



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA LA  
DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE  
COLÁGENA EN PULMÓN DE RATÓN**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTA:

ADRIÁN MUNGUÍA REYES

TUTORA:

DOCTORA ANNIE PARDO SEMO

2007

Esta tesis fue apoyada por el macroproyecto: SDI.PTID.05.6 de la Universidad Nacional Autónoma de México



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero empezar agradeciendo a mi Universidad por la oportunidad que me dio para cumplir con este objetivo, por abrigarme y permitirme conocer a todos los profesores que me formaron en esta hermosa carrera.

A mis papas, Elvira Reyes Ibarra y Juan Munguía Arellano, por darme la vida, por todos sus esfuerzos a lo largo de estos más de 24 años para que yo pudiera ser quien soy ahora, y sé que están preocupados por mi futuro pero también sé que están contentos porque estoy haciendo y siendo quien quiero ser, eso no lo duden!! A mis hermanos. A Bere por quererme tanto, a Juan Carlos por demostrarme que puedes ser responsable sin dejar de ser La Banda, mis hermanos menores por ser el futuro y la motivación para el esfuerzo de toda la familia, a mi cuñado Carlos y sobrinos Yivan y Leo. A todos ellos por ser una gran familia, unida como pocas, mi Familia.

Jazz gracias por todo el apoyo durante estos 4 años, han sido los mejores de mi vida, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por ayudarme a ser una mejor persona, por haberme permitido conocer a Damjir aunque solo hayan sido unos instantes, por creer en mi desde siempre.

A mi asesora Dra. Annie Pardo Semo por permitirme pertenecer a este gran grupo de investigación, por su paciencia y enseñanzas.

Bernardo por estar aquí durante estos 13 años, por decirme lo que estoy haciendo mal aunque sabes que nunca te hago caso, gracias man por ser mi amigo. Ángel y Hugo se les aprecia y agradece por su amistad en tantos años.

A mis compañeros de carrera, que se convirtieron en grades amigos: Javier, Yire, Pablo, Flaw, Sol, Luis, Tania, Silvia, Karla a todos gracias.

A Reme y Jorge por compartir su conocimiento conmigo de manera incondicional, A la M. en C. Martha Montaña por su apoyo durante mi tiempo en el INER, a todo el grupo de investigación: Dr. Selman, Carina, Sandra, Abi, Ileana, Pepe, Víctor, Marco.

Al contrario de lo que generalmente se piensa, tomar una decisión es una de las decisiones más fáciles de este mundo, como cabalmente se demuestra con el hecho de que no hacemos nada más que multiplicarlas a lo largo del santísimo día, aunque, y ahí tropezamos con el busilis de la cuestión, éstas siempre nos traen a posteriori sus problemitas particulares, o, para que nos entendamos, sus rabos asomando, siendo el primero nuestro grado de capacidad para mantenerlas y el segundo nuestro grado de voluntad para realizarlas.

José Saramago

## INDICE

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
MATRIZ EXTRACELULAR.....	7
GLICOSAMINOGLICANOS.....	9
PROTEOGLICANOS.....	9
COLAGENA.....	11
SINTESIS Y MADURACIÓN DE COLÁGENA.....	13
COLÁGENAS FIBRILARES.....	15
COLÁGENAS ASOCIADAS A FIBRAS.....	16
COLÁGENAS MEMBRANAS BASALES .....	17
MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE COLAGENA .....	18
OBJETIVOS.....	20
MATERIAL y MÉTODOS.....	21
RESULTADOS.....	25
DISCUSIÓN.....	30
REFERENCIAS.....	32

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La matriz extracelular (MEC) es un componente muy importante para el mantenimiento de la integridad estructural de los organismos multicelulares. Está compuesta por una mezcla compleja de macromoléculas que incluyen colágenas, lamininas, fibronectinas, glicoproteínas de membrana basal como entactina ó nidogena y proteoglicanos.

Por mucho tiempo se pensó que la MEC era una estructura inerte y que su función era solo estructural. En la actualidad, se sabe que esta estructura desempeña un papel activo y complejo en una gran cantidad de procesos fisiológicos celulares básicos como por ejemplo la proliferación, migración, apoptosis, etc.

Por otro lado, es importante señalar que existen condiciones patológicas en las cuales la composición de la MEC en los diferentes órganos puede verse afectada. Por ejemplo, las enfermedades fibrosantes de diversos órganos como pulmón, hígado, páncreas y corazón entre otros se caracterizan por la acumulación excesiva de las proteínas de MEC, fundamentalmente de colágenas fibrilares, que conducen a la formación de una cicatriz y la destrucción de la arquitectura normal del órgano en cuestión.

