



Nº 82
REV.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"METODO MODIFICADO
PARA EXTRACCION DE COLAGENA
NATIVA A PARTIR DE PIEL
DE OVINO NO-NATO"



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

MEXICO, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



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.

=ANTECEDENTES=

1.- INTRODUCCION.

Cuando pensamos en la variedad de estructuras que componen a un organismo, nuestra mente se pierde entre las dimensiones y las funciones que posee cada una de sus partes, y si hablamos de uno pluricelular, entonces la complejidad es todavía mayor pues no solamente se puede considerar a la célula como la única especie presente, sino que es necesario incluir algunas estructuras intercelulares como parte integral de ese ser. En el presente trabajo, me referiré precisamente a una proteína extracelular denominada colágena, con una gran importancia e indudablemente la más común en el reino animal, ya que constituye parte de la Matriz Extracelular (MEC) en todos los animales pluricelulares y es la más abundante en el tejido conectivo (más del 20 % de la masa corporal total [Jiménez S.A. 1988]). El tejido conectivo, por su parte, comprende una gran masa de tejido intersticial y está compuesto por una sustancia basal que rodea a las fibrillas de la colágena, estos componentes, denominados matriz extracelular, a su vez embeben a las células en tejidos y órganos a lo largo de todo el cuerpo. De tal forma que dicha matriz extracelular (MEC) se encuentra formada de glicosaminoglucanos que consisten en hialuronato, condroitin sulfato, dermatán sulfato, queratán sulfato, heparán sulfato y heparina. Con excepción del hialuronato, los demás glucosaminoglucanos se encuentran siempre unidos covalentemente a proteínas, por lo que su denominación cambia a proteoglucanos. En cuanto a las proteínas presentes en la MEC, cabe mencionar principalmente a la colágena, además de otras proteínas como son: la elastina, la fibronectina y la laminina, cuyas funciones diversas al igual que la colágena van desde estructurales hasta informacionales en sistemas de diferenciación ("Hay E.D., 1981).

No obstante, la colágena es conocida desde hace mucho tiempo; ya era utilizada en la época prehispánica como pegamento cuando se le procesaba en forma desnaturalizada; es decir, hirviendo en agua extremidades de animales (principalmente hueso y cartilago) para después aplicarla como adhesivo o como base en el tratamiento de lienzos para pintar y otro tipo de obras de arte.

Así, las proteínas colagénicas se consideran como una familia de moléculas con estructuras estrechamente relacionadas pero variando su distribución en los tejidos, los diferentes tipos de ellas pueden ser divididos en cuatro grandes grupos de acuerdo a su localización y función fuera de la célula:

1. La colágena intersticial fibrilar, que es el componente principal y más abundante en la mayoría de los tejidos conectivos, tales como la piel, el hueso, el tendón, el ligamento y el cartilago.
2. La segunda clase comprende a la colágena no fibrosa de las membranas basales.
3. La tercera clase está formada por un grupo menos definido de colágena pericelular, tal vez localizada en la parte externa del esqueleto de la célula.
4. Además, existe una cuarta clase de colágena que comprende varios productos genéticos diferentes de distribución variable que no pueden ser clasificados entre los primeros tres grupos (*Jiménez S.A. 1988)

Los grupos antes mencionados, contienen tipos de colágena que participan tanto en los sistemas de diferenciación tisular como en la información intercelular. Sin embargo, entre las principales características de las colágenas fibrilares se encuentra la capacidad de las moléculas monoméricas para polimerizar lateralmente, así como en asociación "cabeza - cola" para la formación de largos agregados fibrilares, mientras que las colágenas no fibrilares se agregan alrededor de la periferia de las fibrillas empaquetadas limitando de tal forma su tamaño; así como otro grupo diferente se encarga del anclaje de las fibrillas a las membranas basales (*Clark R. y Henson P,1988).

De esta manera, al menos 24 genes diferentes codifican para un determinado patrón de repetición (cada 3er. aminoácido es Glicina [GII]) y para grandes cantidades de aminoácidos poco comunes como hidroxiprolina e hidroxilisina (OHPro y OHLis). Estos genes han sido desarrollados por duplicación y divergencia de una secuencia ancestral común, cada tipo tiene una estructura primaria única y ha sido identificado claramente como el producto de un gen en particular (*Shaw L.M., et al, 1991).

Los genes que codifican para las cadenas de algunos de los diferentes tipos de la colágena en humanos se encuentran en la siguiente tabla:

CADENA Y TIPO DE COLAGENA	LOCUS CROMOSOMAL
Pro- α 1(I)	17q21 - 17q22
Pro- α 2(I)	7q21 - 7q22
Pro- α 1(II)	12q13.1 - 12q13.2
Pro- α 1(III)	2q24.3 - 2q31
Pro- α 1(IV)	13q33 - 13q34
Pro- α 2(IV)	13q33 - 13q34
Pro- α 2(V)	2q24.3 - 2q31
Pro- α 1(VI)	21q223
Pro- α 2(VI)	21q223
Pro- α 3(VI)	2q37
Pro- α 1(IX)	6q
Pro- α 1(XI)	1p21

(*Sandell L.J. & Boyd Ch.D., 1990)

Una muestra de la complejidad genética de esta familia de proteínas, son las extensas modificaciones postraduccionales necesarias para llevar a cabo la transformación del precursor hasta la molécula de la colágena. Por lo tanto, las enfermedades de la colágena son raras, extremadamente heterogéneas clínica y genéticamente, y muy probablemente representen nuevas mutaciones.

2.- TIPOS DE COLAGENA, ESTRUCTURA Y CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS.

Los estudios bioquímicos en las colágenas solubles de varias especies, indican que los diferentes organismos han desarrollado sistemas de selección y adaptación, no solo a través de modificaciones en la estructura primaria de las cadenas alfa (α), sino por medio de la elaboración de múltiples genes para su síntesis. Por ejemplo, en la mayoría de las colágenas de los vertebrados, la secuencia de aminoácidos (estructura primaria) de una de las tres cadenas que componen a la molécula (la cadena $\alpha 2$) difiere significativamente del otro tipo (las cadenas $\alpha 1$), lo que lleva a estructurar a la molécula en dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$ ($\alpha 1_2\alpha 2$). Existe evidencia de que las tres cadenas α en las colágenas de algunos vertebrados poco evolucionados e invertebrados son idénticas, y que organismos aún más primitivos pueden tener solamente un gen estructural para la síntesis de colágena. Por lo que la información genética para la síntesis de colágena puede ir aumentando conforme se asciende en la escala evolutiva (*Miller E.J., 1971).

BOVINE GLU-LEU-SER-TYR-SLV-TYR-ASP-GLU-LYS-SER-THR-SLV-ILE-SER-VAL-PRO-SLV-PRO-MET
 HUMAN GLU-MET-SER-TYR-SLV-TYR-ASP-GLU-LYS-SER-ALA-SLV-VAL-ALA-VAL-PRO-SLV-PRO-MET
 RAT GLU-MET-SER-TYR-SLV-TYR-ASP-GLU-LYS-SER-ALA-SLV-VAL-SER-VAL-PRO-SLV-PRO-MET
 HUMAN GLU-MET-SER-TYR-SLV-TYR-ASP-GLU-LYS-SER-ALA-SLV-VAL-SER-VAL-PRO-SLV-PRO-MET
 HUMAN GLU-LEU-SER-TYR-SLV-TYR-ASP-GLU-LYS-SER-THR-SLV-SER-VAL-PRO-SLV-PRO-MET

FIG. 1 Secuencias de cadena $\alpha 1$ de los extremos no entrecruzados (telopeptidos) en las colágenas de diferentes especies.

Ciertos dominios funcionales comunes pueden sin embargo ser identificados; por ejemplo, las regiones entrecruzadas y el sitio de ruptura por colagenasa son fuertemente conservados en las colágenas tipo I, II, y III.

Generalmente se ha convenido que la molécula de colágena nativa tiene una estructura de triple cadena con superenrollamiento y una nomenclatura establecida para la composición de las subunidades de las diferentes moléculas de la colágena es: $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$ para el tipo I, $[\alpha 1(II)]_3$ para el tipo II, etc.

Como ya he mencionado, una forma funcional de algunos de los tipos de la colágena es la fibrilla, y el término fibra de colágena está reservado normalmente para los agregados fibrilares orientados vistos por el microscopio de luz. Por lo anterior, la colágena tiene la capacidad de formar estructuras como hebras y cintas (tendones y ligamentos), láminas ondulares (piel y fascia), membranas de filtración (glomérulo), soporte esquelético reforzado con sales minerales (hueso y dentina), materiales de sostén lubricados con proteoglicanos (cartilago y disco intervertebral) y otros tejidos especiales que deben ser resistentes y aún tener propiedades poco usuales tales como la transmisión de la luz en la córnea y resistencia a la fatiga de las válvulas cardiacas (*Eyre D. R., 1980). La colágena también se encuentra siempre presente como un componente de los tumores sólidos (*Moro L. y Smith B., 1977). Además, la colágena tiene una amplia participación en funciones no estructurales, como lo es en la diferenciación de algunos tejidos junto con otros componentes de la matriz extracelular, proporcionando información para el desarrollo de determinadas estirpes celulares.

CLASIFICACION DE LOS DIFERENTES TIPOS DE COLAGENA

COLAGENA TIPO I:

Este tipo de colágena es el más abundante en los organismos vertebrados. Es un heterotrímero que consiste de 2 cadenas $\alpha 1(I)$ idénticas y una $\alpha 2(I)$, poseen un peso molecular (P.M.) de 300 KiloDaltons (KD). La localización por microscopía electrónica muestra fibras con diámetro promedio de 40-60 nm y un bandeo cruzado en intervalos de 67 nm. La colágena tipo I se encuentra asociada a otras moléculas de colágena (tipos III, IV, VI, XII y XIV), así como a otras proteínas no colagénicas, generalmente en matriz no cartilaginosa.

Una variedad de este mismo tipo de colágena (tipo I), es el trímero de $\alpha 1(I)$, que es relativamente poco común. Se encuentra en cultivo de condrocitos crecidos en presencia de 5-bromo-2'-desoxiuridina o en condiciones de dediferenciación, en patologías de encía, cultivos gingivales de teratocarcinoma murino. También se encuentra *in vivo* en tumores de hueso y cartilago de ratón inducido por virus de Polioma y en piel de humanos adultos normales (*Uitto J., 1979).

COLAGENA TIPO II:

La colágena tipo II es la contraparte cartilaginosa al tipo I, ésta se encuentra predominantemente en cartilago hialino. Es un homotrímero que consiste en tres cadenas $\alpha 1(II)$, con P.M. de 300 KD. A diferencia del tipo I, colágena tipo II aparece en cartilago como fibrillas sin bandeó cruzado de 25 nm de diámetro. Este tipo de colágena interacciona con otras proteínas de cartilago (proteoglucanos, glucoproteínas estructurales y tipos IX, X y XI de colágena) para formar la matriz del cartilago. También forma elementos fibrosos en otros tejidos, tales como notocorda, núcleo pulposo y humor vítreo en el ojo.

Una de las características de este tipo de colágena es que contiene 9 veces más carbohidratos unidos a hidroxilisina que la tipo I de hueso y piel, pero es menos estable al calor (*Miller E.J. 1971).

COLAGENA TIPO III:

Este tipo de colágena se encuentra en asociación con fibras más grandes de colágena tipo I en la mayoría de los tejidos conectivos extensibles como lo es la dermis. En contraste al procesamiento proteolítico de las procolágenas tipo I y II, las moléculas tipo III retienen el dominio globular N-terminal (en su estado de procolágena), observándose una periodicidad en "rosario" al observar al microscopio electrónico. La molécula tipo III aparece como una especie homotrimérica $\alpha 1(III)_3$, aunque algunos cultivos de células endoteliales producen una menor variante de la cadena $\alpha 1(III)$. El P.M. de la molécula es de 300 KD. y se encuentra presente en piel, aorta y tendón. Por otro lado, está bien establecido que las fibras reticulares constan de largas moléculas del tipo III. Por otro lado, los residuos de cisteína en el extremo carboxilo terminal genera las interacciones disulfuro (S-S) que son las responsables del entrecruzamiento en dicha región.

