

173
2oj.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

COLAGENA CUTICULAR DE Phascolosoma antillarum.
Grube and Oersted, 1859. (Sipunculida).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

B I O L O G O

P R E S E N T A :

TERESA PATRICIA SANTOS GONZALEZ



MEXICO; D. F.



1994.

TESIS CON
FALDA 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.

COLAGENA CUTICULAR DE Phascolosoma antillarum.
Grube and Oersted, 1859. (Sipunculida).

Teresa Patricia Santos González.

INDICE:

I. RESUMEN.

II. INTRODUCCION.

III. OBJETIVO.

IV. MATERIALES Y METODOS.

- 1. Microscopía Electrónica.**
- 2. Obtención de cutículas.**
- 3. Extracción de colágena cuticular.**
- 4. Purificación de colágena cuticular.**
- 5. Determinación de hidroxiprolina.**
- 6. Electroforesis.**
- 7. Cristallitos SLS.**
- 8. Susceptibilidad a tripsina y a colagenasa bacteriana.**

V. RESULTADOS.

- 1. Microscopía Electrónica**
- 2. Extracción y purificación de colágena cuticular.**
- 3. Determinación de hidroxiprolina.**
- 4. Obtención de fibras .**
- 5. Susceptibilidad a tripsina y a colagenasa bacteriana.**

VI. DISCUSION.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

A la memoria de mi padre Gilberto Santos Lara y de mi tía Limbania Santos Lara.

A mi gran y amorosa mamá Josefina González vda. de Santos.

A Luis Gregorio Santos Rodríguez.

Esta investigación se desarrolló bajo la dirección del Dr. Alfonso Torre Blanco, en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Mi agradecimiento para la M. en C. Guadalupe Zavala Padilla del Laboratorio de Microscopía Electrónica, M. en C. Alejandro Martínez Mena y Profr. José Antonio Hernández Gómez del Laboratorio de Microcine, y al Profr. Jorge Moreno Hernández, del Laboratorio de Morfofisiología Animal; todos de la Facultad de Ciencias. Especialmente a la Dra. Annie Pardo Semo por su solidaridad y al Dr. Alfonso Torre Blanco por su paciencia.

I. RESUMEN.

En este trabajo se efectuó un análisis de la colágena cuticular del sipuncúlido Phascolosoma antillarum, a fin de compararla con otras colágenas de invertebrados y en particular con la colágena cuticular de los anélidos, grupo cercano filogéticamente.

A nivel de Microscopía Electrónica se exploró la cutícula y los paquetes musculares de la pared corporal de P. antillarum, obteniéndose imágenes de las fibras de colágena sólo del músculo. El diámetro promedio de las fibras fué de 14.6 +/- 1.8 nm, y no mostraron periodicidad distinguible.

Los procedimientos de extracción y purificación de colágena cuticular fueron exitosos, pues se recuperó en el extracto final el 89% de la hidroxiprolina inicial. El patrón electroforético de esta colágena mostró la presencia de un solo componente con un peso molecular de 470,000. En uno de los diferentes intentos por inducir la formación de cristallitos SLS, se obtuvieron fibras reconstituidas sin periodicidad aparente, de aspecto irregular y muy delgadas, el diámetro promedio fué de 9.3 +/- 1.9 nm, medidas en tinción negativa. La colágena cuticular de P. antillarum no mostró susceptibilidad a la degradación con tripsina aún después de 23 horas de incubación, sin embargo al ser incubada en presencia de colagenasa bacteriana, dió lugar a fragmentos de peso molecular inferior a los 470,000 Dalton, destaca un fragmento de aproximadamente 230,000 Dalton, resistente a la colagenasa aún después de 24 horas de incubación.

II. INTRODUCCION.

1. ESTRUCTURA DE LA PROTEINA.

Extendida en todo el Reino Animalia, la proteína más abundante es la colágena. Esta es el componente más importante y abundante del tejido conectivo, al que da forma y rigidez. La colágena está presente desde las esponjas (fibras de espongina), hasta los primates.

Con respecto a otras proteínas la colágena es particularmente abundante en los animales; por ejemplo en los mamíferos constituye el 30% de todas las proteínas del cuerpo, encontrándose responsable de la integridad funcional de distintos tejidos y órganos como: cartilago, córnea, membranas basales en general, dientes, piel, tendones, glomérulos renales, como soporte estructural de vasos sanguíneos, etc. (Nimni, 1983., Gross, 1961. y Trelstad, 1981).

En la actualidad se habla de la colágena como una familia de moléculas especializadas, cada una producto de genes diferentes que han evolucionado hacia funciones estructurales particulares en la matriz extracelular. Es común a todas las moléculas de colágena la repetición del tripéptido Gly-X-Y , que da lugar a una estructura triple helicoidal.

Esta proteína se encuentra en el material intersticial llamado matriz extracelular. Al microscopio electrónico se ponen de manifiesto numerosas fibras (Fig. 1). Cada fibra está formada a su vez por la unión de fibrillas. Las moléculas que componen a estas fibrillas son precisamente las moléculas de colágena. Esta proteína fué aislada por vez primera en los años 50 por Gross. Schmitt & Higberger. (Ramachadran, y Reddi.,1976).

La principal propiedad de todas las moléculas de la familia de la colágena es su estructura triple helicoidal formada en la mayoría de los casos por tres subunidades polipeptídicas denominadas cadenas alfa. Estas pueden ser diferentes (heterotrímero) o iguales entre si (homotrímero).

Cada subunidad polipeptídica presenta a una estructura helicoidal girada hacia la izquierda con tres residuos por vuelta. A su vez las tres subunidades juntas forman una triple hélice con giro a la derecha. Este trímero tiene una longitud aproximada de 280 nm y un diámetro de 1.5 nm. Esta estructura de hélice abierta es ideal para formar fibras que resistan tensiones. (Riehl, 1980).

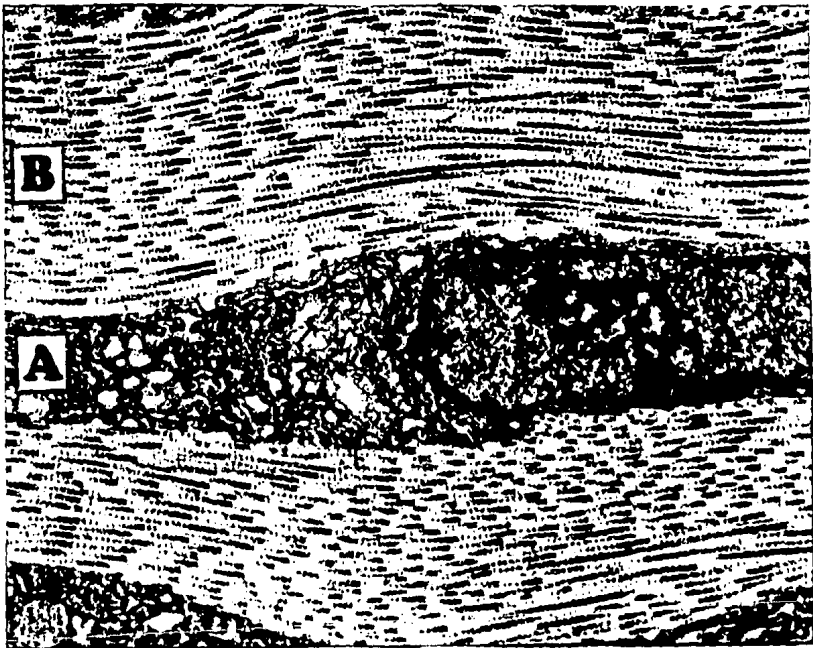


Figura 1. Micrografía electrónica que muestra la organización en fibrillas de la colágena. A: Fibroblasto. B: Matriz Extracelular. (Trelstad, 1981).

La estructura de triple hélice esta determinada por la secuencia de aminoácidos que componen la cadena alfa, es decir por la estructura primaria que en el caso de la colágena es la repetición del tripéptido Gly-X-Y- en donde Gly es glicina, y X y Y, cualquier otro aminoácido. La Glicina juega un papel muy importante ya que es un requerimiento sin el cual no se formaría la estructura triple helicoidal, dado su tamaño pequeño que permite el giro de la molécula (Fig. 2).

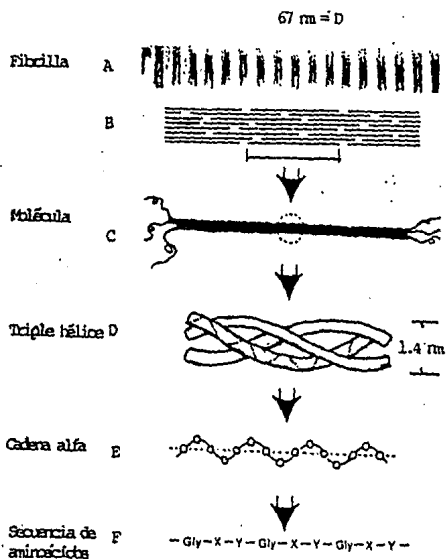


Figura 2. A: Las fibrillas de colágena al microscopio electrónico muestran un aspecto estriado periódico de 67 nm B: En la fibrilla las moléculas de colágena se arreglan desplazadamente una con respecto a la otra. C: Cada molécula es un haz de 300 nm de largo. D: La molécula triple helicoidal tiene 1.4 nm de diámetro. E: Cada una de las subunidades polipeptídicas (cadenas α) que constituye la triple hélice tiene una secuencia de $1,050$ aminoácidos que giran a la izquierda por tres residuos por vuelta. F: La secuencia de aminoácidos se caracteriza por la reiteración del tripéptido Gly-X-Y. (Trelstad, 1981)

La importancia funcional de la colágena radica en que las moléculas forman estructuras fibrilares en el tejido conectivo. En la colágena tipo I las moléculas se arreglan escalonadamente una con respecto a otra con un desplazamiento de $1/4.4$ de la longitud total de la molécula que es de 280 nm esta distancia de espaciamiento es aproximadamente de 67 nm y se llama período D. Las moléculas están entonces desplazadas con respecto a sus vecinas por un período D (Fig. 3). Este arreglo periódico explica la apariencia estriada de las fibras de colágena tipo I que se observa al microscopio electrónico.

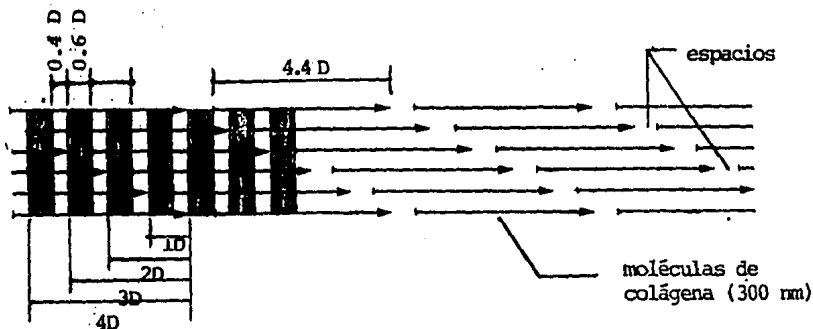


Figura 3. Diagrama que esquematiza el arreglo escalonado de las moléculas de colágena que da como resultado la apariencia estriada de la fibra. El extremo de cada molécula, está desfasado una distancia de 0, 1, 2, 3, o 4 D, del extremo de las moléculas vecinas. (Trelstad, 1981).

En ambos extremos de la molécula se encuentran secuencias terminales llamadas telopéptidos. En estas zonas las cadenas α son pobres o exentas de glicina y prolina; por consiguiente no están arregladas entre sí en triple hélice.

Estos telopéptidos son importantes como sitios donde ocurren enlaces covalentes entre las moléculas y son necesarios para el autoensamble de las moléculas de colágena en las fibrillas.

