



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

## PURIFICACION DE COLAGENASA DE MAMIFERO

T E S I S

Que para obtener el título de:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
ORIENTACION BIQUÍMICO MICROBIOLÓGICO

p r e s e n t a :

HORTENSIA SOTO TREJO



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

LAB *Tesis 1977*

LIBRO \_\_\_\_\_

FECHA \_\_\_\_\_

REC \_\_\_\_\_ 0

\_\_\_\_\_

379



JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Victoria Valles Bourges
Vocal	Q.F.B. Magdalena Oliva González
Secretario	Dr. Ruy Pérez Tamayo
1er. Suplente	M.enC. Ma. Dolores Lastra A.
2º Suplente	Dra. Beatriz Medina Jiménez

SITIO DONDE SE DESARROLLO LA TESIS

Instituto Nacional de la Nutricion

Sustentante	Hortensia Soto Trejo <u>Hortensia Soto T.</u>
Asesor del Tema	Dr. Ruy Pérez Tamayo <u>Ruy Pérez Tamayo</u>

A LA MEMORIA DE MI PADRE

A MI MADRE

A MIS HERMANOS

Mis más sinceras gracias al Dr. Ruy Pérez Tamayo por la dirección de este trabajo y las enseñanzas recibidas durante el mismo.

También quiero agradecer a la Dra. Irmgard Montfort, a la Dra. Annie Pardo, al Sr. Eusebio Tello y a mis compañeros de laboratorio su colaboración y ayuda.

## CONTENIDO

INTRODUCCION .....	1 - 11
MATERIAL Y METODOS .....	12 - 23
I Fuente de la Colagenasa.	
II Obtención de la Enzima.	
III Prueba de Actividad Colagenolítica.	
IV Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.	
V Susceptibilidad a Proteasas.	
VI Análisis del Sistema de Electroforesis.	
VII La Colagenasa Responsable de la Degradación de la Colágena.	
RESULTADOS .....	24 - 28
I Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.	
II Susceptibilidad a Proteasas.	
III Análisis del Sistema de Electroforesis.	
IV La Colagenasa Responsable de la Degradación de la Colágena.	
RESUMEN DE RESULTADOS .....	29 - 31
I Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.	
II Susceptibilidad a Proteasas.	
III Análisis del Sistema de Electroforesis.	
IV La Colagenasa Responsable de la Degradación de la Colágena.	

CONCLUSIONES .....	32 - 33
DISCUSION .....	34 - 40
REFERENCIAS .....	41 - 47



## INTRODUCCION

La colágena es la proteína más abundante en los mamíferos (1) y el constituyente principal del tejido conectivo. En su estado nativo es altamente resistente a la digestión por proteasas no específicas; sin embargo, la colágena puede ser degradada por un grupo específico de enzimas llamadas colagenasas.

En 1962 Gross y Lapiere (2) mostraron la existencia de la primera colagenasa animal en la cola de renacuajo, por medio de la técnica de explantes de tejido. Este descubrimiento tuvo como base los estudios realizados por Harkness (3) quien mostró que durante los primeros días del parto, la vida media de la colágena del útero era aproximadamente 25 horas contra la vida media de 40 días bajo condiciones basales (4); esto indicaba que bajo condiciones fisiológicas existe una rápida reabsorción de la mayoría de colágena depositada en el útero durante la gestación, (5-7).

La abundancia de enzimas colagenolíticas tanto filogenéticamente como anatómicamente, sugiere que estas proteínas no tienen un origen celular único. Diferentes tipos de células pueden sintetizar y liberar colagenasa; aunque Eisen y Gross (8) demostraron que sólo células epiteliales de cola de renacuajo producían colagenasa, las colagenasas animales tienen un origen epitelial o mesenquimatoso y algunas poseen ambos como en heridas de piel humana (9), en cía humana (10), colesteatoma humano (11), conejo (12) y heridas -

de piel de cobayo (13). De origen exclusivamente epitelial (14-16) puede ser mencionada la colagenasa corneal y de origen exclusivamente mesenquimatoso la colagenasa sinovial (17-20), de granulocitos (21, 22) y la de hueso (23-26).

La colagenasa es una enzima que se encuentra en el espacio extracelular, como lo indican los estudios inmunohistoquímicos de Reddick y col. en piel humana (27) y de Montfort y Pérez Tamayo en tejido de rata normal (28) y útero de rata postparto en involución (29).

Se ha reportado un amplio intervalo de pesos moleculares para las colagenasas animales, que varía de 24000 daltones para la colagenasa de fluido sinovial reumatoide humano (20) (Harris y col. 1969) a 158000 daltones para la colagenasa de cornea de conejo (30) (Hook y col. 1972) (ver la tabla No. 1).

Parece ser que todas las colagenasas animales actúan de manera semejante a pH y temperatura fisiológicas y todas requieren  $\text{Ca}^{++}$  para su actividad. Son inhibidas por EDTA, siendo esta inhibición reversible para algunos casos; la cisteína inhibe todas las colagenasas exceptuando a tres de ellas, que son la de útero de rata, la de epitelio de piel de conejo y la de hepatopáncreas de cangrejo (44); de todas las colagenasas descritas sólo dos no son inhibidas por suero, la de granulocitos y la colagenasa A del líquido sinovial en la artritis reumatoide (45).

<u>FUENTE DE LA ENZIMA</u>	<u>PESO MOLECULAR</u>	<u>METODO</u>	<u>REF/</u>
1 Piel de renacuajo	104000 - 110000	Electroforesis en gel	31, 32
2. Piel de renacuajo	40000 - 43000	Filtración en gel	33, 34
3. Hueso de ratón	84000	Filtración en gel	35
4. Hueso de ratón	41000		36
5. Córnea de conejo	65000 y 150000	Filtración en gel	30
6. Encía humana	41000	Filtración en gel	37
7. Líquido sinovial reu matoide humano	24000 - 25000 y 48000 - 50000	Filtración en gel	38
8. Carcinoma epidermoide	32000	Filtración en gel	39
9. Tumores de conejo	33000 - 35000	Electroforesis en gel	40
10. Hueso de cobayo	137000, 29000	Cromatografía en gel	41
11. Granulocitos humanos	76000	Filtración en gel	42
12. Macrófagos alveolares de conejo	165000, 45000 y 85000	Filtración en gel	43

Tabla No. 1 PESOS MOLECULARES DE COLAGENASAS.

El sustrato colágena nativa o desnaturalizada (46) es atacado en un sólo punto, a un cuarto de la longitud del extremo carboxi terminal. El resultado de la acción enzimática es que la tropocolágena (TC) es cortada en dos fragmentos, TC<sup>A</sup> y TC<sup>B</sup>, el primero tiene una longitud que corresponde al 75 % de la longitud total de la molécula y el segundo tiene el 25 % restante (47). Se piensa que este rompimiento lleva a la rápida desnaturalización de los productos de reacción a temperatura fisiológica (47) y que los productos desnaturalizados son degradados por otras enzimas proteolíticas (48).

Existen varias técnicas para determinar la actividad colagenolítica. (ver tabla No. 2). Debido a que la colágena desnaturalizada es susceptible al ataque por proteasas (49), distintas a la colagenasa, es necesario utilizar colágena nativa como sustrato en las pruebas de actividad. Es importante que la prueba se efectúe bajo condiciones estrictamente fisiológicas, la razón para este requerimiento es que el sustrato nativo sufre desnaturalización durante la prueba si ésta no es llevada a cabo a pH neutro, a temperatura debajo del punto de desnaturalización y en ausencia de una fuerza iónica alta u otros agentes desnaturalizantes (50).

Dos mecanismos han sido propuestos para la regulación in vivo de la actividad de la colagenasa: a) Conversión de proenzima inactiva (procolagenasa) a forma activa (Harper and Gross, 1972) - (32), b) Inhibición de la colagenasa por componentes del suero (Ei

---

P R U E B A

S I G N I F I C A D O

COLAGENA EN SOLUCION

- |  |  |
|--|--|
| 1. Viscosimetría                                       | Cambios en la longitud y contenido helicoidal del monómero tropocolágena.      |
| 2. Rotación optica                                     | Cambios en el contenido helicoidal del monómero tropocolágena.                 |
| 3. Curva de desnaturalización (Tm)                     | Destrucción en el orden geométrico a lo largo de la cadena polipeptídica.      |
| 4. Turbidimetría                                       | Cambios en la longitud y contenido helicoidal de la molécula de tropocolágena. |
| 5. Electroforesis en disco en geles de poliacrilamida. | Cambios en el peso molecular, visualización de subunidades y fragmentos.       |
| 6. Cristalitos SLS                                     | Cambios en la longitud de la molécula de tropocolágena.                        |
| 7. Liberación de fragmentos de colágena radioactiva.   | Rompimiento de la molécula de colágena en solución.                            |

COLAGENA RECONSTITUIDA EN GEL

- |  |   |
|--|---|
| 8. Lisis de gel                                      | Efectos colagenolíticos.                            |
| 9. Liberación de fragmentos de colágena radioactiva. | Rompimiento de fibrillas de colágena reconstituida. |
-

sen, Bauer and Jeffrey, 1971) (51), Nagai, 1973 (52).

Vaes (1972) y Vaes y Eeckhout (1975) demostraron que la colagenasa de hueso de ratón es liberada no como una enzima activa, si no como un zimógeno (procolagenasa) el cual puede ser activado por tripsina, quimiotripsina, calicreina y plasmina. Por medio de filtros moleculares se encontró que el zimógeno tiene un peso molecular de 105000 y la enzima activa de 84000; según estos autores, el efecto de la tripsina parece ser doble ya que por un lado activa al precursor de la colagenasa mientras que por otro lado también activa a un proactivador que se transforma en un activador y contribuye a la transformación de la proenzima en enzima activa.

Harper y col., reportaron que en cultivos de cola de renacuajo, una notable concentración de colagenasa como procolagenasa se liberaba al medio de cultivo, durante los primeros días (31, 32), conforme la enzima activa aparecía la procolagenasa decrecía en concentración; paralelamente al incremento de la enzima activa aparecía un activador. El zimógeno no adquiere actividad por proteólisis parcial con tripsina o quimiotripsina, no tiene capacidad de unirse al sustrato, pero da reacción de identidad con un anticuerpo (IgG) dirigido contra la enzima.

