de la colágena, la degradación, se desarrolla en un esquema distinto a la biosíntesis y se encuentra sometida a mecanismos de regulación que difieren entre sí dependiendo del estado fisiológico del organismo así como de las características particulares de cada tejido^(19,20). Sin embargo, cualquiera que sea el mecanismo degradativo, un grupo de enzimas, las colagenasas, son las responsables al menos del primer evento de la degradación, pues-

to que se caracterizan por su capacidad de romper la molécula de colágena en su estado nativo bajo condiciones fisiológicas de pH, fuerza iónica y temperatura⁽²¹⁾, característica que no comparten las proteasas comunes.

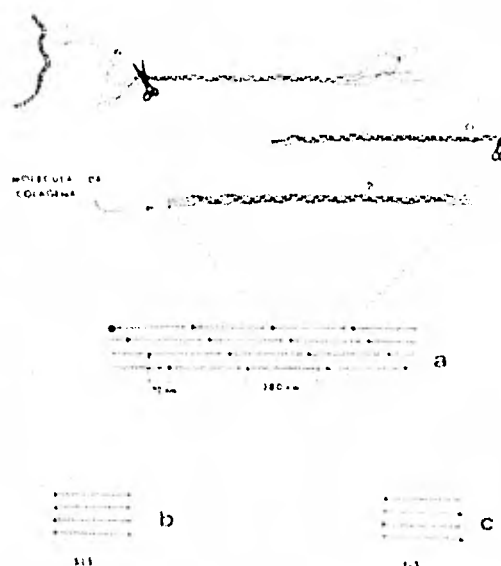


Fig.2 Eventos extracelulares de la biosíntesis y ensamblaje intercelular de las moléculas de colágena.
 a) disposición fibrilar más frecuente, nótese el arreglo escalonado y la periodicidad de 70 nm.
 b) cristallitos SLS.
 c) agregación FLS, obsérvese la orientación antiparalela de las cadenas.
 (basado en Trelstad, R.L. 1981)

1.4 HETEROGENEIDAD MOLECULAR

Como se ha mencionado anteriormente, la palabra colágena es el nombre que agrupa a una familia de proteínas⁽²⁴⁾; el perfil de distribución de estas moléculas no se limita únicamente a la especificidad del tejido, sino que presentan variaciones a lo largo del desarrollo ontogénico del organismo, de modo similar a las transiciones observadas en la hemoglobina. Dentro de este grupo de proteínas se han descrito al menos ocho cadenas α genéticamente distintas, existiendo la posibilidad de la presencia de un número mayor de genes estructurales para colágena⁽⁸⁾. Estas cadenas se ensamblan para formar cinco tipos distintos de moléculas de las cuales la más abundante es la colágena tipo I⁽²²⁾ (ver tabla I), formada por dos cadenas iguales denominadas $\alpha 1$ (I), y una cadena $\alpha 2$ distinta. Esta nomenclatura guarda relación con el orden de elución de las subunidades en columnas de cromatografía de intercambio iónico utilizando CM-celulosa como intercambiador⁽²³⁾. La fórmula abreviada de la colágena tipo I es entonces, $\{\alpha 1(I)\}_2 \alpha 2$. La distribución de esta colágena es amplia y principalmente aparece como componente de la piel, hueso, dientes, vasos sanguíneos, tendones y ligamentos. Análogamente el tipo II de colágena se ensambla con tres cadenas, que en este caso no difieren en estructura primaria por lo que se describen como $\{\alpha 1(II)\}_3$ y es la colágena de cartílago hialino; la colágena tipo III $\{\alpha 1(III)\}_3$ aparece principalmente en etapas tempranas del desarrollo ontogénico formando parte de la piel, vasos sanguíneos y en el útero; la colágena tipo IV $\{\alpha 1(IV)\}_3$, es constituyente de membranas basales glomerulares y de la cápsula del cristalino. Finalmente la colágena tipo V, integrada por las cadenas $\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$, ó $\alpha 3^a(V)$, se concentra en cantidades pequeñas aparentemente como exocitos esqueleto de fibroblastos y otras células mesenquimatosas, así como en la membrana basal del músculo liso⁽⁸⁾.

Estos cinco tipos de colágena muestran además diferencias importantes en relación a las modificaciones post-ribosomales de la molécula, especialmente con respecto a las hidroxilaciones de prolina y lisina así como a la incorporación de carbohidratos⁽⁵⁾, de tal forma que cuando se analiza la heterogeneidad de este grupo de proteínas, el análisis debe plantearse a dos niveles, el genético y el post-traducciona.

Tabla I. Composición molecular de los distintos tipos de colágena (tomado de Bornstein, P., 1980)

| tipo | subunidades | composición molecular |
|------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| I | $\alpha 1, \alpha 2$ | $\{\alpha 1(I)\}_2 \alpha 2(I)$ $\{\alpha 1(I)\}_3$ (trímero tipo I) |
| II | $\alpha 1$ | $\{\alpha 1(II)\}_3$ |
| III | $\alpha 1$ | $\{\alpha 1(III)\}_3$ |
| IV | $\alpha 1, \alpha 2$ | no establecida |
| V | $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$ | no establecida |

Evolutivamente, podemos considerar a la colágena como una proteína conservativa, y esto en gran parte se debe a los requerimientos estructurales para mantener la triple hélice. Varios estudios de las porciones helicoidales de la molécula han indicado altos niveles de homología entre los distintos tipos de colágena en diferentes especies de vertebrados; de hecho en un organismo la homología entre sus distintos tipos de colágena es menor que la existente al analizar un mismo tipo en especies diferentes^(24, 25, 26), de tal forma que se han encontrado grandes parecidos inmunológicos tanto para la parte helicoidal como para la no helicoidal, así como una constancia en el número de residuos polares y no polares. Por otra parte, algunas secuencias como las involucradas en los enlaces intermoleculares y en la susceptibilidad a la colagenasa han permanecido esencialmente sin cambio^(25, 26).

Este estudio se plantea el objetivo de establecer

un análisis paralelo de las propiedades estructurales de la molécula de colágena purificada de piel de *Romerolagus diazi* y conejo doméstico *Sylvilagus* sp.

R. diazi es una especie endémica en el eje volcánico transversal de México⁽²⁷⁾, que se agrupa dentro del orden Lagomorpha en la familia Leporidae al igual que *Sylvilagus*, sin embargo dadas algunas características primitivas de este organismo integra junto con otros dos géneros la subfamilia Paleolaginae. La distribución de *R. diazi* se encuentra muy restringida⁽²⁸⁾, debido en gran parte a que la estrecha asociación de este organismo con su ambiente es afectada por el crecimiento excesivo de la zona urbana de la ciudad de México, así como por la devastación de los bosques, la cacería y el desarrollo de zonas turísticas^(27,29). Esta situación ha reducido el habitat de la especie hasta el grado en que se ha considerado como un organismo en peligro de extinción⁽²⁷⁾.

