

2  
2e



*Universidad Nacional Autónoma  
de México*

---

---

*Instituto de Investigaciones Biomédicas*

**ACTIVIDAD COLAGENOLITICA DE BAZO  
HUMANO**

**T E S I S**

*Que para obtener el título de*

**LICENCIATURA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA**

*presenta*

***Margarita María Hernández Aguilar***

1988



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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
a.- LAS COLAGENAS.....	2
-Clasificación de las Colágenas.....	3
-Biosíntesis de la Colágena.....	5
b.- LAS COLAGENASAS.....	8
II.- OBJETIVO.....	14
III.- MATERIAL Y METODOS.....	15
1.- Obtención de Bazos.....	15
2.- Preparación del homogenado.....	15
3.- Hidrólisis de la muestra para determinar la hidroxiprolina.....	15
4.- Preparación del precipitado del 20% al 65% en sulfato de amonio del homogenado de bazo humano. Fracción 20-65.....	16
5.- Acetilación de colágena.....	16
6.- Electroforesis.....	17
7.- Determinación de la actividad colagenolítica de bazo humano sobre colágena endógena.....	17
8.- Determinación de la actividad colagenolítica de bazo humano sobre colágena - <sup>3</sup> H.....	18
9.- Determinación de actividad colagenolítica sobre un péptido sintético.....	19
IV.- RESULTADOS	
i) Actividad colagenolítica de bazo humano sobre colágena endógena....	20
ii) Actividad colagenolítica de bazo humano sobre colágena exógena.....	22
iii) Actividad colagenolítica sobre el péptido sintético DNP-Pro-Gli-Gli-Ile-Ala-Gli-D de la fracción 20-65 en presencia de inhibidores y activadores de proteasas.....	23
TABLAS	
FIGURAS	
V.- DISCUSION.....	24
VI.- CONCLUSIONES.....	26
VIII.- BIBLIOGRAFIA.....	27

I

INTRODUCCION

En los últimos años el interés de nuestro laboratorio se ha orientado hacia ciertos problemas específicos del vasto campo de las colagenasas. Existen datos en la literatura acerca de la actividad colagenolítica o colagenasas en distintos órganos como hígado, riñón, útero, pulmón, etc., y solo una referencia de actividad colagenolítica dada por proteasas de serina en bazo humano. El objetivo de este trabajo es buscar actividad colagenolítica en el bazo humano.

### a.- LAS COLAGENAS

Aproximadamente la mitad de la proteína total del cuerpo humano es colágena. Su función primordial es de soporte en una gran variedad de tejidos; otras funciones que posiblemente tiene están involucradas en los procesos de desarrollo, unión celular y quimiotaxis.

La colágena es una molécula rígida, altamente asimétrica, con peso molecular aproximado de 300,000 daltones cuyas dimensiones son de 300 X 1.5 nm. Está compuesta de tres cadenas polipeptídicas alineadas colinealmente en la molécula. Se le puede dividir en tres dominios distintos:

1) El amino-terminal, que es una región no helicoidal de aproximadamente el 2% de la molécula. Su importancia radica en que es uno de los sitios donde se encuentran las uniones covalentes intramoleculares.

2) La región central en forma de hélice, siendo aproximadamente el 95% de la longitud total de la molécula. En este dominio las cadenas individuales se encuentran en forma de una hélice de tipo poliprolina con giro hacia la izquierda y la cual acomoda aproximadamente 3 residuos por vuelta a una distancia de 0.9 nm. Las tres hélices se enrollan sobre un eje común formando una super hélice con giro a la derecha, con una distancia aproximada de 10 nm. La forma cuaternaria de la molécula le confiere una considerable resistencia a la tensión.

Este superenrollamiento se estabiliza por puentes de hidrógeno intercatenarios, los cuales parten de los residuos de glicina presentes en la molécula. La glicina se presenta en cada tercera posición a lo largo de toda la cadena.

3) La región carboxi-terminal no helicoidal comprende el otro 3% de la molécula y al igual que la región amino-terminal, es el sitio de inicio de las uniones covalentes intramoleculares.

La molécula está compuesta por 23% de prolina más hidroxiprolina, 33% de glicina, también tiene una gran cantidad de ácido glutámico, alanina e hidroxilisina y en pequeña cantidad metionina, isoleucina, tirosina e histidina.

La existencia de varios tipos genéticos de colágena es un ejemplo del polimorfismo de las proteínas. Esta diversidad apareció probablemente por duplicación génica en respuesta a los requerimientos específicos de los tejidos (1,2). Los tipos de colágena más estudiados y abundantes son I, II y III; son los que se encuentran en los espacios intercelulares, llamándoseles por lo tanto colágenas intersticiales.

#### **Clasificación de las Colágenas:**

La colágena tipo I tiene la composición  $\{\alpha 1(1)_2\alpha 2\}$ , es rica en puentes de hidrógeno intramoleculares, y se encuentra formando parte del tejido conjuntivo en la mayoría de los órganos. El patrón de asociación de las fibras de colágena tipo I es en forma paracristalina con una periodicidad de 65 nm por la agregación desfasada de las moléculas con las

adyacentes y por la interacción de los dominios similares. Su papel es esencialmente de soporte en tejidos que exhiben poca distensibilidad bajo tensión mecánica.

La colágena tipo II tiene la estructura  $\{\alpha_1(\text{II})\}_3$ , se ha aislado de cartílagos hialinos en donde se asocia con proteoglicanos y tiene una prevalencia de uniones intermoleculares cetó-amina estables en forma de fibras paracristalinas.

La colágena tipo III con una estructura  $\{\alpha_1(\text{III})\}_3$ , se encuentra coexistiendo con la colágena tipo I, en tejidos con gran elasticidad - como las paredes arteriales y algunos órganos como miocardio e hígado.

La colágena tipo IV presenta dos tipos de arreglo  $\{\alpha_1(\text{IV})\}_2 \alpha_2(\text{IV})$ , o bien  $\alpha_1(\text{IV}) \{\alpha_2(\text{IV})\}_2$ , se encuentra en las membranas basales (3) en forma de redes por interacciones cola con cola y cabeza con cola, además de que contiene los dominios globulares amino y carboxi-terminal. Este tipo de colágena tiene una mayor cantidad de hidroxiprolina y carbohidratos asociados y menor proporción de glicina.

La colágena tipo V con su estructura  $\alpha_1(\text{V}) \alpha_2(\text{V}) \alpha_3(\text{V})$  se encuentra asociada a las fibras intersticiales aunque en menor proporción, principalmente en los espacios pericelulares (4).

La colágena tipo VI  $\alpha_1(\text{VI}) \alpha_2(\text{VI}) \alpha_3(\text{VI})$  se encuentra también como microfibrillas intersticiales, con menor tamaño y dominios globulares en los extremos en dos terceras partes del total de la molécula (5).

Poco se conoce de la estructura y localización de la colágena tipo VII pero se cree que se encuentra preferentemente entre las células y

la membrana basal, sirviendo tal vez de anclaje entre ellas. La colágena tipo VIII es de estructura indeterminada y se produce en pequeñas cantidades por células endoteliales en cultivo. Esta proteína es sensible a proteasas inespecíficas por lo que se cree tenga varias regiones no helicoidales a lo largo de la molécula. El tipo genético IX de colágena se ha identificado en cartílago, de éste se han aislado tres cadenas alfa diferentes, tiene segmentos intercalados con los dominios de superhélice, por lo cual es sensible a la acción de proteasas inespecíficas. La colágena tipo X también se ha encontrado en cultivos de condrocitos (6). (ver Tabla I).

#### **Biosíntesis de la Colágena:**

Se sabe que la colágena se sintetiza como molécula precursora llamada procolágena. Como se había señalado anteriormente existen varios genes de colágena. La secuencia génica está interrumpida por intrones que ocupan 9/10 partes del total de la secuencia. Con respecto a esto llama la atención el hallazgo en el gene de la cadena alfa-2 (I) el cual tiene secuencias repetidas de 18 aminoácidos separadas por intrones. Por lo que se cree que ésta secuencia patrón se duplicó varias veces. En cada línea celular se expresa selectivamente uno de éstos genes para producir el mRNA apropiado. Este mRNA es transportado al citoplasma donde se une con los ribosomas formándose la cadena de procolágena, que queda también unida a los ribosomas por la parte amino terminal, para ser exportada vía las cisternas del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi donde se ensamblan las tres cadenas y se forma la triple hélice. El ensamblaje depende de la capacidad del carboxi-terminal para agregarse, ya que la procolágena contiene puentes disulfuro intercatenarios sólo en ésta región inicial para la formación de la triple



TABLA 1

TIPOS GENETICOS DE COLAGENA

TIPO	COMPOSICION	LOCALIZACION	CARACTERISTICAS
I	$(\alpha_1(I))_2\alpha_2$	TEJIDO CONECTIVO, ESTROMA VARIOS ORGANOS	SOPORTE DE TEJIDOS
II	$(\alpha_1(II))_3$	CARTILAGOS HIALINOS	ALTAMENTE ASOCIADA A PROTEOGLICANOS
III	$(\alpha_1(III))_3$	TEJIDOS DE GRAN ELASTICIDAD COMO PAREDES ARTERIALES, MIOCARDIO E HIGADO	COEXISTE CON LA COLAGENA TIPO I
IV	$(\alpha_1(IV))_2 \alpha_2(IV)$ ó $(\alpha_1(IV) \alpha_2(IV))_2$	MEMBRANAS BASALES	FORMA REDES CONSERVANDO SUS DOMINIOS GLOBULARES COOH Y NH <sub>2</sub> TERMINALES
V	$(\alpha_1(V), \alpha_2(V)\alpha_3(V))$	ESPACIOS PERICELULARES	SU FUNCION PRINCIPAL PROBABLEMENTE SEA LA UNION CELULAR
VI	$(\alpha_1(VI) \alpha_2(VI)\alpha_3(VII))$	ESPACIO INTERSTICIAL	MICROFIBRILLAS DE MENOR TAMAÑO CON DOMINIOS GLOBULARES EN AMBOS EXTRE- MOS
VII	?	ENTRE LAS CELULAS DE LA MEMBRANA BASAL	CADENA LARGA
VIII	?	CELULAS ENDOTELIALES EN CULTIVO	CON REGIONES NO HELICOIDALES A LO LARGO DE LA MOLECULA
IX	$(\alpha_1(IX) \alpha_2(IX) \alpha_3(IX))$	CARTILAGO	SEGMENTOS GLOBULARES INTERCALADOS CON LOS DOMINIOS SUPERHELICE
X		CULTIVOS DE CONDROCITOS	CADENA CORTA

hélice. En el aparato de Golgi las moléculas de colágena están empaquetadas en vesículas para su secreción, dependiendo ésta del sistema microtubular.

Las moléculas de procolágena recién sintetizadas se encuentran en forma soluble lo que facilita su transporte. La presencia de carbohidratos facilita su paso a través de algunas membranas (7,8).

Una vez excretada la molécula de colágena tipo I ocurre el primer evento de procesamiento extracelular, que es la formación de colágena a partir de la procolágena, eliminándose del carboxi-terminal un péptido de 35,000 daltones y del amino-terminal un péptido de 25,000 daltones, perdiéndose aproximadamente una tercera parte del total de la procolágena. Los péptidos que se cortan de la procolágena contienen una gran cantidad de heteropolisacáridos que no se encuentran en la molécula de colágena y que son inmunogénicos. El siguiente evento importante del procesamiento extracelular es la formación de fibras. Por medio de inmunohistoquímica se han descrito fragmentos de procolágena de tipo III en la malla de tejido en ciertas membranas basales (ver Tabla 2).