COLAGENA TIPO IV:

La colágena de membrana basal, tipo IV ha sido localizada en todas las membranas basales en asociación con otras proteínas (laminina, proteoglucanos de heparán sulfato, entactina y nidógena). Las moléculas de colágena tipo IV existen en dos formas: heterotrímeros $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ y homotrímeros $\alpha 1(IV)_3$, el P.M. es de 450 KD. A diferencia

de los tipos anteriores. por comparaciones de las secuencias de aminoácidos de la cadena $\alpha 1(IV)$ y $\alpha 2(IV)$, indicaron una complejidad adicional para este tipo, que consiste en 21 aminoácidos en la cadena $\alpha 2(IV)$, que forman una curvatura estabilizada por puentes disulfuro al final de la región helicoidal de la molécula. La asociación de las moléculas de la colágena tipo IV conforman un retículo más laxo que las fibras de las colágenas intersticiales. Esta característica junto con la susceptibilidad al ataque proteolítico, se debe a la presencia de dominios "no-helicoidales" en la molécula madura de colágena tipo IV.

COLAGENA TIPO V:

Un componente menor de la mayoría de los tejidos conjuntivos, la colágena tipo V, es sintetizada por todas las células somáticas. Tiene una localización característica pericelular en ciertos tipos celulares y está involucrada en la formación del exoesqueleto de las células de músculo liso (*Rhodes R.K. y Miller E.J., 1978). Los filamentos tienen un grosor de 8-12 nm, han sido encontrados solamente en el intersticio y están estrechamente asociados con la membrana celular de las células de músculo liso. Existen al menos tres especies moleculares del tipo V, la forma que prevalece es el heterotrímero compuesto por dos cadenas $\alpha 1(V)$ y una $\alpha 2(V)$ (anteriormente conocidas como cadenas A y B [*Sage H. y Bornstein P., 1979]), con un P.M. de 300 KD. En otros tejidos tales como la córnea, la colágena tipo V forma junto con las fibrillas del tipo I heterofibrillas como parte del intersticio. En ciertas enfermedades como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), la colágena tipo V del mesangio puede servir como el receptor de DNA y/o Complejos Inmunes-DNA en Lupus Nefritis. También se ha demostrado que la colágena tipo V purificada de cartilago contiene solamente la cadena $\alpha 1(V)$.

La estequiometría de las cadenas en la colágena tipo V ha sido más complicada por el descubrimiento de una tercera cadena presente solamente en algunos tejidos $\alpha 3(V)$, antes denominada αC , ha sido aislada de membrana sinovial y placenta por precipitación diferencial con cloruro de sodio. (*Bornstein P. y Sage H., 1980). Se han encontrado secuencias cortas de este heterotrímero de cadenas $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ en estructuras como membranas basales (*Chung E. et. al., 1976).

COLAGENA TIPO VI:

La colágena tipo VI fue llamada inicialmente "colágena íntima". Los filamentos de colágena tipo VI se encuentran en mayor proporción en el intersticio y frecuentemente son encontrados en estrecha asociación con colágena tipo I. La secuenciación de aminoácidos, hecha recientemente junto con estudios de ADN recombinante han confirmado la presencia de tres cadenas polipeptídicas diferentes $\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$ y $\alpha 3(VI)$, el P.M. es de 570 KD y se encuentra en la íntima de la aorta, placenta, piel riñón y músculo. La molécula presenta secuencias de Arg-Gli-Asp con un núcleo central colagénico, las cuales son estructuras unidas potencialmente a células.

COLAGENA TIPO VII:

La colágena tipo VII ha sido aislada como un componente colagénico menor en membranas placentarias. Su localización es discreta en órganos como la piel, sus dimensiones moleculares sugieren su participación única en las fibrillas de anclaje, donde toman lugar las interacciones con los tipos I, III y IV de colágena, así como con la lámina densa. Solamente se ha encontrado a esta molécula en forma homotrímica, de P.M. 960 KD.

COLAGENA TIPO VIII:

La colágena tipo VIII fue descubierta primero como una proteína secretada en cultivos de células endoteliales, y de esta manera fue inicialmente llamada colágena endotelial. Aunque existe alguna evidencia para la presencia de colágena tipo VIII en tejidos como la membrana de Descemet, la información estructural y bioquímica disponible proviene de estudios in vitro. Esta colágena se encuentra como un homotrímero $\alpha 1(VIII)_3$ de P.M. 500 KD.

COLAGENA TIPO IX:

La colágena tipo IX es un componente menor de cartílago (junto con los tipos X y XI). Esta molécula de colágena está compuesta de tres dominios colagénicos espaciados por cuatro dominios no colagénicos. Se ha demostrado que la colágena tipo IX es un heterotrímero que consiste de tres cadenas polipeptídicas diferentes $\alpha 1(IX)$, $\alpha 2(IX)$ y

$\alpha 3(\text{IX})$, de P.M. 500 KD. La cadena $\alpha 2(\text{IX})$ es sustituida con una cadena simple del glucosaminoglicano condroitín sulfato. Estudios recientes han localizado a la colágena tipo IX en estrecha asociación con las fibras de la colágena tipo II del cartilago. La digestión con pepsina del cartilago de estomón de pollo libera colágenas tipo II, IX y XI en proporción 8:1:1. Se han encontrado entrecruzamientos covalentes de los tipos de colágena II y IX en el cartilago.

COLAGENA TIPO X:

La colágena tipo X representa otra proteína específica de cartilago hipertrófico. Esta molécula es un homotrímico el cual contiene un dominio corto helicoidal con un dominio globular en uno de sus extremos $\alpha 1(\text{X})_3$, de P.M. 180 KD. Semejante a la colágena tipo IV, que la colágena X ha demostrado por estudios biosintéticos no tiene un procesamiento proteolítico de las secuencias no helicoidales. A diferencia de las colágenas cartilaginosas, ésta se encuentra solamente presente en cartilago que contenga condrocitos hipertróficos, por ejemplo, en la placa de crecimiento y callo de la fractura. Técnicas inmunohistológicas por microscopía electrónica (ME) indican que la localización de la colágena tipo X muestra fibrillas amorfas con un diámetro de aproximadamente 15 nm y algunas veces con una ligera periodicidad. Aunque inicialmente se pensó que estuviera involucrada en la calcificación de matriz de cartilago, un estudio reciente de ME no mostró evidencia de colágena tipo X en la periferia de sitios focales de calcificación temprana.

COLAGENA TIPO XI:

La colágena tipo XI, previamente referida como $1\alpha 2\alpha 3\alpha$ o colágena tipo K, ha sido representada como un heterotrímico, que consiste de tres diferentes cadenas de colágena de P.M. 450 KD. Además para cartilago hialino, la colágena tipo XI, se ha encontrado como un componente menor en el disco intervertebral, oreja, humor vítreo y la cubierta de la notocorda. Las cadenas de colágena tipo XI tienen ciertas similitudes a las cadenas de las colágenas II y V con respecto a estudios químicos e inmunológicos.

COLAGENA TIPO XII:

La colágena tipo XII, fue descubierta por clonación de ADNc de tendón de embrión de pollo en una genoteca. Recientemente fragmentos colagénicos identificados como colágena tipo XII han sido aislados por digestión con pepsina de tendón de embrión de pollo. Aunque homóloga a la colágena tipo IX a nivel genético, se requieren nuevos estudios para determinar si está estrechamente asociada a la colágena tipo I y/o si es análoga a los tipos IX / II en cartilago.

COLAGENA TIPO XIII:

La colágena tipo XIII está descrita como una colágena humana no fibrilar de bajo P.M. Su aislamiento y parcial caracterización por clonación de cDNA de la cadena $\alpha 1$ de la colágena tipo XIII ha sido descrito. La síntesis de esta colágena se ha demostrado en cultivos de fibroblastos de piel normal de humanos y también en una línea celular tumoral humana, la HT-1080. Esos estudios revelan procesamientos distintos en el ARN mensajero (ARNm), lo que da origen a cuatro moléculas diferentes de la proteína. (*Stewart T.E.et.al.,1989, *Jimenez S.A., 1988.).

COLAGENA TIPO XIV:

Este tipo de colágena se encuentra en estudio, por lo que se sabe muy poco acerca de su estructura. La colágena tipo XIV tiene dominios de triple hélice homólogos en un 60% con los dominios de la colágena tipo XII; al menos la cadena $\alpha 1(XIV)$ y $\alpha 1(XII)$ son codificadas por una secuencia similar a nivel de cDNA.

Esta colágena junto con los tipos IX y XII forman un grupo aparte dentro de la superfamilia de las colágenas, estas se denominan CAFTI, Colágenas Asociadas a Fibrillas con Triple-hélices Interrumpidas (FACIT, Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple-helices, siglas en inglés).

Las colágenas CAFTI (tipos IX, XII y XIV) han sido agrupadas juntas en una subclase especial debido a que comparten regiones con gran homología y tienen características estructurales únicas. La característica más relevante de este grupo, es que las moléculas presentan más de un dominio de triple hélice (con repetición de la secuencia Gli-X-Y

característica de los dominios colagénicos) separado por segmentos que no son helicoidales. Estos tipos no tienen el procesamiento proteolítico (como ocurre en la forma precursora más grande) tal como las colágenas fibrilares y de esta manera no son secretadas como procolágenas. Además, las proteínas CAFTI no se presentan como polímeros solos, sino que están asociadas con fibrillas compuestas por colágenas fibrilares. Su localización y la diversidad de los dominios perifibrilares, sugieren que la expresión regulada de los diferentes componentes CAFTI pueden representar parte de las bases moleculares para la diversidad estructural de la colágena del tejido conectivo (Shaw L.M. y Olsen B.R., 1991).

3.- ESTRUCTURA

Los estudios acerca de la molécula de la colágena han mostrado un intenso grado de uniformidad en la naturaleza general de la composición de los aminoácidos, dicha composición fue conocida en los años 40. Considerando el número fraccional de residuos en la cadena polipeptídica, es bien conocido que Glicina (Gly) se encuentra como un tercio del total de los aminoácidos presentes en una variedad de muestras estudiadas, incluyendo no solamente a la colágena de los mamíferos, sino también de los anfibios y las aves.

La consecuencia de que cada tercer residuo sea Gly, es el sentido y el giro de cada una de las cadenas α en la triple hélice, en donde el carbono de la Gly está ubicado al centro de la molécula y solo hay espacio para dos átomos de Hidrógeno en la posición α , pero no es así para los carbonos exteriores (carbono β) que interactúan con otros átomos de carbono diferentes.

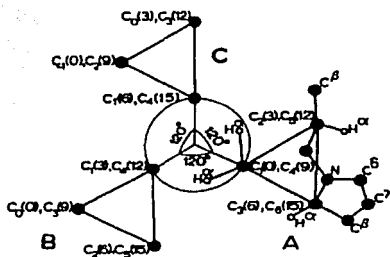


FIG.2 Proyección de la estructura de la triple hélice de la colágena.

Por otro lado, las tres cadenas α de la molécula están unidas entre sí por puentes de hidrógeno intercadena, y los átomos de carbono β se unen covalentemente al carbono α de la GII interior.

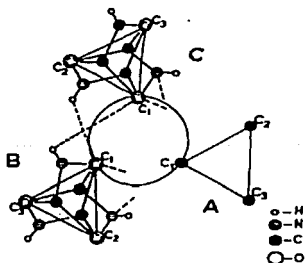


FIG. 3 Formación de los puentes de hidrógeno intercadena.

La estructura superenrollada de la colágena se debe a su "empacamiento" molecular, mientras que el carbono 4 se ubica sobre el carbono 1, éste gira en un ángulo de

aproximadamente 30° sobre el eje central. Como una consecuencia, los átomos de carbono 1 tienen un giro de -110° entre ellos, llevando a 3.3 unidades de aminoácido por vuelta.

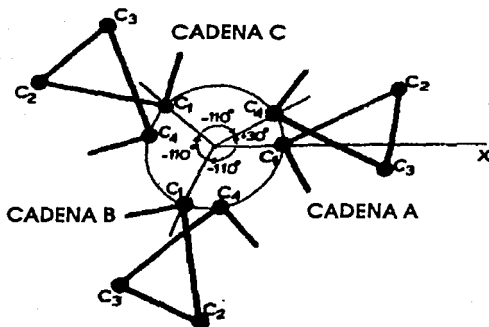


FIG.4 Estructura superenrollada de la colágena.