Se ha mencionado también la existencia de un zimógeno de colagenasa de leucocitos humanos; la colagenasa de extracto de leuco

citocitos polimorfonucleares posee poca actividad frente al sustrato - insoluble (21) pero cuando se pone en contacto con líquido sinovial de sujetos con artritis reumatoide aumenta 5 veces su capacidad colagenolítica (53), Wize y col. (54), han purificado el factor activador del líquido sinovial su peso molecular es de 35000 daltones; Oronsky y col. (55) han demostrado que los leucocitos polimorfonucleares expuestos a IgG humana agregada liberan una procolagenasa que puede ser activada por exposición limitada a tripsina a distintas temperaturas.

Birkedal Hansen y col. (56) han presentado datos que sugieren la existencia de dos formas distintas de colagenasa latente en cultivos de encía bovina. Trabajando en cromatografía en Sephadex G-150 separaron la colagenasa latente en dos picos; sólo uno - de los dos picos fue excluido de la columna y activado por tiocianato y por tripsina, el efecto del tiocianato y la exclusión de la columna sugieren la presencia de un complejo colagenasa-inhibidor sérico. El otro pico incluido en la columna no se activa con tiocianato pero sí con tripsina y como es de peso molecular aproximado a la colagenasa activa de encía bovina (57) se ha interpretado como un precursor. Estos mismos investigadores también han encontrado en cultivos de macrófagos alveolares de conejo (58) colagenasa latente la cual puede ser activada por proteólisis parcial con tripsina.

Birkedal Hansen y col. (59) reportaron la existencia de una colagenasa latente en cultivos de fibroblastos, la enzima latente no hidrolizó a la colágena ni se unió a la  $\alpha_2$  macroglobulina. El peso molecular, determinado por filtración en gel, fue de 78000 y 60000 para la enzima latente y activa respectivamente. Las colagenasas latentes de encía bovina, de macrófagos alveolares y de fibroblastos mencionadas arriba pueden ser activadas con proteasas de células cebadas (60).

La producción de una colagenasa en forma inactiva fue descrita en cultivos de fibroblastos de piel humana normal por Bauer y col. (61), la enzima fue activada por proteólisis parcial con tripsina y por autoactivación; una vez activada la colagenasa de fibroblastos es idéntica en su mecanismo de acción a la colagenasa obtenida de cultivos de piel. Utilizando filtración en Sephadex G-150 detectaron la existencia de un potente inhibidor de la colagenasa, con un peso molecular ligeramente mayor al de la enzima (40000), que está presente también en el medio de cultivo.

Nagai y col. (62) demostraron la existencia de una enzima latente en explantes de piel de embrión de pollo, con un peso molecular aproximado de 45000 daltones, la enzima fue activada con tiocianato.

Recientemente Horwitz y Crystal (63) han sugerido la exis



tencia de la colagenasa latente en cultivos de macrófagos alveolares de pulmón de conejo. El medio de cultivo de los primeros días posee una baja actividad, este bajo nivel no se debe a la presencia de inhibidores, puesto que mezclando medio concentrado del primer día con concentrado del segundo día da un efecto aditivo en la actividad. La actividad colagenolítica puede ser aumentada 3 veces si se trata el medio con tripsina, la activación máxima se observa cuando se utiliza 10  $\mu\text{g}$  de tripsina/mg de proteína presente en el medio.

Eisen y col. han mostrado que componentes del suero tales como  $\alpha_2$  macroglobulina ( $\alpha_2\text{M}$ ) inhibe a casi todas las colagenasas animales (64). Sólo la colagenasa A del líquido sinovial (45) y la de granulocitos no son inhibidas por proteínas del suero. Extractos de piel humana han mostrado una colagenasa inmunoreactiva, pero enzimáticamente inactiva, la cual puede ser separada en forma activa de sus inhibidores por filtración en gel (65).

Abe y col. (66) aislaron un complejo  $\alpha_2\text{M}$ -colagenasa de líquido sinovial por cromatografía de afinidad; el complejo fue dializado contra  $\text{NaSCN}$  3 M, lo que desnaturaliza en forma selectiva y casi completa a la  $\alpha_2\text{M}$  y parcialmente a la enzima, seguida por extensiva diálisis se logró recuperar actividad parcial de la colagenasa.

Además de la  $\alpha_2$  macroglobulina se han mencionado otros inhibidores séricos y/o tisulares como son: la lisozima, las histo-

nas (67), una proteína sérica de peso molecular de 40000 que no tiene efecto sobre la actividad de tripsina o papaína, sugiriendo un cierto grado de especificidad (68), una proteína secretada por fibroblastos (61) y materiales no identificados aún en esputo (69).

Existen algunas observaciones sobre la acción inhibitoria de hormonas en la actividad colagenolítica. Se ha mencionado que el estradiol (70) puede inhibir el rompimiento de la colágena en homogenados de útero; confirmando una observación previa de Woessner (71) hecha en animales intactos, Halme y Woessner encontraron que la progesterona, a dosis muy altas, inhibe la actividad colagenolítica y la involución postparto en la rata (72). También existen algunas pruebas de que los estrógenos inhiben la reabsorción de hueso en medios de cultivos (73) y disminuyen la actividad colagenolítica en los mismos (74).

Existen diferentes sustancias que son capaces de estimular la síntesis y/o la liberación de colagenasa como son: la colchicina, la citocalasina B (75), la dexametasona (76), la tiroxina (77), el AMP cíclico (78), la heparina (79), la endotoxina (80) y las lincocinas derivadas de la interacción entre linfocitos T sensibilizados y el antígeno (81). De las sustancias mencionadas la más estudiada es la colchicina, que actúa en concentraciones muy bajas ( $0.1 \mu\text{M}$ ) estimulando la síntesis de colagenasa en explantes de granuloma de carragenina (82), de sinovial reumatoide (83), de nódulo reumatoide

(84) y de macrófagos (85), su mecanismo de acción se desconoce, pero se ha establecido que no se debe a la disminución de la degradación de la enzima o estimulación en la secreción de enzima almacenada, sino que probablemente represente un aumento en la síntesis de la colagenasa por las células explantadas (83).

Algunos investigadores han obtenido datos que sugieren la existencia de formas poliméricas de la enzima así como la existencia de distintas colagenasas en un mismo sistema.

Ohlsson y Olsson (42) han aislado y caracterizado parcialmente dos colagenasas de granulocitos humanos, la cromatografía con Sephadex G-150 sugiere que ambas colagenasas tienen un peso molecular de 76000. La electroforesis después del tratamiento de las colagenasas con duodecil sulfato de sodio revela dos componentes con pesos moleculares de 42000 y 33000 respectivamente, sugiriendo que la enzima nativa está construida por dos subunidades.

Dos distintas colagenasas de líquido sinovial fueron separadas por Harris y col. (45) por cromatografía de filtración en gel. Una enzima "A" con un peso molecular mayor de 50000, que fue resistente a la inhibición por suero, la otra enzima "B" que fue inhibida por suero; Harris y col. (86) han sugerido que la colagenasa "A" probablemente se deriva de leucocitos polimorfonucleares y que la "B" es sintetizada por células sinoviales.

La purificación de la enzima de piel humana en el laboratorio de Eisen (87, 88) han revelado dos picos de actividad que pueden ser separados por filtración en gel y aparecen como componentes rápido y lento en electroforesis de gel de acrilamida. Usando otro sistema de purificación Wolley (89) encontró sólo una enzima activa con un peso molecular de 63000; esta determinación del peso molecular no fue afectada por la incubación en Tritón al 0.1 % o urea 6 M, sugiriendo que no hay subunidades.

Recientemente Birkedal Hansen y col. (43) han reportado la existencia de formas poliméricas de la enzima; trabajando con macrófagos alveolares de conejo encontraron por filtración en gel distintos pesos moleculares para la enzima, de 45000, 85000 y 165000; por medio de modificaciones en la concentración de sales, observaron que las tres especies moleculares eran intercambiables con predominio de la de peso molecular menor, por lo que concluyeron que las otras dos son formas agregadas de la enzima.

Ninguna de las colagenasas descritas han sido purificadas suficientemente para permitir su caracterización química, su interacción con los inhibidores del plasma, así como estudios de cinética enzimática. De aquí surge la necesidad de purificar la enzima en cantidades que permitan realizar los estudios mencionados.

Estudios realizados por Pardo y Pérez Tamayo (90) demos -

traron que la enzima se encuentra unida a la colágena aún después del proceso de purificación. La enzima puede ser separada de su sustrato por electroforesis en gel de acrilamida, obteniéndose una doble banda (en ocasiones) con una separación ínfima entre sí (91). A la existencia de esta doble banda surgieron las siguientes preguntas: ¿Son moléculas distintas? ¿Relacionadas o no relacionadas? los experimentos mencionados en este trabajo estuvieron encaminados a contestar estas preguntas para lo cual lo primero por hacer era separar esta doble banda.

El objetivo de esta tesis es demostrar que la enzima puede obtenerse en forma pura, teniendo como fuente de la enzima colágena parcialmente purificada.

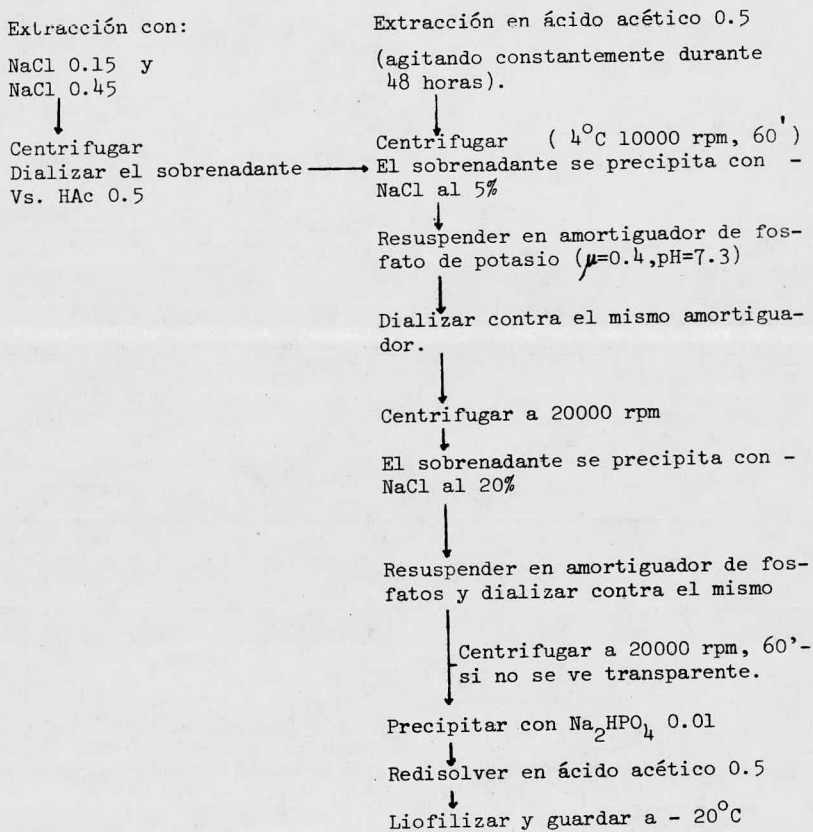
## MATERIAL Y METODOS

### I Fuente de la colagenasa

Como ya se mencionó (90) la colagenasa se encuentra unida fuertemente a su sustrato, por lo que fue empleado como fuente de la enzima. La colagenasa fue obtenida por electroforesis en disco - en geles de poliacrilamida.

