

76



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO

CAMPUS "IZTACALA"

Evaluación de dos métodos para la determinación de
colágena con el empleo del colorante Rojo Sirio.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

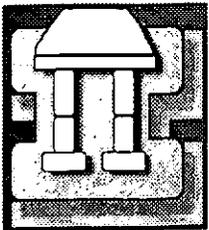
B I Ó L O G O

P R E S E N T A

ALFONSO MARTÍNEZ FLORES

291673

Dir. DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN



IZTACALA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO 2001



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.

U N A M
E N E P I Z T A C A L A

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología del Desarrollo de la Unidad de Morfología y Función del campus Iztacala, bajo la dirección del Doctor en Ciencias Luis Arturo Baiza Gutman.

Durante la realización de este trabajo, el autor fue becario del programa **PAPIIT-DGAPA**, a quien agradece su apoyo financiero a través del proyecto **IN212400**.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman por haber dirigido esta tesis, por toda su paciencia y dedicación y sobre todo por compartir conmigo parte de sus conocimientos e impulsarme para seguir mi formación como investigador.

A mis sinodales por sus acertados comentarios y sugerencias, que contribuyeron en la realización del presente trabajo: Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, Dr. Martín Palomar Morales, Dr. Jorge Campos Contreras, M en C. Rodolfo Cárdenas Reygadas y M en C. Margarita Canales Martínez.

A mis amigos del Laboratorio de Biología del Desarrollo; Guadalupe Martínez y Carmen Álvarez, gracias por compartir su tiempo y conocimientos, por toda su ayuda, confianza y amistad.

DEDICATORIA

A Dios por haberme dado el don de la vida, y por ser mi guía espiritual en ella.

Con cariño para mi madre por el apoyo que me ha dado siempre y por haber aceptado el compromiso de criarme y educarme.

A cada uno de los miembros de mi familia, Elsa, Maria, Rosario, Elizabeth y Diana Karen, gracias por su tolerancia y comprensión.

Con todo mi amor, respeto y admiración para la Bióloga Deyamira Matuz Mares, que ha estado a mi lado brindándome su apoyo de manera incondicional.

A mis amigas Silvana Pertuz Belloso y Emelia Campoy Otero, gracias por compartir su amistad y confianza y por todos los momentos de alegría.

Para mi amigo de toda la vida el Medico Cirujano S. Molina Román y a su apreciable familia.

A todos y cada uno de los maestros de la carrera que contribuyeron a mi formación como Biólogo, especialmente a los maestros de estadística, Ángel Durán y Agustin Vargas; a los maestros de Biología Celular-Bioquímica y Genética, Roberto Velasco y Elías Piedra y Margarita Canales de Fisicoquímica.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
OBJETIVOS.....	9
METODOLOGIA.....	10
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	12
RESULTADOS.....	13
PREPARACIÓN Y ADSORCIÓN DE LA COLÁGENA.....	13
UNION DE COLÁGENA CON ROJO SIRIO EN FASE SÓLIDA.....	13
UNION DE COLÁGENA CON ROJO SIRIO EN SOLUCION.....	13
EFFECTO DE Ca ²⁺ Y Mg ²⁺ SOBRE LA UNION COLÁGENA- ROJO SIRIO.....	16
DESNATURALIZACION DE COLÁGENA Y UNION CON ROJO SIRIO.....	18
SELECTIVIDAD DEL ROJO SIRIO.....	18
DISCUSION.....	22
CONCLUSIONES.....	27
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	28

INDICE DE FIGURAS

1. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ROJO SIRIO.....	5
2. RELACION ENTRE EL CONTENIDO DE COLÁGENA Y LA UNION DEL ROJO SIRIO EN FASE SÓLIDA.....	14
3. RELACION ENTRE EL CONTENIDO DE COLÁGENA Y LA UNION DEL ROJO SIRIO EN SOLUCION.....	14
4. EFECTO DEL SOLVENTE EN LA UNION DEL ROJO SIRIO A LA COLÁGENA INSOLUBLE TIPO I EN SOLUCION.....	15
5. EFECTO DE Ca^{+2} y Mg^{+2} SOBRE LA UNION DEL ROJO SIRIO A COLÁGENA SOLUBLE EN SOLUCION.....	17
6. RELACIÓN ENTRE LOS VALORES RECÍPROCOS DE LA CONCENTRACIÓN DE COLÁGENA Y LA ABSORBENCIA A 540NM.	17
7. UNION DE ROJO SIRIO A COLÁGENA DESNATURALIZADA Y NATIVA.....	19

INDICE DE CUADROS

1. MUTACIONES EN LOS GENES DE LA COLÁGENA Y DEFICIENCIAS EN LAS ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS INVOLUCRADAS EN SU PROCESAMIENTO POSTRADUCCIONAL, QUE SON CAUSANTES DE ENFERMEDADES.....	4
2. TIPOS PRINCIPALES DE COLÁGENA, SU DISTRIBUCIÓN TISULAR, ORGANIZACIÓN SUPRAMOLECULAR Y FUNCIONES PRINCIPALES.....	4
3. ABSORBENCIAS DE LA COLÁGENA SOLUBLE TIPO I A 212 nm BAJO DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	19
4. UNION DE ROJO SIRIO A DIVERSOS COMPUESTOS CATIONICOS Y EFECTOS DE ESTOS SOBRE SU UNION A LA COLÁGENA EN SOLUCION.....	20
5. UNION DE ROJO SIRIO EN ACIDO PICRICO A DIVERSOS COMPUESTOS CATIONICOS Y EFECTOS DE ESTOS SOBRE LA UNION DEL COLORANTE A LA COLÁGENA EN SOLUCION.....	20
6. UNION DE ROJO SIRIO EN ACIDO PICRICO A DIVERSOS COMPUESTOS CATIONICOS Y EFECTOS DE ESTOS SOBRE LA UNION DEL COLORANTE A LA COLÁGENA EN FASE SÓLIDA.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
CaCl ₂	Sal de cloruro de calcio
C.I.	Índice de color
COL1A1	Gen que codifica la cadena alfa 1 de la colágena I
COL1A2	Gen que codifica la cadena alfa 2 de la colágena I
COL2A1	Gen que codifica la cadena alfa 1 de la colágena II
COL3A1	Gen que codifica la cadena alfa 1 de la colágena III
COL4A3	Gen que codifica la cadena alfa 3 de la colágena IV
COL4A4	Gen que codifica la cadena alfa 4 de la colágena IV
COL4A5	Gen que codifica la cadena alfa 5 de la colágena IV
COL4A6	Gen que codifica la cadena alfa 6 de la colágena IV
COL7A1	Gen que codifica la cadena alfa 1 de la colágena VII
COL9A1	Gen que codifica la cadena alfa 1 de la colágena IX
COL9A2	Gen que codifica la cadena alfa 2 de la colágena IX
COL10A1	Gen que codifica la cadena alfa 1 de la colágena X
COL11A2	Gen que codifica la cadena alfa 2 de la colágena XI
D.E.	Desviación estándar
ELISA	Análisis inmuno enzimático
HCl	Ácido clorhídrico
KOH	Solución alcalina de hidróxido de potasio
M	Unidad de concentración molar, molaridad
mg	Miligramos
MgCl ₂	Sal de cloruro de magnesio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
M.r.	Masa relativa
NaCl	Sal de cloruro de sodio
NaN ₃	Azida de sodio
nm	Nanómetros
NaOH	Solución alcalina de hidróxido de sodio
rpm	Revoluciones por minuto
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar
λ	Longitud de onda en nanómetros
X	Media de un conjunto de datos

RESUMEN.

La colágena es en realidad una familia grande y diversa de proteínas. En los vertebrados llegan a constituir un tercio de la masas total de proteínas y presentan una amplia distribución en sus tejidos y órganos, en estos funcionan como elementos de soporte estructural y mantienen su integridad física; son sustratos para la adhesión y migración de células y en consecuencia pueden ser reguladores de la morfología y función de estas. La cuantificación de colágena en secciones tisulares, células en cultivo, fluidos y tejidos corporales es de amplio interés y ha llegado a constituir un importante campo de estudio para la investigación biomédica; sin embargo debido a las desventajas que presentan los métodos más comunes para la cuantificación de esta proteína, se ha desarrollado una serie de modificaciones a estos, encaminadas a la optimización y aumento de su eficiencia. Por lo anterior, se evaluaron dos metodologías para la determinación cuantitativa de colágena con rojo sirio, una que se desarrolla en solución y otra en fase sólida, con base a ellas se evaluó el empleo de colágena soluble e insoluble como estándar y su unión con rojo sirio; se estudió la selectividad del colorante a la colágena en presencia de compuestos catiónicos y policatiónicos y si la presencia de la triple hélice es importante para la unión del rojo sirio a ella. En ambos métodos, la captación del colorante fue directamente proporcional a la concentración de colágena tanto soluble como insoluble, sin embargo en solución la captación por la colágena insoluble fue menor, y en fase sólida ocurrió lo contrario. Al realizar los ensayos de unión en solución y en presencia de iones calcio y magnesio 0.1 M, este último favoreció una mayor incorporación del colorante a la proteína, así mismo, al emplear al ácido pícrico como solvente para el rojo sirio se incrementó la unión del colorante a la colágena insoluble pero continuó siendo menor al de la soluble. En solución con ácido acético 0.5 M las histonas, la espermidina y la espermina se unieron al rojo sirio, al emplear ácido pícrico saturado se evitó que la espermidina captara al colorante pero la poli-L-lisina si lo hace. La unión del colorante a la colágena adsorbida resultó más selectiva para esta, ya que en él no interfieren las poliaminas y cuando la adsorción de las proteínas se realizó a pH ácido tampoco lo hicieron las histonas. Ambas metodologías permitieron la unión cuantitativa del colorante a la colágena, pero las formas soluble e insoluble de colágena unen cantidades diferentes de rojo sirio. El ácido pícrico y el magnesio pueden favorecer la captación del colorante por colágena ya que incrementan la sensibilidad del método para cuantificarla. Algunos de los compuestos policatiónicos captaron al rojo sirio dependiendo de las condiciones del ensayo, por lo tanto se piensa que son capaces de interferir en ellos al cuantificar colágena empleando este colorante; en este sentido el ensayo desarrollado en microplaca consume más tiempo pero más selectivo, mientras que el basado en la precipitación de la colágena en solución ácida es más rápido pero menos selectivo. Finalmente se observó, que el grado de desnaturalización que experimentó la colágena en presencia de glucosa 1 M no afectó su interacción con el rojo sirio.