Otra característica común e importante de las moléculas de colágena es su alto contenido en iminoácidos (de 150 a 250 por cada mil aminoácidos), esto determina la estructura secundaria helicoidal de las cadenas α . En el tripéptido Gly-X-Y, X y Y son posiciones en las que es frecuente encontrar prolina y 4-hidroxiprolina respectivamente, (la 3-hidroxiprolina es menos frecuente). De hecho el tripéptido Gly-Pro-Hipro forma aproximadamente el 10% de la molécula. (Nimni. 1983).

Se ha propuesto que la 4-hidroxiprolina puede formar puentes de hidrógeno intercatenarios que estabilizan la estructura triple helicoidal. Existen modelos que relacionan la cantidad de iminoácidos con la temperatura de desnaturalización de la molécula (Jossé and Harrington. 1964). Estudios de modelos de péptidos indican que la hidroxiprolina contribuye a la estabilidad térmica más que la prolina. Se ha mostrado que existe una correlación casi lineal entre la temperatura de desnaturalización de la colágena y el contenido total de iminoácidos (prolina + hidroxiprolina). (Ramachandran. et. al. 1973 y Torre-Blanco. 1987).

Otro aminoácido importante es la hidroxilisina, a la que se le unen azúcares y que junto con la lisina interviene en las uniones covalentes inter e intramoleculares. La lisina puede ser hidroxilada en el 5° átomo de carbono, y a este grupo hidroxilo se le une glucosa y galactosa. Las uniones covalentes entre las moléculas de colágena se deben también a modificaciones en la lisina e hidroxilisina; que se efectúan en el 6° átomo de carbono. Esta modificación es una desaminación oxidativa, cuyo resultado es la formación de un grupo aldehído en el sexto carbono. Los primeros enlaces que se forman son débiles, de carácter hidrofóbico e interacciones iónicas, después se forman enlaces covalentes que son los que estabilizan a la molécula. Si algunas de las modificaciones de los aminoácidos no ocurren por deficiencias enzimáticas, se traducen en enfermedades del tejido conectivo. por ejemplo el escorbuto (ausencia de hidroxilación de la prolina) o el síndrome de Ehlers-Danlos (ausencia de hidroxilación del 5° átomo de carbono de la lisina).

Cabe mencionar que la hidroxiprolina es un aminoácido casi exclusivo de la colágena (existe también en el factor Clq del complemento, en la colinesterasa y en los vegetales en la conexina). Esta es una particularidad útil cuando se trata de conocer la concentración de la colágena mediante la cuantificación de este aminoácido, pues su ausencia o presencia y en que cantidad revela lo mismo de la colágena.

Experimentos *in vitro* han mostrado que la colágena soluble extraída con ácido acético o amortiguador de citratos, es capaz de reagregarse con el patrón típico de estriación de las fibras nativas, al regresar a las condiciones de pH neutro y a temperaturas entre 30 y 37° C, formando fibras **in vitro**.

Dependiendo de las condiciones experimentales las moléculas de colágena tipo I pueden formar estructuras de orden superior distintas al arreglo escaalonado típico (Khun. 1982., Gross. 1974. y Bruns. y Gross. 1973); tal es el caso de los cristallitos SLS (Segment Long Spacing) y los FLS (Fibrous Long Spacing).

Los FLS se forman al agregar glicoproteínas (alfa 1 derivada del suero sanguíneo o glicosamín glicanos) a una solución de colágena en ácido acético . En estas estructuras las moléculas de colágena se encuentran acomodadas paralelamente, pero orientadas en diferentes direcciones con respecto a los extremos amino y carboxilo terminal lo que produce un patrón centrosimétrico de bandas, reflejo de la distribución simétrica de los residuos polares y no polares.

Los cristallitos SLS se obtienen mediante la incorporación de polianiones como el adenosín trifosfato (ATP) a soluciones diluídas de colágena en bajas concentraciones de ácido acético. En estos cristallitos las moléculas se asocian lateralmente en forma paralela y en la misma dirección sus extremos amino y carboxilo terminales, de tal forma que la longitud del cristal coincide con la de la molécula.. Presentan también un patrón de bandas que refleja la distribución de aminoácidos polares y no polares a lo largo de la molécula. Cuando los cristales SLS se tiñen negativamente y se observan al microscopio se facilita la medición de su longitud; y al teñirse positivamente se encuentra el patrón de bandas particulares. Esta correlación existente entre el tamaño del cristallito y el de la molécula, así como entre el patrón de bandas y la distribución de cargas, son propiedades que proporcionan información de gran reproductibilidad e importancia en el análisis estructural de la proteína y ha permitido comparar las colágenas de diferentes tipos o de diferentes especies entre sí.

2. HETEROGENEIDAD MOLECULAR.

Existen diferentes tipos específicos de colágena, a pesar de que todas se apegan al patrón descrito; es decir se trata de una familia de proteínas (Bornstein. 1980), producto de la codificación de diferentes genes. El perfil de la distribución de diferentes colágenas involucra a distintas especies, tejidos o etapas del desarrollo ontogénico de un individuo. Sin embargo, las más estudiadas son las de los tejidos de vertebrados.

Actualmente se han demostrado y caracterizado al menos 14 tipos de colágena.

Colágena Tipo I.

El primer tipo genético de colágena identificado; es el más abundante y mejor conocido ; se denomina Colágena Tipo I (Miller. 1971.). Su distribución es amplia, pues aparece en piel, vasos sanguíneos, córnea, dientes, ligamentos y es el principal componente colagénico del hueso y tendón. Está compuesta por dos cadenas polipeptídicas idénticas $\alpha 1(I)$ y una diferente $\alpha 2(I)$. La fórmula abreviada de la Colágena Tipo I es entonces: $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$. (Bornstein. 1980).

Colágena Tipo II.

Sólo se ha descrito en el cartilago hialino. Es una molécula formada por tres cadenas idénticas entre sí llamadas $\alpha 1(II)$. Son distintas a las $\alpha 1(I)$ en la composición de aminoácidos. La Colágena Tipo II, comparada con la Tipo I contiene mayor cantidad de carbohidratos asociados, su fórmula es $[\alpha 1(II)]_3$. (Bornstein. 1980. y Miller. 1972).

Colágena Tipo III.

Aparece principalmente en etapas tempranas del desarrollo formando parte de la piel y vasos sanguíneos, mientras que en la piel del adulto constituye sólo el 10% (Nimni, 1983.). Coexiste frecuentemente con la Tipo I asociada a fibras reticulares de órganos parenquimatosos como pulmón, hígado, riñón, miocardio, bazo y en los tejidos que poseen gran elasticidad: piel, paredes arteriales y cordón umbilical formando agregados fibrilares intersticiales. Igual que la Colágena Tipo II es un homotrímero de cadenas polipeptídicas idénticas llamadas $\alpha 1(\text{III})$, su fórmula es $\alpha 1(\text{III})_3$. (Bornstein. and Miller, 1971).

Colágena Tipo IV.

Es componente de las membranas basales y no forma fibras, sino que se acomoda formando redes establecidas, por interacciones cola con cola y cola con cabeza de las cadenas polipeptídicas. Se han identificado dos diferentes tipos de cadenas llamadas $\alpha 1(\text{IV})$ y $\alpha 2(\text{IV})$, que se asocian en dos formas; una, la más abundante en que se mezclan dos cadenas 1 y una $\alpha 2$ y la otra en que la proporción se invierte, su fórmula es $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ y $\alpha 1(\text{IV})[\alpha 2(\text{IV})]_2$. Posee un contenido mayor de hidroxiprolina y menor de glicina que los tipos intersticiales así como mayor cantidad de carbohidratos que otro tipo de colágena. La Colágena Tipo IV presenta secuencias no colagénicas. Estos dominios globulares en los extremos amino y carboxilo que son típicos de las formas inmaduras de la molécula permiten, precisamente adoptar la forma reticular. (Bornstein, 1980).

Colágena Tipo V.

Casi siempre ocurre alrededor de las células, por lo que ha sido llamada colágena pericelular. Al parecer este tipo genético de colágena participa en la unión intercelular y en la conformación del citoesqueleto y anclaje de ciertas células a otros elementos del tejido conectivo. Se ha encontrado también formando membranas basales del músculo liso (Eyre.

1980.). Esta colágena comparte características con las colágenas intersticiales aunque las fibras que forma son de menor tamaño. Se trata de un heterotrímero donde las cadenas polipeptídicas se han llamado $\alpha 1(V)$ $\alpha 2(V)$ $\alpha 3(V)$ o cadenas A, B, y C. (Burgeson. 1976).

Colágena Tipo VI.

Presente en vasos sanguíneos, útero, placenta, ligamentos, piel y pulmón. Forma microfibrillas intersticiales de alto peso molecular; con dos tercios de su estructura representados por dominios globulares en los extremos, y estructura triple helicoidal en su porción central. Este tipo de colágena presenta tres cadenas distintas entre si: $\alpha 1(VI)$ $\alpha 2(VI)$ $\alpha 3(VI)$. (Odermatt. et. al. 1983).

Colágena Tipo VII.

Se encuentra en las fibras de anclaje de las membranas basales sólo o en forma de dímero microfibrilar. Muestra un tamaño mayor que el común por lo que se le conoce como colágena de cadena larga. Casi la totalidad de su estructura es triple helicoidal. Está formada por tres cadenas polipeptídicas iguales llamadas $\alpha 1(VII)$; su fórmula es $[\alpha 1(VII)]_3$. (Bentz.. et. al. 1983).

Colágena Tipo VIII.

Se ha identificado en cultivo de algunos tipos de células endoteliales. Se sabe que forma hélices pequeñas y que la proteína muestra zonas sensibles a la acción de proteasas inespecíficas, lo que sugiere la existencia de zonas sin triple hélice. Presenta tres cadenas iguales: $\alpha 1(VIII)$. La fórmula es $[\alpha 1(VIII)]_3$. (Sage. et. al. 1984).

Colágena Tipo IX.

Originalmente considerada como un componente menor del cartilago, datos recientes indican que la cantidad de colágena tipo IX en el cartilago está por encima del 20% de la Colágena Tipo II. Se trata de un heteropolímero de tres cadenas α genéticamente distintas:

$\alpha 1(\text{IX})$, $\alpha 2(\text{IX})$, $\alpha 3(\text{IX})$. Una característica inusual de este tipo de colágena es la presencia de glicosaminoglicanos unidos covalentemente en la cadena $\alpha 2$. El modelo sugerido es de una tripe hélice con puntos flexibles de aproximadamente 200 nm de longitud y peso molecular de 210,000. La molécula se fabrica en condrocitos y se encuentra altamente concentrada en los espacios pericelulares inmediatamente alrededor de los condrocitos, la forma en que se agrega y su función son desconocidas, sin embargo su química y localización sugieren una relación física cercana con la Colágena Tipo II y con la superficie de las fibras del cartilago. (Vander Rest. 1985).

Colágena Tipo X.

Se trata de una cadena corta aislada de cartilago. Es notable su pequeño tamaño y la ausencia de puentes disulfuro. Contiene tres cadenas α idénticas. La triple hélice tiene un peso molecular de 45,000 y 138 nm de largo. Tiene partes globulares y dominios helicoidales y dominios globulares. La triple hélice no es susceptible a la digestión con tripsina. La distribución de la Colágena Tipo X en el hueso en crecimiento está restringida a la zona de los condrocitos hipertrofiados; células que aparentemente la sintetizan. Esta proteína juega un papel importante en la transición de cartilago a hueso pues se encuentra asociada a las vesículas de la matriz del cartilago en las que se acumula la fosfatasa alcalina y el calcio, que son los involucrados en la iniciación de la calcificación del cartilago. Se desconoce como ocurre exactamente (Schmid. and Lisenmayer. 1985).