La colágena fue extraída de pieles de cobayo muertos por exanguinación cardiaca, el tejido adiposo subcutáneo se eliminó y se cortaron las pieles en fragmentos pequeños; la extracción se realizó a 4° C de acuerdo con la técnica de Gross (92) (ver diagrama).

EXTRACCION DE COLAGENA



## II Obtención de la enzima

La separación electroforética de la enzima se llevó a cabo de acuerdo al método reportado de electroforesis en disco para las proteínas del suero a pH 8.1 (93).

Los geles de 5 cm. de largo por 5 mm. de diámetro fueron preparados con las siguientes soluciones:

Acrilamida al 10%	6.25 ml
Metil-Bisacrilamida al 2%	1.07 ml
H <sub>2</sub> O	2.14 ml
TEMED al 0.28%	1.5 ml
Tris-Glicina 0.05 M pH 8.1	1.5 ml
Persulfato de amonio al 12%	0.062 ml

Después de mezclar las soluciones en el orden descrito la mezcla se colocó en los tubos cubriéndose con agua destilada en la parte superior, después de la polimerización del gel el agua fue eliminada y se adicionó de 375-500 mg de colágena liofilizada la cual fue solubilizada en ácido acético 0.5 M a 4° C, dializada contra el amortiguador Tris-Glicina 0.005 M pH 8.1 y gelatinizada a 60° por 10 minutos antes de proceder a la electroforesis, la que se desarrolló a un voltaje constante de 200 voltios durante 1 hora.

Un gel de cada corrida era teñido (para localizar la posición de la enzima) con una solución de negro de amida al 0.01% en ácido acético al 3% por 15 minutos y desteñido en ácido acético al 3%; los demás geles fueron cortados al nivel en que aparecía la enzi



ma y puestos a eluir con amortiguador Tris-HCl 0.05 M +  $\text{CaCl}_2$  0.005 M pH 7.4.

### III Prueba de actividad colagenolítica

El método utilizado para medir actividad colagenolítica - en la colágena fue el descrito por Sakai y Gross (47), electroforesis en disco en geles de poliacrilamida a pH ácido.

Colágena liofilizada fue disuelta en ácido acético 0.5 M en frío, dializada en amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.4 y después en NaCl 0.4 M, la solución fue aclarada por centrifugación a 39000 rpm a  $4^\circ$  C por 60 minutos; la concentración de colágena se - determinó en el sobrenadante, midiendo hidroxiprolina por el método de Stegemann (94) modificado por Woessner (95).

Se incubó por duplicado: 0.5 ml de colágena más 0.4 ml de amortiguador Tris-HCl 0.05 M +  $\text{CaCl}_2$  0.005 M a  $37^\circ$  C por 48 horas, después de la incubación la reacción fue parada por la adición de - 0.1 ml de EDTA 0.4 M; al mismo tiempo se incubaron en las mismas - condiciones controles a los que se les adicionó el EDTA al inicio - de la incubación. Se tomaron alícuotas de cada muestra y se dializa - ron contra el amortiguador de la cámara superior de la electroforesis a pH ácido, las muestras fueron gelatinizadas a  $60^\circ$  C por 10 mi - nutos antes de someterlas a la electroforesis.

#### IV Electroforesis en gel de poliacrilamida

1. Utilizando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida para las proteínas del suero pH 8.1 (93) se realizaron - algunas variantes al método que fueron:

a) pH

Se prepararon amortiguadores de Tris-Glicina 0.05 M a distintos pHs, pH 7, pH 7.5, pH 8, pH 8.1, pH 8.5, pH 9, pH 9.5 y pH 10.

b) Concentración de acrilamida

Se prepararon geles con una concentración final de acrilamida de 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% y 10%.

c) Concentración de azul de bromofenol

Tomando como base observaciones realizadas por Burford y Pickring (96), se procedió a hacer cambios en la concentración de - azul de bromofenol utilizado como frente del amortiguador. Se efectuaron las electroforesis con el colorante disuelto en el amortiguador de la cámara superior, a distintas concentraciones que variaron de 0.5  $\mu\text{g/ml}$  a 20  $\mu\text{g/ml}$ .

Para las tres variantes mencionadas se utilizaron soluciones de colágena en una concentración de 1.5 mg/ml a 2 mg/ml, siendo dializadas contra el amortiguador de la cámara superior, gelatinizadas y alícuotas de 0.25 ml fueron sometidas a la electroforesis a - voltaje constante de 200 voltios.

d) Intensidad de la corriente

Utilizando como base la misma técnica (93) y procediendo

con la muestra de la misma manera ya mencionada se varió la intensidad de la corriente utilizada en la electroforesis, corriéndose a 1 mA, 2 mA, 3mA, 4 mA y 5 mA por tubo.

2. Electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida a pH 4.5 y pH 8.1 fue realizada en geles al 5 % y 10 % respectivamente de acuerdo a Reisfeld y col. (97). El gel está constituido de dos secciones a) un gel espaciador, donde la concentración electroforética toma lugar y b) un gel de poro pequeño en el cual la separación electroforética es llevada a cabo. La electroforesis se desarrolló a una corriente constante de 4 mA por tubo, los geles fueron fijados y teñidos en una solución de Coomassie al 0.04 % (W/V) en ácido perclórico al 3.5 %.

### 3. Electroforesis en SDS-UREA

Se obtuvo enzima a partir de colágena sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida a pH 8.1 como ya se describió antes, por elución del fragmento en donde aparecía la enzima y se juntó material de varias corridas.

Con el material obtenido se efectuó la electroforesis en SDS-UREA (98) en geles de acrilamida al 7.5 %, la electroforesis se realizó a una corriente constante de 5 mA por tubo por 5 horas; los geles se fijaron en ácido tricloroacético al 10 % y teñidos con Coomassie TCA-ácido sulfosalicílico al 5 % y desteñidos en ácido acético al 7 %.

## V Susceptibilidad a proteasas

Colágena liofilizada fue disuelta en ácido acético 0.5 M y dializada contra lo mismo, tratando de solubilizar la mayor cantidad posible, la solución fue aclarada por centrifugación a 39000 rpm por 60 minutos. Se tomaron alícuotas del sobrenadante y se determinó la concentración de colágena midiendo hidroxiprolina por el método antes mencionado (94, 95). Colágena nativa y gelatinizada fueron sometidas a la acción de la pepsina y de la tripsina.

### 1. Colágena nativa

a) Pepsina.- 5 ml de colágena con una concentración aproximada de 1 mg/ml fueron dializados contra ácido acético 0.5 M pH 3 -- después de la diálisis la muestra se puso en contacto con pepsina - (Pepsin 3 x Cryst., B grade, Calbiochem), siendo ésta a una centésima parte con respecto a la concentración del sustrato, la incubación se llevó a cabo por dos horas con agitación suave. Al término de la incubación la reacción fue llevada a pH alcalino con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.4, con el objeto de inhibir la acción de la pepsina. A la solución resultante se le adicionó NaCl quedando finalmente al 20% de NaCl, precipitando así la colágena presente; después se centrifugó a 12000 rpm a 4° C por 60 minutos, el sobrenadante fue - desechado y el precipitado resuspendido en amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.4, dializado contra el mismo y contra NaCl 0.4 M. Finalmente la muestra fue centrifugada a 39000 rpm por 60 minutos, del sobrenadante se determinó la concentración de colágena y de ésta se - efectuó una electroforesis a pH 8.1.

Al mismo tiempo que el problema se hizo un control realizando se la incubación a pH alcalino y se procedió de manera semejante al problema.

b) Tripsina.- La prueba se realizó a pH alcalino, para lo cual 5 ml de colágena (1 mg/ml) se dializaron en amortiguador de fosfato de potasio pH 7.4 y se sometieron a la acción de la tripsina -- (Trypsin, Fluka Ag, Buchs Sg.) en proporción 100:1, la incubación se realizó a temperatura ambiente por dos horas con agitación; al final de la incubación la reacción fue parada por adición de inhibidor de tripsina de frijol de soya, en relación doble a la concentración de tripsina utilizada. Después se continuó con el problema de la misma manera que se trabajó con el de pepsina. Se hizo también un control donde se incubó la colágena más tripsina, más inhibidor de tripsina, mezclandose previamente la tripsina y el inhibidor.

## 2. Colágena gelatinizada

Tripsina.- Se utilizó colágena gelatinizada a 60° por 10 minutos como sustrato, se incubó a temperatura ambiente por dos horas con agitación lenta, la reacción se paró con la adición del inhibidor de frijol de soya. La mezcla de reacción se dividió en dos y se efectuaron electroforesis en geles de poliacrilamida a pH 8.1 y pH 5.5.

## 3. Enzima eluida de geles de poliacrilamida corridos a pH 8.1

Se trabajó con una concentración de sustrato de 750  $\mu\text{g/ml}$  - y se sometió a la acción de la tripsina (7.5  $\mu\text{g}$ ), la mezcla se incubó

a temperatura ambiente por una hora, después de este tiempo se adicionó el inhibidor de tripsina ( $15\mu\text{g}$ ); al mismo tiempo se hizo el control incubando en las mismas condiciones pero agregando la tripsina más su inhibidor, mezclados previamente, al inicio del periodo de incubación. Se tomaron alícuotas de 0.37 ml del control y del problema y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida a pH 8.1 los geles fueron fijados y teñidos al mismo tiempo en una solución de Coomassie al 0.04% en ácido perclórico al 3.5%. Se utilizó un control para la electroforesis que fue tripsina más inhibidor a la misma concentración que contenían las muestras.

