

00562

5

14

PRODUCCION DE COLAGENASA Y GELATINASAS POR MACROFAGOS
ESTIMULADOS CON EL POLISACARIDO CARRAGENINA

Tesis para obtener el grado de Maestro en
Ciencias Químicas (Bioquímica)

Ricardo López Escalera Romano. 1986

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

I. INTRODUCCION

1. La colágena	2
2. El recambio	3
3. Las colagenasas	4
4. Y el granuloma de carragenina	8

II. SECCION EXPERIMENTAL

1. Colagenasa activa presente en el medio de macrófagos estimulados <u>in vivo</u> con el polisacárido carragenina	
material y métodos	13
resultados	19
2. Metaloproteinasas neutras con actividad sobre gelati na detectadas en el medio de macrófagos estimulados	
material y métodos	26
resultados	28
3. Purificación parcial de las actividades enzimáticas presentes en el medio de macrófagos estimulados	
material y métodos	31
resultados	33

III. DISCUSION

47

IV. CONCLUSIONES

54

V. REFERENCIAS.

55

RESUMEN

Se obtuvieron macrófagos peritoneales de cobayos estimulados mediante la aplicación intraperitoneal del polisacárido carragenina. Las células se mantuvieron en cultivo durante cuatro días y se determinó actividad colagenolítica en el medio. En contraste a los cultivos control, los macrófagos estimulados liberaron colagenasa. La enzima se detecta en forma activa y aparece principalmente durante el primero y segundo día de cultivo, el tratamiento de las preparaciones con tripsina o con el compuesto organomercurico 4-APMA no reveló actividad latente. La enzima es inhibida por suero y por los agentes quelantes EDTA y O-fenantrolina. De modo interesante se detectó la presencia de metaloproteinasa(s) con actividad sobre gelatina en el medio de células estimuladas coexistente con la actividad colagenolítica. Ambas actividades pueden separarse mediante cromatografía de afinidad en heparina sefarosa. La fracción sin afinidad por la resina mostró una banda de actividad gelatinolítica correspondiente a un peso molecular aproximado de 37 Kd. La fracción con afinidad representa la actividad colagenolítica y muestra en electroforesis en geles de poliacrilamida un patrón de bandas con pesos moleculares de 62 a 68 Kd. Los resultados se discuten en relación al papel instrumental que desempeña el macrófago durante el mecanismo degradativo de la colágena en el granuloma de carragenina.

ABSTRACT

Guinea pig peritoneal macrophages were elicited by the intraperitoneal injection of the algal polysaccharide carrageenin. The cells obtained were cultured for four days and the tissue culture medium was assayed for collagenolytic activity. In contrast to control cultures, the stimulated macrophages released collagenase. The enzyme appeared in active form mainly during the first and second day of culture. The treatment of the preparations with trypsin and the organomercurial compound 4-APMA didn't develop an increase in collagenolytic activity. The enzyme is inhibited by serum and the metal chelating agents EDTA and O-Phenanthroline. Of interest is the fact that a specific metal-dependent gelatinolytic activity parallels the presence of collagenase in the media of stimulated cells. Both enzymatic activities can be separated by affinity chromatography in heparin-sepharose. The fraction with no affinity for the column represents a neutral gelatin specific protease with an approximate molecular weight of 37 Kd. The heparin-bound fraction represents the collagenolytic activity and

shows in SDS-PAGE a pattern of several bands ranging from 62 to 68 Kd. The results are discussed with relation to the instrumental role of the macrophage system during the collagen degradation in the experimentally induced model of the carrageenin granuloma.

INTRODUCCION

El concepto de estructura en los organismos vivos no lleva implícita una idea de rigidez e inercia, sino que en los distintos niveles de organización, los elementos estructurales se ajustan en forma dinámica a las necesidades variables de un organismo por una morfología acorde con la función biológica. En el nivel de organización tisular, los armazones de soporte intercelulares aparte de representar el medio de sostén y conexión, desempeñan funciones importantes en las que la interacción de la célula con el medio externo genera transformaciones del tejido durante la morfogénesis y en distintos estados fisiológicos o patológicos.¹

LA COLAGENA

En los animales multicelulares, la estructura, la conexión y el soporte dependen del tejido conectivo, el cual presenta una diversidad de funciones debido a la heterogeneidad de sus componentes moleculares: Colágenas, proteoglicanos y otras glicoproteínas.

De los distintos elementos del tejido conectivo la colágena es el grupo de proteínas mas importante en relación a su abundancia, ya que constituye el 30% del contenido protéico total de un mamífero (2). Esta familia de proteínas presenta una distribución generalizada y variable (3), los agregados de moléculas de colágena dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas dan lugar a diversas estructuras (4). Las fibras de colágena pueden formar elementos sólidos de gran resistencia como es el hueso, estructuras de soporte amortiguado como el cartílago, arreglos fibrilares resistentes a la tensión como los tendones y ligamentos, así como diversos tejidos con funciones altamente específicas como la cornea, con capacidad de transmitir la luz, o bien, las válvulas cardiacas que resisten la intensa presión a la que se encuentran sometidas durante todo el periodo de vida de un organismo.

La diversidad funcional de la colágena depende de la heterogeneidad genética y química de las cadenas que constituyen la molécula, y de su arreglo extracelular. Actualmente se han descrito diez tipos genéticos de colágena (5,6), los cuales, difieren en estructura primaria y en el grado de modificaciones post-traduccionales, abriendo así, una gran variabilidad en la hidroxilación, glicosilación y entrecruzamiento de los monómeros de colágena que constituyen las fibras insolubles paracristalinas del tejido conectivo.

En términos generales, una proteína se agrupa dentro de la familia de la colágena cuando presenta un dominio triple helicoidal, que consiste en el ensamble de tres cadenas polipeptídicas enrolladas hacia la derecha en la misma dirección (7). La posición de los grupos N-terminal se orienta hacia un lado de la molécula, y los grupos C-terminal hacia el otro. Cada cadena polipeptídica tiene una estructura primaria dada por la repetición del tripéptido Gly-X-Y, donde por regla general la prolina aparece en posición X y la 4-hidroxiprolina en posición Y (3,8). Otra característica de las proteínas colagénicas es la modificación post-traducciona l relativamente específica, de la prolina y lisina que aparecen en forma hidroxilada (4). De hecho, la presencia de hidroxiprolina permite cuantificar la cantidad de colágena indirectamente al medir la concentración de este

iminoácido (9), cuando se elimina la proteína Clq de la preparación. Dada la resistencia de la mayoría de las colágenas al ataque proteolítico de enzimas inespecíficas y la especificidad de las colagenasas, la susceptibilidad a la degradación por colagenasa constituye un criterio adicional de clasificación de las colágenas (10). Finalmente la capacidad de formar agregados multimoleculares de orden superior en el espacio extracelular es característica de proteínas colágenicas (11).

EL RECAMBIO

Los arreglos extracelulares de fibras de colágena se remodelan dependiendo de las necesidades fisiológicas de un organismo en un momento determinado, como es el caso de la morfogénesis tisular durante la metamorfosis del renacuajo, en donde se eliminan selectivamente las fibras de colágena de la cola, de una manera sincronizada con los cambios que preparan al animal para la transición de un medio acuático a un medio terrestre (12). Otro ejemplo es la reabsorción de la colágena depositada en el útero durante la gestación, que en el periodo post-parto es eliminada selectivamente con rapidez al disminuir la vida media de la colágena de 40 días en condiciones basales a 24 horas durante las primeras dos semanas después del nacimiento (13,14,15), lo que refleja la versatilidad metabólica de esta proteína. La situación patológica en un organismo involucra en algunos casos el desmantelamiento de estructuras formadas por colágena, como ocurre en la destrucción grave del cartílago articular durante la artritis reumatoide (16).

La remodelación de estructuras colagénicas es entonces una respuesta fisiológica o patológica que se presenta ante distintos tipos de estímulos, y en todos los casos el instrumento degradativo está representado por las colagenasas. Sin embargo, la remodelación no sólo es dependiente de la degradación de colágena sino también de la síntesis de esta proteína. Así, los procesos de síntesis y degradación en conjunto determinan la cantidad de colágena en un tejido, y en una dimensión temporal, las velocidades de síntesis y degradación involucran un concepto distinto: El recambio (12).

El análisis de las estructuras biológicas y su recambio, inmediatamente aparta la idea estática de la estructura y la sitúa dentro del cambio continuo que caracteriza a la naturaleza, siendo entonces la estructura un aspecto funcional en los organismos (17), que como todo evento fisiológico se encuentra sujeto a una estricta regulación.

LAS COLAGENASAS

La primera demostración de actividad colagenolítica en tejidos animales fue el resultado de un ingenioso experimento llevado a cabo por Gross y Lapiere en 1962 (18). En un sistema de explantes de tejido de renacuajo en metamorfosis cultivados sobre geles de colágena reconstituida, lograron observar lisis del gel de colágena en las áreas cercanas a los explantes. El análisis en microscopía electrónica de la colágena degradada en este sistema precipitada como cristalitas SLS (segment long spacing), demostró actividad colagenolítica. Los cristalitas SLS son una forma característica de precipitación de las moléculas de colágena que ocurre in vivo (19) y que se puede obtener in vitro (20). En este tipo de arreglo, las moléculas de colágena se ordenan en registro lateral de modo paralelo. Los grupos N-terminal quedan orientados hacia un lado del cristal y los grupos C-terminal hacia el otro, de forma tal, que la longitud del cristal coincide exactamente con la longitud de la molécula de colágena, o bien, con los productos de degradación liberados por la colagenasa (21), los cuales presentan una longitud menor.

A partir de la demostración de Gross y Lapiere, diversos modelos experimentales han permitido describir una gran cantidad de colagenasas animales (12,22,23) las cuales comparten las siguientes características: Son las únicas enzimas capaces de degradar la triple hélice de la colágena en condiciones fisiológicas de pH, temperatura y fuerza iónica (21); en el caso de las colágenas intersticiales de los tipos I, II y III se produce un solo corte en la posición 772-773, correspondiente en el tipo I, a un enlace peptídico establecido entre los residuos Gly-Ile de las cadenas alfa 1 (I), y la unión Gly-Leu en la cadena alfa 2(I) (24). En los otros tipos la ruptura se establece en las posiciones análogas (25).

En todos los casos, el producto de la acción enzimática de la colagenasa sobre las colágenas intersticiales es la liberación de dos fragmentos, los cuales se denominan TC_A y TC_B , y tienen el 75 y el 25% de la longitud original de la molécula de colágena (21). Los fragmentos liberados por acción de la colagenasa se desnaturalizan en las condiciones fisiológicas de temperatura, adquiriendo una conformación desordenada que recibe el nombre de gelatina (26).

La gelatina es un sustrato por el que las colagenasas muestran poca afinidad (27), su degradación depende de la presencia de otras proteasas extracelulares y de la acción de gelatinasas específicas, o bien, es pinocitada por macrófagos y otras células y degradada intracelularmente por enzimas lisosomales (21).

Las colagenasas presentes en los tejidos requieren zinc; este metal de transición se ha detectado asociado a las colagenasas de piel humana, de rata y de

Útero de rata mediante espectroscopía de absorción atómica (28). Además, la capacidad inhibitoria de la 1,10-fenantrolina, quelante de alta afinidad por metales de transición, indica el requerimiento de zinc. Estas enzimas también muestran dependencia de calcio (67), que parece desempeñar un doble papel, ya que por un lado es un activador de la enzima, y por el otro estabiliza la estructura terciaria de la proteína enzimática a la temperatura y pH fisiológicos. El tetra-acetato de etilén diamina (EDTA) inhibe la actividad de las colagenasas (22).

Las colagenasas son enzimas extracelulares que actúan a pH neutro y dada la resistencia de la colágena a la actividad de enzimas inespecíficas, constituyen el paso limitante en el mecanismo degradativo de la colágena (22), una vez que las fibras extracelulares se han solubilizado. Se ha postulado que la solubilización de moléculas probablemente depende a la actividad de una depolimeraza (22).

El arreglo de las estructuras tisulares depende entonces, de un estricto control en la actividad de la colagenasa. Las investigaciones llevadas a cabo en sistemas de cultivos celulares obtenidos de diversas fuentes y con capacidad de producir colagenasa han permitido el estudio del control degradativo de esta proteína. La regulación de la actividad colagenolítica presenta múltiples puntos de control establecidos en diferentes niveles, los cuales pueden resumirse de la siguiente manera (23):

1. Inducción de la síntesis y procesamiento de formas precursoras de proenzima,
2. Empaquetamiento y secreción
3. Activación de proenzima
4. Interacciones colágena-colagenasa y efecto del sustrato sobre la cinética de colagenolisis
5. Inhibición de la forma activa de la enzima.

En relación al primer nivel de regulación, se ha visto que los fibroblastos sinoviales (30) o de cornea (29) liberan pequeñas cantidades de enzima en ausencia de estímulos inductivos, aunque ha sido posible aislar líneas celulares con un alto potencial de síntesis de colagenasa (31). En general, la inducción de la síntesis de enzima depende de la participación de diferentes tipos celulares. Se ha descrito que los macrófagos producen y liberan factores de naturaleza polipeptídica que estimulan la síntesis de enzima de fibroblastos o de células sinoviales adherentes (32). La producción de estos factores es controlada, a su

vez, por sustancias liberadas por linfocitos estimulados apropiadamente con IgG agregada, concanavalina A o fragmentos Fc de IgG, lo cual muestra una relación entre la respuesta inmunológica y la remodelación del tejido conectivo (33). Interacciones celulares similares han sido descritas en la cornea (23).

En el caso de la producción de enzima en órganos completos, se ha visto que los esteroides progestacionales evitan la expresión de colagenasa en el útero pre-parto de la rata (23); del mismo modo estos esteroides tienen un efecto inhibitorio en la producción de colagenasa de macrófagos (34). Además, diversas sustancias han sido descritas como activadores de la síntesis de enzima (23).

La biosíntesis de procolagenasa es inhibida por los glucocorticoides en cultivos de explantes de piel (35,36), útero (36) y en macrófagos (37,38), al contrarrestar la liberación de ácido araquidónico limitando así la producción de prostaglandina E₂, de la cual es dependiente la síntesis de enzima (23). Se ha descrito que derivados del ácido retinóico inhiben la síntesis de enzima por células sinoviales (39).

Las colagenasas son secretadas al medio de cultivo como enzimas latentes (23) y pueden ser activadas mediante proteólisis limitada con tripsina (30) o mediante el uso de compuestos organomercuriales (40). Se ha descrito también un mecanismo espontáneo de activación que ocurre en las condiciones de almacenamiento (41).

La latencia de la enzima liberada puede deberse a dos factores: Por un lado, la producción de un zimógeno inactivo que requiere la ruptura de un fragmento de la molécula o un cambio conformacional para su activación; y por otro, la presencia de inhibidores específicos de la colagenasa que la inactivan una vez que ha sido secretada.

Utilizando un DNA complementario ha sido posible aislar el mRNA de la procolagenasa de células sinoviales (42). Al traducir este mensajero en un sistema libre de células y precipitar el producto de reacción con un anticuerpo monoclonal específico se ha encontrado que la proteína tiene un peso molecular de 59 Kd. Si se agregan al sistema membranas microsomales la forma de 59 Kd es reemplazada por una de 57 Kd, que es el principal producto segregado por las células en cultivo (42,43). Lo anterior indica un procesamiento de formas precursoras de la colagenasa que se denominan pre-procolagenasas. Una especie que aparece en menor cantidad en el medio de estas células tiene un peso molecular de 61 Kd y puede ser separada de la forma de 57 Kd mediante cromatografía de afinidad en concanavalina A, indicando la presencia de azúcares en la proteína (42). Este dato se refuerza cuando en presencia de tunicamicina (inhibidor de la glicosilación), la forma de 61 Kd no aparece (44). Así, se puede concluir que las células sinovia-

les en cultivo liberan dos especies de procolagenasa que aparecen como un dímero en electroforesis, y que son el producto del procesamiento cotraduccional que involucra una ruptura proteolítica y glicosilación.

Aunque la liberación de procolagenasa es un fenómeno generalizado no representa la situación permanente, ya que algunas células como los macrófagos peritoneales liberan la totalidad de la enzima en forma activa (45,46).

En el segundo nivel de regulación se ha visto que la secreción de colagenasa en diversos sistemas refleja la síntesis de novo (47). Solo se ha encontrado almacenamiento intracelular en leucocitos polimorfonucleares (48), de manera que los procesos de secreción de esta enzima son similares a los de las proteínas estructurales e inmunoglobulinas y distintos a los de las proteasas lisosomales (23).

El tercer nivel de regulación, que consiste en la activación de la proenzima, puede llevarse a cabo por la acción proteolítica de la tripsina, catepsina lisosomal, kalikreína plasmática, proteasas de células cebadas y plasmina (23). En el caso de la procolagenasa descrita anteriormente, la proteólisis limitada genera enzimas activas de la forma glicosilada y no glicosilada con un peso molecular de 50 Kd y 46 Kd respectivamente (42,43).