INTRODUCCION

La familia de proteínas de la colágena es grande y diversa, sus miembros constituyen alrededor de un tercio de la masa total de proteínas en los vertebrados, en quienes además, presenta una amplia distribución en tejidos y órganos (Brown y Timpl, 1995; Miller y Gay, 1982). Con algunas variaciones la podemos encontrar también en algunos fila de invertebrados (Torre-Blanco y Toledo, 1981).

Hasta hoy se conocen 19 tipos de colágena del I-XIX (Brown y Timpl, 1995) cuya estructura común es la triple hélice, formada por tres segmentos polipeptídicos conocidos como cadenas alfa. La secuencia de estas cadenas contienen múltiples segmentos repetitivos de Gli-Xaa-Yaa donde comúnmente Xaa es prolina y Yaa es hidroxiprolina (Van Der Rest y Garrone, 1991), y tiene una forma de hélice con giro a la izquierda (Kuivaniemi y col. 1991). Durante el ensamble de la molécula de colágena las cadenas se alinean en forma paralela por medio de enlaces de puente de hidrogeno que unen las secuencias Gli-Xaa-Yaa de una cadena α con las secuencias Gli-Xaa-Yaa de las otras dos cadenas α y se origina la formación de una superhélice triple helicoidal con giro a la derecha característica de esta proteína (Van Der Rest y Garrone, 1991).

Evidencias acerca del papel que juega la hidroxiprolina e hidroxilisina en la estabilización de la triple hélice han sido aportadas por Ramachandran y col. (1973); Berg y Prockop, (1973) y Kuivaniemi y col. (1991) respectivamente.

Las moléculas de colágena recién sintetizadas, en su mayor parte sirven en la construcción de elementos de soporte extracelular que mantienen la integridad física de los diferentes tejidos y órganos.

En ciertas ubicaciones anatómicas estos elementos de soporte extracelular pueden incorporarse o estar íntimamente asociados con una variedad de componentes de la matriz extracelular, que incluyen agregados de proteoglicanos y glicosaminoglicanos (Van Der Rest y Garrone, 1991), depósitos amorfos o cristalinos de sales de fosfato de calcio (Miller y Gay, 1982), y glicoproteínas específicas tales como la fibronectina, el nidógeno y la laminina (Brown y Timpl, 1995). En consecuencia las propiedades de las diversas matrices extracelulares presentes en los vertebrados son determinadas en gran parte por los tipos de colágenas que las forman.

Como ejemplo de estas propiedades, se puede mencionar que los tejidos conectivos que requieren de fuerza mecánica como los tendones, los huesos, la piel y los grandes vasos sanguíneos son ricos en fibras de colágena tipo I (cuadro 1) y otros tipos de colágenas asociadas, mientras que las propiedades resilientes del cartílago se deben a las fibras de colágena tipo II que forman una red similar a una malla que mantiene en su lugar a los grandes complejos de proteoglicanos y las redes formadas por la colágena tipo IV (cuadro 1) son esenciales para la estabilidad de la membrana basal la cual debe resistir en algunas ubicaciones anatómicas alta presión hidrostática como en las asas glomerulares y mostrar considerable resistencia a la ruptura en las uniones dermis-epidermis (Van Der Rest y Garrone, 1991; Brown y Timpl, 1995; Prockop y Kivirikko, 1995).

Otra función importante de las colágenas son sus propiedades de adhesión celular, demostradas para las colágenas tipo I, II, IV, V y VI; las interacciones entre las células y estas proteínas en la matriz extracelular influyen la morfología y funciones celulares y son mediadas por receptores de superficie celular conocidos como integrinas (Kleinman y col. 1986).

Otro ejemplo que indica la particular importancia de la familia de la colágena son las diversas patologías (colagenopatías) que involucran alteraciones (mutaciones) en sus genes estructurales (cuadro 2). La mayoría de estas enfermedades se deben a sustituciones de la glicina, inserciones y deleciones en el gen, a alelos nulos y defectos en la maduración y terminación prematura del RNA

La determinación cuantitativa del contenido de colágena en secciones tisulares, células en cultivo y fluidos corporales, es de amplio interés para la investigación biomédica (Tullberg-Reinert y Jundt, 1999). Esta se basa usualmente en la cuantificación del contenido de hidroxiprolina (OH-Pro) –un marcador bioquímico y específico para la colágena- que puede simplificar el análisis químico de la proteína (Miller y Gay, 1982). Alternativamente, el empleo de prolina radiomarcada permite medir su incorporación a la colágena para monitorear la producción o degradación de la proteína.

El ensayo con hidroxiprolina, aunque es sensible, requiere previamente de hidrólisis ácida de la proteína, por lo que consume mucho tiempo, ocasiona la destrucción de la muestra y llega a ser complicado; el método con prolina marcada con isótopos radioactivos es caro y se requiere de un espacio adecuado para el manejo de estos, además de que puede representar un peligro para la salud.

Como una alternativa a estos ensayos, se ha empleado el análisis inmuno enzimático (ELISA) que tiene la ventaja de identificar tipos específicos de colágena (Guerret y col. 1987; Yoshioka y col. 1987), aunque el ensayo es altamente sensible, es necesario generar primero un anticuerpo específico para cada tipo de colágena, lo que complica el ensayo y también consume mucho tiempo.

Un método colorimétrico para la determinación cuantitativa del contenido de colágena que ha llegado a constituirse como un procedimiento estándar en las últimas décadas (Junqueira y col. 1979; Marotta y Martino, 1985; Walsh y col. 1992; Nielsen y col. 1998; Tullberg-Reinert y Jundt, 1999), es el ensayo basado en la unión del colorante rojo sirio, C.I. 35780, Mr.1373.09, un colorante ácido tetrakisazo hexasulfonado (figura 1) sensible y al parecer específico a la molécula de colágena (Lillie, 1977; Puchtler y col. 1988).

En este caso la colágena se solubiliza en ácido, se adsorbe en un soporte sólido o se deja en solución para su tinción con rojo sirio (Walsh y col. 1992), y el colorante se extrae a partir del material teñido con una solución alcalina a base de NaOH o KOH (Junqueira y col. 1979; Nielsen y col. 1998).

La estructura química del rojo sirio (figura 1) presenta seis grupos sulfónicos ($-SO_3^-$) distribuidos a lo largo de toda la molécula (Puchtler y col. 1988), al parecer estos grupos cargados negativamente interactúan por medio de enlaces iónicos con los grupos básicos de la colágena de un modo que la unión es selectiva y proporcional (Junqueira y col. 1979), aunque otros autores han postulado que también pueden estar involucrados otros tipos de enlaces o interacciones moleculares y cuestionan que la unión del colorante sea estequiométrica (Lillie, 1977; Puchtler y col. 1998).

Cuadro 1. Tipos principales de colágena, su distribución tisular, organización supramolecular y funciones principales

TIPO	ORGANIZACIÓN SUPRAMOLECULAR	TEJIDO REPRESENTATIVO	FUNCIÓN PRINCIPAL
I	Fibras estriadas	Tejido conectivo como: la piel, el hueso, el tendón, la cornea.	Proporciona fuerza de Tensión
II	Fibras estriadas	Cartilago hialino y el humor vítreo	Proporciona fuerza de Tensión
III	Fibras estriadas	Tejido conectivos extensibles como la piel, los pulmones y el sistema vascular	Proporciona fuerza de Tensión
IV	Red similar a una malla	Membrana basal	Componente estructural
V	Núcleo de fibras estriadas	Asociada con la colágena tipo I, como un componente menor	Proporciona fuerza de Tensión
VI	Filamentos como cuentas de un rosario y microfibras	Muchos tejidos conectivos	Posiblemente como una bisagra entre las células y la matriz extracelular (MEC)
VII	Fibras de anclaje	Fibras de anclaje	Refuerza la uniones dermis-epidermis
VIII	Red hexagonal	Endotelio	Desconocida
IX	Asociada a la superficie de la colágena II	Tejido conteniendo a la Colágena II	Une grupos funcionales a Fibras
X	Red hexagonal	Cartilago	Unión a calcio
XI	Núcleo de fibras asociado con la colágena II	Tejidos conteniendo a la colágena II	Proporciona fuerza de Tensión

Cuadro 2. Enfermedades causadas por mutaciones en los genes de colágena o por deficiencia en las actividades de las enzimas involucradas en su procesamiento postraduccional.

GEN	ENFERMEDAD	REFERENCIAS
COL1A1	Osteogénesis imperfecta	Cohn y col. 1986
COL1A2	Síndrome de Ehlers-Danlos tipo VII, VIV. y osteoporosis	Byers, 1990
COL2A1	Condroadisplasias y Osteoartritis	Kuivaniemi y col. 1991
COL3A1	Síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV y aneurismo aórtico	Kuivaniemi y col. 1991
COL4A3	Síndrome de Alport autosómico	Kuivaniemi y col. 1991
COL4A4	Síndrome de Alport ligado al cromosoma X	Kuivaniemi y col. 1991
COL4A5	Síndrome de Alport	Barker y col. 1990
COL4A6	Leiomiomatosis esofágica ligada al cromosoma X	Barker y col. 1990
COL7A1	Formas distróficas de epidermolisis bulosa	Christiano y col 1994
COL9A1	Osteoartritis inducida en ratones transgénicos	Prockop y Kivirikko, 1995
COL9A2	Displasia múltiple epifiseal	Prockop y Kivirikko, 1995
COL10A1	Condroadisplasia metafiseal	Prockop y Kivirikko, 1995
COL11A2	Formas no oculares de Síndrome de Strickler	Kuivaniemi y col. 1991
Lisil-hidroxilasa	Ehlers-Danlos tipo VI	Prockop y Kivirikko, 1995
N proteinasa I	Ehlers-Danlos tipo VII C	Prockop y Kivirikko, 1995
Lisil oxidasa	Síndromes de cuerno occipital y Menkes	Prockop y Kivirikko, 1995

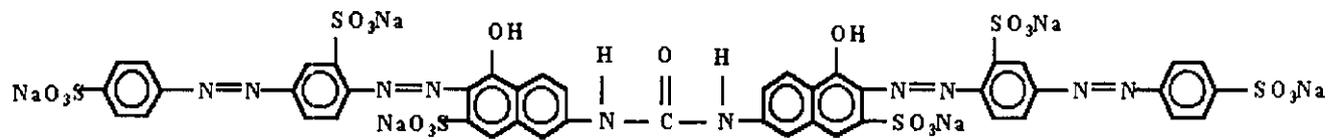


Figura 1. Estructura química del rojo sirio F3BA. Se trata de un colorante tetrakisazo hexasulfonado.