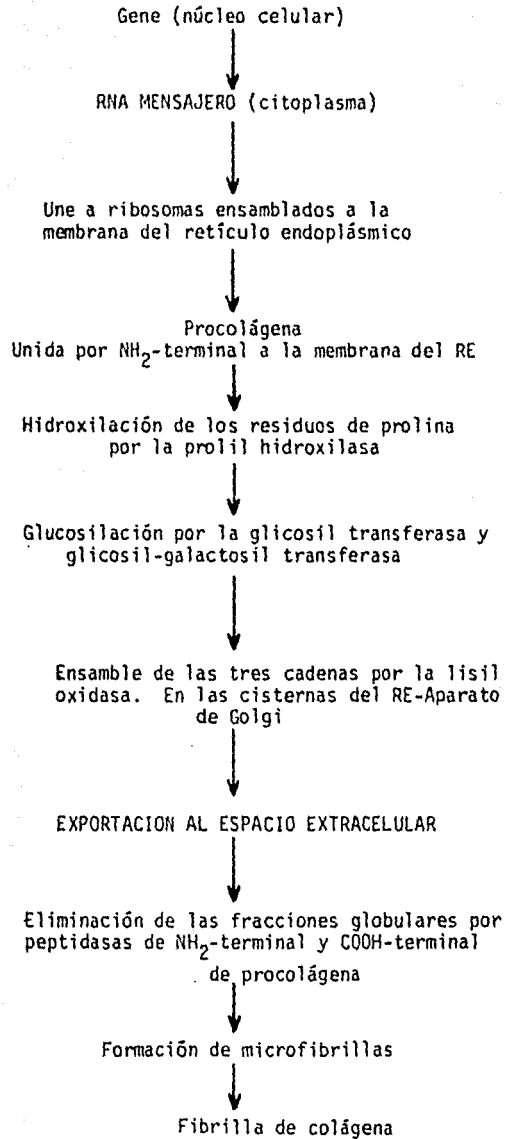
Existen dos opiniones distintas sobre el mecanismo de formación de las fibrillas de colágena en el espacio extracelular:

1) Los monómeros se van agregando individualmente uno por uno cabeza con cola y con las cadenas poliméricas adyacentes ya formadas.

2) Dentro de las vesículas secretorias los monómeros forman agregados que se unen unos con otros formando sobrensamblados que se incorporan como polímeros insolubles (9).

TABLA 2

BIOSINTESIS DE COLAGENA



Las cadenas adyacentes se unen covalentemente por medio de la enzima lisil-oxidasa, enzima específica para colágena y elastina que usa cobre y piridoxal como cofactores; la enzima cataliza una desaminación oxidativa de los residuos del lisil o hidroxilisil, convirtiendo los grupos epsilon-amino a una función de aldehído. Los productos de esta reacción son llamados alisina e hidroxialisina y reaccionan espontáneamente por condensación con los residuos vecinos para formar los enlaces covalentes.

La formación de 4-hidroxiprolina a partir de prolina es catalizada por una enzima llamada prolil-4-hidroxilasa, la cual requiere oxígeno molecular, alfa-ceto-glutarato, ión ferroso y ascorbato como cofactores. El oxígeno se usa en la formación del grupo hidroxilo, el alfa-cetoglutarato en la descarboxilación a succinato, el ión ferroso se une a la enzima para captar el oxígeno y el ascorbato sirve como agente reductor. La enzima procesa los residuos de prolina adyacentes a la glicina así como también los residuos que no participan en la formación de la superhélice.

La hidroxilación es un fenómeno muy eficiente que se lleva a cabo en los residuos nacientes teniendo aproximadamente 100 residuos hidroxilados por molécula de colágena. La presencia de éstos residuos hidroxilados es importante para el superenrollamiento de la molécula a temperatura fisiológica.

La hidroxialisina se encuentra en cantidad variable en la molécula de colágena, siendo más abundante en la colágena tipo II y desempeñando un papel importante en la glicosilación de la molécula que se lleva

a cabo inmediatamente para formar galactosil hidroxilisina o glucosil-galactosil-hidroxilisina, importantes en las uniones intermoleculares.

Estas reacciones son catalizadas por las enzimas específicas galactosil transferasa y glucosil transferasa, requiriendo  $Mg^{++}$  como co-factor.

#### b.-LAS COLAGENASAS

Las colagenasas animales son metaloproteinasas que degradan a la colágena en estado nativo y en condiciones fisiológicas de pH, temperatura y fuerza iónica (10-23). Las colagenasas se agrupan en 3 categorías: 1) la colagenasa bacteriana, que fue la primera que se describió por Seifter, Gallop y Mandl (24,25 y 26) en Clostridium histolyticum; 2) la colagenasa de polimorfonucleares, que fue demostrada por Lazarus en 1968 y que degrada la colágena cuando se encuentra en solución; 3) las colagenasas encontradas en los diferentes tejidos estudiados y que presentan especificidad por los diferentes tipos genéticos de colágena. Nos referiremos a lo largo de éste texto principalmente a ésta tercera categoría.

La primera colagenasa eucariote fue descrita en 1962 por Gross y Lapiere (27) en el medio de cultivo de colas de renacuajo (28,29). Posteriormente han aparecido comunicaciones de colagenasas en animales marinos (30), anfibios (31,32) y mamíferos. En general, las colagenasas animales hacen una sola escisión en la molécula de colágena, resultando un péptido mayor de aproximadamente el 75% de la molécula llamado  $Tc^a$  y otro de menor tamaño, aproximadamente el 25% de la molécula llamado  $Tc^b$  (33 y 34). La especificidad de la enzima se debe a la secuencia

de aminoácidos, que hace a ciertas regiones de la triple hélice más susceptibles a la degradación (35,36). Esto lo demostró Liotta (37) en colagenasa de piel humana, que es incapaz de degradar a colágena tipo IV y V, y una colagenasa de tumor murino que degrada solamente colágena tipo IV y no I, II, III ó V (38).

Bruns y Gross (39) identificaron el sitio de corte de la cadena  $\alpha 1(I)$  de colágena con el uso de microscopía electrónica y Gross (40) confirmó su localización con análisis secuencial, mostrando también que el disacárido Glu-Gal está unido a la hidroxilisina más cercana, además que este sitio de corte está más cercano al carboxi-terminal de la molécula. Las colagenasas de renacuajo o de conejo rompen en los mismos sitios de las diferentes cadenas, el enlace Gli-Ile de la cadena  $\alpha 1(I)$  y el enlace Gli-Leu de la cadena  $\alpha 2(I)$ . Lo mismo ocurre en la cadena  $\alpha 1(II)$  de colágena de cartílago (41), mientras que la colagenasa de tumor de conejo rompe el enlace Gli-Ile (42). En la colágena tipo III se rompe el enlace Gli-Leu. Miller y cols., encontraron (43) que las uniones Gli-Ile y Gli-Leu que resisten al corte de la enzima tienen una hidroxiprolina en el siguiente triplete de repetición, aproximadamente en la posición 700. También observaron que la colágena tipo III se degrada 5 veces más rápido que la colágena tipo II. La colágena I y III tienen velocidades similares de degradación (44). La secuencia mínima requerida para su degradación por colagenasa es Gli-Ile-Ala ó Gli-Leu-Ala.

Miller y cols., (45) señalaron que la tripsina hidroliza a las 3 cadenas de colágena nativa tipo III en el enlace Arg-Gli dando dos fragmentos de 71,000 y 24,000 daltones, éste sitio hidrolítico se encuentra

8 residuos de aminoácidos del carboxi-terminal de la región de corte de la colagenasa. Este efecto no se observa en la colágena tipo I y III, ya que la arginina está sustituida por una valina.

La colagenasa se describió como zimógeno por Harper (46), posteriormente varios laboratorios aislaron zimógenos en otros tejidos (47, 48). Birkedal-Hansen (49) describió una procologenasa de encía de bovino con peso molecular de 80,000, que al incubarse con tripsina pierde una fracción que corresponde a un decremento del peso molecular de 15,000-20,000 daltons y que muestra la enzima activa. Otras proteasas (50) como quimiotripsina, catepsina B, Kalicreína y plasmina, también activan a la enzima. Woessner obtuvo un zimógeno de colagenasa - de útero de rata (48) cuyo precursor pesa 77,000 y se convierte en la enzima con peso molecular de 60,000, producto de un activador presente en el utero (51). Se encontró también (52) en el líquido sinovial una proteína activadora de 35,000 de peso molecular, esta proteína activa los zimógenos de colagenasa y gelatinasa.

Se ha visto también que varias sustancias son capaces de activar a la colagenasa o bien aumentar su síntesis, como por ejemplo la colchicina, que a muy bajas concentraciones activa la colagenasa del explante de granuloma de carragenina (53), de sinovial reumatoide (54, 55, y 56), de nódulo reumatoide (57) y de macrófago.

Se han encontrado también activadores "in vitro" como la citocalasina B (58,59) dexametasona (60), tiroxina (61), AMP cíclico (62, y 63), heparina (64), la endotoxina (65,66), así como linfocinas produ-

cidas al interaccionar linfocitos T sensibilizados y su antígeno correspondiente (67).

Se han propuesto varios mecanismos de activación de colagenasa por enzimas proteolíticas (68), así como compuestos organomercuriales. (69,70).

De acuerdo al método de Macartney y Tschesche (71), la colagenasa latente de polimorfonucleares puede ser activada por radicales de oxígeno generados por el sistema XO y XH, estos  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  interactúan para generar el activador final.

Recientemente Weiss y cols., (72) postularon una autoactivación de la colagenasa latente de neutrófilos por la formación de ácido hipocloroso de la reacción del sistema de la mieloperoxidasa, que se lleva a cabo en presencia de glutatión (73), proponiendo la hipótesis que algún inhibidor con peso molecular de aproximadamente 24,500 daltons está unido por puentes disulfuro a la enzima pudiéndose activar con algún reactivo thiol (74). (ver Tabla 3).

La colagenasa puede ser inhibida por proteinasas séricas u otros compuestos, por lo que también existe en forma de complejos enzima-inhibidor, éste último fue descrito por Birkedal-Hansen (49) y Stricklin (75).