Colágena Tipo XI.

Este tipo genético de colágena está formado por tres cadenas polipeptídicas diferentes entre sí: $\alpha 1(\text{XI})$, $\alpha 2(\text{XI})$, y $\alpha 3(\text{XI})$ de peso molecular aproximadamente 100,000 cada una, así como una composición de aminoácidos que permite identificarlas como cadenas colagénicas.

Aparentemente ocurre sólo en cartílago y ha sido observada frecuentemente en cultivos que producen otros tipos de colágena específico de cartílago (Tipos II, IX, y X). La función del Tipo XI de colágena es desconocida, pero es posible que se trate de interacciones con el dominio globular de la colágena Tipo IX y con otros componentes de la matriz cartilaginosa. (Liss, A. 1987. y Burgeson, R. 1988.).

Colágena Tipo XII.

Contribuye con la estructura de las fibras de cartílagos y tendones. Recién analizada a partir del mRNA de fibroblastos en tendón. La secuencia de aminoácidos es homóloga, pero no idéntica a la de la Colágena Tipo IX (encontrada exclusivamente en cartílago). Se ha detectado el mRNA de la Colágena Tipo XII en tejidos no cartilagosos como calvaria y tendón. La Colágena Tipo XII es un constituyente normal de la matriz del tendón. (Dublet & van der Rest, 1987).

Colágena Tipo XIII.

De esta proteína se conoce muy poco. Se ha determinado sólo a nivel de cDNA. La función se desconoce, y con respecto a su estructura, se presume en el transcrito la presencia de tres dominios triple helicoidales. Su fórmula quizá sea $\alpha 1(\text{XIII})?$. (Pardo. 1993).

Colágena Tipo XIV.

Esta proteína ha sido recientemente descrita en piel fetal y tendón, y se trata de un homotrímero. Comparte con las colágenas tipo IX y XII las siguientes características: 1. No es capaz de formar fibras por sí misma, sino que se encuentran asociadas a las colágenas fibrilares; y 2. Tienen características estructurales particulares: la molécula se puede dividir en tres regiones funcionales, la primera con uno o dos dominios triple helicoidales, la segunda

PORIFERA

Estudios de microscopía electrónica y análisis de aminoácidos han demostrado la presencia de colágena en esponjas (Ircinia sp.). Estas fibras de colágena se encuentran formando la esponjina que constituye el esqueleto orgánico de estos organismos. (Junqua. 1976.). En la esponja de agua dulce Ephydatia mulleri el análisis de aminoácidos indica que la proteína es homóloga a otras fibras de colágena, en particular, comparte algunas características con la Colágena Tipo XI. El aislamiento del DNA que codifica para esta proteína revela una organización intrón-exón emparentada con la familia génica de la colágena fibrilar. Además se ha descrito un exón de 18 pares de bases que es el más corto exón hasta ahora conocido codificador de una secuencia colagénica triple helicoidal. (Exposito. and Garrone. 1989).

CNIDARIA

En este grupo las anémonas Actinia equina y Metridium sp. presentan alto contenido de colágena en la mesoglea. La colágena presenta un peso molecular de 300,000 -310,000 tres cadenas idénticas de peso molecular 100,000 es decir se trata de un homotrímero. Tiene un 5-6% de hidroxiprolina. En Hydra sp. se han encontrado puentes disulfuro (Nordwing. 1969 y 1973 y Adams. 1978.). Por otro lado, la colágena de la medusa Stomolopus nomurai presenta una composición de subunidades parecida a la de la Colágena Tipo V de vertebrados, o sea un heterotrímero: $\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3$ tiene un 30% de glicina. (Miura, y Kimura, 1985.).

PLATYHELMINTA

El parásito hepático Fasciola hepatica presenta una colágena de tres subunidades con un peso molecular de 500,000 que decae a 320,000 después de estar almacenada por varias semanas a 5°C en buffer de citratos. Forma cristallitos SLS de 2,800 A, tiene un 5-6% de hidroxiprolina y ausencia de puentes disulfuro. (Nordwig. 1969.). presenta además un porcentaje en peso en hexosas más alto que en los vertebrados -12.8%-. Forma cristallitos SLS que recuerdan en

cuanto a tamaño y patrón de bandas a la Colágena Tipo I de vertebrados. (Nordwig. and Hayduk. 1969). La colágena del estado larval de la tenia Taenia solium así como la del adulto, presenta algunas particularidades: carece de hidroxiprolina forma fibras delgadas sin aparente periodicidad, tiene una temperatura de desnaturalización de 36°C y su patrón de bandas en los cristaliticos SLS es completamente diferente al observado en colágenas de vertebrados y en otros invertebrados. (Torre-Blanco y Toledo. 1981).

NEMATODA

En el caso de este Phylum se conocen resultados sobre la colágena cuticular. Para el caso de Ascaris lumbricoides se ha encontrado un peso molecular de 62,000 (Mc. Bride. and Harrington. 1967.), o de 52,000 (Evans. 1976.), y cuando se desnaturaliza no se observa cambio en el peso molecular, lo que hace pensar que la triple hélice está formada por una sola cadena que se enrolla sobre si misma. Se han aislado tres subunidades con pesos moleculares similares, un contenido de 12% de hidroxiprolina y un 27% de glicina lo que permite pensar en regiones no formadoras de triple hélice necesarias para el doblaje de la cadena al autoenrollarse. Otra característica es la presencia de cisteína, lo que parece contribuir a la formación de agregados macromoleculares. Tiene un 20% de prolina. Estudios han mostrado que Ascaris lumbricoides presenta otro tipo de colágena en la capa muscular (Fujimoto. 1968.), cuya composición de aminoácidos recuerda más a las colágenas de vertebrados que a las cuticulares; incluso puede agruparse dentro del grupo de las colágenas intersticiales. (Ayala. 1982.). Del nemátodo Ascaris sumu se conoce la colágena de la membrana basal intestinal en donde se han encontrado subunidades de peso molecular 179,000 - 185,000. El análisis de los componentes polipeptídicos recuerda, igual que en el caso de la colágena de la capa muscular de A. lumbricoides, a la colágena de los vertebrados. (Noelken. et. al. 1986).

ANNELIDA.

Los estudios de colágena en este Phylum han arrojado al menos dos tipos diferentes de colágena: 1. La colágena extraída del cuerpo de la lombriz de tierra, libre de cutícula, así

como la colágena del músculo de Hermodice sp. (Garza. 1984.), que por sus características de peso molecular y composición de subunidades están relacionadas con las colágenas intersticiales de los vertebrados, y 2. Las colágenas cuticulares que han sido mejor caracterizadas y que presentan las siguientes características:

Lumbricus terrestris: la colágena cuticular de este anélido tiene un peso molecular de aproximadamente 1'900,000 en contraste con el de 300,000 de las colágenas comunes de vertebrados. Se han encontrado tres diferentes subunidades de 300,000 dalton cada una, ligadas con puentes disulfuro. Forma cristallitos SLS, el contenido de glicina es aproximadamente de 35% y el 96% de los residuos de prolina están hidroxilados. (Fujimoto. 1964). Los poliquetos marinos Nereis virens (Murray. et. al. 1982.) y N. japonica (Kimura. 1969) tienen colágenas cuticulares con características similares a las de la lombriz de tierra. Sus pesos moleculares son de 1'400,000 y 1'400,000 - 1'700,000 respectivamente. el porcentaje de residuos de prolina hidroxilados es de 75% y 88% respectivamente; y tienen un 35% de residuos de glicina. Estudios posteriores de la colágena cuticular desnaturalizada de Nereis revelan la existencia de dos tipos de subunidades, en proporción molar 2:1 comparable a la fórmula $(\alpha_1)_2\alpha_2$; cada cadena polipeptídica tiene un peso de 470,000 dalton.

MOLUSCA.

En la piel del pulpo Octopus vulgaris se encontró una colágena de 262,000 dalton y la presencia de dos subunidades: α_1 de 92,000 dalton y α_2 de 85,000 dalton; sugiriendo la fórmula $(\alpha_1)_2\alpha_2$ (Kimura. 1981.). El músculo del mismo animal tiene dos tipos distintos de colágena: una fracción mayor de 300,000 dalton y cada subunidad de 100,000 como en la Colágena Tipo I, y una fracción menor que contiene unicamente cadenas γ . (Takema. 1982). En el abulón se encontró que la colágena del músculo del pie tiene tres cadenas α idénticas con un peso molecular de 100,000 cada una (Kimura. 1974.). En el cartilago craneano del calamar Todarodes pacificus se ha encontrado que la colágena es rica en carbohidratos y corresponde a la Tipo I; es decir 300,000 dalton, tres subunidades de 100,000 cada una y una composición de subunidades $(\alpha_1)_2\alpha_2$, además de un 38% de glicina. (Kimura. 1984).

Estudios comparativos de colágenas aisladas de otros invertebrados revelan la presencia de características parecidas a las colágenas intersticiales de vertebrados: tres subunidades con un peso molecular aparente de 100,000 cada una. Tal es el caso de Maracanthoryncus hirudinaceus, Acantocephala. (Cain. 1970.), Urechis unicinctus, Echiurida. (Kimura. 1983), Echinodermata (Pucci - Mianfra. 1978) , Locusta migratoria, Arthropoda. (Ashurst. 1980),

Periplaneta americana, Arthropoda: insecta. (Francoise. 1980.), y del mismo Phylum los crustáceos cangrejo y langosta. (Kimura. 1969 y 1986).

Me parece importante comentar la escasez de investigaciones sobre colágena en el Phylum Arthropoda, a pesar de ser el grupo de animales más abundante, diverso y evolucionado. En las revisiones sobre colágena de invertebrados publicadas (Adams, 1978 y Norwing, 1969), se mencionan 14 citas referentes a artrópodos. Estos son solo datos aislados y sin correlación. Una investigación más completa , fué la que realizó Kimura, en 1986 en donde analizó la colágena del músculo abdominal de dos crustáceos (una langosta y un langostino), este estudio tuvo una razón comercial, que fué la de caracterizar el deterioro que sufre el tejido después de la refrigeración; un problema general en la comercialización de crustáceos. Aparte de este, los otros estudios de colágena en artrópodos no revelan aparentemente ninguna característica estructural o bioquímica de la colágena, que no tenga precedente en los demás estudios de invertebrados y vertebrados.

En la figura 5 se presenta una tabla que resume la información presentada sobre colágena en invertebrados.