Recientemente se ha iniciado una serie de estudios en diversas áreas para tratar de establecer con profundidad la biología y algunos aspectos de las interacciones ecológicas que guarda este lagomorfo con su ambiente^(29,30,31,42). En un esquema distinto la finalidad de este estudio es caracterizar la colágena de piel de *R. diazi*; el interés de estudiar a este organismo en nuestro análisis reside en dos aspectos fundamentales: el primero es el de aumentar la información con que actualmente se cuenta en relación a *R. diazi*, utilizando otro tipo de metodología experimental; el segundo radica en que con base en distintas características *R. diazi* se considera un lepórido primitivo, ya que anatómicamente el género se desvía de las otras especies de la familia por sus propiedades craneales y el corto tamaño de sus patas traseras⁽²⁸⁾. Ecológicamente, las relaciones que guarda con sus huéspedes sifonápteros, ácaros y céstodos, demuestran una elevada especificidad y finalmente su distribución tan restringida. Por esta

zón se planteó el objetivo señalado llevado a cabo paralela-
mente con la molécula de colágena extraída del conejo domésti-
co, cercanamente relacionado.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1 EXTRACCION Y PURIFICACION DE COLAGENA DE PIEL

A las pieles de *R. diari* y conejo doméstico se les separó el tejido adiposo, se cortaron en fragmentos pequeños y se llevó a cabo una extracción en medio ácido a 4°C. La purificación se realizó de acuerdo a Trelstad y Gross⁽³²⁾, mediante un procedimiento estándar que se detalla a continuación.

Extracción en ácido acético 0.5 M durante 48 h

filtrar

obtener el sobrenadante centrifugando a 9,090xg, 60 min

sedimento: descartar

precipitar con NaCl al 5%

obtener el sedimento centrifugando a 20,500xg 30 min y resuspender en ácido acético 0.5 M

incorporar en amortiguador de fosfatos de potasio pH 7.3, fuerza iónica 0.4 M mediante diálisis, centrifugar a 36,400xg 60 min

sedimento: descartar

precipitar el sobrenadante con NaCl 20%

obtener el sedimento centrifugando a 20,500xg 30 min; resuspender en ácido acético 0.5 M y dializar contra amortiguador de fosfatos

aclarar la solución centrifugando a 36,400xg 60 min

precipitar sobrenadantes dializando contra Na_2HPO_4 0.01 M

obtener el precipitado por centrifugación a 9,090xg 30 min

redisolver en ácido acético 0.5 M y dializar contra ácido acético 0.005 M

liofilizar y guardar a -20°C .

Todo el procedimiento se realizó a 4°C , la extracción con pepsina se llevó a cabo de acuerdo a ChandraRajan, J.⁽³³⁾, adicionando 1 mg de pepsina a cada mililitro del medio de extracción.

2.2 DETERMINACION DE LA PUREZA DE LAS MUESTRAS

La colágena liofilizada, se redisolvió en ácido acético 0.005 M y se corrió en electroforésis, el patrón de bandas que se obtiene muestra dos componentes con distinta movilidad que corresponden a las cadenas α , además sobre estas bandas aparecen dímeros, que son asociaciones de cadenas α iguales o diferentes; pueden presentarse también componentes que por lo general no entran al gel y se denominan asociaciones γ . La presencia de bandas por debajo de las cadenas α indica una purificación incompleta. En la figura 3 se muestra el patrón obtenido que revela la presencia de colágena purificada.

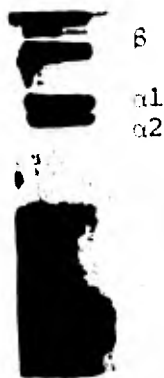


Fig.3 Patrón electroforético de la colágena de piel. La ausencia de bandas con movilidad superior a las cadenas α indica una purificación completa.

2.3 DETERMINACION DE HIDROXIPROLINA

La concentración de colágena fue determinada en relación al contenido de hidroxiprolina, dado que es de las pocas proteínas en donde aparece este iminoácido. A las muestras se les adicionó HCl, hasta una concentración de 6 N, se colocaron en ampollitas de vidrio, se sellaron y se hidrolizaron durante 24 h a 110°C. La determinación de hidroxiprolina se llevó a cabo de acuerdo al método de Stegemann⁽³⁴⁾, modificado por

Woessner⁽³⁵⁾. Este método involucra la oxidación de la hidroxiprolina con cloramina T 0.05 M, la reacción se detiene con ácido perclórico 3.15 M y se colorea con p-dimetil amino benzaldehído al 20% en éter monometílico de etilén glicol. Se lee la absorción a 557 nm.

2.4 ELECTROFORESIS SDS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Esta técnica se realizó de acuerdo a Laemmli⁽³⁶⁾, en presencia de mercaptoetanol. La concentración de acrilamida para el gel inferior (pH 8.8) fue de 7.5%, el gel superior (pH 6.8) se preparó a una concentración de 3%. Las muestras se dializaron con Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 y se diluyeron 1:5 con el amortiguador para la muestra descrito en esta técnica. La concentración de proteína fue menor a 30 microgramos en todos los ensayos, y la electroforésis se corrió a 1.5 mA/placa hasta que el frente del colorante entró al gel inferior, posteriormente la corriente se aumentó a 30 mA/placa y se terminó cuando el colorante alcanzó el extremo anódico del gel. La tinción se realizó de acuerdo a Hayashi y Nagai⁽³⁷⁾.

Mediante esta técnica es posible separar los componentes de una mezcla dependiendo de las diferencias de pesos moleculares, dado que la presencia de SDS uniformiza las cargas, esto permitió utilizarla en dos tipos de experimentos que se detallan a continuación:

2.4.1 COMPARACION DE MOVILIDADES

En este experimento se comparó la movilidad de la colágena extraída de pieles de *R. diazi*, conejo doméstico y cobayo, para determinar si existe alguna diferencia en el peso molecular.