Se han encontrado "in vivo" una gran cantidad de inhibidores de la colagenasa, cuya función es probablemente la de regular su actividad (76,77). Por ejemplo la proteína catiónica de bajo peso molecular aislada de cartílago y de aorta, que inhibe la colagenasa encontrada en piel humana (78) y las enzimas obtenidas de osteosarcoma y carcinomas mamarios (79). Otros inhibidores son el factor 4 plaque-



TABLA 3

ACTIVADORES DE LA COLAGENASA

<u>PROTEASAS</u>	<u>REACCION CON SULFHIDRILOS</u>
Proteasas de serina	Organomercuriales
Tripsina (70)	-4-cloromercuribenzoato (69)
Quimiotripsina (68)	Acetato 4-aminofilmercurio (70)
Plasmina (83)	Mersalil (91)
Kalikrefina (83)	p-hidroximercurobenzoato (70)
Utero (51)	Glutati3n oxidado (73)
Sinovial	N-Etilmaleimida (92)
Piel (68)	Cistina (93)
C3lulas Cebadas (85)	Insulina (93)
Proteasas lisosomales (50)	Relaxina (94)
Metaloproteinasas (86)	
Proteasas de renacuajo (46)	
<u>VARIOS</u>	<u>AGENTES CAOTROPICOS</u>
Autoactivaci3n (72)	Yoduro de Sodio (90)
Placa dental (87)	Isotiocianato de Sodio (90)
Factor Angiog3nico (88)	
Heparina (64)	
Purificaci3n (89)	
SDS (90)	
C3tocalacina B (58,59)	
Dexametasona (60)	
Tiroxina (61)	

tario (80,81) y la betatromboglobulina (82). Woolley encontró una beta<sub>1</sub>-proteína sérica de bajo peso molecular (40,000 d) que inhibe específicamente la colagenasa humana; esta proteína, inhibe en diferente magnitud a las colagenasas de líquido sinovial, mucosa gástrica, piel y granulocitos (95). El suero contiene alfa<sub>2</sub>-macroglobulina (96) la cual inhibe también las colagenasas (97). Se han encontrado inhibidores en piel humana (98), piel de pollo (98), tejidos de conejo (100, 101), tumores (102), en el tendón humano (103), células de músculo liso (104). Estas proteínas no inhiben a la colagenasa obtenida de Clostridium histolyticum.

Berman y cols. (105) han observado que el dibutiril-AMPC y la teofilina inhiben parcialmente la aparición de colagenasa en cultivos de córneas ulceradas de conejo, y sugieren que las prostaglandinas pueden estimular la adenilciclasa para producir AMPC in vivo; Koob y Jeffrey (106), han encontrado que estos compuestos pueden inhibir la producción de colagenasa en cultivos de útero posparto de rata. Ryan y Woessner (107) demostraron que el estradiol y la progesterona inhiben la producción o liberación de la enzima presente en el útero en involución de rata, este efecto se bloquea con CI-628, un antagonista de estradiol (108, 109). Las colagenasas de leucocitos humanos se inhiben con algunas drogas anti-inflamatorias usadas en la terapia de enfermedades reumáticas (110) como ácido acetilsalicílico, indometacina, fenilbutazona, sanocrisina y ácido flufenámico (ver Tabla 4).

En resumen la colagenólisis es un proceso con varios niveles de regulación (111): el primer nivel en la expresión genética en que se regula la síntesis de mRNA; el segundo nivel, en medio extracelular,

TABLA 4

INHIBIDORES DE LA COLAGENA

<u>SERICOS</u>	<u>QUELANTES DE CALCIO (105)</u>
alfa <sub>2</sub> -macroglobulina (49)	EDTA
beta <sub>1</sub> -anticolagenasa (75)	EGTA
	L-Cisteína
	N-acetil-L-cisteína
	Ca-EDTA
	D-penicilamina
<u>GLUCOPROTEINAS CATIONICAS</u>	<u>VARIOS</u>
Células neoplásicas (44)	Lisozima (113)
Cartilago (78)	Tumoral (112)
Aorta (78)	Factor 4 plaquetario (80,81)
Hueso	Fibronectina (112)
Leucocitos (112)	Fragmentos de colágena (112)
Piel embrionaria (112)	beta-tromboglobulina (82)
Sinovial (91)	
Tendón (112)	
Fibroblastos de Piel (112)	
Fluido amniótico (77)	
Humor Vítreo (112)	

donde se encuentra en forma de zimógeno; el tercer nivel sería la presencia de un activador en el sitio donde se requiere la actividad (111); el cuarto nivel de regulación (más específico), en el cual la actividad es modulada por un inhibidor específico en forma de un complejo enzima-inhibidor (112, 113) o bien por la existencia de complejos enzima-sustrato (114); y el último nivel de regulación serían las condiciones del microambiente de la colágena, el tipo de ésta y los varios cambios fisiológicos que pueden iniciar su degradación (115 y 116).

## II OBJETIVO

Como se menciona en la introducción de esta tesis, existe una gran cantidad de información concerniente a la actividad colagenolítica y colagenasa en distintos tejidos animales sin que se describa una colagenasa de bazo, del cual sólo se conoce la existencia de colágena tipo I y III, por lo que nuestro interés radica en buscar actividad colagenolítica en este órgano, y si existe, probar su comportamiento en presencia de quelantes de calcio, inhibidores y activadores de proteasas y activación por proteólisis parcial.

### III MATERIAL Y METODOS

#### 1.- Obtención de Bazos:

- a) 175 gr. de bazo humano obtenido por esplenectomía por hipertensión portal, en el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".
- b) 32 grs. de bazo humano obtenido 10 horas "post-mortem" de un paciente masculino de 50 años con diagnóstico de insuficiencia respiratoria aguda por adenocarcinoma de pulmón derecho, en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
- c) 130 grs. de bazo humano obtenido 6 horas "post-mortem" de un paciente masculino de 68 años con diagnóstico de insuficiencia respiratoria, bronquiectacias e insuficiencia cardíaca derecha Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

#### 2.- Preparación del homogenado:

Se homogeniza con un volumen igual al peso de la muestra de bazo, de amortiguador Tris-HCl 0.05 M + NaCl 0.15 M y  $\text{CaCl}_2$  (5mM, 10mM, 20mM, ó 30mM), pH 7.4.

#### 3.- Hidrólisis de la muestra para determinar la hidroxiprolina:

La muestra se coloca en ampolletas a las cuales se les agrega HCl a una concentración final de 6N, se sellan al vacío y se colocan 24 horas a 100°C. Se evapora el ácido, se resuspende en agua destilada, se neutraliza el pH ajustando con agua a un volumen conocido y se determina hidroxiprolina por el método colorimétrico de Rojkind y González (117).

4.- Preparación del precipitado del 20% al 65% en sulfato de amonio del homogenado de bazo humano. Fracción 20-65.

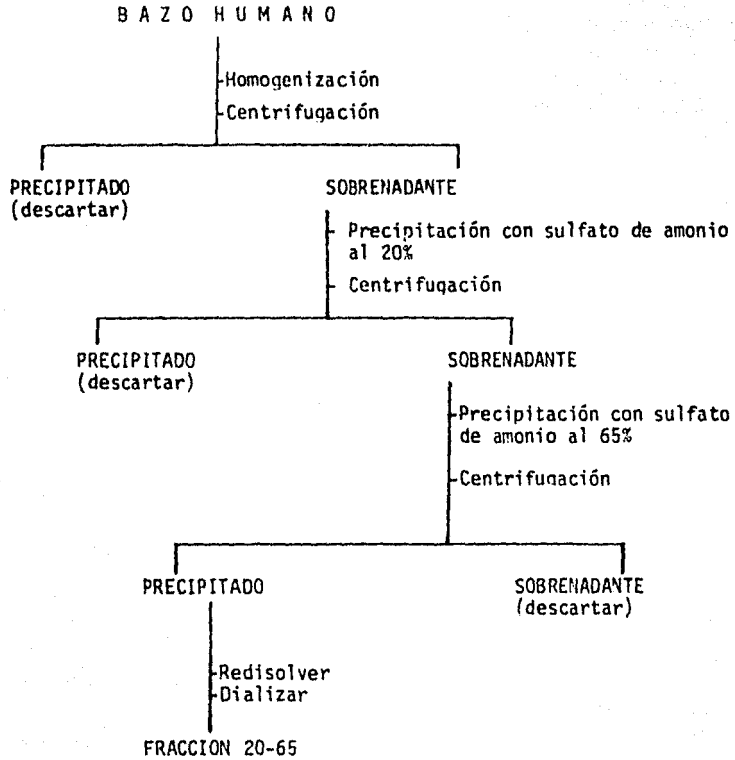
50 ml de homogenado de bazo humano + 10mM  $\text{CaCl}_2$ , se centrifugó 20 minutos a 2,600 rpm, se desechó el precipitado y el sobrenadante se precipitó con una solución saturada de sulfato de amonio en tris pH 7.4 a una concentración final del 20%, 24 horas a 4°C. Se centrifugó 30 minutos a 10,000 rpm, se desechó el precipitado y el sobrenadante se puso a precipitar otra vez con una solución saturada de sulfato de amonio en Tris pH 7.4 a una concentración final del 65% 24 horas a 4°C. Se centrifugó 30 minutos a 10,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se redisolvió en 50 ml de Tris HCl 0.05M, NaCl 0.15M, 10mM de  $\text{CaCl}_2$  pH 7.4. Se dializó 72 horas contra el mismo buffer con 5 cambios. (ver Figura 1). Se determinó la cantidad de proteína total por el método de Lowry modificado por Eagle (118).

5.- Acetilación de colágena:

Se purificó colágena tipo I de piel de rata de 8 a 10 semanas de edad por el método de Müller y Rhodes (119), que consiste en una extracción con pepsina y solubilización en ácido acético 0.5M seguida de precipitaciones con sales. La acetilación de colágena se hizo de acuerdo a la técnica de Lefevre y cols. (120) con anhídrido acético  $^3\text{H}$ , (Actividad específica 0.15 mCi/mg de colágena) en medio alcalino, eliminando la marca que no se incorporó con diálisis exhaustiva contra agua destilada.

FIGURA No. 1

PREPARACION DE LA FRACCION 20-65





## 6.- Electroforésis:

Se corrieron las muestras en geles de acrilamida al 7% con dodecil sulfato de sodio (SDS) a 25 mAmps por gel, de acuerdo al sistema de Laemmli (121). Se tiñó el gel 8 horas con metanol al 50%, ácido acético al 10% y 0.1% de azul de Coomasie. Se destiñó el gel con metanol al 20% y ácido acético al 10% durante 48 horas. En este tipo de geles la colágena tipo I tiene un patrón electroforético de 5 bandas, la banda más pesada consiste de colágena no disociada y se le denomina gamma. Las dos siguientes bandas son asociaciones de la cadena alfa, ya sea alfa-1 con alfa-1 ó alfa-2 con alfa-1 y se le denomina beta 1 y 2 respectivamente. Y las dos últimas bandas son cadenas alfa-1 y alfa-2 disociadas. En éste sistema la actividad colagenolítica se puede observar por la aparición de fragmentos (productos de degradación) por debajo de las cadenas alfa disociadas.

Los geles fueron preparados para autorradiografía con 3 cambios de dimetil sulfóxido de una hora cada uno y un cambio más con PPO (2,5-Difeniloxazol) al 20% en dimetilsulfóxido, una hora, se enjuagó el gel con agua destilada, se secó y se puso 28 días en contacto con una placa fotográfica para Rayos X (Kodak, Omak, x k - 1 20 x 25 cms) a -70°C. La placa se reveló por métodos convencionales.