PHYLUM	ORGANISMO	LOCALIZACION	PESO MOL. (D)	# SUBUNIDADES P. M.	Composición	SLS	OBSERVACIONES	CITA	
CNIDARIA	<i>Actinia</i> sp.	Mesoglea	310,000	3	100,000c/u (α 1)3	si	5-6% Hpro. sólo una subunidad	26	
		Mesoglea	195,000	3	95,000c/u (α 1)3	si	Contracción con otra referencia.		
	<i>Stomatopus nonura</i> (medusa)	Mesoglea	260,000	3	97,000 87,000 86,000	α 1 α 2 α 3		Parecida a la colágena tipo V de vertebrados. 30% de Gly. Heterotrimero	41
PLATELMIINTA	(anémona)	Mesoglea		3		(α 1)3	Homotrimero	1	
		<i>Fasciola hepatica</i>	Organismo completo	500,000	3		si	5-6% Hpro. P. M. decae a 320,000 des pués de almacenamiento en buffer de citratos por varias semanas a 5°C	48
		<i>Taenia solium</i>	Cisticerco	200,000	2	100,000	si	Ausencia de puentes disulfuro. Carece de hidroxiprolina. Patrón de bandas SLS diferente a otros.	63
NEMATODA	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Cutícula	900,000		62,000		Subunidades ligadas por puentes disulfuro.	37	
	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Cutícula	156,000	3	52,000		27% Gly. 80% triple hélice	11	
	<i>Ascaris suum</i>	Mesoglea basal		2	185,000 179,000		Domino globular, 3% de prolina hidroxiladas	47	
ANELIDA	<i>Lumbricus terrestris</i>	Cuticular	\pm 1.9 mill	3	600,000	si	35% Gly., 96% de prolina hidroxiladas.	15	
	<i>Nereis virens</i>	Cuticular		3	470,000c/u	2,400 nm	75% de prolina hidroxiladas	27	
	<i>Nereis japonica</i>	Cuticular	1,400,000	3	470,000c/u		80% de prolina hidroxiladas, 34% de glicinas	27	
ANELIDA	<i>Neanthes diversicolor</i>	Cuticular	300,000					44	
	<i>Macranchoryncus hirudinaceus</i>	Organismo completo	329,000				30% de glicinas, existen 2 subunidades diferentes	9	
	<i>Hermodice</i> sp.	Muscular	100,000	1	100,000	si	Cristalitos similares a los de colágenas intersticiales de vertebrados.	17	
MOLUSCA	<i>Octopus vulgaris</i>	Piel	262,000	3	92,000 (1) 85,000 (2) 80,000	(α 1)2 α 2'		29	
		Musculo	300,000	1	300,000	(α 1)2 α 2		59	
	<i>Todarodes pacificus</i> (calamar)	Cartilago craneano	300,000	3	100,000	Cadena Y (α 1)2 α 2	Presencia de puentes disulfuro	32	
VARIOS	<i>Acanthocephala</i>			3		(α 1)2 α 2		9	
	<i>Urechis unicinctus</i>	Piel	290,000	3	99,000 (1) 88,000 (2)	(α 1)2 α 2	Ausencia de puentes disulfuro	30	
	<i>Langosta</i>	Musculo	300,000	3	100,000	positivo (α 1)2 α 2	Dos cadenas α y un poco de β	2	
	<i>Equino, dermata</i>			3		(α 1)2 α 2	Información sugetida por SDS-PAGE	53	

III. OBJETIVO.

El presente trabajo pretende llevar a cabo un análisis de la colágena cuticular de un organismo aparentemente relacionado filogenéticamente con los anélidos, el sipuncúlido Phascolosoma antillarum, a fin de compararla estructuralmente con la colágena cuticular de los anélidos y establecer así la posible relación evolutiva entre las colágenas de ambos grupos.

El Phylum sipuncúlida agrupa aproximadamente a 330 especies de animalés celomados y protostomados de aspecto externo sencillo, como el de un cacahuete. Tienen un introverso invaginable y un tronco que es de forma cilíndrica, periforme, de saco o vermiformes como es en la mayoría de los casos. Son de color pardo y miden desde 2 mm hasta 72 cm. Son animales exclusivamente marinos cosmopólitos que habitan tanto en litorales templados como en aguas polares profundas. Viven enterrados en la arena, en recovecos de rocas, corales o conchas donde permanecen sedentarios.

La estructura general es celomada, no segmentada y con simetría bilateral. Carecen de aparato circulatorio y respiratorio. Son dioicos sin dimorfismo sexual aparente y con fecundación externa. Se alimentan de materia orgánica existente en el fango y arena que toman (Cendero. 1971., Meglitsch. 1978 y Barnes . 1972)

En este trabajo se utilizó la especie Phascolosoma antillarum (Fig. 6), que se encuentra en las costas del Atlántico, Golfo de México, Brasil y Centroamérica. Pertenecce a la familia Phascolosomatidae y se distingue por poseer un disco oral con tentáculos e introverso con papilas (Gibbs. 1977).

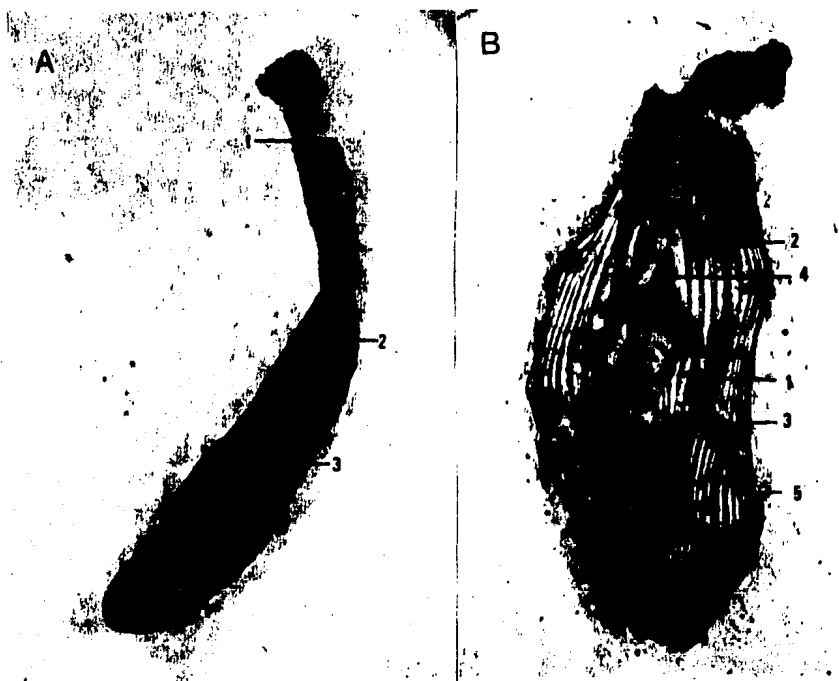


Figura 6 . Phascolosoma antillarum. Aumentos: 3X.

A: Animal entero. 1. Collar cefálico. 2. Ano. 3. Nefridio.

B: Animal disecado. 1. Gónada. 2. Cordón nervioso. 3. Intestino. 4. Músculo alargador. 5. Músculos longitudinales. (Gibbs. 1977).

IV. MATERIALES Y METODOS.

Ciento cincuenta y ocho ejemplares del sipuncúlido *Phascolosoma antillarum* fueron colectados en Isla Sacrificios, Veracruz en la zona de la rompiente al sur-oeste aproximadamente a 400 m de la costa (Figura 7). Los organismos se extrajeron rompiendo las rocas de coral en cuyo interior habitan. Algunos se transportaron a la Ciudad de México congelados en hielo seco, y otros fueron transportados en la roca, manteniéndolos vivos con cambios continuos de agua de mar (aproximadamente cada 3 horas). El material congelado se destinó para el trabajo de Bioquímica y el vivo para Microscopía Electrónica.

La determinación del género y la especie se efectuó en el Laboratorio de Invertebrados de la Facultad de Ciencias.

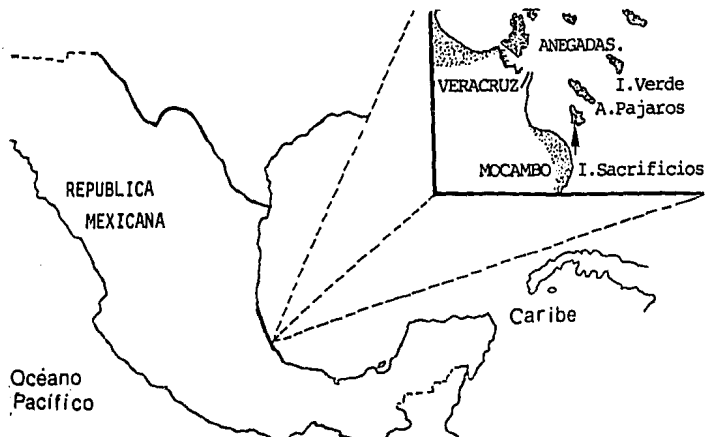


Figura 7. Mapa del sitio de colecta.

1. MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Un organismo vivo se disecó en glutaraldehído al 2.5% preparado con agua de mar filtrada, separando fragmentos de tejido de la pared corporal muscular y cutícula, de 1 x 1 mm aproximadamente; ese tejido se fijó en la misma solución durante dos horas a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). Una parte fué postfijada en tetraóxido de osmio durante hora y media y la otra no se postfijó. A continuación se llevó a cabo la deshidratación seguida de la preinclusión e inclusión en epón. (Fig. 8).

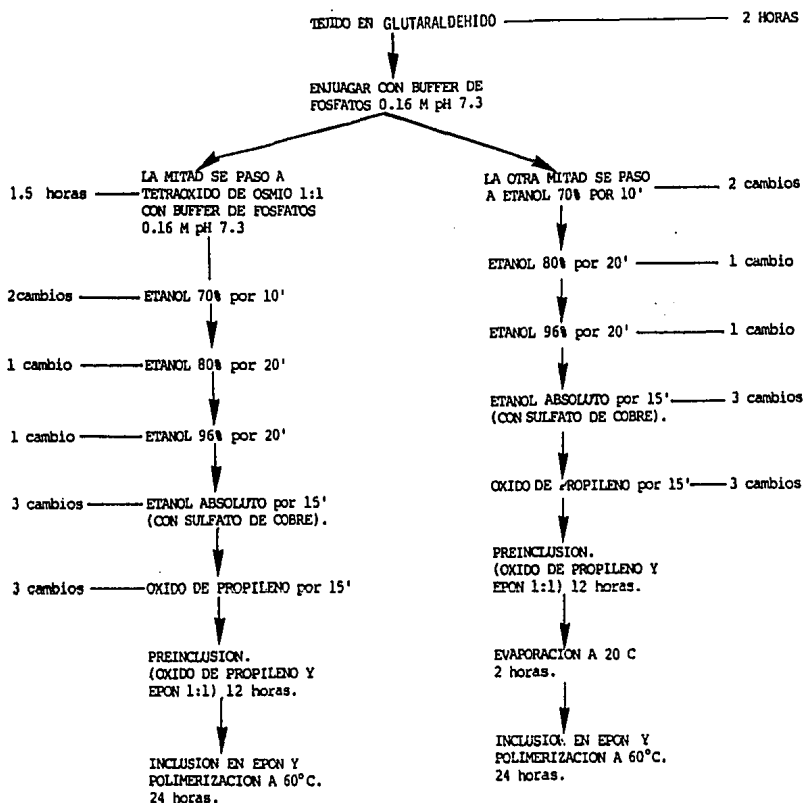


Figura 8. Resumen de la técnica de preinclusión e inclusión.

Los bloques se cortaron en un ultramicrotomo Sorval MT-1. Primero se exploraron los bloques fijados doblemente (glutaraldehído más tetraóxido de osmio) y después los fijados sólo en glutaraldehído, eligiéndose estos últimos para continuar el estudio.

La técnica para explorar los bloques consistió en tallar con navajas una pirámide en el sitio en donde se encuentra el tejido, y de ahí obtener cortes semifinos (aproximadamente 1μ) que se montaron en un portaobjetos y se tificaron con una solución de azul de toluidina al 1%, para verificar el estado del tejido en cuanto a fijación, deshidratación e inclusión, así como localizar la zona precisa de mayor interés. Se talló una segunda pirámide más pequeña sobre la zona seleccionada del tejido, que involucró cutícula y pared corporal muscular. Sobre esta zona se trabajó hasta obtener cortes ultrafinos. Se probaron diferentes métodos de tinción, buscando las condiciones óptimas en donde no se precipitaran los metales y el contraste fuera el mejor. Los distintos intentos se resumen en la Figura 9.