En fibroblastos de piel humana la procolagenasa liberada puede activarse espontáneamente, de una manera dependiente de la temperatura y del tiempo, sin mostrar cambio en el peso molecular (41). La activación de esta enzima puede facilitarse mediante la acción de proteínas activadoras descritas en piel, útero (49) y células sinoviales (50). En estudios realizados en nuestro laboratorio, se ha encontrado que una fracción obtenida del líquido de explantes de granuloma de carragenina tiene capacidad de activar procolagenasa de piel humana (51).

En algunos sistemas se ha descrito que el activador puede presentarse como proactivador y requiere ser activado con tripsina (23).

El efecto activador de los compuestos mercuriales aparentemente se debe a la autocatálisis de la enzima subsecuente a un cambio conformacional inducido por el activador.

Las condiciones de agregación del sustrato determinan el cuarto nivel de regulación de la actividad colagenolítica (23), ya que la mayoría de las colagenasas descritas revelan una mayor eficiencia al actuar sobre colágena en solución que cuando actúan sobre las fibras insolubles de esta proteína (52), ya que los agregados están estabilizados a través de enlaces intermoleculares establecidos entre aldehídos generados por la lisil oxidasa (53). Las colágenas que presentan

mayor número de enlaces intermoleculares muestran mayor resistencia a la acción de la colagenasa. Se ha establecido que la colágena polimérica puede aumentar su susceptibilidad a la colagenasa al ser incubada previamente con enzimas lisosomales o con proteasas del tipo de la catepsina D (21).

Finalmente, la inhibición de la enzima activa resulta ser un quinto nivel en la regulación de la colagenasa. Se han descrito en el suero varios inhibidores, de los cuales, casi el 95% de la capacidad inhibitoria del suero corresponde a la alfa-2-macroglobulina que tiene afinidad por la forma activa de la colagenasa y no por la forma latente (54). También presente en el suero se encuentra una proteína de 40 Kd denominada B1-anticolagenasa que específicamente inhibe colagenasa, sin embargo, de la capacidad inhibitoria total del suero este inhibidor solo contribuye con el 10%. Se ha visto que el inhibidor mencionado cruza inmunológicamente con un grupo de inhibidores de metaloproteinasas presentes en cultivos de explantes de piel, tendón y hueso (23). Todos los inhibidores son glucoproteínas cuyos pesos moleculares van de 25 a 30 Kd, no presentan afinidad por la enzima latente y se unen en una relación estequiométrica de uno a uno con una variedad de metaloproteinasas tisulares. Se les conoce como TIMP 'Tissue Inhibitors of Metalloproteinases' (55).

El esquema regulatorio de la colagenasa es muy complejo y aún cuando existen mecanismos generales de control, en cada tejido se presentan elementos regulatorios específicos.

Las alteraciones en la regulación de la degradación de colágena resultan en dos tipos de situaciones: Un exceso en la degradación o una deficiencia anormal. Asociadas a este desequilibrio se encuentran diversas enfermedades (56).

Las situaciones de degradación excesiva aparecen en enfermedades como la artritis reumatoide, las ulceraciones de la cornea, el colesteatoma, la invasión tumoral, la periodontitis, etc. Por otro lado, ante deficiencias en la degradación se pueden presentar cuadros fibróticos como la cirrosis hepática, la fibrosis pulmonar, la esclerodermia, etc. Las alteraciones colagenolíticas no son la causa directa o primordial en estas enfermedades, sino que representan el principal daño tisular asociado a los cuadros patológicos (22).

EL GRANULOMA DE CARRAGENINA

Distintos tipos de procesos biológicos involucran la degradación de fibras de colágena. Tal es el caso de la morfogénesis constructiva, el recambio de estructuras tisulares y su reparación y la destrucción indiscriminada de origen patológico (12). En estas distintas categorías las interacciones celulares, la

función individual de cada célula y la regulación de la actividad colagenolítica deberán descansar sobre mecanismos diferentes, por lo que los diversos modelos experimentales in vivo o in vitro permitirán entender en cada caso los elementos básicos del control de la degradación de colágena.

Un modelo de estudio in vivo de la síntesis y degradación de colágena es el granuloma inflamatorio producido en animales experimentales por la inyección subcutánea de carragenina (57,58). Este compuesto es un polímero de unidades de galactosa que se presenta en dos formas, kappa y lambda; las propiedades inflamatorias se le han atribuido a la especie lambda (59).

La respuesta biológica a la administración de la carragenina consiste en el desarrollo de un granuloma, es decir, existe una inflamación con leucocitos polimorfonucleares y macrófagos que secuencialmente presenta un depósito de tejido conectivo, el cual, después de llegar a una fase máxima es sucedido por la reabsorción del tejido depositado. La duración del proceso es variable según la cantidad de carragenina inyectada y las condiciones del animal experimental, pero en general va de dos a cuatro semanas (57).

Los estudios ultraestructurales en el granuloma de carragenina han demostrado la existencia de una población heterogénea de células fundamentalmente de tres tipos: Leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y fibroblastos (58). A lo largo de la evolución del fenómeno estas poblaciones celulares aumentan o disminuyen en un orden secuencial. En las etapas tempranas se observan leucocitos polimorfonucleares que presentan en su citoplasma inclusiones de un material denso a los electrones, el cual carece de una membrana y se encuentra rodeado de gránulos específicos lo que sugiere que estas células se encuentran digiriendo materiales extraños, probablemente la carragenina. Los macrófagos también se encuentran desde las etapas tempranas del granuloma con inclusiones citoplásmicas parecidas a las de los leucocitos. El número de macrófagos disminuye a medida que el granuloma se desarrolla y las características citoplásmicas varían hasta que la presencia de gránulos desaparece por completo a los catorce días después de la inyección. En los estudios de la fase de reabsorción del granuloma no se logró observar la presencia de colágena en el interior de los macrófagos, a diferencia de la imagen ultraestructural de otros sistemas en reabsorción como la involución del útero post-parto. Las poblaciones de fibroblastos aparecen en forma paralela a la evolución del granuloma y su número aumenta hasta que a las dos semanas posteriores al estímulo se convierten en las células predominantes. En las etapas iniciales del fenómeno se distingue en los fibroblastos un retículo abun-

dante y polisomas así como algunas fibras de colágena asociadas a vesículas citoplásmicas indicando síntesis activa de colágena (58). Además se observan inclusiones citoplásmicas densas a los electrones que van desapareciendo. Una semana después, el fibroblasto muestra características citoplásmicas diferentes, como dilatación del retículo endoplásmico y aparición de fibras de colágena intracelulares; sin embargo, no se han detectado signos morfológicos que indiquen degradación intracelular (58).

Extracelularmente, los estudios ultraestructurales del granuloma de carragenina (58) indican un depósito activo de colágena que aparece de modo simultáneo con diversos signos de degradación que aumentan en extensión e intensidad hasta que al final del proceso se detectan muy pocas fibras de colágena intactas.

La reabsorción de la colágena del granuloma de carragenina depende primordialmente de la acción extracelular de una colagenasa. La presencia de esta enzima ha sido sospechada desde hace mucho tiempo, las pruebas experimentales son las siguientes:

Un fragmento de tendón de cola de rata cuyo componente principal es la colágena tipo I resulta ser degradado al insertarse en un granuloma en periodo de reabsorción (60).

Utilizando la técnica de explantes de tejido descrita por Gross, Pérez Tamayo logró visualizar lisis del gel de colágena alrededor de fragmentos de granuloma obtenidos desde los tres días después de aplicado el estímulo y en días subsiguientes (57).

Posteriormente Pardo (61) y Pérez Tamayo (61,62) detectaron actividad en el medio de cultivo de explantes de granuloma obtenidos en reabsorción. Una fracción de esta actividad se encuentra en estado latente y requiere una cromatografía en filtro molecular para revelar actividad. A partir de esta preparación se purificó parcialmente la colagenasa del granuloma de carragenina mediante cromatografía de afinidad en safarosa-4B acoplada a colágena (62). La enzima comparte las características comunes de las colagenasas de vertebrados. Es inhibida por EDTA, cisteína y suero, su pH óptimo de actividad es neutro y muestra mayor actividad al ser incubada contra el sustrato en solución que sobre colágena reconstituída. Los productos liberados por esta enzima representan el 75% y probablemente el 25% de la longitud original de la molécula. Las preparaciones parcialmente purificadas son capaces de degradar la colágena en fragmentos aún menores a los descritos cuando se incuban a temperatura fisiológica. Lo anterior indica probablemente la presencia de enzimas gelatinolíticas en esta preparación.

Haciendo uso de otro tipo de metodología se emplearon técnicas de extracción con tritón X-100 a partir de homogenados de granuloma, y se demostró (63) que se puede extraer colagenasa latente, la cual se activa con el compuesto mercuríco 4-aminofenil-mercurio acetato (4-APMA). La actividad colagenolítica en estos experimentos se recupera al pasar la preparación por una cromatografía en filtro molecular en dos fracciones distintas; una de estas con un peso molecular de 60 Kd y otra asociada a una fracción de alto peso molecular en donde la enzima se encontró unida a su sustrato.

Se ha obtenido un anticuerpo dirigido contra la colagenasa del granuloma de carragenina (65) que al probarlo en inmunodifusión contra la fracción cruda de la enzima y contra colagenasa-unida a colágena pura de piel de cobayo, resultó ser monoespecífico. Con este anticuerpo se determinó la presencia de la colagenasa en secciones de granuloma correspondientes a distintos periodos de evolución y se encontró que la proteína enzimática está presente tanto en la fase de depósito como en la de reabsorción.

En relación a la actividad de la enzima en ambas etapas, recientemente se ha encontrado actividad colagenolítica en homogenados de granuloma incubados directamente contra la colágena endógena del tejido (64). Estos estudios demuestran que existe actividad colagenolítica en ambas etapas; durante el depósito, mas de la mitad de la actividad se encuentra en forma latente. Al medir actividad colagenolítica en los homogenados incubados en presencia de CaCl_2 0.03 M se alcanza en las preparaciones de depósito el mismo nivel de actividad que en reabsorción.

El estudio inmunohistoquímico indirecto del granuloma (65) ha revelado que la proteína enzimática se encuentra en asociación con las estructuras extracelulares tanto en el depósito como en la reabsorción; esta localización extracelular y la distribución de la enzima asociada a las fibras de colágena coinciden con las observaciones de una colagenasa-unida a colágena (66) en preparaciones de colágena parcialmente purificada de piel y de granuloma de carragenina. Un aspecto interesante del estudio inmunohistoquímico es que en ningún caso se detectó la tinción de células.

En resumen, se sabe que la degradación de la colágena en el granuloma de carragenina involucra la acción de una colagenasa presente desde la fase inicial, una fracción de la cual se encuentra en estado latente. La distribución de la enzima es constante a lo largo de la evolución del proceso y coincide temporal-

mente con las distintas poblaciones celulares. Su origen celular se desconoce en este sistema.

En los procesos inflamatorios una característica constante es la presencia de macrófagos, que en los casos de inflamación crónica se convierten en el elemento celular predominante (68). Este sistema de células desempeña un papel instrumental en el daño tisular asociado con la inflamación, ya que los macrófagos activados pueden liberar distintas enzimas con potencial degradativo incluyendo colagenasa (69).

El estímulo de los macrófagos con diversos compuestos como lipopolisacáridos (70), muramyl dipéptido (71) y linfocinas (72), dispara una serie de eventos membranales en donde por acción de la fosfolipasa A_2 se libera ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana, el cual, subsecuentemente es transformado a prostaglandina E_2 (PGE_2) induciendo la síntesis de proteínas entre estas de colagenasa (73) que es liberada posteriormente.

Los estudios del mecanismo degradativo de la colágena en el granuloma de carragenina descritos anteriormente se han llevado a cabo utilizando el tejido completo y debido a la heterogeneidad de los componentes celulares capaces de producir colagenasa en este sistema, el origen de la enzima se desconoce.

El presente trabajo forma parte de un proyecto general que tiene como objetivo conocer el papel individual de las distintas células en el mecanismo de colagenólisis en el granuloma mencionado. De modo particular, esta investigación tiene como objetivo analizar la capacidad de producción de colagenasa por macrófagos estimulados con carragenina, sobre la base del papel instrumental que desempeña este tipo celular en otros sistemas y de su coexistencia con la actividad y presencia de la enzima en el desarrollo del granuloma de carragenina.

COLAGENASA ACTIVA PRESENTE EN EL MEDIO
DE MACROFAGOS ESTIMULADOS IN VIVO CON
EL POLISACARIDO CARRAGENINA.

MATERIAL Y METODOS

1. Estímulo in vivo de macrófagos peritoneales.

La cavidad peritoneal de cobayos contiene macrófagos residentes sin características inflamatorias o de activación que pueden obtenerse directamente mediante lavado; la cantidad de células en este sistema se puede aumentar considerablemente al inducir un exudado celular mediante la aplicación de diversos compuestos, y dependiendo del tipo de irritante se obtienen células con diferentes características de activación (74).

1. Se obtuvieron células de la cavidad peritoneal de animales no estimulados para ser utilizadas como control.
2. Con objeto de analizar el efecto estimulante de la carragenina sobre la producción de colagenasa, se aplicó intraperitonealmente una solución esteril del polisacárido al 1% preparada en NaCl 0.15 M (5 ml), cuatro días después se extrajeron las células.
3. Para efectos comparativos, se estimularon cobayos con 5 ml de proteosa peptona al 10% en NaCl 0.15 M (75). Los macrófagos estimulados se extrajeron después de un periodo de cuatro días.

2. Cultivos celulares.

Las células de los tres grupos descritos anteriormente se colectaron de acuerdo a Boxer (45); brevemente: La cavidad peritoneal se lava con 15 a 30 ml de solución salina estéril balanceada con fosfatos (SSBF, KH_2PO_4 0.044M; NaOH 0.025 M; NaCl 0.15 M). Las células se recuperan mediante centrifugación a 800 r.p.m. en una centrífuga Beckman modelo L-21, y se lavan dos veces mas con SSBF. Se resuspenden en medio Eagle modificado por Dulbecco (GIBCO lab.cat. No. 430-2100, Chagrin Falls Ohio) libre de suero y preparado con antibióticos (penicilina 100 u/ml, estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sulfato de kanamicina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se siembran con una densidad de 2×10^6 células por ml en botellas de cultivo de plástico (Costar, Sci.Co.) o en cajas de petri de vidrio (10 cm de diámetro).

Los macrófagos se seleccionan por adherencia al vidrio o plástico manteniendo los cultivos a 37°C durante 3h con una atmosfera de 5% CO_2 95% aire. Al terminar este periodo de tiempo las células no adherentes se eliminan con el medio agitando suavemente y se agrega medio fresco.

En algunos casos las células se crecieron en presencia de albúmina (1 mg/ml). El medio de cultivo se colecta cada 24 h durante tres días en vista de que

en los experimentos preliminares se detectó actividad colagenolítica en este periodo. Se centrifuga y neutraliza inmediatamente, posteriormente el sobrenadante se concentra introduciéndolo en una bolsa de diálisis y cubriéndolo con azúcar glass, hasta disminuir 10 veces su volumen. Una vez concentrado, el medio se dializa contra un amortiguador Tris-HCl 0.05 M + CaCl₂ 0.01 M, pH 7.4; los medios concentrados se almacenan a -20°C hasta ser utilizados.

3. Obtención del sustrato para las pruebas de actividad colagenolítica.

3.1. Purificación de colágena.

La colágena se obtuvo a partir de piel de cobayo; las pieles se limpian de tejido subcutáneo y se cortan en fragmentos pequeños, se realiza una extracción de colágena en ácido acético 0.5M + 1 mg/ml de pepsina (76) agitando durante 48 h a 4°C. A partir de este extracto se realiza una purificación de colágena de acuerdo a Trelstad (77), mediante un procedimiento estándar que permite obtener mediante precipitaciones por salado con NaCl, una mezcla de los tipos genéticos I y III de esta proteína.

Existen datos (10,78) de que la colágena tipo III en estado nativo presenta un enlace susceptible a la acción proteolítica de la tripsina; específicamente un enlace Arg-Gly localizado cerca del sitio de corte producido por la colágena sobre esta proteína; aparentemente lo que provoca esta susceptibilidad es una región de la molécula que se caracteriza por una estabilidad helicoidal reducida (78). En función de que uno de los criterios para considerar al sustrato en estado nativo en las pruebas de actividad colagenolítica es su resistencia a la incubación con tripsina (79), se decidió purificar exclusivamente colágena tipo I.

3.2. Preparación de la colágena tipo I.

La colágena tipo I se purificó mediante precipitaciones diferenciales con NaCl de acuerdo al método descrito por Miller (80), el cual se resume a continuación:

Colágena solubilizada en amortiguador
Tris-HCl 0.05 M pH 7.6

Precipitar con NaCl hasta una concentración de 1.5 M.

Se obtiene el sedimento al centrifugar 30 min. a 20500 g, en éste se encuentra la colágena tipo III.