## 7.- Determinación de la actividad colagenolítica de bazo humano sobre colágena endógena:

Se probó la actividad colagenolítica incubando 0.5 ml de homogenado de bazo humano con 0.5 ml de buffer Tris-HCl pH 7.4 + CaCl<sub>2</sub> (5mM 10mM, 20mM ó 30mM) por duplicado, con y sin EDTA (sal tetrasódica de

ácido Etilendiaminotetracético) a una concentración final 8 veces mayor que la de calcio a 37°C durante, 72, 96 y 120 horas. Al final de la incubación a los tubos que no contenían EDTA se les agregó a la misma concentración final que los incubados. Se centrifugaron a 2600 rpm durante 20 minutos. Se tomaron alícuotas de 1 ml del sobrenadante para procesarlo por los métodos siguientes:

- a) Ultrafiltración por membrana (Amicon Co.) XM100, la cual retiene moléculas de 100,000 daltones o más.
- b) Centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos colectando tanto el precipitado como el sobrenadante.
- c) Precipitación con TCA (ácido tricloroacético) al 10% a 4°C durante una hora. Centrifugar 10 minutos a 10,000 rpm y colectar por separado el precipitado del sobrenadante.
- d) Precipitar una hora con dioxano-metanol 4:1 v:v a 4°C (121) obteniendo el precipitado y el sobrenadante.

El filtrado, lo que no filtra, los precipitados y sobrenadantes se colocaron en ampollitas, se hidrolizaron y se les determinó hidroxiprolina por el método de Rojkind y González (117).

#### 8.- Determinación de actividad colagenolítica sobre colágena -<sup>3</sup>H

Se incubó una mezcla de 12.5 µl de la fracción 20-65 de homogenado de bazo humano (192.1 µg de proteína) con 12.5 µl de colágena <sup>3</sup>H (12,500 CPM), Tris-HCl 0.5 M, NaCl 0.15 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7.8 para neutralizar el pH de la colágena -<sup>3</sup>H; ajustando el volumen con Tris-HCl pH 7.4.

Se incubó por duplicado con y sin EDTA a una concentración final de 80 mM, colágena sola, fracción 20-65 sola y fracción 20-65 + colágena en presencia de PHMB (para-hidroximercurobenzoato) a una concentración final de 0.1 M, PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro) a una concentración final de 1 mM, NEM (N-Etil-maleimida) 0.012 M final, DTT (Ditiotreitol) a una concentración final de 0.012 M, beta-mercaptoetanol a una concentración final de 1-100 v/v, y tripsina 5 µg, 10 µg, y 20 µg, así como también con las mismas concentraciones de tripsina más ITFS (inhibidor de tripsina de frijol de soya) a una concentración 5 veces mayor que la concentración de tripsina y con inhibidor solo a una concentración de 10 µg, 25 µg, 40 µg, 60 µg y 100 µg, 24 horas a 30°C (122). Al final de la cual se paró la reacción por adición de EDTA a una concentración final de 0.08 M.

Un grupo de muestras se trató para electroforésis y el otro grupo se precipitó una hora con dioxano v/v a 4°C. Se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm. Se tomaron 50 µl del sobrenadante y se le agregaron 5 ml de líquido de centelleo (Bray) y se contaron en un aparato marca Beckman.

En este ensayo es importante notar que los fragmentos productos de la degradación permanecen solubles mientras que la colágena entera precipita con el dioxano.

#### 9.- Determinación de Actividad colagenolítica sobre un péptido sintético.

El péptido utilizado para medir actividad colagenolítica es DPN-Pro-Gli-Gli-Ile-Ala-Gli-Gli-D Arg-OH, que contiene la unión Gli-Ile que es el sitio de corte de la colagenasa tipo I; se usó de acuerdo a las indi-

caciones de Nagai (123). Se suspendió en Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.15 M,  $\text{CaCl}_2$  10 mM y 0.2% de albúmina bovina a una concentración final de  $5 \times 10^{-4}$  M. Se incubaron 50  $\mu\text{l}$  de péptido sintético con 50  $\mu\text{l}$  de precipitado 20-65 en presencia y ausencia de EDTA a una concentración final de 0.8 M, con PHMB a una concentración final de 0.1 M, PMSF 1 mM, NEM 0.12 M, DTT 0.012 M, y beta-mercaptoetanol a una concentración final de 1:100 vol:vol 20 horas a 37°C por duplicado. Al término de la incubación se detuvo la reacción agregando 0.25 ml de HCl 1.0 N.

A continuación se extrajeron los fragmentos del péptido con 1 ml de acetato de etilo/n-butanol 10:0.15 v/v, agitando vigorosamente por espacio de 30 segundos. Se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm y se midió la absorbancia de la fase orgánica a 365 nm. El coeficiente de extinción molar del péptido es de  $1.22 \times 10^{-3}$ .

#### IV RESULTADOS

##### i) Actividad colagenolítica de bazo humano sobre colágena endógena

Los resultado de esta primera serie de experimentos mostraron una actividad colagenolítica que alcanza un máximo a las 48 horas de incubación con un 4.43% de degradación, disminuyendo a un 3.66% a las 72 horas y manteniéndose a este nivel de degradación hasta las 120 horas de incubación (ver Gráfica 1) partiendo de 1935  $\mu\text{g}$  de colágena/ml de homogenado total, manteniéndose constante el resultado en los cuatro experimentos montados. Por lo tanto, la actividad colagenolítica sobre colágena endógena de bazo fue inhibible con EDTA, y alcanzó su máximo a las 48 horas de incubación (ver Figura 2, Tabla 5).

En una comunicación sobre actividad colagenolítica en granuloma de carragenina, Figueras (116) encontró que al aumentar la concentración de calcio en el sistema de incubación aumentaba la actividad, por lo que también se probó la actividad colagenolítica sobre colágena endógena con 10 mM, 20 mM y 30 mM y se encontró que el máximo de actividad ocurre a 20 mM de  $\text{CaCl}_2$ , disminuyendo cuando se llega a 30 mM de  $\text{CaCl}_2$  (Figura 3, Tabla 6). El máximo de actividad apareció a las 48 horas y se mantiene las 72 horas el mismo patrón con respecto al tiempo de incubación que el primer experimento donde se incubó a 5 mM de  $\text{CaCl}_2$  (Fig. 2 Tabla 5), por lo que la siguiente serie de experimentos se realizó a ésta concentración de calcio. Para ver si la actividad colagenolítica obtenida a través de ultrafiltración se incrementa, se comparó con la separación por simple centrifugación a alta velocidad, precipitación con TCA y

dioxano-metanol, (ver métodos) encontrándose que la actividad es más aparente por centrifugación a alta velocidad a las 48 horas y con precipitación con dioxano-metanol a las 72 horas, sin que la actividad medida fuera mayor a pesar de haber incubado con 20 mM de  $\text{CaCl}_2$  porque se preparó homogenado de un nuevo bazo y la adición de EDTA a una concentración 8 veces mayor no inhibió completamente la actividad colagenolítica en este experimento (Figura 4, Tabla 7).

ii) Actividad colagenolítica de bazo humano sobre colágena exógena

Se purificó parcialmente el homogenado de bazo humano a través de precipitaciones con sulfato de amonio (ver Métodos) hasta obtener una fracción llamada 20-65 que contiene 16-17  $\mu\text{g}$  de proteína/ml que se probó con colágena  $^3\text{H}$ . Estos experimentos mostraron un máximo de degradación a las 24 horas con un porcentaje de 37.14, decreciendo a las 48 horas a un 16.04% y permaneciendo constante a las 72, 96 y 120 horas, observándose en gel de acrilamida el efecto de inhibición de actividad por EDTA en todos los tiempos de incubación (Tabla 8, Fig. 5 y 6). La actividad sobre colágena exógena resultó mayor que con colágena endógena. El máximo de actividad que se obtuvo a las 24 horas no es efecto de la autodegradación de la colágena por el tiempo de incubación, ya que incubamos la colágena sola 24, 48, 72, 96 y 120 horas y no observamos degradación en ningún tiempo determinada por electroforésis en poli acrilamida con SDS y fluorografía (ver métodos).

La fracción 20-65 se incubó con colágena  $^3\text{H}$ , en presencia de activadores e inhibidores de proteasas como PMB, NEM, PMSF, DTT y beta-mercaptoetanol 24 horas, determinada por electroforésis en poli acrilamida con SDS y observamos que en presencia de PMB, DTT y beta-mer-

captoetanol hay pérdida de nitidez y presencia de las bandas 1 y 2 a diferencia de NEM y PMSF, que permanecen sin cambio (Figura 7).

Con respecto al porcentaje de degradación a través de cuentas observamos que la colágena sola incubada 24 horas con la fracción 20-65 presentó 16.25%; en presencia de PMB, 21.33%; con PMSF y NEM, 0%; con DTT, 10.52% y con beta mercaptoetanol, 13.07% (Tabla 9). Observamos que el PMB, DTT y betamer-captoetanol incrementa la actividad y el PMSF y NEM la inhiben. Cuando se incubó con tripsina o con inhibidor de tripsina observamos una disminución de la actividad colagenolítica (Tabla 10, Figura 8) y a través de fluorografía encontramos que la actividad medida está compuesta de 2 partes, una que corresponde a una proteasa de serina que degrada los fragmentos de colágena y que es inhibida por el inhibidor de tripsina y la otra que corresponde muy probablemente a una colagenasa (Figura 9).

iii) Actividad colagenolítica sobre el péptido sintético DNP-Pro-Gli-Gli-Ile-Ala-Gli-D de la fracción 20-65 en presencia de inhibidores y activadores de proteasas.

Cuando se incubó la fracción 20-65 con el péptido sintético no encontramos actividad, ni en presencia de PMB, NEM, DTT y beta mercaptoetanol a diferencia de un 29.09% de actividad cuando se incubó con PMSF (Tabla 11).

T A B L A 5

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA DE BAZO HUMANO SOBRE COLAGENA  
ENDOGENA A 5mM DE CaCl<sub>2</sub>

	<u>PORCIENTO DE DEGRADACION</u>
T0	0.92
24 horas	2.88
48 horas	4.43
72 horas	3.66
96 horas	3.70
120 horas	3.99

n = 4

Bazo No. 1

Incubación de homogenado total de bazo humano a 37°C a diferentes tiempos, referido a la colágena total del homogenado sin incubar.



TABLA 6

TANTO POR CIENTO DE DEGRADACION CON RESPECTO A LA COLAGENA TOTAL EN  
FILTRADOS POR XM100 DE HOMOGENADOS DE BAZO HUMANO A DIFERENTES  
CONCENTRACIONES DE CALCIO

	<u>5mM</u>	<u>10mM</u>	<u>20mM</u>	<u>30mM</u>
To	1.85	1.06	1.95	1.60
24 horas	2.73	2.72	2.82	9.04
48 horas	9.40	11.11	19.45	8.35
72 horas	11.75	8.86	33.36	3.77

---

Homog - (homog + EDTA) referido al 100% de colágena del homogenado sin incubar

n = 4

Bazo No. 1

TABLA 7

TANTO POR CIENTO DE DEGRADACION CON RESPECTO A LA COLAGENA TOTAL EN  
EL SOBRENADANTE Y FILTRADO POR XM100, PRECIPITADO CON TCA, DIOXANO-  
METANOL Y CENTRIFUGACION DE HOMOGENADO DE BAZO HUMANO A 20mM DE CaCl<sub>2</sub>

	<u>filtrado XM100</u>	<u>SN del centrifugado</u>	<u>SN del proceso TCA</u>	<u>SN del proceso con Dioxano-Metanol</u>
To	0.76	3.75	1.81	2.28
24 horas	2.12	4.15	3.45	3.94
48 horas	3.25	4.52	3.94	4.35
72 horas	3.31	5.29	5.32	5.92

n = 2

Bazo No. 2

La colágena total se refiere a la colágena en el homogenado sin incubar.  
No se toma en cuenta las fracciones incubadas con EDTA, por que no inhibió.

