

6

Reje.



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias
División de Estudios de Posgrado

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE
PROTEOGLICANOS DE PARENQUIMA
PULMONAR

T E S I S
Que para obtener el grado Académico de
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
p r e s e n t a

JOSE IGNACIO PARAMO RAMIREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MOISES EDUARDO SELMAN LAMA

TESIS CON
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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

ROCIO

DOÑA ESTHER Y DON JOSE

IETZA
GLORIA
SOFIA
CAROLINA
NACHO
LICHY
PETER
LULA
REBECA
LUPITA
SHEILA
BRENDA
GONZALO

TEOSHIA
JAIME
RODRIGO
ANNIE
ANN
BRIZIA
GABRIEL
PILAR
ALFONSO
SILVIA
EILEEN
CARLOS
YOLANDA
MIGUEL AGUSTIN
DANIELA
JORGE
BERNARDO
CAMILA
DOÑA LUZ

MOISES
PACO
EDGAR
CLIVE
JOSE ENRIQUE
ANGUS
RAQUEL
PABLO
MARILU
QUICA
COLIN
DIEGO
LUZMA
EDUARDO
TATA
DAVID

ALMA
ANGUS
KATHY
CONY
LUZMA
TATA
DAVID

JAVIER

I N D I C E

	Pág.
I.- INTRODUCCION	3
II.- OBJETIVO	31
III.- MATERIAL Y METODOS	32
IV.- RESULTADOS	44
V.- DISCUSION	61
VI.- APENDICES	
A: ABREVIATURAS	74
B: REACTIVOS	75
C: EQUIPO	76
VII.- BIBLIOGRAFIA	78

5

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE PROTEOGLICANOS
DE PARENQUIMA PULMONAR

I.- INTRODUCCION:

La matriz extracelular es una estructura compleja constituida por diversas macromoléculas que son sintetizadas y secretadas localmente hacia el espacio intercelular en donde forman una intrincada red compuesta principalmente por proteínas fibrilares de colágena y elastina que estan inmersas en un gel de polisacáridos hidratados cuyos principales componentes son proteoglicanos (PGs) y glicosaminoglicanos (GAGs). La interacción entre las diferentes moléculas de la matriz extracelular genera las propiedades biomecánicas del tejido.

La matriz extracelular forma parte de los tejidos conjuntivos donde es más abundante que las células, y las rodea completamente. Debido a que es el principal componente en estos tejidos, desempeña un papel crucial en el mantenimiento de sus propiedades físicas y funcionales. Asimismo, en todos los órganos, la matriz extracelular representa el sitio de anclaje de las células. Por la estrecha relación que mantienen células y matriz, esta última tiene una gran influencia en la manera en que las

células se desarrollan, migran y proliferan, en sus funciones metabólicas, y hasta en su forma.

Desde el punto de vista biomecánico, algunos de los componentes de la matriz extracelular resisten fuerzas tensiles (i.e. fibras de colágena), mientras otros resisten compresión (principalmente proteoglicanos). Además hay otras moléculas que contribuyen en su comportamiento elástico, como lo es la elastina. Menos abundantes pero no menos importantes son las moléculas con propiedades adhesivas, como la fibronectina.

El pulmón tiene propiedades biomecánicas muy particulares, las cuales varían según la estructura pulmonar. Por una parte tiene un parénquima lo suficientemente elástico como para ceder sin romperse cuando es sometido a presiones positivas y negativas alternantes durante la inspiración y espiración. Por otro lado, las vías de conducción del aire son lo suficientemente rígidas como para evitar el colapso ante el cambio de presiones. Por lo tanto en el pulmón hay una gran variedad de estructuras intercaladas con funciones diferentes pero que deben trabajar en concierto. La distribución de los elementos que lo constituyen, además de las interacciones que deben de ocurrir entre ellos determinan la arquitectura y función de éste órgano tan peculiar, que tiene como una de sus principales funciones el intercambio gaseoso.

La alteración de cualquier componente de la matriz extracelular del pulmón, ya sea cualitativo o cuantitativo,

puede manifestarse como un funcionamiento anormal de este órgano. Esto se puede observar en diferentes procesos patológicos como la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y el enfisema pulmonar entre otros. En la FPI, el tejido se torna rígido, lo que disminuye notablemente su capacidad para mover volúmenes significativos de aire, lo que altera progresivamente el intercambio gaseoso. Asimismo, el pulmón disminuye de tamaño y se hace menos distensible. Desde el punto de vista de su estructura, la modificación con consecuencias más graves es el engrosamiento de las paredes alveolares, pues esto se traduce en un bloqueo de la difusión del oxígeno y el bióxido de carbono a través de la membrana alveolo-capilar y por lo tanto del intercambio gaseoso que debe ocurrir normalmente de acuerdo a los gradientes en las presiones parciales de estos gases prevalentes entre sangre y el espacio alveolar. El análisis bioquímico del parénquima pulmonar de pacientes con esta enfermedad ha revelado un incremento significativo en el depósito de colágena (1). Sin embargo, es esperable encontrar otras alteraciones bioquímicas, en particular si se consideran las estrechas relaciones que mantienen las moléculas de colágena con otras especies moleculares tales como los proteoglicanos.

En este contexto, el enfoque central de este trabajo es sobre los proteoglicanos, en particular el proteoglicano PG-40 o Decorina, pero es muy relevante para el marco general de esta tesis el describir someramente a otros componentes

importantes de la matriz extracelular del parénquima pulmonar, como las colágenas y la elastina. Con estas moléculas los proteoglicanos mantienen relaciones muy estrechas, producto de las cuales resultan las propiedades fisiológicas del tejido pulmonar.

LA FAMILIA DE LAS COLAGENAS:

Debido a su gran importancia estructural y a que son los componentes más abundantes de la matriz extracelular, las colágenas han sido objeto de una gran atención (ver revisión ref. 2). Hasta la fecha se han descrito 14 tipos genéticos de colágenas, cada una de las cuales tiene características estructurales específicas, y debido a esto, funciones particulares. En el parénquima pulmonar se han descrito al menos 5 tipos genéticos diferentes. Las colágenas tipo I y III son las más abundantes y constituyen el 95% de las proteínas colagénicas del intersticio. La colágena tipo IV forma parte de las membranas basales del epitelio alveolar y el endotelio capilar. Finalmente, la colágena tipo V se ha encontrado en la matriz extracelular formando parte de las láminas basales y la colágena tipo VI ha sido muy recientemente descrita en el parénquima en relación con la colágena tipo I (3). Las colágenas tienen una composición de aminoácidos peculiar, con una secuencia de residuos que se repite, Gly-X-Y, donde X y Y pueden ser cualquier aminoácido, pero con mucha frecuencia son prolina e

hidroxiprolina respectivamente. Esta estructura primaria, sumada al hallazgo de que la hidroxiprolina y la hidroxilisina son componentes casi exclusivos de estas moléculas, han sido de gran utilidad para su estudio.

Cada molécula de colágena está formada por tres cadenas polipeptídicas llamadas cadenas alfa, acomodadas en un arreglo triple helicoidal conocido también como la triple hélice de colágena. En una molécula de colágena, las cadenas alfa pueden ser idénticas o no. Algunas colágenas contienen también estructuras globulares, generalmente cercanas a las porciones N y C terminales.

En general la función mecánica más importante de las colágenas fibrilares es la de resistir fuerzas tensiles. Este papel es particularmente relevante en un órgano como el pulmón, el cual debe resistir fuerzas de estiramiento generadas por el cambio alternante y constante de las presiones implicadas en cada inspiración y espiración. Las fibras de colágena determinan el "tope" de estiramiento (4) de las paredes alveolares. Alteraciones de la conformación de las fibrillas pueden modificar las propiedades mecánicas de las fibras, y por consecuencia, el comportamiento del órgano. Además de las funciones mecánicas, las moléculas de colágenas contribuyen en numerosas funciones a través de sus relaciones con las células y los otros componentes de la matriz.

ELASTINA:

La elastina es el principal componente de las fibras elásticas, las cuales les confieren a los órganos que la poseen su elasticidad. Esta función determina la capacidad de tolerar fuerzas compresivas y tensiles porque pueden deformarse ante ellas y son capaces de recuperar su forma original una vez que ha cesado la influencia de esas fuerzas (5).

La elastina es una de las proteínas estructurales más insolubles presentes en el cuerpo humano. Esto, unido a su estructura tan especial han hecho que el avance en su estudio haya ocurrido a un ritmo relativamente lento. Los primeros procedimientos para su purificación recurrían al uso de extracciones vigorosas que incluían soluciones fuertemente alcalinas (6), y en algunos casos hasta el empleo del autoclave (7), los cuales permitieron solo la caracterización parcial de la estructura de la elastina. Posteriormente, numerosos estudios han intentado el aislamiento de la proteína pura. Solo después del descubrimiento del precursor soluble, la tropoelastina (5), fue posible definir la naturaleza química precisa de esta molécula.

La forma monomérica secretada de la elastina tiene un peso molecular de aproximadamente 70 kDa cuando es extraída de los tejidos. La tropoelastina y la elastina son muy ricas en aminoácidos pequeños e hidrofóbicos como son glicina, alanina y valina. Esto, unido al hecho de que la

tropoelastina sufre rápidos entrecruzamientos, la convierten en una proteína insoluble en medios acuosos; sin embargo, este polipéptido es soluble en alcoholes, precipita espontáneamente si se calienta por encima de 15-20 °C en soluciones acuosas. Otra característica de la elastina purificada es la ausencia de metionina, triptofano e histidina.

La desmosina e isodesmosina son componentes exclusivos de la elastina. Estos compuestos se forman por el entrecruzamiento covalente de cuatro residuos lisil, y son el resultado final de un proceso de maduración que puede requerir de varios días (5). Los pasos iniciales del entrecruzamiento producen tres cadenas laterales lisil desaminadas que terminan en grupos aldehído reactivos (al-lisina). Es posible que las desmosinas sean el resultado de la condensación sucesiva de tres cadenas laterales de al-lisina con un cuarto residuo lisil que por condensación finalmente produce la estructura llamada desmosina (5).

Esta proteína sólo se encuentra en vertebrados, y se ha visto que su composición de aminoácidos está muy conservada. En el parénquima pulmonar la elastina y las colágenas son sintetizadas por las mismas células, los fibroblastos (8), y se encuentran en estrecha relación anatómica.

PROTEOGLICANOS:

ESTRUCTURA: Los proteoglicanos (PGs) constituyen una familia heterogénea de macromoléculas que comparten la característica de estar compuestas por una proteína central y una o más cadenas lineales laterales de glicosaminoglicanos (GAGs) unidas covalentemente a la cadena peptídica, de la cual protruyen en forma más o menos perpendicular, (Fig.1). Aparte de ésta, hay pocas características comunes a todos los PGs. La heterogeneidad de este grupo radica principalmente en la gran diversidad que se ha observado en las secuencias de aminoácidos de sus proteínas centrales, y a las diferencias en los tipos y número de las cadenas laterales de glicosaminoglicanos. Además presentan diferencias en el grado de sulfatación que pueden tener estas cadenas laterales (9).

LOCALIZACION: Se han descrito proteoglicanos en muy diversos sitios de los tejidos. Así, se han localizado como componentes de las membranas celulares (i.e. syndecán) y en gránulos intracelulares (i.e. heparina), en las láminas basales (i.e. heparán sulfato) y en la matriz extracelular (i.e. ácido hialurónico, decorina). Funcionalmente también muestran una gran diversidad. En este sentido, se han descrito algunos PGs que forman parte de grandes complejos que resisten fuerzas compresivas como es el caso del ácido hialurónico y el agregán en cartílagos (10); otros, como la decorina, han demostrado ser importantes en procesos de

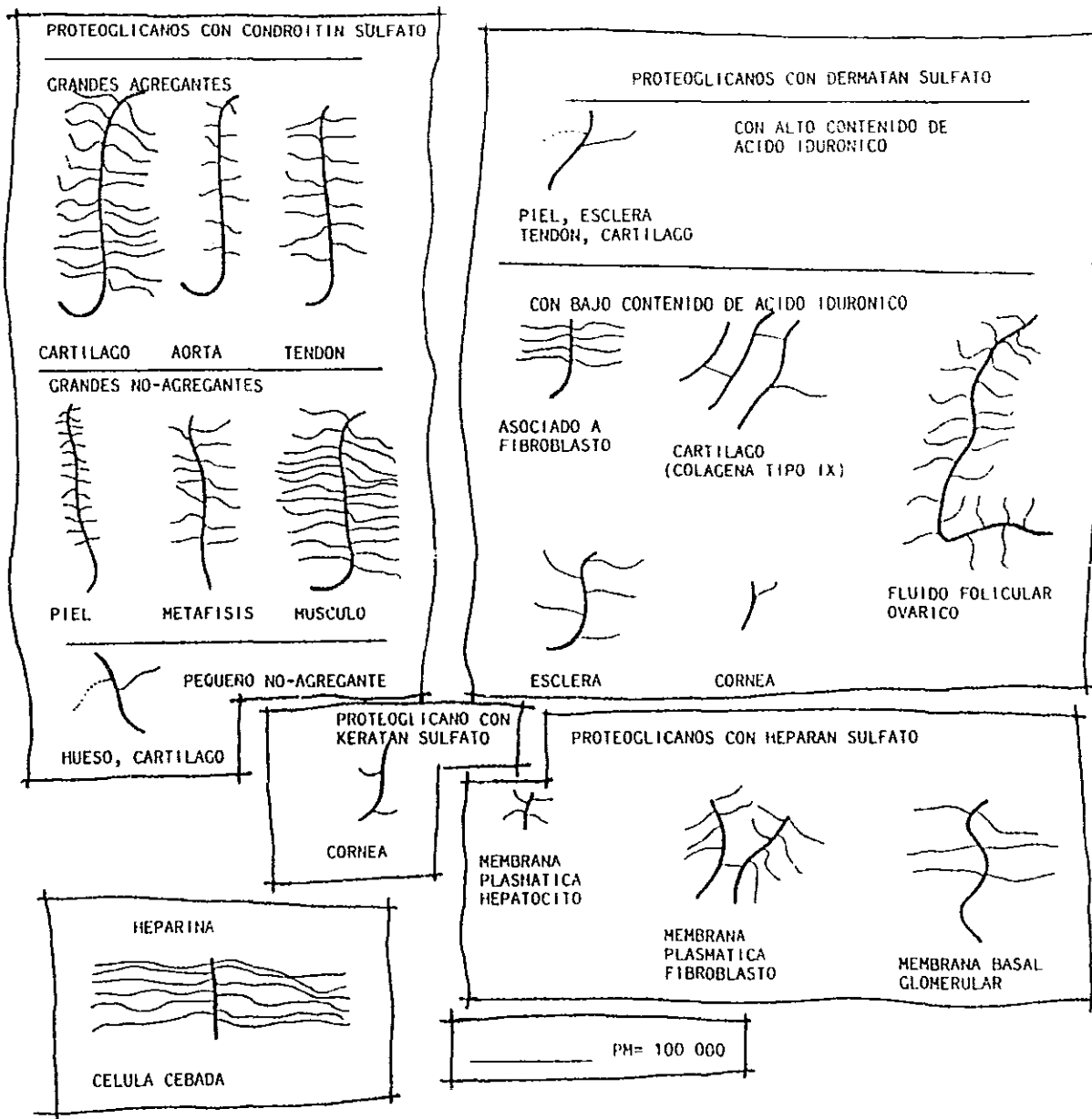


Fig. 1 : Representación gráfica de algunas moléculas de PGs agrupadas de acuerdo a la composición de sus cadenas laterales de GAGs.

regulación de la fibrillogénesis de colágena (11), mientras que otros desempeñan un papel crucial en procesos de regulación celular, como lo son algunos que estructuralmente están relacionados con el heparán sulfato (12). En otras palabras, moléculas que pueden ser clasificadas dentro del grupo de los proteoglicanos pueden ser encontradas prácticamente en cualquier ámbito de las células y los tejidos (13).