Se precipita la colágena tipo I en el sobrenadante llevando la concentración de NaCl a 2.5 M

El precipitado se recupera centrifugando 30 min. a 20500 g y se resuspende en ácido acético 0.005 M

Se precipita nuevamente mediante diálisis contra Na_2HPO_4 0.01 M

El precipitado se recupera centrifugando a 9000 g durante 30 min y se resuspende en 0.005 M ácido acético.

La preparación se dializa contra agua destilada y se liofiliza.

Todo el procedimiento se realiza a 4°C, la preparación de colágena tipo I se almacenó a -20°C hasta ser utilizada.

3.3. Marcaje radiactivo de la colágena tipo I.

Para llevar a cabo las pruebas de actividad colagenolítica, la colágena tipo I se acetiló con ^3H -anhidrido acético (Lot.No. 1244-271, New England Nuclear Boston Mass.) de acuerdo a las modificaciones de Lefevre (81) y Johnson-Wint (82) al método de Gisslow y Mc.Bride (83). La técnica se resume a continuación:

1. 100 mg de colágena tipo I se disuelven en ácido acético 0.01%, el pH se lleva a 8,3 agregando K_2HPO_4 1 M.
 2. Se diluyen 10 mg de ^3H -anhidrido acético (5 mCi) en 1.5 ml de benceno.
 3. A lo largo de 90 minutos se agrega esta solución gota a gota a la preparación de colágena, agitando constantemente y manteniendo la temperatura de reacción a 10°C.
 4. Se agita una hora más y la fracción protéica se precipita con NaCl al 15%.
 5. La colágena marcada se recupera centrifugando a 27 000 g durante 20 min, se resuspende en ácido acético 0.005 M y se dializa exhaustivamente hasta no obtener cuentas en el líquido de diálisis.
 6. Se liofiliza y se almacena a -20°C hasta ser utilizada.
- ### 4. Electroforesis con SDS en geles de poliacrilamida.

Esta técnica se realizó de acuerdo a Laemmli (84) utilizando geles preparados al 7.5% en la mayoría de los casos. Las preparaciones se dializaron o diluyeron con el amortiguador de la muestra descrito en este sistema ajustando la concentración de proteína entre 15 y 30 μg .

La electroforesis se corre a 5 mA/placa hasta que el frente del colorante

se introduce en el gel inferior, en este momento la corriente se aumenta a 30 mA/placa y se detiene cuando el colorante alcanza el extremo anódico del gel.

Las placas se tiñen con azul de Coomassie R al 1% y se destiñen con una solución de metanol al 5% y ácido acético al 7.5%. La densitometría de las bandas se llevó a cabo a 250 nm en un densitómetro Auto Scanner (Helena Laboratories).

4.1. Electroforesis con SDS en geles de poliacrilamida en presencia de urea.

Esta técnica se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Hayashi y Nagai (85), el cual es útil para detectar la presencia de colágena tipo III en preparaciones de colágena tipo I. La elevada concentración de urea en el gel (3.6 M), disminuye la movilidad de las cadenas alfa 1 (III) en relación a las cadenas alfa 1 (I).

5. Determinación de la concentración de colágena.

La concentración de esta proteína se calculó en relación al contenido de hidroxiprolina. Las muestras se hidrolizaron en HCl 6 N en ampollitas de vidrio cerradas a la flama, el tiempo de hidrólisis fue de 20 h a una temperatura de 110°C.

La determinación de hidroxiprolina en el hidrolizado se llevó a cabo de acuerdo a la modificación de Woessner (86) al método de Stegemann (87).

6. Determinación de proteínas.

Se llevó a cabo mediante el método descrito por Bradford (88), utilizando una curva patrón de albúmina sérica bovina y los reactivos para la determinación de proteínas de Bio Rad Laboratories. En algunos casos se determinó la concentración aproximada de proteínas mediante el método espectrofotométrico descrito por Groves (89).

7. Actividad colagenolítica.

La actividad de colagenasa se determinó de acuerdo al método de Terato y Nagai (90), extrayendo selectivamente los productos de degradación solubles en una solución de dioxano metanol en proporción 4:1.

Se incuban 100 µl del medio de cultivo concentrado con 50 µl de ³H-colágena (1 mg/ml) en amortiguador Tris-HCl 0.05 M + CaCl₂ 0.01 M + 0.2 M NaCl, pH 7.4, durante 12 h a 34°C en presencia o no del inhibidor. El volumen de reacción es de 0.3 ml.

Al término de la incubación se agregan los inhibidores y se precipita la colágena no degradada con 0.3 ml de dioxano-metanol a una temperatura de 8°C. los

fragmentos producidos por acción de la enzima se separan centrifugando a 2500 r.p.m. en una centrífuga Beckman L-21, durante 40 min a temperatura ambiente. Se colectan 200 μ l del sobrenadante en viales con solución de Bray para determinar la radiactividad liberada.

Los inhibidores utilizados fueron orto-fenantrolina 0.001M, tetraacetato de etilén diamina 0.08M (Sigma Chemicals, St.Louis Mo.) y suero homólogo descomple mentado diluído 1:30 en el amortiguador de reacción.

La temperatura de incubación fué de 34°C para evitar la desnaturalización térmica del sustrato, el cual tiene una temperatura de desnaturalización menor debido al proceso de acetilación (81).

Los resultados se expresan como el porcentaje que representan los péptidos solubles en dioxano-metanol con respecto a la radiactividad total incubada, res tando a cada preparación su control inhibido.

7.1. Activación de las preparaciones.

Se ha descrito la presencia de colagenásas latentes en varias preparaciones (40-42,44,91,92), y dependiendo de la fuente de obtención aparecen porcentajes variables de la enzima en forma activa en relación a la actividad total.

El tratamiento de proteólisis limitada con bajas concentraciones de tripsina y tiempos cortos de incubación (31), permite revelar en diversos sistemas la pre sencia de actividad colagenolítica latente. En el presente estudio se determinó actividad colagenolítica directamente en las muestras, o preincubando con dife rentes concentraciones de tripsina (0.5,1.0,2.5 y 5.0 μ g) a temperatura ambiente (25°C) durante 10 minutos, posteriormente se agrega el inhibidor de tripsina cua tro veces mas concentrado que la enzima. Se procede a determinar la actividad co lagenolítica de la muestra activada.

7.2. Determinación de actividad colagenolítica por electroforesis.

La actividad degradativa de la colagenasa se detecta en este método mediante la comparación de los patrones electroforéticos de la muestra inhibida y la mues tra activa incubadas con colágena nativa. La presencia de bandas con una migra ción mayor a la de las cadenas alfa o beta de colágena, así como una disminución de estas últimas, inhibible por EDTA, indican actividad colagenolítica (22). El procedimiento seguido es el siguiente:

100 μ l de medio concentrado se incuban con 50 μ g de colágena fría diluída en amortiguador Tris-HCl 0.05 M + CaCl₂ 0.01 M + NaCl 0.2 M, pH 7.4 en un volú-

men de reacción de 200 μ l. Se incuban a 34°C en presencia o ausencia de EDTA. Al término de la incubación se agrega inhibidor a los tubos que no lo tengan y 100 μ l de las mezclas de incubación se diluyen v/v con el amortiguador de la muestra descrito en el sistema de Laemmli, se hierven durante 2 minutos y se corre la electroforesis en las condiciones indicadas en el punto 4.

En todas las pruebas de actividad colagenolítica se requiere demostrar el estado nativo del sustrato, analizando para ello la susceptibilidad a tripsina.

RESULTADOS

1. Características del sustrato utilizado en las pruebas de actividad colagenolítica.

1.1. Pureza. El patrón electroforético de la colágena purificada de acuerdo a Trelstad mostró que la proteína esta libre de otros contaminantes, no está degradada como lo indica la ausencia de bandas por debajo de las cadenas alfa y consiste principalmente de una mezcla de colágena tipo I y colágena tipo III.

En el sistema de electroforesis de Hayashi y Nagai, la migración de las cadenas alfa 1 (III) es retardada en relación a las cadenas alfa 1 (I) como se puede apreciar en la figura 1a; esto se debe a la elevada concentración de urea en el gel (3.6M). Al purificar mediante precipitaciones por salado la preparación, se eliminó la colágena tipo III como se puede apreciar en el patrón electroforético de la figura 1 b, en donde desaparecen por completo las cadenas alfa 1 (III).

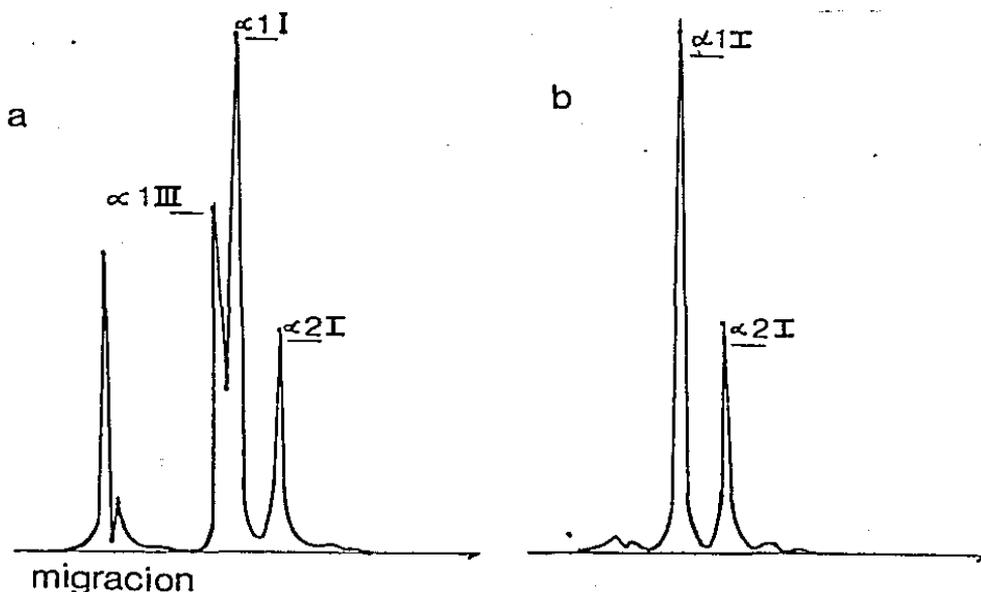


Fig.1 Trazos densitométricos de los gels de electroforesis de colágena tipo I y III (a), y de colágena tipo I obtenida al precipitar con NaCl 2.5 M (b).

1.2. Determinación del estado nativo del sustrato.

La colágena tipo I en estado nativo es resistente a la acción proteolítica de enzimas inespecíficas (10), cuando se pierde la estructura triple helicoidal de la molécula ésta puede ser degradada por proteasas inespecíficas como la tripsina o la pepsina. La preparación de colágena tipo I se incubó durante 3 h a 34°C con diferentes cantidades de tripsina; como se puede observar en la tabla 1, la molécula mostró ser resistente a la acción de esta enzima por lo que se considera que se encuentra en estado nativo a la temperatura en que se realizan las incubaciones de determinación de actividad colagenolítica. Como puede observarse, solo se degrada el 4.58% de la colágena incubada en una relación enzima sustrato de 1:50, en cambio la susceptibilidad de la hemoglobina a la tripsina es alta como se puede observar en la figura 10, aún en una relación enzima sustrato mucho menor.

En función de los resultados anteriores, en todos los experimentos se consideró actividad colagenolítica toda liberación mayor al 5% de la radiactividad incubada inhibible por EDTA, O-fenantrolina o suero.

Tabla 1. Porcentaje de degradación de la colágena tipo I obtenido al incubar 50 µg con distintas cantidades de tripsina.

µg de tripsina	% de degradación
0	0
0.5	0
1.0	4.06
2.5	4.58

1.3. Actividad específica.

Se determinó la concentración de colágena en relación al contenido de hidroxiprolina, y se midió la radiactividad en una muestra con la misma cantidad de colágena. La actividad específica de la colágena marcada es de 1 104 000 c. p.m./mg de colágena.

2. Determinación de actividad colagenolítica en el medio de células no estimuladas.

Los macrófagos extraídos de la cavidad peritoneal de cobayos que no recibieron estímulo previo (macrófagos residentes) no liberaron al medio de cultivo colagenasa activa. El tratamiento de 100 µl (50µg/ml de proteína) de medios concentrados con diferentes cantidades de tripsina (0.5, 1 y 2 µg) durante 10 minutos a temperatura ambiente no reveló la presencia de colagenasa latente en ningún día de cultivo, indicando la ausencia de liberación de enzima por parte de estas células.

3. Actividad colagenolítica en el medio de macrófagos obtenidos de animales estimulados.

El estímulo aplicado intraperitonealmente a los cobayos, ya sea de carragenina o proteosa peptona, aumentó el número de macrófagos obtenidos del peritoneo; en especial, la carragenina demostró ser un potente inductor de la llegada de estas células a la cavidad peritoneal. En la mayoría de los casos se obtuvo un número mayor de células con carragenina, en comparación con la proteosa peptona.

Los macrófagos estimulados *in vivo* con ambas sustancias liberaron al medio de cultivo colagenasa activa durante el primero y segundo día de cultivo principalmente, como se puede apreciar en la figura 2. La actividad se detectó incubando 100 μ l de medio concentrado (50 μ g/ml de proteína) con 50 μ g de 3 H-colágena, se muestran los datos de un experimento representativo.

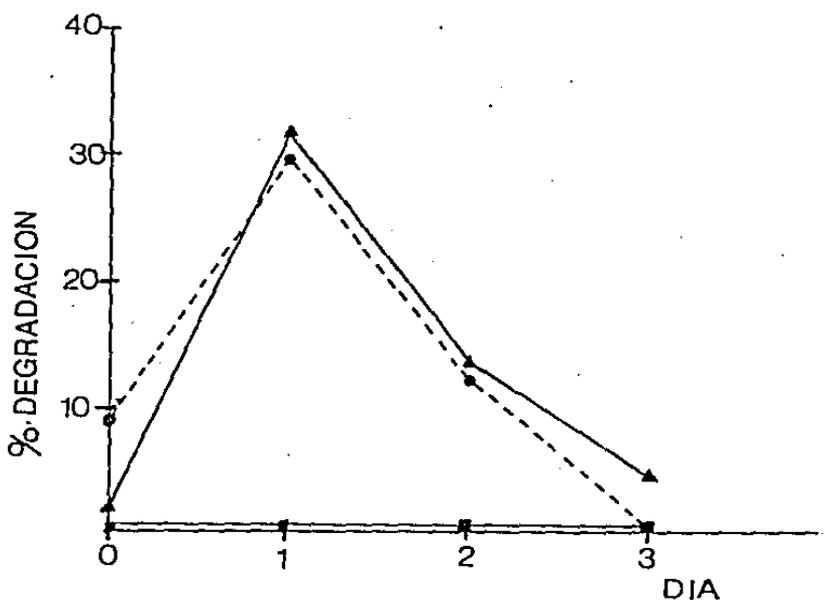


Fig.2. Actividad colagenolítica en el medio de diferentes días de cultivo de macrófagos estimulados con proteosa peptona (\blacktriangle — \blacktriangle), carragenina (\blacktriangle — \cdots — \blacktriangle) o no estimulados (\blacksquare — \blacksquare). La incubación se llevó a cabo durante 15 h a 34°C.

La actividad colagenolítica en los medios de células estimuladas con carragenina no aumenta al preincubar las preparaciones con diferentes cantidades de tripsina (de 0.5 a 5 μ g) (Fig.3), o activando con el compuesto mercúrico 4-APMA de acuerdo a Cawston (93) (Fig.4).

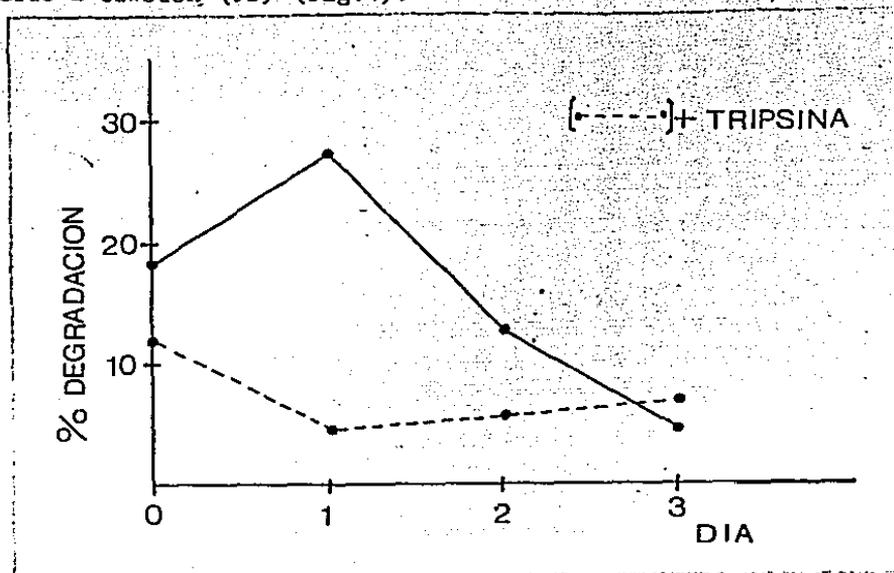


Fig.3. Efecto de la tripsina sobre la actividad colagenolítica del medio de macrófagos estimulados con carragenina.