2.4.2 SUSCEPTIBILIDAD A ENZIMAS PROTEOLITICAS

La molécula de colágena en su estado nativo es resistente a la acción de proteasas inespecíficas como la

tripsina. En este experimento, las muestras resuspendidas en ácido acético 0.005 M a una concentración de 0.5 mg/ml, se diluyeron volumen a volumen con amortiguador Tris-HCl 0.1 M NaCl 0.4 M CaCl₂ 10 mM pH 7.8. Se incubaron 0.4 ml de cada muestra con colagenasa bacteriana o tripsina en un volumen de 1 ml durante 6 h a 26 y 37°C, pH 7.4. La concentración de las enzimas fue cien veces menor que la de las muestras; los inhibidores utilizados fueron EDTA (etilén diamino tetra acetato) 0.04 M para colagenasa e inhibidor de soya para tripsina al doble de concentración que ésta. Se corrió electroforesis de las muestras para determinar su susceptibilidad a la acción de estas enzimas.

2.5 ELECTROFORESIS SDS EN PRESENCIA DE UREA

Se empleó el método Hayashi y Nagai⁽³⁷⁾, que requiere urea 8 M en la preparación del gel; se corrieron 20 microgramos de proteína en todos los ensayos.

2.6 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA PH 5.5

Se realizó de acuerdo a Sakai y Gross⁽³⁸⁾, sustituyendo el gel superior por una solución saturada de sacarosa; se corrieron 20 microgramos de cada muestra a 200 voltios. La electroforesis se terminó cuando el frente del colorante alcanzó el extremo catódico de la placa. Los geles se tiñeron con amido negro al 1% en ácido acético al 5%, y se destiñeron con ácido acético al 3%. En esta técnica, la migración de los componentes de la mezcla está regulada por dos parámetros: la carga de la molécula y el peso molecular.

2.7 VISCOSIMETRIA

Se realizaron dos tipos de experimentos, midiendo en cada uno la viscosidad específica de las muestras en viscosímetros del tipo Cannon Fenske, con tiempos de flujo de 59 seg para agua destilada. La viscosidad específica se obtiene restando una unidad a la viscosidad relativa definida como:

$$\eta_{rel} = \frac{\text{tiempo de paso de la muestra}}{\text{tiempo de paso del amortiguador}}$$

2.7.1 TEMPERATURA DE DENATURALIZACION

Como se ha mencionado anteriormente, la molécula de colágena es una estructura rígida de gran asimetría, con la propiedad de formar soluciones de alta viscosidad; cuando se alcanza la temperatura de desnaturalización la triple hélice se desacopla y las cadenas α adquieren una conformación distinta a la nativa perdiéndose la estructura original, lo que provoca un brusco descenso en la viscosidad. El método seguido para determinar la temperatura de desnaturalización fue el siguiente:

Las muestras liofilizadas, se redisolviéron en CaCl_2 0.5 M pH 7.0 según la técnica de von Hippel, P.H. (40). Las soluciones se aclararon por centrifugación y se midió la cantidad de colágena a los sobrenadantes mediante hidroxiprolina. La concentración se ajustó a 1.18 mg/ml y a 0.4 mg/ml. 4 ml de las muestras se colocaron en un viscosímetro sumergido en agua, la temperatura del baño se incrementó grado a grado recorriendo el intervalo de 25 a 40°C. El tiempo de incubación fue de 30 minutos para cada temperatura.

2.7.2 VISCOSIDAD INTRINSECA

Esta prueba consiste en medir la viscosidad intrínseca a la molécula de colágena, que se obtiene al extra-

polar la curva de viscosidad reducida en función de la concentración, hasta una concentración hipotética de cero para eliminar el efecto que la formación de agregados pudiera tener sobre la viscosidad de la solución. Las muestras liofilizadas se redisolviéron en CaCl_2 0.5 M pH 7.0, las soluciones se aclararon mediante centrifugación y se midió la viscosidad de los sobrenadantes a concentraciones secuencialmente decrecientes. El experimento se llevó a cabo a una temperatura de 25°C y la concentración de cada muestra se determinó mediante el contenido de hidroxiprolina. La viscosidad reducida se obtuvo de la siguiente relación

$$\eta \text{ reducida} = \frac{\eta \text{ específica}}{\text{concentración}}$$

2.8 CRISTALITOS SLS

Esta forma de precipitación de la molécula permite medir su longitud y establecer comparaciones con respecto a la distribución de los residuos polares y no polares a lo largo de la triple hélice; los cristales se prepararon de acuerdo a Bruns y Gross⁽¹⁷⁾. La colágena redisuelta en ácido acético 0.5 M a una concentración de 1 mg/ml se incorporó mediante 24 horas de diálisis a una solución de ATP al 0.4% en ácido acético 0.1 M; una vez dializada, la suspensión se diluyó hasta aclararla con la solución de ATP. Se hicieron preparaciones de la suspensión de cristales utilizando dos tipos de contraste.

2.8.1 TINCIÓN POSITIVA

Se aplicó una gota de la suspensión de cristales a rejillas cubiertas con una delgada capa de carbón; después de cuatro minutos, se secaron y se aplicó ácido fosfotúngstico 0.1% durante tres minutos, las rejillas se enjuagaron con agua destilada, y se agregó una gota de acetato de uranilo 0.01% durante cinco minutos, se enjuagó nuevamente y se secó.

2.8.2 TINCION NEGATIVA.

Se mantuvo una gota de la suspensión de cristales sobre la rejilla por espacio de cuatro minutos; se secó y se aplicó una gota de fosfotungstato de sodio al 2% pH 7.0 durante cuatro minutos y se secó nuevamente. Las preparaciones fueron observadas y fotografiadas en un microscópio electrónico Karl Zeiss, modelo E.M. 10.

2.9 FORMACION DE FIBRAS

Las muestras redisueltas en ácido acético 0.005 M, a una concentración de 2 mg/ml se incorporaron mediante diálisis en amortiguador de fosfatos pH 7.3, fuerza iónica 0.4 M. Posteriormente se dializaron contra NaCl a 0.4 M durante 30 min a 4°C. La formación de fibras se detectó por el cambio en la absorbancia leída a 313 nm en un espectrofotómetro Karl Zeiss con portacubetas termoregulables. El experimento se realizó a 37°C. Esta es una prueba que nos indica la capacidad que tienen las moléculas de colágena para reconstituir la principal estructura que forman en el espacio extracelular.

2.10 ANALISIS DE AMINOACIDOS

Se hidrolizaron 250 microgramos de cada muestra en HCl 6 N durante 24 h a 110°C. Los hidrolizados se secaron por evaporación y se corrieron en un analizador de aminoácidos Beckmann modelo 120-C, por el Dr. Marcos Rojkind y Jesús Arellano, en el laboratorio de Bioquímica del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN.