A los PGs se les asignó originalmente el nombre de mucopolisacáridos. Este término fué empleado para describir a un material polisacárido que era viscoso o mucinoso. Debido a su utilización generalizada durante mucho tiempo, el término continúa empleándose esporádicamente como un nombre general, ya sea para referirse a la porción polisacárida o a la combinación total de polisacárido-proteína. Es conveniente destacar que desde su origen el término nunca fué definido rigurosamente (9). Esto se debió en gran parte a que entonces sólo se podía reconocer a la porción polisacárida (glicosaminoglicano), dado que los métodos para su extracción casi siempre empleaban enzimas proteolíticas, las cuales degradaban casi por completo a la porción protéica (10); esto resultaba en la purificación de las cadenas de polisacáridos con pequeños muñones de péptidos. Posteriormente, con el desarrollo de métodos menos agresivos, se demostró que esos polisacáridos estaban generalmente unidos de manera covalente a proteínas (Fig.2) (14, 15). Esta nueva información sobre la estructura de

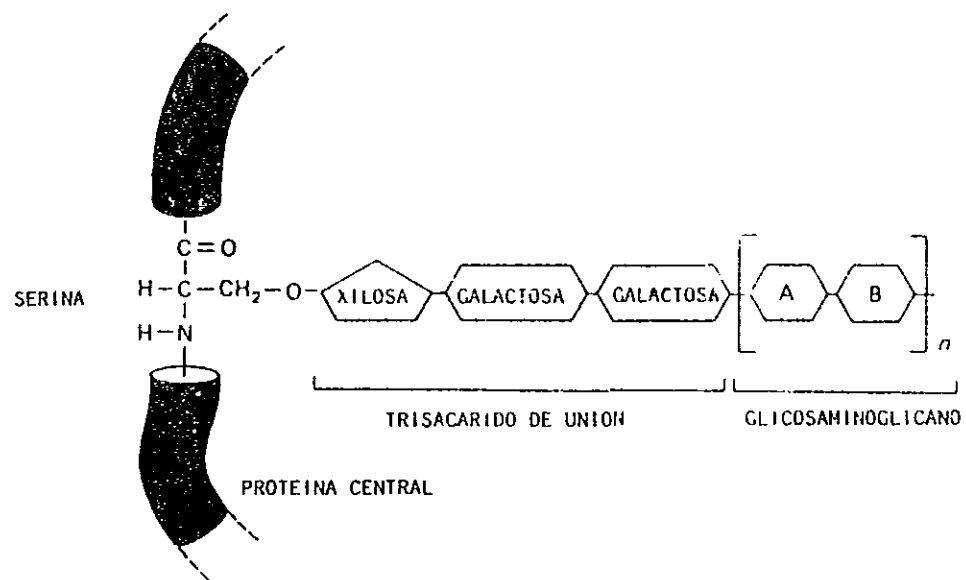


Fig. 2: Trisacárido de unión entre una cadena de GAGs y una serina de la cadena peptídica central de un PG.

estas moléculas generó a su vez nuevas dificultades en la nomenclatura pues hicieron inadecuado al sistema hasta entonces empleado.

NOMENCLATURA: El nombre glicosaminoglicano fue propuesto para aclarar un poco la confusión. Con él se describe a la porción polisacárida (glicano), que está formada por estructuras que contienen hexosaminas (glicosamino). Como este término no incluye a la parte protéica, para poder referirse a la molécula completa constituida por las cadenas de glicosaminoglicanos (GAG) junto con la proteína se acuñó el nombre de proteoglicano (PG) (9).

Hasta la fecha no se ha sistematizado completamente la nomenclatura de estos compuestos, y por consiguiente algunas moléculas de proteoglicanos han recibido nombres complicados que intentan describir ciertas características de la molécula, como por ejemplo su tamaño (grande, pequeño), alguna propiedad funcional (agregante, no-agregante), el tejido del cual han sido extraídos etc.; el resultado puede ser tan complejo y vago como los nombres de los siguientes ejemplos: proteoglicano grande agregante del cartílago, y, proteoglicano pequeño no-agregante del hueso (16). Otros han recibido su nombre debido a razones aún más peculiares, como es el caso de la decorina, que fué descrita originalmente como una molécula que se hallaba "decorando" a fibras de colágena, unida a la superficie de éstas a intervalos

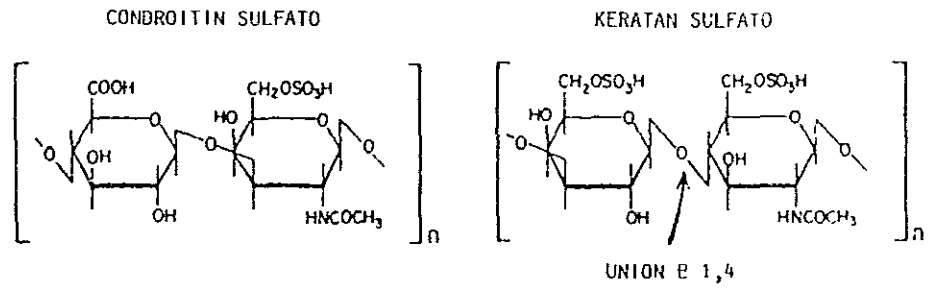
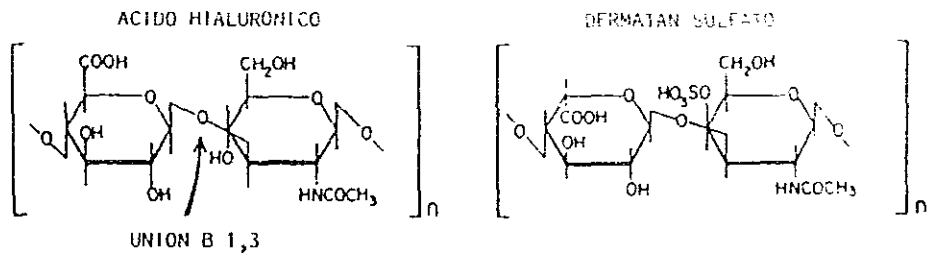
regulares, en una asociación aparentemente muy estrecha (13).

ESTRUCTURA: El rango de peso molecular del grupo de moléculas clasificadas como proteoglicanos es muy amplio, y oscila desde 90 kDa para la decorina (que es uno de los PGs más pequeños), hasta varios miles de kDa, como es el caso del agregán.

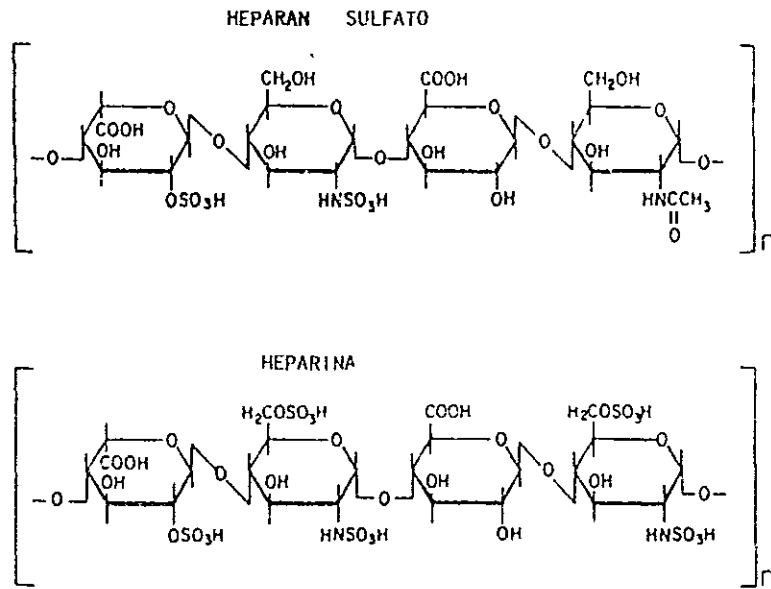
Las cadenas laterales de glicosaminoglicanos también contribuyen a la diversidad en tamaño pues pueden estar constituidas desde unas 15 unidades disacáridas, hasta 5000 de estas unidades.

Es importante señalar que las cadenas de GAGs no presentan uniformidad en tamaño, aún cuando pertenezcan a la misma especie molecular y hayan sido purificadas del mismo tejido; en consecuencia, la molécula compleja constituida por la cadena protéica central y la o las cadenas de GAGs tampoco es uniforme en su peso molecular. Este fenómeno, cuyas causas no se conocen con precisión, es el que da origen a la polidispersidad de los proteoglicanos (16). Sin embargo, las cadenas centrales son tan constantes en su peso molecular como cualquier otra proteína (monodispersidad) (17).

COMPOSICION: Las cadenas de glicosaminoglicanos están compuestas por una hexosamina (ya sea glucosamina o galactosamina), que se alterna con otro azúcar (ácido glucurónico, ácido idurónico, o galactosa; (Fig.3). Los



SUBUNIDADES DE DISACARIDOS QUE SE REPITEN EN LOS GAGs



OLIGOSACARIDOS TIPICOS DE HEPARINA Y HEPARAN SULFATO

Fig. 3: Subunidades de sacáridos que forman las cadenas laterales de los GAGs más conocidos relacionados con los proteoglicanos.

residuos de los monosacáridos que constituyen la cadena de GAG se encuentran generalmente dispuestos en una conformación de silla C-1. Esta es estéricamente favorable para los D-monosacáridos pues debido a esta conformación la mayoría de sus grupos sustituyentes se pueden acomodar en una disposición ecuatorial que les permite estar a la mayor distancia posible entre ellos (16). Las uniones entre estos azúcares son enlaces glicosídicos de tipo alfa o beta, y son 1,3 o 1,4. Casi todas las hexosaminas están sustituidas en el grupo amino por un acetilo o un sulfato (9).

Los GAGs contienen una hexosamina acomodada alternantemente con un ácido urónico y debido a esto son considerados como cadenas repetitivas de disacáridos. Aún cuando una cadena individual puede tener una mezcla de ácidos urónicos (algunas moléculas pueden ser de ácido glucurónico y otras de ácido idurónico), la hexosamina será siempre galactosamina o glucosamina. Aún no se han descrito cadenas de GAGs formadas por mezclas de galactosa y ácido urónico (9). El caso del ácido hialurónico es especial porque es un GAG no sulfatado al que se pueden asociar un gran número de proteoglicanos que se unen por su cadena protéica central a la cadena de ácido hialurónico por medio de un péptido llamado proteína de unión, constituyendo así un agregado de proteoglicanos que es el de mayor tamaño descrito hasta ahora (P.M. de varios millones de daltones) (9,13,17,18).

Los GAGs son muy aniónicos, debido principalmente a que tienen grupos sulfato y carboxilo (puede haber hasta tres

grupos sulfato por cada unidad disacárida). Además, sus ácidos urónicos se encuentran ionizados a pH fisiológico. La relevancia de esta característica radica en que iones positivos (tales como el sodio) son atraídos por esta nube de cargas negativas, y a su vez atraen grandes números de moléculas de agua hacia las cadenas de GAGs. Esto trae como consecuencia un atrapamiento de agua que hace que el complejo así constituido adquiera características de gel (9). Este mecanismo de atrapamiento de agua es el principal responsable de la turgencia de los tejidos (2,13). Asimismo, se ha propuesto a éste, como un mecanismo de control de retención y flujo de agua, difusión de solutos, migración celular, etc. (17).

Los GAGs están unidos a la proteína central por medio de un trisacárido formado por galactosil-galactosil-xilosa que se une a la cadena peptídica en una serina. La cadena de GAG se une a través del extremo reductor del trisacárido, como ha sido demostrado para el condroitín 4-sulfato y 6-sulfato, dermatán sulfato, heparina y heparán sulfato. Por otra parte, el keratán sulfato puede unirse por N-acetilglucosamina a residuos de asparagina, o por N-acetilgalactosamina a residuos de serina o treonina de la proteína central (9).

SULFATACION DE LOS GAGs: La gran mayoría de las cadenas de GAGs asociadas a PGs están sulfatadas por completo. Sin embargo, se han detectado cadenas que no tienen ningún grupo

sulfato, así como una pequeña proporción que sólo se encuentran parcialmente sulfatadas (9).

SINTESIS: El proceso de biosíntesis de los PGs no se conoce completamente. Diversos estudios han demostrado que la síntesis de la proteína central precede a la formación de cadenas de GAG:

- En experimentos de pulso y seguimiento en los cuales la síntesis de proteoglicanos fué inhibida por puromicina, no se inhibió la transferencia de azúcares hacia un aceptor endógeno de PG (19).

- Cuando el condroitín está siendo sintetizado, los azúcares son adicionados uno por uno de manera alternante (20-22).

En geles de poliacrilamida las proteínas forman bandas discretas, pero los GAGs libres o unidos a proteína se observan como zonas barridas, lo que pone de manifiesto una gran dispersión en peso molecular. El por qué de esas diferencias no es conocido y para tratar de explicarlas se ha propuesto un modelo de síntesis estrechamente relacionado a la membrana (Fig. 4). En este modelo se propone que la proteína central sale hacia el sitio de síntesis de GAG en el aparato de Golgi en donde es retenida con firmeza. Las enzimas requeridas para la síntesis de GAGs y su sulfatación se encuentran adyacentes a este sitio de manera que a la vez que ocurre la formación de las cadenas de GAGs también son sulfatados sus azúcares. Si el PG es removido de este sitio,

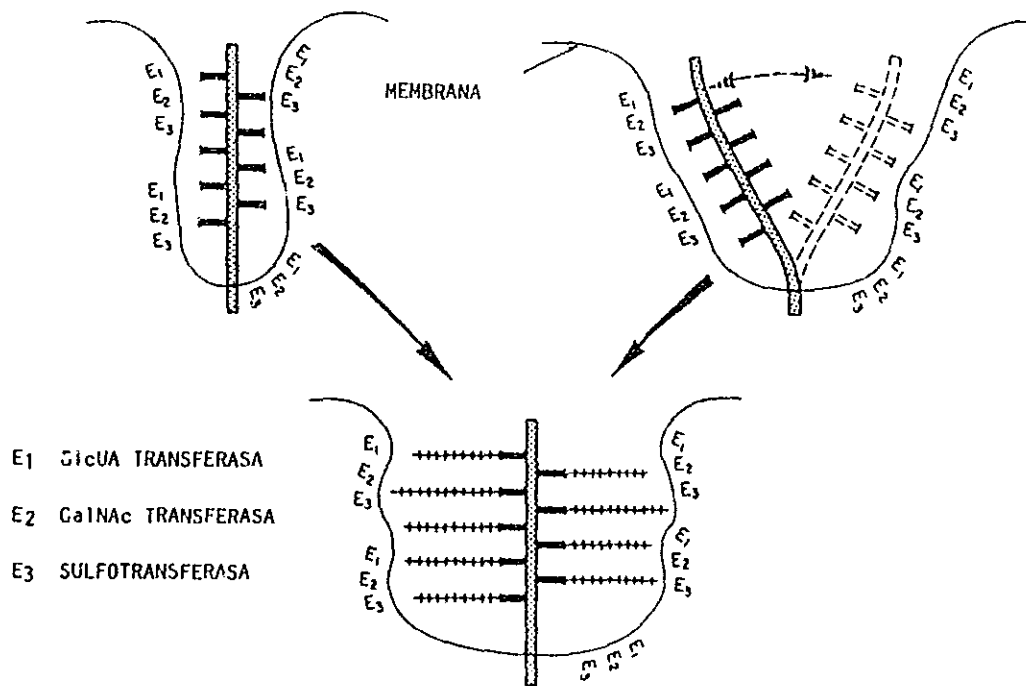


Fig. 4: Esquema del modelo de síntesis de GAGs propuesto por Silbert (9).

no es capaz de volver a unirse y la polimerización de cadenas de GAGs no se puede reanudar.