ANTECEDENTES

El rojo sirio ha sido empleado por muchos investigadores, para la cuantificación de colágena. Se puede mencionar que se ha utilizado en soportes sólidos (Junqueira y col. 1979; Kuttan y Di Ferrante, 1980; Walsh y col. 1992; Nielsen y col. 1998; Tullberg-Reinert y Jundt, 1999), en solución o suspensión (Marotta y Martino, 1985; Anderson y Elliot, 1991) y en secciones histológicas (Armendariz-Borunda y Rojkind, 1985; López-De León y Rojkind, 1985; James y col. 1990; Kalaria y Pax, 1995).

Junqueira y col. (1979) desarrollaron un ensayo colorimétrico para la unión del rojo sirio, en el que cuantifican colágena que ha sido fijada como una película extendida sobre portaobjetos, y encontraron que en este sistema el colorante se une de manera proporcional y preferencialmente a la colágena que a otras proteínas como la albúmina sérica humana, inmunoglobulina G humana, tripsina de bovino, proteoglicanos, acetilcolinesterasa, C1q del complemento humano y proteínas del suero sanguíneo humano.

En este sentido se ha ensayado una gran diversidad de proteínas en presencia y ausencia de la colágena para determinar si reaccionan con el rojo sirio e interfieren en la captación de este por la colágena (Kuttan y Di Ferrante, 1980; Marotta y Martino, 1985; Anderson y Elliot, 1991; Walsh y col. 1992; Tullberg-Reinert y Jundt, 1999), en todos estos casos las proteínas reaccionaron débilmente con el colorante y no lo captan de manera proporcional o dependiente de dosis.

Kuttan y Di Ferrante (1980), encontraron que una alta concentración de sal (NaCl 0.5%) y el dodecil-sulfato de sodio (SDS 0.5%) inhiben completamente la unión del colorante por colágena, que las diferencias de absorbencia del color extraído de colágena reducida (con 2 mecaptoetanol), colágena desnaturalizada con calor y colágena nativa son evidencias que indican la importancia de la triple hélice de la proteína para la interacción entre el colorante y la colágena. Por otra parte demostraron que el complejo rojo sirio-colágena es un sustrato conveniente para la colagenasa bacteriana y una forma para caracterizar parcialmente su actividad.

Marotta y Martino (1985) propusieron un método nuevo para cuantificar colágena, basado en la capacidad del rojo sirio para precipitar dicha proteína en una solución ácida; bajo este principio el método permitió la determinación cuantitativa de varios tipos de colágena, y además encontraron que la presencia de algunos iones (Mg^{+2} , K^+ , Na^+) pueden favorecer o interferir en la precipitación de la proteína y en una incorporación del colorante a ella, en un mayor grado de cómo lo hace el rojo sirio solo.

López-De León y Rojkind (1985) desarrollaron un método para la estimación cuantitativa y específica del contenido de colágena en secciones de tejido fijado con formalina y embebido en parafina. El método se basa en la unión selectiva de los colorantes verde rápido y rojo sirio a las proteínas no colágenas y colágenas respectivamente.

Bajo estas condiciones el rojo sirio tiñe selectivamente a la colágena intersticial, y de la membrana basal de diferentes ubicaciones anatómicas, a pesar de que estas estructuras contienen diferentes cantidades y tipos específicos de colágena, todas ellas unen una cantidad similar de colorante (demostrado por la similitud en la equivalencia de color, obtenida al teñir colágena en ellas), permitiendo obtener una determinación cuantitativa del contenido de colágena

Con esta ventaja, el método ha sido empleado en la cuantificación de la colágena en muestras de tejido bajo condiciones fisiológicas normales y patológicas, sin considerar la proporción relativa y los tipos de colágena presentes.

James y col. (1990) emplearon al rojo sirio para teñir la colágena en un método histofotométrico combinado con el análisis de imágenes. A diferencia del procedimiento anterior, el ácido pícrico es empleado en lugar del verde rápido para diferenciar las proteínas no colágenas, y el análisis densitométrico (después de la respectiva fijación del tejido y tinción con el rojo sirio de las secciones hepáticas) se utilizó para determinar el grado de alteración del contenido de colágena ocasionada por la fibrosis colestásica hepática.

Kalaria y Pax (1995), empleando la tinción selectiva de colágena por el rojo sirio, demostraron que las profundas alteraciones morfológicas y bioquímicas de la microvasculatura cerebral (de los lóbulos frontales, occipital y área cortical) involucradas en la enfermedad de Alzheimer, incluyen un aumento en el contenido de colágena IV en las regiones frontal y occipital, pero no en la cortical, determinado *post mortem* en sujetos con dicha enfermedad.

El rojo sirio ha sido empleado también para cuantificar el contenido de colágena en células en cultivo y en el medio empleado para ello. En ambos casos los ensayos en cuestión, son una modificación al método de Junqueira y col. (1979), a diferencia del extendimiento y fijación de la colágena sobre un portaobjetos, células similares a osteoblastos humanos (Tullberg-Reinert y Jundt, 1999), o el medio condicionado de fibroblastos de pulmón humano (Walsh y col. 1992) son colocados directamente en pozos de una microplaca de ELISA, se incuba por 16 horas a 37°C en una atmósfera húmeda y 24 horas a 37°C en atmósfera seca y se fijan con formaldehído, sin que esto afecte la calidad de tinción.

En el caso de las células similares a osteoblastos, las acumulaciones focales del material teñido con rojo sirio permiten identificar zonas de alto depósito de colágena intracelular, mientras que en el medio condicionado proveniente de los fibroblastos se cuantifica únicamente la colágena secretada.

En el estudio con fibroblastos, los autores no aclaran con precisión el tipo de preparado comercial de la colágena que emplearon como estándar, se deduce que fue la insoluble y que solo adsorben a la superficie de plástico la fracción soluble en ácido de la misma.

Lo anterior representa un obstáculo serio para el estudio de la proteína en cuestión, puesto que en algunos casos no se obtiene reproducibilidad en los datos o no es posible la preparación de la proteína de acuerdo al protocolo recomendado.

Finalmente en ensayos de unión del colorante sobre filtros de nitrato de celulosa, se ha establecido que compuestos policatiónicos como poli-histidina, poli-lisina y poli-arginina pueden interactuar fuertemente con el rojo sirio (Nielsen y col. 1998), lo que marca la posibilidad que tales compuestos interfieran con los métodos de cuantificación de colágena basados en su unión con el colorante.

Otra evidencia que apoya lo anterior es que el núcleo celular rico en histonas también se tiñe en ocasiones con el rojo sirio (López-De León y Rojkind, 1985).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La presencia y función de los diversos tipos de colágena como elementos de soporte estructural (Miller y Gay, 1982), como sustrato para la adhesión, diferenciación y migración celular (Kleinman, 1986), y la mineralización de la matriz ósea (Brown y Timpl, 1995), es de vital importancia para el desarrollo y mantenimiento de los organismos vertebrados.

En los humanos una gran cantidad de enfermedades (colagenopatías) ocasionadas por alteraciones (mutaciones) en los genes estructurales de los diferentes tipos de colágenas (Prockop y Kivirikko, 1995), así como alteraciones en la síntesis, depósito y degradación de colágena en algunos órganos y tejidos (López-De León y Rojkind, 1985; James y col. 1990; Kalaria y Pax, 1995), revisten de importancia el estudio de las colágenas.

En consecuencia la necesidad de contar con métodos que nos permitan obtener una determinación cuantitativa del contenido de colágena, de células en cultivo, extractos y/o secciones tisulares, y fluidos corporales, ha llegado a constituir un amplio campo de estudio en la investigación biomédica.

Sin embargo debido a las desventajas que muestran los métodos más usuales para la cuantificación de colágena, en los últimos años se han desarrollado una serie de modificaciones a estos encaminadas a la optimización y aumento en la eficiencia de los mismos.

Por todo lo anterior en este trabajo se valoraron dos ensayos colorimétricos para la determinación cuantitativa de colágena, basados en la unión al parecer específica del colorante rojo sirio a dicha proteína.

Asimismo, algunos aspectos de tales métodos no han sido evaluados con precisión, principalmente los referentes al empleo de colágenas solubles e insolubles como estándar, si existen diferencias en la unión del rojo sirio a estas, y si compuestos catiónicos y policatiónicos también reaccionan con el colorante y restan especificidad al método.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar dos metodologías para la determinación cuantitativa de colágena con rojo sirio, una metodología que se desarrolla en solución y otra en fase sólida.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar la forma de preparar y adsorber la colágena soluble e insoluble en fase sólida.
- Valorar el empleo de colágena soluble e insoluble y su unión con rojo sirio en ambos métodos.
- Estudiar la especificidad del rojo sirio en presencia de compuestos catiónicos y policationicos en ambos métodos, empleando, aminoácidos básicos (Arg, Lis e His), un polímero de lisina, las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) e histonas (fracción rica en arginina)
- Estudiar la importancia de la presencia de la triple hélice de la colágena en su unión al rojo sirio.

METODOLOGIA

CUANTIFICACION DE COLAGENA CON ROJO SIRIO EN UNA MICROPLACA

Se empleó el método de Walsh y col. 1992 según el siguiente procedimiento: se utilizó colágena tipo I soluble (Sigma Chemical Co. C9791) e insoluble (Sigma Chemical Co. C9879) disuelta y suspendida respectivamente en ácido acético al 0.2 % a una concentración de 2 mg/ml.

Ambas soluciones fueron diluidas en una proporción 1:2.5 en agua y posteriormente 1:2 con amortiguador de Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 10 mM y NaN₃ 0.02 % a (pH 7.5), a continuación se diluyeron de nuevo a diferentes concentraciones (60 µg, 40 µg, 20 µg, 10 µg, 5 µg / 100µl) en amortiguador de Tris-HCl 100 mM, NaN₃ 0.02 % a (pH 7.9).

Se colocaron en pozos de una placa para ELISA (Greiner labortechnik), cien microlitros de cada una de las diluciones de colágena y se incubaron por 16 horas a 37°C en una atmósfera húmeda y 24 horas a 37°C en atmósfera seca. Con base a este método se evaluó el procedimiento de preparar y adsorber la colágena soluble e insoluble a la superficie de la placa de ELISA y su unión con el rojo sirio.

Método de tinción.