3. EXPERIMENTOS Y RESULTADOS

3.1 MOVILIDAD EN ELECTROFORESIS

Se comparó el comportamiento de ambas colágenas en electroforésis por dos razones principales: la primera es conocer si existe alguna diferencia notable en la migración de la molécula de colágena extraída con y sin pepsina, ya que la colágena de *R. diazi* se extrajo en presencia de pepsina debido a que en ácido acético 0.5 M la cantidad obtenida fue mínima, por el contrario la colágena de conejo doméstico se solubilizó fácilmente en ácido acético obteniéndose un buen ren-

dimiento. La segunda razón es verificar si existe alguna diferencia entre la molécula de colágena de conejo doméstico y *R. diazi*, que se manifieste con una movilidad distinta. Se utilizaron tres sistemas diferentes de electroforésis, en el primero de ellos se empleó la técnica de Laemmli⁽³⁶⁾ en presencia de SDS sin encontrarse diferencia en la movilidad (Fig.4). En el segundo sistema empleado, la migración de los componentes está regulada por dos factores, la carga de la molécula y el peso molecular; en este sistema tampoco se encontró diferencia entre las colágenas de conejo doméstico y *R. diazi*, la técnica utilizada fue la de Sakai y Gross⁽³⁸⁾. Finalmente, se corrió una electroforésis en presencia de urea puesto que la urea modifica la migración de las cadenas $\alpha 1(I)$ y $\alpha 1(III)$, reteniéndolas en relación a las $\alpha 2$. Este experimento se realizó de acuerdo a Hayashi y Nagai⁽³⁷⁾, y nuevamente no se detectan diferencias de movilidad en relación a las cadenas α y a los dímeros β , no obstante que con esta técnica se consigue una mayor resolución. Sin embargo en la colágena de *R. diazi* se detectó la presencia de un componente en ambos sistemas de electroforésis con SDS, esta banda migra entre las cadenas α y los dímeros β . (Fig.5).

3.2 SUSCEPTIBILIDAD A ENZIMAS PROTEOLITICAS

La conformación nativa de la colágena purificada de ambos organismos, se determinó analizando por electroforésis SDS en gel de poliacrilamida la susceptibilidad a tripsina, mediante la presencia de bandas producidas por la degradación con una movilidad superior a las cadenas α . La colágena de *R. diazi* al igual que otras colágenas mostró ser resistente al efecto de la tripsina sobre todo en tiempos de incubación cortos, esto indica que las muestras se encuentran en su conformación nativa. Las colágenas mostraron ser vulnerables al efecto de la colagenasa y los péptidos producidos por la acción de esta enzima muestran en electroforésis un

patrón similar en ambas colágenas. (Fig.6).

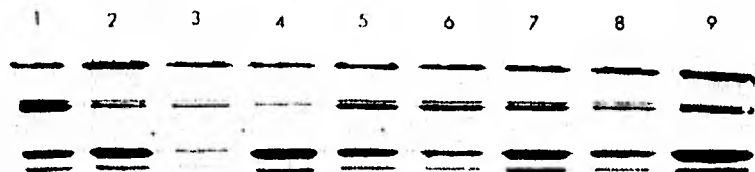


Fig.4 Electroforésis SDS en gel de Poliacrilamida. Se corrieron 20 μ g de cada muestra, la concentración de acrilamida fue de 7.5%. Las colágenas son las siguientes: 1. conejo, 2. *R.díazi*, 3. cobayo, 4. cobayo extraída con pepsina, 5. conejo + *R.díazi*, 6. conejo + cobayo, 7. conejo + cobayo pepsinizada, 8. *R.díazi* + cobayo y 9. *R.díazi* + cobayo pepsinizada.



Fig.5 Electroforésis SDS con urea 8 M. De izquierda a derecha: colágena de *R.díazi*, colágena de conejo y colágena de *R.díazi* + conejo.



Fig.6.A a) Efecto de la colagenasa bacteriana sobre la molécula de *R. diazi*
 b) Efecto de la colagenasa bacteriana sobre la molécula de conejo.



Fig.6.B a) Efecto de la tripsina sobre la molécula de *R. diazi*
 b) Efecto de la tripsina sobre la molécula de conejo.

3.3 TEMPERATURA DE DESNATURALIZACION .

Una vez determinado el estado nativo de las muestras se procedió a buscar la temperatura de desnaturalización de la molécula. El experimento se realizó en CaCl_2 0.5 M pH 7.0 para evitar la formación de fibras; las temperaturas de desnaturalización (Tabla II), se obtuvieron de las curvas de viscosidad específica en función de la temperatura, en los puntos en donde la viscosidad desciende bruscamente (Fig.7). La temperatura de desnaturalización de la colágena de *R. diazi*

es ligeramente más elevada que la de conejo doméstico.

Tabla II. Temperaturas de desnaturalización de las colágenas de conejo doméstico y *R. diazi*, solubilizadas en CaCl_2 0.5 M pH 7.0

| Concentración (mg/ml) | T.D.R. <i>diazi</i> | T.D. conejo |
|--------------------------|---------------------|-------------|
| 0.4 | 32.7°C | 32.3°C |
| 1.18 | 32.4°C | 21.1°C |

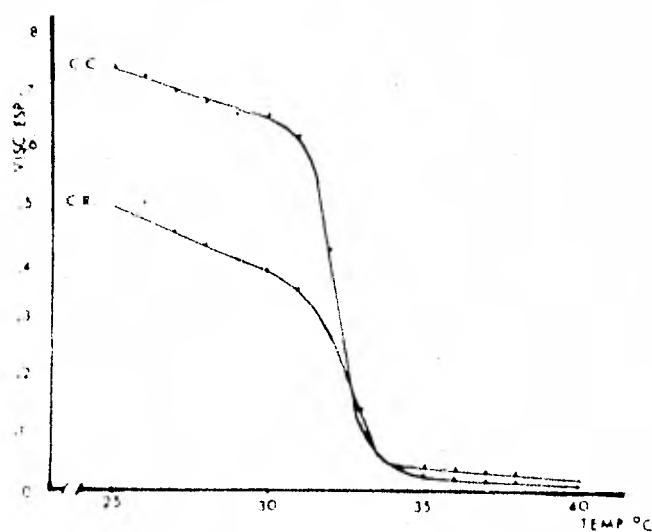


Fig.7.A Curvas de desnaturalización de la colágena de *R. diazi* y conejo doméstico solubilizadas en CaCl_2 0.5 M pH 7.0. La concentración de proteína fue de 0.4 mg/ml, con un tiempo de incubación de 30 min en cada temperatura. (C.C. conejo doméstico, C.R. *R. diazi*)