A la tripsina utilizada en las pruebas realizadas previamente a su utilización se le determinó su actividad por el método de la digestión de la caseína (Kunitz 99), para éste se prepararon distintas diluciones de la enzima, se aforaron a un ml con amortiguador de fosfatos pH 7.4, se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  y a cada tubo se le adicionó 1 ml de caseína con una concentración de 1 mg/ml, después de 20 minutos se les adicionó 3 ml de ácido tricloroacético al 5% y se dejaron por una hora a temperatura ambiente, después fueron centrifugados a 8000 rpm por 20 minutos y los sobrenadantes fueron leídos a 280 nm.

#### VI Análisis del sistema de electroforesis.

Se efectuaron varias corridas en geles de poliacrilamida a pH 8.1 como ya se describió antes (93). Se utilizó como muestra control lámina gelatinizada a  $60^{\circ}$  por 10 minutos corriendose de  $750\mu\text{g}$  a --

1000  $\mu$ g de colágena en cada tubo, se utilizó una gota de sacarosa al 40% y azul de bromofenol como frente del amortiguador, se hicieron algunos controles para estas corridas:

- a) Colágena + sacarosa + colorante
- b) Colágena + sacarosa -----
- c) Colágena -----
- d) ----- sacarosa + colorante
- e) ----- sacarosa -----
- f) ----- -----

El tiempo de la electroforesis fue de 45 a 60 minutos y en ninguno de los casos se dejó salir el frente del amortiguador.

#### VII La colagenasa responsable de la degradación de la colágena

Ante la imposibilidad de probar actividad colagenolítica de la enzima obtenida por elución de los geles de poliácridamida, se procedió a realizar el experimento que a continuación se describe.

Se utilizó una colágena a la que se le identificó la presencia de la enzima por electroforesis a pH 8.1 y actividad colagenolítica de la misma por el método antes descrito. El experimento consistió de dos incubaciones: a) Muestras de colágena fueron sometidas a la acción de pepsina ó tripsina b) Prueba de actividad colagenolítica de las muestras de colágena sometidas a la acción de las proteasas.

a) Muestras de colágena con una concentración aproximada - de 1 mg/ml fueron sometidas a la acción de la tripsina o pepsina como ya se describió antes. Para el caso de pepsina se utilizaron dos distintas concentraciones de la enzima, una décima y una centésima - parte con respecto a la concentración de colágena; la pepsina utilizada fue otra (Pepsin Worthington Biochemical Corporation).

Las mezclas de reacción fueron las siguientes:

Para tripsina:

- a) Colágena + tripsina a pH 7.4
- b) Colágena + Tripsina + inhibidor de tripsina a pH 7.4
- c) Amortiguador de fosfatos pH 7.4 + Tripsina + inhibidor de tripsina.

Para pepsina:

- a) Colágena + pepsina en proporción 10:1 a pH 3
- b) Colágena + pepsina en proporción 10:1 a pH 7.4
- c) Acético 0.5M + pepsina en la misma concentración utilizada en a) y b).
- d) Colágena + pepsina en proporción 100:1 a pH 3.
- e) Colágena + pepsina en proporción 100:1 a pH 7.4
- f) Acético 0.5 M + pepsina en la misma concentración utilizada en d) y e).

Después del periodo de incubación de 24 horas a temperatura ambiente se tomaron alícuotas de las mezclas de reacción y se dia



lizaron contra el amortiguador de la cámara superior de la electroforesis a pH 8.1 con el objeto de ver la presencia o ausencia de la colagenasa.

b) De las muestras de colágena sometidas a la acción de las proteasas tanto como de sus controles se tomaron alícuotas que se incubaron a  $37^{\circ}$  C por 24 horas, después de la incubación se visualizaron los productos de reacción por electroforesis a pH 5.5.

## RESULTADOS

A continuación se enuncian los resultados en el mismo orden en que se presentaron los métodos.

### I Electroforesis en gel de poliacrilamida

1. Con el objeto de separar la doble banda observada en electroforesis a pH 8.1 se realizaron las variantes de pH, concentración de acrilamida, concentración de azul de bromofenol y corriente aplicada.

a) La utilización de distintos pHs reveló que la aparición de la banda o doble banda fue restringido, sólo a pH 8. pH 8.1 y pH 8.5, a pHs menores de 7 y 7.5 no se observó proteína y a pHs mayores pH 9, pH 9.5 y pH 10 la proteína se observaba en la parte superior del gel de manera difusa. La observación de proteína a pH 7.5 fue posible a tiempos de corrida muy largos.

b) Se hicieron geles a distintas concentraciones se acrilamida y en todas se observó la banda o doble banda sin ningún cambio.

c) Las distintas concentraciones de azul de bromofenol utilizadas no variaron la forma de aparición de la proteína en las electroforesis efectuadas, apareciendo para todas las concentraciones -- una doble banda.

d) La variación de la corriente no afectó la forma de aparición de la enzima, los geles mostraron una doble banda indistinta-

mente de la corriente aplicada en el sistema.

Ante la imposibilidad de separar la doble banda con las variantes realizadas se procedió a cambiar a un sistema de electroforesis que involucra dos distintos pHs y dos tamaños en el poro del gel.

## 2. Electroforesis discontinua.

La utilización de esta técnica mostró a la proteína como una banda perfectamente definida.

## 3. Electroforesis en SDS-UREA

Los resultados de esta electroforesis no revelaron bandas definidas, sin embargo se observan dos componentes, uno que corre en la parte superior del gel y el segundo más abundante que corre aproximadamente a la mitad del gel. El análisis densitométrico de uno de los geles se muestra en la gráfica de la figura 1.

## II Susceptibilidad a proteasas

Ante los intentos sin éxito para separar la doble banda con las técnicas electroforéticas aplicadas, se procedió a utilizar enzimas.

### 1. Colágena nativa.

a) Pepsina.- La colágena incubada con pepsina con el método ya descrito y sometida a electroforesis a pH 8.1 mostró ausencia de las bandas o sea susceptibilidad de la colagenasa a la pepsina. (fig. 2).

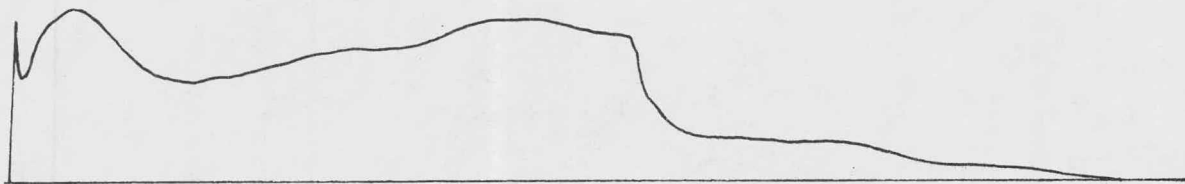


Fig. 1 Densitometría de collagenasa en geles de acrilamida SDS-Urea, obtenida por elución de geles de acrilamida corridos a pH 8.1.

b) tripsina.- Para este experimento la electroforesis a pH 8.1 de la colágena tratada reveló presencia de la o las bandas, o sea resistencia de la colagenasa a la tripsina. (fig. 2).

## 2. Colágena gelatinizada.

Sabiendo que la colágena nativa no es susceptible a la tripsina se pensó que la presencia de la o las bandas en las preparaciones de colágena incubadas con tripsina podía deberse a que la colágena la protegía de alguna manera impidiendo así que la colagenasa fuera atacada por la tripsina, por esta razón se procedió a realizar la prueba utilizando gelatina.

La colágena gelatinizada sometida a la acción de la tripsina fue totalmente degradada como lo mostraron los geles corridos a pH 5.5; sin embargo, estas mismas preparaciones sometidas a electroforesis a pH 8.1 mostraron la presencia de la banda o doble banda.

## 3. Enzima eluida de geles de poliacrilamida corridos a pH 8.1.

Ante la posibilidad de que la gelatina protegiera a la colagenasa de la acción de la tripsina, se procedió a realizar el experimento con enzima eluida de geles de poliacrilamida. La electroforesis a pH 8.1 de la colagenasa incubada con tripsina reveló persistencia de ésta.

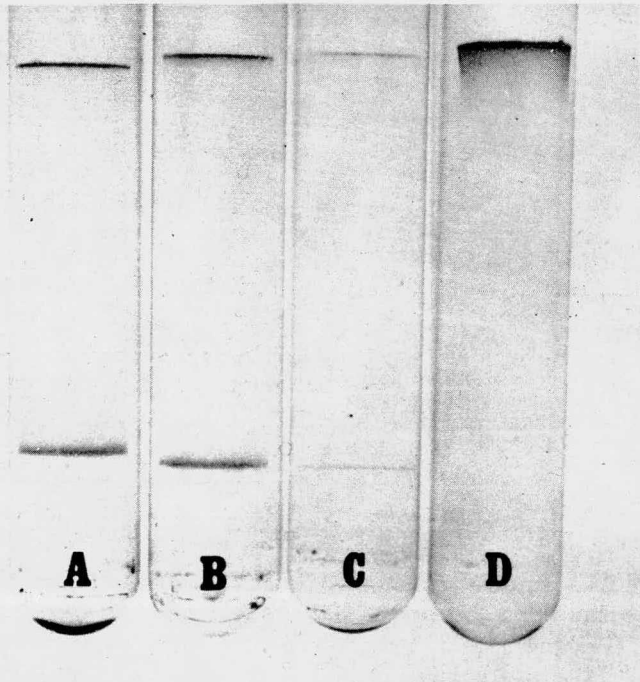


Fig. 2 Electroforesis en gel de poliacrilamida a pH 8.1. Los dos geles de la izquierda corresponden a una preparación de colágena incubada con tripsina: A) Control --- B) Problema, mostrando la resistencia de la colagenasa a la tripsina. Los dos geles de la derecha muestran una preparación de colágena incubada con pepsina: C) Con -- trol D) Problema, mostrando la sensibilidad de la colagenasa a la pepsina.

### III Análisis del sistema de electroforesis

Ante la imposibilidad de separar la doble banda y el poder discriminar alguna de las dos por su susceptibilidad a pepsina o tripsina se analizó el sistema mismo de electroforesis en el que aparecía la doble banda. La electroforesis llevada a cabo presentó los siguientes resultados:

- a) Colágena + sacarosa + colorante - una o doble banda
  - b) Colágena + sacarosa ----- - una o doble banda
  - c) Colágena ----- ----- - una o doble banda
  - d) ----- sacarosa + colorante - ninguna o una banda
  - e) ----- sacarosa ----- - ninguna o una banda
  - f) ----- ----- ----- - ninguna o una banda
- (ver fig. 3)

### IV La colagenasa responsable de la degradación de la colágena

- a) Colágena tratada con tripsina.