Otro aspecto que hasta la fecha no ha sido esclarecido es el referente al control de la síntesis. Este puede ser un asunto de gran importancia ya que se ha hecho cada vez más aparente que los procesos patológicos se encuentran relacionados con mucha frecuencia a alteraciones en la regulación y organización metabólica más que a alteraciones en pasos individuales de las rutas metabólicas. Esto se pondría de manifiesto como cambios múltiples a nivel celular, y no como el efecto de una sola enzima que sería relativamente sencillo de explicar (23).

El tiempo de recambio de los PGs es relativamente corto si se le compara con el de otros componentes de la matriz extracelular; se ha calculado que puede ser de dos días a dos semanas para el ácido hialurónico, condroitín sulfato, y dermatán sulfato (24,25). Esto significa que debe de haber una síntesis continua y muy activa. Probablemente no existe reciclaje de los productos de degradación de PGs pues, en el humano, se ha observado que en situaciones en que el ritmo de degradación es alto se pueden identificar tales productos en orina (9).

Entre las enzimas que degradan GAGs se han descrito endoglicosidasas y exoglicosidasas. De las endoglicosidasas la más estudiada es la hialuronidasa testicular, la cual genera tetrasacáridos o fragmentos más grandes pero constituidos por residuos en números pares. Es una endo- β -N-

acetilhexosaminidasa que ataca al azar a los grupos N-acetilglucosaminil β -unidos de la cadena pero muestra mayor preferencia por las moléculas grandes que por los oligosacáridos (26). Este tipo de enzimas se encuentra en tejidos que están en proceso de remodelación, como es el caso de la piel de la espalda de los renacuajos, donde se mantiene activa a través de todas las etapas de su metamorfosis. En contraste, no se encuentra en la rana adulta (27).

Las exoglicosidasas atacan a un azúcar terminal no reductor y son incapaces de hacerlo sobre la parte intermedia de un GAG o un oligosacárido intacto.

Otro grupo de enzimas que participan en la degradación de los PGs son las sulfatasas, que generalmente no tienen actividad sobre GAGs intactos y solamente quitan sulfato de un extremo terminal no reductor (28). Por lo tanto, es probable que estas enzimas actúen en forma secuencial empezando por el extremo no reductor de un GAG. Parece ser necesario que el sulfato sea removido de un azúcar terminal no reductor para que sea removido por una exoglicosidasa (29).

Otra forma en la que puede darse el recambio de PGs en los tejidos es por degradación inicial de la porción protéica. Esto se ha demostrado en experimentos en los cuales se inyectó papaína a conejos. La introducción de esta enzima dió por resultado una rápida pérdida de la rigidez de los cartílagos, lo cual se pudo observar en la flacidez que a

continuación presentaron las orejas, y que fue acompañada por un incremento en la movilización y excreción de GAGs en la orina (30). Además se sabe que las enzimas proteolíticas ácidas pueden degradar grandes cantidades de GAGs in vivo (16).

Se ha demostrado que las catepsinas de hueso y cartílago son capaces de degradar la parte protéica de los PGs (31), lo cual precede a la solubilización de GAGs. La proteína central de muchos PGs es degradable por enzimas proteolíticas de especificidad amplia; en contraste, la proteína central de la heparina es muy resistente a la degradación por proteasas (32). La estromelina, enzima que pertenece a la familia de las metaloproteinasas, es una importante degradadora de los componentes de la matriz extracelular, en particular de proteoglicanos por lo que también se le conoce como proteoglicanasa (33).

LOS PROTEOGLICANOS DEL PULMON: El estudio del contenido y distribución de GAGs y PGs tanto en condiciones normales como en diferentes procesos patológicos es un área de interés creciente para los investigadores del pulmón, en particular para aquellos dedicados a la matriz extracelular. Su estudio puede ayudar a dilucidar los mecanismos patogénicos en diferentes padecimientos en los cuales el tejido conjuntivo se encuentra afectado como es el caso del enfisema pulmonar y la fibrosis intersticial difusa.

Sin embargo, las dificultades metodológicas han hecho difícil la generación de información en este terreno. Esto se puede observar en el análisis de trabajos que presentan resultados contradictorios. Por ejemplo, Schmid y cols. (34), hicieron una cuidadosa cuantificación de GAGs en diferentes componentes anatómicos del pulmón en diversas etapas de desarrollo y envejecimiento y encontraron que la cantidad total de GAGs aumenta con la edad. En contraste, Konno y cols. (35) demostraron que en las mismas condiciones existe una disminución estadísticamente significativa en el contenido de GAGs totales en el pulmón. Adicionalmente, los autores encontraron una disminución significativa en el contenido de ácido hialurónico en pulmón enfisematoso en comparación con los normales. De manera interesante, ambos trabajos son contemporáneos.

Más recientemente, Masuda y cols. (36) empleando métodos cromatográficos reportaron la existencia de cantidades detectables de heparina en tejidos normales, y además encontraron un incremento de la misma en el adenocarcinoma. En esta neoplasia existe también más ácido hialurónico que en el parénquima de pulmón normal. Es la primera publicación en que se reporta la detección de heparina en pulmón humano normal y en cáncer, esto se debe probablemente al uso de nuevos métodos de extracción y purificación.

En relación a la posible modificación de las cantidades de PGs debido al envejecimiento, la información en la literatura no concuerda en las cifras pero sí en que se

producen cambios en las cantidades totales y relativas de proteoglicanos con el envejecimiento. En general parece ser que la tendencia del contenido de PGs es hacia la disminución (34,35,37).

Existen algunos estudios sobre las modificaciones en pulmón de los PGs en general o de alguno de los miembros de esta familia. En particular durante el desarrollo de la fibrosis pulmonar intersticial difusa, enfermedad caracterizada por un aumento en el contenido de colágena con destrucción del parénquima, generalmente se ha encontrado un aumento en las cantidades de GAGs (36,38,39), lo que hace pensar que también puede haber un mayor contenido de alguno o algunos PGs.

Como puede observarse, la información acerca de los PGs en pulmón normal y patológico es aún escasa, pero la que hay en la literatura sugiere que los proteoglicanos de bajo peso molecular desempeñan funciones de regulación directa e indirecta relevantes.

Uno de estos proteoglicanos pequeños, la decorina (PM 97 kDa), despierta particular interés, pues se ha visto que es capaz de regular la formación de fibrillas de colágena in vitro (40). En experimentos de fibrillogénesis en los cuales la decorina es agregada al seno de la reacción al principio de la misma, las fibras que se forman son de grosor menor al normal y muestran una disminución en la resistencia a fuerzas de tensión; en cambio cuando se agrega después de iniciada la reacción, pero antes de que se complete la

polimerización de colágena, las fibras presentan un aspecto y comportamiento normal (40). Aunque el mecanismo responsable de este fenómeno no se conoce, probablemente esté relacionado con la inhibición del crecimiento radial por agregación de moléculas de colágena a las fibrillas (11).

Es interesante señalar que este proteoglicano se ha encontrado íntimamente asociado a fibras de colágena de una forma específica (11,13,40,41,42). Existen además evidencias de que si la asociación entre decorina y colágena es defectuosa, puede haber consecuencias patológicas como sucede por ejemplo en algunos casos de osteogénesis imperfecta (43), aunque es pertinente señalar que en esta patología las principales alteraciones se han descrito en las colágenas.

Otra característica interesante de la decorina es el hecho de que tiene en la porción protéica un sitio receptor para el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β) (44). Este factor promueve los procesos inflamatorios y fibrosantes. Por ejemplo, se ha descrito que es capaz de disminuir la síntesis de estromelisina, colagenasa, elastasa, y otras enzimas que degradan componentes de matriz extracelular. Además contribuye a la inhibición de la degradación de colágena porque estimula la producción de inhibidores de colagenasa, como lo es el TIMP (45). Pero cuando el TGF- β está asociado con decorina, se neutralizan sus funciones estimuladoras o inhibitoras (44). Se ha

propuesto que esta función de la decorina constituye un mecanismo de regulación para el control del TGF- β (44).

Es interesante asimismo señalar que la presencia de TGF- β inhibe la producción o liberación de decorina y estimula la síntesis de biglicano, otro PG de pequeño PM y con gran homología con la cadena peptídica de la decorina, mientras que no parece tener un efecto similar sobre otros PGs (46).

Por otro lado, se han realizado investigaciones con células transformadas que no expresan decorina, y a las cuales, por medio de una transfección, se les ha introducido el gene estructural de la decorina. Los resultados han mostrado que estas células que no presentan inhibición por contacto, lo manifiestan después de la transfección del gene de decorina; asimismo, su tiempo de proliferación y el tamaño aparente de cada célula se incrementaron. Lo que los investigadores observaron fue una "normalización" de estas células transformadas. Las modificaciones observadas correlacionaron directamente con la cantidad de decorina que después de la transfección fueron capaces de producir (47).

La información generada hasta ahora por diferentes grupos de investigadores ha hecho evidente la importancia que tienen los proteoglicanos de bajo peso molecular, en particular la decorina, en la homeostasis de la matriz extracelular. Este proteoglicano de 97 kDa tiene una sola cadena lateral de dermatán sulfato o condroitín sulfato que representa aproximadamente la mitad del peso de esta molécula. Esta molécula es capaz a través de diferentes mecanismos de

afectar la formación de fibras de colágena y su degradación; uno de ellos es que aparentemente lo puede hacer por su interacción directa con las fibrillas de colágena. Otro es por la modulación indirecta que ejerce en la síntesis de metaloproteinasas y sus inhibidores, además de la influencia que puede ejercer en mecanismos de proliferación celular por su asociación con TGF- β .

Todo lo anterior establece la relevancia del estudio de la decorina en el parénquima pulmonar para lograr un mejor entendimiento de los mecanismos normales y patológicos involucrados en la generación y desarrollo de las enfermedades del tejido conjuntivo.

II.- OBJETIVO:

Desarrollo de un método para la purificación de decorina de parénquima pulmonar humano.

Para estudiar la actividad y funciones de una biomolécula es importante tenerla en forma pura. Los métodos existentes para la purificación de la decorina humana se basan en su extracción a partir de cartílago. Sin embargo, debido a las notables diferencias que existen en la composición celular y molecular entre parénquima pulmonar y cartílago, el método debe de ser modificado. Aún cuando se ha descrito un método para la purificación de la decorina de parénquima pulmonar bovino (48), las diferencias que hay entre el parénquima pulmonar humano y el de bovino, los hace inadecuados (49). Esto hizo necesario el desarrollo de un nuevo método para la purificación de decorina del parénquima pulmonar humano, que es el objetivo del presente trabajo.

III.- MATERIAL Y METODOS:

Se procedió inicialmente con la siguiente estrategia:

- 1.- Cortes de 2-3 mm de espesor y lavado del tejido pulmonar para eliminar proteínas séricas.
Homogenado y lavado del tejido para eliminar proteínas intra y extracelulares no unidas a la matriz.
- 2.- Extracción de los PGs y otros componentes de la matriz extracelular mediante el uso de clorhidrato de guanidina (ClHGu).
- 3.- Separación por densidad de flotación de las moléculas solubilizadas por el ClHGu.
- 4.- Separación por columna de intercambio iónico de las moléculas con densidad de flotación cercana a 1.4 g/ml.
- 5.- Separación por tamaño en gel de poliacrilamida de las moléculas de las fracciones eluídas por la solución de mayor concentración, y que den positiva la reacción de identificación de GAGs.
- 6.- Electrotransferencia de las moléculas separadas por el gel de acrilamida a membrana de nylon Immobilon PVDF de Millipore. Identificación de decorina con anticuerpos conjugados con peroxidasa (Western Blot).

MATERIAL BIOLÓGICO: Un lóbulo del pulmón derecho (76.8 g), de un sujeto masculino de 23 años de edad fué obtenido por lobectomía realizada para la remoción de una neoplasia pulmonar primaria del tipo histológico de adenocarcinoma, que se presentó como nódulo pulmonar solitario localizado en el bronquio principal. No se encontraron metástasis en el resto de la muestra después de ser examinado por el patólogo, tanto desde el punto de vista macro como microscópico.

Inmediatamente después de ser recibido, el tejido pulmonar se disecó cuidadosamente para eliminar vías aéreas y grandes vasos sanguíneos, siempre que estas estructuras fuesen localizables a simple vista. Se eliminaron estos elementos anatómicos pues el propósito de este trabajo era la obtención de PGs de parénquima pulmonar; la maniobra se realizó a 4°C. Es conveniente recordar que cartilago y vasos sanguíneos tienen un alto contenido de PGs en sus anillos o asociados a las fibras elásticas. Posteriormente el tejido fue colapsado en una cámara de alto vacío para que pudiera ser congelado más rápida y uniformemente.

La muestra de peso final 76.8 g. se conservó a -70°C hasta ser utilizada.

PREPARACION DE LA MUESTRA: El tejido congelado se cortó finamente con una navaja de bisturí. A continuación, se lavó con 300 ml de solución de PBS (NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂PO₄ 1.15 g, KH₂PO₄ 0.2 g, H₂O c.b.p. 1.0 l, pH=7.3) (50) que contenía PMSF 1.0 mM y EDTA 1.0 mM como inhibidores de

proteasas. Posteriormente el tejido se procesó en un homogenizador Omni de Sorvall hasta obtener una suspensión homogénea. Para lograr ésto se sometió al tejido a la acción de las hojas cortantes del aparato durante tres períodos de diez segundos c/u a la máxima velocidad (20,000 rpm). El volumen total se llevó a 1110 ml con la misma solución, la mezcla se agitó con suavidad durante 15 min y a continuación se centrifugó a 7,000 x g durante 10 minutos a 4 °C (centrífuga preparativa Beckman Ja-21, cabezal JA-10) para recuperar el tejido lavado. Una pequeña parte del tejido permaneció flotando por lo que fué necesario desaerear de nuevo (inducción de colapso al vacío) antes de centrifugar por segunda vez de la misma manera. Así se logró bajar al fondo del tubo el total del tejido de la muestra.

Se repitió la operación de lavado ahora con un volumen total de 700 ml de la misma solución.

Los sobrenadantes se conservaron para cuantificar proteínas totales extracelulares e intracelulares eliminadas.

El tejido homogenizado y lavado se dividió en 8 fracciones que fueron conservadas a -70 °C.