3.4 VISCOSIDAD INTRINSECA

Se determinó la viscosidad intrínseca a cada molécula mediante la extrapolación a concentración cero de la curva de viscosidad reducida en función de la concentración. Se consideró una concentración hipotética de cero, con el fin

de eliminar el efecto que la formación de agregados de moléculas pudiera tener sobre la viscosidad de la solución. El valor obtenido para la colágena de conejo fue de 14.07 dl/g y para *R.diazi* fue de 14.8 dl/g (Fig.8)

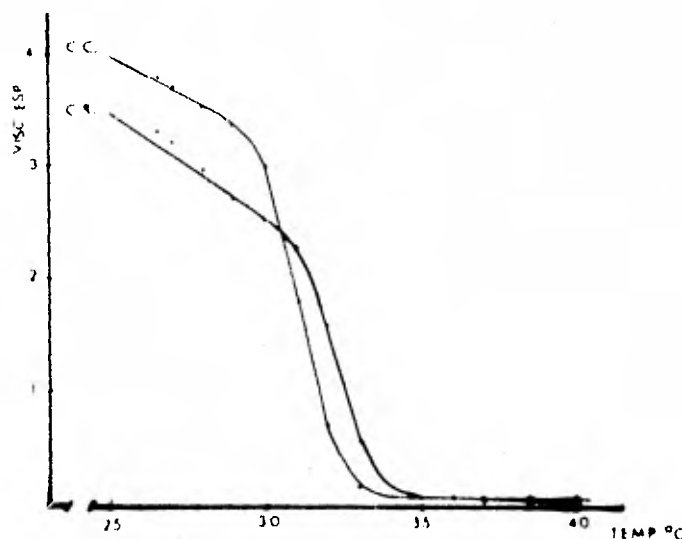


Fig.7.B Se muestra el mismo experimento variando la concentración de proteína a 1.18 mg/ml. (C.c. conejo, C.R.R.diazi)

3.5 CAPACIDAD DE FORMACION DE AGREGADOS DE ORDEN SUPERIOR

3.5.1 CRISTALITOS SLS

Ambas moléculas mostraron la capacidad de agregarse como cristalitas SLS; mediante la tinción negativa de estos cristales se midió la longitud de la molécula observando las preparaciones de colágena a 50,000 aumentos encontrándose los siguientes valores:

| | |
|------------------------------|----------|
| colágena de conejo doméstico | 274,7 nm |
| colágena de <i>R.diazi</i> | 283.2 nm |

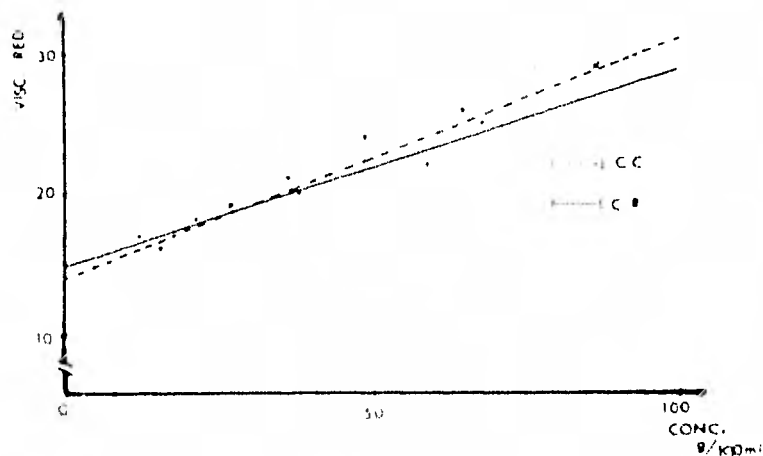


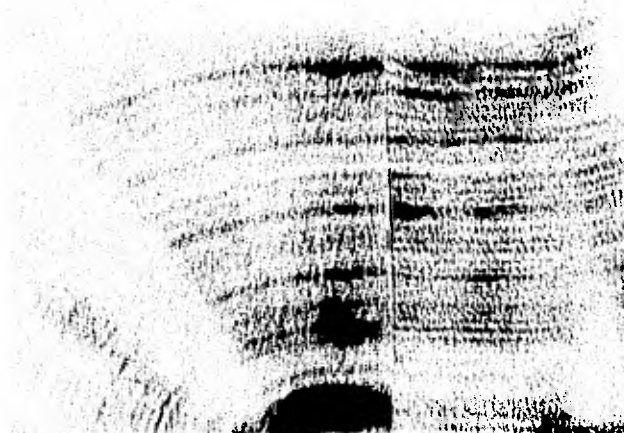
Fig.8 Curva de viscosidad reducida en función de la concentración de proteína, el experimento se llevó a cabo en CaCl_2 0.5 M 0.5 M pH 7.0 a 25°C . La concentración se determinó midiendo la cantidad de hidroxiprolina. (C.C. Conejo doméstico, C.R.R.díaz)

La tinción positiva de estos cristales, permitió establecer una comparación de las bandas formadas por la distribución de residuos polares y no polares en la molécula, en la figura 9 se muestra el parecido de ambas colágenas en tinción positiva y negativa.

3.5.2 FORMACION DE FIBRAS

Se analizó la capacidad que tienen estas moléculas de agregarse en la forma escalonada típica que muestran en el espacio extracelular. El experimento se llevó a cabo en amortiguador de fosfatos de potasio pH 7.3, dializando las muestras durante 30 min contra NaCl 0.4 M; la formación de fibras se detectó en ambas moléculas, siendo mayor para R.díaz tanto la pendiente como el valor de densidad óptica alcanzado (Fig.10)

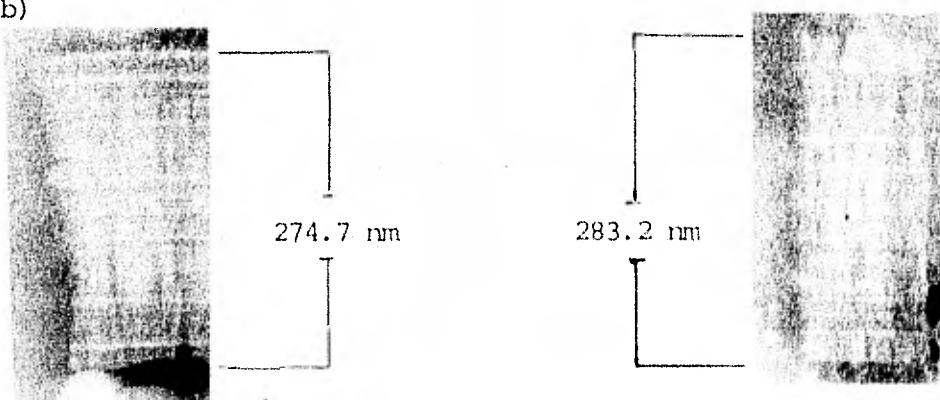
a)



CC

CR

b)



CC

CR

Fig.9 Comparación de cristallitos SLS

a) tinción positiva. Nótese la similitud de las bandas obtenidas
 b) tinción negativa. (CR = colágena de *R. diazi*, CC = colágena de conejo doméstico).