La electroforesis a pH 8.1 de la colágena incubada con - tripsina nos mostró la presencia de la banda correspondiente a la colagenasa, al igual que su control, el control constituido únicamente por tripsina no mostró ninguna banda en el gel.

El resultado de la prueba de actividad de la colágena sometida a tripsina (fig. 4) muestra que ante la persistencia de la colagenasa en la colágena problema, ésta es capaz de degradarse a

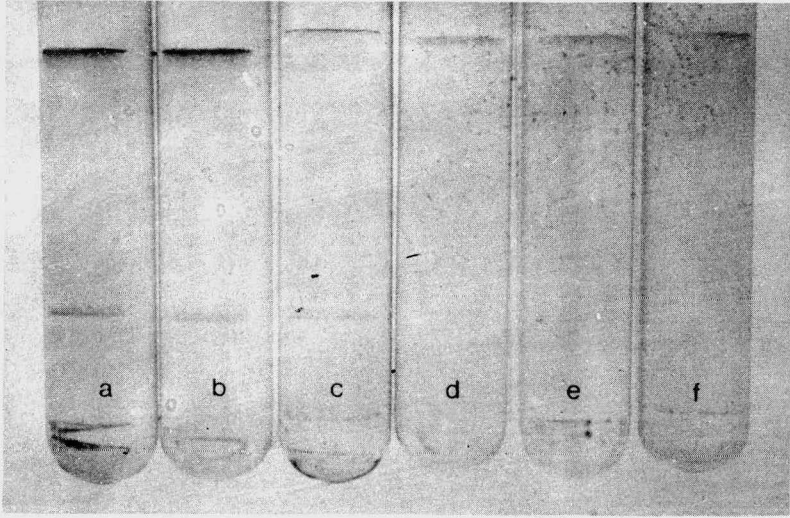


Fig. 3 Electroforesis en geles de poliacrilamida a pH 8.1 resultante del análisis del sistema de electroforesis. De izquierda a derecha se muestra lo siguiente: a) Colágena + sacarosa + colorante, b) Colágena + sacarosa, c) Colágena d) Sacarosa + colorante, e) Sacarosa, f) Amortiguador.



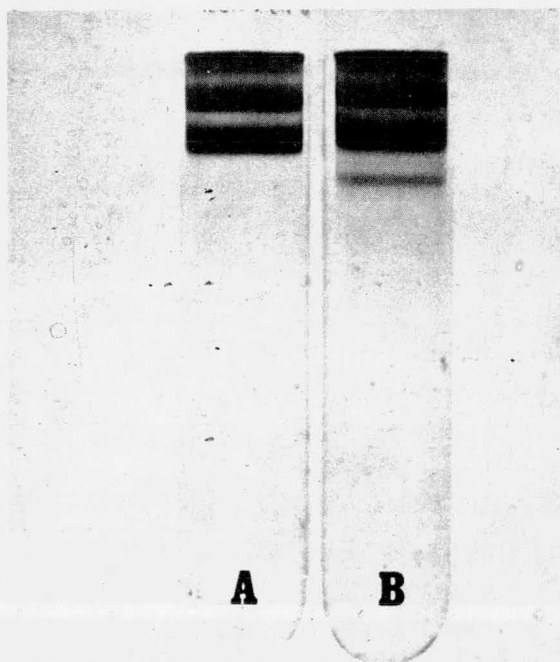


Fig. 4 Resultado de la prueba de actividad de la colágena después de haber sido incubada con tripsina, visualizado por electroforesis a pH 5.5. A) Control. - B) Problema.

37° C y pH 7.4 y que dicha degradación puede ser inhibida por la acción del EDTA 0.04 M. La colágena control (colágena + tripsina + inhibidor de tripsina) mostró el mismo resultado.

b) Colágena tratada con pepsina.

Las colagenas sometidas a la acción de la pepsina y corridas en electroforesis a pH 8.1 nos mostraron persistencia de la colagenasa. El análisis densitométrico de los geles (fig. 5) nos reveló lo siguiente: la colágena tratada con pepsina a distintas concentraciones a pH 3 mostraron una disminución de la banda correspondiente a la colagenasa con respecto a sus controles; lo que nos indicó que la colagenasa unida a colágena fue degradada parcialmente por la pepsina.

Los geles a pH 5.5 de la prueba de actividad de las colágenas sometidas a la acción de la pepsina, mostraron que ante la persistencia de la banda correspondiente a la colagenasa, la degradación de las colágenas problemas continúa (colágena + pepsina a pH 3) mostrando los geles fragmentos por debajo de las subunidades alfa, sin embargo es importante hacer notar que el grado de degradación de estas colágenas es mucho menor si se comparan con las colágenas controles (colágenas + pepsina a pH 7.4). Los geles fueron analizados en un densitómetro Quick-Scan obteniéndose las gráficas de las figuras 6 y 7; a partir de éstas y de la concentración conocida de la colágena aplicada en cada uno de los geles se obtuvieron los datos de la tabla 3.

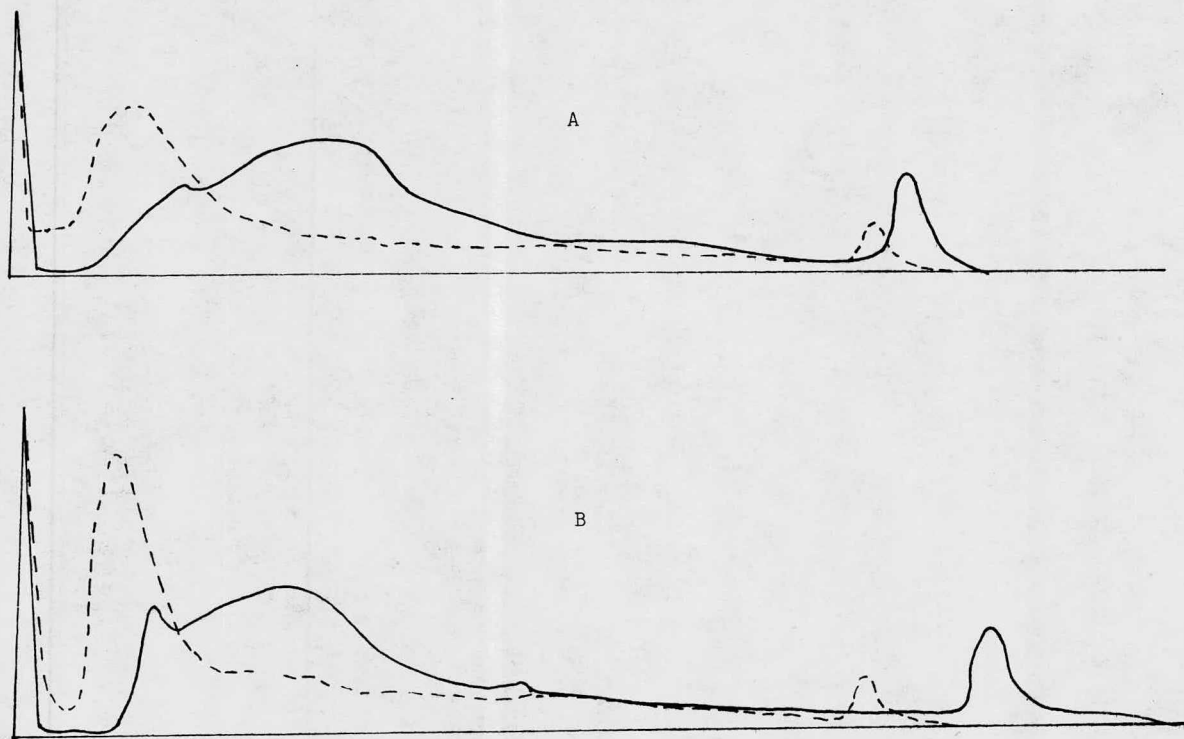


Fig. 5 Densitometría de los geles a pH 8.1 de las colágenas tratadas con pepsina a distintas concentraciones: A) Colágena más pepsina en proporción 10:1. B) Colágena más pepsina en proporción 100:1. Controles-línea continua, problemas-línea punteada.

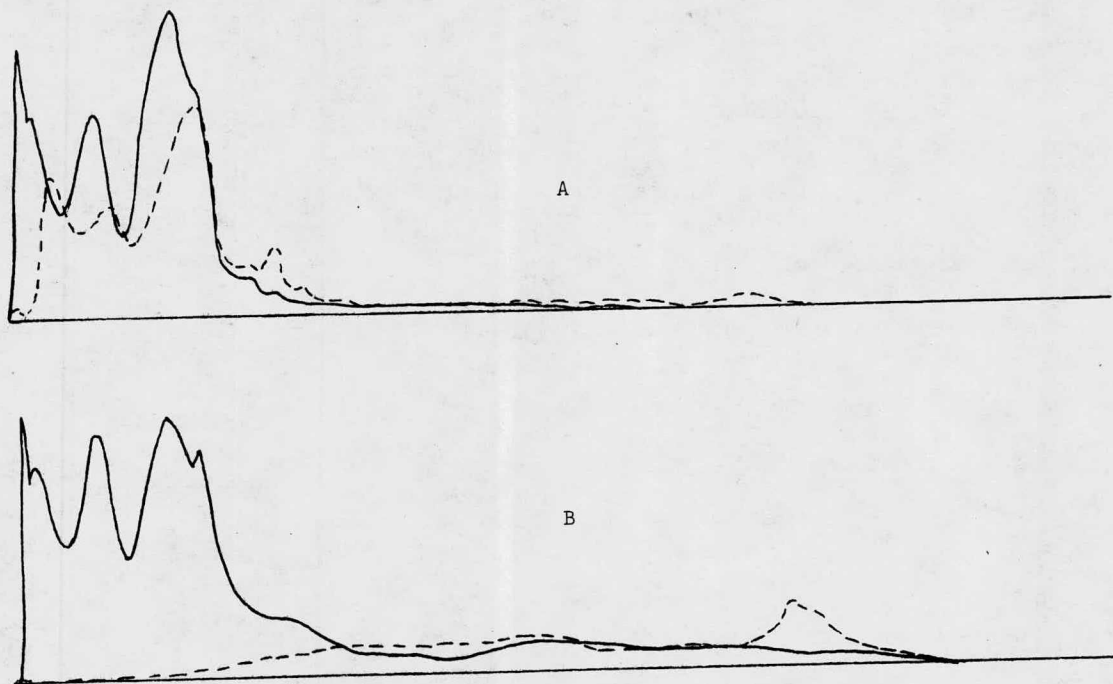


Fig. 6 Densitometría de los geles a pH 5.5 de la prueba de actividad de la colágena tratada con pepsina en proporción 10:1. A) Problema-primera incubación. B) Control-primera incubación (ver texto). Controles de la prueba de actividad-línea continua, problemas de la prueba de actividad-línea punteada.