Se colocaron 100 µl de colorante rojo sirio F3BA (Fluka Chemika, No. Cat. 43665) al 0.1 % en ácido pícrico saturado en los pozos de la placa durante 1 hora a temperatura ambiente y en la oscuridad, posteriormente la colágena teñida se lavó 5 veces con 200 µl de HCl 10 mM, 10 segundos por lavado para eliminar el exceso de colorante. Para extraer el colorante unido a la colágena, los pozos se lavaron con 200 µl de NaOH 0.1 M por 5 minutos, el colorante extraído se resuspendió varias veces antes de transferirse a una segunda placa.

A continuación se determinó la absorbencia del color en un lector de microplaca (Bio-Rad modelo 450) a una longitud de onda (λ) de 540 nm. A partir de los datos obtenidos se construyó una curva que relaciona la concentración de colágena con valores de absorbencia debida a la unión del rojo sirio.

CUANTIFICACION DE COLAGENA EN SOLUCION CON ROJO SIRIO.

En este ensayo se aprovechó la capacidad del rojo sirio para precipitar la colágena en un medio ácido empleando como base el método de Marotta y Martino (1985).

Colágena tipo I soluble e insoluble (1 mg / 1.5 ml) se solubilizó y suspendió respectivamente en ácido acético 0.5 M. De estas soluciones se tomaron volúmenes que contenían a 1, 5, 10, 20 40 y 60 µg /100 µl de ácido, se colocaron en tubos de ensayo y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente con 1ml de colorante rojo sirio 50 µM en ácido acético 0.5 M.

A continuación los tubos se centrifugaron a 3000 rpm/30 minutos a 10°C en una centrifuga Zettich (modelo Universal 30RF), y el precipitado se lavó con un 1 ml de ácido acético 0.5 M, se centrifugó nuevamente a 5000 rpm / 15 min y el precipitado se lavó con 1ml de KOH 0.1 M durante 15 min para extraer el colorante unido a las fibras de colágena. La intensidad del color extraído se determinó en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1201) a una λ de 540nm.

Con los datos obtenidos se construyó una curva que relaciona la concentración de colágena contra valores de absorbancia debida a la unión de rojo sirio en dicha longitud de onda.

En este método se evaluó si el cambio del ácido acético por el ácido pícrico saturado afecta la sensibilidad del método, si la inclusión de cationes Mg^{2+} en forma de $MgCl_2$ 0.1 M y de Ca^{2+} en forma de $CaCl_2$ 0.1 M favorece una mayor incorporación del colorante a ella.

IMPORTANCIA DE LA TRIPLE HELICE DE LA COLÁGENA EN LA UNIÓN DEL ROJO SIRIO.

Para valorar si la estructura tridimensional de la colágena es importante para su unión con el rojo sirio, una solución de colágena tipo I soluble disuelta en ácido acético 0.5 M (1 mg /1.5 ml) fue diluida para obtener cantidades de 20 y 60 μg / 1000 μl de amortiguador de Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, $CaCl_2$ 10 mM, glucosa 1 M (pH 7.5).

Estas diluciones se llevaron a ebullición por 10 minutos y se enfriaron rápidamente en hielo. Como control cantidades similares de colágena fueron ebuldidas en el amortiguador sin glucosa 1 M, debido a que esta y otros azúcares son capaces de interferir en la fibrillogénesis de la colágena (Hayashi y Nagai, 1972).

Alternativamente algunos ensayos se desarrollaron a temperatura ambiente en el amortiguador de pH 7.5 en presencia y ausencia de glucosa 1 M. La absorbancia de las diluciones en todos los casos se determinó haciendo un barrido espectral de los 200 nm a los 600 nm en un espectrofotómetro (Philips, Modelo. PU8710 UV-VIS)

Para el ensayo de unión con rojo sirio, colágena soluble tipo I (1 mg / 1.5 ml) fue disuelta en amortiguador de Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, $CaCl_2$ 10 mM (pH 7.5) con o sin glucosa 1 M, y se tomaron volúmenes que contenían cantidades de 20 y 60 μg , y la capacidad de estas de unir al rojo sirio se determinó de acuerdo a la metodología para la cuantificación de colágena desarrollada en solución.

ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DEL COLORANTE ROJO SIRIO F3BA

La unión específica del rojo sirio a la colágena se estudió en presencia de diversos compuestos catiónicos, incluyendo las poliaminas: putrescina (Sigma Chemical Co. P7505), espermidina (Sigma Chemical Co. S2501) y espermina (Sigma Chemical Co. S2876); una fracción de histona tipo VIII-S rica en arginina (Sigma Chemical Co. H4380); un polímero de poli-lisina (Sigma Chemical Co. P-8920) y los aminoácidos básicos: arginina (Merck 1.5142), lisina (Sigma Chemical Co. L-1262) e histidina (Sigma Chemical Co. H-8000).

La colágena tipo I soluble (Sigma Chemical Co. C9791) y todos los compuestos anteriores en una concentración de 1 mg/ml, se disolvieron en ácido acético 0.5M. Veinte microlitros de colágena se mezclaron -individualmente- con un volumen que contenía a 20 μg de los compuestos antes mencionados y como control en cada caso, se emplearon 20 μg de colágena tipo I soluble sola. La captación del colorante en todos los casos se determinó de acuerdo a los métodos para la cuantificación de colágena en solución o en fase sólida.

En todos los casos, los ensayos se realizaron tres veces y con muestras por triplicado, excepto los ensayos de la importancia de la triple hélice de colágena para su unión con rojo sirio, los cuales se desarrollaron con muestras por duplicado.

ANALISIS ESTADISTICO

Se empleó el método estadístico de comparación de pendientes (Zar, 1992) para determinar si existen diferencias significativas en la tasa de unión del rojo sirio a la colágena soluble o insoluble tanto en fase sólida como en solución.

Se utilizó el mismo método para comparar si la inclusión de iones metálicos (Mg^{2+} y Ca^{2+}) favorece la precipitación de la proteína y una mayor incorporación del colorante a ella, y si el cambio del ácido acético por el ácido pícrico saturado tiene un efecto sobre la sensibilidad del mismo.

En ambos casos los cálculos estadísticos para la comparación de pendientes se realizaron manualmente con el empleo de una calculadora científica Casio, fx-3600.

En los ensayos de la selectividad del rojo sirio, se utilizó el estadístico para comparaciones múltiples (ANOVA) de un factor, para determinar si existen diferencias significativas respecto del control bajo las diferentes condiciones de los ensayos, para ello se empleo el análisis de datos del programa de Excel® Office 2000.

RESULTADOS

PREPARACIÓN Y ADSORCIÓN DE LA COLÁGENA.

Después de colocar la colágena insoluble tipo I en ácido acético 0.2 %, por aproximadamente 18 horas a temperatura ambiente, se obtuvo una mezcla que contenía una porción de proteína solubilizada y otra en suspensión. Para obtener la porción soluble de esta mezcla, la solución se homogenizó manualmente y se centrifugó a 3000 rpm / 5 min.

De esta manera se trabajó con mezclas de colágena con distinto grado de solubilización, la mezcla completa (ST) formada por la porción de colágena soluble y en suspensión, un sobrenadante correspondiente a la porción soluble (SB), y la colágena tipo I soluble (S) en ácido acético 0.5 M.

Por otra parte, el procedimiento que recomiendan Walsh y col. (1992) para la dilución de las colágenas (1:2.5 con agua, 1:2 con el amortiguador de pH 7.5) provocó la precipitación de la colágena antes de su aplicación a la placa de ELISA y por ello es causante de variabilidad en los resultados.

Por lo tanto, la colágena de la ST, del SB y la S se aplicaron directamente (disueltas en ácido) a la placa en volúmenes que contenían 5, 10, 20, 40 y 60 μg de proteína y el volumen final en cada pozo se ajustó a 100 μl con el amortiguador de pH 7.5. Con este procedimiento, en todos los casos la colágena se depositó en el fondo de los pozos en forma de disco central y los resultados fueron más reproducibles.

UNIÓN DE COLÁGENA CON ROJO SIRIO EN FASE SÓLIDA.

Los tres tipos de colágena empleados reaccionaron con el rojo sirio, y en todos los casos la cantidad de colorante unido fue directamente proporcional a la cantidad de proteína presente (Fig. 2)

La cantidad de color que une la colágena de la mezcla total es aproximadamente 24 % mayor a la que unen cantidades equivalentes de colágena S y esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.05$) como se aprecia en la Fig. 2. Como no toda la colágena se solubilizó, la porción de colágena soluble captó solamente una quinta parte de la cantidad de color que une la colágena de la mezcla completa (Fig. 2), y esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

UNION DE COLÁGENA CON ROJO SIRIO EN SOLUCIÓN.

La colágena tipo I soluble e insoluble en cantidades de 1 a 60 μg fue precipitada después de haber sido incubada en solución con 1 ml de colorante rojo sirio.

En ambos casos la intensidad del colorante extraído del precipitado, mostró proporcionalidad con la cantidad de proteína presente en el tubo de ensayo (figura 3), pero la colágena insoluble fija aproximadamente 40 % menos colorante que su contraparte soluble y esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Al sustituir al ácido acético 0.5 M por el ácido pícrico como solvente para el rojo sirio, se favoreció que la colágena insoluble uniera en promedio 35 % mas color en comparación cuando el colorante es disuelto en ácido acético (Fig. 4), tal incremento fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

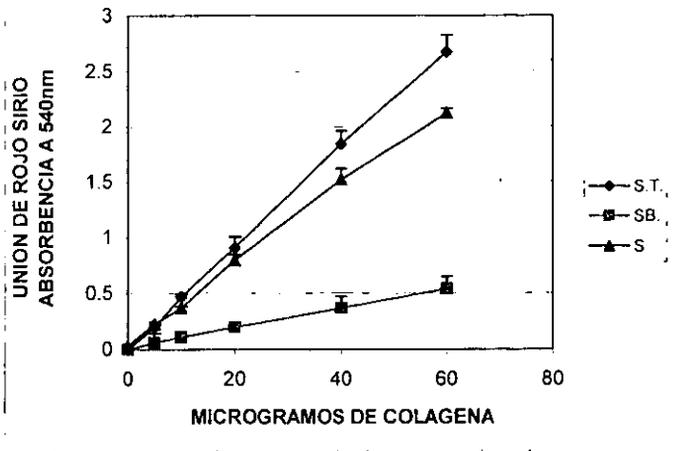


Figura 2. Relación entre el contenido de colágena y la unión de rojo sirio en fase sólida. La unión del colorante a la colágena en todos los casos es lineal en el intervalo ensayado pero la cantidad de color que une la colágena (S.T.) es mayor a la de las demás. Cada punto es el promedio $X \pm D.E.$ de tres experimentos independientes con muestras por triplicado.