3.6 ANALISIS DE AMINOACIDOS

La tabla III muestra el resultado de un análisis preliminar de aminoácidos, en donde puede observarse que la cantidad de residuos de prolina hidroxilados es mayor en *R. diazi* en comparación con el conejo doméstico. Por esta razón se obtuvo un nuevo factor para la transformación de μg de hidroxiprolina a colágena, en las determinaciones de concentración. El valor de este factor es de 6.49 para *R. diazi*, y de 7.42 para el conejo. La hidroxilación de residuos de lisina también es superior en *R. diazi*. El aminoácido arginina no se detectó en el aparato al correr la muestra de *R. diazi*. Lo mismo ocurrió con la metionina, que tampoco se detectó en el aparato.

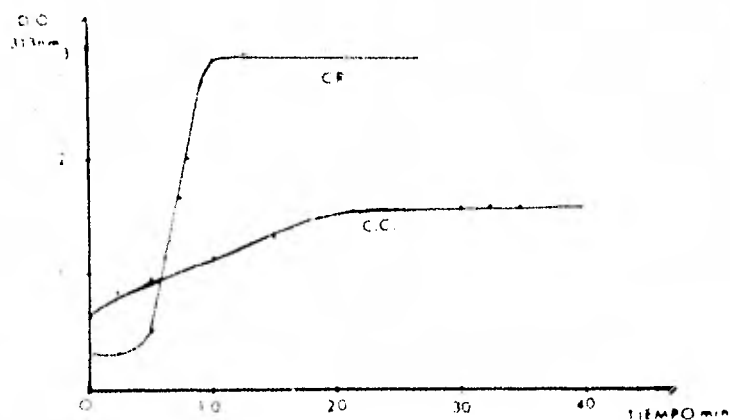


Fig.10 Se muestra el cambio en la absorción en función del tiempo de incubación de ambas colágenas en amortiguador de fosfatos de potasio pH 7.3 + NaCl 0.4 M a 37°C, producido como resultado de la formación de fibras. (C.C. colágena de conejo doméstico, C.R. colágena de *R. diazi*).

Tabla III. Composición de aminoácidos de ambas muestras.
El tiempo de hidrólisis fue de 24 horas

| Aminoácido | no.de residuos / 1000 residuos | | | |
|----------------|--------------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| | <i>R.diazi</i> | <i>Sylvilagus sp.</i> | | |
| Lisina | 45 | 32 | 27.9 ¹ | 31.9 ² |
| Histidina | 11 | 6 | 4.42 | 7.2 |
| Arginina | - | 50 | 48.0 | 47.6 |
| Hidroxiprolina | 136 | 119 | 100.5 | 97.1 |
| Ac.Aspártico | 45 | 37 | 47.5 | 54.8 |
| Treonina | 16 | 17 | 20.8 | 27.4 |
| Serina | 27 | 27 | 38.2 | 44.5 |
| Ac.Glutámico | 75 | 67 | 70.2 | 75.7 |
| Prolina | 125 | 140 | 122.0 | 111.5 |
| Glicina | 335 | 309 | 318.0 | 296.0 |
| Alanina | 103 | 115 | 112.1 | 100.8 |
| Valina | 22 | 24 | 25.4 | 26.9 |
| Metionina | - | - | 4.76 | 6.5 |
| Isoleucina | 11 | 11 | 11.2 | 17.0 |
| Fenilalanina | 14 | 15 | 12.7 | 15.1 |
| Leucina | 26 | 26 | 25.6 | 29.7 |
| Hidroxilisina | 8 | 4 | 4.6 | 4.8 |

^{1,2} estos datos obtenidos de Eastoe, J.E. (1967), corresponden a la composición de la fracción soluble en citratos (¹) y en sales neutras (²) de colágena de piel de conejo.

4. DISCUSION

Hemos mencionado en la introducción de este trabajo el hecho de que la colágena es una proteína conservativa desde el punto de vista evolutivo. Esta idea es el resultado de varios estudios^(24,25,26), en donde el análisis de secciones de la parte helicoidal de la molécula ha permitido detectar un gran parecido en la estructura primaria de esta proteína en diferentes especies, así lo demuestran los estudios en donde se ha reportado⁽²⁵⁾ que la comparación de las secuencias de cadenas $\alpha 1(\text{III})$ obtenidas de hígado humano, con $\alpha 1(\text{I})$ purificada de la rata, muestra homología puesto que el tipo de

sustituciones en estas cadenas es conservativo, involucrando en general aminoácidos neutros; sin embargo el grado de homología aumenta considerablemente cuando un mismo tipo genético de colágena es analizado en el humano y en el bovino⁽⁴¹⁾; lo que demuestra que la variación interespecífica es muy pequeña en la secuencia de residuos de esta proteína, y por lo tanto en todas las formas estructurales dependientes de ésta.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con el panorama general descrito, puesto que la molécula de *R. diazi* no muestra diferencias importantes en comparación con las propiedades estructurales que tiene la colágena purificada de la piel del conejo, al menos al nivel en que se llevó a cabo el análisis.

Respecto a la estructura primaria no se puede obtener información en relación a las diferencias o semejanzas entre estas dos moléculas, sin embargo se cuenta con información indirecta extraída de los resultados del análisis de aminoácidos y los cristallitos SLS.

El análisis de aminoácidos que se presenta en la sección de resultados es un experimento preliminar, puesto que la variación encontrada entre las dos proteínas no concuerda con el parecido que demostraron en las otras pruebas efectuadas.