Otra característica significativa de la composición de aminoácidos de la colágena, es que la prolina (Pro) junto con la hidroxiprolina (OHPro) forman aproximadamente el 25 % de los residuos en la cadena a de esta proteína. La consecuencia de ello es que la unión peptídica que une el aminoácido previo al residuo del iminoácido (Pro o OHPro) tiene relativamente poca libertad de rotación en la unión nitrógeno-carbono (N-C). Esto impone una considerable rigidez a la molécula de la colágena requerida para estabilizar su estructura de la cadena. Considerando a los otros residuos de aminoácidos, la alanina (Ala) constituye aproximadamente el 10 % y las cadenas laterales polares, como la

arginina (Arg), lisina (Lis), ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu), componen el 20 % de los 1014 residuos por los que está formada cada cadena en toda su extensión. Aunque ellos no jueguen un papel esencial en la formación y la estructura de la triple hélice, son importantes en las uniones intercadena, lo cual lleva a la formación de las fibrillas (*Ramachandran G.N. y Reddi A.H., 1976).

pGlu-Het-Ser-Tyr-Gly-Tyr-Asp-Glu-Lys-Ser-Ala-Gly-Val-Ser-Val-Pro-

Fig. 2.

1 Gly-Pro-Met-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Arg-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-Gln-Gly-Phe-Gln-Gly-Pro-Hyp-
 23 Gly-Glu-Hyp-Gly-Glu-Hyp-Gly-Ala-Ser-Gly-Pro-Met-Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Lys-Asn-Gly-Asp-Asp-
 35 Gly-Glu-Ala-Gly-Lys-Pro-Gly-Arg-Hyp-Gly-Gly-Arg-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Gln-Gly-Ala-Ser-Gly-Lys-Hyp-Gly-Thr-Ala-
 52 Gly-Leu-Hyp-Gly-Ser-Met-Gly-His-Arg-Gly-Phe-Ser-Gly-Leu-Asp-Gly-Ala-Lys-Gly-Asn-Thr-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Lys-
 120 Gly-Glu-Hyp-Gly-Ser-His-Gly-Gln-Ala-Gly-Ala-Hyp-Gly-Gln-Het-Gly-Pro-Arg-Gly-Leu-Hyp-Gly-Glu-Arg-Gly-Arg-Hyp-
 136 Gly-Pro-Hyp-Gly-Ser-Ala-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Asp-Gly-Ala-Val-Gly-Ala-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Thr-Gly-Pro-Thr-
 161 Gly-Pro-Hyp-Gly-Lys-Hyp-Gly-Ala-His-Gly-Ala-His-Gly-Glu-Ala-Gly-Pro-Gln-Gly-Ala-Arg-Gly-Ser-Gly-Gly-Pro-Gln-
 190 Gly-Val-Arg-Gly-Glu-Hyp-Gly-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Hyp-Gly-Hyp-Gly-Pro-Ala-Arg-Gly-His-
 217 Gly-Ala-Lys-Gly-Ala-Asn-Gly-Ala-Hyp-Gly-His-Ala-Gly-Ala-Hyp-Gly-Phe-Hyp-Gly-Ala-Arg-Gly-Pro-Ser-Pro-Gln-
 244 Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-Lys-Gly-Asn-Ser-Gly-Glu-Hyp-Gly-Ala-Hyp-Gly-Ala-Lys-Gly-Lys-Thr-Gly-Ala-Lys-
 271 Gly-Glu-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Val-Gln-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gln-Gly-Lys-Arg-Gly-Ala-Arg-Gly-Lys-Hyp-Gly-
 286 Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Lys-Gly-Pro-Ala-Gly-Arg-Gly-Thr-Hyp-Gly-Gly-Hyp-Gly-Ser-Arg-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Asp-Gly-Val-Ala-
 375 Gly-Pro-Lys-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Arg-Gly-Thr-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Lys-Gly-Ser-Hyp-Gly-Glu-Ala-Gly-Arg-Hyp-
 391 Gly-Glu-Ala-Gly-Leu-His-Gly-Ala-Lys-Gly-Leu-Thr-Gly-Ser-Hyp-Gly-Ser-Hyp-Gly-Pro-Asp-Gly-Lys-Thr-Gly-Pro-Hyp-
 409 Gly-Pro-Ala-Gly-Gln-Asp-Gly-Arg-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Arg-Gly-Gln-Ala-Gly-Val-Net-Gly-Pro-Hyp-
 433 Gly-Lys-Asp-Gly-Glu-Ala-Gly-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Arg-Gly-Val-Hyp-Gly-Ala-Val-Gly-Pro-Ala-
 440 Gly-Ser-Hyp-Gly-Thr-Gln-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Gln-Gly-Ala-Gly-Lys-Hyp-Gly-Glu-Gly-Val-Hyp-
 461 Gly-Asp-Leu-Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Ala-Arg-Gly-Glu-Arg-Gly-Pro-Hyp-Gly-Glu-Arg-Gly-Val-Gln-Gly-Pro-Hyp-
 516 Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Ala-Ser-Gly-Ala-His-Gly-Asn-Asp-Gly-Ala-Lys-Gly-Asp-Ala-Gly-Ala-Hyp-Gly-Ala-Hyp-
 548 Gly-Ser-Gln-Gly-Ala-Hyp-Gly-Leu-Gln-Gly-Net-Hyp-Gly-Glu-Arg-Gly-Ala-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Lys-Gly-Asp-Arg-
 640 Gly-Asp-Ala-Gly-Pro-Lys-Gly-Ala-Asp-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Asp-Gly-Val-Arg-Gly-Leu-Thr-Gly-Pro-His-Gly-Pro-Hyp-
 692 Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Hyp-Gly-Asp-Lys-Gly-Gln-Ala-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Ala-Gly-Thr-Arg-Gly-Ala-Hyp-Gly-Asp-Arg-
 721 Gly-Glu-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Asp-Gly-Gln-Hyp-Gly-Ala-Gly-Gln-Hyp-
 845 Gly-Asp-Ala-Gly-Ala-Lys-Gly-Asp-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-His-Gly-Pro-His-Gly-Ala-Val-
 676 Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-His-Gly-Ala-Arg-Gly-Ser-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Thr-Gly-Phe-Hyp-Gly-Ala-Ala-Gly-Arg-Val-
 703 Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Lys-Hyp-Gly-Ser-Lys-Gly-Pro-Arg-
 730 Gly-Gly-Thr-Gly-Pro-Ala-Gly-Ser-Hyp-Gly-Gly-Val-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Lys-Gly-Ala-Hyp-
 757 Gly-His-Asn-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Hyp-Gly-Thr-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly-His-Ala-Gly-Gln-Arg-Gly-Val-Val-Gln-Leu-Hyp-
 764 Gly-Glu-Arg-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Ser-Gly-Gly-Pro-Gly-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Ser-
 811 Gly-Glu-Arg-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Met-Gly-Pro-Hyp-Gly-Leu-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Gly-Ser-Gly-Arg-Gly-Gly-Ala-Hyp-
 828 Gly-Ala-Gln-Gly-Ser-Hyp-Gly-Arg-Asp-Gly-Ser-Hyp-Gly-Ala-Lys-Gly-Asp-Arg-Gly-Glu-Thr-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Hyp-
 865 Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Hyp-Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-Val-Gly-Pro-Ala-Gly-Lys-Ser-Gly-Ser-Arg-Gly-Glu-Thr-Gly-Pro-Ala-
 892 Gly-Pro-His-Gly-Pro-Val-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Arg-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Arg-Gly-Asp-Pyl-Gly-Gln-Thr-
 919 Gly-Gln-Gly-Asn-Arg-Gly-His-His-Gly-His-Arg-Gly-Phe-Ser-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Pop-Gly-Ser-Hyp-
 946 Gly-Gln-Gly-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Ser-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ser-Ala-Gly-Ser-Hyp-Gly-Lys-Asp-
 973 Gly-Leu-Arg-Gly-Leu-Hyp-Gly-His-Gly-Hyp-Gly-Pro-Arg-Gly-Arg-Thr-Gly-Asn-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-
 1000 Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Phe-

Ser-Gly-Gly-Tyr-Asp-Leu-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Phe-Pro-Gln-Gln-Gln-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg-Tyr-T

FIG. 5 Secuencia de aminoácidos de la cadena $\alpha 1$ de la colágena en la piel de rata (residuos 1-402) y ovino (residuos 403-1011), el N-terminal es de rata y el C-terminal es de ovino. Las regiones no helicoidales están separadas de la región del triplete y no están numeradas. (*Hulmes D.J.et.al,1973).

Las regiones terminales amino (N) y carboxilo (C) de las cadenas α en la colágena tipo I, llamadas telopéptidos, consisten en secuencias de 10-25 residuos que no contienen GII en cada tercera posición, como se encuentra en el resto de la molécula y por lo tanto no pueden tener una estructura del tipo de la triple hélice. Esas regiones, son los sitios de donde los residuos de Lis originan los entrecruzamientos responsables de la orientación en la molécula para la formación de las fibrillas. El residuo de Lis en la posición 9 es convertido al aldehído de alisina, el cual es un precursor de los entrecruzamientos. Se sabe que en algunos casos, primero se hidroxila y luego se convierte en hidroxialisina, que también es un precursor de entrecruzamientos. En el caso de la Pro, el proceso de hidroxilación ocurre durante la síntesis de las cadenas polipeptídicas hasta que suficiente OHPro está formada (4-OHPro y 3-OHPro) para hacer más estable a la molécula, la cantidad de hidroxilación requerida en general es menor a la cantidad posible.

Sin embargo, las moléculas de la colágena en la fibra "nativa" están escalonadas por múltiplos de 234 residuos, a este valor se le ha referido como D. Este efecto es originado por los entrecruzamientos de los residuos de Lis 9 y 1044 de las regiones terminales no-helicoidales de la molécula. Si se asume que estos telopéptidos son extendidos con un espaciamiento de residuo similar al espaciamiento en la hélice, entonces parte de los residuos 9 y 1044 de una cadena α deberían tener contacto con las moléculas adyacentes escalonadas por D, 2D, 3D y 4D.

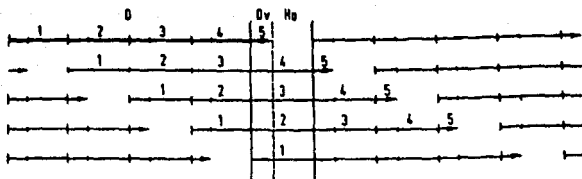


FIG.6 Representación esquemática del arreglo axial de las moléculas de la colágena intersticial. Las moléculas están separadas una de otra por la distancia D de 234 aminoácidos o 670 Angstroms.

Dado que la distancia entre los residuos 9 y 1044 es de 1035 residuos o $4.42 D$ ($1035/234$), el residuo 1044 tendrá contacto con moléculas adyacentes $0.42D$ después de los valores integrales de D del residuo 9 (Ramachandran G.N. y Reddi A.H., 1976), es decir que la molécula de la colágena tiene una longitud de $4D + D/3$, y las moléculas se superponen una longitud de $D/3$. Esto lleva a dos diferentes densidades de regiones empacadas a lo largo de la fibrilla, una zona de superposición "Densa" $D/3$ con cinco moléculas por sección cruzada y una zona "Vacía" $2D/3$ conteniendo cuatro moléculas por sección cruzada (*Kühn K., 1982).

Por otro lado, se ha reportado que proteínas análogas a fibronectina pero específicas para condrocitos (condronectina) y células epiteliales (laminina) se unen específicamente a esas células y sus respectivas colágenas (*Cholappadi V. S., et. al.,1977)

4.- BIOSINTESIS DE LA COLAGENA.

Las moléculas de la colágena son principalmente sintetizadas por las células del mesénquima tales como los fibroblastos, osteoblastos y condroblastos, (10 % de su producción proteica está destinada a la colágena), además de sintetizarse en menor proporción por otras células. La biosíntesis de la colágena sigue los principios básicos de la

biosíntesis de proteínas. Sin embargo, en este caso hay varias reacciones únicas y una característica especial es que las cadenas polipeptídicas iniciales son modificadas por varios pasos post-traduccionales; o sea, después de que toda la información fue traducida por el ARN mensajero (ARNm) correspondiente.

TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN:

Como ocurre con otras proteínas, en el núcleo se transcribe el ARNm del ácido desoxirribonucleico (ADN) y las cadenas polipeptídicas son sintetizadas en los complejos ribosomales que contienen al ARNm. Además, en la biosíntesis ribosomal de la colágena existen dos características no usuales. Los dos aminoácidos característicos de la colágena OHPro y OHLis, no son incorporados directamente en las cadenas polipeptídicas, sino que son derivados de Pro y Lis que se hidroxilan solamente después de que han sido incorporados por uniones peptídicas. Otra característica interesante en la biosíntesis ribosomal de la colágena, es que las cadenas polipeptídicas sintetizadas inicialmente son cadenas pro α , debido a que las extensiones peptídicas en sus extremos son aproximadamente 40-50 % más grandes que en las cadenas α , esas extensiones difieren en la composición de aminoácidos de la región colagénica. Otra diferencia importante es que las extensiones no colagénicas contienen cisteína (Cis), la cual no se encuentra presente en las cadenas α de las colágenas tipo I y II, únicamente se han descrito en la región C terminal de la colágena tipo III.