Las colágenas son las proteínas que constituyen principalmente a las matrices extracelulares y son las proteínas más abundantes de los mamíferos; de ahí la importancia de que contemos con métodos de cuantificación que nos permitan determinar de manera correcta el contenido de esta proteína en diferentes tejidos de los mamíferos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

## INTRODUCCIÓN

### MATRIZ EXTRACELULAR

Los tejidos en animales, además de estar constituidos por células, contienen un espacio extracelular que se encuentra lleno de una intrincada red de macromoléculas que constituyen la MEC. La matriz extracelular es el material que se encuentra fuera de las células, entre los límites epitelial y endotelial de los animales multicelulares (1).

En cada uno de los diferentes órganos la presencia y componentes de la MEC varía, por ejemplo en el caso de la piel, cartílago, tendón y hueso, es muy abundante y las variaciones en los componentes y en la manera en la que estén organizados en la matriz extracelular da lugar a una gran cantidad de formas, cada una adaptada a los requerimientos funcionales del tejido en particular. En otros órganos puede ser muy escasa como en el cerebro y la médula espinal donde la matriz extracelular se vuelve un componente menor. La matriz se encuentra además en diversas estructuras, por ejemplo se encuentra en la membrana alveolo capilar a través de la cual se realiza el intercambio gaseoso en el pulmón (2).

La MEC es un componente muy importante para mantener la estructura de los tejidos de los organismos multicelulares. Hace tiempo se pensaba que la matriz era una estructura inerte, pero ahora sabemos que es todo lo contrario, esta estructura desempeña un papel activo y complejo en una gran cantidad de procesos básicos de las células (1, 2).

Como ya mencioné la MEC no solo provee un soporte sólido para las células sino que interactúa como un complejo de reserva para una gran cantidad de moléculas que regulan procesos celulares complejos como migración,

proliferación y forma, estos procesos son regulados con la liberación controlada de moléculas como citocinas y factores de crecimiento como por ejemplo la familia de factores de crecimiento de fibroblastos y la superfamilia de factores de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$  por sus siglas en ingles) (2).

Las células presentan en su superficie receptores de MEC (integrinas, por ejemplo) y las moléculas que conforman a la MEC interactúan entre si y forman una estructura tridimensional a la cual las células se adhieren. Las macromoléculas que constituyen a la matriz extracelular son producidas en su mayoría de manera local por células que se encuentran dentro de la matriz. En los tejidos conectivos, las macromoléculas de matriz son secretadas en su mayoría por células especializadas llamadas fibroblastos (3). En algunos tipos especializados de tejido conectivo, como por ejemplo cartílago y hueso, las macromoléculas de matriz son secretadas por células de la familia de los fibroblastos que reciben un nombre más específico, como condroblastos para el cartílago y osteoblastos para el hueso.

La MEC está compuesta por una mezcla compleja de moléculas insolubles que se pueden dividir en dos grandes grupos:

- (1) Cadenas de polisacáridos llamadas glicosaminoglicanos, las cuales comúnmente se encuentran unidas covalentemente a proteínas y son llamadas proteoglicanos, y
- (2) Las proteínas fibrilares, que incluyen colágenas, lamininas, fibronectinas, elastina y entactina, las cuales tienen funciones estructurales y adhesivas. La elastina le confiere cualidades de flexibilidad y elasticidad a la matriz, las lamininas son proteínas de adhesión y la fibronectina participa en la interacción célula-integrina-matriz.

## **GLICOSAMINOGLICANOS**

Los glicosaminoglicanos (GAG) son cadenas de polisacáridos compuestas de unidades repetidas de disacáridos, son polímeros lineales sin ramificaciones. Uno de los dos azúcares es generalmente un ácido urónico, glucurónico o idurónico, y la otra molécula de azúcar es siempre una amino azúcar, que puede ser N-acetilgalactosamina o N-acetilglucosamina que debido a sus grupos carboxilo y sulfato principalmente los GAG son muy aniónicos; de hecho, son las moléculas más aniónicas producidas por células animales. Además los ácidos aniónicos se encuentran ionizados a pH fisiológico, esto es importante porque debido a esta característica, los iones positivos como el sodio, por ejemplo, son atraídos hacia este cúmulo de cargas negativas, lo que a su vez atrae gran cantidad de moléculas de agua hacia las cadenas de GAG (3). Esto crea turgencia en la matriz, lo que le da la capacidad de resistir fuerzas de compresión, (al contrario de las fibras de colágena que resisten fuerzas de estiramiento).

En tejidos conectivos los GAG constituyen menos del 10 % del peso de las proteínas fibrilares, sin embargo como forman geles hidratados, los GAG llenan la mayoría del espacio extracelular y proveen de soporte mecánico a los tejidos (3).

## **PROTEOGLICANOS**

Los proteoglicanos son moléculas formadas por una proteína central, a la cual están unidas covalentemente una o más cadenas de glicosaminoglicanos (Fig.1). La composición de los proteoglicanos es extremadamente variada, ya que se da una gran diversidad en las proteínas centrales, así también en los tipos, número y grado de sulfatación de los GAG que están unidos a la cadena central (2).