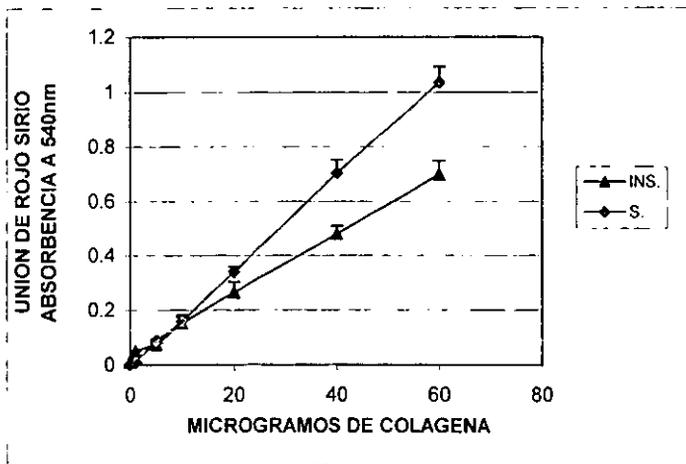


Figura 3. Relación entre el contenido de colágena y la unión de rojo sirio en solución. La unión del colorante a la colágena es lineal en el intervalo ensayado y la cantidad de color fijada por la colágena soluble (S) difiere significativamente de la insoluble. Cada punto es el promedio $X \pm D.E.$ de tres experimentos independientes con muestras por triplicado.

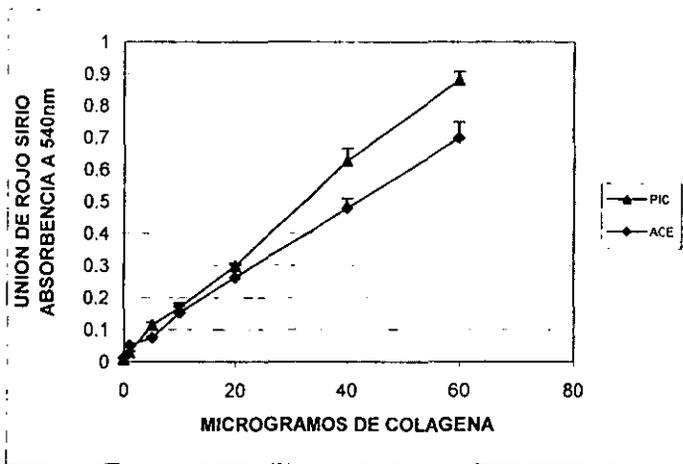


Figura 4. Efecto del solvente en la unión del rojo sirio a la colágena insoluble tipo I en solución. El ácido picrico saturado incrementa la unión de rojo sirio a colágena de modo significativo. Cada punto es el promedio $\bar{X} \pm D.E.$ de tres experimentos independientes con muestras por triplicado.

LOS IONES Mg^{2+} y Ca^{2+} AFECTAN DIFERENCIALMENTE LA UNIÓN DEL ROJO SIRIO CON LA COLÁGENA

El ion magnesio (Mg^{+2}) favoreció una mayor incorporación del colorante a la proteína cuando sus cantidades fueron 5, 10, 20 y 40 μg no así a 60 μg donde fue lo mismo con y sin Mg^{+2} . aunque en presencia de este ion la unión del colorante es proporcional a la cantidad de colágena, la relación entre ellas no es lineal o solo lo es hasta 10 μg de la proteína, además muestra saturación a 40 μg de la misma (figura 5).

En presencia del Mg^{+2} la colágena precipita en forma de gránulos a diferencia de la del control que lo hace formando agregados fibrilares.

El ion Ca^{+2} ejerce un efecto diferente del observado con el Mg^{+2} , primeramente su presencia a una concentración de 1 M en la solución de rojo sirio provocó la precipitación del colorante en forma estable que no se puede remover por el procedimiento empleado para extraer el colorante unido a la colágena, por si solo el Ca^{+2} capta una cantidad de colorante similar a la que 60 μg de colágena (Fig. 5).

Consecuentemente al mezclar esta solución con diferentes cantidades de la proteína, se observó que no solo el rojo sirio unido por la colágena precipita con ella, sino que también el colorante que está en suspensión lo hace, por lo tanto la unión del rojo sirio con la colágena no es lineal ni proporcional en el intervalo ensayado (figura 5) y se observa que no hay cambio en la unión del colorante entre 1 y 60 μg de colágena, solo entre 0 y 1 μg de proteína se observó un aumento en la unión a colágena de 0.4 unidades de absorbencia.

En presencia del Ca^{+2} la colágena precipita en forma de filamentos muy cortos en combinación con gránulos que son más finos que los observados en presencia del Mg^{+2} .

Para comparar las pendientes de cada una de las curvas de la figura 5, se obtuvieron los recíprocos de cada dato de concentración de colágena, de la absorbencia debida a la unión del rojo sirio a colágena en presencia o ausencia de Ca^{+2} y Mg^{+2} ; y como tal se graficaron para ajustarlos lo más posible a una línea recta (Fig. 6); el valor de las pendientes de estas líneas se comparó por medio del estadístico de comparación de pendientes y en todos los casos se encontró diferencias significativas con el control ($p < 0.05$).

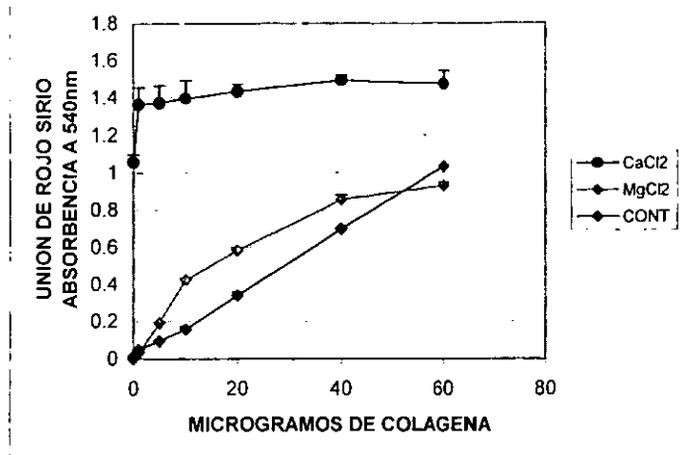


Figura 5. Efecto de Ca^{+2} y Mg^{+2} sobre la unión del rojo sirio a colágena soluble. El Mg^{+2} incrementa la unión del colorante a la colágena, pero provoca la saturación temprana de la proteína por el colorante, el Ca^{+2} no permite al rojo sirio unirse de manera proporcional a la colágena. Cada punto es el promedio $\bar{X} \pm \text{D.E.}$ de tres experimentos independientes con muestras por triplicado.

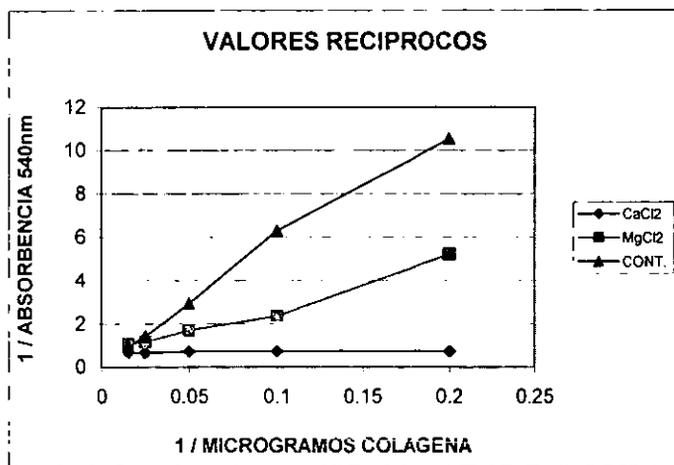


Figura 6. Relación entre los valores recíprocos de la concentración de colágena y la absorbencia a 540 nm. Se transformaron los datos de absorbencia y de las concentraciones de colágena mostrados en la figura 5, a su correspondiente valor recíproco y la pendiente obtenida a partir de ellos se empleó en el estadístico para la comparación de pendientes.

EFFECTO DE LA DESNATURALIZACIÓN DE LA COLÁGENA SOLUBLE TIPO I SOBRE LA UNIÓN DEL ROJO SIRIO.

El grado de desnaturalización de la colágena se evaluó y al ocurrir ésta se observó un efecto hipercrómico a 212nm. Notablemente, en presencia de glucosa 1 M la absorbencia a 212 nm de 20 y 60 µg de colágena soluble fue de 4 a 18 veces mayor en comparación a la de los controles ($p < 0.05$); esto indica la capacidad de la glucosa de causar un incremento en la absorbencia de la colágena debido a la desnaturalización de la misma (cuadro 3).

Consecuentemente, se realizaron experimentos incubando cantidades variables de colágena en el amortiguador con y sin glucosa 1 M pero a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos en el experimento anterior, y refuerzan la idea de que es la glucosa responsable del efecto hipercrómico a 212 nm (cuadro 3).

Aprovechando este fenómeno se valoró la importancia de la presencia de la triple hélice de la colágena en la unión de la molécula de rojo sirio a ella, ya sea en presencia de la glucosa (colágena desnaturalizada) o en ausencia de la misma (colágena nativa).

Bajo las condiciones antes mencionadas, se encontró que la cantidad de colorante unido por la colágena fue prácticamente igual ($p > 0.05$) en las dos condiciones (Fig. 7).

ESTUDIO DE LA SELECTIVIDAD DEL ROJO SIRIO.

La capacidad del rojo sirio de unirse preferencialmente a la colágena y no a otras moléculas se estudió en presencia de poliaminas, poliaminoácidos y aminoácidos básicos así como la proteína histona. Lo anterior se examinó por los métodos en solución y en fase sólida.

En solución con ácido acético 0.5M la fracción de histonas rica en arginina, la espermidina, la espermina y la poli-lisina reaccionaron significativamente con el rojo sirio por lo que la mezcla de cada uno de ellos con colágena aumenta marcadamente la captación del colorante (cuadro 4). Notablemente la poli-lisina disminuye la unión del colorante y el resto de las moléculas no tuvieron un efecto significativo.

Al emplear ácido pícrico saturado como solvente para el rojo sirio, se evita que la espermidina reaccione con el colorante, pero la poli-lisina si lo hace ya sea sola o en presencia de colágena (cuadro 5).

En el método desarrollado en fase sólida, la fracción de histona rica en arginina interfiere con la unión del rojo sirio disminuyendo su captación por colágena (cuadro 6, A), la poli-lisina capta al colorante por lo que la unión del rojo sirio a la mezcla de ésta con la colágena es más alta que la de la colágena sola ($p < 0.05$).