Conforme las regiones amino terminal de las cadenas pro α entran en la cisterna del Retículo Endoplásmico Rugoso (RER) (Prockop D.J., et al., 1979), ellas encuentran aparentemente unidas a la o las proteasas que eliminan a la secuencia señal, y también se encuentran con las tres enzimas hidroxilasas que convierten los residuos de Pro y Lis en 3-OHPro, 4-OHPro y OHLis. Las reacciones catalizadas por las hidroxilasas involucran la utilización de cofactores como Fe, O_2 , α -cetoglutarato y un agente reductor como el ácido ascórbico. El α -cetoglutarato es estequiometricamente descarboxilado a succinato y CO_2 durante las reacciones, y un átomo de la molécula de oxígeno es incorporado en la OHPro u OHLis, mientras el otro átomo queda para el succinato.

La secuencia mínima requerida para la interacción de la prolil-hidroxilasa es un triplete -X-Pro-Gli-, donde X puede ser cualquier aminoácido. Sin embargo la hidroxilación

del residuo proil en esta secuencia está claramente influenciado por varios factores adicionales, que incluyen: la longitud de la cadena del péptido sustrato, la naturaleza del aminoácido de la posición -X- del triplete y la naturaleza de los aminoácidos en otros tripletes. La conformación del péptido sustrato tiene un marcado efecto, mientras que la conformación de la triple hélice previene completamente la hidroxilación de los residuos proilo.

El requerimiento mínimo por un péptido para servir como sustrato de la lisil hidroxilasa, es tener una secuencia -X-Lis-Z-, donde Z puede ser GII y probablemente también serina (Ser). La interacción con la lisil hidroxilasa es nuevamente afectada por la longitud de la cadena del péptido sustrato, la naturaleza del aminoácido en la posición -X- del triplete para ser hidroxilado y los aminoácidos de los demás tripletes. Como con la proil hidroxilasa, la conformación de triple hélice previene la hidroxilación de los residuos lisil.

GLUCOSILACION:

Después de la hidroxilación de los residuos de Lis, ciertos residuos de OHLis son glucosilados a galactosil hidroxilisina y a glucosil-galactosil hidroxilisina, dado que el grado de hidroxilación de Lis en la colágena tipo I es variable se puede esperar lo mismo para su glucosilación. La reacción es catalizada por dos enzimas específicas, la galactosil transferasa y la glucosil transferasa. Ambas enzimas catalizan la transferencia del monosacárido del correspondiente uridil-difosfato glucósido (UDP-glucósido), utilizando como cofactor el manganeso. La galactosil transferasa no actúa en los residuos de OHLis libres, mientras que la glucosiltransferasa actúa sobre los residuos libres de galactosilhidroxilisina. Similar a como sucede con las enzimas hidroxilasas, la conformación de la triple hélice detiene las reacciones de glucosilación.

Desde el punto de vista cuantitativo, la colágena tipo II contiene aproximadamente 10 % de los carbohidratos mencionados y todas las OHLis identificadas en la secuencia se encuentran glucosiladas. una situación similar se presenta para la colágena tipo IV; por lo tanto, la colágena es una glucoproteína.

ASOCIACION DE LAS CADENAS α Y FORMACION DE LA TRIPLE HELICE:

Una de las funciones en las extensiones de la cadena de colágena (pro-peptido), es facilitar la formación rápida de la triple hélice en la porción colagénica. Este fenómeno se lleva a cabo por medio de uniones covalentes (vía puentes disulfuro) en las extensiones peptídicas. Un requerimiento adicional para la formación de la triple hélice es que un número apropiado de residuos de Pro estén hidroxilados antes de que tome lugar el proceso, esto a su vez se traduce en la resistencia de la molécula, dado que se ha encontrado que la presencia de OHPro incrementa fuertemente la estabilidad térmica de sus hélices.

Como se mencionó anteriormente, las hidroxilaciones y glucosilaciones se llevan a cabo en la cisterna del RER conforme las cadenas α van siendo sintetizadas en los ribosomas, esto se debe a la conexión de los ribosomas con las cisternas del RER. Así, estas modificaciones post-traduccionales continúan aún después de que las cadenas α ya fueron liberadas a las cisternas y se detienen con la formación de la triple hélice.

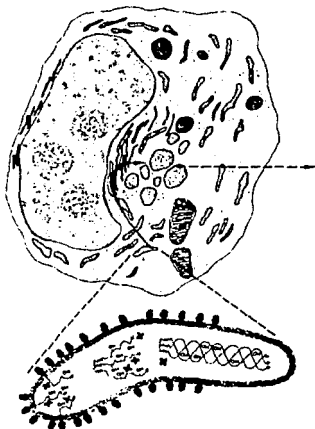


FIG. 7 Esquema de los pasos intracelulares en la biosíntesis de la procolágena.

SECRECION DE LA PROCOLAGENA A LA MATRIZ EXTRACELULAR:

Se ha encontrado que para la secreción de la procolágena se requiere energía y se propone como mecanismo de translocación que los microtúbulos la desplacen desde su sitio de síntesis en los polisomas hasta cerca de la membrana celular (*Ehrlich H.P., Bomstein P., 1972).

Para que la proteína sea acarreada en el interior de la célula es necesario que se mantenga en forma soluble, y ello probablemente dependa del péptido C terminal determinando la solubilidad de la proteína, dado que la eliminación de esos péptidos está asociada con la precipitación en fibras de las proteínas (*Paglia L.M.et.al.,1981).

MODIFICACIONES EXTRACELULARES

CONVERSION DE LA PROCOLAGENA EN COLAGENA:

La conversión de la procolágena en colágena ocurre fuera de la célula, y se lleva a cabo al menos en dos pasos que involucran dos enzimas diferentes. Ambas enzimas tienen como función la eliminación de las extensiones peptídicas amino y carboxilo (*Olsen B.et.al.,1977, Duksin D. y Bomstein P.,1977). La actividad catalítica de estas enzimas se denomina procolágena peptidasa (*Fessler J.H. y Fessler L.I.,1978), es dependiente de calcio (Ca) y la reacción se lleva a cabo en un solo paso.

La cadena $\alpha 1(I)$ de procolágena tipo I de pollo es sintetizada como un precursor de alto peso molecular con una secuencia líder hidrofóbica. Tal secuencia contiene repetidamente residuos hidrofílicos cerca del N terminal, pero casi siempre contienen un segmento de 9 a 12 aminoácidos que son altamente hidrofóbicos en la región central de la secuencia (*Palmiter R.D., et.al., 1979).

Por lo tanto, la región N terminal también tiene influencia en la formación de la triple hélice, en el mantenimiento del estado soluble de la proteína (al igual que la región C terminal) y pueden ayudar a la molécula de la procolágena en la orientación para formar finalmente las fibras de la colágena (*Becker U.et.al.,1976).

Otra función muy importante de la región N terminal en la biosíntesis de la colágena es su capacidad reguladora. se ha demostrado *in-vitro*, en sistema libre de células

derivados de reticulocitos, que estos péptidos tienen efecto supresor sobre la traducción del ARNm de la procolágena (*Paglia L., et.al., 1979).

La síntesis de la colágena durante el estado embrionario alcanza un máximo entre los días 14 y 15 del desarrollo, dicha síntesis constituye el 60 % del total de la actividad biosintética. Estudios *in-vivo* han demostrado que este pico se encuentra en el día 13, seguido por un estado decreciente hacia el día 16 (*Breitkreutz D., et.al.,1978).

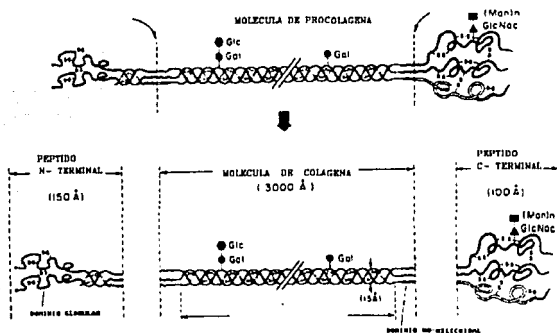


FIG. 8 Procesamiento extracelular de la molécula de procolágena.

AGREGACION Y ENTRECRUZAMIENTO DE LA COLAGENA (FIBRIOGENESIS).

Después de la conversión de la procolágena en colágena, las moléculas se agregan de manera específica formando las fibrillas de la colágena, este proceso se lleva a cabo sin necesidad de catálisis enzimática, las fibrillas formadas tienen aún poca fuerza tensil. La fuerza tensil se deriva de la formación de entrecruzamientos.

El primer paso en la fibrilógenesis es un proceso enzimático, con la oxidación de los grupos ϵ -amino en ciertos residuos lisil e hidroxilisil en aldehídos, la reacción se lleva a cabo por la enzima Lisil oxidasa, que requiere de cobre (Cu) y oxígeno para su función.

De esta manera, existen dos tipos de entrecruzamientos en la colágena: entrecruzamientos intramoleculares, uniendo las cadenas polipeptídicas en la misma

molécula; y entrecruzamientos intermoleculares, uniendo las cadenas con moléculas adyacentes. Los entrecruzamientos intramoleculares son formados por condensación aldólica de dos aldehídos y están presentes cerca de la región N terminal de las cadenas α de la colágena. Los entrecruzamientos intermoleculares son producto de reacciones de condensación de un grupo ϵ -amino de Lis o principalmente de OHLis con un grupo aldehído de otra molécula (*Kivirikko K.I. y Risteli L., 1976).

El papel de los glucosaminoglucanos (GAG) (ácido hialurónico, dermatán, condroitín y queratán sulfato) en el desarrollo de las fibrillas de la colágena, es dependiente del tipo de glucano o glucanos presentes en la fase de nucleación o "fase lag", los cuales afectan la densidad y el número de fibrillas de colágena formadas.

Se sabe que la composición de los GAGs cambia con la profundidad de la dermis y la distribución del diámetro de las fibrillas tienen variaciones locales en el cuerpo de los animales. Sin embargo, la capa superficial de la dermis (papilar) de muchos animales (borregos, cerdos y humanos) tiene un contenido más alto de GAGs, las fibrillas de colágena son de diámetro más fino y existe una mayor relación de ácido hialurónico y dermatán sulfato que en la dermis inferior. Por ejemplo; en determinaciones de GAGs en el tendón, cuando un 60 % de ellos es condroitín sulfato, el diámetro de la fibrilla es de aproximadamente 150 nm, y si el contenido de dermatán sulfato es de 70 % el diámetro promedio es de 200 nm aproximadamente (*Parry D.A.D., et al., 1982. Veis A., 1982).

5.- DEGRADACION DE LA COLAGENA.

El proceso catabólico de la colágena se lleva a cabo principalmente por medios enzimáticos y es definido como la ruptura de uniones peptídicas en la porción helicoidal de las moléculas de la colágena nativa. La identificación de los péptidos remanentes nos indica el tipo de enzima y/o proceso por el cual la molécula fue degradada.

Así, existen diversas enzimas que presentan actividad colagenolítica, tales como la catepsina colagenolítica a pH ácido, la pronasa, etc.

La enzima específica para llevar a cabo este proceso es la colagenasa, la cual se encuentra en tejidos animales y fluidos, ésta se presenta al menos en cuatro formas:

- i) Enzima latente
- ii) Enzima libre
- iii) Enzima unida a colágena
- iv) Enzima unida a inhibidores

Se considera que las formas moleculares de la colagenasa latente son precursores de la enzima activa o verdaderos zimógenos, la cual es sintetizada y secretada por varios tipos de células. Estas pro-enzimas podrían requerir de la activación por mecanismos específicos, que puede ser proteólisis parcial, por otras enzimas, auto-activación o aún otros factores desconocidos. Otros autores sugieren que todas las colagenasas latentes son complejos enzima-inhibidor y la activación representa la disociación de la colagenasa de los inhibidores.

La degradación de la colágena nativa por enzimas no colagenolíticas, escinde la porción helicoidal de la molécula bajo condiciones fisiológicas de pH, temperatura y fuerza iónica, esto ha sido documentado solamente para soluciones de colágena tipo III incubadas con tripsina, aunque existe la posibilidad de que la colágena unida a colagenasa pudiera ser activada por tripsina.

Se sabe bien, que preparaciones puras de casi todos los tipos de la colagenasa animal escinden a la colágena "nativa" soluble o fibrillas reconstituidas en una unión peptídica simple a lo largo de la porción helicoidal de la molécula cuando la incubación es llevada en condiciones fisiológicas de pH, fuerza iónica y temperaturas abajo del punto de desnaturalización de los productos de reacción (30 °C). Parece que la cinética de reacción colagenolítica depende en gran medida del grado de agregación y entrecruzamiento del sustrato.