Una de las diferencias más notables se presenta en el número de residuos de glicina obtenido para la molécula del conejo doméstico. En general la glicina ocupa el 33% del número total de residuos y en este caso el valor es muy bajo difiriendo en 26 residuos con respecto a *R. diazi*. Existen datos⁽⁴⁵⁾ en donde se ha observado que la fracción de colágena de piel de conejo soluble en sales neutras es deficiente en los aminoácidos más comunes en esta proteína (glicina, alanina, prolina e hidroxiprolina), por el contrario la colágena

solubilizada en citratos, al ser analizada en su composición, muestra un contenido más elevado de estos aminoácidos. Esto puede deberse a que las condiciones de extracción de la fracción soluble en sales a pH neutro parece favorecer el arrastre de contaminantes de naturaleza protéica⁽⁴⁶⁾, lo que se expresa en el análisis de aminoácidos como una disminución de la cantidad de los residuos más comunes en la colágena.

Un proceso similar se pudo presentar en este experimento, ya que existen datos en donde se ha detectado la presencia de colagenasa unida a colágena extraída de diferentes tejidos y especies⁽⁴⁷⁾ y de una proteasa unida a la colágena purificada a partir de piel de cobayo⁽⁴⁸⁾. La presencia de estas proteínas asociadas a la colágena no se detecta en los sistemas de electroforésis utilizados en este trabajo, sin embargo es probable que se manifiesten en el análisis de aminoácidos influyendo en las variaciones encontradas tanto para la glicina como para el ácido aspártico y el ácido glutámico.

La ausencia de arginina y metionina, aparentemente se debió a un error experimental, ya que los picos correspondientes a estos aminoácidos no aparecieron en la gráfica, y en los duplicados que se corrieron aumentó el número de aminoácidos no detectados.

Por otra parte el contenido de aminoácidos indica una diferencia notable en el grado de hidroxilación de residuos de prolina, apareciendo más hidroxilada la colágena de *R. diazi*. Este fenómeno no se detectó únicamente en el análisis sino que continuamente se manifestó en los experimentos de electroforésis y viscosimetría, en donde la colágena de *R. diazi* aparecía en menor concentración debido a que en todos los ensayos la cantidad de colágena se determinó en relación al contenido de hidroxiprolina. Esta diferencia es de importancia ya que la 4-hidroxiprolina tiene la capacidad de esta-

bilizar la triple hélice mediante la formación de puentes de hidrógeno establecidos entre las cadenas α mediante moléculas de agua^(9,43). Si relacionamos los resultados del análisis de aminoácidos referentes a la cantidad de hidroxiprolina con las temperaturas de desnaturalización obtenidas por viscosimetría, observamos que concuerdan con lo esperado; la molécula de *R. diazi* presenta una temperatura de desnaturalización ligeramente superior a la obtenida para el conejo, lo que indica que la molécula es más estable.

Las temperaturas obtenidas en las condiciones empleadas son menores a las reales debido a que el CaCl_2 es un agente con la capacidad de desestabilizar la triple hélice de la molécula, lo que produce un desplazamiento de la curva hacia temperaturas inferiores. Además de esto, el tiempo de incubación empleado para cada temperatura fue de 30 min, lo que provoca que la temperatura obtenida sea un grado más alta en comparación con los experimentos en donde el tiempo de incubación es mayor, acercándose más a la temperatura real de desnaturalización⁽⁴⁰⁾. El sistema de CaCl_2 se utilizó porque en presencia de éste la colágena no forma fibras y de esta manera se puede distinguir claramente, mediante viscosimetría, la zona de transición de la molécula a la conformación de menor energía.

En los cristallitos SLS el patrón de bandas obtenido es esencialmente el mismo en ambas moléculas. Estas bandas son producidas por el agrupamiento de residuos polares y no polares a lo largo de la proteína, de manera que la sustitución de algunos residuos, que generalmente involucra aminoácidos con polaridades semejantes, no sería detectada por este mecanismo. Una herramienta que permitiría un análisis más detallado de la estructura primaria sería la digestión parcial de la proteína con bromuro de cianógeno (CNBr), y el subsecuente análisis de los péptidos mediante electroforésis SDS en gel de poliacrilamida.

En el sistema de electroforésis en presencia de SDS no se detectaron diferencias en la movilidad, lo que sugiere que el peso molecular es igual en ambas proteínas, puesto que en presencia de SDS las cargas de la molécula se encuentran uniformizadas siendo su tamaño el único factor que determina diferencias en la migración. Las pruebas de viscosidad intrínseca, así como la longitud de la molécula medida en los cristallitos SLS, son coherentes con este resultado y con los valores esperados para las cadenas de colágena de 280 nm de longitud y 100,000 de peso molecular⁽⁴⁴⁾.

Se encontró también que no existe diferencia en la carga entre estas dos moléculas ya que la movilidad en electroforésis en gel de poliacrilamida amortiguada a pH 5.5 presentó el mismo patrón. Un resultado similar se obtuvo cuando la movilidad de las cadenas $\alpha 1(I)$ y $\alpha 1(III)$ es retardada en presencia de urea 8 M en el gel.

Adicionalmente se obtuvo un resultado interesante en la electroforésis SDS en presencia de urea o sin ésta, que consistió en la detección de un componente que migra entre las cadenas α y las bandas correspondientes a los dímeros β de la colágena de *R. diazi*; este componente no apareció en la muestra del conejo doméstico. La incubación con proteasas demostró que esta banda es susceptible a la colagenasa bacteriana, esto indica una naturaleza colagénica lo cual abre dos posibilidades: la primera que consista en un producto de degradación y la segunda que esta banda corresponda a otro tipo de colágena. Esta última posibilidad es la más probable, ya que en el tratamiento de la muestra con tripsina la banda no muestra ser susceptible, lo que indica su estado nativo. Además de esto su posición en el gel aparentemente corresponde a la colágena tipo γ ⁽²⁴⁾.

En relación a la solubilidad de ambas muestras, se encontró que la colágena de *R. diazi* no se solubilizó en

cantidades apreciables en ácido acético 0.5 M, por esta razón se extrajo con pepsina logrando de esta manera solubilizar una mayor cantidad, puesto que la pepsina rompe las porciones no helicoidales de la molécula que es el sitio en donde se establecen las uniones intermoleculares. La solubilidad de la colágena de conejo por el contrario, fue mayor. Esta diferencia guarda relación con la edad del animal ya que la colágena de depósito reciente presenta un número menor de uniones intermoleculares que aumenta a medida que el tiempo de depósito es mayor. La pepsina aparentemente no alteró las diferencias de peso molecular, ni la capacidad de la colágena de *R. diazi* de autoensamblarse.