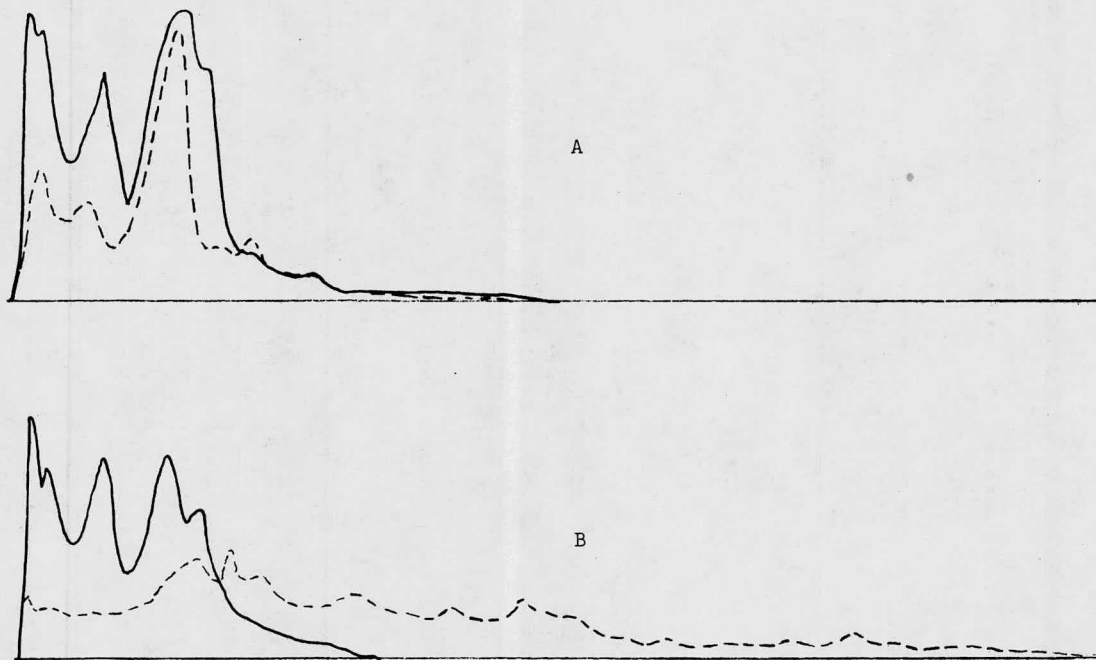


Fig. 7 Densitometría de los geles a pH 5.5 de la prueba de actividad de la colágena tratada con pepsina en proporción 100:1. A) Problema B) Control de la primera incubación - (ver texto). Controles de la prueba de actividad- línea continua, problemas de la -- prueba de actividad-línea punteada.

1a Incubación	2a Incubación	$\mu\text{g}$ de colágena no degradada	% de degradación
Problema	Control	92.51 $\mu\text{g}$	0
Clg + P (10:1) pH 3	Problema	52.19 $\mu\text{g}$	43.5
Control	Control	102.3 $\mu\text{g}$	0
Clg + P (10:1) pH 7.4	Problema	0 $\mu\text{g}$	100
Problema	Control	104.4 $\mu\text{g}$	0
Clg + P (100:1) pH 3	Problema	51.2 $\mu\text{g}$	51
Control	Control	109 $\mu\text{g}$	0
Clg + P (100:1) pH 7.4	Problema	39.4 $\mu\text{g}$	70

Tabla 3. Resultado de la prueba de actividad de las colágenas sometidas a pepsina a distintas concentraciones. Clg.-colágena, P.-pepsina.

## RESUMEN DE RESULTADOS

## I Electroforesis

## 1. Electroforesis de colágena.

Distintos pHs	7	7.5*	8	8.1	8.5	9	9.5	10
Observación	---	Banda doble o simple				---	---	---
Concentración de acrilamida	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%
Observación	Banda doble o simple a todas las concentraciones empleadas.							
Concentración de azul de bromofenol $\mu\text{g/ml}$	0	0.5	1	2	5	10	20	
Observación	Banda doble o simple para todas las <u>concentraciones</u> probadas.							

Electroforesis discontinua.- Aparición de una sola banda.

## 2. Electroforesis de enzima eluída.

Electroforesis en SDS-UREA.- Aparición de dos componentes de manera difusa.

\* Aparición de la banda doble o simple sólo a tiempos de corrida mayores.

## II Susceptibilidad a proteasas.

---

SUSTRATO	PROTEASA EMPLEADA	RESULTADO
Colágena nativa	Pepsina	Desaparición de la enzima
Colágena nativa	Tripsina	Persistencia de la enzima
Colágena desnatu ralizada	Tripsina	Persistencia de la enzima
Colagenasa eluida de geles de acrilamida	Tripsina	Persistencia de la enzima

---

## III Análisis del sistema de electroforesis

- 
- a) Colágena + sacarosa + colorante - una o doble banda
  - b) Colágena + sacarosa ----- - una o doble banda
  - c) Colágena ----- ----- - una o doble banda
  - d) ----- sacarosa + colorante - ninguna o una banda
  - e) ----- sacarosa ----- - ninguna o una banda
  - f) ----- ----- ----- - ninguna o una banda
-



IV La colagenasa responsable de la degradación de la colágena

---

Resultados

	Electroforesis a pH 8.1	Electroforesis a pH 5.5
Clg + T	Presencia de la enzima	Degradación de la clg.
Clg + T + SBTI	Presencia de la enzima	Degradación de la clg.
Clg + P (10:1) pH 7.4	Presencia de la enzima	Degradación de la clg.
Clg + P (10:1) pH 3	Disminución de la enzima	Disminución de la degradación de la clg.
Clg + P (100:1) pH 7.4	Presencia de la enzima	Degradación de la clg.
Clg + P (100:1) pH 3	Disminución de la enzima	Disminución de la degradación de la clg.

---

Clg.- colágena, P.-pepsina, T.-tripsina, SBTI.-inhibidor de tripsina de frijol de soya.

## CONCLUSIONES

1. El análisis del sistema de electroforesis en el que aparecía la doble banda nos reveló que una de ellas correspondía a un contaminante del sistema empleado, ya que en geles corridos sin proteína aparecía una banda que migraba muy cercana al frente del amortiguador por delante de la banda correspondiente a la colagenasa. La identificación de donde provenía el contaminante no fue posible ya que geles corridos únicamente con amortiguador presentaban o no la banda correspondiente al contaminante.

2. Con los resultados presentados en esta tesis y otros ya reportados en la literatura podemos concluir que la colagenasa puede ser obtenida a partir de colágena en forma pura por los siguientes datos:

a) Se obtiene una sólo banda correspondiente a la colagenasa a distintas concentraciones de acrilamida, criterio que se ha tomado para hablar de homogeneidad de una proteína, (100).

b) Presenta actividad colagenolítica y la degradación de la colágena es proporcional a la cantidad de colagenasa unida a ésta.

c) Un anticuerpo obtenido utilizando como antígeno colagenasa eluída de geles de poliacrilamida a pH 8.1 teniendo como fuente de la enzima colágena de granuloma de carragenina obtenida en cobayos, mostró una sola banda de precipitación contra su antígeno y con

tra la enzima obtenida por electroforesis de colágena de piel de cobayo a pH 8.1 y se observó identidad entre estas bandas; la presencia de una sola banda de precipitación en inmunodifusión sugiere la pureza del antígeno, (91).

## DISCUSION

La electroforesis se define como la migración de una partícula, eléctricamente cargada, bajo la acción de un campo eléctrico. Las proteínas compuestas de aminoácidos, los cuales poseen grupos disociables, pueden adquirir una carga eléctrica neta, la cual dependerá del pH del amortiguador en el cual esten disueltas.

Siendo el desplazamiento proporcional al grado de disociación, se trató de separar la doble banda que aparecía en los geles de electroforesis a pH 8.1 por diferencia en sus movilidades - de acuerdo a su carga eléctrica. Como lo indican los resultados la observación de la enzima fue posible sólo a pH 7.5 (a tiempos de corrida mayores), pH 8, pH 8.1 y pH 8.5; si tomamos en cuenta el punto isoeléctrico reportado para la colagenasa de tumor de conejo de 6.8-7 (40), podemos explicar la observación de la enzima a esos pHs en función a su carga neta:

A pH 7 la enzima se encuentra eléctricamente neutra por lo que no es capaz de migrar bajo la acción de un campo eléctrico, a pH 7.5 la movilidad de la enzima está bastante disminuída y a pHs de 8, 8.1 y 8.5 se encuentra la enzima suficientemente cargada que le permite migrar en un tiempo de 45 minutos a 1 hora; la aparición de la enzima a pH 9, 9.5 y 10 no es posible explicar la en función de la carga eléctrica de la proteína y movilidad de ésta, por otra parte se desconoce el tipo de unión de la enzima -

con su sustrato, por lo que la separación de la colagenasa podría estar dada por una serie de condiciones obtenidas a pHs menores de 9.

La electroforesis en gel separa a las proteínas de acuerdo a la carga y tamaño molecular, la propiedad del gel para distinguir especies moleculares de distintos tamaños se denomina como efecto de filtración molecular; aprovechando esta propiedad del gel se trató de separar la doble banda por diferencia en sus pesos moleculares variando la concentración del gel, como se observa en los resultados - la aparición de la doble banda fue igual para las distintas concentraciones de acrilamida empleadas, lo que nos indicaba que las dos - poseían un peso molecular muy cercano, sin embargo sabiendo que una de ellas corresponde a un contaminante del sistema (ver las conclusiones) podemos decir que la enzima se obtiene como una sola banda a distintas concentraciones de acrilamida.