La unión peptídica específica escindida por las colagenasas, se encuentra entre los residuos 772 y 773 de la subunidad α_1 de la colágena tipo I, las cuales son -Gli-Ile- y entre los posibles residuos correspondientes en la cadena α_2 representada por -Gli-Leu-. Sin embargo, a nivel de microscopía electrónica, la ruptura ocurre entre las bandas 41 y 42 de acuerdo a la numeración de Bruns y Gross. los dos péptidos resultantes de la ruptura

colagenolítica son de diferente tamaño, el más largo consta de aproximadamente 75 % de la molécula de la colágena y el más pequeño del 25 % restante; los dos péptidos son conocidos respectivamente como TCA y TCB. Aunque ha sido reportada la especificidad de las colagenasas para la colágena, las enzimas parecen atacar a pocas o a ninguna otra proteína, la excepción es la colagenasa leucocitaria, la cual en forma altamente purificada también degradará al fibrinógeno y a los proteoglicanos. Por otro lado, las colagenasas no reconocen sustratos especie específicos. Por lo tanto, las colagenasas degradan colágenas extraídas de muchas especies de animales diferentes con la misma eficiencia. Cabe mencionar que la colágena tipo III tiene la mayor susceptibilidad a colagenasa, mientras que la tipo II es la menos susceptible.

Resumiendo, existen dos posibles mecanismos para la colagenólisis *in-vivo*:

a) Una enzima sola, la colagenasa, es capaz de iniciar la degradación de la colágena por ruptura de una unión peptídica sencilla en la porción helicoidal de las tres subunidades de la cadena del sustrato nativo y continuar una nueva ruptura de los productos de reacción sin ayuda de otras enzimas, pero con la participación de su desnaturalización a temperatura fisiológica.

b) Un mecanismo multienzimático sugiere que varios pasos enzimáticos son necesarios para degradar la colágena nativa insoluble, empezando con la despolimerización (catalizada por enzimas proteolíticas no específicas), seguido de la ruptura específica por colagenasas y continuada por digestión de los productos de reacción desnaturalizados, primero por endo y exopeptidasas específicas, después por peptidasas de baja especificidad y finalmente por exopeptidasas no específicas (*Pérez Tamayo R., 1978).

6.-ASPECTOS INMUNOLOGICOS

La inmunología de colágena es importante por dos razones: primero porque las colágenas animales están siendo utilizadas en humanos, además de que en algunas enfermedades autoinmunes se presentan autoanticuerpos contra la colágena del organismo; y segundo, porque los anticuerpos contra la colágena son una herramienta útil en el laboratorio.

Ahora bien, el término "inmunogenicidad" relaciona la capacidad de un material para inducir la producción de anticuerpos en los animales a través de la interacción de dicho material (antígeno) con las células de respuesta inmune del organismo, conocidas como las células presentadoras del antígeno (CPA), entre las cuales se encuentran los macrófagos, las células endoteliales, los linfocitos B, etc. (*Roitt l.,1991).

Existen dos formas para inducir anticuerpos en un organismo por medio de una proteína, una de ellas es debido a la estructura primaria, es decir sus "determinantes antigénicos secuenciales", y la otra es por su conformación espacial, "determinantes antigénicos conformacionales". Además, en la producción de anticuerpos influye la ruta de administración y la frecuencia con que se realice ésta.

Entonces, los determinantes antigénicos conformacionales están dados por la triple hélice y las regiones no helicoidales que se encuentran en los extremos de la molécula; mientras que los determinantes antigénicos secuenciales, pueden ser detectados por anticuerpos que interaccionan con cadenas α no enrolladas. Estos están localizados en la región de la triple-hélice (aunque la estructura en la colágena nativa los enmascara ante los anticuerpos).

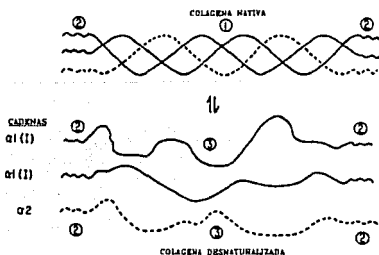


FIG. 9 Localización esquemática de los tres grupos diferentes de determinantes antigénicos en la molécula de la colágena. (1) Determinantes antigénicos helicoidales, (2) determinantes antigénicos terminales y (3) determinantes antigénicos centrales.

Dadas estas razones, la colágena tipo I es la proteína menos inmunogénica, pues como ya he mencionado, su estructura primaria es muy semejante entre las especies, al igual que su estructura secundaria y terciaria (*Ramachandran G.N. y Reddi A.H.,1976).

7.- IMPORTANCIA DE LA COLAGENA

La colágena es una de las proteínas más estudiadas y de mayor importancia biológica, entre otras se encuentran por ejemplo a la albúmina y la hemoglobina. La importancia de la colágena reside en su función como material estructural en el tejido conectivo. Además de ser el soporte celular de los tejidos, es reconocida como marcador de diferenciación celular (*Gurdon J.B.,1987). Existen además, una gran variedad de enfermedades asociadas a la colágena, por lo que su estudio clínico también la hace importante.

Dentro del uso que se ha dado a la colágena (en sus principales tipos), es el de soporte para cultivos celulares y marcador de diferenciación celular, por ejemplo en la condrogénesis en donde se presenta característicamente el tipo II. También se ha utilizado marcada con isótopos radiactivos (litio por ejemplo), para observar el metabolismo de algunas células en diferentes condiciones, como los fibroblastos, macrófagos, células epiteliales, endoteliales, hepatocitos, etc.

Debido a que la colágena se encuentra en proporción elevada como proteína de matriz extracelular y dada su baja antigenicidad en forma nativa, se ha utilizado desde hace algún tiempo como material de bioimplante en diversos tejidos, como son: la piel, el hueso, el cartilago, etc. Teniendo además la propiedad de reabsorberse sin consecuencias, esta absorción es relativamente rápida tomando en cuenta su velocidad de recambio, por lo cual se ha combinado con polímeros inertes como son polietileno, polivinilpirrolidona, etc.

El tipo I de la colágena es el más abundante en piel y hueso, como ya he mencionado y se ha utilizado ampliamente como material de bioimplante ya que las características de la colágena en las diferentes especies son muy similares, permitiendo así realizar injertos con un amplio margen de seguridad.

Son bien conocidos (incluso en el mercado) los implantes de la colágena en heridas en donde por la disposición de la lesión es difícil que el organismo repare por sí solo o lo haga en un período breve. Así como también los bioimplantes en cirugía reconstructiva, en donde se ha injertado colágena heteróloga (del cerdo y ovino) en el hueso, teniendo muy buenos resultados y se hace mención que la regeneración es mucho más acelerada que cuando el implante se lleva a cabo con materiales aloplásticos que muestran la desventaja de no transformarse en hueso o eliminarse en períodos cortos como es el caso del fosfato tricálcico (*Joos U. y Vogel D.,1980). Además, las áreas tratadas con el implante de la colágena, no presentan células gigantes del tipo cuerpo extraño y tampoco se observa ningún problema en la cicatrización (*Joos U.et.al.1980). Joos y cols. concluyeron que el proceso de extracción, purificación y regeneración de colágena son un factor esencial para la calidad del material de implante y por lo tanto, en su compatibilidad con el organismo (*Joos U.et.al.,1978. Bioceramics Symposium,1978. Koehenlein H.E.,1972).

8.- METODOS DE EXTRACCION, PURIFICACION Y CONTROL

Generalmente, todos los métodos de extracción de la colágena se basan en la disolución de la proteína en un medio con pH ácido o neutro. El proceso consiste en el disgregado del material; sea en general piel, cartilago o hueso, agitación suave en el medio ideal; para las colágenas tipo I y III es el medio ácido y para las colágenas tipo II y IV es el medio neutro, aunque estos últimos también son muy solubles en medio ácido.

Los pasos involucrados en la extracción de la colágena son:

- Adquisición del tejido, se refiere a la selección del material que contenga en mayor proporción el tipo de la colágena que se desea.
- Deslipidación, es el tratamiento previo a la extracción, con solventes orgánicos que disuelvan la grasa contenida en el tejido.
- Extracción, involucra el medio ideal para disolver (si es posible de manera selectiva) el tipo de la colágena en cuestión. Esto puede incluir la adición de inhibidores de

proteasas y quelantes como el EDTA y otros, así como proteasas inespecíficas del tipo de tripsina, para facilitar la disolución sin degradar a la molécula nativa (*Miller E.J. y Rhodes R.K.,1982. Bloch A., 1961).

- Purificación inicial, se lleva a cabo por sistemas de solvatación diferencial; es decir, cada tipo de colágena nativa se precipita en fibras a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl). Además de incluir sistemas mecánicos del tipo de la ultracentrifugación.
- Purificación selectiva, se lleva a cabo por métodos varios, los más empleados son las técnicas cromatográficas, por ejemplo con resinas de intercambio iónico o resinas de afinidad.
- El control de la proteína se lleva a cabo de dos maneras, la cualitativa, que se refiere a los tipos de la colágena contenidos en la muestra y que generalmente se evalúa por electroforesis en gel de poliacrilamida, la cuantitativa, que utiliza principalmente un método donde se hace reaccionar el aminoácido característico de la colágena (OHPro) en forma oxidada, con p-dimetilamino benzaldehído para dar un compuesto colorido que se lee en el espectro de luz visible por un colorímetro (*Neuman R.E. y Logan M.A., 1949. *Woessner J.F.,1961).

Otros métodos para la cuantificación, son sistemas automatizados con analizadores programados (*Jackson D.S. y Cleary E.G.,1967).

= OBJETIVOS =

OBJETIVO GENERAL.

- Elaborar modificaciones a un método para la extracción y purificación de la colágena "nativa" con el fin de mejorar el tiempo y el rendimiento, utilizando como materia prima la piel del ovino *no-nato*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Disminuir el tiempo y mejorar el rendimiento de la extracción y purificación de un método de rutina (Methods in Enzymology Vol. 82) para la extracción de la colágena "nativa".
- Extraer y purificar la colágena "nativa" a partir de la piel del ovino *no-nato*.
- Evaluar la calidad de la colágena obtenida por el método propuesto contra las muestras extraídas por los métodos de rutina.

=MATERIALES Y METODOS=

EQUIPO Y REACTIVOS EMPLEADOS EN LA EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA COLAGENA

EXTRACCION Y PURIFICACION:

- Homogenizador "Polytron" Birkman.
- Potenciómetro.
- Vasos de precipitado 1000 ml.
- Probetas 50 y 100 ml.
- Pipetas 1, 5, 10 ml.
- Cristalizador.
- Gasas.
- Agitador magnético.
- Barras para agitación.
- Centrífuga "Sorvall".
- Tubos p/centrífuga.
- Vortex.
- Viscosímetro "Brookfield".
- Filtro de flujo tangencial "Minitan Acrylic Ultrafiltration System Millipore"
- Membrana Durapore 0.65 mm, 60 cm².
- Membrana Polisulfona 100,000 NMWL (KD), 60 cm².
- Cámara refrigerada 4 °C.
- Materia Prima = Piel de ovino (Borrego) no-nato, peso aproximado
100 gr.
- Acetona.
- Acido acético Glacial 0.5 M y 5 mM.
- Acido Clorhídrico conc. (HCl)
- Pepsina "Sigma 1:10,000, actividad 800-2500 U/mg."
- Cloruro de Sodio cristales (NaCl).

- Cloruro de Sodio 4.0 M.

EQUIPO Y REACTIVOS EMPLEADOS PARA LA EVALUACION Y EL CONTROL DE LA COLAGENA:

- Ampolletas de vidrio 2 ml.
- Tubos de ensayo 16 x 150 mm.
- Tubos "Ependorf".
- Pipeta automática 20 - 100 μ l.
- Soplete.
- Homo 104 °C.
- Plancha de calentamiento.
- Baño maría 60 °C, 92 °C.
- Espectrofotómetro UV-Visible "Secomam 1000 G", con impresora.
- Sistema para electroforesis con fuente de poder "Buchler 3-1500".
- HCl 0.001 N y 6 N
- NaCl 0.2 M.
- Metil Cellosolve.
- Amortiguador para OHPro: 5.0 gr de ácido cítrico. H₂O, 1.2 ml de ácido acético glacial, 12.0 gr de acetato de sodio.3H₂O, 3.4 gr de
- Hidróxido de Sodio, atorar a 100 ml con agua destilada, ajustar el pH=6.0.
- Cloramina T (Reactivo) =Solución 0.05 M, se prepara para cada determinación poco antes del análisis (menos de 1 hr), 1.41 gr de Cloramina T en 20 ml de agua, 30 ml de Metilcellosolve y 50 ml de Amortiguador para OHPro. (La solución se mantiene almacenada en un matraz con tapón).
- Acido Perclórico 3,15 M.
- p-Dimetilaminobenzaldehido 20 %, en Metilcellosolve. Preparar poco antes de cada análisis.
- Solución estándar de OHPro. Preparar una solución base disolviendo 25 mg de L-OHPro seca por vacio en 250 ml de HCl 0.001 N. Los estándares se preparan para cada determinación diluyendo la solución base hasta 1-10 μ g/ml.