Los proteoglicanos tienen una gran variedad de funciones y pueden encontrarse constituyendo la matriz extracelular, en superficies celulares o en el interior de las células. Los proteoglicanos pueden unirse a moléculas de señal, como por ejemplo a factores de crecimiento, y pueden aumentar o disminuir la actividad de señalización. También tienen propiedades de adhesión y antiadhesivas, y pueden promover la formación de vasos sanguíneos y la fibrilogenésis de las moléculas de colágena (2)

La síntesis y degradación de los proteoglicanos son procesos muy activos y la vida media de estas moléculas en la matriz extracelular es muy corta, de unos cuantos días a algunas semanas.

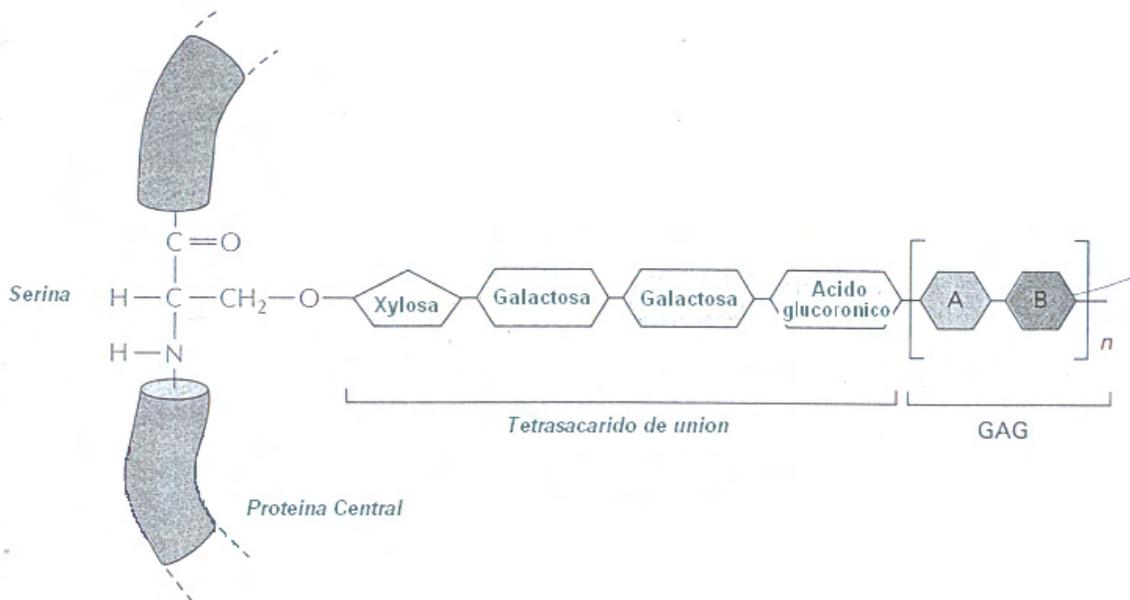


Fig. 1.- Esquema que representa la unión de una molécula de GAG con una proteína central, para formar una molécula de proteoglicanos. Imagen modificada de Alberts, 2004 (3).

## **PROTEINAS FIBRILARES**

### **COLÁGENA**

Las colágenas son una familia de moléculas que se encuentra en todos los animales multicelulares, siendo el componente principal de la matriz extracelular y las proteínas más abundantes de los animales y constituyen el 25 % de la masa proteica total de los mamíferos (3). Las colágenas forman una superfamilia de genes altamente relacionados, y su secuencia se caracteriza por repeticiones de una unidad de tres aminoácidos Glicina, X y Y donde X y Y pueden ser hidroxiprolina ó hidroxilisina.

Una molécula típica de colágena tiene una estructura de triple hélice, la cual consiste en tres cadenas polipeptídicas las cuales son llamadas cadenas alfa, cada una de estas cadenas alfa tienen la forma de una hélice la cual gira a mano izquierda con aproximadamente 3.3 residuos de aminoácidos en cada vuelta (1). Estas tres cadenas además se enrollan con un giro en el sentido contrario (mano derecha) sobreponiéndose una encima de otra con lo que forman la estructura de triple hélice.