TRATAMIENTO	CANTIDADES DE PROTEINA	
	20 μg	60 μg
EBULLICIÓN + GLUCOSA	0.346 \pm 0.0057	1.788 \pm 0.0106
CONTROL	0.087 \pm 0.0014	0.098 \pm 0.0014
GLUCOSA +	0.426 \pm 0.0247	1.753 \pm 0.0014
CONTROL	0.050 \pm 0.0064	0.077 \pm 0.0071

CUADRO 3. Absorbencias de la colágena soluble tipo I a 212 nm bajo diferentes condiciones experimentales. En todos los casos la presencia de glucosa originó un incremento en la absorbencia de la solución de colágena debido a su desnaturalización. Se muestra el promedio $\bar{X} \pm \text{D.E.}$ de tres experimentos independientes desarrollados con muestras por duplicado.

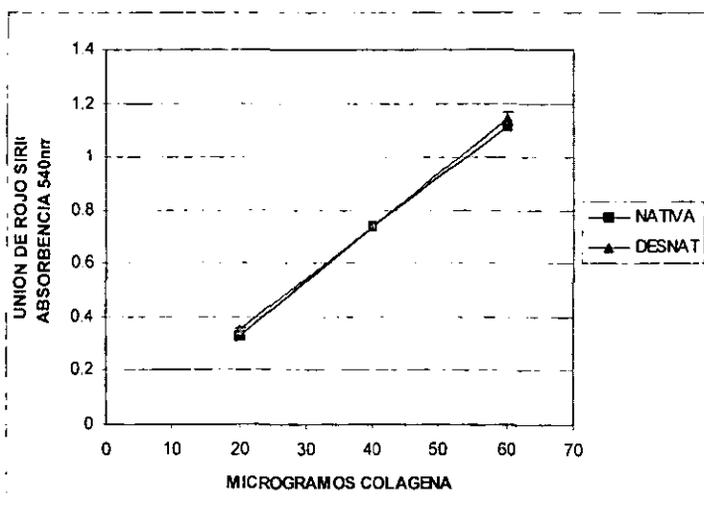


Figura 7. Unión del rojo sirio a la colágena desnaturada (GLUCOSA) y nativa (CONTROL). Estas dos formas de proteína fijaron la misma cantidad de colorante a temperatura ambiente y la unión de este se incrementó de manera lineal con la concentración de colágena. Cada punto es el promedio $\bar{X} \pm \text{D.E.}$ de tres experimentos independientes con muestras por triplicado.

Cuadro 4. Unión del rojo sirio a diversos compuestos catiónicos y efecto de estos sobre su unión a la colágena en solución. Los resultados expresan la absorbencia a 540 nm debida a la unión del rojo sirio con 20 µg de los diversos cationes (A), y el cambio en la absorbencia de la solución control (rojo sirio - 20 µg colágena) al adicionar 20 µg del soluto correspondiente (B). Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes con muestras por triplicado, * indica diferencias significativas con el grupo control ($p < 0.05$), NS: no significativo.

(A) MOLECULA	ABS A 540nm	(B) MOLECULA	ABS A 540nm	CAMBIO EN LA ABS
Colágena	0.254 ± 0.008	Colágena	0.2664 ± 0.009	-
Histona	0.096 ± 0.009	+Histona	1.0573 ± 0.025	+ 0.7909 *
Espermina	1.408 ± 0.003	+Espermina	1.2446 ± 0.088	+ 0.9782 *
Espermidina	1.342 ± 0.011	+Espermidina	1.1856 ± 0.108	+ 0.9192 *
Putrescina	0.044 ± 0.002	+Putrescina	0.2742 ± 0.037	NS
Arginina	0.042 ± 0.001	+Arginina	0.2911 ± 0.009	NS
Histidina	0.042 ± 0.005	+Histidina	0.2904 ± 0.021	NS
Lisina	0.045 ± 0.001	+Lisina	0.2859 ± 0.017	NS
poli-lisina	0.062 ± 0.018	+poli-lisina	0.1456 ± 0.017	- 0.1208 *

Cuadro 5. Unión del rojo sirio en ácido pícrico a diversos compuestos catiónicos y efecto de estos sobre la unión del colorante a la colágena en solución. Los resultados expresan la absorbencia a 540 nm debida a la unión del rojo sirio con 20 µg de los diversos cationes (A) y el cambio en la absorbencia de la solución control (rojo sirio - 20 µg colágena) al adicionar 20 µg del soluto correspondiente (B). Cada dato es el promedio de tres experimentos independientes con muestras por triplicado, * indica diferencias significativas con el grupo control ($p < 0.05$), NS: no significativo.

(A) MOLECULA	ABS A 540nm	(B) MOLECULA	ABS A 540nm	CAMBIO EN LA ABS.
Colágena	0.2627 ± 0.0150	Colágena	0.2427 ± 0.010	-
Histona	0.3643 ± 0.0112	+Histona	1.0534 ± 0.042	+0.8107 *
Espermina	0.0057 ± 0.1094	+Espermina	1.0352 ± 0.027	+0.7925 *
Espermidina	0.0067 ± 0.0012	+Espermidina	0.2711 ± 0.009	NS
Putrescina	0.6017 ± 0.0012	+Putrescina	0.2590 ± 0.006	NS
Arginina	0.0043 ± 0.0030	+Arginina	0.2443 ± 0.027	NS
Histidina	0.0040 ± 0.0010	+Histidina	0.2241 ± 0.007	NS
Lisina	0.0053 ± 0.0015	+Lisina	0.2284 ± 0.025	NS
poli-lisina	0.1043 ± 0.0305	+poli-lisina	1.8646 ± 0.055	+1.622 *

Cuadro 6. Unión del rojo sirio en ácido picrico a diversos compuestos catiónicos y efecto de estos sobre la unión del colorante a la colágena en fase sólida. Los resultados expresan la absorbencia a 540 nm debida a la unión del rojo sirio con 20 µg de los diversos cationes (A) y el cambio en la absorbencia de la solución control (rojo sirio – 20 µg colágena) al adicionar 20 µg del soluto correspondiente (B). Cada dato es el promedio de tres experimentos independientes con muestras por triplicado, * indica diferencias significativas con el grupo control ($p < 0.05$), NS: no significativo.

(A) MOLECULA	ABS A 540nm	(B) MOLECULA	ABS A 540nm	CAMBIO EN LA ABS.
Colágena	0.2687 ± 0.0012	Colágena	0.2581 ± 0.034	-
Histona	0.0820 ± 0.0041	+Histona	0.1591 ± 0.019	-0.0990*
Espermina	0.0333 ± 0.0017	+Espermina	0.2773 ± 0.032	NS
Espermidina	0.0370 ± 0.0024	+Espermidina	0.2711 ± 0.020	NS
Putrescina	0.0347 ± 0.0017	+Putrescina	0.2750 ± 0.043	NS
Arginina	0.0320 ± 0.0024	+Arginina	0.2595 ± 0.034	NS
Histidina	0.0383 ± 0.0041	+Histidina	0.2241 ± 0.021	NS
Lisina	0.0367 ± 0.0045	+Lisina	0.2473 ± 0.013	NS
Poli-lisina	0.5020 ± 0.0322	+Poli-lisina	1.1798 ± 0.019	+0.9217*

DISCUSION

UNION DE ROJO SIRIO A COLÁGENA.

Los métodos utilizados en el presente trabajo para estudiar la unión de rojo sirio a la colágena son empleados para la determinación cuantitativa de colágena y se basan en la unión aparentemente específica de este colorante a dicha proteína.

El ensayo para la cuantificación de colágena desarrollado en fase sólida es una adaptación al método de Junqueira y col. (1979), realizado de acuerdo a la metodología descrita por Walsh y col. (1992) y modificado en este trabajo.

En contraste con el extendimiento y fijación de una solución de colágena sobre un portaobjeto (10x40 mm) (Junqueira y col. 1979), se colocó directamente en los pozos de una placa de ELISA, cantidades variables de colágena tipo I soluble, tipo I insoluble en forma de una mezcla completa (S.T.), y una porción soluble en ácido de la misma (SB); sin que esto afecte la calidad de tinción de la proteína en el intervalo ensayado (5-60 µg).

A pesar de que Puchtler y col. (1988) argumentan que el colorante rojo sirio no puede ser utilizado para la determinación cuantitativa de colágena puesto que su unión a dicha proteína no es estequiométrica, los resultados sugieren claramente que existe una relación lineal entre la concentración de colágena y la absorbancia del colorante a 540nm (Figs. 2 y 3), y coinciden en buena parte con los resultados obtenidos por otros investigadores (Junqueira y col. 1979; Kuttan y Di Ferrante, 1980; Marotta y Martino, 1985; Tullberg-Reinert y Jundt, 1999).

Las diferencias de absorbancia del color obtenido a partir de la colágena de la mezcla completa y de la porción soluble en ácido de la misma (Fig.2) se deben seguramente a que solo una porción de la proteína se ha solubilizado en ácido.

En el primer caso la colágena de la S.T. captó una cantidad mayor de colorante (Fig. 2) debido a que contiene la porción de proteína suspendida y soluble, y la colágena de la SB unió menos rojo sirio puesto que solo es una porción soluble obtenida de la mezcla total.

En el caso de la colágena de la SB los valores de absorbancia que obtuvimos, son básicamente los reportados por Walsh y col. (1992), ellos no aclaran que tipo de colágena usan como estándar, sin embargo, indirectamente y de nuestros resultados se puede inferir que emplearon colágena insoluble y solo adsorben la porción soluble de colágena a la placa de ELISA.

Por otra parte las diferencias en la cantidad de color fijado por la colágena soluble y la colágena de la mezcla completa, pueden deberse a que cada tipo de proteína al depositarse en la superficie de la placa de ELISA adopte cierta organización o autoensamble como sucede con otras proteínas como la laminina o fibronectina (Jones et al. 2000), esto en el caso de la forma insoluble, tal vez le permite fijar una mayor cantidad de colorante en comparación con la soluble.

En este trabajo se demostró que se puede adsorber con éxito la suspensión completa de colágena insoluble tipo I a la superficie de las placas y que esto es más útil como curva estándar; ya que la cantidad de la proteína que se adsorbe coincide con aquella de que se parte, es posible por lo tanto que el método de Walsh y col. (1992) conduzca a la sobreestimación del contenido de colágena en las muestras problema; ya que aunque aparentemente solo adsorben la fracción de colágena soluble ácido consideran la cantidad de colágena de la mezcla completa (tanto soluble como insoluble).