- Acrilamida 30 %, 0.8 % N,N'-metileno-bisacrilamida. Diluir ambos reactivos en 50 ml de agua destilada y aforar a 100 ml.
- Amortiguador para Gel separador: Tris 2.25 M, 0.6 % SDS, pH=8.8. Disolver 272.6 gr de Tris y 6.0 gr SDS en 700 ml de agua dest. Ajustar pH = 8.8 y aforar a 1000 ml.
- Amortiguador para Gel concentrador: Tris 0.125 M, 0.2 % SDS, pH=8.8.
- Amortiguador de corrida: Tris 0.063 M, 2 % SDS, Glicerol 10 %, Azul de Coomassie 0.01 %, pH = 6.8.
- Amortiguador para electrodos: (5X) Tris 0.25 M, SDS 0.5 %, Glicina 1.92 M pH = 8.3. NOTA: El ajuste de pH se hace con HCl conc.
- TEMED
- Persulfato de amonio
- Solución fijadora y para tinción: Disolver 2.5 g de Azul Brillante de Coomassie-R250 en una solución compuesta de 200 ml de agua destilada, 500 ml de metanol absoluto y 100 ml de ácido acético glacial, agitar mínimo 2 hrs y llevar a 1000 ml con agua dest. Filtrar.
- Solución para desteñir: mezclar 100 ml de metanol absoluto, 100 ml de ácido acético glacial y 800 ml de agua dest.
- 2-mercaptoetanol.

METODO A SEGUIR PARA LA EXTRACCION, PURIFICACION Y CONTROL DE LA COLAGENA

La preparación de una muestra de colágena involucra generalmente varios pasos, que van desde:

- La adquisición del tejido de donde se va a extraer.
- Procesamiento inicial, es decir, el aislamiento de la proteína junto con los otros componentes de la matriz extracelular en un medio adecuado.
- Y su purificación por los sistemas selectivos.

De esta manera, se conocen varios medios para la extracción de la colágena: las soluciones salinas neutras y las soluciones de ácidos orgánicos.

Las primeras, involucran soluciones de cloruro de sodio (NaCl) en amortiguadores a pH neutro, estas soluciones muestran la menor capacidad para disolver a la colágena, especialmente de los tipos I y III, pero funcionan bien para extraer la colágena de otros tipos (no fibrilares principalmente). Las segundas incluyen a los ácidos orgánicos débiles o soluciones amortiguadoras orgánicas ácidas. Estas favorecen la disolución de la mayoría de las colágenas incluyendo las fibrilares (*Miller E.J. y Rhodes R.K., 1982).

Por lo tanto, el presente método se basa en la extracción de la colágena en una solución orgánica ácida.

El tejido seleccionado para el aislamiento de la colágena, es la piel del ovino (borrego) *no-rato*. Y el sistema de purificación es por disolución y precipitación diferencial con NaCl, además de métodos mecánicos como centrifugación y filtración tangencial.

La filtración tangencial, es la parte de innovación del presente método. Consiste en un sistema con membrana de microfiltración 0.65 μm , en donde el flujo de la suspensión por filtrar recorre a la membrana en forma paralela, permitiendo así recuperar la fracción filtrada y la no filtrada (rechazo). Además que la fracción de "rechazo" no se queda en el área filtrante y por lo tanto, el sistema no se satura de inmediato.

DISEÑO EXPERIMENTAL DEL METODO DE EXTRACCION

1. Piel de ovino *no-rato*, se lava con agua corriente y se elimina manualmente el hueso y músculo que contenga, así como la mayor parte del tejido adherido a la piel y sangre.
2. Se sumerge en acetona y queda en refrigeración (4 °C) por toda la noche.
3. La piel libre de grasa se lava con agua desionizada y se disgrega en un homogenizador "Polytron" en una solución de ácido acético 0.5 M, pH = 2.5 (previamente ajustado con HCl), hasta obtener un homogenado sin partículas gruesas.
4. Filtrar por una gasa para retener el tejido no disgregado.
5. Adicionar pepsina en relación 1:10 (peso de la enzima: peso seco del material inicial) y se agita suavemente a 4 °C por toda la noche.

PURIFICACION:

1. Precipitar las fibras de la colágena "nativa" en la suspensión, por adición de cristales de NaCl a una concentración de 2.0 M con agitación suave y constante. Dejar en agitación por toda la noche.
2. Centrifugar la suspensión a 15,000 x g por 1:00 hora, a 4 °C.
3. Resuspender los botones en ácido acético 0.5 M y dejar en agitación por toda la noche.
4. Repetir los pasos anteriores de precipitación y redisolución una vez más.

ELIMINACION DE PARTICULAS MAYORES DE 0.65 μ m.

1. La suspensión anterior se centrifuga a 15,000 x g para eliminar las partículas de mayor tamaño.
2. El sobrenadante debe tener una viscosidad menor a 25 centipoises (cp), en caso de estar más concentrado diluir al límite mencionado.
3. Filtrar en un sistema de flujo tangencial: "Minitan Acrylic Ultrafiltration System" (Millipore) por una membrana de 0.65 μ m, 60 cm². Recuperando la solución de rechazo y resuspendiéndola en ácido acético 0.5 M, agitar toda la noche y volver a filtrar de la misma forma, mezclar los filtrados y continuar el tratamiento.

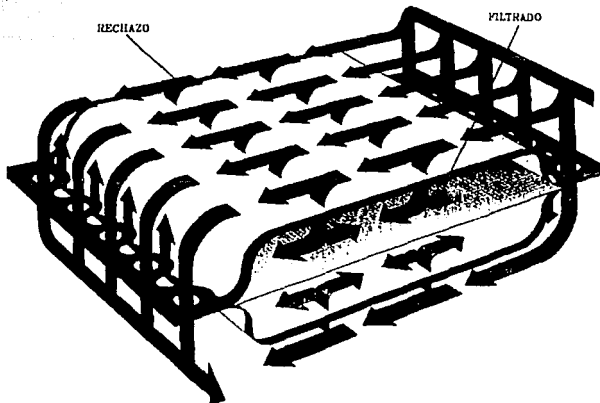


Fig.10 Esquema del principio de filtración tangencial por membrana.

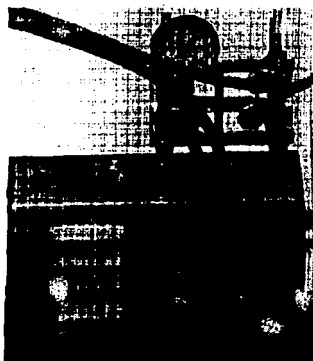


Fig.11 Aparato empleado en la filtración tangencial.

PRECIPITACION SELECTIVA.

Este procedimiento se utiliza para recuperar de manera selectiva diferentes tipos de colágena en mezclas complejas como la matriz extracelular.

- 1.- El filtrado claro obtenido anteriormente, se precipita con una solución de NaCl 4.0 M, suficiente para alcanzar una concentración final de 0.7 M, en agitación constante y a 4 °C. La suspensión de fibras queda agitándose por toda la noche.
- 2.- Centrifugar la suspensión a 15,000 x g y resuspender los botones en ácido acético 0.5 M.
- 3.- Cuantificar colágena y observar el patrón electroforético (ver adelante "Métodos de Evaluación de la Colágena Nativa").
- 4.- Diluir o concentrar si es necesario.

CONCENTRACION.

Si la muestra se encuentra diluida se puede concentrar en el sistema de filtración tangencial "Minitan", colocando una membrana de 100 KD, eliminando el filtrado y regresando el flujo de rechazo al recipiente original, hasta obtener la concentración deseada.

METODO PARA LA EVALUACION Y EL CONTROL DE LA COLAGENA

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION.

Existen varios métodos para determinar la concentración de la colágena, y se pueden dividir en específicos e inespecíficos.

Los inespecíficos involucran la determinación de las proteínas totales, bien por su contenido de nitrógeno proteico, como es el método de Kjeldahl, o la cuantificación por enlaces peptídicos, como en los métodos espectrofotométricos, Lowry y Biuret, ("Harris E.L.V. y Angal S. 1989).

Los específicos se refieren a la cuantificación de los aminoácidos particulares presentes en la proteína, que en el caso de la colágena es la hidroxiprolina. Algunos métodos la determinan en tejido y otros también lo hacen en las muestras proteicas (*Neuman R.E. y Logan M.A. 1950), (*Woessner J.F., 1961).

El método empleado para este trabajo (aunque con algunas modificaciones prácticas) es el de Woessner, en donde 100 μ l de la muestra de la colágena disuelta en ácido acético, se colocan en una ampollita con 900 μ l de HCl 6 N.

Las ampollitas se cierran con calor y se hidroliza a la muestra en homo a 104 °C por 18 h.

El contenido de la ampollita se evapora lentamente en una plancha de calentamiento.

- 1.- La muestra evaporada se resuspende en 200 μ l de NaCl 0.2 M y de aquí se toman las alícuotas para la prueba.
- 2.- Las alícuotas dependen del grado de concentración de la muestra, por ejemplo para una concentración aproximada de 1 mg/ml, tomar 50 μ l y agregar a 1.0 ml de NaCl 0.2 M, preparar un blanco con NaCl 0.2 M.
- 3.- Agregar a cada tubo 0.5 ml de reactivo Cloramina T, mezclar e incubar 20 min a temperatura ambiente (TA).
- 4.- Agregar a cada tubo 0.5 ml de ácido perclórico 3.15 M, mezclar e incubar 5 min a TA.
- 5.- Agregar a cada tubo 0.5 ml de p-dimetilaminobenzaldehído 20 %, mezclar e incubar 20 min a 60 °C. Enfriar 5 min y leer en colorímetro a 557 nm.
- 7.- Las absorciones se interpolan directamente en una curva estándar que contenga concentraciones de 0 a 10 μ g de OHPro.
- 8.- El porcentaje de la colágena está dado por el producto del porciento de OHPro con el factor de 7.46.

$$\% \text{ Colágena} = \% \text{ OHPro} \times 7.46$$

IDENTIFICACION DE LOS TIPOS DE COLAGENA

La electroforesis en gel de acrilamida es utilizada comunmente en la identificación de los diferentes tipos de la colágena así como para otras proteínas. Esta es una técnica útil para el estudio de trimeros, bandas gama (γ); dímeros bandas beta (β), monómeros o bandas alfa (α) y péptidos de degradación, además que se pueden analizar varias muestras simultaneamente.

La técnica empleada en este estudio es una electroforesis en gel de acrilamida con un sistema de amortiguador discontinuo.

PREPARACION DEL GEL

Gel separador:

- Acrilamida 4.5 ml
- Amortiguador Tris pH=8.8 5.63 ml
- Agua destilada 12.15 ml
- SDS 10 % 450 μ l
- TEMED 20 μ l
- Persulfato de amonio 200 μ l

Gel concentrador:

- Acrilamida 1.0 ml
- Amortiguador Tris pH=6.8 1.87 ml
- Agua destilada 4.6 ml
- SDS 10 % 75.0 μ l
- TEMED 7.5 μ l
- Persulfato de amonio 50.0 μ l

Primero se prepara el gel separador y se adiciona (aún líquido a la cámara, esperar a que gelifique agregando suavemente agua destilada para evitar la formación de un menisco.

Una vez que ya gelificó el gel separador, se procede a preparar y agregar el gel concentrador. Colocar el aditamento para formar los carriles antes de que gelifique.

PREPARACION Y APLICACION DE LAS MUESTRAS.