TABLA 8

INCUBACION DE LA FRACCION 20-65 CON COLAGENA  $^3\text{H}$

TIEMPO DE INCUBACION	CUENTAS	% DE COLAGENA DEGRADADA.	$\mu\text{G}$ COLAGENA DEGRADADA.
To	350	1.72	0
24 horas	3 719	18.28	3.89
48 horas	3 571	17.56	3.74
72 horas	3 262	16.04	3.42
96 horas	4 044	19.88	4.24
120 horas	3 696	18.20	3.88

$$[(20-65) + (\text{Clg } ^3\text{H})] - [(20-65) + (\text{Clg } ^3\text{H}) + (\text{EDTA})] - \text{To}$$

INCUBACION:

12.5  $\mu\text{l}$  F 20-65 + 12.5  $\mu\text{l}$  Clg  $^3\text{H}$

202.12  $\mu\text{g}$  prot. + 21.34  $\mu\text{g}$ . clg.

30°C

Cuentas totales de colágena 20 339 CPM

n=2

Bazo No. 3

TABLA 9

INCUBACION DE LA FRACCION 20-65 CON COLAGENA <sup>3</sup>H EN PRESENCIA  
DE ACTIVADORES E INHIBIDORES DE PROTEASAS

INCUBACION	CUENTAS POR MINUTO	PORCIENTO DE DEGRADACION	µG DE COLAGENA DEGRADADA
20-65 + EDTA	2 508	- -	- -
20-65 + Clg	3 255	16.25	3.45
20-65 + Clg + PMB	4 272	21.33	4.46
20-65 + Clg + PMSF	0	0	0
20-65 + Clg + NEM	0	0	0
20-65 + Clg + DTT	2 108	10.52	2.23
20-65 + Clg + beta-mercaptoetanol	2 168	13.07	2.74
Colágena Total	20 022	- -	- -

$$[(20-65) + (Clg \text{ } ^3H) + (Inh \text{ ó } Act.)] - [(20-65) + (Clg \text{ } ^3H) + (EDTA)]$$

n = 4

Bazo No. 3

TABLA 10

EFFECTO DE LA TRIPSINA Y EL INHIBIDOR  
DE TRIPSINA SOBRE LA FRACCION 20-65

INCUBACION	CUENTAS	% DE ACTIVIDAD	µG DE COLAGENA DEGRADADA
20-65 + Clg <sup>3</sup> H	3,401.60	10.75	3.57
20-65 + Clg <sup>3</sup> H + EDTA	427.60	0	0
20-65 + 5 µg Trip	1,571.60	3.02	0.49
20-65 + 10 µg Trip	2,145.60	5.48	2.25
20-65 + 20 µg Trip	3,194.60	9.88	3.35
20-65 + 10 µg Inh	1,627.60	3.26	1.71
20-65 + 25 µg Inh	1,904.60	4.43	2.00
20-65 + 40 µg Inh	2,609.60	7.40	2.74
20-65 + 60 µg Inh	2,584.60	7.30	2.71
20-65 + 100 µg Inh	2,344.60	6.28	2.46
20-65 + 5 µg Trip + 25 µg I	1,408.60	2.33	1.43
20-65 + 10 µg Trip + 50 µg I	1,484.60	2.66	1.56
20-65 + 20 µg T + 100 µg I	2,248.60	5.85	2.12
Cuentas Totales	23,680.60		24.85 µg Clg

$$((20-65) + (Clg^3H) + (T \& I) - (Clg^3H + EDTA))$$

n= 4

Bazo # 3

TABLA 11

ACTIVIDAD SOBRE EL PEPTIDO SINTETICO  
 DNP-Pro-Gli-Gli-Ile-Ala-Gli-Gli-D  
 DE LA FRACCION 20-65 EN PRESENCIA DE  
 INHIBIDORES Y ACTIVADORES DE PROTEASAS

---

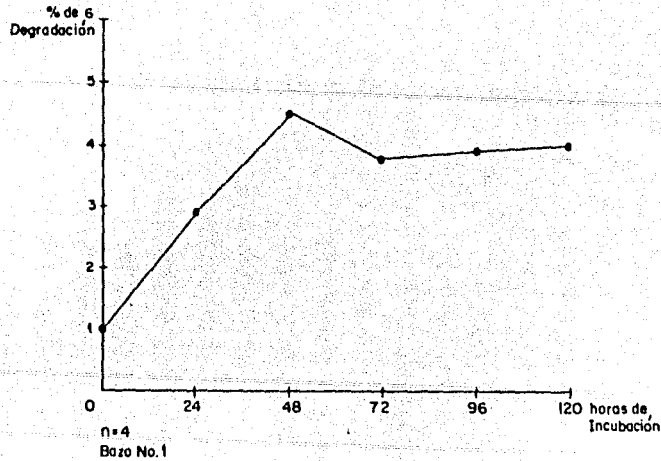
Incubación	% ACTIVIDAD
20-65 sola	0
20-65 + PMSF	29.09
20-65 + PMB	0
20-65 + NEM	0
20-65 + DTT	0
20-65 + Mercapto	0

(20.65 + Péptido) - (20-65 + Péptido + EDTA)

n=2

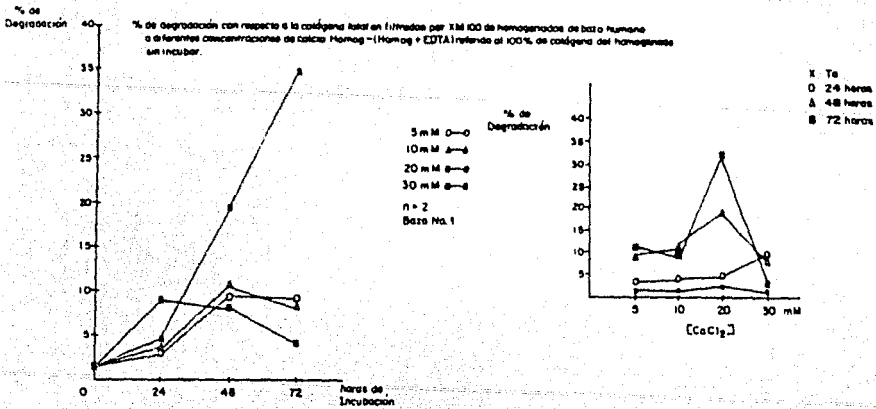
Bazo # 3

FIGURA No. 2



Actividad colagenolítica de bazo humano sobre colágena endógena a 5mM de  $\text{CaCl}_2$   
Incubación de homogenado total de bazo humano a 37°C a diferentes tiempos, referido a colágena total del homogenado sin incubar.

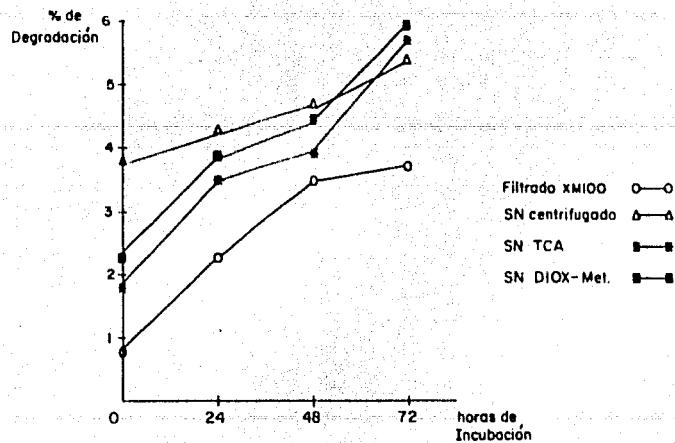
FIGURA No. 3



% de degradación con respecto a la colágena total en filtrados por XM100 de homogenizados de bazo humano a diferentes concentraciones de calcio Homog-(Homog + EDTA) referido al 100% de colágena del homogenizado sin incubarlo.

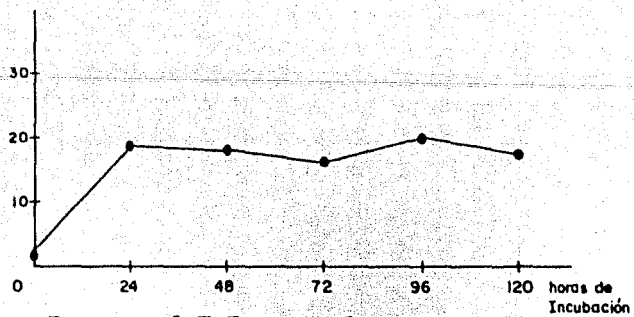


FIGURA No. 4



% de degradación con respecto a la colágena total en el sobrenadante y filtrado por XM100 de homogenado de bazo humano a 20 mM de  $\text{CaCl}_2$ .

FIGURA No. 5



$$\left[ (20-65) + (Cl_3^3H) \right] - \left[ (20-65) + (Cl_3^3H) + (EDTA) \right] T_0$$

30°C 24 horas.

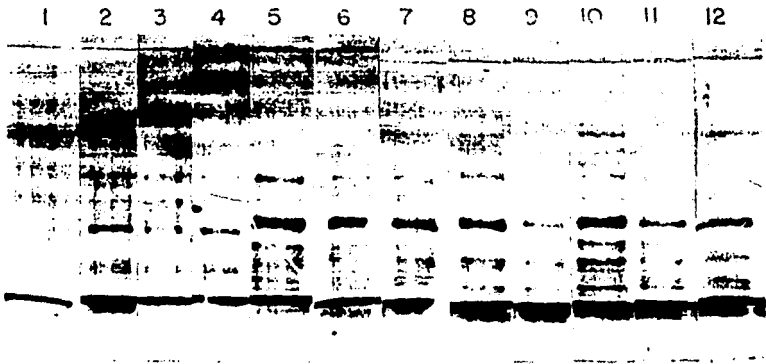
n = 2

Bazo No. 3

% de degradación de la colágena  $^3H$  incubada con la fracción  
20-65

FIGURA 6

GEL DE ACRILAMIDA-SDS AL 7% DE LA INCUBACION DE LA FRACCION  
20-65 Y SIN EDTA



Carriles:

- 1.- 40  $\mu$ l Clg<sup>3</sup>H
- 2.- To
- 3.- Incubación 24 horas
- 4.- Incubación 24 horas + EDTA
- 5.- Incubación 48 horas
- 6.- Incubación 48 horas + EDTA
- 7.- Incubación 72 horas
- 8.- Incubación 72 horas + EDTA
- 9.- Incubación 96 horas
- 10.- Incubación 96 horas + EDTA
- 11.- Incubación 120 horas
- 12.- Incubación 120 horas + EDTA

n = 2

Bazo No. 3

Incubación:

Fracción 20-65<sup>1</sup> Clg<sup>3</sup>H      Tris HCl pH 7.8  
12.5  $\mu$ l + 12.5  $\mu$ l +      12.5  $\mu$ l  
13.287  $\mu$ g de proteína por carril

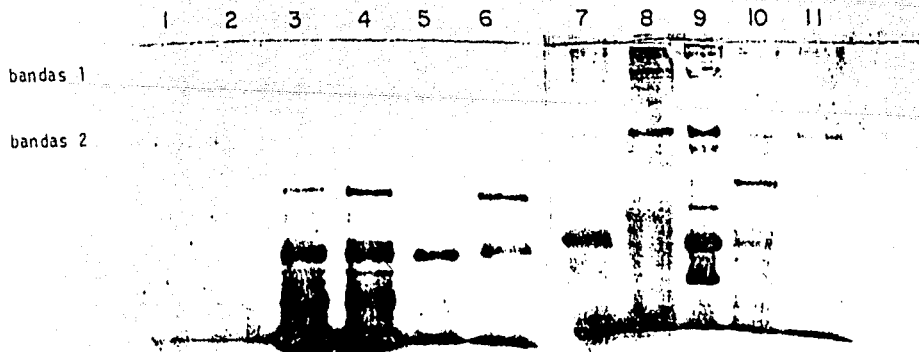
Electroforésis de la incubación a diferentes tiempos de la fracción 20-65 del homogenado de bazo humano en presencia y ausencia de EDTA.