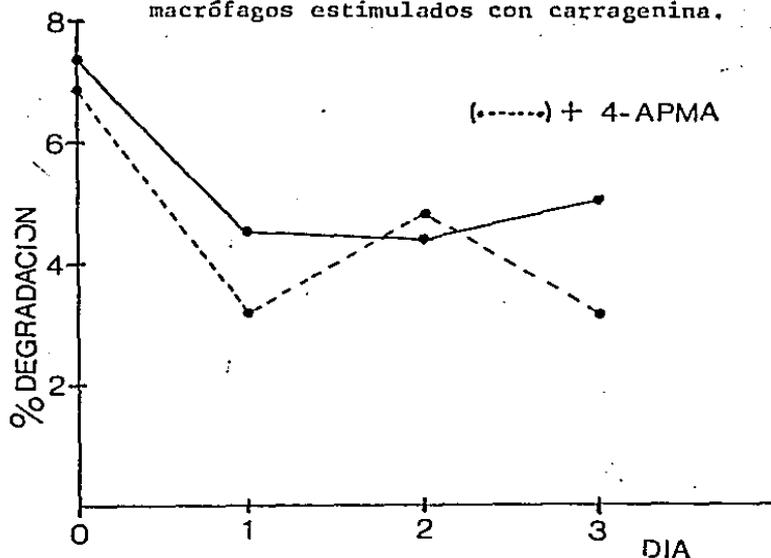


Fig.4 Efecto del compuesto mercúrico 4-APMA sobre la actividad colagenolítica presente en el medio de macrófagos. El ensayo se realizó preincubando o no con 4-APMA 0.005 M.

Finalmente, se probó el efecto de una fracción obtenida del medio de cultivo de explantes de granuloma de carragenina que ha mostrado capacidad de activar procologenasa de piel humana (51). Esta fracción no mostró efecto activador sobre las preparaciones de macrófagos.

3.1. Actividad colagenolítica de los medios de cultivo de macrófagos estimulados detectada mediante electroforesis.

La actividad colagenolítica de los medios de cultivo de macrófagos estimulados se determinó también por electroforesis. Se incubaron 50 μg de colágena con 100 μl de medio concentrado en ausencia y presencia de EDTA 0.08 M a 34°C durante 17 h. Al término de la incubación se tomaron 100 μl de la mezcla de reacción y se diluyeron con 100 μl del amortiguador de la muestra de Laemmli. En la figura 5 se muestra la actividad degradativa de los medios sobre la colágena, se puede observar que existe una degradación total de los fragmentos liberados por la enzima; esta actividad es inhibible por EDTA. La desaparición de las betas y alfas sugiere la presencia de proteinasas neutras con actividad sobre gelatina en los medios, las cuales pueden degradar los fragmentos liberados por la colagenasa.

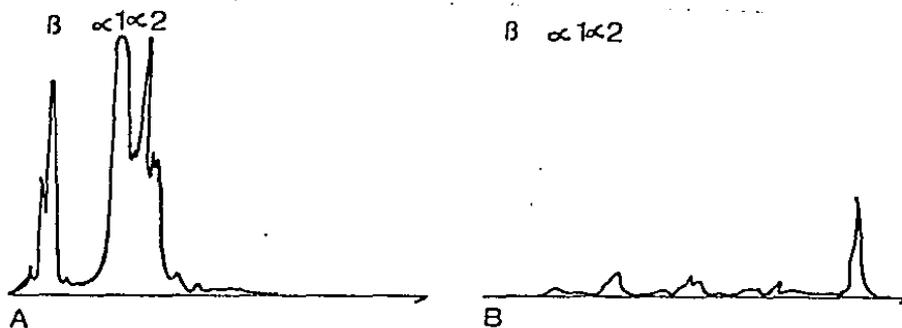


Fig.5 Densitometría del gel de electroforesis de: A) colágena + medio de macrófagos estimulados con carragenina + EDTA. B) colágena + medio de macrófagos estimulados con carragenina.

El conjunto de observaciones que se desprenden de los experimentos descritos indica que la colagenasa se encuentra en los medios de cultivo totalmente en forma activa, y que no existe en el sistema colagenasa latente. Se observa también (Fig.3) que el tratamiento con tripsina de preparaciones activas produce una disminución de la actividad, lo cual indica que probablemente la enzima activa es vulnerable a la acción proteolítica de la tripsina. Estas observaciones se han repetido continuamente en nuestro laboratorio utilizando diversas preparaciones (95).

4. Efecto de inhibidores.

La actividad colagenolítica descrita en el medio de macrófagos estimulados se inhibe con los agentes quelantes EDTA y O-fenantrolina y por suero homólogo descomplementado como se puede apreciar en la figura 6.

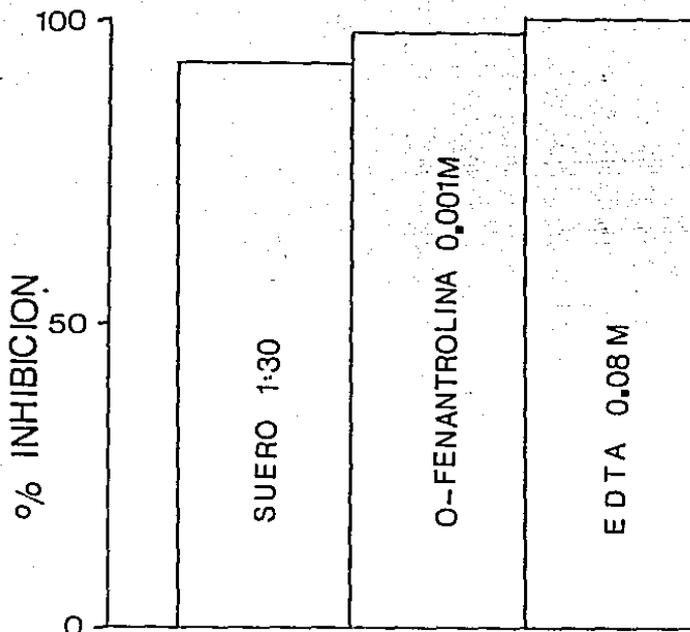


Fig.6 Inhibición de la actividad colagenolítica detectada en los medios de cultivo de macrófagos estimulados con carragenina.

5. Actividad colagenolítica en el homogenado de células estimuladas con carragenina.

La presencia de colagenasa activa en el medio de macrófagos puede ser el resultado de la liberación gradual de enzima almacenada en el interior celular, o bien, representar la producción de enzima seguida de su liberación inmediata.

Para conocer la naturaleza de este fenómeno, los macrófagos obtenidos de animales estimulados, se incubaron durante 30 minutos en una solución de Tritón X-100 al 0.1% en Tris-HCl 0.05 M + CaCl₂ 0.01 M pH 7.4; se despegaron de las cajas de cultivo con una espátula de hule, se sonicaron durante 1 minuto y se midió actividad colagenolítica en el sobrenadante, preincubando o no con tripsina para revelar actividad latente. En ningún caso se encontró actividad colagenolítica. Se realizó el mismo experimento en ausencia de tritón X-100, conge

lando y descongelando la suspensión celular antes de sonicar. Nuevamente no se encontró actividad colagenolítica libre o latente. Los resultados anteriores probablemente indican que la actividad colagenolítica encontrada en los medios de macrófagos estimulados se debe a la producción y liberación continua de la enzima, y que ésta no se almacena.

METALOPROTEINASAS NEUTRAS CON ACTIVIDAD
SOBRE GELATINA EN EL MEDIO DE MACROFAGOS
ESTIMULADOS.

MATERIAL Y METODOS

1. Determinación de actividad gelatinolítica mediante electroforesis en presencia de SDS.

La actividad proteolítica sobre gelatina de los medios de macrófagos estimulados se detectó mediante electroforesis.

Se prepara una solución de colágena de piel de cobayo a una concentración de 1 mg/ml en amortiguador Tris-HCl 0.05 M + CaCl_2 0.01 M pH 7.4 y se gelatiniza incubándola durante 20 minutos a 60°C. 100 µg de gelatina se incuban con 50 µl del medio concentrado por espacio de 5 h a 37°C en presencia y en ausencia de EDTA 0.1 M en un volumen de reacción de 200 µl. Al término de la incubación se agregan 150 µl del amortiguador de la muestra descrito por Laemmli, se hierve durante 2 minutos y se corren 150 µl de la mezcla en un gel de electroforesis preparado al 7.5%.

2. Detección de proteínas con actividad gelatinolítica mediante incubación directa en geles de poliacrilamida.

Se siguió la modificación de Hori (95) al método de Heussen y Doyle (96). El medio de macrófagos estimulados se incuba durante 2 h a 25°C en el amortiguador de Laemmli con una concentración de SDS al 3%; 50 µl del medio se corren a 6 mA/placa durante 12 h en un gel de electroforesis polimerizado con gelatina (0.8 mg/ml de gel).

Al término de la electroforesis el SDS se elimina lavando el gel durante 1 h en dos cambios de tritón X-100 al 2.5%; el tritón se elimina con agua destilada y la incubación se lleva a cabo durante 3 h a 37°C en 500 ml de glicina 0.1 M + CaCl_2 0.005 M + ZnCl_2 1×10^{-6} M pH 8.3.

Después de la incubación la reacción se detiene precipitando las proteínas dentro del gel con TCA al 50% durante 10 minutos. El TCA se elimina lavando con agua destilada y el gel se tiñe con azul de Coomassie al 1% durante 20 minutos. Se destiñe con metanol 5%, ácido acético 7.5%.

La ausencia de tinción en bandas discretas contrastante con el fondo oscuro indica la movilidad de proteasas con actividad gelatinolítica.

3. Actividad proteolítica inespecífica.

Se midió la actividad proteolítica inespecífica a las preparaciones utilizando hemoglobina desnaturalizada como sustrato y las enzimas tripsina y pepsina como controles de actividad proteolítica a pH neutro y a pH ácido respectivamente. El método empleado fue el descrito por Laskowski (97); en resumen, se

incubaban 11 mg de hemoglobina con 100 μ l de medio concentrado en un volúmen de reacción de 0.6 ml durante 15 minutos a pH neutro (7.5) y a pH ácido (4.8): Paralelamente se incuban diferentes cantidades de tripsina en el ensayo a pH neutro o de pepsina en el ensayo a pH ácido. La mezcla de reacción se precipita con TCA al 3.8 % y se mide la degradación al determinar la concentración de proteína degradada en el sobrenadante de acuerdo a Lowry et al (98).

RESULTADOS

1. Determinación de actividad gelatinolítica.

La presencia de actividad gelatinolítica en los medios de macrófagos estimulados con carragenina o proteosa peptona se muestra en la figura 7. En ambos casos, al incubar durante 5 h los medios concentrados y analizar los productos de degradación mediante electroforesis en SDS, se observó una actividad degradativa considerable. Como se observa, desaparecen totalmente 100 µg de gelatina incubados durante el tiempo indicado a una temperatura de 37°C. La actividad detectada demostró ser inhibida totalmnete cuando la incubación se realiza en presencia de EDTA.



Fig. 7 Electroforesis en SDS de: 1=gelatina + EDTA; 2=gelatina; 3=gelatina + medio de células estimuladas con proteosa peptona + EDTA; 4= gelatina + el mismo medio; 5= gelatina + medio de macrófagos estimulados con carragenina + EDTA; 6=gelatina + el mismo medio.

2. Detección de bandas con actividad gelatinolítica por incubación directa en el gel de electroforesis.

Como se puede ver en la figura 8, en el medio de los primeros tres días de cultivo de macrófagos estimulados con proteosa peptona o carragenina se detectan varias bandas con actividad proteolítica sobre gelatina, la actividad de estas bandas no se presenta cuando el gel se incuba en presencia de EDTA (no se muestra). En ambos casos se observan: una banda de 37 Kd, un doblete con un peso molecular aproximado de 88 Kd, y dependiendo de la preparación, bandas con una movilidad superior a 100 Kd.

Se probó el medio de macrófagos no estimulados y se encontró que al igual que en el caso de la actividad colagenolítica, las células no estimuladas no producen gelatinasas detectables por este método.

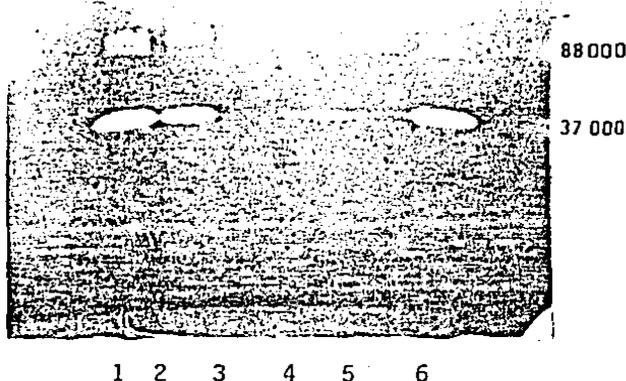


Fig. 8 Ensayo de actividad gelatinolítica. 1,2 y 3= medios obtenidos de células estimuladas con carragenina pertenecientes a los días 1,2 y 3 de cultivo. 4,5 y 6= medio de los días 1,2 y 3 provenientes de macrófagos estimulados con proteosa peptona.

3. Determinación de actividad proteolítica inespecífica.

Se realizaron experimentos de actividad proteolítica inespecífica utilizando hemoglobina y albúmina como sustratos con la finalidad de determinar si la actividad observada sobre gelatina representa la acción generalizada de enzimas inespecíficas, o bien, se debe a gelatinasas específicas,

En la figura 9, al comparar la actividad proteolítica de tripsina a diferentes concentraciones y de los medios con actividad gelatinolítica sobre hemoglobina, se demuestra que la 'gelatinasa' no tiene actividad degradativa inespecífica. En la figura 10 se muestran los datos de la incubación en medio ácido, utilizando en este caso pepsina como control de actividad enzimática, nuevamente la gelatinasa no muestra actividad degradativa,

También se realizó un ensayo enzimático en un gel de electroforesis polimerizado con albúmina sérica en lugar de gelatina (1 mg/ml de gel). Se corrieron muestras del medio de macrófagos estimulados y tripsina como control de actividad enzimática. El gel se trató de la manera descrita para detectar actividad gelatinolítica. Se observó degradación de albúmina únicamente en el carril correspondiente a tripsina (no se muestra el resultado),

Estos datos son sugestivos de que los macrófagos estimulados liberan al medio de cultivo enzimas con actividad proteolítica específica sobre gelatina, que se inhibe con EDTA.

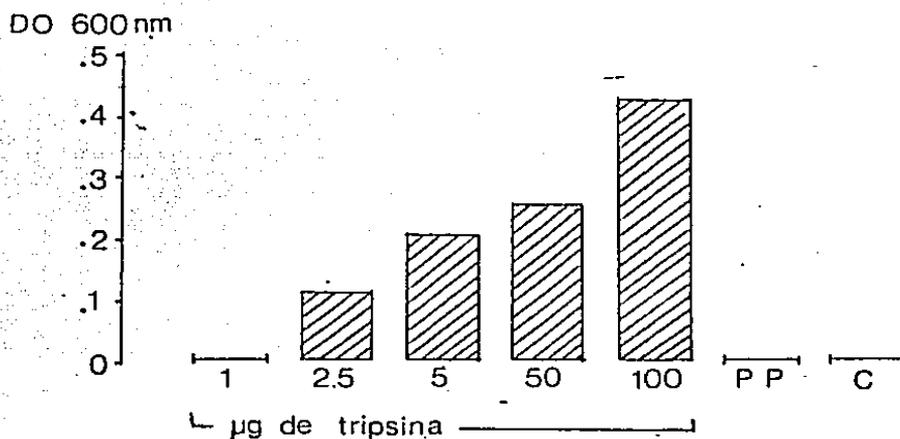


Fig. 9 Actividad proteolítica de tripsina a diferentes concentraciones y de los medios de células estimuladas con carragenina (C) o proteosa peptona (P P), el ensayo se realizó a pH 7.5.

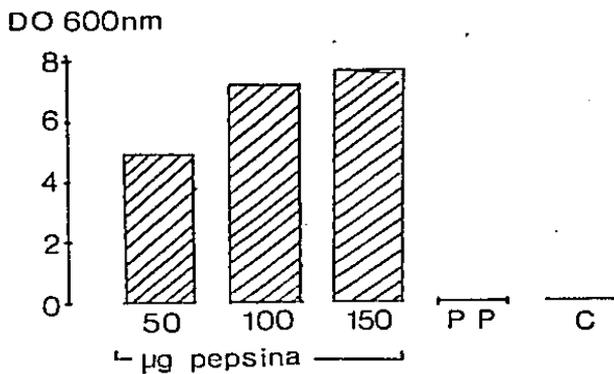


Fig. 10 Actividad proteolítica de pepsina a diferentes concentraciones y de los medios colectados de células estimuladas con carragenina o proteosa peptona; el ensayo se realizó a pH 4.8.