El azul de bromofenol usado generalmente en electroforesis en gel de acrilamida a pH alcalino como marcador de la posición del frente del amortiguador no ha sido considerado como un factor importante en la separación electroforética; sin embargo ha sido reportado (96) que diferentes concentraciones de azul de bromofenol afectan la resolución de proteínas por la formación de complejos de éstas - con el colorante. Puede verse en los resultados que las distintas - concentraciones de azul de bromofenol no afectaron la presencia de la doble banda, los resultados de este experimento nos indicaron que

la banda contaminante no está dada por el azul de bromofenol, ya que en muestras corridas sin colorante se llegó a observar la doble banda. Por otra parte pudo observarse que la enzima posee cierta afinidad por el colorante, pero éste no varía la movilidad de la proteína.

Sabiendo que la movilidad de una proteína depende de la -- magnitud del campo eléctrico, que la fuerza  $F$  que actúa sobre una mo lécula cargada es el producto de la intensidad  $E$  del campo eléctrico y la carga neta  $Q$  de las partículas móviles de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$F = E Q = \frac{V}{d} Q$$

Donde  $V$  = voltaje y  $d$  = distancia entre los electrodos y sabiendo que el voltaje y la corriente se relacionan de acuerdo a la siguiente ecuación:  $I = \frac{V}{R}$  donde  $I$  es la corriente en mA,  $V$  es el voltaje y  $R$  la resistencia, nosotros podemos correr una electroforesis a  $I$  constante de ésta manera varía el voltaje durante la corrida, la fuerza  $F$  y con ello la movilidad. Teniendo como fundamento lo anteriormente mencionado se realizaron las electroforesis empleando distintas intensidades de corriente, las que nos mostraron que la mo vilidad de las bandas (una con respecto a la otra) no se vió afectada, la banda contaminante apareció siempre por delante de la colagenasa; es importante hacer notar que la movilidad de la enzima si se vió afectada ya que a mayor intensidad de corriente el tiempo de la electroforesis disminuyó.

Ohlsson y Olsson (42) han reportado la existencia de dos -  
colagenasas en granulocitos humanos, las cuales difieren en movili -  
dad electroforética utilizando la técnica de Reisfeld y col., ante -  
la posibilidad de separar las bandas problema por la utilización de  
la misma técnica se aplicó ésta, la cual nos reveló la presencia de  
una sola bnada, dato que apoya que la proteína obtenida a partir de  
colágena es homogénea.

La presencia de dos componentes fundamentales en los geles  
de acrilamida SDS-UREA podrian deberse a la enzima y a un estado de  
agregación de la misma provocado durante la electroforesis, efecto -  
que puede observarse en otras proteínas (101), en estos casos sería  
necesario carboximetilar los grupos sulfhidrilos, expuestos por el -  
SDS y provocados por el mercaptoetanol, para prevenir la agregación.

Existen datos en la literatura (43) que sugieren la existen -  
cia de distintas formas de agregación de la colagenasa de macrófagos  
alveolares como dímeros o tetrámeros, existiendo cambios reversibles  
de un peso molecular a otro. Por otra parte Nagai ha mencionado que  
la preincubación a 25° C de medios de cultivo de explantes de tejido  
antes de la filtración en Sephadex G-150 elimina un pico de activi -  
dad colagenolítica de alto peso molecular y toda la colagenasa se --  
eluye como una especie única de bajo peso molecular.

Otros datos reportados por Pardo (91) sugieren estados de  
agregación de la colagenasa, para este caso se utilizaron distintas  
preparaciones de colágena y fueron sometidas a electroforesis a pH

8.1 en donde se observa a la colagenasa que migra muy cerca al frente del amortiguador y proteína en la parte superior del gel de manera difusa, el material eluido de la parte superior del gel y el correspondiente a la colagenasa vuelven a correr muestran nuevamente el mismo efecto.

La susceptibilidad de la colagenasa a la acción de la pepsina y resistencia a la tripsina (revelado por electroforesis a pH 8.1) no nos permitió el poder descartar alguna de las bandas por su susceptibilidad a las enzimas empleadas; sin embargo, sabiendo que una de ellas corresponde a un contaminante del sistema empleado, podemos decir que la colagenasa es sensible a la pepsina, dato que no nos sorprende ya que la pepsina ataca los enlaces peptídicos en donde el grupo carbonilo es contribuido por aminoácidos aromáticos y otros, lo que nos indica que la enzima está constituida por alguno de estos aminoácidos.

La resistencia de la colagenasa a la tripsina no está dada por algún tipo de protección proporcionado por la colágena o gelatina como puede observarse en los resultados, por lo que podríamos decir que la enzima no es sensible a la tripsina. Las explicaciones a este dato podrían ser: a) la enzima no posee lisina o arginina, b) la colagenasa posee los dos aminoácidos mencionados, por tanto la ausencia de susceptibilidad está dada por el tipo de conformación.

La ribonucleasa pancreática bovina existe en dos formas A y B, se cree que ambas poseen la misma secuencia de aminoácidos pe-



ro sólo el tipo B es glicosilado y contiene 2.7% W/w de carbohidratos ésta diferencia hace que el tipo B sea más resistente hacia 4 diferentes proteasas, entre ellas tripsina, conservando más del 60% de actividad (102); por otra parte las enzimas glicosiladas presentan estabilidad térmica (103). Sabiendo que la actividad colagenolítica se conserva en preparaciones de colágena gelatinizadas a 60° C por 10 minutos y que la colagenasa mostró resistencia a la tripsina podríamos pensar que se trata de una glicoproteína.

El análisis del sistema de electroforesis en el que aparecía la doble banda nos mostró que geles corridos sin proteína presentaron una banda en ocasiones y que la aparición de dicha banda estaba asociada con la presencia de la doble banda en los geles corridos con colágena; con estos datos se llegó a la conclusión de que la aparición de las bandas en los geles corridos en electroforesis a pH 8.1 correspondían: una a material protéico obtenido de la colágena (colagenasa) y la otra banda a un contaminante del sistema o artefacto dado por él.

El último experimento mencionado en esta tesis se realizó con el objeto de asociar la presencia de la banda en electroforesis a pH 8.1 con la degradación de la colágena.

De los resultados obtenidos con pepsina se observa que las colágenas problemas tratadas a pH ácido mostraron en electroforesis a pH 8.1 disminución de la banda correspondiente a colagenasa, con -

respecto a las colágenas controles, hecho que se asocia con la disminución en la degradación de dichas colágenas problemas cuando se incubaron a  $37^{\circ}$  C por 24 horas.

En la tabla 3 se observa que la colágena problema tratada con pepsina en proporción 10:1 pH 3 presenta un porcentaje de degradación menor (43%) que la colágena problema tratada con pepsina en proporción 100:1 (51% de degradación), datos que se relacionan de manera inversa con las concentraciones de pepsina utilizadas y directamente con la cantidad de colagenasa presente en la colágena, después de ser tratada con pepsina; sin embargo siendo la diferencia de degradación tan pequeña (8%), pudiera no ser significativa y que la concentración de pepsina a una décima parte con respecto a la concentración de la colágena estuviera en exceso. Comparando los problemas de la segunda incubación de las colágenas problema y control (primera incubación) se observa una diferencia franca en el porcentaje de degradación de 56.5 % y 19 % para las colágenas tratadas con pepsina en proporciones 10:1 y 100:1, respectivamente, lo que nos indica que en las colágenas incubadas con pepsina a pH 3 la colagenasa fue atacada parcialmente por la pepsina, por lo que en la segunda incubación las colágenas son capaces de degradarse a  $37^{\circ}$  C, pero el porcentaje de degradación disminuye con respecto a las colágenas incubadas inicialmente a pH 7.4 en donde la pepsina fue inactiva, por lo que la colagenasa unida a colágena no se vió afectada, de ahí que los porcentajes de degradación fueran de 100% y 70% para las colágenas incubadas con pepsina en proporciones 10:1 y 100:1 respectivamente.

## REFERENCIAS

1. Gross, J. in *Comparative Biochemistry* (M. Florin and H. S. Manson, eds.), Vol. 5, Academic, New York. 1963 p 307.
2. Gross, J. and Lapiere, C. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 48: -- 1014, 1962.
3. Harkness, R. D. and Moralee, B.C.: *J. Physiol.*, 132: 502, 1956.
4. Kao, K.Y.T., Hilker, D. M. and McGavack, T. H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 106: 335, 1961.
5. Montfort, I. and Pérez Tamayo, R.: *Lab. Invest.*, 10: 1240, 1961.
6. Morrione, T. G. and Seifter, S.: *J. Exp. Med.*, 115: 357, 1962.
7. Woessner, J.F. Jr.: *Biochem. J.*, 83: 304, 1962.
8. Eisen, A.Z., Gross, J.: *Develop. Biol.*, 12: 408, 1965.
9. Grillo, H. C., McLennan, J. E. and Wolforth, F. G. in *Repair and - Regeneration* (J. E. Dunphy and H. W. Van Winke eds.) Mcgran Hill, New York 1969 p. 185-199.
10. Fullmer, H. M. and Lazarus, G. S.: *Histochem. Cytochem.*, 17: 793 1969.
11. Abramson, M. and Gross, J.: *Ann. Otol. Rhin. Laryngol.*, 80: 177, 1971.
12. Donoff, R. B., McLennan, J. E. and Grillo, H. C.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 227: 639, 1971.
13. Grillo, H. C. and Gross, J.: *Develop. Biol.*, 15: 300, 1967.
14. Brown, S.I. and Hook, C. W: *Trans. Ann. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.*, 74: 375, 1970.
15. Slansky, H. H., Freeman, M. I. and Itoi, M.: *Arch. Ophthalmol.*, 80: 496, 1968.