SUBSTANCIA	TIEMPO		SUBSTANCIA	TIEMPO
1. Acetato de uranilo 2%	20'	+	Citrato de plomo 3N	10'
2. Acetato de uranilo 2%	10'	+	Citrato de plomo 3N	5'
3. Acetato de uranilo 1%	2.5'	+	Citrato de plomo 1.5N	5'
4. Acetato de uranilo 0.1%	2.5'	+	Citrato de plomo 3N	5'
5. Acido fosfotúngstico (PTA) 0.01%	3'	-	-	-
6. Acetato de uranilo 0.01%	5'	+	Acido fosfotúngstico (PTA) 0.1%	3'
7. Acetato de uranilo 1%	5'	+	Acido fosfotúngstico (PTA) 0.4%	5'
8. Citrato de plomo 0.2% en NaOH 1N	3'	-	-	-
9. Acetato de uranilo 2%	5'	+	Citrato de plomo 3N	2.5'
10. Acetato de uranilo 2%	2.5'	+	Citrato de plomo 3N	5'
11. Acetato de uranilo 0.01%	10'	+	Acido fosfotúngstico 0.1%	6'

Figura 9. Resumen de los tiempos y sustancias de contraste.

Se obtuvieron micrograffas a un aumento de 50,000 con un voltaje de 80 KV, en un microscopio electrónico Zeiss modelo EM-10. Posteriormente se imprimieron y ampliaron los negativos a 5X en papel F4.

MEDICION DE FIBRAS.

El diámetro de las fibras fué medido sobre los negativos a 50,000 X utilizando una lente de aumento con una reglilla con escala 1/10 mm incluida.

2. OBTENCION DE CUTICULAS DE Phascolosoma antillarum.

Los organismos se mantuvieron congelados a - 16°C hasta el momento de diseccionarlos. Después de congelar y descongelar dos veces fué más sencillo separar la cutícula de la pared corporal muscular. Con la disección se separaron tres componentes de cada organismo: cutícula, pared corporal muscular y órganos internos.

Las cutículas se mantuvieron congeladas a - 16°C hasta el momento de ser utilizadas.

3. EXTRACCION DE COLAGENA CUTICULAR.

Se descongelaron las cutículas y se pesaron tres gramos. Las cutículas pesadas se lavaron tres veces con agua destilada a 4°C y se pusieron a extraer a 4°C en 250 ml de ácido acético 0.5 M conteniendo los siguientes inhibidores de proteasas: Fenil metil sulfonyl fluoruro (PMSF) 0.001 M, N-etil maleimida (NEM) 0.002 M, y etilen diamin tetraacetato de sodio (EDTA) 0.01 M.

Esta mezcla se mantuvo en agitación continua a 4°C durante 22 horas. La suspensión resultante se centrifugó a 53,800 g durante 2 horas. Con el precipitado se repitió el procedimiento de extracción tres veces en condiciones similares. Los sobrenadantes se juntaron y se mantuvieron a 4°C.

4. PURIFICACION DE COLAGENA CUTICULAR

La purificación de esta colágena se efectuó con precipitaciones secuenciales de cloruro de sodio.

A la colágena cuticular extraída en ácido acético se le agregó cloruro de sodio hasta llevar la sal a una concentración de 2.5%, agitando continuamente en un baño de hielo. El precipitado blanquecino de consistencia gelatinosa se resuspendió en 200 ml de ácido acético 0.5 M. Esta mezcla se agitó a 4° por un período adicional de 40 horas. Esta suspensión se centrifugó a 53,800 durante una hora, el precipitado se eliminó y al sobrenadante se le agregó cloruro de sodio hasta una concentración de 2.5% agitando continuamente en baño de hielo a fin de precipitar la colágena presente. El precipitado se colectó y resuspendió de nuevo en 500 ml de ácido acético 0.5 M. Esta suspensión se centrifugó por última vez a 53,000 g durante una hora eliminando el precipitado y conservando el sobrenadante a 4°C. (Fig. 10). Esta muestra purificada y solubilizada se utilizó para los experimentos de análisis.

Una parte del extracto (20 ml) se precipitó con una solución saturada de sulfato de amonio, con agitación continua en baño de hielo. El precipitado se resuspendió y centrifugó análogamente al procedimiento anterior.

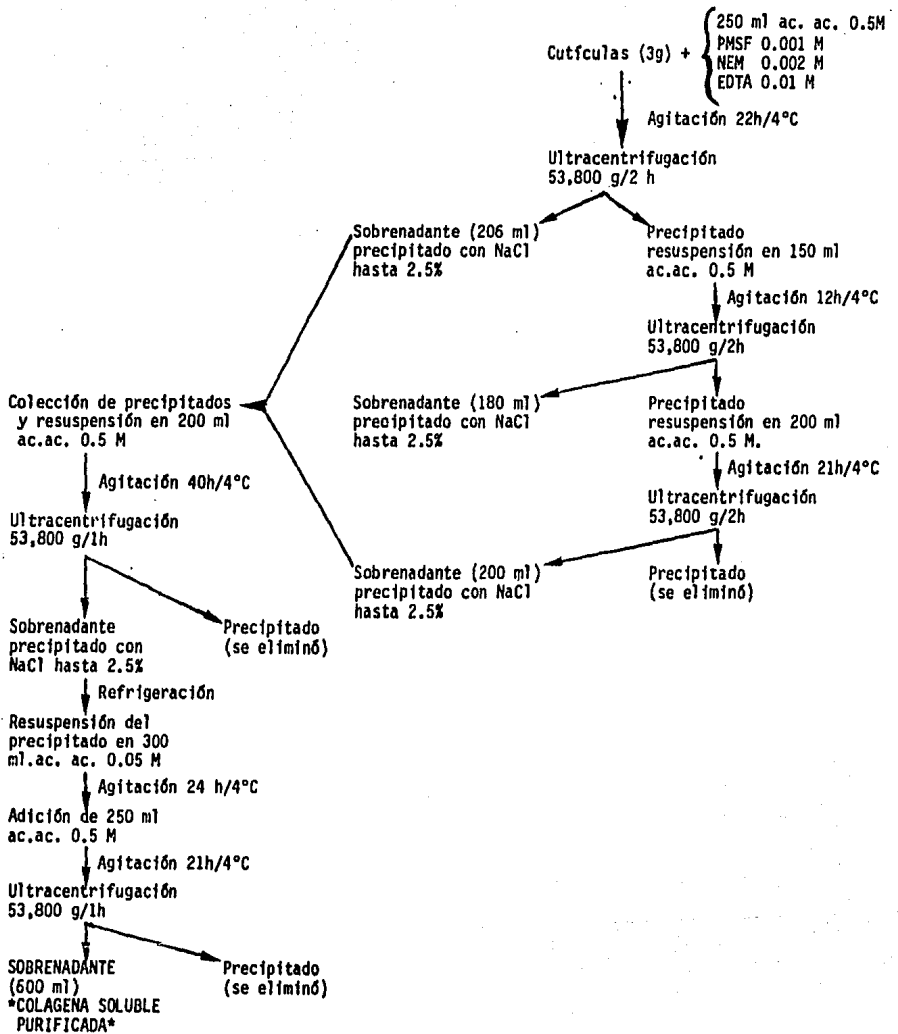


Figura 10. Resumen de la técnica de extracción y purificación de la colágena cuticular de Phascolosoma antillarum.

5. DETERMINACION DE HIDROXIPROLINA.

La cuantificación de hidroxiprolina se efectuó en la cutícula seca y en la solución de colágena cuticular purificada.

Las técnicas de determinación de hidroxiprolina que se usaron, requieren que la muestra problema sea previamente hidrolizada en ácido clorhídrico 6 N a 100-110°C durante 20-24 horas, a fin de dejar libre la hidroxiprolina. Después se evapora el ácido y la muestra se redissuelve en agua destilada.

El principio químico de los métodos, es la oxidación de la hidroxiprolina libre con cloramina T; el producto es un pirrol que al reaccionar con el para-dimetilaminobenzaldehído (p-DMAB) forma un complejo rojo que puede ser medido por absorción en el espectrofotómetro a 557 nm.

Se emplearon dos métodos distintos: el de Woessner (1961) aplicable a muestras puras, ya que varias sustancias interfieren en el desarrollo de las reacciones; este método se usó para la solución de colágena purificada. Para la cutícula seca se usó el método de Rojkind y González (1974), en este método el producto de la oxidación de la hidroxiprolina se separa de otras sustancias por la extracción en una fase de tolueno.

6. ELECTROFORESIS.

La técnica usada en la mayoría de los casos es la citada por Murray, et. al. (1982). Esta se efectúa en geles de poliacrilamida al 4% en presencia de SDS; corriendo a 4 mA por gel. Las muestras por correr se dializaron contra ácido acético 0.01 M. Posteriormente se sometieron a ebullición durante 3-5 min. en presencia de Sample Buffer (buffer de fosfatos de sodio 0.05 M, pH 7.4, 20% de glicerol, 2% de mercaptoetanol, 2% de SDS y 0.03% de rojo

fenol). Así la muestra se desnaturaliza en presencia de mercaptoetanol que es un agente reductor y rompe los puentes disulfuro facilitando que corran las subunidades. El SDS favorece que no se formen agregados y carga negativamente a las proteínas. Una técnica análoga que también se utilizó fué la de Laemli. (1987).

7. CRISTALITOS SLS.

Una muestra de 0.3 ml de colágena cuticular en ácido acético 0.1 0.01 M de acuerdo con la técnica de Murray. et. al. (1982). Alternativamente la diálisis se llevó a cabo en las mismas condiciones, pero eliminando el cloruro de sodio de la solución. El gel resultante se disgregó manualmente y por agitación y se depositó en rejillas de cobre cubiertas con una película de formvar estabilizada con carbono. La tinción positiva se llevó a cabo con ácido fosfotúngstico al 0.1% durante 3 minutos y acetato de uranilo al 0.01% durante 5 minutos (Bruns y Gross, 1973.). La tinción negativa se llevó a cabo con fosfotungstato de sodio al 2% pH 7.4 durante 4 minutos (Torre-Blanco y Toledo, 1981). Las rejillas fueron examinadas en un microscopio electrónico Zeiss EM-10 a 80 KV y fotografiadas a 50,000 aumentos.

El diámetro de las fibrillas fué medido sobre los negativos utilizando una lente de aumento con una reglilla con escala 1/10 mm incluida.

8. SUSCEPTIBILIDAD A COLAGENASA BACTERIANA .

Se utilizaron tres métodos diferentes para llevar a pH neutro la colágena cuticular en ácido acético 0.5 M.

a) Diálisis a 4° C contra un amortiguador de fosfatos de potasio 0.15 M, pH 7.3.

b) Diálisis a 4° C contra un amortiguador tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.05 M, NaCl 0.15 M, pH 7.3 y CaCl 0.005 M.

c) Diálisis a 4° C contra ácido acético 0.005 M (tres cambios de 24 horas cada uno), una vez dializada la colágena cuticular se diluyó en un volumen igual de NaCl 0.4 M, CaCl 0.02 M en tris-HCl 0.1 M, pH 7.6 (Nagai. 1966).

La colágena cuticular llevada a pH neutro por el tercer método, se incubó en presencia de colagenasa bacteriana o de tripsina (0.1 mg/ml en tris Nagai-agua 1:1) a 27° C (+/- 1° C). Para detener la reacción se agregó ácido etinén diamino tetracético (EDTA) a pH 7.3 a una concentración final de 0.05 M en las muestras incubadas con colagenasa, o inhibidor trípico de soya a una concentración final de 0.33 mg/ml en las muestras incubadas con tripsina. Las muestras resultantes fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% en presencia de SDS, de acuerdo con la técnica descrita por Laemli. 1987. Como control se utilizó colágena tipo I de tendón de cola de rata.

V. RESULTADOS.

1. MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Durante la exploración de los bloques, se eligió trabajar sólo con los tejidos fijados en gluteraldehído, por ser éste el que mejor conservó el tejido. (Fig. 11).