EXTRACCION: Una fracción del tejido (equivalente a 9.6 g de parénquima pulmonar fresco sin lavar) se colocó en 100 ml de la solución de extracción (ClHGu 4.0 M, EDTA 0.1 M, PMSF 1.0 mM, leupeptin 10.0 µg/ml, pepstatin 10.0 µg/ml, acetato de sodio 0.1 M, pH 5.8), a 4 °C. La muestra se llevó a un volumen total de 150 ml, por lo que se adicionaron 20.0 g de ClHGu para mantener su concentración en 4.0 M. Esto se

realizó con agitación constante (evitando la formación de espuma) durante 20 h.

Se centrifugó la mezcla en una ultracentrífuga Beckman L8-55M a 30 000 x g, a 4 °C, durante 25 minutos. Debido a la elevada viscosidad de la mezcla, no se separó el material insoluble. Por lo tanto fue necesario incrementar la proporción de solución de extracción, llevándose a 400 ml de volumen final.

Separación del material solubilizado: Para eliminar la porción insoluble se realizó una separación por centrifugación en una ultracentrífuga Beckman L8-55, cabezal SW-28 (de columpio), camisas 117.7, tubos Beckman de polialómero 1,0 X3.5 pulgadas, a 30 000 x g, 4°C, durante 25 minutos; el sobrenadante con el material solubilizado (280 ml) se dividió en alícuotas de 70 ml y se conservó a -70 °C hasta su uso.

GRADIENTE DE DENSIDAD:

a).- Para lograr una buena separación de los PGs pequeños se ajustó la densidad de la solución de la muestra a 1.4 g/ml con cloruro de cesio (ClCs) (51).

Manejo de la muestra: una alícuota de la solución del extracto (70.0 ml, 3.8 mg/ml de proteínas totales) fue descongelada en baño de hielo. Se centrifugó a 14 000 x g, 20 minutos, para separar el material que hubiese precipitado por efecto de la congelación. Para aclarar la solución fue necesario filtrar por hoja doble de papel filtro Watman No. 4 en Büchner pues había material insoluble suspendido, el cual fue descartado.

Ajuste de densidad: se realizó agregando progresivamente ClCs hasta obtener la densidad de 1.4 g/ml que es la densidad de flotación de los PGs de bajo peso molecular. Simultáneamente con cada adición de ClCs se añadieron las cantidades necesarias de ClHGu para mantener la concentración en 4.0 M, pues el volumen de la muestra se va incrementando con cada adición de ClCs (en algunas corridas el volumen se incrementó hasta en un 20 %).

Para obtener una buena separación en el gradiente de densidad, la concentración de proteínas totales no debe de exceder 1.0 mg/ml, pues no se forma adecuadamente el gradiente como fué determinado previamente en nuestro laboratorio. El ajuste de concentración se hizo diluyendo la muestra con solución de extracción.

Para una alícuota de 70 ml se requirieron alrededor de 80.0 gramos de ClCs para ajustar la densidad a 1.4 g/ml. Debido a que la adición de ClCs altera la concentración de ClHGu, esta sal debe ser añadida en forma sólida para mantener su concentración en 4.0 M, pues es a esta molaridad que se

solubilizan más eficazmente a los PGs. Esto obliga a reajustar de nuevo la densidad por la alteración producida a su vez por esta maniobra, y así sucesivamente hasta que se obtiene la densidad deseada, y la concentración de ClHG_u en 4.0 M.

Para formar el gradiente de densidad se centrifugaron 8 tubos, cada uno de ellos con 38.5 ml de la solución a 10 000 x g, a 4 °C durante 65 h.

Una vez que el gradiente se ha formado, la solución de la zona cercana al fondo del tubo tiene una densidad mayor a 1.4 g/ml, la solución de la zona del menisco presenta una densidad menor a 1.4 g/ml, mientras que en la zona intermedia entre el menisco y el fondo del tubo se encuentra una zona con densidad de 1.4 g/ml, en la cual se localizan los PGs de bajo peso molecular (51).

b).- Fraccionamiento del gradiente: se separaron las zonas de diferentes densidades vaciando cuidadosa y lentamente los tubos. Este proceso se realizó mediante la succión del contenido de los tubos por una aguja que se introdujo a través del menisco hasta el fondo del tubo; la succión se hizo con una bomba peristáltica. La zona de más alta densidad fue la que se extrajo primero, y la última en salir fue la de menor densidad (la zona del menisco). El contenido de los tubos se transfirió a un colector de fracciones que separó su contenido en fracciones cuyo número osciló entre 8 y 15. Debido a que los cambios de temperatura pueden generar

corrientes por convección que a su vez pueden destruir el gradiente, esta operación de fraccionamiento se hizo lo más rápidamente posible, lo que significó un período de aproximadamente 15 min por tubo (Fig. 5).

c).- Medición de densidad: de cada fracción se pesó 1.0 ml en la balanza analítica y se juntaron todas las fracciones con densidad en el rango de 1.39 a 1.48 g/ml para continuar la purificación.

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO: Los métodos de cromatografía de intercambio iónico se basan en el hecho de que muchas biomoléculas se unen por fuerzas electrostáticas de su superficie a los grupos cargados de la fase sólida o resina intercambiadora de iones. Inicialmente las cargas de la resina se equilibran con iones de carga contraria que toma de la solución amortiguadora. A su vez, las biomoléculas se equilibran con iones de carga contraria a la suya neta y que son del mismo signo que los de la resina. Al entrar en contacto estrecho con la resina, las biomoléculas desplazan a los iones contrarios que están unidos a la resina; generalmente los iones desplazados son de la misma carga que los que rodean a la biomolécula, de ahí el nombre "intercambio iónico". La fuerza de unión de las biomoléculas a la fase sólida dependerá de su naturaleza química, tamaño y número de cargas. La unión es reversible. Se pueden desprender las biomoléculas haciendo pasar una solución con

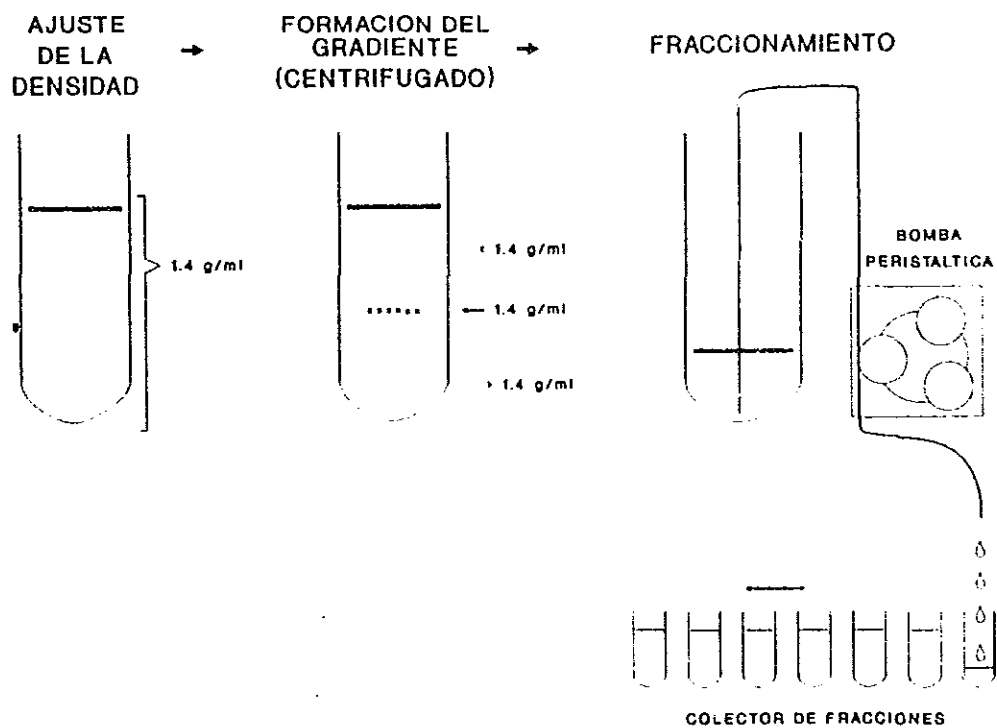


Fig. 5: Esquema de la separación de las moléculas de la muestra por gradiente de densidad de CsCl y el subsecuente fraccionamiento de el contenido de los tubos.

mayor concentración de iones contrarios para que la biomolécula sea desplazada. La concentración del ión contrario que se requiere para desprender a una biomolécula dada es directamente proporcional a la fuerza de unión de la biomolécula con la resina (52).

La resina empleada inicialmente en este trabajo fué DEAE-Sephacel, la cual fué substituída posteriormente por Q-Sepharose para las últimas corridas. Esta resina dió mejores resultados. La preparación de la muestra biológica no requirió de modificaciones especiales para poder usar esta nueva resina.

Para el uso de ambas resinas fue necesario cambiar el ClHGu por urea, porque el primer agente disociante es capaz de asociarse con las resinas de intercambio iónico; en cambio la urea es inerte en ese sentido. Para mantener las condiciones disociantes, se reemplazó el ClHGu por urea mediante una diálisis (52). Se equilibró la muestra con la solución con que se iniciaría el gradiente de intercambio iónico: urea 7.0 M, NaCl 0.1 M, Tris 25 mM, pH 6.8 .

La muestra (67.5 ml, 82.0 mg de proteínas totales) se introdujo a la columna (dimensiones de la cama: 2.5 x 17.2 cm, volumen: 85.9 ml). El flujo durante la introducción de la muestra fué de 40.0 ml/h, aproximadamente la mitad del de la corrida (90.0 ml/h).

Antes de aplicar el gradiente, se lavó la columna con la solución de inicio para eliminar proteínas que no se adhirieron a la resina de intercambio, eliminandose así una

buena cantidad de proteínas que no fueran parte de los PGs. El lavado se consideró completo cuando la lectura de D.O. hubo regresado al nivel basal. Como se mencionó, el seguimiento de la elución se realizó mediante un lector de U.V. (280 nm.) acoplado al colector de fracciones para detectar proteínas en el eluido. Una vez que se ha alcanzado el nivel basal después del lavado, se inicia la aplicación del gradiente de concentración de NaCl a la columna. Mediante este lavado se eliminaron alrededor de un 60 % de proteínas unidas por la resina.

El gradiente lineal se genera en el transcurso de la corrida con un Gradient Mixer (Pharmacia), el cual adiciona paulatinamente a la solución de inicio un volumen controlado de solución que sólo difiere de la de inicio en que tiene mayor concentración de NaCl (1.0 M para la columna de DEAE-Sephacel, y 2.0 M para la columna de Q-Sepharose). El incremento de concentración de NaCl es lineal. Al consumirse los volúmenes totales de las dos soluciones (100 ml en cada caso), la concentración final del eluyente se aproxima a la de la solución de mayor concentración, lo que debe ocurrir de manera simultánea con el consumo total de los volúmenes de las 2 soluciones, por esto es lineal el gradiente.

Se midió la densidad óptica a 280 nm en el eluido, para detectar a la salida de la columna la presencia de proteínas que se desprendieron de la resina conforme se incrementó la concentración de NaCl. En cada cromatografía de intercambio iónico fueron colectadas más de 200

fracciones (independientemente de qué resina se empleara) hasta asegurarse que hubiera eluido todo el material incorporado inicialmente y que quedara la resina totalmente limpia. Para comprobar la limpieza de la columna se aplicó un volumen de 10.0 ml de buffer de corrida con NaCl 3.0 M, pero no se registró absorción a 280 nm.

CUANTIFICACION DE ACIDO HEXURONICO POR EL METODO DE BITTER Y MUIR (53):

Si los ácidos urónicos son calentados en ácido borosulfúrico y recalentados en presencia de carbazol, desarrollan una coloración roja.

REACTIVOS:

- 1.- Acido borosulfúrico: $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ 0.025 M en H_2SO_4 18 M. Conservar a 4°C.
- 2.- Reactivo de carbazol 0.125 % (peso/volumen): disolver 125 mg de carbazol en 100 ml de etanol.
- 3.- Solución standard de hexuronato: disolver 234 mg de glucuronato de sodio monohidratado en H_2O destilada. Llevar a aforo de 100 ml con H_2O destilada. La concentración será de 10 μmol de hexuronato/ml. Almacenar a 4°C.
- 4.- Curva standard: diluir 100, 200 y 300 de la solución standard hasta 10 ml con en disolvente en que se tendra la muestra problema. Las concentraciones de estos puntos serán: 20, 40 y 60 nmol/200 μl .

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Colocar 200 μ l de la muestra en un tubo en baño de hielo. Preparar simultáneamente un blanco de reactivos.
- 2.- Adicionar 1.2 ml del reactivo de ácido borosulfúrico.
- 3.- Mezclar en mezclador vortex.
- 4.- Enfriar en baño de hielo.
- 5.- Incubar 10 minutos a 100 °C.
- 6.- Enfriar 5 minutos en baño de hielo.
- 7.- Adicionar 500 μ l de reactivo de carbazol.
- 8.- Mezclar inmediatamente en el mezclador vortex.
- 9.- Incubar 10 minutos a 100 °C.
- 10.- Enfriar en baño de hielo.
- 11.- Llevar a temperatura ambiente.
- 12.- Leer absorbancia a 530 nm.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA: Este método fué empleado porque permite la separación de biomoléculas de diferente tamaño sin importar su carga neta. El uso de detergentes uniforma la carga de las moléculas disueltas en la muestra y las desnaturalizan. En este método, la muestra es colocada en un gel de poliacrilamida cuya concentración determina la densidad de la malla por la cual serán forzadas a pasar las diferentes moléculas de la muestra. La aplicación de una corriente constante al sistema obliga a las moléculas a migrar hacia el polo opuesto a su carga. Las moléculas más pequeñas podrán penetrar a una mayor profundidad del gel, mientras que las de mayor tamaño lo

harán más lentamente y por lo tanto llegarán a una menor profundidad (52,54).

El diseño más común de gel de poliacrilamida incluye una sección inicial del gel que se elabora con una concentración de acrilamida menor a la del gel separador. Este gel tiene como objetivo el de concentrar a las moléculas de la muestra para que estas tengan el mismo punto de partida y puedan ser comparadas de manera más confiable con controles de peso molecular. Este gel concentrador constituye del 10 al 15 % de la longitud total del gel.

Para determinar la concentración óptima del gel para la separación de decorina se corrieron minigeles comerciales (9.4 cm X 8.3 cm X 0.7 mm) de concentración creciente de acrilamida (gradiente de 3% a 10%) con 2-mercaptoetanol para mantener condiciones reductoras. Las concentraciones de los geles más adecuadas para este trabajo fueron: gel concentrador de 3 % y gel separador de 7.5 %.

Después de la cromatografía de intercambio iónico, las muestras fueron dializadas contra una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 M, pH 6.8, para eliminar exceso de NaCl y tener a todas las muestras en las mismas condiciones.

Se manejaron condiciones reductoras para evitar en lo posible la formación de agregados. Para lograr esto se tomaron 5 μ l de muestra y se le adicionaron 5 μ l de "buffer de muestra":

SDS al 10 %	2.0 ml.
Tris 0.5 M, Ph 6.8	2.0 ml.

Glicerol	2.0 ml.
2-mercaptoetanol ...!	100.0 μ l.
Azul de bromofenol	10.0 μ g.
H ₂ O destilada	4.0 ml.

Las muestras se colocaron en baño maría a 90 °C, durante 5 min.

Se corrió la electroforesis a 25 mA durante 4 h con enfriamiento.

Paralelamente se corrió un carril con controles de peso molecular.