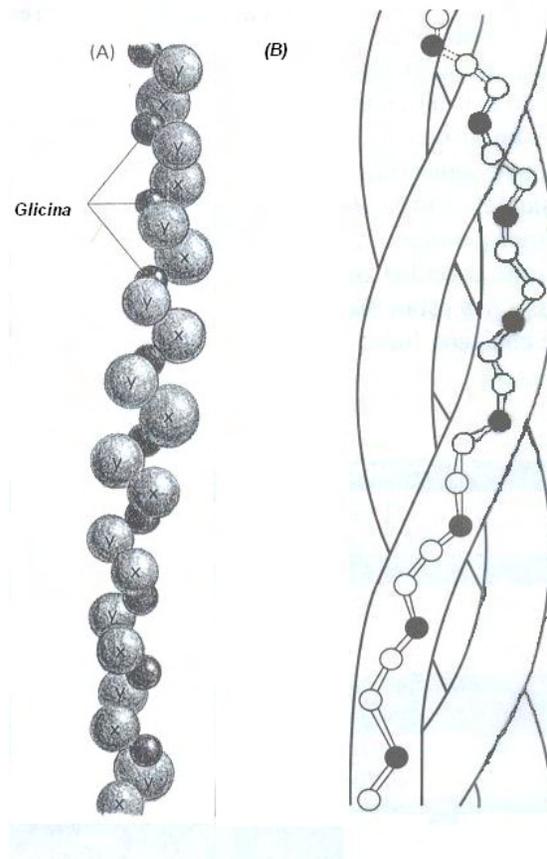
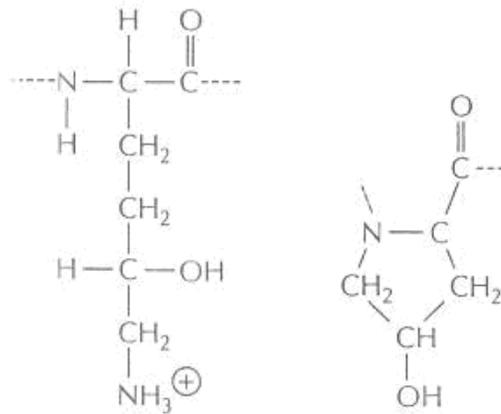


FIGURA 2.- (A) Modelo de estructura de cadena alfa, las esferas representan cada aminoácido, las esferas oscuras cada tercer posición representan glicina.

(B) Modelo de estructura de triple hélice de una molécula de colágena formada por tres cadenas alfa. Imágenes tomadas de Alberts, 2004 (3), y de Jiménez, 2003 (2).

Las colágenas, como ya se mencionó son ricas en glicina, que constituye uno de cada tres aminoácidos de cada cadena alfa, además contiene prolina e hidroxiprolina aminoácidos fundamentales en la formación de la estructura de la triple hélice de las colágenas. La glicina es el aminoácido más pequeño y debido a su tamaño es el único aminoácido que cabe en el centro de la triple hélice, gracias a esto permite que las tres cadenas alfa de la estructura de la colágena se empaquen juntas. Por su parte la prolina e hidroxiprolina estabilizan la conformación helicoidal de cada cadena alfa.



**Hidroxisilina**

**Hidroxirolina**

Figura 3 Hidroxirolina e Hidroxisilina.  
Aminoácidos modificados presentes en colágena.

Se han identificado más de 40 genes de la familia de colágenas de vertebrados que codifican para diferentes cadenas alfa (4), por lo que se podrían formar más de 10,000 tipos de colágenas formadas con distintos ensamblajes de estas cadenas alfa, sin embargo en el presente solo se conocen alrededor de 28 diferentes tipos de colágenas. (5)

## SINTESIS Y MADURACIÓN DE COLÁGENA

Las cadenas polipeptídicas de colágena son sintetizadas de manera individual en los ribosomas y son introducidas en el lumen del retículo endoplásmico como precursores grandes que son llamados cadenas pro-alfa. Estos precursores tienen aminoácidos adicionales llamados propéptidos en los extremos amino y carboxilo terminal (3). En el lumen del retículo endoplásmico aproximadamente la mitad de las prolinas son hidroxiladas. La prolina es hidroxilada por una enzima llamada hidroxilasa de prolina (2), algunos residuos de lisina también son hidroxilados por una enzima específica llamada hidroxilasa de lisina, la cual agrega un grupo hidroxilo en las lisinas que se encuentran en el

lado amino de residuos de glicina y la molécula resultante de esta hidroxilación es llamada hidroxilisina (6)(Fig.3). Posteriormente cada cadena pro-alfa se combina con otras dos cadenas y forma una molécula helicoidal llamada procolágena (Fig.4) la cual es secretada a través de una vesícula secretora.

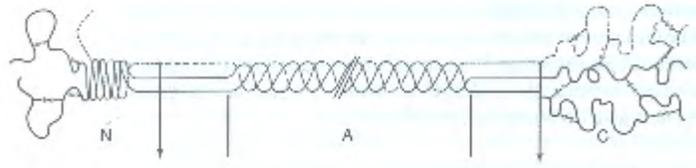


Fig. 4.- Representación Esquemática de pro colágena. Imagen tomada de Jiménez, 2003 (2).

Después de que la procolágena es secretada los propéptidos de las colágenas fibrilares son removidos por enzimas proteolíticas específicas antes de ser depositadas como fibras de colágena en el espacio extracelular (2, 7).