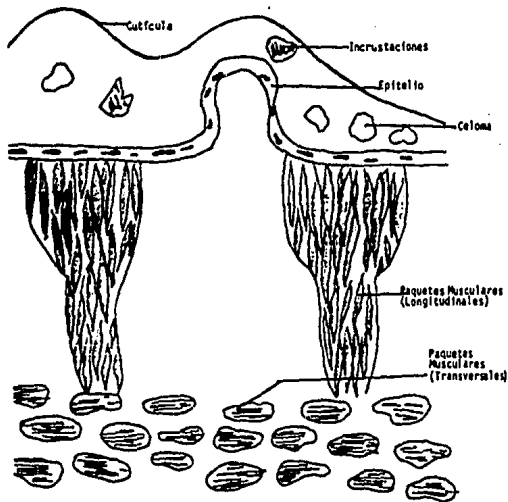


Figura 11. Esquema de un corte semifino de la cutícula y pared corporal muscular de *P. antillarum* fijada con gluteraldehído y teñida con azul de toluidina al 1% (40 X).

No se logró obtener cortes ultrafinos de la cutícula, pues en ésta existen concreciones calcáreas que mellan el filo de las cuchillas (Voss-Foucart, S. 1977). Por lo anterior se talló el bloque dejando sólo músculo, de ahí se obtuvieron los cortes ultrafinos.

Durante el contraste de los cortes, se presentaron muchos problemas de precipitación de los metales; uranilo principalmente, aunque a tiempos mayores el plomo también se precipitaba. De las diferentes pruebas que se efectuaron la del contraste con acetato de uranilo al 2% durante 2.5 min seguida por citrato de plomo al 3% durante 5 min que fué la dió mejores resultados.

Las micrograffas de los cortes de la pared muscular de *P. antillarum* mostraron la presencia de fibrillas en la matriz extracelular (Figs. 12 y 13). Estas fibrillas no mostraron una periodicidad axial distinguible; la medición de las fibrillas en los negativos reveló un diámetro promedio de 14.6 ± 1.8 nm (media \pm desviación estándar $n = 64$).

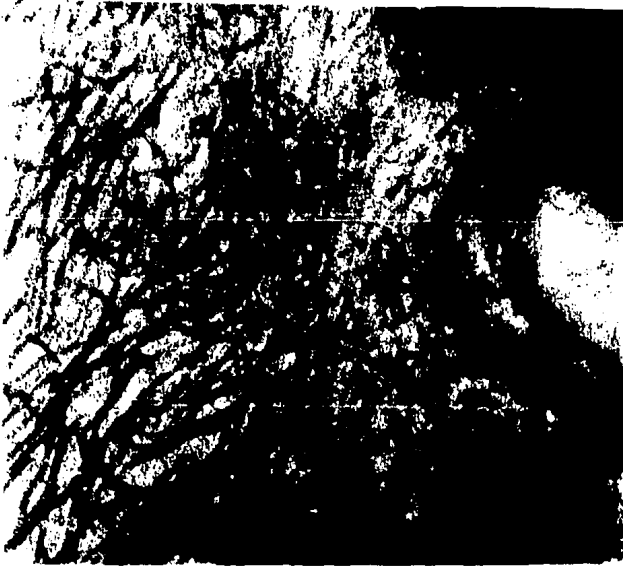


Figura 12. Fibras de colágena. Tejido conectivo de los paquetes musculares de *P. antillarum*. Fijación: glutaraldehído al 2.5%. Contraste: acetato de uranilo al 2% por 2.5 min y citrato de plomo al 3% por 5 min Aumentos: 75,000 X. Diámetro de las fibras 14.6 ± 1.8 nm.

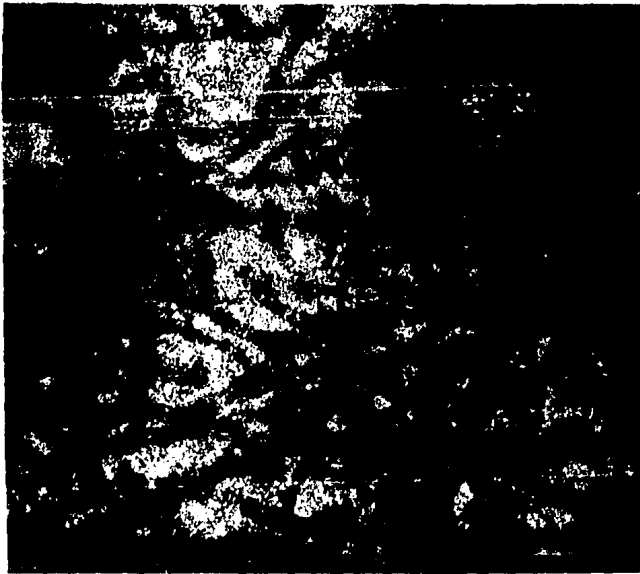


Figura 13. Fibras de colágena. Tejido conectivo de los paquetes musculares de *P. antillarum*. Fijación: glutaraldehído 2.5%. Contraste: acetato de uranilo al 2% por 2.5 min y citrato de plomo al 3% por 5 min . Aumentos: 250,000 X. Diámetro de las fibras 14.6 +/- 1.8 nm.

2. EXTRACCION Y PURIFICACION DE COLAGENA CUTICULAR.

La extracción de colágena cuticular se llevó a cabo a partir de 3 g de cutículas (peso húmedo). El contenido de agua de las cutículas fué de 24.2%, medido después de secarlas en un horno a 100°C. El contenido de hidroxiprolina medido después de hidrolizar un fragmento de cutícula seca fué de 30.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

El procedimiento de extracción y purificación de colágena cuticular descrito en Materiales y Métodos dió como resultado una solución viscosa e incolora con un alto contenido de hidroxiprolina (101.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Este método de extracción mostró tener un alto rendimiento, ya que en el extracto final se recuperó el 89% de la hidroxiprolina inicial presente en las cutículas.

La concentración de NaCl utilizada para purificar esta colágena produjo un precipitado blanquecino de consistencia gelatinosa, que se separó fácilmente del sobrenadante por decantación. El sobrenadante resultante había perdido la alta viscosidad característica del extracto inicial y fué descartado.

3. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LA COLAGENA CUTICULAR DE *P.antillarum*.

El patrón electroforético en geles de poliacrilamida al 4% de la colágena cuticular solubilizada y purificada de *P. antillarum* reveló, la presencia de un solo componente en una banda que migra escasamente. (Fig.14). Usando como referencia una colágena tipo I de piel de chivo, la banda de *P. antillarum* mostró una migración menor a la de las subunidades de la colágena tipo I.

El peso molecular de 470,000 Da de la banda principal de colágena cuticular se determinó usando las subunidades de la colágena tipo I como patrón de referencia. (Fig. 14 y 15).



Figura 14. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% en presencia de SDS. A: Colágena cuticular de *P. antillarum*, B: Colágena tipo I de piel de chivo.

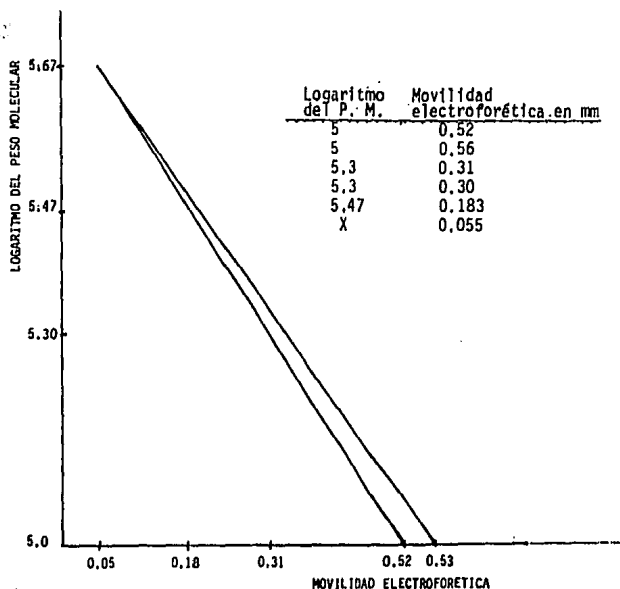


Figura 15. Gráfica que muestra la relación entre la movilidad electroforética de la colágena tipo I y el logaritmo del peso molecular. Se muestran los valores de movilidad de la colágena cuticular de *P. antillarum*.

4. OBTENCIÓN DE FIBRAS RECONSTITUIDAS A PARTIR DE COLÁGENA CUTICULAR DE *P. antillarum*.

La colágena cuticular de *P. antillarum* se dializó contra ATP (ver materiales y métodos) con la intención de inducir la precipitación de cristallitos SLS. En tres ocasiones se repitió el experimento en presencia de NaCl 0.1 M obteniéndose un gel translúcido de consistencia firme en lugar de la suspensión esperada; el exámen al microscopio electrónico del gel disgregado reveló la ausencia de cristallitos SLS y la presencia de grandes agregados sin morfología fina discernible. Cuando el experimento se llevó a cabo en ausencia de NaCl se obtuvo un gel de aspecto similar a los anteriores; sin embargo, el exámen al microscopio electrónico de este gel reveló la presencia de estructuras fibrilares muy delgadas sin una periodicidad axial aparente (Figs. 16 y 17). La tinción negativa, en particular, mostró fibrillas con un aspecto irregular (fig. 17); estas fibrillas fueron medidas sobre los negativos con una lupa micrométrica encontrándose un diámetro promedio de 9.3 +/- 1.9 nm (media +/- desviación estandar, n = 64).



Figura 16. Fibras de colágena cuticular de *P. antillarum* reconstituidas en diálisis contra ATP 0.8%. Tinción positiva: ácido fosfotúngstico 0.1% y acetato de uranilo 0.01%. Aumento 225,000 X.

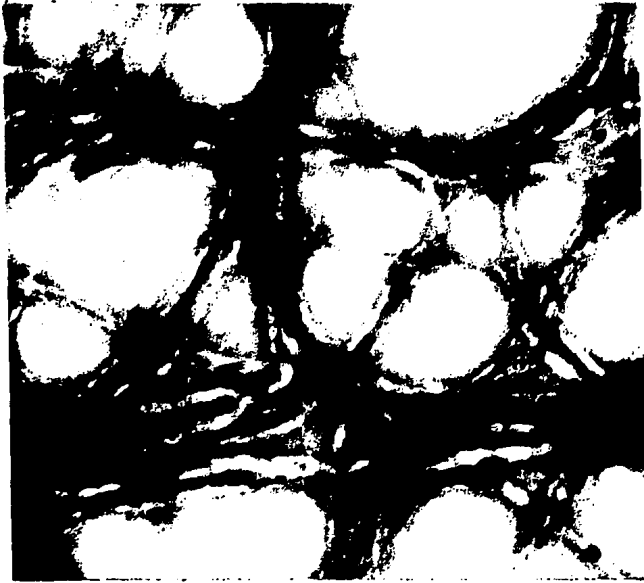


Figura 17. Fibras de colágena cuticular de *P. antillarum*, reconstituídas en diálisis contra ATP 0.8%, NaCl 0.1 M y azida de sodio 0.02 %. Tinción negativa : fosfotungstato de sodio al 2 %, pH 7.4. Aumento: 225,000 X. Diámetro de las fibras: 9.3 +/- 1.9 nm.

5. SUCEPTIBILIDAD A COLAGENASA BACTERIANA Y A TRIPSINA.

Como se muestra en la figura 18, la colágena cuticular de *P. antillarum* no parece ser degradada por la tripsina a 27° C aún después de 23 horas de incubación. Por otro lado (figura 19) la colágena cuticular incubada en presencia de colagenasa bacteriana, es parcialmente degradada dando lugar a fragmentos de peso molecular inferior a 470,000. Entre los productos de la degradación destaca un fragmento cuyo peso molecular es aproximadamente de 230,000 daltons resistente a la colagenasa aún después de 24 horas de incubación.