Para evitar que las bandas formadas por las diferentes moléculas difundan en el gel y desaparezcan es necesario fijarlas. Esto se consiguió sumergiendo al gel en una solución acuosa de metanol y ácido acético al 40 % y 10 % respectivamente.

Para visualizar las bandas se tiñe el gel. Se probó inicialmente la tinción con azul coomssie pero no tuvo la sensibilidad necesaria. La tinción que funcionó bien fue la de azul alcian seguida de plata amoniacal para incrementar el contraste (55).

WESTERN BLOT: Este método permite confirmar la presencia de la molécula de interés en la muestra entre las moléculas separadas por gel de acrilamida. El gel se corre en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente, las moléculas

son electrotransferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa en la cual quedan fijas. Después se aplica un anticuerpo específico contra la molécula de interés el cual puede tener conjugada directamente una enzima capaz de desarrollar una reacción de color. Es posible también emplear un segundo anticuerpo contra el anticuerpo primario que sea el que tenga conjugada la enzima. Esta segunda opción fué la utilizada en este método. La enzima empleada fué peroxidasa. El sistema indicador fué el de quimioluminiscencia de Amersham.

Una vez que se han separado las moléculas de una muestra en un gel de acrilamida, éste es colocado en una celda adosada a una membrana de nitrocelulosa para efectuar la electrotransferencia. Para esto se aplica una corriente directa constante en sentido normal al plano del "emparedado" constituido por el gel, la membrana de nitrocelulosa y las esponjas del sistema de inmovilización de la celda. Debido a que las moléculas están cargadas negativamente, el gel se coloca del lado del polo negativo, y la membrana del lado positivo, para que las moléculas migren hacia la membrana a la cual quedarán adheridas.

Una vez terminada la transferencia se coloca la membrana en una solución de una proteína que sea diferente a las de la muestra (albúmina sérica bovina, ovoalbúmina o caseína, etc.), con el fin de que la membrana quede saturada de proteínas y se evite la adhesión inespecífica de anticuerpos a la membrana. En nuestro experimento se utilizó albúmina

sérica bovina al 2% en solución salina amortiguada con tris. Lo que se consigue con esto es que los anticuerpos se unan solamente a la proteína que reconozcan específicamente. A continuación se lavó la membrana con buffer que contenía Tween-20. La membrana se puso en contacto con el anticuerpo primario (IgG de conejo) específico contra la decorina humana y posteriormente se lavó y se le adicionó el segundo anticuerpo, específico contra el primer anticuerpo (IgG de cabra), conjugado con peroxidasa (56). La enzima cataliza una reacción que oxida al luminol (sistema de Amersham), éste emite luz, la cual es detectada por una placa autoradiográfica sensible a luz azul (Hyperfilm-ECL). Así se confirma la presencia de decorina en la muestra, además de que indica su posición en la membrana.

IV.- RESULTADOS:

LAVADO Y HOMOGENIZADO DE LA MUESTRA: El peso de la muestra después de la disección y eliminación del cartílago de las vías aéreas fue de 76.8 g y el total de proteínas eliminadas con los dos lavados que se realizaron en el tejido homogenado fue de 5.01 g (tabla 1). El tejido homogenado se dividió en 8 alícuotas, cada una representando aproximadamente 9.6 g de la muestra de tejido original en un volumen de 50 ml cada una. Estas se conservaron a -70 °C.

TABLA 1: PROTEINAS TOTALES SOLUBILIZADAS EN LAVADOS CON PBS.

	Volumen (ml)	Concentración (mg/ml)	Proteínas totales (g)
Primer lavado	1110	4.2	4.66
Segundo lavado	700	0.5	0.35

Proteínas totales eliminadas con ambos lavados: 5.01 g.

EXTRACCION: El volumen de solución de extracción (buffer con ClHGu) que se adicionó inicialmente fue de 100 ml, con una relación tejido-solución de extracción: 1 a 2. Posteriormente se agregaron 250 ml de la solución de ClHGu

para disminuir la viscosidad. El volumen final de la mezcla tejido-solución de extracción fue 400 ml y la relación tejido-solución de extracción: 1 a 7.

Después de la separación del material insoluble por centrifugación, el volumen final de extracto fue de 280 ml. La discrepancia entre los volúmenes se debe a que el material insoluble se hinchó, lo que no permitió recuperar un mayor volumen de extracto en solución.

TABLA 2: PROTEINAS TOTALES SOLUBILIZADAS CON ClHGu.

	Volumen (ml)	Concentración (mg/ml)	Proteínas totales (g)
Extracto de ClHGu	280	3.8	1.06

GRADIENTE DE DENSIDAD: Por dificultades técnicas cuando la muestra sometida a gradiente de densidad de ClCs, se separó en colector de fracciones no se pudo tener un número uniforme de fracciones de todos los tubos. Hubo uno de 8 y otro de 15. En general se obtuvieron 11 o 12 fracciones de cada tubo.

A cada fracción obtenida se le hicieron mediciones de densidad, concentración de GAGs (medición de ácido urónico) y de proteínas totales (tabla 3). Sin embargo, la reacción

de cuantificación de ácido urónico no desarrolló el color rosa típico que dan los GAGs, sino un pardo rosado.

Para probar si este color producía interferencia con la lectura de absorbancia a 530 nm se determinó el espectro de las diferentes fracciones de una corrida diferente a la de la tabla 3. Como puede observarse en la figura 6 mientras mayor es la lectura de absorbancia a 480 nm, mayor es el traslape con el pico de absorción a 530 nm, al cual absorbe el complejo carbazol-GAG. Esto es particularmente notorio si se comparan las gráficas 2 y 4 de esta figura. Por lo tanto concluimos que estas lecturas no eran confiables.

Por este motivo la selección de fracciones para la purificación de PGs pequeños se hizo de acuerdo a parámetros teóricos. Esto es:

- 1.- Los GAGs y el ClCs se asocian por cargas. El complejo así constituido adquiere una determinada densidad de flotación directamente proporcional al número de cargas presentes en cada cadena de GAG.
- 2.- Para los PGs de bajo peso molecular esta densidad es de alrededor de 1.4 g/ml (51).

Tomando en cuenta estas consideraciones, se seleccionaron las fracciones con densidad de flotación de 1.39 a 1.48 g/ml, y se juntaron. Los volúmenes variaron en cada corrida, pero oscilaron entre 15 y 17.5 ml.

Cabe mencionar que las especies de PGs de peso molecular elevado, más de 200 000 Da, se localizan en las zonas de mayor densidad consiguiéndose así su separación de los PGs

TABLA 3: DATOS DE UNA SEPARACION REPRESENTATIVA POR GRADIENTE DE DENSIDAD DE CsCl.

TUBO I:

FRACC.	DENSIDAD	D.O.	AC. URONICO
#	(g/ml)	(280 nm)	(mmol/200 μ l)
1	1.56	0.230	31.83
2	1.50	0.131	26.96
3	1.48	0.354	27.34
4	1.46	1.700	50.69
5	1.45	1.470	46.29
6	1.43	1.200	44.05
7	1.42	1.130	39.22
8	1.40	1.130	39.58
9	1.41	1.100	37.32
10	1.39	0.980	38.14
11	1.38	1.100	36.30
12	1.38	1.110	36.35
13	1.36	1.100	39.19
14	1.36	0.610	27.56
15	1.32	1.600	64.30

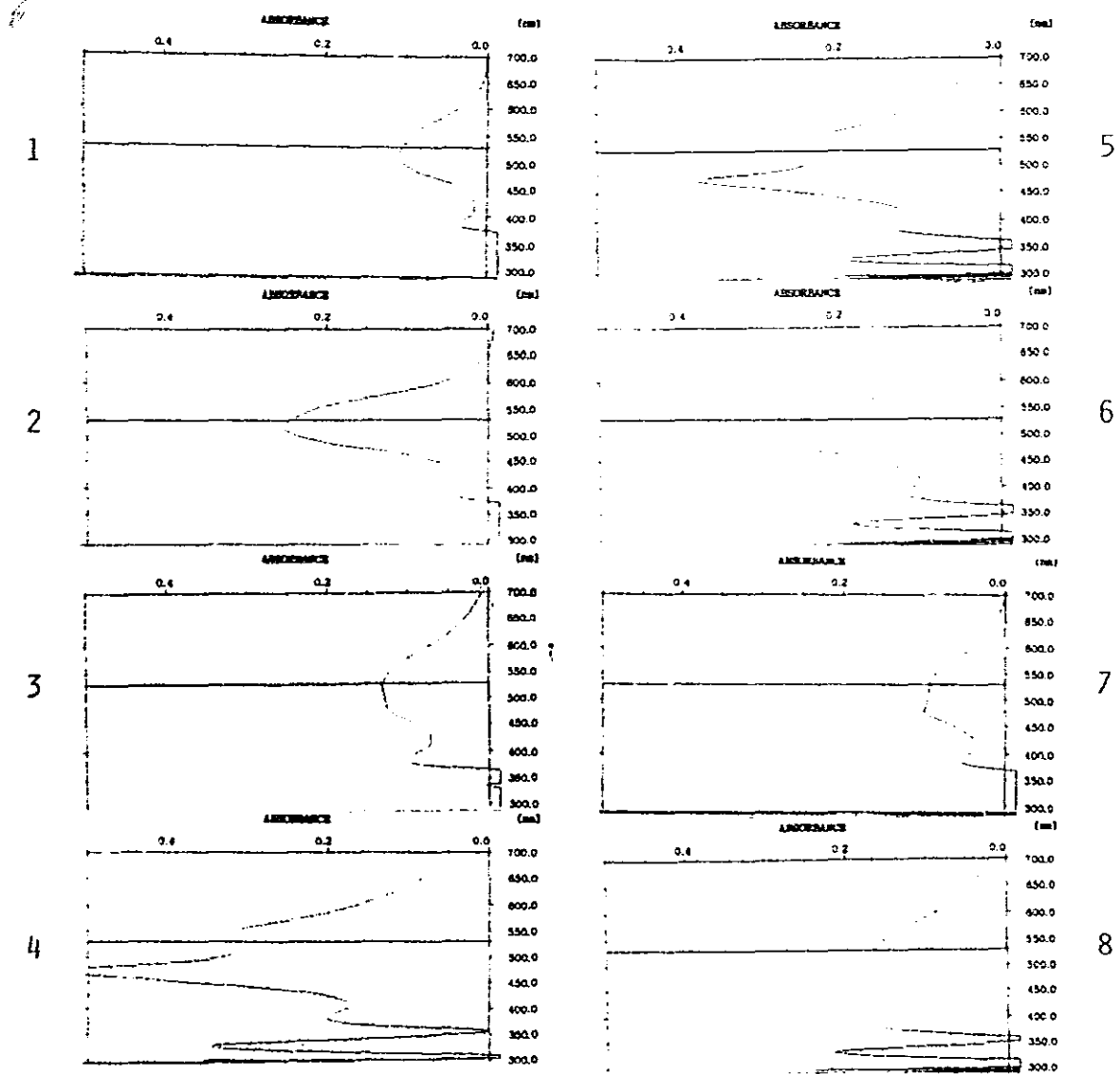


Fig.6: Gráficas de los espectros de absorción en el rango de longitudes de onda de 300-700 nm. Las muestras son fracciones de un gradiente de densidad en ClCs. A mayor lectura de D.O. a 480 nm, mayor es el traslape con la zona de absorción a 530 nm. (ac. úronico) marcada con la recta que atraviesa cada gráfica.

pequeños y su posterior eliminación.

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO: En la figura 7 se ilustra la cromatografía de una muestra eluída por DEAE-Sephacel. En ella se encuentra el pico de proteínas construido con las lecturas de densidad óptica a 280 nm, así como el pico correspondiente a la medición del ácido urónico, el cual fue cuantificado posteriormente. Puede observarse que no se obtiene una buena separación. Por este motivo se decidió probar otra resina, la Q-Sepharose de Sigma, la cual es capaz de unir con mayor fuerza a los glicosaminoglicanos. Se buscaba de esta manera, aumentar la diferencia de concentraciones de cloruro de sodio a las que podrían desprenderse de la resina primero las proteínas y después, a una mayor concentración de NaCl, los GAGs. Los resultados obtenidos con la columna de Q-Sepharose se muestran en la figura 8. Como se puede apreciar, el último pico, en el que el eluato dió positiva la reacción para GAGs, aparece separado.

Una vez obtenidas y reunidas las fracciones que contenían los GAGs, se procedió a concentrarlas aprovechando nuevamente las características de la resina Q-Sepharose. La muestra se aplicó a una columna de Q-Sepharose de 0.5 cm de diámetro por 1 cm de altura. Para eluir a los GAGs se utilizaron 150 μ l de NaCl 3 M.

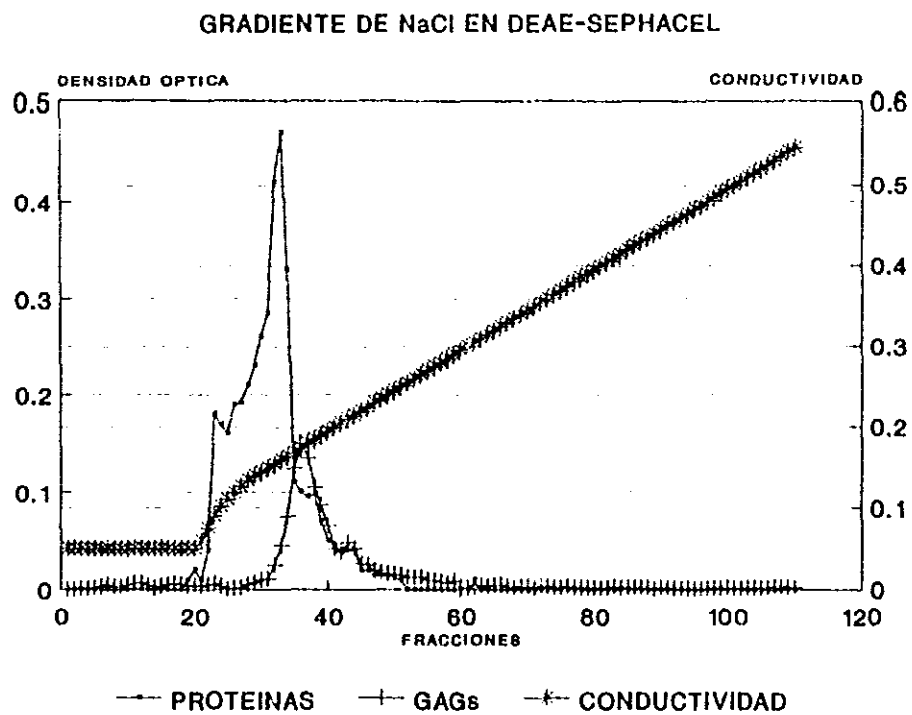


Fig. 7: Cromatograma del eluyente de la columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharose). Las magnitudes de los picos de proteínas totales y GAGs no son comparables.