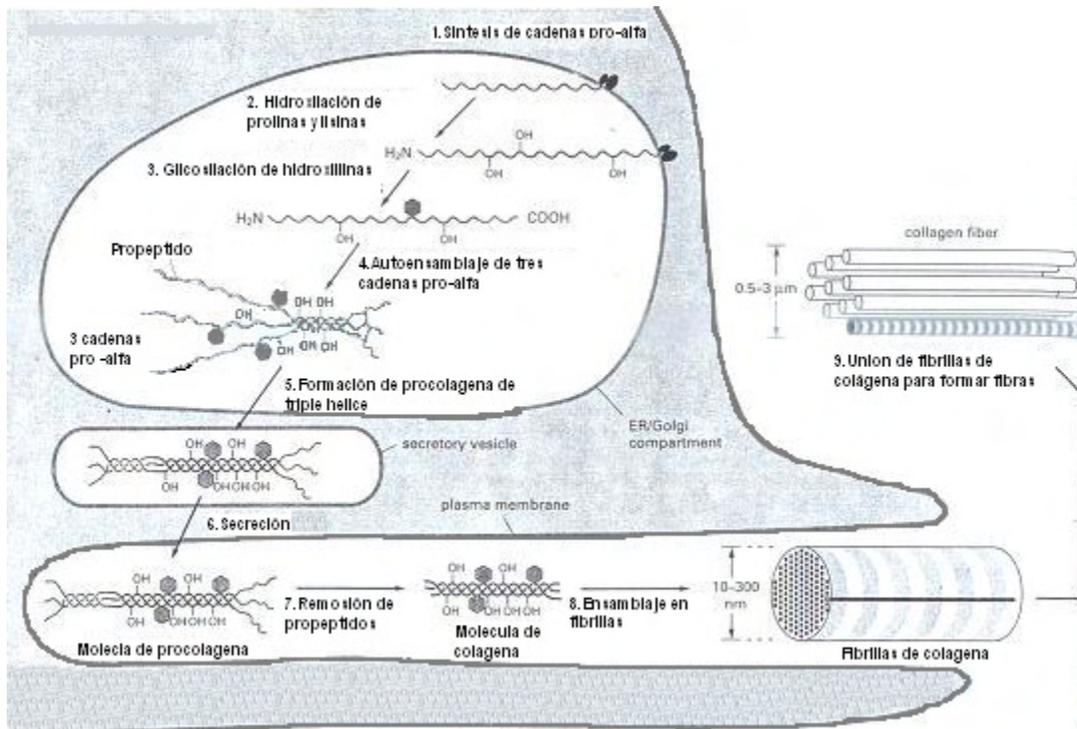


Fig. 5.- Esquema de los pasos intra y extracelulares en la formación y maduración de colágena fibrilar. Modificado de Alberts, 2004 (3)

Como ya fue mencionado anteriormente existen alrededor de 28 moléculas de colágena diferentes, a cada tipo de colágena se le asigna un numero romano, que refleja generalmente el orden cronológico en el que fueron identificadas. Las colágenas que tienen características estructurales similares se agrupan en clases (5).

### **COLÁGENAS FIBRILARES**

Se conocen así a las colágenas que forman fibras, en esta clase están incluidas las colágenas tipo I, II, III, V y XI. Cuando se observan los tejidos conjuntivos con microscopio electrónico las fibras de colágena presentan estriaciones características. A estas estriaciones se les ha interpretado en colágena tipo I como alineamientos de moléculas de 300 nm. de longitud las cuales están desfasadas por espacios de 67 nm esta distancia es llamada D (fig.6) (2). Esto es debido a que en la formación de las fibrillas de colágena cada extremo de la molécula de colágena se desfasa una distancia D del extremo de las moléculas vecinas.

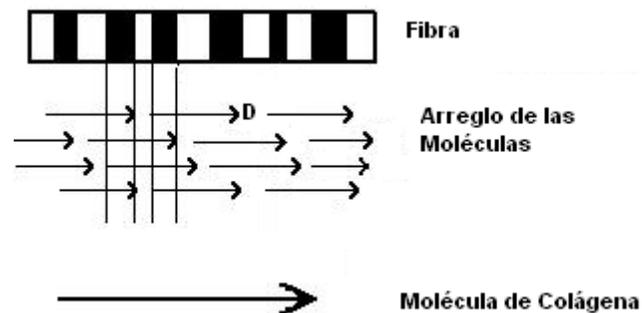


Fig. 6 Esquema de arreglo molecular de colágena en una fibra, la parte superior del esquema representa como se observan las estriaciones de las fibras en el microscopio electrónico.

Las colágenas fibrilares I, II, III, V y XI son moléculas estructuralmente homólogas, y esto explica el bandeo similar entre diferentes tejidos, aún cuando existen diferencias en el empaquetamiento tridimensional de las fibras y también en el diámetro de las fibras.