Adicionalmente se demostró que la colágena soluble e insoluble tipo I no necesita de condiciones alcalinas para su adsorción a una superficie de plástico como sucede con otras proteínas, por ejemplo las histonas (datos no mostrados) o albúmina sérica humana (Vynios y col. 1998) entre otras, esto debido probablemente a sus propiedades de molécula altamente adhesiva y más soluble en ácido.

UNION DE ROJO SIRIO A COLÁGENA EN SOLUCION.

El método para la cuantificación de colágena en solución y basado en la capacidad del rojo sirio para precipitar dicha proteína en una solución ácida, evita la necesidad de adsorber la colágena en un soporte sólido y puede ser más rápido.

Los resultados obtenidos con esta metodología contrastan con lo mencionado por Puchtler y col. (1988) sobre la unión no estequiométrica del rojo sirio a la colágena; ya que encontramos que existe proporcionalidad entre la absorbancia del color extraído y la cantidad de proteína precipitada ya sea soluble o insoluble.

En el caso de la forma soluble nuestros resultados son acorde con los publicados por Marotta y Martino, (1985) y Andersen y Elliot, (1991) en el intervalo ensayado, sin embargo la colágena insoluble une menos colorante y difiere en este aspecto de la forma soluble, sin embargo la unión es proporcional a la cantidad de proteína por lo que puede ser empleada como estándar en este método.

Es posible que las diferencias en la captación del colorante por la colágena soluble e insoluble, se deba a diferencias tanto estructurales como químicas entre ambas. La forma insoluble probablemente presentó una mayor complejidad estructural tal que impida la difusión del colorante; pues según Puchtler y col. (1988) la facilidad de penetración (difusión) de un colorante tipo azo depende entre otros factores del grado de empaquetamiento de las cadenas polipeptídicas (por ejemplo las dimensiones de los espacios entre estas) y del tamaño de la molécula del colorante, esto puede ocasionar que proteínas idénticas químicamente pero con distinto grado de empaquetamiento exhiban patrones de tinción ampliamente variables, lo que puede explicar en parte los resultados obtenidos con la colágena soluble e insoluble.

Por otra parte la forma soluble tal vez presentó una mayor cantidad de sitios potenciales para la unión del colorante, por ejemplo una mayor proporción de residuos básicos que podrían favorecer una mayor incorporación del colorante a ella.

EL ACIDO PICRICO INCREMENTA LA FIJACIÓN DEL COLORANTE POR COLÁGENA

El incremento en la unión del rojo sirio a la colágena insoluble observado en presencia del ácido picrico saturado, probablemente se debe a la acidez mayor que este aporta (pH de 1.5 en comparación con pH 2.5 del ácido acético); pues claramente se ve que esto favorece una mayor incorporación de rojo sirio a la colágena (Fig. 4).

Una posible explicación para esto, es la idea de que a valores de pH muy ácidos se producen alteraciones en varios tipos de enlaces en las proteínas, sean iónicos, hidrofóbicos, enlaces de hidrógeno (Morris, 1975), esto produce cambios estructurales en la proteína ocasionando repulsión entre sus cargas que a su vez originan la distorsión o ruptura de una gran proporción de sus enlaces intercadena (Prento, 1993); se piensa que esto pudo haber facilitado la difusión del colorante hacia la estructura de la colágena, resultando en un mayor número de moléculas de rojo sirio fijadas a ella a pH más ácido, como en el caso del ácido picrico.

EFFECTO DE LOS IONES Mg^{2+} y Ca^{2+} SOBRE LA UNION DEL ROJO SIRIO CON LA COLÁGENA.

El incremento en la unión del rojo sirio a la colágena (1-20 μg) observado en presencia de Mg^{2+} puede deberse a un cambio en la conformación del colorante (inducido por el Mg^{2+}) que le permite ser unido por la colágena en una mayor proporción.

Así mismo, es probable que una vez fijada una molécula de rojo sirio por la colágena, el Mg^{2+} favorezca la unión de moléculas adicionales de colorante probablemente por medio de los grupos sulfónicos, incrementando una vez más la unión del rojo sirio; sin embargo el efecto de saturación de la colágena observado en presencia del $MgCl_2$ (Fig. 5) indica la existencia de un número finito de sitios de unión a rojo sirio sobre la colágena y que estos son disminuidos por el Mg^{2+} .

En este caso es posible que a cierta concentración de proteína el Mg^{2+} deje de favorecer la unión incrementada del rojo sirio y comience a competir con este por los sitios de unión, impidiendo la fijación de más moléculas de colorante a la colágena, pues con otros iones como el Na^+ , el K^+ se ha demostrado este efecto de competencia (Kuttan y Di Ferranti, 1980; Einbinder y Schubert, 1951).

El efecto de precipitación del rojo sirio por el Ca^{2+} indica la existencia de enlaces entre estas dos moléculas, más fuertes de los que se forman con el Mg^{2+} , ocasionados probablemente por la propia naturaleza del calcio. Al lavar el precipitado colágena-rojo sirio formado en presencia de Ca^{2+} no se puede extraer el colorante, lo que indica que su unión ya sea con colágena o rojo sirio es más fuerte que la del Mg^{2+} . Esto probablemente explica por que siempre se encontró una cantidad constante de colorante (precipitado al unirse con la colágena o precipitado con el ion) a pesar de que la concentración de proteína fue variable.

DESNATURALIZACIÓN DE LA COLÁGENA POR GLUCOSA.

La triple hélice de la colágena puede ser desnaturalizada en solución incubándola a temperaturas por encima de su punto de fusión (Gallop y Seifter, 1963), y este fenómeno puede ser visualizado por un efecto hipercrómico en la región de los 227 nm (Lindy y col. 1986), sin embargo, en este trabajo los ensayos para la desnaturalización de colágena soluble realizados de acuerdo al procedimiento de este último autor, mostraron que el cambio en la temperatura tuvo poco efecto sobre la desnaturalización de la colágena (cuadro 3), y por otra parte, el efecto hipercrómico referido por este autor, en nuestro caso lo observamos en la región de los 212 nm.

Encontramos que el responsable en mayor parte de la aparente desnaturalización de la colágena es la glucosa 1 M, dado que el efecto hipercrómico se observó aun sin tratamiento con calor cuando esta estuvo presente (cuadro 3). Se cree, que tal efecto se debe a la capacidad de la glucosa de disociar a la colágena fibrilar (Hayashi y Nagai, 1972) de un modo reversible; pues si se incubaba la colágena a 37°C en presencia de glucosa (no formación de fibras), y luego se dializa con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) para eliminar la glucosa, es capaz de volver a asociarse y formar fibras de proteína en un mismo grado cómo los hacen los controles donde la glucosa ha sido omitida (Hayashi y Nagai, 1972; Lien y col. 1984).

Se ha demostrado que la glucosa interfiere en la agregación de moléculas de colágena, y por lo tanto en la formación de los enlaces cruzados de tipo covalente (Lien y col. 1984) que se forman entre residuos específicos de lisina o hidroxilisina (Jackson, 1980); estos enlaces son necesarios para la estabilización de la molécula de colágena, en ausencia de estos se ha demostrado que la proteína se desnaturaliza y esta más expuesta a la degradación por colagenasas (Harris y Vater, 1982).

UNION DEL ROJO SIRIO POR LA COLÁGENA DESNATURALIZADA.

La cantidad de rojo sirio unido por la colágena fue siempre la misma, independientemente si esta se encuentra desnaturalizada por glucosa 1 M o en su estado nativo. Aparentemente la estructura tridimensional de la colágena tiene poca importancia en la fijación del colorante, o el grado de desnaturalización que la proteína experimenta en presencia de la glucosa no afecta de manera significativa su unión con el rojo sirio.

Kuttan y Di Ferrante (1980) han reportado previamente que la cantidad de rojo sirio fijado por la colágena no se ve alterada cuando esta es desnaturalizada por tratamiento con calor en condiciones similares a las nuestras, sin embargo un posible efecto de la glucosa en este aspecto no sabemos si ha sido reportado.

SELECTIVIDAD DEL ROJO SIRIO.

En solución, la reacción con el rojo sirio de algunas de las poliaminas probablemente se deba a sus grupos amino cargados positivamente y distribuidos a todo lo largo de su estructura (Tabor y Tabor, 1980; Morgan, 1999). Como tal es probable su unión con los grupos sulfónicos de la molécula de rojo sirio.

No obstante y de acuerdo con nuestros resultados, es probable que el número y tipo de grupos amino primarios o secundarios ($\text{NH}_2 \rightleftharpoons \text{NH}$) sea importante para su unión con el colorante, esto debido a que la putrescina quien posee solo dos grupos amino (NH_2) fue incapaz de unirse al rojo sirio y por tanto de producir interferencia.

El efecto del ácido pícrico con la espermidina puede deberse a que los aniones picrato poseen una mayor capacidad para unirse a los sitios catiónicos de esta molécula y evitan que el rojo sirio lo haga, probablemente la carga negativa de tales aniones debida a sus siete átomos de oxígeno arreglados en pares en orbitales solos (Puchtler y col. 1988) facilita su interacción con moléculas disponibles o iones.

Por el contrario, con la espermina, pensamos que la presencia de un mayor número de grupos amino y la mayor longitud de esta molécula favorecen su capacidad de unión con el colorante, mientras que su posibilidad de fijar aniones picrato puede ser disminuida.

En fase sólida ninguna de las poliaminas produce interferencia debido a que no son capaces por si mismas de adherirse a la superficie de la placa (datos no mostrados), para su adsorción a una superficie de plástico más bien se requiere que estas moléculas pequeñas sean conjugadas con una proteína transportadora o un polímero de aminoácidos (Fujiwara y Kitagawa, 1993; Vynios y col. 1998), pero tal situación no fue un objetivo en nuestro trabajo.

Debido a que en las poliaminas las cargas se encuentran extendidas por toda la molécula, tienen alta flexibilidad estérica, lo que les da la capacidad de interactuar con estructuras helicoidales y producir un efecto neutralizante sobre sus cargas (Wallace, 1999). En este sentido se esperaría un efecto inhibitorio en algún grado, de los poliaminas sobre la captación del rojo sirio por la colágena, pero nuestros resultados no proporcionan evidencia de esto o probablemente empleando estas en una mayor concentración respecto de la colágena podríamos encontrar cierto grado de inhibición sobre la unión del colorante.