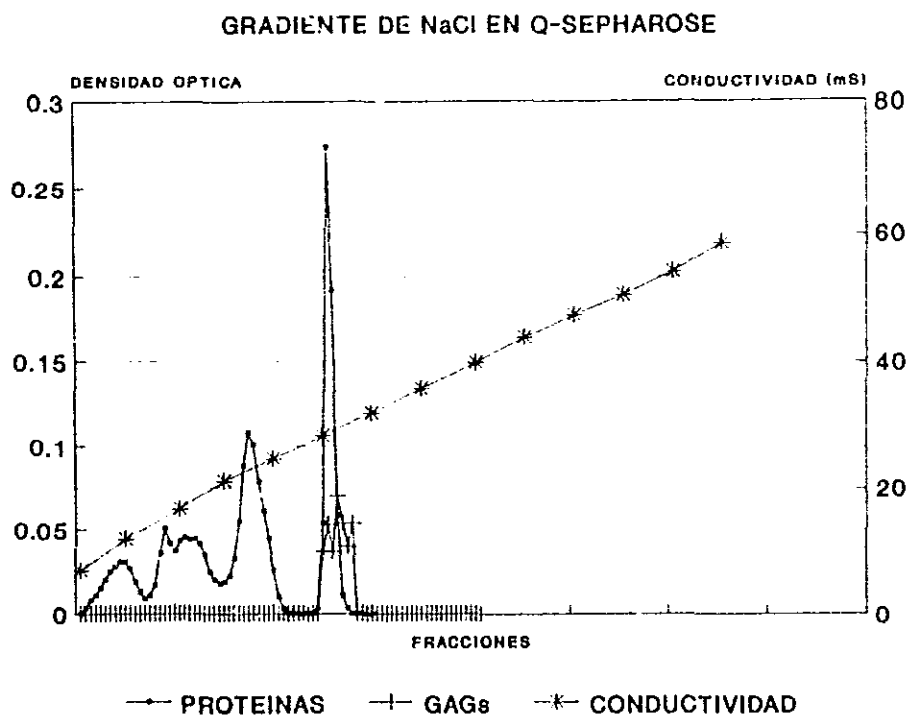


Fig. 8: Cromatograma construido con las lecturas de densidad óptica a 280 nm del eluyente de la columna de intercambio iónico (Q-Sepharose) y de las cuantificaciones de GAGs. Las magnitudes de los picos de proteínas totales y GAGs no son comparables.

SEPARACION EN GEL DE POLIACRILAMIDA: Los geles de poliacrilamida fueron teñidos por el método de Krueger (55). En las figuras 9 y 10 se ejemplifican dos etapas de tinción de un gel de acrilamida. Con azul alcian sólo, que tiñe a los glicosaminoglicanos, se obtiene un contraste muy débil (fig. 9). En cambio, cuando se tiñe el gel de poliacrilamida con azul alcian y plata amoniaca se obtienen bandas muy intensas (fig. 10), lo que se debe a que la plata se une al azul alcian mejorando notablemente el contraste. En el gel de la figura 10 puede notarse la polidispersidad característica de los proteoglicanos. En los carriles 3 y 4 se observa una zona teñida que de acuerdo a los marcadores de pesos moleculares está a la altura que se esperaba para la decorina, cuyo peso molecular es de 97,000 Da. Con esta misma tinción se observan algunas bandas tenues ubicadas por debajo del marcador de peso molecular de 98 kDa. Estas bandas, dadas su forma y peso molecular, pueden corresponder a proteínas. De hecho, en las condiciones en las que se desarrolló la tinción del gel, después de 10 minutos la plata amoniaca comienza a teñir a las proteínas. En relación a los GAGs, el resultado de esta electroforesis en gel de acrilamida estuvo de acuerdo a lo esperado, aunque no era posible asegurar aún que lo purificado hasta aquí era decorina.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT): Este método se emplea para separar e identificar moléculas inmobilizadas en

un soporte sólido. Se aprovecha la gran capacidad separadora de la electroforesis en poliacrilamida y la especificidad de los métodos inmunológicos. Se emplearon anticuerpos comerciales (Thelios Pharmaceuticals) contra decorina humana de membranas amnióticas desarrollados en conejo. Los resultados obtenidos se pueden apreciar en la figura 11. En el carril 1 se encuentra teñida una banda gruesa que corresponde por peso molecular a la decorina. Con este mismo anticuerpo específico se identifica a la misma altura en los carriles 5 y 7 que fueron cargados con muestras de pulmón humano, una banda con la polidispersidad característica descrita para los GAGs y varias bandas menores bien definidas que pudiesen corresponder a la porción protéica de la decorina parcialmente degradada.

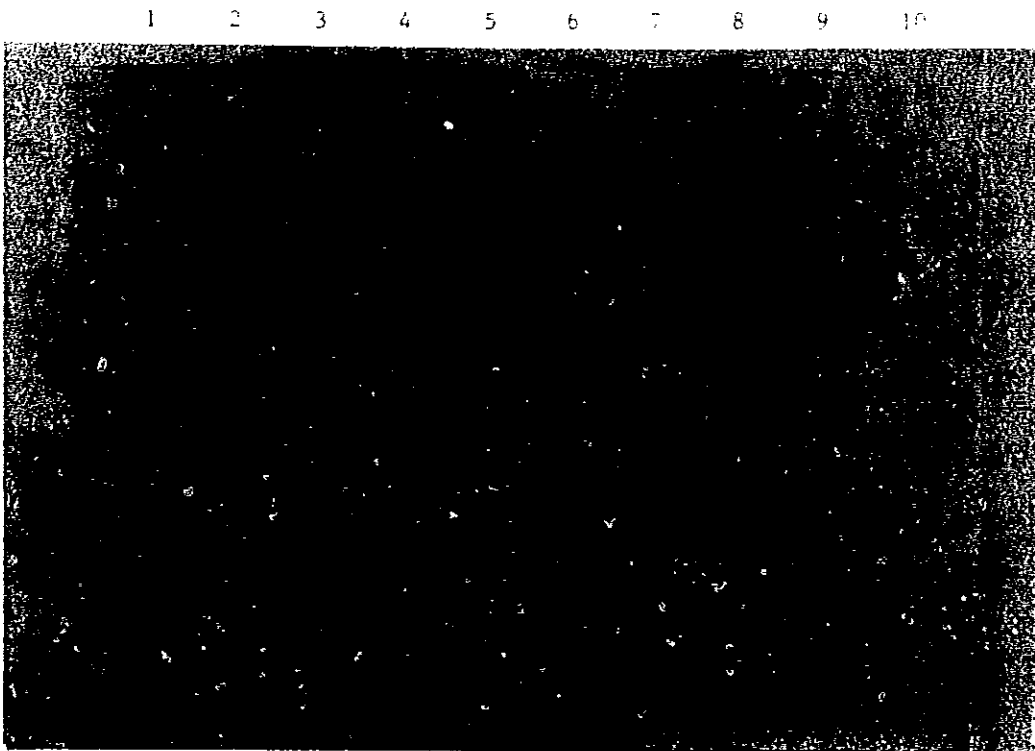


Fig. 9: Gel de poliacrilamida teñido con azul alcian para la detección de GAGs de acuerdo al método de Krueger (55). Como puede observarse, la coloración de las bandas es muy tenue.

Carril 1: Controles de peso molecular.

Carril 2: 2.5 µg de GAGs de un purificado de cartilago articular neonatal.

Carril 3: 12.5 µg de GAGs de la misma muestra del carril 2.

Carril 4: 18 µg de GAGs de la misma muestra del carril 2.

Carriles 5-6: Duplicado de una muestra de parénquima pulmonar humano purificado por DEAE-Sephacel. 5.2 µg de GAGs y 13.25 µg de proteínas totales/100 µl.

Carriles 7-9: Triplicado de una muestra de parénquima pulmonar humano purificado por DEAE-Sephacel diferente a el que se cargó en los carriles 5-6. 5.4 µg de GAGs y 13 µg de proteínas totales/100 µl.

Carril 10: Vacío.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Fig. 9: Gel de poliacrilamida teñido con azul alcian para la detección de GAGs de acuerdo al método de Krueger (55). Como puede observarse, la coloración de las bandas es muy tenue.

Carril 1: Controles de peso molecular.

Carril 2: 2.5 μ g de GAGs de un purificado de cartilago articular neonatal.

Carril 3: 12.5 μ g de GAGs de la misma muestra del carril 2.

Carril 4: 25 μ g de GAGs de la misma muestra del carril 2.

Carriles 5-6: Duplicado de una muestra de parénquima pulmonar humano purificado por DEAE-Sephacel. 5.2 μ g de GAGs y 13.25 μ g de proteínas totales/100 μ l.

Carriles 7-9: Triplicado de una muestra de parénquima pulmonar humano purificado por DEAE-Sephacel diferente a el que se cargó en los carriles 5-6. 5.4 μ g de GAGs y 19 μ g de proteínas totales/100 μ l.

Carril 10: Vacío.

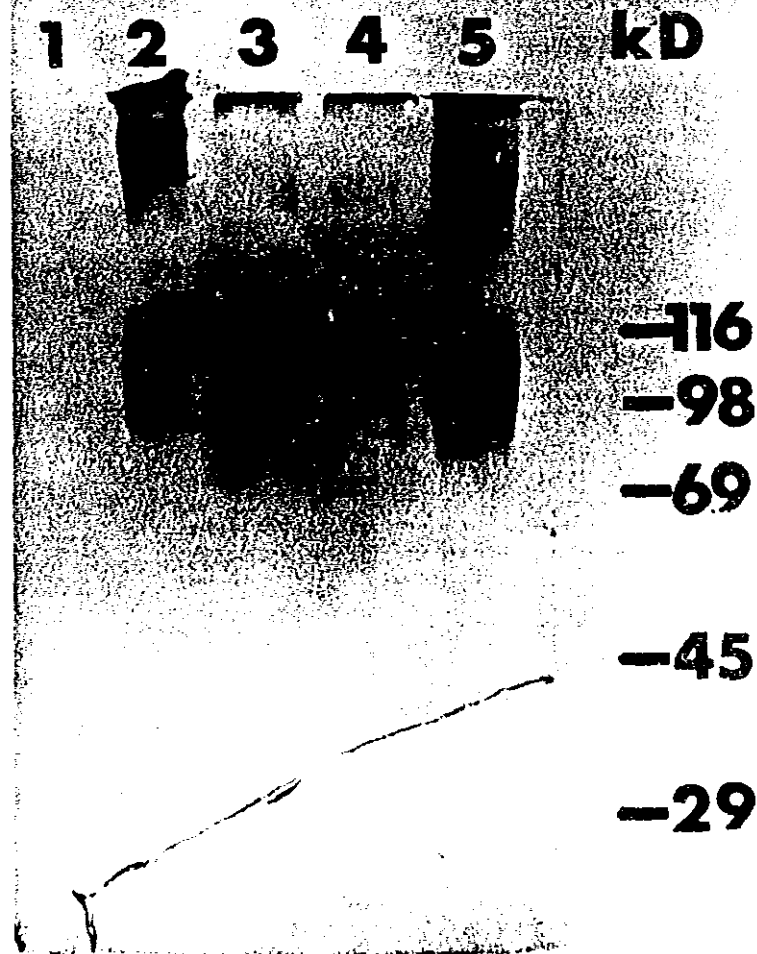


Fig. 10: Gel de poliacrilamida teñido con azul alcian/plata amoniacal para la detección de GAGs de acuerdo al método de Krueger (55).

Carril 1: Vacío.

Carril 2: Muestra de purificación de PGs pequeños de pulmón (DEAE-Sephacel). 10.0 μ g proteínas totales.

Carriles 3 y 4: Duplicado de muestra de parénquima pulmonar procesada con Q-Sepharose. (10.0 μ g proteínas totales).

Carril 5: Muestra del purificado de PGs pequeños de cartílago articular neonatal (10.0 μ g proteínas totales).

Los valores de PM aparecen anotados a la izquierda.

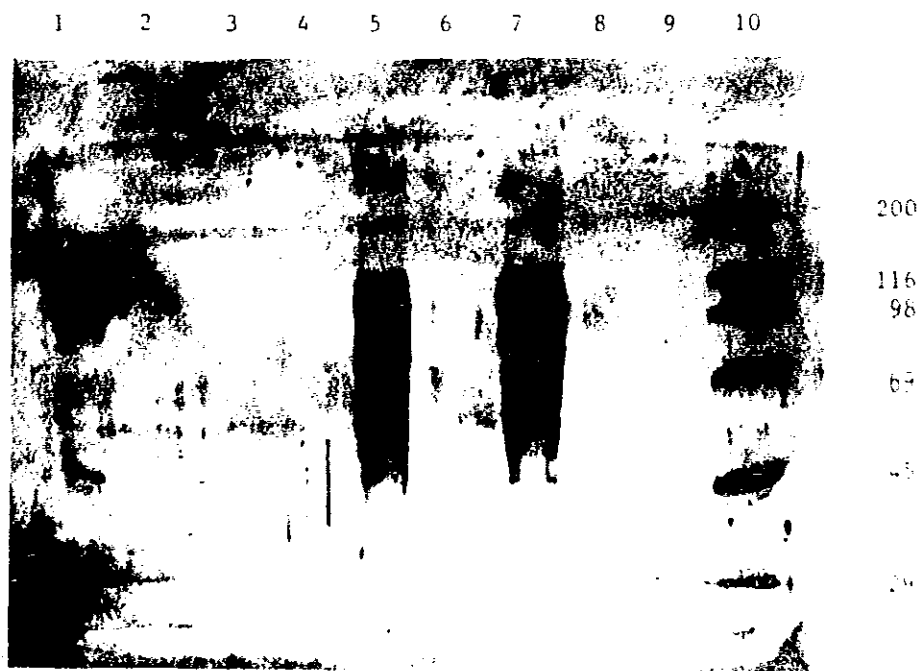


Fig. 11: Electroinmunotransferencia (Western Blot) revelada con el sistema de quimioluminiscencia de Amersham.

Carril 1: PGs pequeños de cartílago articular neonatal.

Carriles 2-4: Vacíos.

Carriles 5-8: muestras de purificado de pulmón humano después de la separación por Q-sepharose.

Carriles 5 y 7: GAGs 1.4 μ g, proteínas totales 8.0 μ g.

Carriles 6 y 8: GAGs 0.14 μ g, proteínas totales 0.8 μ g.

Carril 9: Vacío.

Carril 10: Marcador de PM. Este carril fue teñido por separado con azul coomassie y superpuesto en la autoradiografía para ser fotografiado.

V.- DISCUSION:

Los PGs están presentes prácticamente en todos los tejidos como componentes de la matriz extracelular y algunos de ellos forman parte de las membranas basales. Sin embargo, la síntesis y degradación, el contenido total, y las cantidades relativas de PGs varían dependiendo del tejido y de la etapa de desarrollo en que se encuentren (57). Estas moléculas contribuyen de diferentes maneras a las propiedades estructurales y mecánicas de los tejidos, y además se encuentran involucradas directamente en diversas funciones reguladoras como es el caso de la decorina.

El trabajo de investigación en PGs ha sido difícil debido a su naturaleza química. Poseen una alta densidad de cargas negativas en la porción de GAGs que las hace muy adhesivas. Por esta razón, cuando se intenta purificarlos, ocurre una gran pérdida de estas moléculas. Habitualmente, y dependiendo del material que se utilice, se adhieren en mayor o menor proporción a las paredes de los recipientes en los que se manejan; además, algunos PGs son capaces de autoagregarse como ocurre por ejemplo con el biglicano. Para superar esta dificultad, los métodos de extracción deben emplear condiciones disociativas que permitan mantener a los PGs en solución.