16. Itoi, M., Gnädinger, M. C., Slansky, H. H. and Dohlman, C. H.: *Exptl. Eye Res.*, 8: 368, 1969.
17. Harris, E. D. Jr., Cohen, G. L. and Krane, S. M.: *Arthr. Rheumat.*, 11: 486, 1968.
18. Evanson, J. M., Jeffrey, J.J. and Krane, S. M.: *J. Clin. Invest.* 47: 2639, 1968.
19. Lazarus, G. S., Decker, J. L., Oliver, C. H., Daniels, J. R., Multz, C. V. and Fullmer, H. M.: *New Eng. J. Med.*, 279: 914 - 1968.
20. Harris E. D., Jr., DiBona, D. R. and Krane, S. M.: *J. Clin. Invest.*, 48: 2104, 1969.
21. Lazarus, G. S., Brown, R. S., Daniels, J. R. and Fullmer, H. M.: *Science*, 199: 1483, 1968.
22. Daniels, J. R., Lian, J. and Lazarus, G. S.: *Clin. Res.*, 17: - 154, 1969.
23. Walker, D. G., Lapiere, C. M. and Gross, J.: *Biochem. Biophys. Res. Common.*, 15: 379, 1964.
24. Fullmer, H. M. and Lazarus, G. S.: *Israel J. Med. Sci.*, 3: 758, 1967.
25. Shimizu, M., Glimcher, M. J., Travis, D. and Goldhaber, P.: - *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 130: 1175, 1969.
26. Aer, J.: *Ann. Med. Exptl. Biol. Fenn.*, 49: 9, 1971.
27. Reddick, M. E., Bauer, E. A., Eisen, A. Z.: *J. Invest. Ophthalmol.* 11: 728, 1972.
28. Montfort, I. Pérez Tamayo, R.: *J. Histochem. Cytochem.*, 23: 910 1975.
29. Montfort, I., Pérez Tamayo, R.: *Connect. Tissue Res.* 3: 245, 1975.

30. Hook, C. W., Bull, F. G., Iwanij, V. and Brown, S. I.: Invest. Ophthalmol., 11: 728, 1972.
31. Harper, E., Bloch, K. J. and Gross, J.: Biochemistry, 10: 3035, 1971.
32. Harper, E. and Gross, J.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 48: 1147, 1972.
33. Nagai, Y. and Hori, H.: Biochim. Biophys. Acta, 312: 742, 1973.
34. Nagai, Y. and Hori, H.: Biochim. Biophys. Acta, 263: 564, 1972.
35. Vaes, G.: Biochem. J., 126: 275, 1972.
36. Sakamoto, S., Goldhaber, P. and Glimcher, J. dato no publicado tomado de la referencia anterior.
37. Fullmer, H. M., Taylor, R. E. and Gothrie, R. W.: J. Dent. Res. 51: Supplement 349, 1972.
38. Harris, E. D. Jr., Evanson, J. M., DiBona, D. R. and Krane, S. N.: Arth. Rheumat., 13: 83. 1970.
39. Abramson, M., Schilling, R. W., Huang, C. C.: Ann. Otol. Rhinol. Laryngol., 84: 158, 1975.
40. McCroskery, P. A., Richards, J. F. and Harris, E. D.: Biochem. J., 152: No 1.
41. Bryan Herd, S.: J. Oral Path., 5: 17, 1976.
42. Ohlsson, K. and Olsson, I.: Eur. J. Biochem., 36: 473, 1973.
43. Birkedal Hansen, H., Taylor, R. E. and Fullmer, H. M.: Biochim. Biophys. Acta, 420: 428, 1976.
44. Eisen, A. Z., Henderson, K. O., Jeffrey, J. and Bradshaw, R. A.: Biochemistry, 12: 7814, 1973.
45. Harris, E. D. Jr., DiBona, D. R. and Krane, S. M.: J. Clin. Invest., 48: 2104, 1969.

46. Nagai, Y., Masiu, Y. and Sakakibara, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 445: 521, 1976.
47. Sakai, T. and Gross, J.: *Biochemistry*, 6: 518, 1967.
48. Harris, E. D. and Krane, S. M.: *New Eng. J. Med.*, 291: 557, 605, 652, 1974.
49. Seifter, S., Gallop, P. M. and Meilman, E. in *Recent Advances in Gelatin and Glue Research* (G. Stainsby, eds.) Pergamon, - London, 1958 p 164- 169.
50. Pérez Tamayo, R. and Rojkind, M.: *The Biochemistry of Diseases*, Vol. 3 (Marcel Dekker Inc.) New York, 1973, P 234.
51. Eisen, A. Z., Bauer, E. A. and Jeffrey, J. J.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 68: 248, 1971.
52. Nagai, Y.: *Mol. Cell Biochem.*, 1: 137, 1972.
53. Kruze, D. and Wojtecka, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 285: 436, 1972.
54. Wize, J., Spota, I., Wojtecka, E., Ksiezny, S. and Dancewicz, A. M.: *Acta Biochem. Polon.*, 22: 230, 1975.
55. Oronsky, A. L., Perper, R. J. and Schoeder, H. C.: *Nature*, -- 246: 417, 1973.
56. Birkedal Hansen, H., Cobb, C. M., Taylor, R. E. and Fullmer, H. M.: *Archs. Oral Biol.*, 20: 681, 1975.
57. Birkedal Hansen, H., Cobb, C. M., Taylor, R. E. and Fullmer, H. M.: *J. Oral Path.*, 3: 232, 1974a.
58. Birkedal Hansen, H., Cobb, C. M., Taylor, R. E. and Fullmer, H.M.: *Archs. Oral Biol.*, 21: 21, 1976.
59. Birkedal Hansen, H., Cobb, C. M., Taylor, R. E. and Fullmer, H. M.: *J. Biol. Chem.*, 251: 3162, 1976.

60. Birkedal Hansen, H., Cobb, C. M., Taylor, R. E. and Fullmer, H. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 438: 273, 1976.
61. Bauer, E. A., Stricklin, G. P., Jeffrey, J. J. and Eisen, A. Z.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 64: 232, 1975.
62. Nagai, Y., Hori, H., Kawamoto, T. and Komiya, M.: *Dinamics of Connective Tissue Macromolecules*, (P. M. C. Burleigh and A. R. Poole eds.) North-Holland Publishing Company.
63. Horwitz, A. L. and Crystal, R. G.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 69: 296, 1976.
64. Bauer, E. A., Eisen, A. Z. and Jeffrey, J. J.: *J. Clin. Invest.* 50: 2056, 1971.
65. Eisen, A. Z., Bauer, E. A. and Jeffrey, J. J.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.A.*, 68: 248, 1971.
66. Abe, A., Nagai, Y.: *J. Biochem. (Tokyo)* 73: 897, 1973.
67. Sakamoto, S., Sakamoto, M., Goldhaber, P. and Glimcher, M. J.: *Calcif. Tissue Res.*, 14: 291, 1965.
68. Woolley, D. E., Roberts, D. R. and Evanson, J. M.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 66: 747, 1975.
69. Ohlsson, K. and Tegner, H.: *Eur. J. Clin. Invest.*, 5: 221, 1975.
70. Ryan, J. M., Woessner, J. F.: *Biochem. J.*, 127: 705, 1972.
71. Woessner, J. F.: *Biochem. J.*, 112: 637, 1969.
72. Halme, J. and Woessner, J. F.: *J. Endocrin.*, 66: 357, 1975.
73. Caputo, C. B., Meadows, D. and Raisz, L. G.: *Endocrinology*, 98: No. 4 1976.
74. Cruess, R. L. and Hong, K. C.: *Calcif. Tissue Res.*, 20: 317, - 1976.
75. Werb, Z., Gordon, S.: *J. Cell Biol.*, 67: 452, 1975.

76. Hook, R. N., Hook, C. W. and Brown, S. I.: Invest. Ophthalmol., 12: 771, 1973.
77. Davis, B. P., Jeffrey, J. J., Eisen, A. Z. and Derby, A.: Develop. Biol., 44: 271, 1975.
78. Berman, M. B., Cavanagli, H. D. and Gage, J.: Exp. Eye Res.,- 22: 209, 1976.
79. Sakamoto, S., Goldhaber, P. and Glimcher, M. J.: Calcif. Tissue Res., 12: 247, 1973.
80. Wahl, L. M., Wahl, S. M., Mergenhagen, S. E. and Martin, G. R.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 71: 3598, 1975.
81. Wahl, L. M., Wahl, S. M., Mergenhagen, S. E. and Martin, G. R.: Science, 187: 261, 1975.
82. Pérez Tamayo, R.: Lab. Invest., 22: 137, 1970;
83. Harris, E. D. Jr. and Krane, S. M.: Arthr. Rheumat., 14: 669, - 1971.
84. Harris, E. D. Jr.: J. Clin. Invest., 51: 2973, 1972.
85. Werb, Z. and Gordon, A.: J. Cell Biol., 67: 452, 1975.
86. Harris, E. D. Jr., Faulkner, C. S. and Brown, R. E.: Clin. Ortho ped., 110: 303, 1975.
87. Bauer, E. A., Eisen, A. Z., Jeffrey, J. J.: Biochim. Biophys. - Acta, 206: 152, 1970.
88. Bauer, E. A., Jeffrey, J. J., Eisen, A. Z.: Biochem. Biophys. - Res. Comm., 44: 813, 1971.
89. Woolley, D. E., Glanville, R. W., Crossley, M. J.: Scand. J. -- Clin. Lab. Invest., 29: 123, 1972.
90. Pardo, A. and Pérez Tamayo, R.: Biochim. Biophys. Acta, 392: -- 121, 1975.



91. Pardo, A. Tesis Doctoral, Facultad de Química, UNAM, 1976.
92. Gross, J.: *J. Exrtl. Med.*, 107: 247, 1958.
93. Nerenberg, S. T.: *Electrophoresis. A practical laboratory manual* (F. A. Davis Co.) Philadelphia 1966.
94. Stagemann, H., Hoppe-Seylers, Z.: *Physiol. Chem*, 311: 41, 1958.
95. Woessner, J. F. Jr.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 93: 440, 1961.
96. Burford, G. D. and Pickering, B. T.: *Biochem. J.*, 128: 941, 1972.
97. Reisfeld, R. A., Lewis, V. J. and Williams, D. E.,: *Nature (Lond.)* 195: 281, 1962.
98. Maizel, J. V. Jr.: *Science*, 151: 988, 1966.
99. Kunitz, M.: *J. Gen. Physiol.*, 30: 291, 1947.
100. Maurer, H. R., *Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Walter de Gruyter) Berlin New York p 20, 1971.
101. Arnold, L. S., Vinuela, E. and Maizel, J. V.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28: 815, 1967.
102. Christensen, T. B. and Ruud, P.: *Int. Res. Commun. Syst. (Biochem)*, 2: 1709. 1974.
103. Christensen, T. B. and Vergarud, G.: *Int. Res. Commun. Syst. - (Biochem.)*, 2: 1311, 1974.



## Impresiones Lupita

MEDICINA No. 25

FRACC. COPILCO UNIVERSIDAD

CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.

TEL. 548-49-79