Tomando en cuenta lo anterior, podemos decir que la molécula de colágena de piel de *Romerolagus diazi* presenta las características comunes de las colágenas de vertebrados. Las diferencias en la hidroxilación de residuos son una propiedad que puede presentar variaciones entre individuos de la misma especie o bien, en un solo individuo en diferentes estados fisiológicos. No obstante, cabe la posibilidad de que esta sea una característica particular de la especie. Por otro lado, el componente detectado en electroforesis de colágena de *R. diazi* puede corresponder al tipo V de colágena, y el hecho de que no aparezca en la muestra extraída del conejo doméstico puede deberse al método de extracción utilizado, ya que existen evidencias experimentales que así lo demuestran⁽²⁴⁾.

La permanencia de algunos aminoácidos en las estructuras protéicas durante la evolución, es el resultado del hecho de que las sustituciones de los residuos en las proteínas son un evento que está sometido a la acción de la selección natural, puesto que la posición del aminoácido desempeña un papel funcional en la molécula, que es el producto de las interacciones que lleva a cabo con el medio y con otros resi-

duos, así, cuanto mayor sea la interacción que guarden distintas regiones de la molécula para determinar su actividad biológica, aumentará el número de restricciones de cambio para un residuo particular, determinadas por los mecanismos de la selección natural.

La colágena, como el principal elemento estructural de los metazoarios requiere que las interacciones entre las cadenas α que constituyen la triple hélice sean posibles, así como su capacidad de agregación que también depende de la estructura primaria. Es entonces un resultado lógico el que la molécula presente esta permanencia estructural al ser analizada en especies diferentes.

REFERENCIAS

1. Grant, M.E., Prockop, D.J., *New Eng. J. Med.* 286: 194; 1972.
2. Trelstad, R.L., *The Journal of Histochem and Cytochem.* 21 (6): 521-528; 1973.
3. Trelstad, R.L., *Mundo Científico* 1 (3): 284-295; 1981.
4. Traub, W.E., Piez, K.A. *Adv. Prot. Chem.* 25: 243; 1971.
5. Piez, K.A. in *Biochemistry of Collagen* (Ramachandran, G.N. ed.): 1-40. Plenum Press New York; 1976.
6. Pérez Tamayo, R. en *Los Perfiles de la Bioquímica en México* (Jaime Mora ed.): 495-514. UNAM. México; 1974.
7. Kuhn, K. *Essays Biochem.* 5: 59; 1969.
8. Eyre, D.R. *Science* 207: 1315-1322; 1980.
9. Berg, R.A. Prockop, D.J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52 (115); 1973.
10. Tanzer, M.L. Church, R.L. Yaeger, J.A. Wampler, D.E. Park, E.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3009-3013; 1974.
11. Vuust, J. *Eur. J. Biochem.* 60: 41-50; 1975.
12. Veis, A. *Annals of Clin. and Lab. Sci.* 5 (2): 123-131.
13. Fessler, L.I. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 129-162; 1978.
14. Prockop, D.J. Juva, K. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 53: 661-668; 1965.
15. Hodje, A.J. en *Treatise on Collagen* (Ramachandran G.N. ed.) Academic Press Nuy York vol I: 185; 1967.
16. Trelstad, R.L. Hayashi, K. *Develop Biol.* 71: 228; 1979.
17. Bruns, R.R., Gross, J. *Biochemistry* 12 (5): 808; 1973.
18. Tanaka, K. Sugawara, B. Katsura, N. *Polimer Journal*, 10 (2): 201-205; 1978.
19. Harris, D.E. Jr. Krane, M.S. *Medical Progress* 291 (II): 557-563 (12): 605-609 (13): 661; 1974.
20. Pérez Tamayo, R. *American Journal of Pathology* 92 (2): 509; 1978.
21. Gross, J. in *Chemistry and Molecular Biology of the intercellular Matrix* (Balasz, E.A. ed.): 1623-1636. Acad. Press, New York 1970.
22. Miller, J.E. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 13: 165-192; 1976.
23. Piez, K.A. en *Treatise on Collagen* (Ramachandran, G.N. ed) Academic Press, New York vol I: 207; 1967.
24. Bornstein, P. Sage, H. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 957-1003; 1980.
25. Miller J.E. et al *Biochemistry* 15: 787-792; 1976.
26. Fietzek, P.P. et al *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 84-86; 1977.
27. Granados, H. *Información Básica sobre el Conejo de los Volcanes Romerolagus diazi*. *Lab. Biol. Anim. Exp. Dept. de Biol. Fac. de Ciencias, UNAM, México*; 1979.
28. Hall, E. Raymond. *The Mammals of North America I*, 2nd. ed. John Wiley & Sons: 286-294; 1981.
29. Cervantes, R.F. 1980. *Algunos Aspectos de la Biología de Romerolagus diazi* (Ferrari-Pérez) 1893 (Mammalia/Lagomorpha). Tesis profesional, Depto. de Biol. Fac. de Ciencias. UNAM.
30. Barrera, A. *Ann. Inst. Biol. UNAM. Ser. Zool.* 39: 35-99.
31. Granados, H. *Naturaleza* 11: 161-166; 1980.
32. Gross, J. *J. Exp. Med.* 107: 247; 1958.
33. ChandraRajan, J. *Biochem. & Biophys. Res. Comm.* 83 (1): 180-186; 1978.
34. Stagemann, H. Hoppe-Seyler's, *Z. Physiol. Chem.* 311: 41; 1958.
35. Woessner, J.F. Jr. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 93: 440-447, 1961.
36. Laemmli, U.K. *Nature* 222: 680; 1970.
37. Hayashi, T. Nagai Y. *J. Biochem.* 86: 453-459; 1979.

39. Adams, E. Frank, L. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 1005-61; 1980.
40. von Hippel, P.H. et al. *Biochemistry.* 2 (6): 1387; 1963.
41. Fietzek, P.P. & Kuhn, K. *Int. Rev. Conn. Tiss. Res.* 7: 1; 1976.
42. Rojas, M.P. 1951. Estudio Biológico del Conejo de los Volcanes (Cénero *Romerolagus*) Tesis profesional depto. de Biol. Fac. de Ciencias, UNAM.
43. Ramachandran, G.N. Ramakrishnan in *Biochemistry of Collagen*, Plenum Press New York; 1976.
44. von Hippel, P.H. in *Treatise on Collagen* (Ramachandran, G.N. ed.) vol I. Academic Press. 1967.
45. Jackson, D.S. *Biochim. Biophys. Acta.* 27: 418; 1958.
46. Eastoe, J.E. in *Treatise on Collagen* (Ramachandran G.N.ed.) Academic Press New York. vol. 1: 40; 1967.
47. Pardo, A. Soto, H. Montfort, I. & Pérez Tamayo, R. *Connect Tissue Res.* 7: 253-261; 1981.
48. Calahorra, F.M. comunicación personal, 1982.