FIGURA 7

GEL DE ACRILAMIDA -SDS AL 7% DE LA INCUBACION DE LA FRACCION 20-65 CON DIFERENTES ACTIVADORES

E INHIBIDORES DE PROTEASAS

MUESTRAS SIN HERVIR ANTES DE CORRERLAS



Carril: 3  
 1.- Clg<sup>3</sup>H sola  
 2.- Clg<sup>3</sup>H + EDTA  
 3.- 20-65 solo  
 4.- 20-65 + EDTA  
 5.- 20-65 + Clg<sup>3</sup>H  
 n = 4

Bazo No.3

Carril: 8  
 7.- 20-65 + PMB  
 8.- 20-65 + NEM  
 9.- 20-65 + PMSF  
 10.- 20-65 + DTT  
 11.- 20-65 + beta-  
 mercaptoetanol

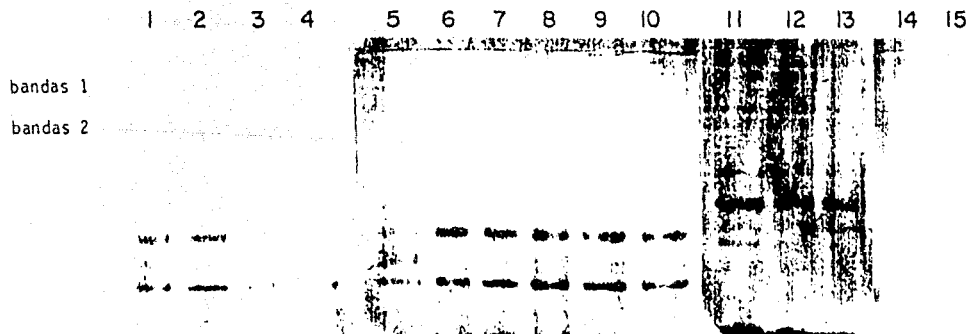
Incubación  
 20-65 + Clg<sup>3</sup>H + Inh/Act. Tris 7.8  
 12.5 μl 12.5 μl x 12.5 μl

Electroforésis en gels de acrilamida SDS al 7%.  
 Incubación de la fracción 20-65 con Clg<sup>3</sup>H en  
 presencia de inhibidores y activadores de protea-  
 sas a 30°C durante 24 horas.

FIGURA 3

EFFECTO DE LA TRIPSINA E INHIBIDOR DE TRIPSINA SOBRE LA FRACCION

20-65



Electroforésis en geles de Acrilamida -SDS al 7%. Activación de la fracción 20-65 de homogenado de bazo humano con tripsina ó Inhibidor de Tripsina e incubada con Clg<sup>3H</sup> 24 horas a 30°C

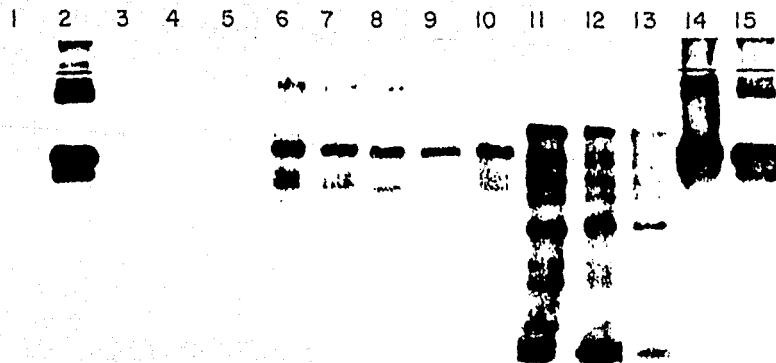
Carriles:

- |   |  |
|---|--|
| 1.- Clg <sup>3H</sup> + 20-65                           | 9.- Clg <sup>3H</sup> + 20-65 + 60 µg Inhibidor                    |
| 2.- Clg <sup>3H</sup> + 20-65 + EDTA                    | 10.- Clg <sup>3H</sup> + 20-65 + 100 µg Inhibidor                  |
| 3.- Clg <sup>3H</sup> + 20-65 + 5 µg Tripsina           | 11.- Clg <sup>3H</sup> + 20-65 + 5 µg Tripsina + 25 µg Inhibidor   |
| 4.- Clg <sup>3H</sup> + 20-65 + 10 µg Tripsina          | 12.- Clg <sup>3H</sup> + 20-65 + 10 µg Tripsina + 50 µg Inhibidor  |
| 5.- Clg <sup>3H</sup> + 20-65 + 20 µg Tripsina          | 13.- Clg <sup>3H</sup> + 20-65 + 20 µg Tripsina + 100 µg Inhibidor |
| 6.- Clg <sup>3H</sup> + 20-65 + 10 µg Inhibidor         | 14.- Clg <sup>3H</sup> sola  |
| 7.- Clg <sup>3H</sup> + 20-65 + 25 µg Inhibidor         | 15.- Clg <sup>3H</sup> + EDTA                                      |
| 8.- Clg <sup>3H</sup> + 20-65 + 20-65 + 40 µg Inhibidor |  |

n = 4  
Bazo # 3

FIGURA 9

EFFECTO DE LA TRIPSINA E INHIBIDOR DE TRIPSINA SOBRE LA  
FRACCION 20-65



Autorradiografía de la electroforesis en geles de acrilamida -SOS al 7% de la figura anterior

Carriles:

- |   |   |
|---|---|
| 1.- Clg $^3\text{H}$ + 20-65                              | 9.- Clg $^3\text{H}$ + 20-65 + 60 $\mu\text{g}$ Inhibidor                               |
| 2.- Clg $^3\text{H}$ + 20-65 + EDTA                       | 10.- Clg $^3\text{H}$ + 20-65 + 100 $\mu\text{g}$ Inhibidor                             |
| 3.- Clg $^3\text{H}$ + 20-65 + 5 $\mu\text{g}$ Tripsina   | 11.- Clg $^3\text{H}$ + 20-65 + 5 $\mu\text{g}$ Tripsina + 25 $\mu\text{g}$ Inhibidor   |
| 4.- Clg $^3\text{H}$ + 20-65 + 10 $\mu\text{g}$ Tripsina  | 12.- Clg $^3\text{H}$ + 20-65 + 10 $\mu\text{g}$ Tripsina + 50 $\mu\text{g}$ Inhibidor  |
| 5.- Clg $^3\text{H}$ + 20-65 + 20 $\mu\text{g}$ Tripsina  | 13.- Clg $^3\text{H}$ + 20-65 + 20 $\mu\text{g}$ Tripsina + 100 $\mu\text{g}$ Inhibidor |
| 6.- Clg $^3\text{H}$ + 20-65 + 10 $\mu\text{g}$ Inhibidor | 14.- Clg $^3\text{H}$ + sola  |
| 7.- Clg $^3\text{H}$ + 20-65 + 25 $\mu\text{g}$ Inhibidor | 15.- Clg $^3\text{H}$ + EDTA  |
| 8.- Clg $^3\text{H}$ + 20-65 + 40 $\mu\text{g}$ Inhibidor |   |

n = 4

Bazo # 3

## V DISCUSION

El bazo es un órgano parenquimatoso ampliamente estudiado desde el punto de vista inmunológico, pero se sabe poco de su actividad colagenolítica. La información concerniente a su actividad proteolítica se debe a Hedin (124) que en 1904 demostró en bazo de bovinos la presencia de proteinasas activas a pH alcalino. Lo Spalluto (125) en 1971 demostró en bazo humano la presencia de proteinasas neutrales activas en contra de hemoglobina e inmunoglobulinas con una actividad máxima a pH 7-8, parte de esta actividad mediada por proteasas de serina. Traskey & Barret, en 1976 demostraron que la actividad proteolítica de bazo humano a pH neutro estaba dada por dos proteasas de serina, una elastasa y otra catepsina G; y Ohlsson y Olsson en 1974 encontraron que la elastasa de bazo y de neutrófilos eran la misma proteína, así como la catepsina G de bazo y una enzima semejante a la quimiotripsina de polimorfonucleares; ambas enzimas hidrolizan hemoglobinas, fibrinógeno, caseína, azocaseína, colágena y proteoglicanos. Probablemente estas enzimas de bazo se originen de la población de neutrófilos presentes en este órgano (126).

La actividad colagenolítica que encontramos corresponde a 2 tipos de actividades, una inhibible con inhibidores de proteasas de serina como elastasa y Catepsina G, descrita por Rhodin (127) que solubiliza a la colágena probablemente para hacerla más accesible a las colagenasas, con mas preferencia sobre colágena tipo II aunque en el bazo humano los tipos de colágena presentes son I, y III (127, 128) y otra, una actividad colagenolítica inhibible por quelantes de calcio que muy

probablemente corresponda a una colagenasa.

Aunque queda demostrada la existencia de actividad colagenolítica en el bazo humano, debida muy posiblemente a una colagenasa, no podemos asegurar nada hasta que la tengamos más purificada que la fracción 20-65 por cromatografía ya que por membranas de ultrafiltración, centrifugación y precipitaciones esto no fue posible. En el laboratorio hemos observado la ineficiencia de estas membranas en la selectividad real de tamaños moleculares (112). Así como lograr que los patrones de inhibición de la actividad en presencia de quelantes de calcio (EDTA) sean muy constantes ya que en la primera y segunda serie de experimentos (Gráfica 2 y 3) los resultados parecen no reproducirse por la falta de inhibición del EDTA a pesar de haberlo usado a una concentración ocho veces mayor que la de calcio.

También es de interés el poder demostrar la estirpe celular del bazo productora de la enzima y de esta manera discernir la posibilidad de que provenga de polimorfonucleares. Esto solo representa el inicio de una serie de experimentos para conocer la actividad colagenolítica de este órgano y poderla comparar con la de otros tejidos sobre todo humanos en donde hay una gran cantidad de estados patológicos en la regulación del metabolismo de la colágena.



## VI CONCLUSIONES

- 1.- Existe actividad colagenolítica en los homogenados de bazo humano.
- 2.- Esta actividad es inhibible con quelantes de calcio como EDTA.
- 3.- La concentración óptima de calcio para la actividad colagenolítica es de 20 mM.
- 4.- Algunos inhibidores o activadores de proteasas como el PMSF, PMB, N-etilmaleimida, DTT y Beta-mercaptoetanol influyen en la actividad colagenolítica.
- 5.- La presencia de tripsina o de inhibidor de tripsina de frijol de soya en la incubación, inhiben una parte de la actividad, efecto de la presencia de proteasas de serina en la fracción 20-65.