Otro problema importante deriva de que su porción protéica es degradable por proteasas de muy amplia especificidad, por lo que el empleo de inhibidores de proteasas es obligado. Por otro lado, la muestra de tejido debe manejarse

cuidadosamente, siempre a bajas temperaturas y a pH adecuado; se recomienda que este último sea ligeramente ácido, entre 5.0 y 6.5 con el objeto de evitar la activación de proteasas neutras y de proteasas ácidas lisosomales (51). Otra dificultad para el estudio de los PGs es la enorme variación que presentan en su peso molecular. Los PGs están compuestos de una proteína central que tiene peso molecular constante, y por un cierto número de cadenas laterales de GAGs que se encuentran unidas a la cadena protéica central. Sin embargo, las cadenas laterales de GAGs carecen de uniformidad en su longitud, lo cual se refleja en una inmensa variación en el peso molecular, esto es, su polidispersidad. Quizá la razón sea que la glicosilación de estas moléculas no se realice de manera uniforme, lo que necesariamente se refleja en diferencias en el peso molecular entre moléculas del mismo tipo, incluso aunque éstas procedan del mismo tejido. Por este motivo, cuando se analizan los PGs en geles de acrilamida teñidos apropiadamente, se puede observar que no forman bandas discretas, bien definidas, como las que se ven cuando la muestra es de proteínas, sino que se aprecian como una amplia zona teñida, de la cual, la parte central es considerada como representativa del peso molecular.

Otro problema para el estudio de estas moléculas es la ausencia de un marcador bioquímico que permita un seguimiento cercano (como es el caso de hidroxiprolina para las colágenas, o de las desmosinas para la elastina). Aún

cuando es posible aprovechar a los colorantes metacromáticos para la detección de la porción de GAGs, estas tinciones no son específicas.

Para desarrollar el presente trabajo se aprovecharon los antecedentes metodológicos existentes para la investigación de PGs en cartílago, en donde son particularmente abundantes. Sin embargo, es conveniente destacar que para las necesidades específicas del proyecto no existía ningún antecedente descrito para pulmón humano y el método que se siguió más de cerca fue el reportado por Van Kuppevelt y cols. (48).

La estrategia inicial de trabajo consistió básicamente en los siguientes pasos:

- 1.- Disección y lavado del tejido.
- 2.- Homogenado y lavado tisular.
- 3.- Solubilización de los componentes de la matriz extracelular con un agente desnaturizante.
- 4.- Separación de los PGs por diferencias en densidad de flotación.
- 5.- Separación de PGs de la muestra por cromatografía de intercambio iónico.
- 6.- Identificación de decorina mediante métodos inmunológicos.

Diferentes agentes desnaturizantes de proteínas han sido empleados para solubilizar PGs, algunos de ellos son el cloruro de calcio (CaCl_2), cloruro de magnesio (MgCl_2), y clorhidrato de guanidina. El que hasta ahora ha dado mejores

resultados es el ClHGu pues es capaz de disociar PGs y otros componentes de la matriz extracelular, y además puede desunir estructuras agregadas de PGs (14,58). Esto permite que algunos PGs salgan por difusión de los tejidos, como por ejemplo, PGs desagregados, proteínas de unión, y hasta ácido hialurónico. Por estas razones este agente desnaturalizante fue elegido para este trabajo, donde se empleó a una concentración de 4.0 M., la cual demostró ser la más adecuada en trabajos experimentales previos que se realizaron en tejido cartilaginoso. La razón es que a esta concentración se rompen la mayoría de los enlaces intermoleculares. A concentraciones menores el efecto desnaturalizador del ClHGu es menor y la extracción menos eficiente. Curiosamente, a mayores concentraciones el rendimiento puede ser menor y aunque no está claro el por qué, podría ser consecuencia de alteraciones en la red de colágenas como resultado de la desnaturalización (51).

Para extraer PGs de matriz extracelular es necesario que los fragmentos de tejido sean del menor tamaño posible; de esta manera se disminuye la distancia que debe difundir el agente desnaturalizante para llegar al PG, así como la distancia que tiene que difundir el PG para salir del fragmento de tejido. Esto repercute también en el tiempo de extracción, pues mientras más rápida sea la difusión más corto será el tiempo de exposición de los PGs a enzimas degradativas.

El riesgo de degradación enzimática se disminuye al trabajar a bajas temperaturas, pero principalmente mediante el uso de

inhibidores enzimáticos. Los que se emplearon en este trabajo incluyeron a inhibidores de serín proteasas como fluoruro de fenilmetilsulfonilo y de metaloproteinasas como la sal tetrasódica del ácido etilen-dinitrilo-tetraacético. Asimismo, se utilizaron el leupeptín para inhibir serín y cisteín proteasas y al pepstatín el cual inhibe aspartato proteasas. El pH del medio de extracción también es importante para el control de la actividad enzimática pues a pH de 5.8 la actividad de proteasas ácidas lisosomales es muy baja así como la actividad de proteasas neutras.

Por otro lado, es importante que la relación entre la cantidad de tejido y el volumen de solución de extracción sea la adecuada para obtener un buen rendimiento, por ejemplo: para tejido conjuntivo denso como el cartílago, se requieren diez volúmenes del agente de extracción, pero para tejido más laxo como aorta, membrana basal, estroma de córnea, etc. son suficientes cinco volúmenes del reactivo para una extracción óptima (51). En el método descrito en este trabajo, se encontró que para pulmón humano, la relación de 1:7 es adecuada. Inicialmente se utilizó de manera exploratoria una relación 1:2. Sin embargo, la viscosidad que alcanzó la mezcla de la solución de extracción con el homogenado de parénquima pulmonar fue tan alta que no fue posible obtener separación alguna en el gradiente de densidad de ClCs. Fué necesario aumentar el volumen total de la mezcla hasta obtener una relación 1 a 7, para conseguir una viscosidad que permitiera continuar el

trabajo. La separación por centrifugación del material insoluble redujo el volumen de la muestra soluble (sobrenadante) a 280 ml.

Para separar los PGs pequeños de los PGs grandes y de las proteínas solubilizadas, la muestra se sometió a un gradiente de densidad construido con cloruro de cesio (ClCs) en ultracentrífuga (51).

Las sales de cesio forman espontáneamente gradientes de concentración cuando son sometidas a grandes fuerzas angulares, lo que ocurre con la centrifugación, y esta diferencia en concentración se refleja en diferencias en la densidad de la solución. Por otro lado, los proteoglicanos, por la alta densidad de cargas negativas que tienen en sus GAGs (en particular si el grado de sulfatación es elevado), se unen a un gran número de iones de cesio, y como consecuencia de esta asociación, los PGs adquieren una alta densidad de flotación, la cual es directamente proporcional a su electronegatividad, no a su tamaño. Si a una mezcla de PGs se le adiciona ClCs, como se hizo en este estudio, y después se somete a ultracentrifugación, los PGs migran en el gradiente hacia la zona de densidad a la cual flotan. Las proteínas, por otro lado, debido a que no tienen una densidad de cargas tan grande como los PGs, sólo son capaces de unirse a pequeñas cantidades de iones de cesio y alcanzan densidades de flotación menores. De esta manera, migran a la zona de menor densidad. En las condiciones del método que aquí se describe, la mayoría de las proteínas solubilizadas

en la muestra se concentraron en la zona del menisco, en la cual formaron una película de una consistencia tal, que en algunos tubos pudo ser extraída con pinzas. Las moléculas de la muestra permanecen en su zona de flotación mientras no se perturbe el gradiente. Por esta misma razón cuando el gradiente se corre a temperatura menor a la del ambiente, la separación de las zonas de diferente densidad (fraccionamiento del gradiente) se debe realizar con rapidez para evitar que por cambios de temperatura se generen corrientes por convección que puedan distorsionar el gradiente.

Este método de separación por densidad de flotación que emplea al ClCs, es ampliamente utilizado porque tiene al menos las siguientes ventajas sobre otros procedimientos (54):

- Permite manejar grandes volúmenes de muestra.
- Elimina la necesidad de un aparato para la formación de gradientes.
- La separación no está basada en el tamaño de las moléculas, así, todas aquellas de alta densidad pueden ser separadas aún cuando haya moléculas de alto peso molecular pero baja densidad de flotación en la solución.
- El ClCs puede ser adicionado en forma sólida, eliminándose así los problemas generados por dilución de la muestra.

Sin embargo, es necesario tener algunos cuidados en su manejo: cuando se usan altas concentraciones de ClCs existe el riesgo de que la sal forme precipitados en la zona de más alta densidad del gradiente y si ésto llega a ocurrir, el gradiente se perturba. En trabajo experimental previo realizado en nuestro laboratorio se demostró que ésto no ocurriría en las condiciones establecidas para este método (cantidad de ClCs, velocidad angular, tiempo, temperatura). El ajuste de la densidad con ClCs es un proceso laborioso, debido a que no hay manera de calcular con exactitud la cantidad de ClCs que va a dar una densidad específica. Esto se debe por una parte a la interacción de los GAGs con el cesio y por otra a que el ClHGu también lo hace de alguna manera con el ClCs; el ajuste, por lo tanto, debe hacerse siempre de manera individual para cada corrida. En este trabajo se comenzó con una cantidad aproximada, determinada experimentalmente, y poco a poco se fue acercando hasta llegar a la densidad adecuada, siguiendo por pesaje el incremento de densidad que se fue logrando. Simultáneamente se fue agregando ClHGu para mantener la concentración de esta sal en 4.0 M, pues la adición del cesio aumentaba el volumen de la muestra. En el ejemplo que se presenta en la sección de métodos, el volumen inicial de la muestra se incrementó 18.4% una vez que se ajustó la densidad. Por otro lado, la disolución de ClCs no es rápida pues se trabaja a 4°C y la concentración de ClHGu es muy elevada; además, la viscosidad de la muestra es alta por la gran

cantidad de macromoléculas disueltas. Todo esto contribuye a que el proceso de disolución sea lento. El ajuste de densidad debe ser preciso y para conseguirlo se requirieron de 24 a 48 hrs.

Si la centrifugación se realiza con cabezal de ángulo fijo, el gradiente se forma más rápidamente que en cabezal de columpio. En cambio este último, que fue el que se utilizó en nuestro estudio, tiene la ventaja de que una vez formado el gradiente, este no sufre modificaciones. Se debe tener la precaución de que al concluir el tiempo de la corrida, la disminución de la velocidad se haga lentamente para evitar la perturbación del gradiente. Asimismo, es necesario impedir que el ClCs entre en contacto con metales (tapones de los tubos, cabezal, etc.), pues puede haber corrosión, con el consiguiente daño para el equipo.

En el método de purificación de decorina que se describe aquí, la densidad inicial (antes de comenzar la centrifugación) de la solución se ajustó con ClCs a 1.4 g/ml, pues es la densidad a la que flotan los PGs pequeños. Una observación en este paso fue que simultáneamente con el proceso de disolución del ClCs se formaron agregados de tamaño visible, y algunos de ellos flotantes. Por este motivo, para clarificar la solución antes de proceder a la centrifugación, se filtró todo el material de la muestra. A continuación se procedió a centrifugar la muestra y a fraccionar el contenido de los tubos.

Cuando se intentó cuantificar los GAGs en estas fracciones usando la medición del ácido urónico se encontró que el color de la reacción no era el rosa esperado. Por esta razón, y basados sólo en la suposición de que los PGs pequeños de parénquima pulmonar no fuesen muy diferentes de sus análogos de cartílago, se decidió continuar la purificación con aquellas fracciones que tenían una densidad de alrededor de 1.4 g/ml.

Posteriormente se procedió a separar las macromoléculas disueltas en la muestra por columna de intercambio iónico.

Sin embargo, antes fue necesario realizar el cambio de agente desnaturizante. Esto se debió a que el ClHGu es capaz de interaccionar con las resinas de intercambio iónico, pero no así la urea. Esta es un agente desnaturizador de proteínas pero no es tan eficiente como el ClHGu para solubilizar los PGs cuando éstos están asociados a los otros componentes de la matriz extracelular en el tejido. Sin embargo, la urea es capaz de evitar la reasociación de PGs una vez que estas moléculas se encuentran en solución. El hecho de que no interaccione con resinas de intercambio iónico, hace a la urea el agente desnaturizante más adecuado durante la parte de este método en el que se emplean resinas de intercambio iónico (51). Así, previo a la cromatografía, se cambió el ClHGu por ureapor medio de una diálisis.

Inicialmente, y de acuerdo al reporte de van Kuppevelt y cols (48) se utilizó DEAE en un soporte de celulosa. Esta

resina ha sido utilizada extensamente en la purificación de proteoglicanos de cartílago donde produce muy buenos rendimientos. Sin embargo, los resultados en parénquima pulmonar humano no fueron buenos, dado que no se obtuvo una buena separación entre PGs y proteínas.

Esto originó la principal modificación en este trabajo, la cual consistió en el empleo de Q-Sepharose en lugar de DEAE-Sepharcel. La Q-Sepharose es una resina que tiene un amonio cuaternario $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ como grupo funcional y que es capaz de unirse con mayor fuerza que DEAE-sephacel a las moléculas electronegativas de una muestra. La consecuencia de esto es que se requieren condiciones mucho más drásticas para desprender a las macromoléculas de la resina lo que sólo se puede alcanzar cuando la concentración del ión contrario es mayor. Si el incremento de concentración del ión contrario se realiza en forma de gradiente continuo, se requiere del paso de un mayor volumen del buffer por la columna para que se desprendan dos especies moleculares de diferente fuerza de unión a la resina. Esto significa que se amplifica la separación las diferentes especies moleculares.

Por su naturaleza, los GAGs y por consecuencia los PGs son muy electronegativos, más que las proteínas. Esta característica es aprovechada en este método para separar PGs de las proteínas presentes en la muestra.

Bajo las condiciones empleadas, los resultados obtenidos fueron buenos, aunque dadas las propiedades de esta nueva resina es posible pensar que si se realizan algunas

modificaciones, los resultados podrían mejorar significativamente. Por ejemplo, con el objeto de evitar o por lo menos disminuir la formación de agregados y mejorar así el rendimiento desde los pasos iniciales de la purificación, se podría trabajar la muestra en buffers que tengan una mayor concentración de NaCl. Esto es factible gracias a que la resina de Q-Sepharose es un atrapador más fuerte de biomoléculas que DEAE y por lo tanto se necesitan mayores concentraciones de NaCl para separar los GAGs unidos a la resina.

En este trabajo por ejemplo, se aprovechó el hecho de que el pico en que se puede demostrar la presencia de GAGs eluye de la columna de Q-Sepharose en el intervalo de concentración de NaCl 0.9-0.98 M, mientras que de la columna de DEAE-Sepharose eluyó en el intervalo de concentración de NaCl de 0.36 a 0.6 M.

Esta ventaja de Q-Sepharose permitiría que en lugar de empezar el gradiente desde una concentración de NaCl de 0.1 M, se podría empezar con buffer que tenga NaCl 0.7 M., o hasta 0.8 M.

Otra buena herramienta para el estudio de los PGs la constituyen los métodos inmunológicos. Sin embargo, la naturaleza de los PGs no hace fácil su manejo, debido fundamentalmente a que como molécula completa no son buenos inmunógenos. Esta característica complica la obtención de anticuerpos (13), principalmente por 4 razones:

1) La poca complejidad de las cadenas de GAGs, las que además son lineales.

2) Los GAGs son ubicuos.

3) Existe una gran conservación evolutiva de los PGs.

4) La inaccesibilidad de la proteína central por el impedimento estérico que la(s) cadena(s) de GAGs producen.