- 1.- Las muestras de la colágena en ácido acético 0.5 M, se dializan contra ácido acético 5 mM. Una vez dializadas se mezclan con amortiguador de corrida en proporción 1:2 (una parte de muestra por una de amortiguador) o 4 mg/ml de colágena vs amortiguador.
- 2.- Las muestras en amortiguador de corrida, se desnaturalizan en baño de maría a 92 °C, 5 min.
- 3.- Colocar las muestras en los carriles y agregar el amortiguador de electrodos para cubrirlos.
- 4.- Cerrar la cámara y aplicar corriente continua a 40 mA. Detener la corrida cuando el indicador del amortiguador (azul de Coomassie) llegue al final del gel.
- 5.- El gel se fija y tiñe con la solución de Coomassie por 18 hrs. y luego se destiñe en una solución de ácido acético/metanol (AcOH/MeOH), hasta que el gel sea claro y las bandas se observen nítidas.

IDENTIFICACION DE OTROS COMPONENTES COLAGENICOS PRESENTES EN LA FRACCION PURIFICADA.

El comportamiento de la colágena tipo III es más complejo que la tipo I cuando se separa en un sistema electroforético. En las condiciones donde los puentes disulfuro intercadena están intactos, las cadenas $\alpha 1(\text{III})$ se mueven como trimeros (bandas) con algunos polímeros grandes. En condiciones reductoras, esos enlaces son eliminados y se liberan monómeros que migran ligeramente más despacio que las cadenas $\alpha 1(\text{I})$ (Sykes B., et. al. 1976). La resolución de estas bandas cuando hay una mezcla de los tipos I y III de colágena es muy baja por lo que el presente método realiza una reducción retardada.

Las condiciones para la preparación y aplicación de las muestras son las mismas que el sistema antes mencionado. La diferencia estriba en detener la corrida cuando el frente del indicador esté a un centímetro del inicio del gel separador. Entonces adicionar 2-mercaptoetanol 10 % (v/v en amortiguador de corrida) en los carriles que se desee realizar la reducción y continuar la corrida en las condiciones anteriores. El teñido del gel también es igual.

=RESULTADOS=

EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA COLAGENA A PARTIR DE LA PIEL DEL OVINO NO-NATO.

Una vez lavada la piel y estando libre del hueso y músculo, se determinó la humedad con el fin de conocer el peso seco del material y relacionarlo con la cantidad de la enzima y solución necesarias para la extracción:

Cristalizador = C.

Cl = 31.2100 g.

C+m = 31.6240 g.

Cs = 31.2952 g.

mH = 0.4240 g.

mS = 0.0852 g.

Humedad = 79.9 %

Peso seco = 20.1 %

40 g. de piel húmeda = 8.04 g. piel seca.

La piel se sumergió en acetona por una hora en el cuarto frío (4 °C), después se lavó con agua corriente y se dejó en acetona toda la noche en las mismas condiciones, eliminando la grasa que contenida.

La piel se lavó con agua corriente y se procedió a disgregarla, obteniendo así un homogenado en donde la proteína esté más expuesta al medio de extracción.

40 gr de piel húmeda se fragmentaron con tijeras en trozos pequeños y se disgregaron en un homogenizador "Politron" en 400 ml (50 volúmenes) de ácido acético 0.5 M, pH=2.5 por cuatro períodos de 20 s c/u.

La suspensión se filtró por gasa eliminando los trozos grandes del tejido.

Relación enzima/piel seca = 1:10. Entonces se agregaron 0.804 g de pepsina (Sigma Corp.) y quedó en agitación por 18 h a 4 °C.

La suspensión fue centrifugada a 15,000 x g durante 1:00 h, a 4 °C, de tal forma que la fracción Insoluble junto con el material no colagénico fueran eliminados.

PURIFICACION INICIAL:

La suspensión anterior fue precipitada por adición de 46.76 g de NaCl 2.0 M (cristales). Quedó en agitación por 24 h a 4 °C. Este paso permitió que la proteína fuera separada de otros componentes no proteicos o con mayor solubilidad por el fenómeno de solvatación.

La suspensión de fibras fue centrifugada a 15,000 x g, 1:00 hr a 4 °C. Los botones se resuspendieron en 400 ml de ácido acético 0.5 M agitando suavemente 18 h a 4 °C.

El proceso de precipitación y redisolución se repitió una vez más en las mismas condiciones.

ELIMINACION DE PARTICULAS MAYORES A 0.65 μ m.

La densidad de la suspensión fue de 17.5 centipoises (cp).

La microfiltración tangencial en el sistema "minitan" se llevó a un flujo de 10 ml/min (40 min totales) separando el "rechazo" o fracción no filtrable y conservando el filtrado que se observó como una solución ligeramente viscosa y clara.

El rechazo fue resuspendido en el volumen original de ácido acético (400 ml) y vuelto a filtrar como en el paso anterior. De esta manera, se redisolvió la parte de la colágena que no fue filtrada.

Los dos filtrados claros fueron mezclados para continuar el proceso.

PURIFICACION SELECTIVA:

Los 800 ml del filtrado claro se precipitaron por adición lenta de 169 ml de una solución de NaCl 4.0 M con agitación constante. La adición se realizó con ayuda de una bureta para que el fenómeno de solvatación fuera lento.

Al terminar la precipitación, quedó en agitación suave por 24 h a 4 °C.

La suspensión de fibras fue centrifugada a 15,000 x g, 1:00 h a 4 °C. Los botones fueron resuspendidos en 400 ml de ácido acético 0.5 M con agitación lenta 18 h a 4 °C. De tal forma que la colágena ipo I (preferentemente) fue selectivamente aislada de otros tipos de colágena presentes en la fracción purificada.

Esta solución se encontraba lista para determinar la concentración y hacer electroforesis.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN:

La determinación se realizó por el método de Woessner (ver Métodos).

100 µl de la solución se mezclaron con 900 µl de HCl 6.0 N, se hidrolizaron para obtener a los aminoácidos libres y poder determinar la OHPro presente en la muestra, posteriormente la solución fue evaporada.

El residuo de la ampollita se resuspendió en 200 µl de NaCl 0.2 M, ésta es la solución de prueba.

- a) 25 µl de la solución de prueba fueron mezclados con 1.0 ml de NaCl 0.2 M en un tubo de 16 x 150 mm. Se prepararon tubos iguales con un blanco de reactivos, un control y un estándar:
- b) Colágena purificada Pentapharm* (10 mg/ml). De una solución al 25%, se tomaron 25 µl de la muestra.
- c) Estándar de OHPro 5 µg/ml, 50 µl de la solución estándar de OHPro 100 µg/ml.

El contenido de OHPro determinado en el colorímetro fue de:

- a) 4.9 µg

b) 4.25 μg

c) 5.1 μg

$$\mu\text{g Colágena} = \mu\text{g OHPPro} \times 7.46$$

a) 36.554 μg de colágena/25 μl de solución de prueba.

b) 31.705 μg de colágena/25 μl de solución de prueba.

Entonces:

a) 292.43 μg de colágena/100 μl iniciales = 2.92 mg/ml

b) 253.56 μg de colágena/100 μl iniciales = 2.53 mg/ml

IDENTIFICACION DE LA COLAGENA POR ELECTROFORESIS:

Muestras de 100 μl para la solución de extracción (2.92 mg/ml).

Muestras de 100 μl para la solución control (10 mg/ml).

Fueron dializadas contra 100 volúmenes de ácido acético 5 mM, 4 cambios, dejando a la proteína en una solución débilmente ácida.

Las muestras se mezclaron con amortiguador de corrida 100 μl (con indicador) y fueron colocadas a ebullición 5 min para lograr la desnaturalización de la proteína y poder observar en el gel las diferentes cadenas que la componen.

Alícuotas de 20 μl se corrieron por electroforesis en gel de acrilamida, con un sistema de amortiguador discontinuo (ver Métodos).

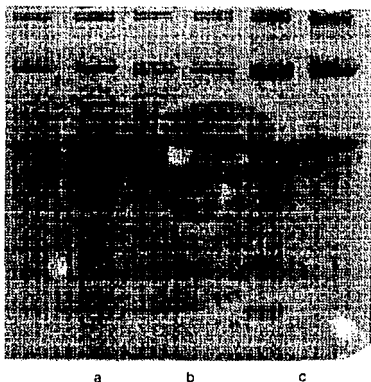


FIG. 12 GEL DE COLAGENA

1.-La electroforésis en gel de acrilamida muestra en (a y b) Colágena extraída por el presente método a una concentración de 1 mg/ml.a)40 μ l, b)20 μ l. c) Colágena control 10 mg/ml, la alícuota fue de 40 μ l.

La muestra de la colágena extraída por el presente método se volvió a correr en las mismas condiciones, pero ahora con alícuotas de 50 μ l con el objeto de observar más claramente a las bandas de los diferentes monómeros, dímeros y trímeros.



FIG. 13 GEL DE COLAGENA UN SOLO CARRIL

2.-Electroforesis corrida en las mismas condiciones que la anterior, pero ahora con una alícuota de 80 μ l. Las bandas que se observan en la parte superior del gel, representan las γ o trímeros de las cadenas α , las siguientes (hacia abajo) son las β o dímeros de las mismas y las últimas son las α o monómeros de colágena tipo I, la superior con mayor grosor es $\alpha 1(I)$ y la inferior $\alpha 2(I)$, recordar que colágena tipo I es un heterotrímero de $\alpha 1(I)$ y $\alpha 2(I)$. Obsérvese que no aparecen bandas de degradación abajo de las $\alpha 2(I)$, lo cual indica el grado de purificación.

ELECTROFORESIS DE COLAGENA CON REDUCCION RETARDADA:

Una vez concentrada la muestra de colágena a 7 mg/ml se volvió a correr por electroforesis, ahora con reducción retardada para observar si se presentaba la colágena tipo III mezclada con la tipo I.

Alícuotas de 20 μ l de la muestra dializada vs ácido acético 5 mM, fueron colocadas en el siguiente orden:

- a) Control de colágena 10 mg/ml.
- b) Colágena extraída por éste método 7 mg/ml.

(c y d) son iguales que (a y b respectivamente) tratadas con 5 μ l de β -mercaptoetanol 20 % para su reducción.

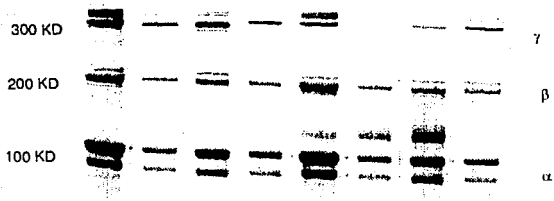


FIG. 14 GEL CON REDUCCION RETARDADA.

3.-En el gel se observan las muestras sin reducir, las muestras reducidas presentan una banda adicional entre las β y las α tipo I. Esta banda representa el homotrímero $\alpha 1(III)$ de colágena tipo III.

=CONCLUSIONES=

La colágena ha sido desde hace mucho tiempo de gran interés en el laboratorio de investigación, tanto para el propio estudio de la proteína y por su utilidad como herramienta en metodologías, en donde la colágena es una molécula importantemente reconocida como un marcador, sea del metabolismo tisular/celular, en el desarrollo de los tejidos en la diferenciación celular, biosoporte para cultivos celulares, etc. Otro aspecto importante de la colágena, es su uso en el área médica de cirugía plástica y reconstructiva; ésta molécula ha demostrado tener propiedades restauradoras de tejidos donde el daño ha ido más allá de lo que pueda resolver el propio organismo. Así, los implantes de la colágena "nativa" en forma liofilizada y soluble fueron denominados "bioimplantes". La industria cosmética por su parte, la emplea de manera rutinaria, pues existen formulaciones que contienen colágena en estado "nativo" y como hidrolizados, las primeras son utilizadas como agentes fuertemente humectantes y los segundos se utilizan en sistemas ionotóxicos; es decir, impulsando a las moléculas eléctricamente a través de la piel.

Dados los requerimientos de los laboratorios de investigación para utilizar a la colágena en estado nativo, aquí he propuesto un método más mecánico que químico para la extracción de la proteína en forma pura, aunque con mezcla de dos tipos de colágena tipo I y III. Esto afectará en la medida que el uso dado a la proteína no sea tipo-específico, como es el caso de la generación de los anticuerpos monoclonales, en donde se puede dar al producto de purificación un paso más específico como lo es la cromatografía de intercambio iónico o de afinidad (reportado en antecedentes parte de métodos de extracción o precipitación diferencial con NaCl).

Sin embargo, la mayoría de los métodos de laboratorio para la extracción de la colágena nativa, emplean sistemas de ultracentrifugación para eliminar detritus y otras proteínas insolubles como la queratina, éstos equipos alcanzan velocidades de hasta 100,000 veces la gravedad ($100,000 \times g$), este sistema presenta ciertas desventajas; los períodos de ultracentrifugación para obtener una buena calidad de colágena son largos (2 a 3 hrs), las muestras que pueden trabajarse deben ser de volúmenes pequeños, pues los rotores tienen poca capacidad, además que requieren de tiempo para generar vacío y mantener una temperatura relativamente baja (4°C). Finalmente, el poseer una

ultracentrífuga para un laboratorio de montaje reciente, es un gasto monetario muy fuerte, aunque su utilidad es también muy grande para una diversidad de procesos.