PURIFICACION PARCIAL DE LAS ACTIVIDADES
COLAGENOLITICA Y GELATINOLITICA PRESENTES
EN LOS MEDIOS DE CULTIVO DE MACROFAGOS
ESTIMULADOS IN VIVO.

MATERIAL Y METODOS

1. Cromatografía de afinidad en heparina-sefarosa.

La resina se empacó en una columna de 1,5 X 2,2 cm y se equilibró con amortiguador Tris-HCl 0.05 M + CaCl₂ 0.01 M pH 7.4. El medio concentrado de células estimuladas se pasó por este sistema a una velocidad de flujo de 25 ml/h, colectando fracciones de 3 ml. La columna se lavó con el mismo amortiguador hasta que la absorbancia de las fracciones medida a 230 nm disminuyó a cero. Posteriormente, la columna se eluyó con NaCl 1 M, preparado en el mismo amortiguador y a la misma velocidad de flujo.

Se determinó actividad colagenolítica y gelatinolítica en las fracciones utilizando el sustrato radiactivo para obtener el perfil cromatográfico de las distintas actividades enzimáticas.

2. Determinación de actividad gelatinolítica con ³H-gelatina.

La colágena acetilada se gelatinizó por incubación a 60°C durante 20 minutos y se utilizó como sustrato para determinar actividad proteolítica sobre gelatina de acuerdo al método descrito por Seltzer (99), que se basa en la solubilidad de los fragmentos de gelatina en ácido tricloroacético al 20%.

75 µl de las preparaciones se incuban a 37°C durante 3 h con 25 µl de gelatina tritiada (25µg) en un amortiguador Tris-HCl 0.05 M + CaCl₂ 0.01 M pH 7.4, para cada muestra se prepara un tubo control con EDTA. Al término de la incubación se agregan 25 µl de ácido tricloroacético al 100% para precipitar la gelatina entera, se mantiene durante 15 minutos en hielo y se centrifuga a 2 500 r.p.m. en una centrífuga Beckman L-21 durante 40 min a 4°C. Se colectan 60 µl de los productos de degradación presentes en el sobrenadante y se determina la radioactividad liberada por la enzima.

El resultado se expresa como el porcentaje solubilizado por la preparación en relación a la actividad proteolítica de la tripsina (40 µg) incubada el mismo tiempo.

3. Determinación de pesos moleculares.

El peso molecular aproximado de las proteínas presentes en las distintas preparaciones se obtuvo mediante electroforesis en presencia de SDS, utilizando geles de poliacrilamida preparados al 7.5% y la mezcla de estándares de bajo peso molecular obtenida de Bio Rad Laboratories, (Fosforilasa B, 92,500. albúmina 66,200; ovalbúmina, 45,000; anhidrasa carbónica, 31,000). La identificación del

peso molecular de las bandas con actividad gelatinolítica se llevó a cabo utilizando los mismos marcadores corridos paralelamente en el gel polimerizado con gelatina.

3. Cromatografía de afinidad zinc-quelante-sefarosa.

Se utiliza como agente quelante ácido iminodiacético acoplado a sefarosa 6 B (Pharmacia fine chemicals). La resina se empaca en una columna de 2 cm³ y se lava con 5 volúmenes de agua destilada. Posteriormente se aplican 4 volúmenes del agente quelante EDTA 0.25 M pH 7.5 para eliminar metales de la columna. Se lava nuevamente con agua y se carga con dos volúmenes de ZnCl₂ 5 mg/ml en ácido acético 0.01 M. Después de este tratamiento la resina se equilibra con Tris-HCl 0.05 M + CaCl₂ 0.01 M hasta detectar con carbonato de sodio la ausencia de zinc en el eluido. La muestra se aplica a una velocidad de 40 ml/h y se colectan fracciones de 2 ml.

La fracción con afinidad se despega de la columna bajando el pH con amortiguador Gly-HCl 0.2 M pH 3.5. Para evitar pérdida de actividad, las fracciones se colectan en tubos con Tris-HCl 1 M pH 7.5+ CaCl₂ 1 M para dar una concentración final de Tris 0.05 M y CaCl₂ 0.01 M y un pH de 7.4 en el volumen de cada fracción.

RESULTADOS

Purificación parcial de la actividad colagenolítica presente en el medio de cultivo de macrófagos estimulados con carragenina.1. Cromatografía de afinidad heparina-sefrosa.

Se ha descrito que colagenasas obtenidas de diferentes fuentes presentan afinidad por heparina y se han utilizado resinas acopladas a este compuesto para purificar la enzima (93,100,101).

En función de la coexistencia de actividad colagenolítica y gelatinolítica en el medio proveniente de macrófagos estimulados con carragenina se decidió emplear una resina de heparina-sefrosa con objeto de purificar parcialmente la actividad colagenolítica y estudiar el comportamiento de la actividad gelatinolítica en este tipo de cromatografía.

En la figura 11 se muestra el perfil cromatográfico de una preparación obtenida del medio de macrófagos estimulados con carragenina. La actividad colagenolítica se concentra en el pico que muestra afinidad por la resina. En adelante nos referiremos a la fracción que no tiene afinidad por la resina como fracción 1 y a la eluída con NaCl 1 M como fracción 2, que es donde se concentra la actividad colagenolítica.

1.1 Actividad colagenolítica detectada por electroforesis en presencia de SDS de las mezclas de incubación con la fracción 2.

La incubación se llevó a cabo durante 48 y 96 h a 34°C en amortiguador Tris-HCl 0.05 M + CaCl₂ 0.01 M + NaCl 0.2 M, pH 7.4. La reacción se detuvo con EDTA 0.1 M; 100 µl de las mezclas de incubación se corrieron en geles de poliacrilamida preparados al 5%. En la figura 12 y 13 se puede observar que la actividad colagenolítica es evidente desde las 48 h y a las 96 h desaparece por completo la colágena incubada. La actividad degradativa es inhibida por EDTA.

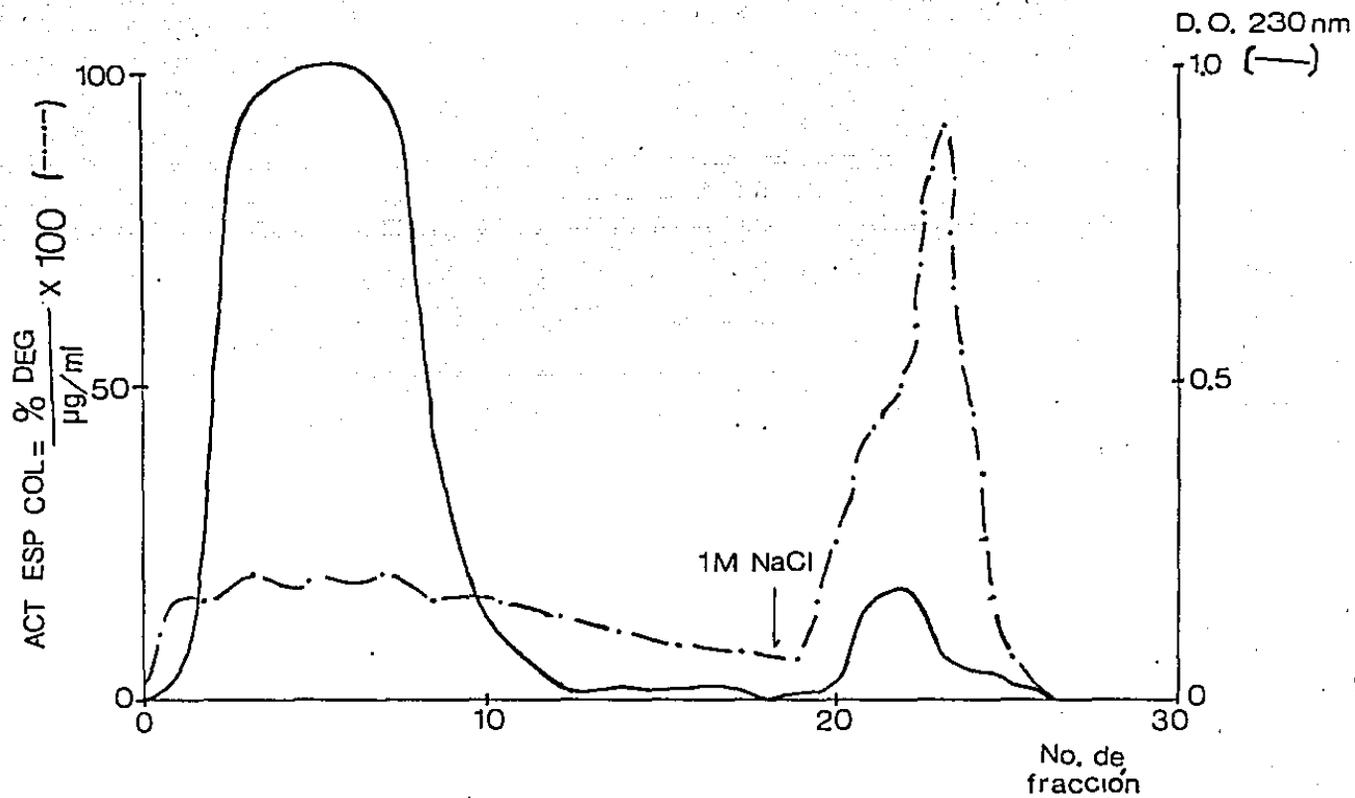


Fig.11 Perfil cromatográfico de la actividad colagenolítica presente en los medios de cultivo de macrófagos estimulados, al correr la preparación en heparina sefarosa.

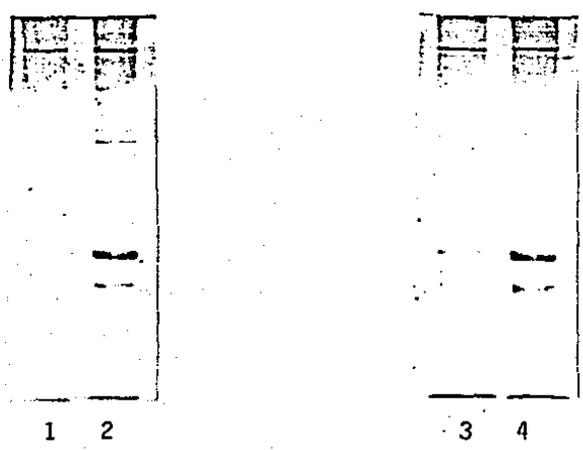


Fig. 12 Electroforesis SDS a las 48 horas de incubación de colágena tipo I con: 1=medio completo de células estimuladas; 2=medio completo + EDTA, 3= Fracción 2; 4= Fracción 2 + EDTA,

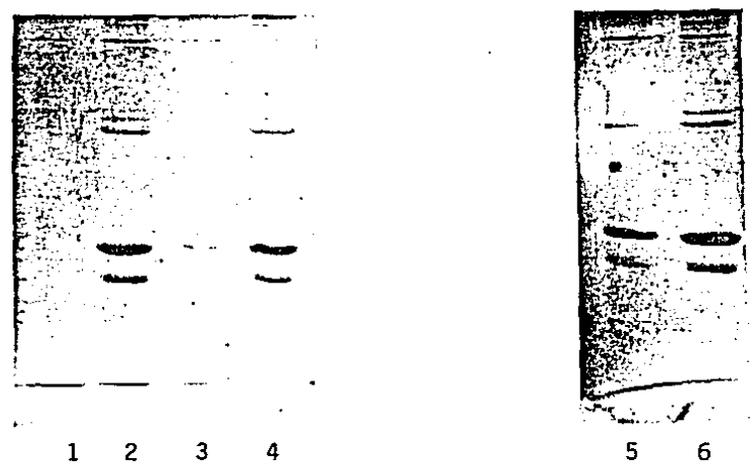


Fig. 13 Electroforesis SDS a las 96 horas de incubación de colágena tipo I con: 1= medio completo, 2= medio completo + EDTA; 3= fracción 2; 4= fracción 2 + EDTA; 5= colágena tipo I + EDTA; 6= colágena tipo I,

1.2 Electroforesis SDS en geles de poliacrilamida de las fracciones obtenidas de la columna.

Con el fin de detectar las proteínas presentes en las distintas fracciones de la cromatografía de afinidad, se tomaron alícuotas de la fracción 1 y de la fracción 2, ésta última se concentró mediante liofilización. Se resuspendieron en el amortiguador de la muestra de Laemmli. En la figura 14 se muestra el gel de electroforesis; como se puede observar, el patrón electroforético de ambas fracciones es completamente distinto, cabe aclarar que en la fracción 2 se observan bandas muy tenues con una movilidad superior a 58 Kd,

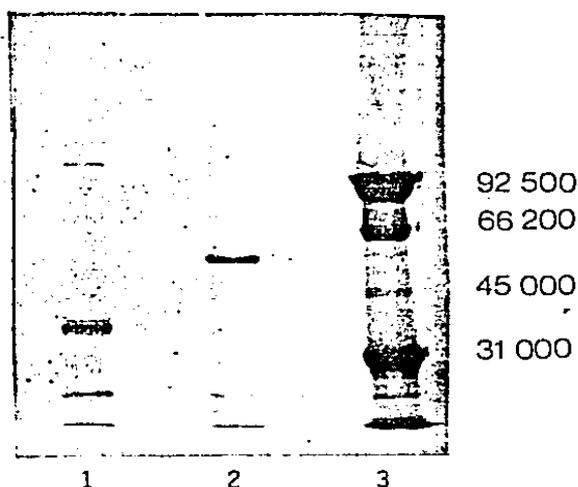


Fig. 14 Electroforesis SDS en gel de poliacrilamida de la fracción 1 (1) y 2 (2) de la cromatografía de afinidad heparina-sefarosa. 3= marcadores de peso molecular.

1.3 Cromatografía de afinidad zinc-quelante-sefarosa.

La cromatografía de afinidad con zinc se ha utilizado para purificar colagenasas. En este tipo de cromatografía los grupos superficiales tiol e imidazol de los residuos de aminoácidos cisteína e histidina forman complejos con el zinc acoplado a la resina mediante un agente quelante (102).

La fracción 2 de la cromatografía de afinidad en heparina-sefarosa se pasó por esta resina.

El pico que mostró afinidad se despegó disminuyendo el pH con Gly-HCl 0.2 N pH 3.5, y se determinó actividad colagenolítica en ambas fracciones

En la fracción sin afinidad por zinc no se detectó actividad colagenolítica, en contraste, la fracción con afinidad mostró actividad colagenolítica. No se muestra el perfil cromatográfico debido a que la alta absorción de la glicina utilizada para eluir la columna enmascara la presencia de proteína. La fracción con afinidad por la resina se concentró mediante liofilización y se corrió en SDS. En la figura 15 se muestra el patrón obtenido, como se puede observar la actividad colagenolítica se asocia a una región del gel correspondiente a un peso molecular que va de 62 a 68 Kd, en la cual se observan distintas bandas. En contraste, el pico sin afinidad no muestra actividad colagenolítica.

Con los datos disponibles no es posible identificar a cual o cuales bandas se asocia la actividad colagenolítica en la fracción con afinidad por zinc.

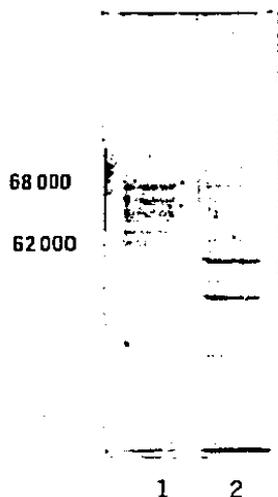


Fig. 15 Electroforesis SDS de: 1= pico con afinidad por zinc, 2= pico sin afinidad por zinc; ambos obtenidos al correr la fracción 2 de heparina-sefaraosa.

Actividad Gelatinolítica

1. Cromatografía de afinidad heparina sefarosa.

El comportamiento de la actividad gelatinolítica en este tipo de cromatografía fue distinto al de la actividad colagenolítica. En la figura 16 se muestra el perfil cromatográfico de la actividad gelatinolítica en las distintas fracciones eluidas de la columna heparina-sefarosa. Se puede ver que esta actividad no presenta afinidad por la resina y aparece en la fracción 1.

2. Actividad gelatinolítica de la fracción 1.

Se incubó una alícuota (100 μ l) de la fracción 1 de la columna heparina-sefarosa con 100 μ g de gelatina durante 3 h a 37°C en presencia y ausencia de EDTA, las mezclas de incubación se corrieron en electroforesis en presencia de SDS, se observó que la actividad gelatinolítica de la fracción 1 se inhibe con EDTA y degrada por completo la gelatina incubada (Fig. 17). En contraste, la fracción 2, que es donde se encuentra la actividad colagenolítica, no mostró actividad gelatinolítica.

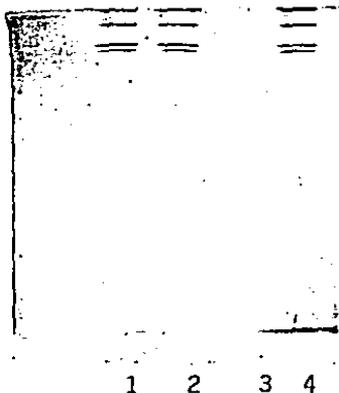


Fig. 17 Gel de electroforesis de: 1= gelatina; 2= gelatina + EDTA; 3= gelatina + fracción 1; 4= gelatina + fracción 1 + EDTA.