La colágena tipo I es la proteína estructural más abundante de los vertebrados, es la colágena principal de piel, tendón, ligamentos, cornea y hueso, constituyendo entre el 80 y 99% de la colágena total. Está formada por dos cadenas alfa 1 iguales y una cadena diferente alfa 2.

### **COLÁGENAS ASOCIADAS A FIBRAS**

Las colágenas son responsables de la resistencia mecánica de los tejidos conjuntivos, las estructuras formadas por colágenas fibrilares son capaces de resistir fuerzas tensiles. Dependiendo de los tejidos que estudiemos podemos observar fibras de diferentes diámetros y organizadas de diferentes maneras, incluso fibras compuestas por la misma mezcla de moléculas de colágena fibrilares tienen diferentes arreglos en diferentes tejidos, esto se explica en parte debido a que existen otra clase de colágenas que no forman fibras por sí mismas pero si están asociadas a la formación de fibras junto con las colágenas fibrilares, estas son las colágenas tipo IX, XII y XIV.

Estas moléculas presentan las siguientes diferencias con las colágenas fibrilares: Presentan estructura de triple hélice, sin embargo esta estructura es interrumpida por segmentos que no forman triple hélice. Mantienen los propéptidos después de que son secretadas, es decir no son sometidas a procesos de maduración post-traduccional y no forman agregados supramoleculares (2).

Como ya se mencionó anteriormente la estructura de estas moléculas está formada por segmentos de triple hélice y segmentos que no forman triple

hélice. La estructura se puede dividir en tres regiones funcionales. Una región está constituida por uno o dos dominios en triple hélice los cuales pueden interactuar con fibras. La segunda región está constituida por otro dominio en triple hélice que se proyecta hacia fuera de la fibra y la tercera región está constituida por un dominio que no está formado por triple hélice y este dominio interactúa con elementos diferentes de la matriz y con células.

## **COLÁGENAS DE MEMBRANAS BASALES**

Dentro de este grupo de colágenas se encuentran las colágenas que no tienen una estructura fibrilar, y que participan en la formación de láminas o membranas proteicas que rodean tejidos, dentro de esta clase de colágenas se agrupan a la colágena tipo IV, VIII y X.(2)

La primer colágena no fibrilar que fue estudiada ampliamente fue la colágena tipo IV, la cual es un componente importante de membranas basales, dentro de las cuales forman una fina red de cordeles entrelazados que atrapan a moléculas de gran tamaño como laminina o el proteoglicano heparán-sulfato.(7)

Se ha demostrado que la colágena tipo IV existe en diferentes formas moleculares, una de estas formas contiene 2 cadenas alfa 1 y una alfa 2, otra forma molecular esta conformada por tres cadenas diferentes denominadas Alfa 3, alfa 4 y alfa 5.(8)

## MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE COLÁGENA

A lo largo de la historia de la bioquímica se han desarrollado distintos métodos para determinar y cuantificar las proteínas que componen a los tejidos, y los componentes de la matriz no son una excepción.

En los métodos de determinación colorimétrica de proteínas, se utilizan reactivos químicos que se adicionan a una solución de la proteína, lo que produce un cambio de color que puede ser medido con un espectrofotómetro a una longitud de onda específica. Algunos de estos métodos son, por ejemplo, el método de Bradford se basa en el cambio de color que se produce en el colorante azul brillante de Coomassie en medio ácido en presencia de proteínas que contengan residuos de aminoácidos básicos y aromáticos. Las proteínas producen el cambio de coloración del reactivo a una tonalidad azul; se produce un cambio en la intensidad del color, que es proporcional a la concentración de proteínas (9). También existen mediciones específicas para algún aminoácido, este es el caso del método de Woessner (10), el cual se utiliza para medir hidroxiprolina. En 1961 J.F. Woessner, Jr. presentó un método para la determinación colorimétrica de hidroxiprolina en tejidos y muestras de proteína. La hidroxiprolina de organismos animales está confinada principalmente a colágenas debido a esta distribución restringida, la hidroxiprolina se utiliza como un indicador de la presencia de esta proteína. El método se basa en la reactividad de la cloramina T que oxida la hidroxiprolina, después el Ácido Perclórico destruye la Cloramina T, y el p-Dimetilaminobenzaldehído (Reactivo de Erlich) reacciona con la hidroxiprolina oxidada produciendo una coloración que a bajas concentraciones de este iminoácido se observa amarilla y en altas concentraciones se puede observar de un color rojo.

Por otro lado, recientemente se ha popularizado el ensayo de Sircol™, (Sircol™, Biocolor Life science assays, Reino Unido) que se basa en la reactividad del rojo de sirio con la colágena. Esta reacción se basa en que los grupos laterales de ácido sulfónico del rojo de sirio reaccionan y se unen con los grupos laterales de aminoácidos básicos presentes en la estructura de la colágena, lo que bajo las condiciones del ensayo permiten determinar colorimétricamente el contenido de colágena en tejidos o muestras de proteínas.