Figura 18 . Electroforesis en gel de acrilamida de colágena cuticular de *P. antillarum* incubada en presencia de tripsina a 27 °C. En los carriles de izquierda a derecha: 0, 8 y 24 horas de incubación.

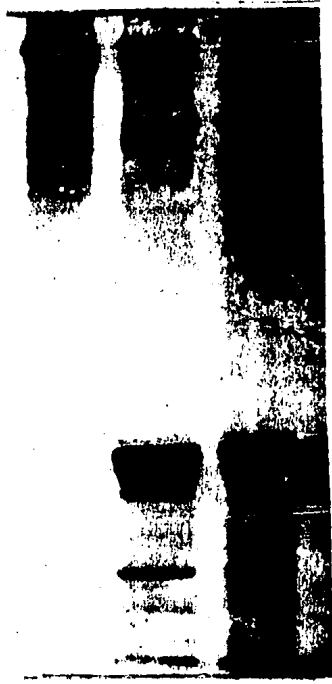


Figura 19. Electroforesis en gel de acrilamida de colágena cuticular de *P. antillarum* incubada en presencia de colagenasa bacteriana a 27°C. En los carriles de izquierda a derecha: 24 horas de incubación sin enzima, 8, y 24 horas de incubación con enzima.

VI. DISCUSION.

En este trabajó se estudió la presencia de colágena en un organismo del Phylum Sipunculida: Phascolosoma antillarum. Se mostró la presencia de colágena en el tejido conjuntivo y en la cutícula que recubre al animal.

La información obtenida mediante Microscopía Electrónica de los cortes de la capa corporal muscular, muestra la forma típica de agregación de la colágena en fibras extracelulares. Sin embargo estas son distintas a las fibras extracelulares típicas observadas en colágena tipo I de mamíferos, pues son más delgadas (14.6 ± 1.8 nm) y no se observa una periodicidad axial. La ausencia de periodicidad axial puede deberse a que en esta colágena las moléculas no se encuentran arregladas escalonadamente como es el caso de la colágena tipo I. Sin embargo no se puede descartar que la ausencia de estriaciones periódicas se debe a que las fibras son muy delgadas. Cabe mencionar, que en otros invertebrados; en particular en el cisticerco de la Taenia solium (Torre-Blanco, 1982) también se ha reportado la presencia de fibras extracelulares delgadas (11 nm) y sin estriaciones aparentes.

La dificultad y final imposibilidad para obtener cortes ultrafinos de la cutícula de P. antillarum radicó en la presencia de escudos muy duros, los datos de la literatura indican que el análisis cromatográfico posterior a hidrólisis ácida de la cutícula de estos animales muestra la existencia de un material proteico que podría intervenir en el endurecimiento de los escudos; endurecimiento acentuado por depósitos de carbonatos. Estos escudos están presentes al menos en otras cuatro especies de sipunculidos (Aspidosiphon clavatus, Golfingia vulgaris, Phascolion strombi y Sipunculus nudus.) El material cuticular no proteico se compone, al menos en parte, de mucopolisacáridos neutros y una cierta cantidad de mucopolisacáridos ácidos. El análisis de la presencia de quitina por métodos enzimáticos ha dado resultados negativos (Voss- Foucart. et. al. 1977).

Se diseñó un método para llevar a cabo la extracción de la colágena cuticular de *P. antillarum*. El procedimiento fué exitoso, pues con su aplicación a las cutículas se logró extraer en forma soluble el 89% de la hidroxiprolina inicial presente en la cutícula.

Con lo que respecta a la purificación, el método empleado fué el de precipitaciones secuenciales con NaCl. Este procedimiento es útil en la purificación de una gran variedad de colágenas. El patrón electroforético de la colágena cuticular de *P. antillarum* purificada por este método mostró una clara banda que migra escasamente y queda por encima de la banda del trómero de 300,000 dalton de colágena tipo I. Esto indica que probablemente se trata de un sólo tipo de colágena. El peso molecular determinado para esta proteína, es de 470,000 utilizando como estandar la colágena tipo I.

Con el objeto de medir la longitud de las moléculas de colágena extraídas de la cutícula, se intentaron obtener cristallitos SLS a partir de la colágena purificada. Estos no se formaron en ninguno de los distintos intentos. Los cristallitos usualmente forman una suspensión de apariencia turbia y lo que se obtuvo en todos los casos fué un gel de consistencia firme después de la diálisis contra ATP. El exámen de esos geles al microscopio electrónico reveló que en esas condiciones lo que se forma son delgadas fibras. La medición de las fibras reconstituidas teñidas negativamente reveló que poseen un diámetro medio de 9.3 nm. Debido a que no contamos con micrografías de la cutícula, no podemos establecer una relación entre la estructura de las fibras reconstituidas y la estructura *in situ* de esta colágena. Un estudio posterior en este sentido sería interesante ya que podría dilucidar si la colágena cuticular está organizada en forma de delgadas fibrillas o si las fibras reconstituidas son una forma artificial de agregación de esta colágena. Sin embargo es interesante hacer notar que la colágena cuticular del poliqueto *Alvinella pompejana* está formada por microfibrillas muy delgadas de 3 a 5 nm de diámetro que a su vez se agrupan formando fibrillas más gruesas (Gailly y Bouligand, 1987). La colágena cuticular del poliqueto *Paralvinella grasslei*, también muestra la presencia de fibrillas formadas por microfibrillas más delgadas (Lepescheux, 1988) aunque los autores no reportan la medida. En ambos casos se trata de fibrillas no estriadas que muestran un arreglo geométrico sumamente ordenado.

Para llevar a cabo los experimentos de susceptibilidad a la tripsina y a la colagenasa bacteriana hubo que superar una dificultad inicial para llevar la colágena cuticular a pH neutro, ya que al dializar la colágena soluble en ácido contra un amortiguador a pH neutro se formaba un gel. Aunque no se estudió la estructura de la colágena agregada en estos geles, es probable que se tratara de fibras reconstituidas semejantes a las que se obtuvieron al dializar la proteína contra ATP. La metodología descrita por Nagai et. al. (1966), consistente en disolver la

colágena en un ácido muy diluido y llevarla a pH neutro añadiendo el amortiguador a una concentración mayor, resolvió el problema de la agregación. Los resultados obtenidos muestran que la colágena cuticular de *P. antillarum* es resistente a la degradación por tripsina en incubaciones llevadas a cabo a pH 7.3 y 27°C, este comportamiento indica que la molécula de colágena cuticular seguramente tiene una estructura triple helicoidal típica de las colágenas. Por otro lado, la incubación con colagenasa bacteriana en las mismas condiciones reveló que la colágena cuticular es susceptible a esta enzima. Es importante hacer notar que la degradación por colagenasa produce un fragmento de la colágena cuticular resistente a la hidrólisis con un peso molecular aparente de 230,000 este fragmento resistente a la colagenasa bacteriana se encontró aún después de 24 horas de incubación. Llama la atención, que este comportamiento es similar al de la colágena cuticular del poliqueto *Nereis virens*, la cual también muestra una resistencia parcial a la colagenasa bacteriana dando un fragmento de alrededor de 300,000 daltones (Kimura y Tanzer, 1977).

Hasta ahora los conocimientos y las conclusiones de las líneas evolutivas de la colágena han sugerido, según diferentes autores (1967. y Kimura, 1983.) que la colágena fué originalmente compuesta por un sólo tipo de cadena α , cuyo gene primordial posteriormente se duplicó por mutaciones independientes en segundo y tercer gen, dando como resultados las cadenas α_2 y α_3 (Nordwig, et. al. 1969.). Lo anterior a pesar de que se han encontrado colágenas formadas por distintas cadenas alfa, parecida a la colágena tipo I en grupos primitivos. Kimura y colaboradores (1983), han interpretado la presencia de colágenas tipo I o semejantes en invertebrados (como es claro en *Octopus* sp.) como un desarrollo a lo largo de líneas filogenéticas independietes en grupos protostomados y deuterostomados. Los resultados de estudios en el equiúrdo *Urechis unicinctus*, sugieren en este sentido que una proteína homóloga a la tipo I está ampliamente distribuída en la línea animal protostomada, pues su presencia ha sido confirmada en los Phyla: Platyhelmintha, Mollusca, Annelida, Acantocephala y Echinodermata. (Fig. 20).

Con esta información proponemos una clasificación de las colágenas, sobre las bases de peso molecular y composición de subunidades:

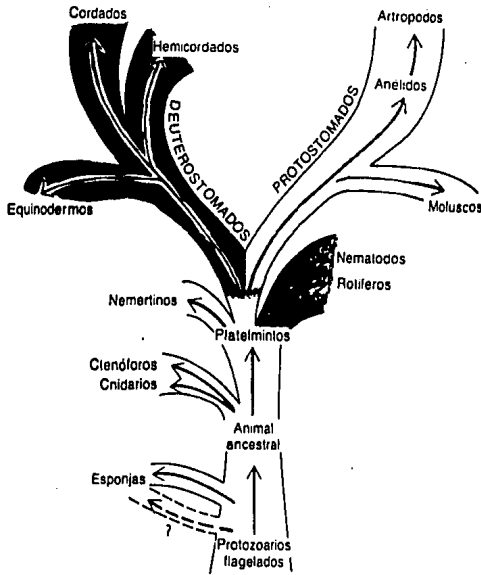
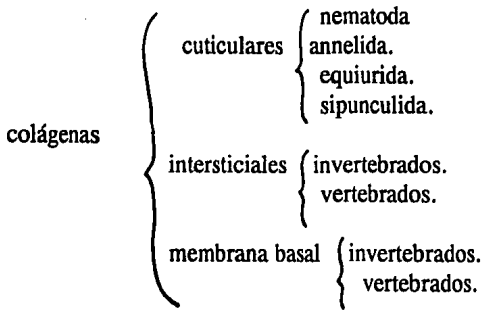


Figura 20. Filogenia de las líneas protostomada y deuterostomada (según Barnes, R.)

A pesar de la variabilidad de criterios, y de la presencia de colágena en otras estructuras corporales como las cutículas, las colágenas intersticiales y de membranas basales presentes en los metazoarios estudiados, exhiben una pronunciada constancia a lo largo de su evolución.

En las colágenas cuticulares de invertebrados las diferencias son significativas y probablemente son un reflejo de requerimientos tisulares específicos, como es el caso de *P. antillarum* que requiere de una cutícula que le dé soporte y protección. Los anélidos son un Phylum cercano filogenéticamente a los sipuncúlidos, y en ellos también se ha investigado sobre la colágena cuticular; de los resultados publicados quiero destacar los siguientes: colágenas de altos pesos moleculares , 1'400,000, 1'700,000, y 1'900,000 Dalton (Fujimoto, 1964. y Kimura. 1969) ; colágenas con un contenido elevado de hidroxiprolina, y presencia de subunidades con un peso molecular de 470,000 (Kimura. 1969). En esta investigación se mostró que la colágena cuticular de *P. antillarum* tiene también un peso molecular elevado, y ese dato 470,000 es muy cercano al peso de las subunidades en *Nereis japonica* y *Nereis virens*. La colágena de *P. antillarum* tiene también un alto contenido de hidroxiprolina (datos no presentados). A semejanza de las colagenas cuticulares tanto de poliquetos (Kimura, 1969) como de oligoquetos (Fujimoto, 1964 y 1968). Otro aspecto en el que la colágena cuticular de este sipuncúlido es similar a la de los anélidos es la resistencia parcial a la colagenasa bacteriana. La semejanza de esta proteína con la cuticular de los anélidos, afirma la estrecha relación entre anélida y sipuncúlida (sistema nervioso, organización de la pared corporal y desarrollo embrionario entre los más notables). Si el desarrollo del metamerismo dió lugar a un grupo ancestral (estirpe protoanélida), probablemente los sipuncúlidos divergieron de esta línea evolutiva que llevó hasta los anélidos en algún punto inmediato anterior al desarrollo del metamerismo. (Figura 21.).