Respecto a la poli-lisina, en el ensayo en fase sólida y en presencia del ácido pícrico, creemos que su carácter poli-básico y su capacidad de adherirse a la superficie de la placa es el responsable de su unión con el rojo sirio, y corresponde con lo reportado previamente por Nielsen y col. (1998).

En solución, sin embargo, cuando el colorante se disuelve en ácido acético 0.5 M, los resultados indican que la poli-lisina, probablemente se une a la colágena pero no al rojo sirio e inhibe en cierto grado la unión de este con la proteína. Aparentemente el poli-aminoácido ocupa los mismos sitios de unión en la colágena que el rojo sirio, y de ahí probablemente su efecto sobre la fijación del colorante por colágena.

Siguiendo esta misma línea de ideas en ácido pícrico por el contrario la poli-lisina no se une a la colágena, pero si al colorante (cuadro 2), probablemente debido a la posible distorsión y/o desnaturalización que la molécula de colágena experimenta en presencia del ácido pícrico, como ya lo hemos mencionado.

En solución en presencia de ambos ácidos, la unión de la fracción de histona rica en arginina con el rojo sirio es muy probable que se deba a su gran proporción de residuos básicos de arginina (Luger y Richmond, 1998), los que probablemente favorecen su unión con el colorante.

Por otra parte los resultados en fase sólida en donde la histona no une colorante ni afecta la unión debida a la colágena, se deben a que la fracción de histona no se adhiere por si misma a la superficie de la placa (resultados no mostrados) probablemente debido al pH al cual se llevó a cabo la adsorción.

CONCLUSIONES

- 1.- Las formas soluble e insoluble de colágena unen cantidades diferentes de rojo sirio, pero siempre esta se incrementa de manera lineal con la concentración de proteína presente.
- 2.- El ácido pícrico y el ion Mg^{+2} pueden favorecer la captación de rojo sirio por la colágena y por tanto incrementan la sensibilidad del método para cuantificar colágena cuando se emplea este colorante.
- 3.- Las poliaminas, la histona y poli-lisina se unen al rojo sirio bajo ciertas condiciones experimentales, consecuentemente se piensa que son capaces de interferir en los métodos para cuantificar colágena basados en el empleo del rojo sirio.
- 4.- El grado de desnaturalización que experimenta la colágena en presencia de glucosa 1 M no afectó su capacidad de interacción con el rojo sirio ya sea aumentando o disminuyendo su unión.
- 5.- Los dos ensayos colorimétricos empleados en el presente trabajo, permiten obtener una determinación cuantitativa de la colágena, en forma simple, sensible, y económica y permite el manejo de un gran número de muestras.
- 6.- El ensayo desarrollado en placa es más selectivo, sin embargo, presenta una limitante, que es el tiempo de adsorción de la colágena.
- 7.- El ensayo basado en la precipitación de colágena en solución ácida es más rápido puesto que elimina la necesidad de adsorber la proteína, pero es menos selectivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Anderson S.M.L; Elliot R.J. 1991: Evaluation of a new, rapid collagen assay. Biochem. Soc. Trans. 19: 389
- Armendáriz-Borunda, J; Rojkind, M. 1984. A simple quantitative method for collagen typing in tissue sample: Its application to human liver with schistosomiasis. Collagen Rel. Res. 4: 35-47.
- Barker D.F; Hostikka S.L; Zhou J; Chow L.T; Oliphant A.R; Gerken S.C; Gregory M.C; Scolnick M.H; Atkin C.L; Triggvason K. 1990: Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. Science. 248: 1224-1226
- Berg R.A; Prockop D.J. 1973: The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 52 (1): 115-119.
- Berg R.A. 1982: Determination of 3- and 4-Hydroxyproline. En: Methods in Enzymology. Cunningham L.W; Frederickson D.W. (Editores) Vol.82, p. 372-398, Academic Press. San Diego, CA.USA.
- Brown J.C; Timpl R. 1995: The collagen superfamily. Int. Archiv. Allergy Immunol. 107:484-190.
- Byers, H. P. 1990. Brittle bones-fragile molecules: disorders of collagen gene structure and expression. Trends Genet 6 (9): 293-300
- Christiano A.M; Ryyanen M; Uitto J. 1994: Dominant dystrophic epidermolysis bullosa: identification of a Gly→Ser substitution in the triple-helical domain of type VII collagen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:3549-3553.
- Cohn D.H. Byers P.H; Steinman B; Gelinas R.E. 1986: Lethal osteogenesis imperfecta resulting from a single nucleotide change in one human pro α (I) collagen allele. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 38:5926-5930.
- Einbender J; Schubert M. 1951. Binding of mucopolysaccharides and dyes by collagen. J. Biol. Chem. 186: 335-341.
- Fujiwara K y Kitagawa T. (1993). A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for spermidine using glutaraldehyde coupling of the hapten to carrier-coated microtiter plates. J. Biochem. 114: 708-713.
- Gallop P. M; Seifter S. (1963). Preparation and properties of soluble collagens. Methods. Enzymol. 93: 635-641
- Guerret S; Rojkind M; Druguet M; Chevallier M; Grimaud J.A. 1988: Immunohistochemical micromethods for the measurement of specific collagen types in human liver biopsies. Collagen Rel. Res. 8: 249-258.

Harris E.D; Vater C.A. (1982). Vertebrate collagenases. En: *Methods in enzymology*. Cunningham, L.W; Fredericksen D.W (Editores) vol. 82, p. 423-453. Academic Press, San Diego, CA.USA.

Jackson D.S. (1980). The substrate collagen. En: *Collagenase in normal and Pathological Connective tissues*. Woolley and J.M. Evanson (Editores). John Wiley & Son Ltd. p. 1-7.

James J; Bosch K.S; Aronson D.C; Houtkouper J.M. 1990: Sirius red histophotometry of sections in the assesment of the collagen content of liver tissue and its aplication in growing rat liver. Liver 10:1-15.

Jones J.C.R; Dehart G.W; G.M; Goldfinger L.E. 2000. Laminins: An overview. Micros. Res. Tech. 51: 211-213.

Junqueira L.C.U; Bignolas G; Brentani R. R. 1979: A simple and sensitive method for the cuantitative determination of the collagen. Anal. Biochem. 94:96-99.

Kalaria R.N; Pax A.B. 1995: Increased collagen content of cerebral microvessels in Alzheimer's disease. Brain Res. 703:349-352.

Kleinman H. K; Luckenbill-Edds L; Cannon F. W; Sphel G. C. 1986: Use of extracellular matrix components for cell culture. Anal. Biochem. 166: 1-13.

Kuivaniemi H; Tromp G; Prockop D.J. 1991: Mutations in collagen genes: causes of rare and some common diseased in humans. FASEB J. 5:2052-2060.

Kuttan R; Di Ferrante N. 1980: Sirius red-collagen interaction: a method for the measurement of collagen and the bacterial collagenase activity. Biochem. Int. 1 (5): 455-462.

Lien Y.H; Stern R; Fu J.C.C; Siegel R.C. (1984). Inhibition of collagen fibril in vitro and subsequent cross-linking by glucose. Science 225: 1489-1491.

Lillie R. D. 1977: *Conn's Biological Stains*. Williams & Williams Baltimore, M D; USA. p.41-59, 199.

Lindy S; Sorsa T; Suomalainen K; Lauhio A; Turtu E. 1986: Hyperchromic effect of collagen induced by human collagenase. Eur. J. Biochem. 156:1-4.

López-De León A; Rojkind M. 1985: A Simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. J. Histochem. Cytochem. 33 (8):737-743.

Luger K; Richmond T. (1998). The histones tails of the nucleosome. Curr. Opin. Genet. Dev. 8: 140-146

Marotta M; Martino G. 1985: Sensitive spectrophotometric method for the cuantitative estimation of collagen. Anal. Biochem. 150:86-90.

ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA

Miller E.J; Gay S. 1982: Collagen: An Overview. En: Methods in enzymology. Cunningham, L.W; Fredericksen D.W (Editores) vol. 82, p.3-33. Academic Press, San Diego, CA.USA.

Morgan D.M.L. (1999). Polyamines An overview. Mol. Biotech. 11: 229-249.

Morris, J.G. 1975. Fisicoquímica para biólogos. Reverte, España. p: 164-165

Nielsen L.F; More D; Kirkeb S; Garbarsch Ch. 1998: Sirius red and acid fuchsin staining mechanism. Biotech. & Histochem. 73 (2):71-77.

Prento P. 1992. Van Gieson's picrofuchsin. The staining mechanism for collagen and cytoplasm, and an examination of the diffusion rate model of differential staining. Histochem. 99: 163-174.

Prockop D. J; Kivirikko K.I. 1995: Collagens: molecular biology, diseases and potential for therapy. Annu. Rev. Biochem. 64: 403-434.

Puchtler H; Meloan S.M; Woldrop F.S. 1988: Are picro-dye reactions for collagen quantitative? Histochem. 88:243-256.

Ramachandran G.N; Bansal M; Bhathagar R.S. 1973: Hypotesis on the role of hydroxiprolin stabilizing collagen structure. Biochem. Biophys. Acta. 322:166-171.

Tabor C.W; Tabor H. (1984). Polyamines. Ann. Rev. Biochem. 53: 749-790.

Torre-Blanco A; Toledo I. 1981: The isolation, purification and characterization of the collagen of *Cysticercus cellulosea*. J. Biol. Chem. 256 (11)5926-5930.

Tullberg-Reinert H; Jundt G. 1999: In situ measurement of collagen syntesis by human bone cell with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor β 2 and ascorbic acid – fosfate. Histochem. Cell Biol. 112:271-276.

Van Der Rest M; Garrone R. 1991: Collagen family of proteins. FASEB J. 5:2814-2823.

Vynios D.H; Vamvacas S.S; Kalpaxis D.L; Tsiganos P. (1998). Aggrecan immobilization onto polystyrene plates through electrostatics interactions with spermine. Anal. Biochem. 260: 64-70.

Wallace H.M. (1998). Polyamines: specific metabolic regulators or multifunctional polycations?. Biochem Soc. Trans. 26: 560-561.

Walsh B. J; Thornton S.C; Penny R; Breit S.N. 1992: Microplate reader-based quantitation of collagens. Anal. Biochem. 203:187-190.

Yoshioka H; Oyamada I; Usuku G. 1987: An assay of collagenase activity using enzyme linked immunosorbent assay for mamalian collagenase. Anal. Biochem. 199:172-177.

Zar, J. H. 1992. Analysis biostatistics. 2th ed. Edit. Prentice Hall, New Jersey USA. p. 292-304.