Por lo tanto, el presente método para la extracción de la colágena "nativa", fue desarrollado pensando en un sistema que pudiera suplir la ultracentrifugación y algunos pasos de la purificación. Así, la implementación de un sistema de microfiltración y ultrafiltración fue la clave para este problema.

Las ventajas de este método consisten en lo siguiente:

Se pueden trabajar volúmenes más grandes que por los demás métodos, pensando en que los puntos claves para la purificación de la colágena son: el sistema de precipitación/redisolución (que no tiene mayor problema), ultracentrifugación, diálisis y concentración. De ésta manera, ultracentrifugar, dializar y concentrar volúmenes grandes son sustituidos por microfiltración y ultrafiltración de flujo tangencial, en donde los volúmenes que se manejan con respecto al tiempo son mucho mayores.

- 1) La ultracentrifugación es suplida por microfiltración teniendo una eficiencia incluso más alta, pues la solución obtenida es más clara.
- 2) El sistema de diálisis líquido/líquido, es más rápido utilizando el sistema de ultrafiltración con una membrana de 100 KD, además que por el tamaño de la partícula que migra hacia afuera se eliminan los péptidos de degradación generados durante el proceso. Este sistema utiliza cantidades relativamente grandes de solución de diálisis.
- 3) La concentración con el sistema de ultrafiltración en membrana de 100 KD, se lleva a cabo en mucho menor tiempo que por liofilización.
- 4) El sistema de filtración tangencial, no permite que las membranas se saturen rápido, y después de haberlo usado, éstas se pueden lavar y mantener en soluciones desinfectantes. Así, la vida media de las membranas es de aproximadamente 1 año.
- 5) La compatibilidad de las membranas con diferentes solventes, ácidos y álcalis a diferentes concentraciones es muy amplia.
- 6) El costo del equipo, comparado con los demás sistemas empleados es bajo.

ultracentrífuga para un laboratorio de montaje reciente, es un gasto monetario muy fuerte, aunque su utilidad es también muy grande para una diversidad de procesos.

Por lo tanto, el presente método para la extracción de la colágena "nativa", fue desarrollado pensando en un sistema que pudiera suplir la ultracentrifugación y algunos pasos de la purificación. Así, la implementación de un sistema de microfiltración y ultrafiltración fue la clave para este problema.

Las ventajas de este método consisten en lo siguiente:

Se pueden trabajar volúmenes más grandes que por los demás métodos, pensando en que los puntos claves para la purificación de la colágena son: el sistema de precipitación/redisolución (que no tiene mayor problema), ultracentrifugación, diálisis y concentración. De ésta manera, ultracentrifugar, dializar y concentrar volúmenes grandes son sustituidos por microfiltración y ultrafiltración de flujo tangencial, en donde los volúmenes que se manejan con respecto al tiempo son mucho mayores.

- 1) La ultracentrifugación es suplida por microfiltración teniendo una eficiencia incluso más alta, pues la solución obtenida es más clara.
- 2) El sistema de diálisis líquido/líquido, es más rápido utilizando el sistema de ultrafiltración con una membrana de 100 KD, además que por el tamaño de la partícula que migra hacia afuera se eliminan los péptidos de degradación generados durante el proceso. Este sistema utiliza cantidades relativamente grandes de solución de diálisis.
- 3) La concentración con el sistema de ultrafiltración en membrana de 100 KD, se lleva a cabo en mucho menor tiempo que por liofilización.
- 4) El sistema de filtración tangencial, no permite que las membranas se saturen rápido, y después de haberlo usado, éstas se pueden lavar y mantener en soluciones desinfectantes. Así, la vida media de las membranas es de aproximadamente 1 año.
- 5) La compatibilidad de las membranas con diferentes solventes, ácidos y álcalis a diferentes concentraciones es muy amplia.
- 6) El costo del equipo, comparado con los demás sistemas empleados es bajo.

De ésta manera, se puede tener colágena "nativa" para ser empleada en el laboratorio de investigación disponible en poco tiempo, con mejores rendimientos y muy buen grado de purificación.

Con base en lo anterior, los objetivos propuestos fueron cumplidos satisfactoriamente.

=BIBLIOGRAFIA=

- .Becker U., Timpi R., Helle O. y Prockop D.J. *Biochemistry*, 15 No.13,(2853-2862), 1976. "NH₂-Terminal Extensions on Skin Collagen from Sheep with a Genetic Defect In Conversion of Procollagen into Collagen".
- Bioceramics Symposium, 16 sept. 1978. "Mechanical Properties of Biomaterials".
- Bloch A., 1961, Patente. "Purification of Collagen". 2,973,302.
- Bomstein P. y Sage H. *Ann.Rev.Biochem.*, 49:957-1003, 1980. "Structurally Distinct Collagen Types".
- Breilkreutz D., Díaz de León L., Paglia L., Zeichner M., Wilczek J. y Stern R. *Biochim. et Biophys. Acta.*, 517,(349-359), 1978. "The Synthesis of Presumptive Procollagen Messenger Ribonucleic acid in the Calvaria of the Developing Chick Embryo".
- Clark R.A.F. & Henson P.M. *The Molecular & Cellular Biology of Wound Repair*, (20 y 21), 1988. Plenum Press, U.S.A.
- Chung E., Rhodes R.K. y Miller E.J., *Biochem. & Biophys. Res. Comm.*, 71, No. 4, (1167-1174), 1976. "Isolation of three Collagenous Components of Probable Basement Membrane Origin from Several Tissues".
- Duksin D. y Bomstein P. *The Journal of Biochemical Chemistry*, 252, No. 3, (955-962), 1977. "Impaired Conversion of Procollagen to Collagen by Fibroblasts & Bone Treated with Tunicamycin, an Inhibitor of Protein Glycosylation".
- Ehrlich H.P., Bomstein P. *Nature New Biology*, 238, (257-260), 1972. "Microtubules in Transcellular Movement of Procollagen".
- Eyre D. R. *Science*, 207, (1315-1322), 1980. "Collagen: Molecular Diversity in the Body's Protein Scaffold".
- Fessler J.H. y Fessler L.I. *Ann.Rev.Biochem.* 47, (129-162), 1978. "Biosynthesis of Procollagen".
- Gurdon J.B. *Development*, 99, (285-306), 1987. "Embryonic Induction-Molecular Prospects".
- Harris E.L.V. y Angal S. *Protein Purification Methods*. IRL PRESS, Oxford University Press, (10-14), 1989.
- Hay Elizabeth D., *The Journal of Cell Biology*, 91 No.3, (205s-223s), 1981. "Extracellular Matrix".

- Hulmes D., Miller A., Parry D., Piez K. y Woodhead-Galloway J. J. Mol. Biol. 79, (137-148), 1973. "Analysis of the Primary Structure of Collagen for the Origins of Molecular Packing".
- Jackson D.S. y Cleary E.G. Methods of Biochemical Analysis, XV, (26-73), 1967. "Determination of Collagen & Elastin".
- Jimenez S.A. Primeron Rheumatic Diseases. H. Ralph Schumacher, Jr. M.D., Published by the Arthritis Foundation, Atlanta, (6-30), 1988.
- Joos U., Vogel D. & Ries P. 28 th Congress of the German Soc. of Oral & Maxillofacial Surgery., Tübingen, May 9 to 12, 1978. "The use of Collagenfleece for filling up bone defects in maxillofacial surgery".
- Joos U. y Vogel D. John Wiley & S. Ltd. Mechanical Properties of Biomaterials, (515-518), 1980. "Collagen Fleece as a Biomaterial for Mandibular Defects".
- Joos U., Ochs G. & Ries P.E. Biomaterials Vol. 1, (23 - 25), 1980. "Influence of Collagenfleece on Bone Regeneration".
- Kivirikko K.I. y Risteli L. Medical Biology, 54, (159-186), 1976. "Biosynthesis of Collagen & its Alterations in Pathological States".
- Koehenlein H.E. Plastic & Reconstructive Surgery, Vol. 50, No. 5, 1972. "Effects of various hemostyptic drugs in rats".
- Kühn K. Connective Tissue Res., 10, (5-10), 1982. "Relationship Between Aminoacid Sequence & Higher Structures of Collagen".
- Miller E.J. Biochemistry, 10, No. 9, (1652-1659), 1971. "Isolation & Characterization of α Collagen from Chick Cartilage Containing Three Identical α Chains".
- Miller E.J. y Rhodes R.K. Methods in Enzymology, Acad. Press, 82 (33-64), 1982. "Structural & Contractile Proteins".
- Moro L. y Smith B. Arch. of Biochem. & Biophys., 182, (33-41), 1977. "Identification of Collagen $\alpha 1(I)$ Trimer & Normal Type I Collagen in a Polyoma Virus-Induced Mouse Tumor".
- Neuman R.E. y Logan M.A. J. Biol. Chem., 184, (299-305), 1950. "The Determination of Hydroxyproline".

- Olsen B.,Guzman I.A.,Engel J.,Condit Ch.y Aase S. Biochemistry, 16,No.13,(3030-3036),1977."Purification & Characterization of a Peptide from the Carboxy Terminal Region of Chick Tendon Procollagen Type I".
- Paglia L.,Wilczek J.,Díaz de León L.,Martin G.R.,Hörlein D. y Müller P. Biochemistry, 18,No.22,(5030-5034),1979."Inhibition of Procollagen Cell-Free Synthesis by Amino-Terminal Extension Peptides".
- Paglia L.,Westner M.,Duchene M.,Ouellette L.,Hörlein D.,Martin G. y Müller P. Biochemistry, 20,(3523-3527),1981."Effects of Procollagen Peptides on the Translation of Type II Collagen Messenger Ribonucleic Acid on Collagen Biosynthesis in Chondrocytes".
- Palmiter R.,Davidson J.,Gagnon J.,Rowe D. y Bornstein P. The Journal of Biological Chemistry, 254,No.5,(1433-1436), 1979."NH₂-Terminal Sequence of the Chick Pro α 1(I) Chain Synthesized in the Reticulocyte Lysate System".
- Parry D., Flint M.,Gillard G. y Craig A. FEBS Letters, 149,No.1,(1-7),1982."A Role for Glycosaminoglycans in the Development of Collagen Fibrils".
- Pérez Tamayo R. American Journal of Pathology, 92,No.2,(509-551),1978."Pathology of Collagen Degradation".
- Prockop D.,Kivirikko K.,Tuderman L. y Guzman N. The New England Journal of Medicine, 301,No.1,(13-21),1979."The Biosynthesis of Collagen & its Disorders".
- Ramachandran G.N. y Reddi A.H. Biochemistry of Collagen, Plenum Press.,1976.
- Rhodes R.K. y Miller E.J. Biochemistry, 17,No.17,(3442-3448), 1978."Physicochemical Characterization & Molecular Organization of the Collagen A & B Chains".
- Roitt I. Essential Immunology 7th. Edition,Blackwell Sci.Pub.1991.
- Sage H. y Bornstein P. Biochemistry, 18,No.17,(3815- 3827), 1979. "Characterization of a Novel Collagen Chain in Human Placentae & its Relation to AB Collagen".
- Sandell Linda J. & Boyd Charles D., Extracellular Matrix Genes, Academic Press, Inc., (35),1990.
- Shaw L.M. y Olsen B.R. TIBS, 16,(191-194),1991."FACIT Collagens:Diverse molecular Bridges in Extracelular Matrices".
- Stewart T.E., Gay R. E. y Gay S. Clinical Impact of Bone & Connective Tissue Markers, Acad.Press.,1989."The Collagens".

- Sykes B.,Puddle B.,Francis M. y Smith R. Biochem. Biophys. Res. Commun., 72 (1472-1478), 1976. "The Estimation of two Collagens from Human Dermis by Interrupted Gel Electroforesis".
- Uitto J. Arch.of Biochem.& Biophys.,192,No.2,(371-379),1979."Collagen Polymorphism:Isolation & Partial Characterization of $\alpha 1(I)$ -Trimer Molecules in Normal Human Skin".
- Veis A. Connective Tissue Res., 10,(11-24), 1982."Collagen Fibrillogenesis".
- Woessner J.F. Arch.of Biochem. & Biophys., 93,(440-447), 1961."The Determination of Hydroxyproline in Tissue & Protein Samples Containing Small Proportions of this Imino Acid".