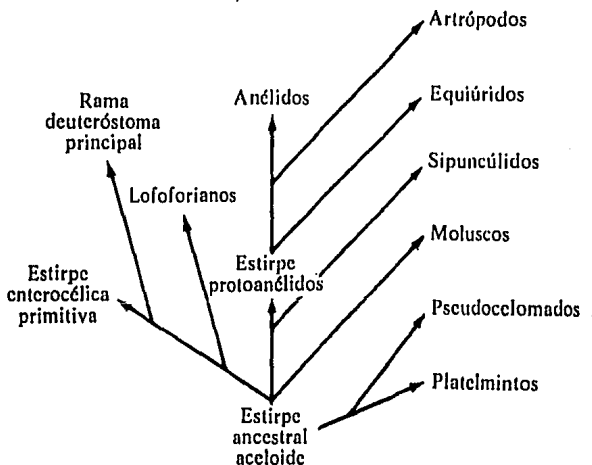


Figura 21. Filogenia de los Phyla celomados (según Hyman, L.)

Con estudios de esta índole, pretendemos conocer la variabilidad en esta familia de proteínas: las colágenas; además de aportar caracteres para apoyar el estudio de las relaciones evolutivas de los metazoarios.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Adams, E. 1978. Invertebrate Collagens. *Science*. 202: 591 - 597.
2. Ashurst, D. y A. Bailey. 1980. Locust Collagen. Morphological and Biochemical Characterization. *Eur. J. Biochem.* 103: 75-83.
3. Ayala, J. 1982. Aislamiento y Purificación de la colágena del músculo de Ascaris. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
4. Barnes, R. 1972. Zoología de los Invertebrados. Interamericana. México. 651-654.
5. Bentz, H. et. al. 1983. Isolation and characterization of a new human collagen with and extended triple helical structure domain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 80:3168.
6. Bornstein, P. y H. Sage. 1980. Structurally distinct collagen types. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 957-959.
7. Brugeson, R. 1976. Fetal membrane collagens. Identification of two new collagen alfa chain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73: 2579.
8. Bruns, R. y J. Gross. 1973. Band pattern of segment - long- spacing from of collagen . Its use in the analysis of primary structure. *Biochemistry.* 12: 808-815.
9. Cain, G. 1970. Collagen from the gigant Acanthocephalan Macracanthorhynchus hirudinaceus. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 141: 264-270.
10. Cendero, L. 1971. Zoología Hispanoamericana. Ed. Porrúa. México. 327-328.
11. Evans, H. et. al. 1976. The resolution of Ascaris cuticle collagen in to three chain types. *Biochemistry* 15: 1435.
12. Eyre, D. 1980. Collagen: Molecular Diversity in the Body's Protein Scaffold. *Science.* 207: 1315-1322.
13. Fisher, W. 1952. The sipunculid worms of California and Baja California. *Proceedings of the United States National Museum.* 102. (3306): 434.
14. Francoise, J. et. al. 1980. Cockroach collagen : Isolation, biochemical and biophysical characterization *Eur. J. Biochem.* 112: 389-396.
15. Fujimoto, D. and E. Adams. 1964. Intraspecies composition difference in collagen from cuticle and body of Ascaris and Lumbricus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17: 437.
16. Fujimoto, D. 1968. Isolation for Collagens of high hidroxylysine and carbohydrate content from muscle layer of Ascaris lumbricoides and pig kidney. *Biochem. Biophys. Acta.* 168: 537.
17. Garza, G. 1984. La Colágena de Hermodice . Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM . México.
18. Gaill , F. and Y. Bouligand. 1987. Supercoil of collagen fibrils in the integument of Alvinella, an abysal annelid. *Tissue & Cell* 19.(5): 625-642.

19. Gibbs, P. 1977. British Sipunculans. The Linnean Society of London.: 28-29.
20. Gross, J. 1961. Collagen. Scientific American. 204: 120-130.
21. Gross, J. 1974. Collagen Biology. Structure, degradation and disease. The Harvey Lectures. Ac. Press. N.Y. :315-342.
22. Harper, E. 1980. Collagenases. Ann. Rev. Biochem. 49: 1063.
23. Harris, E. and C. Vater. 1982. Vertebrate collagenases. In Methods Enzymology 82.: 423.
24. Hyman, L. 1959. The Invertebrates. I. The Smaller Coelomated Groups. Mc.Graw Hill. N:Y: 610-696.
25. Josse, J. and W: Harrington. 1964. Role of pyrrolidine residues in the structure and stabilization of collagen. J. Mol. Biol. 9: 269-287.
26. Junqueira, L. et. al. 1976. Biochemical and Morphological studies on collagen of horny sponges. Ircinia filaments compared to spongies. In: Connective Tissue Reseach. Gordon and Breach Science Publishers LTD. 2: 193-203.
27. Kimura, S. et. al. 1969. Studies on Marine Invertebrate Collagens II. Molecular Properties of soluble Cuticle Collagen from a Marine Worm. Nereis japonica. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 35: 1121-1130.
28. Kimura, S. and M. Tanzer. 1977. Isolation and propierties of a large fragment resistant to proteolysis by bacterial collagenase. J. Biol. Chem. 252 (22): 8018-8022.
29. Kimura, S 1981. Octopus skin Collagen. Isolation and Characterization of Collagen. Comprising Two Distinct Chains. The J. Biol. Chem. 256: 13230-13234.
30. Kimura, S. et. al. 1983. Annelid Skin Collagen: Ocurrence of Collagen with Structure of $(\alpha 1) 2 \alpha 2$ in Urechis unicinctus. Comp. Biochem. Physiol. 75B: 681-684.
31. Kimura, S. and F. Matsura. 1984. Abalone Collagen. J. Biochem. 75: 1231.
32. Kimura, S. and K. Karasawa. 1984. Squid Cartilage Collagen: Isolation of type I. Collagen rich in Carbohydrate. Comp. Biochem. Physiol. 81B: 361-365.
33. Kimura, S. and H. Tanaka. 1986. Partial characterization of muscle collagens form prawns and lobster. J. Of Food Science. 51: 332-339.
34. Khun, K. 1982. Segment long Spacing Cristallinities, a powerful tool in collagen research. Collagen. Rel. Res. 2: 61-80.
35. Laemli, A. et. al. 1987. Annal. Biochem. 166: 368-379.
36. Lepescheux, L. 1988. Spatial organization of collagen in annelid cuticle: order and defects. Biology of the Cell. 62: 17-31.
37. Mc. Bride, O. and W: Harrington. 1967. Ascaris cuticle collagen on the disulfide cross-linkage and the molecular properties of the subunits. Biochemistry. 6: 1484

38. Meglitsch, P. 1978. Zoología de los Invertebrados. H. Blume. Madrid.: 471-475.
39. Miller, E. et. al. 1971. Identification of three genetically distinct collagen by cyanogen bromide cleavage of insoluble human skin and cartilage collagen. Bioch. Biophys. Res. Comn. 42 : 1024.
40. Miller, E. 1972. Isolation and characterization of a collagen of chick cartilage containing three identical alpha chains. Biochemistry. 10: 1652.
41. Miura, S. and S. Kimura. 1985. Jellyfish Mesoglea Collagen. Characterization of molecules as $\alpha 1 \alpha 2 \alpha 3$ Heterotrimers. The J. Biol. Chem.(260) 28: 15352- 15356.
42. Murray, L. et. al. 1982. Preparation and Characterization of Invertebrate Collagens. In Methods in Enzymology 82: 65-96.
43. Murray, L. et. al. 1982. Annelid cuticle Collagen: A very long protein. Biology Chemistry and Pathology of Collagen. 460: 478-481.
44. Murray, L. and M. Tanzer. 1983. Characterization of a large fragment form Annelid cuticle Collagen and its relationship to the Intact Molecule. Collagen Rel. Res. 3: 445.458.
45. Nagai, Y. et. al. 1966. Tadpole Collagenasa. Preparation and Purification. Biochemistry. 5:3123-3130.
46. Nimni, M. 1983. Collagen: Structure , function and metabolism and Normal and Fibrotic Tissues. Seminaris in Arthritis and Reumatism . 13: 1-86.
47. Noelken, M. et. al. 1986. Intestinal Basement Membrane of Ascaris suum. The J. Biol. Chem. 261: 4706-4714.
48. Nordwing, A. and U. Hayduk. 1969. Invertebrate Collagens : Isolation, Characterization and Phylogenetic Aspects. J. Mol. Biol. 44: 161-172
49. Nordwing, A. 1970. Chemistry and Molecular Biology of the intercellular matrix. Vol. I. E: Balazs Ed. Ac. Press, N.Y.: 27-41.
50. Nordwing, A. 1973. Sea Anemone Collagen: Futher evidence for the existence of only one chain type. J. Molec. Evolution. 2: 175-180.
51. Odermatt, E. et. al. 1983. Structural diversity and composition of a unique collagenous fragment (intima collagen) obtained form human placenta. Biochem. J. 211: 295.
52. Pardo, A. 1993. La matriz extracelular y los diferentes tipos de colágena. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. (6) 3: 156-163.
53. Pucci-Mianfra, I. et. al. 1978. Identification of Collagen in the Aristotels lanternae of Paracentrolus lividus. J. Submicr. Cytol. 10: 53-63.
54. Ramachadran, G. and H. Reddi. 1976. (Eds). Biochemistry of Collagen. Plenum Press. USA.
55. Riehl, R. 1980. Gigant collagen fibres in the ganopodium of the mosquito fish Heterandria formosa. Hgassiz, 1853. (Pices, Poeciliidae). Experimentia . 36: 961-962.
56. Rojkind, M. and E. González. 1974. A improved method for determinig specific radioactives of proline -14 C and Hidroxyproline -14 C in collagen and in noncollagenous proteins. Analitical Biochemistry 57: 1-7.

57. Sage, H. et. al. 1984. Type VIII collagen synthesis by normal and malignant cells in culture. *Lab. Invest.* 50: 219.
58. Schmid, T. and T. Linsenmayer. 1985. Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen. (Type X) in avian tissues. *J. Cells. Biol.* 100:598.
59. Takema, Y. 1982. Two genetically distinct molecular species of octopus muscle collagen. *Biochemica et Biophysica Acta.* 706: 123-128.
60. Trelstad, R. 1981. La Colágena. *Mundo Científico.* (1) 3: 284-295.
61. Torre-Blanco, A and A. Alvizouri. 1987. In vitro hydroxylation of proline in the collagen of the cysticercus of Taenia solium. *Comp. Biochem. Physiol.* (88) 4: 1213-1217.
62. Torre-Blanco, A. and I. Toledo. 1981. The isolation, purification and characterization of the collagen of Cysticercus cellulosae. *J. Biol. Chem.* 256: 5926.
63. Torre-Blanco, A. 1982. The collagen of Cysticercus cellulosae a study in the comparative biochemistry of collagen. En: *Cysticercosis. Present state of Knowledge and perspectives.* (Academic Press Inc.): 423-436.
64. Vander Rest, M. et. al. 1985. The structure of type IX Collagen. *J. Biol Chem.* 260: 220.
65. Voss-Foucart, S. et. al. 1977. Etude comparée de la composition en acides aminés d'extraits peptidiques de la cuticule de siponculiens et d'annélides polychètes. *Arch. Zool. Exp. Gén.* 118: 457-470.
66. Voss-Foucart, S. et. al. 1977. Etude comparée de la composition chimique des régions souples et durcies de la cuticule de quatre espeés de siponculiens. *Cahiers de Biologie Marine.* XIII: 135-145.
67. Woesner, J. 1961. The determination of hidroxiproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Archives of Biochem. and Biophys.* 93: 440-447.