VII BIBLIOGRAFIA

- 1.- Martín G.R., Timpl R., Muller P.K., Kihn K.: The genetically distinct collagens. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 10: 285-291, 1985.
- 2.- Piez K.A.: Symposium on Molecular and Cellular Biology. 1-19, 1987
- 3.- Thorgeirson U.P., Turpeenmiemi-Huganen T., Liotta L.A.: Cancer cells, components of basement membranes, and proteolytic enzymes. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 27: 203-234, 1985.
- 4.- Liotta, L.A., Kalebic T., Reesl CA., Mayne R.: Protease susceptibilities of HMW. 1X, 2 alfa, but not 3 alfa cartilage collagens and similar to type V collagen. *Biochem. Biophys Res. Comm.* 104: 500-506, 1982.
- 5.- Engl J., Furthmayr H., Dermatt E., Von Der Mark, H., Aumailley M., Fleischmajer R., Timpl R.: Structure and macromolecular organization of type VI collagen. *Annals New York Acadm Sci.* 460: 25-37, 1986.
- 6.- Sykes B.: The molecular genetics of collagen. *Bioessays* 3: 112-117, 1986.
- 7.- Grant M.E., Jackson D.S.: Essays in Biochem 12: 77-113, 1976.
- 8.- Kivirikko KI., Myllyla R.: in Piez K.A., Reddi A.H. (eds): Biosynthesis of the collagens. *Extr. Mat. Biochem. N.Y. Elsevier* 1984: 83-118, 1984.
- 9.- Davidson JM., Mc Eneany L.S.G., Bornstein P.: *Biochemistry* 14: 5188-5194.
- 10.- Seifter S., Harper E., *The Enzyme* 3: 649-97, 1971.

- 11.- Harris E.D., Krane S.M.: Collagenases. *N. Engl. J. Med.* 291: 557-563, 605-609, 652-661, 1974.
- 12.- Gross J.: Collagen biology: structure, degradation and disease Harvey Lect. 68: 351-432, 1974
- 13.- Woëssner J.F.: *Clin Orthop.* 96: 310-326, 1973.
- 14.- Pérez-Tamayo, R.: In molecular pathology of connective tissues. *Mol. Pathol. Conn. Tiss.* Ed. R. Pérez-Tamayo, M., Rojkind pp. 232-406, 1973.
- 15.- Nordwing A.: *Adv. Enzymol.* 34: 155-205, 1971.
- 16.- Gross J.: Aspects of the animal collagenases. *Biochem Coll.* Ed. C.W. Ramachandran AM., Redd. pp. 275-317, NY. Plenum pp. 536.
- 17.- Harris E.D. Jr., Cartwright E.: Inhibitor of human collagenase from human rheumatoid synovial cartilage. *Prot. Mamm. Col. Tiss.* pp. 825, 1977.
- 18.- Weiss J.B.: Enzymic degradation of collagen. *Int. Rev. Connect. Tiss. Res.* 7: 102-49, 1976.
- 19.- Kerl B.: *Mol. Cell. Biochem.* 23: 87-108, 1979.
- 20.- Pérez-Tamayo, R.: Pathology of collagen degradation. *Am. J. Pathol.* 92: 509-566, 1978.
- 21.- Grillo H.C., Gross J.: Collagenolytic activity during mammalian wound repair. *Dev. Biol.* 15: 300-317, 1957.
- 22.- Harper E.: Collagenases. *Ann. Rev. Bioch.* 49: 1063-1073, 1980.
- 23.- Pérez-Tamayo R.: Colagenasas de Mamíferos. *Rev. Invest. Clin.* 28: 279-300, 1976.
- 24.- Seifter S.: Harper E., Perlman GE., Lorand L. eds, *Enzymology Vol.*

- XIX N.Y. and London Academic Press. 1979, 613-635.
- 25.- Mandl I.: MacLenan J.D., Howes E.L., De Bellis R.H., Sholer A.:  
Isolation and characterization of proteinase and collagenase  
from clostridium histolyticum. J. Clin. Invest. 32: 1323, 1953.
- 26.- Emod I., Tong N.T., Keil B.: Chemical characterization of the  
homogenous collagenase from clostridium histolyticum. Biochim.  
Biophys. Acta. 659: 282-291, 1981.
- 27.- Gross J., Lapiere C.M.: Collagenolytic activity in amphibian tissues:  
a tissue culture assay.
- 28.- Hori H., Nagai Y.: Purification of tadpole collagenase and  
characterization using collagen and synthetic substrates. Bioc.  
Bioph. Acta. 566:211-221, 1979.
- 29.- Emod I., Tong N.T., Keil B.: Tadpole collagenase. Preparation and  
purification. Biochem. 5: 1966.
- 30.- Eisen AZ., Henderson KD., Jeffrey JJ., Bradshaw RA.: Human skin  
collagenase: relationship to pathogenesis of epidermolysis  
bullosa dystrophic. Biochem. 12: 1814-1822, 1973.
- 31.- Dresden M.H., Gross J.: Collagenolytic enzymes in human neoplasm.  
Dev. Biol. 22: 129-137, 1970.
- 32.- Mailman ML., Dresden MH.: Dev. Biol. 71: 60-70, 1979.
- 33.- Wolley DE., Tucker JS., Green G., Evanson J.M.: Small molecular  
weight beta-1 serum protein which specifically inhibits human  
collagenase. Bioch. J. 153: 119-1126, 1976.

- 34.- Sunda H., Nagai Y.: Mechanism of collagen degradation by collagenase: a transition process of the collagen molecule from collagenase-substrate to gelatinase-substrate. *Biomed. Res.* 4: 61-70, 1983.
- 35.- Highberger JH., Corbett C., Gross J.: Amino acid sequence of chick skin alfa 1 (I)-C88 and the complete primary structure, of the helical portion of chick skin collagen alfa 1(I) chain. *Biochem.* 21: 2084-2055, 1982.
- 36.- Brow RA., Hukins DWL., Weiss JB.: *Bioch. Biophys Res. Comm.* 74: 1102-1108, 1977
- 37.- Liotta LA., Abe S., Robey PG., Martin GR.: Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76: 2268-2272, 1979.
- 38.- Weingarten H., Feder J.: Cleavage site specificity of vertebrate collagenases. *Biochem. Biop. Res. Comm.* 139: 1184-1187, 1986.
- 39.- Bruns RR., Gross J.: *Biochemistry* 12: 808-815, 1973.
- 40.- Gross J., Harper E., Harris EDJ., Croskery P., Highberger JH., Corbett C., Kang AH.: Collagen biology: structure, degradation and disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61: 605-612, 1974.
- 41.- Miller EJ.: *Biochem* 11: 4903-4909, 1972.
- 42.- Harris E.D.J., McCroskery PA., Miller EJ., Butler WT.: Isolation and characterization of a collagen from chick cartilage containing three identical alpha chains. *Scand. J. Rheumatol.* 4: Suppl. 8. p. 1501 1976.
- 43.- Miller EJ., Harris ED Jr., Chung E., Finch JE.Jr. McCroskery PA., Butler W.T.: Biochemical characteristics and biological significance

- of the genetically distinct collagens. *Biochem.* 15: 787-792, 1976.
- 44.- McCroskery PA., Richards JF., Harris ED.Jr.: Purification and characterization of a collagenase extracted from rabbit tumours. *Biochem. J.* 152: 131-142, 1975.
- 45.- Miller E.J., Finch J.E., Chung E., Butler W.T., Robertson P.B.: *Arch. Biochem. Biophys.* 173: 631-637, 1976.
- 46.- Harper E., Bach KJ., Gross J.: The zymogen of tadpole collagenase. *Biochem.* 10: 3035-3041, 1971.
- 47.- Harper E., Gross J.: Collagenase, procollagenase and activator relationship in tadpole tissue cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48: 1147-1152, 1972.
- 48.- Woessner JF.: A latent form of collagenase in the involuting rat uterus and its activation by a serine proteinase. *Bioch. J.* 161: 535-542, 1977.
- 49.- Birkedal-Hanssen H., Cobb CM., Taylor RE., Fulimer HM.: Activation of fibroblast procollagenase by mast cell proteases. *J. Biol. Chem.* 251: 3162-3168, 1976.
- 50.- Ecckhout Y., Vaes G.: Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. *Biochem J.* 166: 21-31, 1977.
- 51.- Rajabi M., Dean D.D., Woessner J.F.: Serum collagenase activity in pregnant, parturient, and postpartum women. *Obst. Gyn.* 69: 179-186, 1987.

- 52.- Wize J., Irena S., Wojtecka Lukasik E., Ksiezny S., Dancewicz AM.:  
Isolation purification and properties of a factor from rheumatoid  
synovial fluid activating the latent forms of collagenolytic  
enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 370: 510-523, 1974.
- 53.- Pérez-Tamayo, R.: Collagen resorption in carragenin granulomas I.  
Collagenolytic activity in in vitro explants. *Lab. Invest.* 22:  
137, 1970.
- 54.- Harris E.D.Jr., Krane S.M.: Effects of colchicine on collagenase in  
cultures of rheumatoid synovium. *Arthr. Rheumat.* 14: 669, 1971.
- 55.- Hasselbacher P., Hanover NH.: Stimulation of synovial fibroblasts  
by calcium oxalate and monosodium urate monohydrate. *J. Lab. Clin.  
Med.* 100: 977-985, 1982.
- 56.- Al-Haik N., Lewis D.A. Struthers G.: Neutral protease, collagenase  
and elastase activities in synovial fluids from arthritic patients.  
*Agents. Act.* 15: 1984.
- 57.- Harris E.D.Jr.: A collagenolytic system produced by primary cultures  
of rheumatoid nodule tissue. *J. Clin. Invest.* 51: 2973, 1972.
- 58.- Werb Z., Gordon S.: Secretion of a specific collagenase by stimulated  
macrophages. *J. Cell. Biol.* 67: 452, 1975.
- 59.- Harris E.D. Jr. Reynolds J.J. Werb Z.: Cytochalasin-B increases  
collagenase production by cells in vitro. *Nature* 257: 227, 1975.
- 60.- Hook RM., Hork CW., Brown SL.: Fibroblast collagenase; partial  
purification and characterization. *Invest. Ophthalmol* 12: 711,  
1973.

- 61.- Davis B.P., Jeffrey J.J., Eisen A.Z., Derby A.: Introduction of collagenase by thyroxina in resorbing tadpole tailfin in vitro. *Develop. Biol.* 44: 271, 1975.
- 62.- Harper E., Toole B.P.: Collagenase and hyaluronidase stimulation by dibutyryl adenosine cyclic 3-5 monophosphate. *J. Biol. Chem.* 248: 2625, 1973.
- 63.- Berman M.B., Cavanagli H.D., Gage J.: Regulation of collagenase activity in ulcerating cornea by cyclic-AMP. *Exp. Eye. Res.* 22: 209, 1976.
- 64.- Sakamoto S., Goldhaber P., Glimcher M.J.: Mouse bone collagenase the effect of heparin on the amount of enzyme released in tissue culture and on the activity of the enzyme. *Calif. Tissue. Res.* 12: 247, 1973.
- 65.- Hausmann E., Raisz L.G., Miller W.A.: Endotoxin:stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science* 168: 862, 1970.
- 66.- Wahl L.M., Wahl S.M., Hengerhagen S.E., Martin G.R.: Collagenase production by endotoxin-activated macrophages. *PNAS USA* 71: 3598, 1975.
- 67.- Wahl L.M., Wahl S.M., Hengerhagen S.E., Martin G.R.: Collagenase production by lymphokine activated macrophages. *Science.* 187: 261, 1975.
- 68.- Eisenberg M., Johnson L., Monn K.E.: Serine proteinase activation of latent human skin collagenase. *Bioch. Bioph. Res. Commun.* 125: 279-285, 1984.
- 69.- Burkhardt H., Hartmann F., Schwingel M.L.: Activation of a latent collagenase from polymorphonuclear leukocytes by oxygen radicals. *Enzyme.* 36: 221-231, 1986.