Sin embargo, se ha observado que si mediante el uso de enzimas se les quitan las cadenas laterales de glicosaminoglicanos, la porción protéica con un pequeño muñón de GAGs es muy inmunogénica. De esta manera se pueden obtener buenos anticuerpos en algunos casos (13). En el método que se describe en este estudio se emplearon anticuerpos comerciales anti-cadena central de decorina humana con buenos resultados. Con la utilización de la electroinmunotransferencia se observó la presencia de una banda a la altura del peso molecular esperado para decorina que es de 97 kDa, similar a la observada en la muestra de cartílago. Sin embargo, se identificaron otras moléculas de menor PM lo que pudiera deberse a degradación parcial.

En conclusión, el método descrito en este trabajo es útil para la purificación de PGs de bajo peso molecular, en particular del Proteoglicano PG-40 o Decorina.

VI.- APENDICES:

APENDICE A : ABREVIATURAS

ClCs	:	Cloruro de cesio.
ClHG _u	:	Clorhidrato de guanidina.
DEAE	:	Dietil amino etil celulosa.
EDTA	:	Sal tetrasódica del ácido etilen-dinitrilo-tetraacético.
FPI	:	Fibrosis pulmonar idiopática.
GAGs	:	Glicosaminoglicanos.
kDa	:	Kilodalton.
nm	:	Nanometro.
PBS	:	Solución salina amortiguada con fosfatos.
PGs	:	Proteoglicanos.
PMSF	:	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo.
SDS	:	Sulfato de dodecilo de sodio.
TGF- β	:	Factor transformante de crecimiento tipo β .
TIMP	:	Inhibidor tisular de metaloproteinasas.

APENDICE B : REACTIVOS

Reactivo	Marca
ClCs	Accurate
ClHGu	Sigma
Urea	Serva
Azul de dimetil metileno	Serva
Azul alcian	Sigma
Carbazol	Eastman
Borato de sodio	B.D.H.
Acido sulfúrico	B.D.H.
Acido acético	B.D.H.
Acido clorhídrico	B.D.H.
Acido tricloracético	B.D.H.
Hidróxido de sodio	B.D.H.
Etanol	B.D.H.
Metanol	B.D.H.
Glicina	B.D.H.
Cloruro de sodio	B.D.H.
Nitrato de plata	B.D.H.
Glutaraldehido	B.D.H.
Glucuronato monohidratado	Corn Products
Reactivo para cuantificar proteínas totales	Bio Rad
Resinas y geles cromatográficos	Pharmacia
Acrilamida	Bio Rad
Bis acrilamida	Bio Rad
TEMED	Bio Rad
Persulfato de amonio.....	Bio Rad

Membranas para transferencia Tipo: PVDF

Tamaño de poro: 0.45 UM Millipore

Anticuerpos anti-decorina.....Telios Pharmaceuticals

Todos los demás reactivos empleados eran de pureza grado analítico o la mejor disponible, todos eran de B.D.H. Chemicals, Toronto, Canada.

APENDICE C : EQUIPO

Aparato	Marca	Modelo
Bomba de vacío	Sargent Welch	8816
Ultracongelador	Forma Scientific	Bio Freezer
Cámara de secado al vacío	Pyrex	Sleeve Top
Homogenizador de tejido	Sorvall	Omni
Agitador magnético	Thermolyne	Nuova II
Centrífuga preparativa	Beckman	JA-21
Cabezal	Beckman	JA-10
Ultracentrífuga	Beckman	L8-55M
Cabezal	Beckman	SW-28
Bombas peristálticas	Pharmacia	P-3
	Gilson	Mini Plus 3
Colector de fracciones	LKB-Bromma	2112 Redirac
Balanza analítica	Mettler	H1-52
Micropipetas	Gilson	Pipetteman
Espectrofotómetro	Perkin-Elmer	Lambda 2

Columnas cromatográficas	Pharmacia	varios
Monitor cromatográfico	LKB-Bromma	2138 Uvicord S
Mezclador de gradientes	Pharmacia	GM-1
Conductímetro	Hanna Instruments	HI-8733
Potenciómetro	Corning	240
Celdas electroforéticas	Bio-Rad	Protean II

(Gel standard: 16 cm X 10 cm x 1.2 mm)

Bio-Rad Mini-ProteanII

(Minigeles (9.4 cm X 8.3 cm X 0.7 mm)

Celda para transferencias	Bio-Rad	Trans blot cell
Fuente de poder	Bio-Rad	200/2.0
Agitador horizontal	Baxter	S/P Rotator V
Secador de Geles	Bio-Rad	224
Balanza granataria	Ohaus	Harvard Trip
Agitador de vórtice	VWR	Vortexer 2
Bloque caliente	VWR	Heat-block
Liofilizadora	Labconco	Freeze dryer 5

VII.- BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Selman, M., Montaña, M., Ramos, C., Chapela, R. Concentration, biosynthesis and degradation of collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. 1986; Thorax. 41: 355-359.
- 2.- Davidson, J. M. Biochemistry and turnover of lung interstitium. J. Eur. Respir. 1990; 3: 1048-1068.
- 3.- Specks U, Nerlich A, Colby T, Wiest I, Timpl R: Collagen type VI expression in pulmonary fibrosis. Am Rev Respir Dis 145:A840, 1992.
- 4.- Clark, J. G. The molecular pathology of pulmonary fibrosis. En: Connective tissue disease: Molecular pathology of the extracellular matrix. eds. Uitto, J., Perejda, A.J. Ed. Marcel Dekker Inc. N. Y. 1989; 12: 336-337.
- 5.- Davidson, J.M. Elastin: Structure and Biology. En: Connective tissue disease: Molecular pathology of the extracellular matrix. eds. Uitto, J., Perejda, A.J. Ed. Marcel Dekker Inc. N. Y. 1989; 12: 29-54.
- 6.- Lowry, O.H., Gilligan, D.R., Katersky, E.M. The determination of collagen and elastin in tissues with results obtained in various normal tissues from different species. J. Biol. Chem. 1947; 139: 795.

7.- Partridge, S.M., Davis, H.F., Adair G.S. Soluble proteins derived from partial hydrolysates of elastin. Biochem. J. 1955; 61: 11.

8.- Burgeson, R.E., Morris, N.P. The collagen family of proteins. En: Molecular pathology of the extracellular matrix. eds. Uitto,J., Perejda, A.J. Ed. Marcel Dekker Inc. N. Y. 1989; 12: 3-28.

9.- Silbert, J. Advances in the biochemistry of proteoglycans. En: Connective tissue disease: Molecular pathology of the extracellular matrix. eds. Uitto,J., Perejda. Ed. Marcel Dekker Inc. N. Y. 1989; 12: 83-98.

10.- Muir, H., en: The Seventeenth CIBA Medal Lecture. Biochemical Society Transactions. 15 de Julio de 1982. Oxford, U.K.

11.- Brown, D.C., Vogel, K.G. Characteristics of the *in vitro* interaction of a small proteoglycan (PGII) of bovine tendon with type I collagen. Matrix. 1989; 236: 468-478.

12.- Gallagher, J.T., Lyon, M., Steward, W.P. Structure and function of heparan sulphate proteoglycans. Biochem. J. 1986; 236: 313-325.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

13.- Ruoslahti, E. Structure and biology of proteoglycans. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 1988; 4: 229-255.

14.- Sajdera, S.W. and Hascall, V.C. Proteinpolysaccharide complex from bovine nasal cartilage. A comparison of low and high shear extraction procedures. *J.Biol.Chem.* 1969; 244: 77-87.

15.- Muir, H. The nature of the link between protein and carbohydrate of a chondroitin sulphate complex from hyaline cartilage. *Biochem. J.* 1958; 69: 195-204.

16.- Heinegard D., Sommarin Y. Proteoglycans: An overview. *Methods in Enzymology.* 1987;144: 327-338.

17.- Heinegård, D., Paulsson, M. Structure and metabolism of proteoglycans. En: *Extracellular matrix biochemistry.* eds. Piez, K.A., Reddi A.H. Ed. Elsevier, New York, 1984; pp 277-328.

18.- Hascall, V.C. Interaction of cartilage proteoglycans with hyaluronic acid. *J. Supramol. Struc.* 1977; 7: 101-120.

19.-De Luca, S., Caplan, A.I., Hascall, V.C. Biosynthesis of proteoglycans by chick limb bud chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 1978; 253: 4713-4720.

20.- Telser, A., Robinson, H.C., Dorfman, A. The biosynthesis of chondroitin-sulfate protein complex. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 1965; 52: 912-919.

21.- Telser, A., Robinson, H.C., Dorfman, A. The biosynthesis of chondroitin sulfate. *Arch. Biochem. Biophys.* 1966; 116: 458-465.

22.- Silbert, J.E., Reppucci, A.C. Jr. Biosynthesis of chondroitin sulfate. *J. Biol. Chem.* 1976; 251: 394-3947.

23.- Fluharty, A. L.: "Diseases of glycosaminoglycan and proteoglycan metabolism". En: "Connective tissue disease". eds. Uitto/Perejda Ed. Marcel Dekker Inc., New York. 1989. 22: 491-521.

24.- Schiller, S., Mathews, M.B., Cifonelli, J.A., Dorfman, A. The metabolism of mucopolisaccharides in animals. *J. Biol.Chem.* 1956; 218: 139-145.

25.- Davidson, E. A. Metabolism in vivo of connective-tissue mucopolisaccharides. *Biochim. Biophys. Acta.* 1963; 69: 453-458.

26.- Boström, H. On the metabolism of the sulfate group of chondroitinsulfuric acid. *J. Biol. Chem.* 1956; 196: 477-481.

27.- Silbert, J. E., Nagai, Y., Gross, J. Hyaluronidase from tadpole tissue. J. Biol. Chem. 1965; 240: 1509-1511.

28.- Weissmann, B., J. The transglycosylative action of testicular Hyaluronidase. J. Biol. Chem. 1955; 216: 783-794.

29.- Glaser, J. H., Conrad, H.E. Chondroitin SO₄ catabolism in chick embryo chondrocytes. J. Biol. Chem. 1979; 254: 2316-2325.

30.- Tsaltas, T.T. Papain-induced changes in rabbit cartilage. J. Exp. Med. 1958; 108: 507.

31.- Woessner, J. F. Jr. Cartilage cathepsin D and its action on matrix components. Fed. Proc. 1973; 32: 1485-1488.

32.- Yurt, R. W., Leid, R. W., Austen, Silbert, J. E. Native heparin from rat peritoneal mast cells. J. Biol. Chem. 1977; 252: 518-521.

33.- Matrisian, M.S., y Bowden, G.T. Stromelysin/ transin and tumor progression. Seminars in Cancer Biology. 1:107-115. 1990.

34.- Schmid, K., Grundboeck-Jusco, J., Kimura, A., Tschopp, F.A., Zollinger, R., Binette, J. P., Lewis, W., Hayashi, S. The distribution of the glycosaminoglycans in the anatomic

components of the lung and the changes in concentration of these macromolecules during development and aging. *Biochem. et Biophys. A.* 1982; 716: 178-187.

35.- Konno, K., Arai, H., Motomiya, M., Nagai, H., Ito, M., Sato, H., Satoh, K. A biochemical study of glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) in emphysematous and in aged lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1982; 126: 797-801.

36.- Masuda, H., Oseki, T., Takazono, I., Tanaka, Y. Tissue content of glycosaminoglycans in the diffuse idiopathic interstitial fibrosis patient. *Am. J. Med. Sci.* 1988; 295 (6): 507-512.

37.- Roberts, C. R., Paré, P. D.: "Composition changes in human tracheal cartilage in growth and aging, including changes in proteoglycan structure". 1994 (en prensa).

38.- Laros, C.D., Kuyper, C.M.A., Janssen, H.M.J.: The chemical composition of fresh human lung parenchyma. *Respiration.* 1972; 29: 458-467.

39.- Sahu, S., y Williams, L. Hyaluronic acid in the pulmonary secretions of patients with alveolar proteinosis. *Inflammation,* 1978; 3(2): 149-158.

40.- Vogel, K.G., Paulsson, M., Heinegård, D. Specific inhibition of type I and II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem. J.* 1984; 223: 587-597.

41.- Scott, J.E., Orford, C. R. Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the d band in the gap region". *Biochem. J.* 1981; 213-216.

42.- Pringle, G.A., Dodd, C. M. Immunoelectron microscopic localization of the core protein of decorin near the d and e bands of tendon collagen fibrils by use of monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 1990; 38: 1405-1411.

43.- Nogami, H., Oohira, A. Defective association between collagen fibrils and proteoglycans in fragile bone of osteogenesis imperfecta. *Clin. Orthopaed. Rel. Res.* 1988; 232: 284-291.

44.- Yamaguchi, Y., Mann, D. M., Ruoslahti, E. Negative regulation of transforming growth factor by the proteoglycan decorin. *Nature* 1990; 346: 281-284.

45.- Sporn, M. B., Roberts, A. B. eds. Peptide growth factors and their receptors. Ed. Springer-Verlag. 1990; 8.

46.- Border, W.A., Okuda, S., Languino, L. R., Ruoslahti E. Transforming growth factor-Beta regulates production of proteoglycans by mesangial cells. *Kidney International*. 1990; 37: 689-695.

47.- Yamaguchi, Y., Ruoslahti, E. Expression of human proteoglycan in chinese ovary cells inhibits cell proliferation. *Nature*. 1988; 336: 244-246.

48.- Van Kuppevelt T.H.M.S.M., Janssen H.M.J., Van Beuningen H.M., Cheung K.S., Schijen M.M.A., Kuyper Ch.M.A., Veerkap J.H. Isolation and characterization of a collagen fibril-associated dermatan sulphate proteoglycan from bovine lung. *Biochimica et Biophysica Acta* 1987; 926: 296-309.

49.- Roberts C.R.: Comunicación personal.

50.- Hudson, L., Hay, F.C. Apéndice I en: *Practical Immunology*. Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, pag. 336. 1980.

51.- Heinegard, D. Sommarin, Y. Isolation and characterization of proteoglycans. *Methods in enzymology*. 1987; 144: 319-372.

52.- Scopes, R.K.: Protein Purification - Principles and practice. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin. 1986; 248-250.

53.- Bitter, T., Muir, H.M.: A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem. 1962; 4: 330-334.

54.- Carney S.L. Proteoglycans. En: Carbohydrate analysis: a practical approach. ed. Chaplin M.F. Ed. IRL Press Limited. Oxford. Washington D.C. 1986; 4: 97-141.

55.- Krueger R.C. Jr., Schwartz N.B. An improved method of sequential alcian blue and amoniactal silver staining of chondroitin sulfate proteoglycan in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry. 1987; 167: 295-300.

56.- Pardo, A., Ramírez, R., Gutiérrez-Kobeh, L., Mendoza, F., Bauer, E., Selman, M. Purification of a procollagenase-activator present in medium of cultured guinea pig carrageenin granuloma. Conn. Tiss. Res. 1991; 26: 259-269.

57.- Bianco P., Fisher L.W., Young, M.F., Termine, J.D. Gerhon, R.P. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. J. Histochem. Cytochem. 1990; 38(11): 1549-1563.

58.- Beeley, J.G. Glycoprotein and proteoglycan techniques.
En: Laboratory techniques in biochemistry and molecular
biology. eds. Burdon, R.H. y Knippenberg, P.H. Ed. Elsevier
Science Publishers B.V. (Biomedical Division) Holanda, 1989.