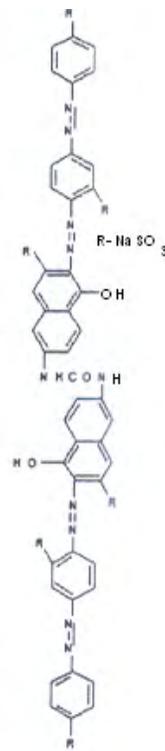


Fig. 8. -Estructura Molecular de Rojo de Sirio  
Imagen tomada de instructivo de Ensayo de Sircol Biocolor R.U.

## **OBJETIVOS**

Es importante señalar que existen condiciones patológicas en las cuales la composición de la MEC en los diferentes órganos puede verse afectada. Por ejemplo, las enfermedades fibrosantes de diversos órganos como pulmón, hígado, páncreas y corazón entre otros se caracterizan por la acumulación excesiva de las proteínas de MEC, fundamentalmente de colágenas fibrilares, que conducen a la formación de una cicatriz y la destrucción de la arquitectura normal del órgano en cuestión.

Las colágenas como ya se señaló son las proteínas que constituyen principalmente a las matrices extracelulares y son las proteínas más abundantes de los mamíferos, de ahí la importancia de que contemos con métodos de cuantificación que nos permitan determinar de manera correcta la concentración de esta proteína.

La línea de trabajo principal de nuestro laboratorio es la patogénesis de la fibrosis pulmonar. El objetivo principal del presente estudio es comparar los métodos de determinación colorimétrica de hidroxiprolina (Método de Woessner) y el ensayo de colágena de Sircol en pulmones de ratón.

## **MATERIAL y MÉTODOS**

### **OBTENCIÓN DE PULMONES DE RATÓN**

Se utilizaron ratones *Mus musculus* (C54/Balb C ), que se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Se sacrificaron 4 ratones de 52 semanas de edad, por anestesia con éter, y se obtuvieron los pulmones que se conservaron a -80 °C.

Los pulmones se descongelaron, se pesaron, y se dividieron en cuatro partes de un peso similar. Para la determinación colorimétrica de Woessner se utilizó la mitad del material pulmonar, y la otra se utilizó para determinar colágena mediante el Ensayo de Sircol. Este último, con dos variantes: en una se extrajo la colágena con pepsina a temperatura ambiente y en la otra se realizó la extracción con pepsina a 4° C. Debido a que por experiencia dentro de este grupo de investigación la pepsina se trabaja a 4°C ya que solubiliza y degrada las proteínas en un lapso corto de tiempo y el kit requería de una incubación de 24 horas, es por eso que se manejaron dos variantes para este ensayo, a temperatura ambiente como lo indica el kit y a 4°C como se trabaja con pepsina dentro del grupo de investigación.

### **DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA DE OH-PRO (MÉTODO DE WOESSNER)**

Las muestras de los tejidos se hidrolizaron con 2 ml de HCL 6N a una temperatura de 100 °C por un período de tiempo de 24 Hrs.

Posteriormente se evaporó el HCl dentro de un vaporizador calentando los tubos y aplicado vacío, al terminar la evaporación se agregó 1 ml de agua. Se ajustó el pH a 7.0 agregando NaOH 0.1 N y se llevó a un volumen final de 2 ml. Se tomaron 20 µl de muestra y se llevaron a un volumen total de 2 ml con agua destilada desionizada

Se preparó una curva estándar de hidroxiprolina de 0 a 10 µg/ml, a partir de una solución de 100 µg/ml. Reactivos:

Solución de OH- Prolina (100 µg / ml)

5 mg Hyp/ 50 ml de HCl 1N

Cloramina T 62mM

1.41 g Chloramine T (N-Chloro-p-toluenesulfonamide sodium SALT de Sigma...

20 ml de H<sub>2</sub>O Desionizada

30 ml Methyl cellosolve (Ethylene Glycol Monomethyl Ether) de Sigma Aldrich Co. USA.

50 ml Amortiguador Tris-HCl, pH 6.

Ácido perclórico (3.15 M)

27 ml de HClO<sub>4</sub> al 70 % / 100ml de H<sub>2</sub>O

Reactivo de Erlich

20 g p- Dimetilaminobenzaldeído/ 100 ml Methyl cellosolve

Procedimiento:

Se añade a la muestra 1 ml de cloramina T (recién preparada), se agita y se incuba 20 minutos a temperatura ambiente.

Se adiciona 1 ml de ácido perclórico, se agita y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente.

Se añade 1 ml de p- Dimetilaminobenzaldeído (Reactivo de Erlich) preparado en fresco, se agita y se incuba 20 minutos a 60 C°.