- 70.- Stricklin GP., Jeffrey JJ., Roswit W.T., Eisen AZ.: Human skin fibroblast procollagenase: Mechanisms of activation by organomercurials and trypsin. *Biochemistry* 22: 61-63, 1983.
- 71.- McCartney HW., Tschesque H.: Sulfhydryl reacting groups activates collagenase. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361: 298-299, 1980.
- 72.- Weiss J.J., Peppin G., Ortiz X., Ragsdale C., Test ST.: *Science* 227: 747-749, 1985.
- 73.- Tschesche H., McCartney HW.: A new principle of regulation of enzymic activity. *Eur. J. Biochem.* 120: 183-190, 1981.
- 74.- Sellers A., Cartwright E., Murphy G., Reynolds J.: Evidence that latent collagenase are enzyme inhibitor complexes. *Biochem J.* 163: 303-307, 1987.
- 75.- Stricklin GP., Bauer EA., Jeffrey JJ., Eisen AZ.: Human skin collagenase: Isolation of precursor and active forms from both fibroblast and organ cultures. *Biochem* 16: 1607-1615, 1977.
- 76.- Welgus HG., Bauer E.A., Stricklin GP.: Elevated levels of human collagenase inhibitor in blister fluids of diverse etiology. *J. Invest. Dermatol.* 87: 592-596, 1986.
- 77.- Aggeler J., Engvalle E., Werb Z.: An irreversible tissue inhibitor of collagenase in human amniotic fluid: characterization and separation from fibronectin. *Bioc. and Bioph. Res. Commun.* 100: 1195-1201, 1981.
- 78.- Kuettnner KE., Hiti J., Eisenstein R., Harper E.: Collagenase inhibition by cationic proteins derived from cartilage and aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72: 40-46, 1976.

- 79.- Kuettner KE., Soble L., Croxen RL., Marczynska B., Hitti J., Harper E.: Tumor cell collagenase and its inhibition by a cartilage derived protease inhibitor. *Science* 196: 653-654, 1977.
- 80.- Hiti-Harper J., Wohl H., Harper E.: Platelet factor 4 an inhibitor of collagenase. *Science* 199: 991-992, 1978.
- 81.- Cooper TW., Eisen AZ., Stricklin PG., Welgus HG.: Platelet derived collagenase inhibitor: Characterization and subcellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 2779-2783, 1985.
- 82.- Rucinski B., Hiewiarowski S., James P., Walz DA., Budzynsky AZ.: *Blood* 53: 47-62, 1979.
- 83.- Eechout Y., Vaes G.: Activation of the inactive precursor of collagenase by kallikrein and plasmin. *Febs. Lett.* 28: 198, 1972.
- 84.- Bauer E.A., Stricklin GP., Jeffrey, JJ., Isen AZ.: Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 64: 232-240, 1975.
- 85.- Birkedal-Hansen H., Cobb CM., Taylor RE.: Activation of fibroblast procollagenase by mast cell proteases. *Bioch Bioph. A.* 433: 273-286, 1976.
- 86.- Horwitz AL., Kellman JA.: Activation of alveolar macrophage collagenase by a neutral protease secreted by the same cell. *Nature* 264: 772, 1976.
- 87.- Birkedal-Hasen H., Cobb CM., Taylor R., Fulmer HM.: Trypsin activation of latent collagenase from several mammalian sources. *Scand J. Dent. Res.* 83: 302, 1975.
- 88.- Weiss J., Hill CR., McLaughlin B.: Activation of a procollagenase by

- low-molecular weight-angiogenesis factor. *Bioscience Rep.* 3: 171, 1983.
- 89.- Ehrlich M.G., Martin H.J., Jones H.: Collagenase and collagenase inhibitors in osteoarthritic and normal human cartilage. *J. Clin. Invest.* 59: 226, 1977.
- 90.- Nagai Y., Kawamoto T.: A regulation mechanism of collagenase activity in vitro and in vivo. In Burleigh MC Poole HR. Eds. Elsevier North Holland Amsterdam pp. 171., 1975.
- 91.- Vater CA., Mainardi C.L., Harris ED.: Activation in vitro of rheumatoid synovial collagenase from cell cultures. *J. Clin. Invest.* 62: 987, 1978.
- 92.- Uitto VJ., Turto H., Huttunen A., Lindky S., Uitto J.: Activation of human leukocyte collagenase by compounds reacting with sulphhydryl groups. *Bioch. Bioph. A.* 613: 618, 1980.
- 93.- McCartney HW., Tschesche H.: Latent collagenase from human polymorphonuclear leucocytes and activation to collagenase by removal of an inhibitor. *Febs Lett.* 119: 327, 1980.
- 94.- Web M., Magelschmidt M., Struck H.: Relaxin and collagen metabolism. *Horm. Metab. Res.* 11: 403, 1979.
- 95.- Wooley D.E., Roberts D.R., Evanson J.M.: Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 66: 747-754, 1975.
- 96.- Harper E.: Collagenases. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 1063, 1980.
- 97.- Werb Z., Burleigh MC., Barrett A.J., Starkey P.M.: A specific collagenase from rabbit fibroblast in monolayer culture. *Biochem J.* 139: 359-368, 1974.

- 93.- Welgus HG., Stricklin G.P., Eisen AZ., Bauer EA., Jeffrey JJ.: The collagen substrate specificity of human skin fibroblast collagenase. Clin. Res. 26: 489A, 1981.
- 99.- Shinkai H., Kawamote T., Hori H., Nagai Y.: A complex of collagenase with low molecular weight inhibitor in the culture medium of embrionic chick skin explants. J. Biochem. 81: 261-263, 1977.
- 100.- Murphy C., Cartwright EC., Sellers A., Reynolds J.J.: Metalloproteinases from rabbit bone culture medium degrade types IV and V collagens, laminin and fibronectin. Biochem. Biophys. Acta. 483: 493-498, 1981.
- 101.- Ishibashi M., Ito A., Sakyo K., Yori Y.: Procollagenase activator produced by rabbit uterine cervical fibroblasts. Biochem J. 241: 527-534, 1987.
- 102.- McCroskery PA., Richards JF., Harris CD.: Purification and characterization of a collagenase extracted from rabbit tumours. Biochem. J. 152: 133-142, 1975.
- 103.- Vater C.A., Mainardi C.L., Harris E.D.: Inhibitor of human collagenase from human tendon. J. Biol. Chem. 254: 3045-3053, 1979.
- 104.- Nolan J.C., Ridge S., Oronsky AL., Slakey L.L., Kerwar S.S.: Further characterization of the impaired bactericidal function of granulocytes in patients with poorly controlled diabetes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 83: 1183-1190, 1978.
- 105.- Berman MB., Cavanagh D.H., Gagf J.: Regulation of collagenase. Exp. Eye Res. 22: 209-218, 1978.
- 106.- Koob J.J., Jeffrey J.J.: Hormonal regulation of collagen degradation in the uterus inhibition of collagenase expression by progesterone and a cyclic AMP. Biochim. Biophys. Acta. 354: 61-70, 1974.

- 107.- Ryan J.H., Woessner J.F.: Oestradiol inhibition of collagenase role in uterine involution. *Nature* 248: 526-528, 1974.
- 108.- Woessner J.F.: A latent form of collagenase in the involuting rat uterus and its activation by a serine proteinase. *J. Endocrinol.* 70: 197-198, 1977.
- 109.- Murdoch W.J., Peterson T.A., Van Kirk E.A., Viment D.L., Inskoop E.K.: Interactive roles of progesterone, prostaglandins and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biol. Rep.* 35: 1187-1194, 1986.
- 110.- Wojtecka Lukasik E., Dancewicz A.M.: *Biochem Pharmacol.* 23: 2077-2081, 1974.
- 111.- Harris E.D.: Regulation of the mammalian collagenase. *Coll. Rel. Res.* 4: 493-512, 1984.
- 112.- Vadillo Ortega F.: *Colagenasa de Riñón. Tesis para obtener el grado de Maestría. U.N.A.M. 1986.*
- 113.- Sakamoto S., Sakamoto N., Golhaber P., Glimcher M.: The inhibition of mouse bone collagenase by lysosime. *Calcif. Tiss. Res.* 14: 291, 1974.
- 114.- Pardo A., Soto H., Montfort I., y Pérez-Tamayo R.: Collagen-bound collagenase. *Cann. Tiss. Res.* 7-37, 253-261, 1980.
- 115.- Pérez-Tamayo R., Montfort I., Pardo A.: Whats controls collagen resorption in vivo?. *Med. Hypoth.* 6: 711-726, 1980.
- 116.- Figueras T.: *Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias. U.N.A.M. Biosíntesis y Degradación de Colágena en granuloma de carragenina. 1985.*

- 117.- Rojkind M., González E.: An improved method for determining specific radioactive of proline  $^{14}\text{C}$  and hidroxiprolina  $^{14}\text{C}$  in collagen and in noncollagenous proteins. *Anal. Bioch.* 57: 1974.
- 113.- Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265, 1951.
- 119.- Muller E., Rhodes RK.: Preparation and characterization of the different types of collagen. *Meth. Enzym.* 82: 33, 1982.
- 120.- Lefevre MF., Slegers GA., Claeys AE.: Evaluation of a rapid sensitive and specific assay for the determination of sensitive and specific assay for the determination of collagenolytic activity in biological samples. *Clin. Chim. Acta.* 92: 167, 1979.
- 121.- Laemli VK.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* 227: 680, 1970.
- 122.- Sellers A., Reynolds J.J.: Identification and partial characterization of collagenase from rabbit bone. *Biochem J.* 167: 353-360, 1977.
- 123.- Kobayashi S., Nagai Y.: Human leucocyte neutral proteases with special reference to collagen metabolism. *J. Biochem.* 84: 559, 1978.
- 124.- Hedin S.G. (1904) *J. Physiol* 30, 155-175.
- 125.- Lo Spalluto, J., Fehr K., Zih M. (1971) in *Tissue Proteinases*, (Barrett, A.J. & Dingle I.T., Eds.) pp. 263-289, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- 126.- Barret A.J. Editor: *Proteinases in Mammalian cells and tissues*. Research monographs in cell and tissue physiology 2. General

Editor J.T. Dingle. North-Holland Publishing Company. pp. 57-89  
Capt. 1, 1977.

127.- Rhodin J.A.G.: Connective tissue, in: Histology ed. by Rhodin. J.A.  
G. Oxford Univ. Press. New York, 1974 pp. 140-171.

128.- Snodgrass M.J.: Ultrastructural distinction between reticular and  
collagenous fibers with an ammoniacal silver stain. Anat. Rec.  
1987: 191-206, 1977.