3. Determinación del peso molecular de la actividad gelatinolítica presente en la fracción 1.

La fracción 1 de la cromatografía de afinidad heparina-sefarosa, se corrió en SDS (Fig 18-A) y en un gel que tiene gelatina incorporada (Fig.18-B) Como se observa, la actividad gelatinolítica de esta fracción tiene un peso

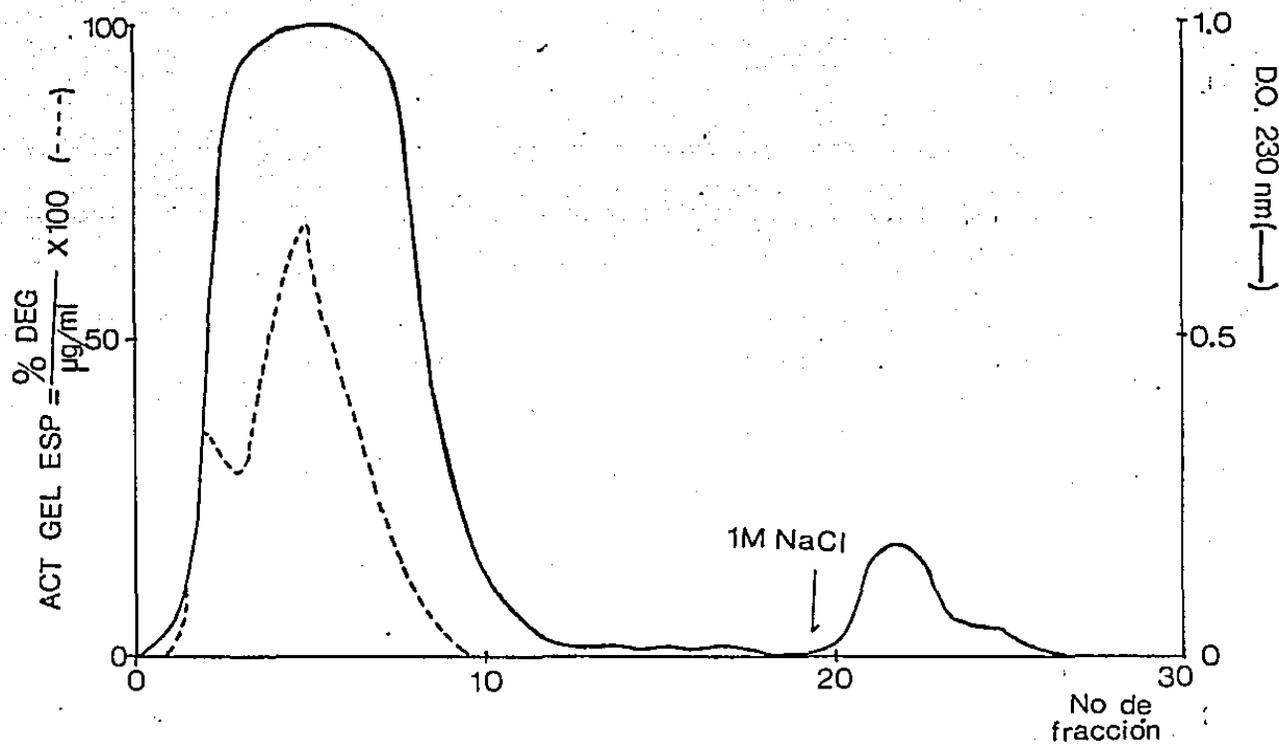


Fig. 16 Perfil cromatográfico obtenido al pasar una preparación del medio de macrófagos estimulados con carragenina por la resina heparina-sefarosa. Se colectaron fracciones de 3 ml y se determinó en cada una la actividad gelatinolítica.

molecular de 37 Kd, que corresponde a una banda que aparece en el gel de electroforesis en SDS.

Por este método se repite el hallazgo de que en la fracción 2 de heparina-sefarosa, donde se concentra la actividad colagenolítica, no aparece ninguna banda que degrade gelatina.

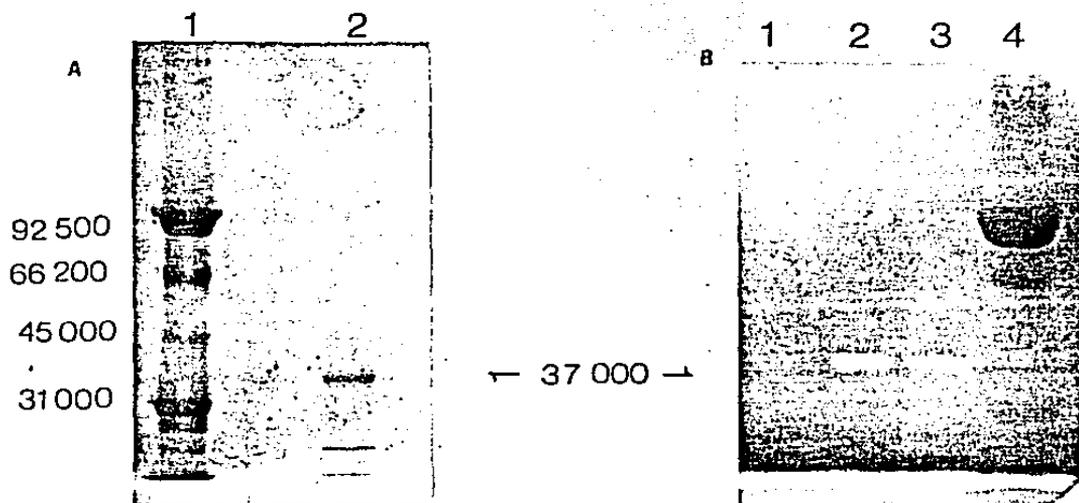


Fig. 18 A) electroforesis SDS: 1= marcadores de peso molecular; 2= fracción 1 columna heparina-sefarosa. B) ensayo de actividad gelatinolítica: 1= fracción 2; 2= fracción 1; 3= medio concentrado antes de la cromatografía; 4= marcadores de peso molecular.

4. Actividad proteolítica inespecífica.

Para determinar si la actividad enzimática presente en la fracción 1 es específica contra gelatina, se realizó un ensayo de actividad proteolítica de esta muestra contra hemoglobina. La incubación se realizó durante 3 h, que corresponde al mismo tiempo del ensayo contra gelatina. No se encontró actividad proteolítica inespecífica de las fracciones con y sin afinidad por la heparina al ser incubadas a pH 7.4.

5. Actividad colagenolítica de la fracción 1 contra colágena tipo V.

Se ha publicado recientemente que cultivos de macrófagos alveolares estimulados in vivo liberan al medio una metaloproteinasa (103). La enzima descrita en estas investigaciones tiene actividad proteolítica sobre gelatinas obtenidas de colágenas tipo I o tipo V; sin embargo, sólo muestra actividad colagenolítica contra colágena tipo V, produciendo dos cortes en el sustrato

y liberando consecuentemente tres fragmentos. El peso molecular de esta proteína es de 82 Kd.

La fracción 1 con actividad gelatinolítica, y que no presenta actividad contra colágena tipo I, se probó contra colágena tipo V obtenida de riñón y proporcionada amablemente por el Dr. Jose Luis Rosales.

La incubación se llevó a cabo durante 24,36 y 96 h a 34°C contra colágena tipo V. Al término de la incubación las mezclas se corrieron en SDS en las concentraciones descritas anteriormente. En la figura 19 aparece el resultado de este experimento, como puede verse la actividad gelatinolítica presente en el medio de las células estimuladas no degrada colágena tipo V.

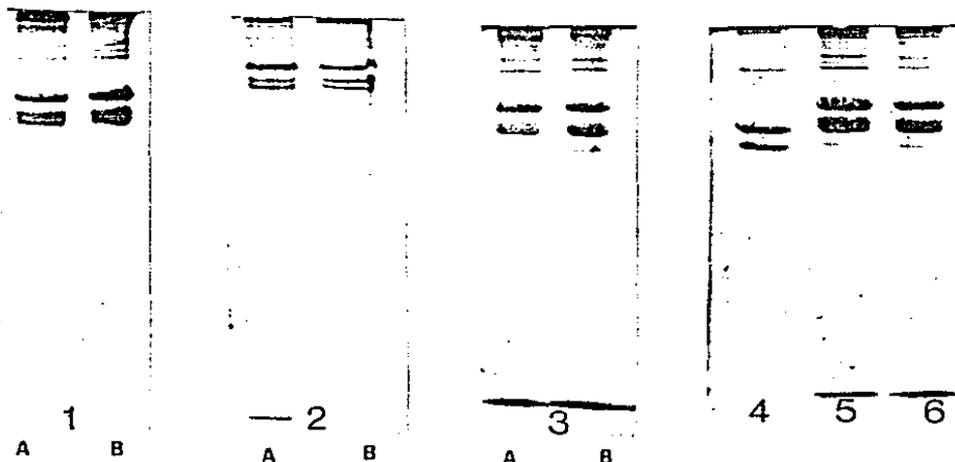


Fig. 19 Gel de electroforesis de las mezclas de incubación de la fracción 1 contra colágena tipo V a las 24(1), 36(2) y 96(3) horas de incubación a= en presencia de EDTA, b=en ausencia de EDTA. 4= colágena tipo I 5= colágena tipo V + EDTA, 6= colágena tipo V.

También se probó la actividad colagenolítica de la fracción 2 contra colágena tipo V. En la figura 20 se puede observar que la actividad colagenolítica presente en el medio de macrófagos estimulados es específica contra colágena tipo I y no degrada colágena tipo V.

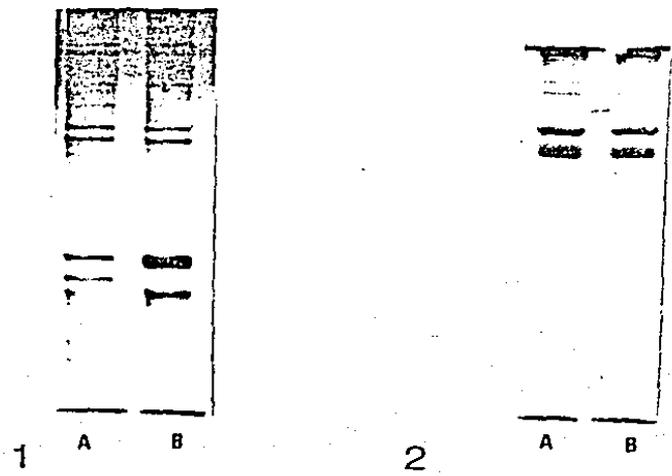


Fig. 20 Gel de electroforesis de las mezclas de incubación de la fracción 2 contra colágena tipo I (1) y contra colágena tipo V (2). a= sin EDTA, b= con EDTA.

6. Cromatografía de afinidad zinc-sefarosa.

Para caracterizar un poco mas la actividad gelatinolítica presente en el medio de cultivo de macrófagos estimulados, se decidió pasar el pico que no mostró afinidad por heparina por la columna zinc-sefarosa. al determinar actividad gelatinolítica se obtuvo un 62% en la fracción con afinidad por zinc en comparación con un 18% en la fracción sin afinidad, lo que indica que esta enzima es afín por la resina.

7. Actividad gelatinolítica con diferentes pesos moleculares.

En los distintos experimentos de detección de actividad gelatinolítica por incubación directa en el gel de electroforesis, se ha observado un fenómeno interesante. Cuando una preparación se prueba en el ensayo de actividad gelatinolítica, aparecen bandas de alto peso molecular, una banda de 88 Kd y una de 37 Kd. Si después de varias semanas de almacenamiento en amortiguador de Tris a -20°C, se prueba nuevamente la preparación, no se detectan bandas de alto peso molecular y solo persiste la de 37 Kd.

Las observaciones anteriores sugieren que por algún mecanismo espontáneo las formas de alto peso molecular pueden inactivarse o transformarse en las de bajo peso molecular en las condiciones de almacenamiento de la preparación.

Cuando los medios de cultivo provienen de células crecidas en presencia de albúmina, solo se observa la actividad de alto peso molecular (Fig. 21) y

no aparece la banda de 37 Kd. Ambas preparaciones comparten las características de especificidad y requerimiento de metales y contrariamente a lo descrito para la gelatinasa de 37 Kd, la actividad gelatinolítica de 88 Kd muestra afinidad por la resina heparina-sefarosa. En la figura 22 aparece el perfil cromatográfico de esta preparación. En la figura 23 aparece el ensayo de actividad gelatinolítica de las fracciones 1 y 2 de la columna de la figura 22 y de la preparación completa. Un dato adicional es que la preparación completa no muestra actividad gelatinolítica y al someterla a la cromatografía, la actividad aparece asociada a ambas fracciones.

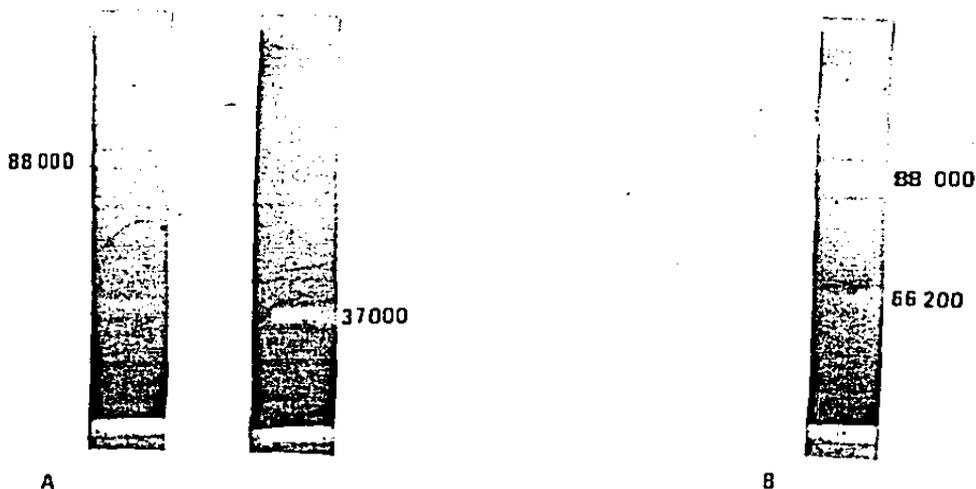


Fig. 21 Ensayo de actividad gelatinolítica de: a) medio de cultivo de células crecidas en ausencia de albúmina probado a distintos tiempos de almacenamiento. b) medio de células crecidas en presencia de albúmina.

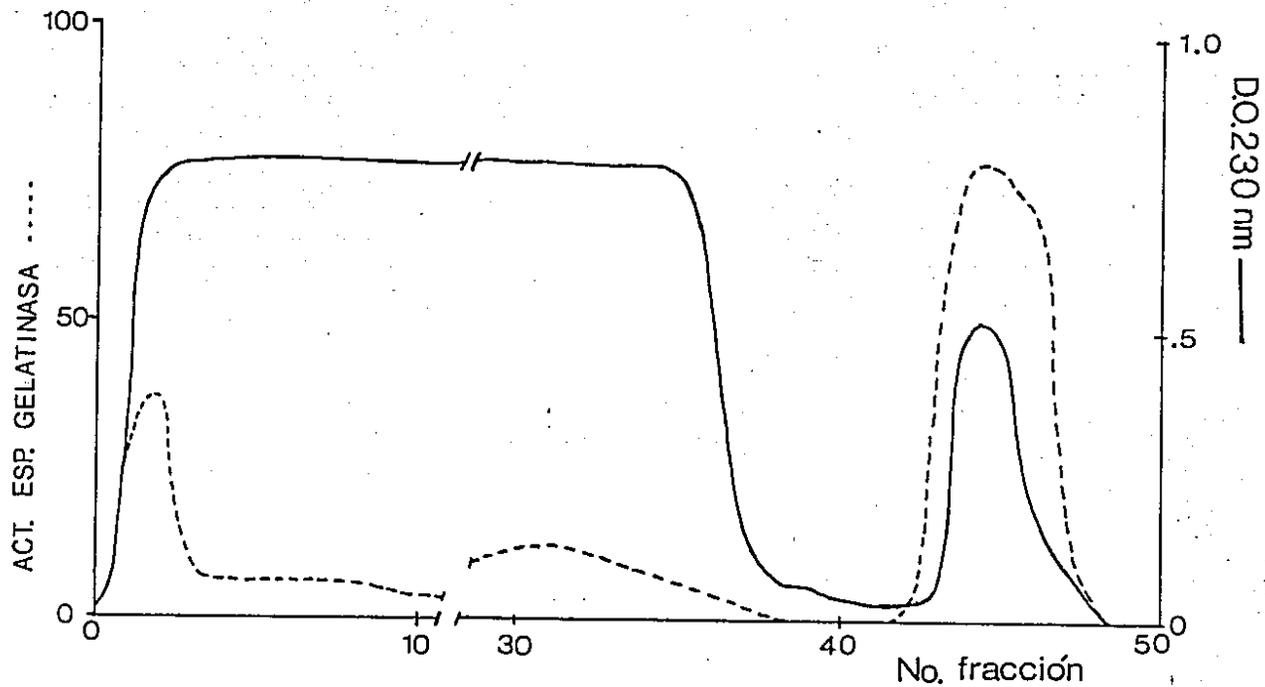


Fig.22 Perfil cromatográfico de una preparación con actividad gelatinolítica proveniente de células crecidas en presencia de albúmina al correrla en heparina-sefarosa., la preparación no se almacenó.

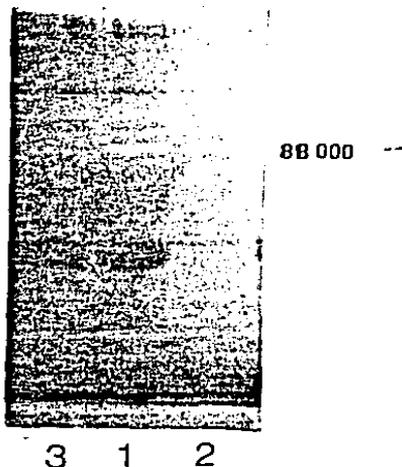


Fig. 23 Ensayo de actividad proteolítica sobre gelatina de la preparación completa (3) y de las fracciones 1(1) y 2(2).

8. Cambio de peso molecular.

Sobre la base de las observaciones descritas en relación a los pesos moleculares de las proteasas con actividad gelatinolítica se realizó el siguiente experimento:

Se tomaron 3 alícuotas de cada una de las fracciones 1 y 2 así como de la preparación completa corrida en la columna heparina sefarosa (fig 22). Una parte de cada fracción se congeló y descongeló 10 veces con la finalidad de determinar si este tipo de manipulación induce algún efecto en el peso molecular de la banda con actividad gelatinolítica. Otra alícuota se incubó en presencia de β -mercaptoetanol, y la tercera se corrió paralelamente sin haber recibido ningún tratamiento previo.

En la figura 24 se presenta el resultado de estos experimentos, como se puede apreciar, no se detectó cambio en el peso molecular de la preparación al someterla a los tratamientos descritos. En la misma figura se puede observar que la gelatinasa de la preparación completa no se activó con los tratamientos descritos.

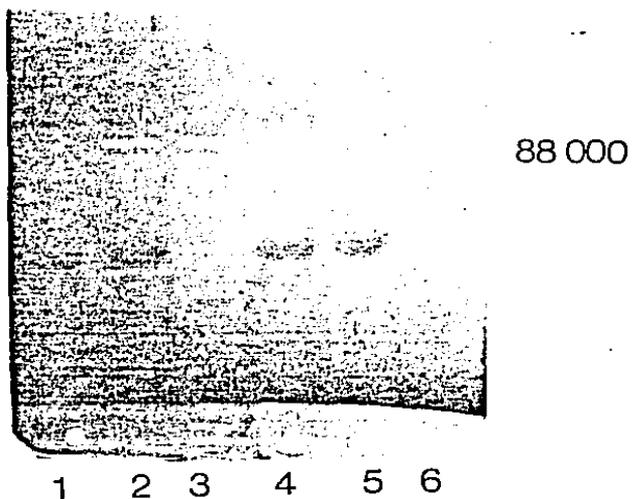


Fig.24 Ensayo de actividad gelatinolítica de la preparación completa y de las fracciones 2 y 1 preincubadas con mercaptoetanol (1,2 y 3), o con congeladas y descongeladas (4,5 y 6).

DISCUSION

En este estudio se ha examinado la respuesta de los macrófagos peritoneales al estímulo del polisacárido carragenina y se ha encontrado que en presencia de carragenina los macrófagos liberan colagenasa y gelatinasa(s) al medio durante los dos primeros días de cultivo. La actividad colagenolítica fue detectada al incubar las preparaciones con colágena soluble y analizar los productos de degradación, ya sea por medio del ensayo radiactivo o de electroforésis en presencia de SDS. Por el contrario, en ausencia de estímulo la población de células obtenida de la cavidad peritoneal no libera colagenasa activa ni latente, ni gelatinasa(s) al medio de cultivo.

Los resultados anteriores concuerdan con otras observaciones (34,45,70,71,72,106) donde los macrófagos peritoneales residentes no liberan enzimas, mientras que al ser estimulados in vivo o in vitro con diferentes sustancias sí lo hacen. (107). En ningún caso se ha detectado colagenasa latente con los distintos activadores en preparaciones de macrófagos peritoneales (100, 107). En este estudio la enzima apareció totalmente en forma activa, ya que no se logró revelar actividad latente mediante proteólisis limitada con tripsina ni con el uso del compuesto organomercurio 4-APMA. Tampoco se activaron las preparaciones con una fracción obtenida del líquido de explantes de granuloma capaz de activar procolagenasa de piel humana (51). En cambio, los macrófagos de origen alveolar, liberan constantemente colagenasa aún en ausencia de estímulo puesto que son células activadas (46,109), y cuando son estimulados in vivo o in vitro, aumenta la cantidad de enzima en el medio, de la que una fracción es latente y requiere ser activada mediante proteólisis limitada o con el uso de compuestos mercuriales (107). De hecho, en el medio de macrófagos alveolares se ha descrito una proteasa capaz de activar la procolagenasa sintetizada por las mismas células (108).

La colagenasa producida por los macrófagos estimulados con carragenina aparentemente no se almacena en el interior de las células sino que se libera de modo constante, como lo demuestra el hecho de que no se encontró actividad colagenolítica libre ni latente en el homogenado celular. La observación anterior ha sido descrita tanto en macrófagos (107) como en fibroblastos sinoviales y de piel (47); en contraste, la enzima producida por los leucocitos polimorfonucleares sí se almacena en el interior celular (48). Sin embargo, en las condiciones experimentales en que se realizó este experimen-

to, puede ser que el tratamiento con tripsina no sea suficiente para activar una forma almacenada de procolagenasa, o bien, que la sensibilidad del método de determinación de actividad colagenolítica no permitió detectar actividad colagenolítica en el homogenado celular.

En relación a su patrón de inhibición, se encontró que la enzima de macrófagos comparte las características comunes de las colagenasas de vertebrados y de la colagenasa del granuloma de carragenina (62), ya que se inhibe con agentes quelantes como el EDTA y la O-fenantrolina; estos compuestos son inhibidores porque las colagenasas son dependientes de calcio (67) y de zinc (28). Aparentemente el requerimiento de zinc es importante en la catálisis, mientras que el calcio funciona estabilizando la estructura terciaria de la enzima (67); cabe aclarar que en este trabajo las preparaciones enzimáticas se mantuvieron en presencia de calcio 0.01M.

Además del efecto inhibitor de los quelantes, se obtuvo una inhibición considerable de la enzima al realizar las incubaciones en presencia de suero homólogo; este resultado se debe a que en el suero se encuentran diversos inhibidores de la colagenasa (23), como la alfa-2-macroglobulina, la B1-anticolagenasa y los inhibidores de metaloproteinasas tisulares (TIMP) (55). Entre todos estos, la alfa-2-macroglobulina es considerado el inhibidor más potente. Este inhibidor muestra especificidad por la forma activa de la enzima debido a que el mecanismo de inhibición depende de un corte que la proteina ejerce sobre la molécula del inhibidor, produciendo un cambio conformacional y quedando atrapada en su interior (54).

Al pasar los medios de cultivo de macrófagos estimulados por cromatografía de afinidad en heparina-sefarosa, se obtuvo la actividad colagenolítica en la fracción con afinidad por la resina, por lo que esta metodología resulta útil para purificar colagenasa de macrófagos. Aparentemente, la resina actúa como intercambiador catiónico y ha sido utilizada para purificar colagenasas de distintas fuentes, como hueso de ratón, sinovial de cerdo (93), así como hueso y útero de conejo; también se ha empleado para obtener una preparación con actividad colagenolítica libre de proteasas a partir de C. histolyticum (101).

La colagenasa de macrófagos se une a la resina zinc-sefarosa, lo cual indica la presencia de grupos imidazol y (o) tiol presentes en la superficie de la proteína, que forman complejos estables con metales divalentes (102); también es probable que la afinidad por zinc tenga relación con el requeri-

miento de este metal en la catálisis.

Al correr en electroforesis la fracción obtenida después de pasar por heparina-sefarosa y por zinc-sefarosa, se detecta que la fracción con actividad colagenolítica migra en una región del gel correspondiente a un peso molecular entre 62 y 68 Kd, representando probablemente distintas formas moleculares de la enzima, lo cual ha sido descrito para colagenasas obtenidas de diversas fuentes (23). Sin embargo, se desconoce a cuál o cuáles bandas se asocia la actividad colagenolítica y no se puede descartar la presencia de uno o más contaminantes en la preparación.

Dado que la triple hélice de la colágena es resistente al ataque proteolítico de enzimas inespecíficas, la colagenasa constituye el paso limitante en los procesos degradativos de esta proteína (22). Una vez producido el corte característico de la enzima, los fragmentos liberados se desnaturalizan a temperatura fisiológica y adquieren una conformación desordenada, convirtiéndose en sustratos pobres para la enzima colagenasa y altamente susceptibles a las funciones proteolíticas de enzimas gelatinolíticas sobre las cuales descansa la degradación subsecuente de la proteína hasta el nivel de aminoácidos y péptidos (26).

Puesto que la degradación de colágena en el granuloma de carragenina es un proceso fundamentalmente extracelular (58), la existencia de proteasas con actividad sobre gelatina en el medio intercelular es muy probable, en este sentido, el hallazgo de gelatinasas producidas por macrófagos estimulados resulta ser interesante. Un elemento de interés lo constituye el hecho de que en ausencia de estímulo de carragenina las células no liberan la proteasa, y de modo paralelo, la actividad colagenolítica y gelatinolítica son detectadas con el estímulo, sugiriendo una co-regulación en la producción de ambas actividades enzimáticas. Esta regulación coordinada resulta lógica ya que ambas enzimas dirigen su actividad proteolítica contra distintas conformaciones del mismo sustrato. En cultivos de explantes de piel se ha descrito que los glucocorticoides como la hidrocortisona y su análogo sintético dexametasona inhiben de modo coordinado la liberación de colagenasa y gelatinasa de una manera dependiente de la dosis y a través de un proceso mediado por receptores, ya que un antagonista de la dexametasona (dexametasona 21-mesilato) bloquea el efecto (110).

Se ha descrito que algunas colagenasas tienen muy poca afinidad por colágena desnaturalizada en comparación con su capacidad degradativa contra

el sustrato en estado nativo; no obstante, existen datos de que otras enzimas de esta clase, como la purificada de fibroblastos de piel humana, tienen actividad gelatinolítica sobre las formas desnaturalizadas de la colágena tipo I a V (111). Sin embargo, su afinidad por gelatina en todos los casos es menor que por colágena. Por otro lado, recientemente se ha purificado una colagenasa-gelatinasa con actividad colagenolítica contra colágena tipo V (103); esta enzima se ha purificado del medio de cultivo de macrófagos alveolares. La enzima descrita en este trabajo no presenta actividad colagenolítica contra colágena tipo V pero su capacidad contra la forma desnaturalizada de esta proteína no se exploró.

La cromatografía de afinidad en heparina-sefarosa de los medios de cultivo de macrófagos estimulados con carragenina ha permitido separar las actividades colagenolítica y gelatinolítica descritas en este trabajo, ya que la proteasa con actividad sobre gelatina no mostró afinidad por la resina. Esto permitió, por un lado, probar la preparación enzimática con actividad gelatinolítica contra albúmina, hemoglobina a pH ácido y neutro y contra colágena nativa tipo I y V. La falta de degradación de estas proteínas indica que la enzima es específica contra los fragmentos liberados por la colagenasa o la forma desnaturalizada de la colágena y que la enzima es inhibida por EDTA, lo que indica un requerimiento de metal, por lo que podemos considerarla una metaloproteínasa neutra con especificidad por gelatina. Además se encontró que esta preparación muestra afinidad por zinc.

Por otro lado, la preparación con actividad colagenolítica se probó contra colágena desnaturalizada y no se encontró actividad, lo que indica que la actividad gelatinolítica se debe a la presencia de una gelatinasa y no a una actividad de la colagenasa sobre la colágena desnaturalizada.

Lo anterior permite concluir que en el medio de macrófagos estimulados existen dos actividades enzimáticas distintas, cada una dirigida contra diferentes conformaciones del mismo sustrato. Esto sugiere que tales proteínas podrían tener una actividad secuencial durante la degradación extracelular de la colágena del granuloma in vivo.

La presencia de enzimas con actividad gelatinolítica ha sido descrita en diversos sistemas experimentales: cultivos de explantes de tejido reumatoide (112), hueso (26), leucocitos (99) y explantes de piel (110,113). La gelatinasa de piel muestra especificidad por gelatina y no degrada colágena

nativa, tampoco muestra actividad proteolítica inespecífica sobre hemoglobina o caseína. La enzima es inhibida por EDTA y requiere calcio, se produce y libera de modo constante durante el cultivo, ya que deja de aparecer en el medio en presencia de cicloheximida. La proteasa con actividad gelatinolítica encontrada en el presente trabajo comparte las características de especificidad e inhibición por EDTA con la enzima de piel. El peso molecular de la enzima de piel es de 120-150 Kd.

La actividad gelatinolítica presente en el medio de macrófagos estimulados con carragenina se asocia con distintas bandas cuando se prueba en el ensayo de gelatinasa por electroforesis. Una banda de actividad se observa en una región del gel correspondiente a 37 Kd, otra en 88 Kd, y dependiendo de la preparación, aparecen bandas de alto peso molecular superiores a 100 Kd. En las condiciones de almacenamiento en que se tiene la preparación, la actividad de 88 Kd y la de alto peso molecular desaparecen y únicamente persiste la banda de actividad de 37 Kd.

Cuando las células se cultivan en presencia de albúmina no se detecta la actividad de 37 Kd sino únicamente la de 88 Kd. Sin embargo, todas las preparaciones son específicas para gelatina, se inhiben con EDTA y muestran afinidad por zinc. La diferencia entre estas preparaciones es que la actividad de 88 Kd muestra afinidad por heparina, mientras que la banda de 37 Kd no es afín por esta resina.

Las observaciones anteriores abren dos posibilidades de interpretación:

- a) La primera sería que la desaparición de las actividades de alto peso molecular y de 88 Kd se deben a un proceso degradativo, por lo que se manifiestan en una región del gel correspondiente a 37 Kd. Lo anterior supone que la banda de 37 Kd es un producto de degradación de la de 88 Kd.
- b) Una segunda forma de interpretar estos resultados es que las distintas bandas de actividad corresponden a enzimas diferentes y por algún mecanismo, las gelatinasas de 88 Kd y las de alto peso molecular se inactivan, permaneciendo únicamente la enzima de 37 Kd.

Con los datos disponibles se puede argumentar en favor de la primera posibilidad de la siguiente manera:

1. La única diferencia entre la gelatinasa de 37 Kd y las otras formas de la enzima es que ésta no tiene afinidad por heparina, lo que probablemente se deba a la pérdida de cargas positivas debida al proceso degradativo.

2. La ausencia de actividad de 37 Kd en los medios de células cultivadas en presencia de albúmina podría deberse a un efecto protector de esta proteína, que por competencia evita la degradación de la gelatinasa llevada a cabo por alguna proteasa o por autocatálisis.

A favor de la segunda interpretación de estos resultados se plantean los siguientes argumentos:

1. La forma de 88 Kd tiene afinidad por heparina sefarosa mientras que la de 37 Kd no se pega a la resina, lo que indica diferencias estructurales.
2. Al cromatografiar el medio de células crecidas en presencia de albúmina en heparina-sefarosa, la fracción con afinidad por la resina se libera de la albúmina, eliminando el efecto protector. En estas preparaciones no se ha logrado observar la banda de actividad de 37 Kd con ninguno de los tratamientos descritos.

Una tercera posibilidad sería que la presencia de distintas bandas se deba a la agregación de monómeros, que en las condiciones de almacenamiento se disocian; sin embargo, en las condiciones en que se preincuba la preparación con SDS, lo más probable es que existiera una disociación y que no apareciera actividad de alto peso molecular.

Los estudios ultraestructurales del granuloma de carragenina han demostrado desde el tercer día de evolución del proceso datos morfológicos extracelulares que indican la degradación de colágena, como fragmentación de fibras, separación de fibrillas y su desintegración. También se ha descrito que aunque en las etapas finales del granuloma existe colágena intracelular en los fibroblastos, hay muy pocos signos de degradación intracelular de esta proteína (58). Lo anterior contrasta con lo que ocurre en otros sistemas, como la reabsorción de la cola del renacuajo o la involución del útero post-parto, en donde la degradación intracelular de colágena es prominente.

En la mayoría de los estudios ultraestructurales de la reabsorción de colágena se ha visto que la fagocitosis de esta proteína es un fenómeno predominante y se ha propuesto que una vez que la colágena es degradada en el espacio extracelular por la colagenasa, los productos liberados por la enzima son ingeridos principalmente por macrófagos y subsecuentemente degradados, sin que exista oportunidad para que el efecto extracelular de la enzima sea visualizado morfológicamente. En el granuloma de carragenina, difícilmente se detectan fibras de colágena intracelulares en los macrófagos (58). Por otro lado, la acti

vidad colagenolítica detectada ya sea por la técnica de explantes (61,62) o en homogenados (64), y la presencia de la enzima localizada inmunoenzimáticamente (65), coinciden con las distintas poblaciones celulares del granuloma, quedando involucrado cualquier tipo celular en el origen de la enzima. Sin embargo, la reabsorción de colágena en el granuloma de carragenina ha sido estudiada utilizando el tejido íntegro, de donde el papel que cada tipo celular desempeña en la respuesta no ha sido determinado.

En el presente trabajo hemos investigado separadamente las funciones secretorias de enzimas colagenolíticas provenientes de macrófagos estimulados in vivo con carragenina y hemos encontrado que estas células tienen un papel efector en las condiciones utilizadas, ya que son capaces de producir y liberar colagenasa activa ante el estímulo de la carragenina, y en forma paralela, producen proteasas con actividad degradativa sobre los fragmentos desnaturalizados de colágena con una acción probablemente secuencial a la colagenasa. Lo anterior coincide con diversos estudios del granuloma.

Bioquímicamente, se ha encontrado colagenasa activa en las distintas etapas de evolución del granuloma coexistente con los macrófagos.

Morfológicamente, se ha descrito la presencia de carragenina en el interior de los macrófagos (58) y con los resultados de este trabajo sabemos que en estas condiciones, los macrófagos adquieren un potencial degradativo; de donde es lógico suponer que al menos una fracción de la colagenasa activa detectada desde el tercer día de evolución del granuloma mediante la técnica de explantes, puede tener un origen macrofágico. Además, los signos degradativos extracelulares y la ausencia de colágena en el interior de los macrófagos (58) indican que probablemente la gelatinasa liberada por los macrófagos estimulados de modo paralelo a la colagenasa, representa el instrumento degradativo que sustituye la actividad fagocítica de la colágena degradada.

CONCLUSIONES

1. Los macrófagos estimulados con carragenina producen paralelamente una colagenasa y gelatinasa(s) activas.
2. La colagenasa es una metaloproteinasa con afinidad por heparina-sefarosa y por zinc-sefarosa, su peso molecular se encuentra entre 62 y 68 Kd .
3. La actividad gelatinolítica es específica y muestra requerimiento por metales. Se han detectado varias gelatinasa(s) con distintas movilidades en electroforesis:
 - i. Preparaciones de alto peso molecular y 88 Kd afines por heparina-sefarosa, presentes en los medios de células crecidas en medios con albúmina.
 - ii. Preparaciones que además tienen una banda de 37 Kd sin afinidad por heparina, la cual permanece con el tiempo a diferencia de las otras formas, que se inactivan.

REFERENCIAS.

1. Reddi, A.H. en Extracellular Matrix Biochemistry (Piez, K.A. & Reddi, A.H. eds) :355-454; Elsevier New York; 1984.
2. Grant, M.E. Prockop, D.J. N. Engl. J. Med. 286:194, 242, 291; 1972.
3. Eyre, D.R. Science 207:1315-1322; 1980.
4. Trelstad, R.L. Mundo Científico 1(3):284-295; 1981.
5. Martin, G.R. TIBS July:285-287; 1985.
6. Fleischmajer, R. Olsen, B.R. Kuhn, K. (eds) Biology, Chemistry and Pathology of Collagen. Ann N.Y. Acad. Sci. (in press).
7. Piez, K.A. en Treatise on Collagen (Ramachandran, G.N. ed.) vol I:207, Acad. Press, N.Y. 1967.
8. Traub, W. Piez, K.A. Adv. Prot. Chem. 25:243; 1971.
9. Woessner, J.F. Arch. Biochem. Biophys. 93:440; 1961.
10. Bornstein, P. Ann. Rev. Biochem. 49:957-1003; 1980.
11. Kuhn, K. Essays Biochem. 5:59; 1969.
12. Gross, J. en
13. Woessner, J.F. Jr. Brewer, T.H. Fed. Proc. 19:335; 1960.
14. Montfort, I.Y. Pérez Tamayo, R. Lab. Invest. 10:1240; 1961.
15. Morrione, T.G. Seifter, S. J. Exp. Med. 115:357; 1962.
16. Vaes, G. Huybrechts-Godin, G. Hausser, P. en Trends in Inflammation Research (Velo, G. ed.) I:100. Beikhauser Verlag, Basel; 1980.
17. Pérez Tamayo, R.
18. Gross, J. Lapiere, C.M. P.N.A.S. 48:1014; 1962.
19. Pérez Tamayo, R. Conn. Tiss. Res. 1:55-60; 1972.
20. Bruns, R.R. Gross, J. Biochemistry 12:808; 1973.
21. Harris, E.D. Jr. Krane, S.M. N.
22. Pérez Tamayo, R. Am. J. Pathol. 92:509-566; 1978.
23. Harris, E.D. Jr. Welgus, H.G. & Krane, S.M. Collagen and Related Research 4:493-512; 1984.
24. Gross, J. Highberger, J.H. Johnson-Wint, B. Biswas, C. en Collagenase in Normal and Pathological Connective Tissues (Wooley, E. Evanson, J.M. eds.):11-35. John Wiley & Sons; 1980.
25. Krane, S.M. Conn. Tiss. Res. 10:51-59; 1982.
26. Sunada, H. Nagai, Y. Biom. Res. 4(1):61-70; 1983.
27. Mc. Croskery, P.A. Wood, S. Jr. Harris, E.D. Jr. Science 182:70-71; 1973.
28. Seltzer, J.L. Jeffrey, J.J. Eisen, A.Z. B.B.A. 485:179-187; 1977.

29. Johnson-Muller, B. and Gross, J. P.N.A.S. 75:4417-4421;1978.
30. Werb, Z. Burleigh, M.C. Biochem, J. 137:373-385;1974.
31. Bauer, E.A. Stricklin, G.P. Jeffrey, J.J. Eisen, A.Z. Biochem. Biophys. Res. Comm. 64:232-240;1975.
32. Dayer, J.M. Breard, J. Chess, L. Krane, S.M. J. Clin. Invest. 64:1386-1392;1979.
33. Dayer, J.M. Passwell, J.H. Schneeberger, E.E. and Krane, S.M. J. Immunol. 124:1712-1719;1980.
34. Whal, L.M. Biochem. Biophys. Res. Comm. 74(2):838-844;1977.
35. Salo, T. Oikarinen, J. Biochem. Biophys. Res. Comm. 130(2)588-595;1985.
36. Koob, T.J. Jeffrey, J.J. Eisen, A.Z. Biochem. Biophys. Res. Comm. 61:1083-1088;1974.
37. Werb, Z. Foley, R. Münck, A. J. Exp. Med. 147:1684-1694;1978.
38. Werb, Z. Foley, R. Münck, A. J. Immunol. 121(1): 115-121;1978.
39. Bauer, E.A. Seltzer, J.L. Eisen, A.Z. J. Acad. Dermatol. 6:603-607;1982.
40. Stricklin, J.P. Jeffrey, J.J. Roswit, W.T. Eisen, A.Z. Biochemistry 22:61-68;1983.
41. Stricklin, G.P. Bauer, E.A. Jeffrey, J.J. Eisen, A.Z. Biochemistry 16:1607-1615;1977.
42. Nagase, H. Jackson, R.C. Brinckerhoff, C.E. Vater, C.A. Harris, E.D. Jr. J. Biol. Chem. 256:11951-11954;1981.
43. Nagase, H. Brinckerhoff, C.E. Sheldon, L. Vater, C.A. Harris, E.D. Jr. en Collagen Degradation and Mammalian Collagenase (Tsuchiya, M. Pérez Tamayo, R. Okasaki, I. Maruyama, K. eds.):20-26. International Series 601. Excerpta Medica, Amsterdam 1982.
44. Nagase, H. Brinckerhoff, C.E. Vater, C.A. and Harris, E.D. Jr. Biochem. J. 214:281-288;1983.
45. Boxer, P.A. Leibovich, J.S. B.B.A. 444:626-632;1976.
46. Horwitz, A.L. Crystal, R.G. Biochem. Biophys. Res. Comm. 69(2):296-303;1976.
47. Valle, K. Bauer, E.A. J. Biol. Chem. 254(20)10115-10122;1979.
48. Tschesche, H. Mc. Cartney en Collagen Degradation and Mammalian Collagenase (Tsuchiya, et al eds.):27-40. International Series 601. Excerpta Medica, Amsterdam. 1982.
49. Tyree, B. Seltzer, J.L. Halme, J. Jeffrey, J.J. Eisen, A.Z. Arch. Biochem. Biophys. 208(2)440-443;1981.
50. Vater, C.A. Nagase, H. Harris, E.D. J. Biol. Chem. 258:9374-9382;1983.
51. Pardo, A. 1985 Observaciones no publicadas.
52. Harris, E.D. Farrell, M.E. B.B.A. 278:133-141;1972.
53. Tanzer, M.L. Science 180:561;1973.
54. Barret, A.J. Meth. Enzymol. 80:737-754;1981.
55. Murphi, G. Mc. Guire, M.B. Russel, R.G. Reynolds, J.J. Clin. Sci. 61:711-716;1981.

56. Pérez Tamayo, R. en Los Perfiles de la Bioquímica en México. (J. Mora et al eds.) U.N.A.M. México. 1974.
57. Pérez Tamayo, R. Lab. Invest. 22(2):137;1970.
58. Pérez Tamayo, R. Lab. Invest. 22(2):142;1970.
59. Mc.Candless, E.L. Lehoczy-Mona, J. Growth 28:143;1964.
60. Rojkind, M. Pérez Tamayo, R. Arch. Pathol. 74:455;1962.
61. Pardo, A. Estudio de la Colagenasa del Granuloma de Carragenina. Tesis de maestría, Facultad de Química UNAM, México 1974.
62. Pardo, A. Pérez Tamayo, R. Conn. Tiss. Res. 2:243-252;1974.
63. Figueras, T. Actividad Latente de Colagenasa en el Granuloma de Carragenina. Tesis profesional, Facultad de Ciencias. U.N.A.M. México 1982.
64. Figueras, T. Biosíntesis y Degradación de Colágena en el Granuloma de Carragenina. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México, 1985.
65. Pardo, A. Rosenstein, Y. Montfort, I. Pérez Tamayo, R. J. Histochem. and Cytochem. 31(5):641-646;1983.
66. Pardo, A. Soto, H. Montfort, I. Pérez Tamayo, R. Conn. Tiss. Res. 7:253;1980.
67. Seltzer, J.L. Welgus, H. Jeffrey, J.J. Eisen, A.Z. Arch. Biochem. Biophys. 173:355-361;1976.
68. Pearsall, N.N. and Weiser, R.S. 'The macrophage' Lea & Febiger, Philadelphia 1970.
69. Nathan, C.F. Murray, H.W. Cohn, Z.A. New. Engl. J. Med. 303:622;1980.
70. Whal, L.M. et al P.N.A.S. 71:3598;1974.
71. Whal, L.M. et al J. Immunol. 122:2226;1979.
72. Whal, L.M. et al Science 187:261-263; 1975.
73. Whal, L.M. Whal, S.M. Cell Immunol. 92:302-312;1985.
74. Stuart, A.E. Adams, D.O. Methods in Enzymology 58:494-506;1979.
75. Montfort, I. Pérez Tamayo, R. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 138(1):204-207;1971.
76. ChandraRajan, J. Biochem. Biophys. Res. Comm. 83(1):180-186;1978.
77. Trelstad, R.L. Kang, A.H. Igarashi, S and Gross, J. J. Biochem. 9:4993-4998;1970.
78. Sleep, J.A. Hutton, R.L. Biochem. 17:5423-5430;1978.
79. Seifter, S. Harper, E. en The Enzymes (Boyer, P.D. ed.) vol 3 Acad. Press. N.Y.:649-697;1971.
80. Miller, E. Rhodes, K. en Methods in enzymology 82:33-64.1982.
81. Lefevere, M.F. Slegers, G.A. Claeys, A.F. Clinica Chimica Acta. 92:165-167; 1979.
82. Johnson-Wint, B. Analytical Biochem. 104:175-181;1980.
83. Gisslow, M.T. Mc.Bride, B.C. Analytical Biochem. 68:70-78;1975.

84. Laemmli, U.K. *Nature* 222:680;1970.
85. Hayashi, T. Nagai, Y. *J. Biochem.* 86(2):453-459;1979.
86. Woessner, J.F. Jr. *Arch. Biochem. Biophys.* 93:440-447;1961.
87. Stegemann, H Hope-Seyler's, Z. *Physiol. Chem.* 311:41;1958.
88. Bradford, M. *Anal. Biochem.* 72:248;1976.
89. Groves, E.G. et al *Anal. Biochem.* 22:195-210;1968.
90. Terato, K. Nagai, Y Kawanishi, K. Yamamoto, S. *B.B.A.* 445:753-762;1976.
91. Stricklin, G.P. Bauer, E.A. Jeffrey, J.J. Eisen, A.Z. *Biochem.* 16:1607-1615; 1977.
92. Stricklin, G.P. Eisen, A.Z. Bauer, E.A. Jeffrey, J.J. *Biochem.* 17:2331-2337;1978.
93. Cawston, T.E. Tyler, A.J. *Biochem. J.* 183:647-656;1979.
94. López Escalera, R.R. Figueras T. *Observaciones no publicadas*;1985.
95. Hori, N. Ito, Y Fukuyama, K.J. *Invest. Dermatol.* 80:372;1983.
96. Heussen, C. Dowdle, E.B. *Anal Biochem.* 102:196;1980.
97. Laskowsky, M. *Methods in Enzymology* 2:26-36; Acad. Press.; 1955.
98. Lowry, O.H. Rosebrough, N.J. Farr, A.L. Randall, R.J. *J. Biol. Chem.* 193:265-275; 1951.
99. Seltzer, J.L. Adams, S.A. Grant, G.G. Eisen, A.Z. *J. Biol. Chem.* 256:4662;1981.
100. Sakamoto, S. Sakamoto, M. Goldhaber, P. Glimcher, S. *B.B.A.* 385:41-50;1981.
101. Bicksac, T.A. Harper, E. *Anal. Biochem.* 145:286-291;1985.
102. Porath, J. Carlsson, J. Olsson, J. Belfrage, G. *Nature* 258:598-599;1975.
103. Mainardi, C. Hibbs, M. Hasty, K. Seyer, J. *Conn. Tiss. Res.* 4:479-492;1984.
104. Sakamoto, M. Alfant, M Sakamoto, S. *Biochem.* 90:715-720;1981.
105. Lusse, S. Hutton, R. *Anat. Rec.* 148:308;1964.
106. Whal, L.M. Olsen, Ch.E. Sandberg, A.L. Mergenhausen, S.E. *P.N.A.S.* 74(11): 4955-4958;1977.
107. Birkedal-Hansen, H. Cobb, C.M. Taylor, R.E. Fullmer, H.M. *Archs. Oral Biol.* 21:21-25;1976.
108. Horwitz, A.L. Kelmar, J.A. Crystal, R.G. *Nature* 264:772-774;1976.
109. Dayer, J.M. Sundström, L. Polla, B.S. Junod, A.F. *J. Leukocyte Biol.* 37:641-649; 1985.
110. Seltzer, J.L. Horan, T.P. Eisen, A.Z. *J. Invest. Dermatol.* 80(6):42-43;1983.
111. Welgus, H.G. Jeffrey, J.J. Stricklin, G.P. Eisen, A.Z. *J. Biol. Chem.* 257(19): 11534-11539;1982.
112. Harris, E.D. Jr. Krane, S.M. *B.B.A.* 258:556;1972.
113. Seltzer, J.L. Eschback, M.L. Eisen, A.Z. Purification of a gelatin-specific neutral protease from human skin by conventional and high performance liquid chromatography. in press.

114. Pardo, A. observaciones no publicadas.
115. Ishikawa, M. Ziff, M. Arthritis Rheum. 19:1-14;1976.
116. Huybrechts-Godin, G. Hanser, P. Vaes, G. Biochem. J. 184:643-650;1974.
117. Dayer, J.M. Krane, S.M. Russel, G.G. Robinson, G.M. P.N.A.S. 73(3):945-949; 1976.
118. Dayer, J.M. Stephenson, M.L. Schmidt, E. Karge, W. Krane, S.M. FEBS Letters. 124(2):253-256;1981.
119. Vaes, G. Peeters-Joris, Ch. Emonds-Alt, X. Hausser, P. Huybrechts-Godin Laub, R. en Collagen Degradation and Mammalian Collagenase (Tsuchiya, M et al eds.) Excerpta Medica. Int. Congress Series 601:49-56;1982.