Se enfrían las muestras y se leen en un espectrofotómetro (Beckman) a una longitud de onda de 557 nm.

### ENSAYO DE SIRCOL (COLÁGENA RECIÉN SINTETIZADA)

Previo al ensayo de Sircol la colágena contenida en los tejidos se solubiliza con pepsina.

La pepsina se prepara de la siguiente manera:

Para 10 ml de solución se agregan:

300 µl de ácido acético

200 mg de pepsina (Pepsin Sigma P-7000 1:10,000 De Mucosa Estomacal de Porcino)

10 µl de PMSF 1 M (Sigma Phenylmethyl Sulfonyl Fluoride)

12.5 µl de NEM 2M (Sigma-Aldrich N-Ethylmaleimide)

100 µl de EDTA 1M (Sigma Ethylene Diamine- Tetraacetic Acid)

200 µl de NaN<sub>3</sub> 1%

Para este ensayo se siguieron las instrucciones del fabricante (Biocolor, Reino Unido). En breve, se pesa el fragmento de pulmón y se trata con pepsina (a una concentración de 20 mg/ml) en una proporción de 1:10 con el tejido.

Se homogeniza y se incuba con la solución de pepsina 24 horas en agitación constante. Una parte del pulmón se incubo a 4°C y la otra parte a temperatura ambiente.

Posteriormente se centrifugan las muestras a 10,000 rpm durante 10 minutos. Se recupera el sobrenadante.

Para el ensayo se realiza una curva estándar de colágena con una solución de colágena incluida en el kit (Concentración de 1 mg/ml) se utilizan 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu$ l de solución.

Se adiciona 1 ml Sircol Dye Reagent, se mezcla y se mantiene en agitación constante durante 30 minutos. Posteriormente se centrifuga a 10,000 rpm por 10 minutos. Se desecha el sobrenadante y se añade 1 ml de reactivo álcali (0.5 M hidróxido de Sodio). Se mezcla y se deja reposar por 10 minutos. Se cuantifica en un espectrofotómetro (Beckman) a una longitud de onda de 540 nanómetros.

## RESULTADOS

Determinación colorimétrica de Hidroxiprolina por el método de Woessner

En la figura 9 se muestra el resultado de la curva estándar de hidroxiprolina con concentraciones de 0 a 10  $\mu\text{g}$  de hidroxiprolina

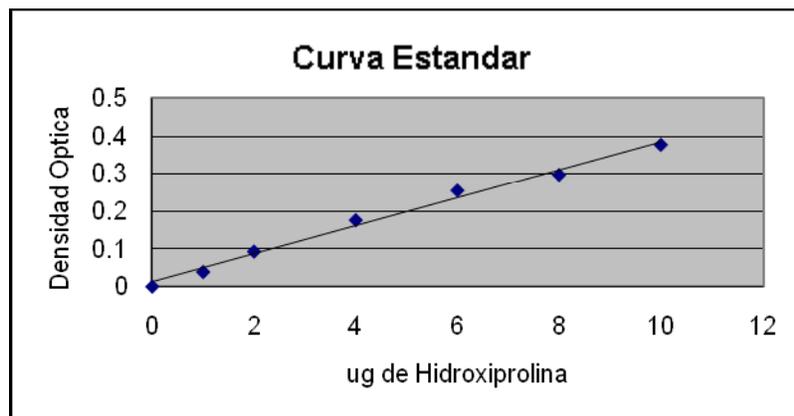


Figura 9

Para obtener los resultados de colágena se dividió la densidad óptica obtenida en el espectrofotómetro entre  $m:0.037$  ( $m$ : pendiente obtenida de la curva estándar  $Y=mx+b= \text{D.O.}$   $x=y-b/m$ ) se multiplica por 100 para obtener el total contenido en los 2 ml de muestra que se trabajaron, esto se dividió entre el peso (gramos) del tejido para obtener la cantidad de hidroxiprolina contenida en un mg de tejido, después se multiplica por 7.23 para obtener los  $\mu\text{g}$  de colágena contenida en cada mg de tejido.

Los resultados de colágena obtenidos por el método de Woessner se muestran en la tabla 1.

Columna1	Columna2
# Muestra	ug Col/mg Tej
1	27.02
2	17.17
3	23.64
4	34.59
5	26.62
6	22.7
7	22.37
8	28.55
Promedio	25.33
Desvst	5.15

Tabla 1

µg de colágena contenidos en mg de tejido obtenidos  
con método de Woessner.

El promedio del contenido de colágena por este método es de 25.33 µg de Colágena en 1 mg de tejido con 5.15 µg de desviación estándar

## ENSAYO DE SIRCOL

En la Figura 10 se muestran los resultados de la curva estándar para una concentración de colágena de 0 a 120  $\mu\text{g}$  de colágena en 1 ml. La curva estándar se obtuvo con una solución de colágena con una concentración de 1mg/ml incluida en el kit.

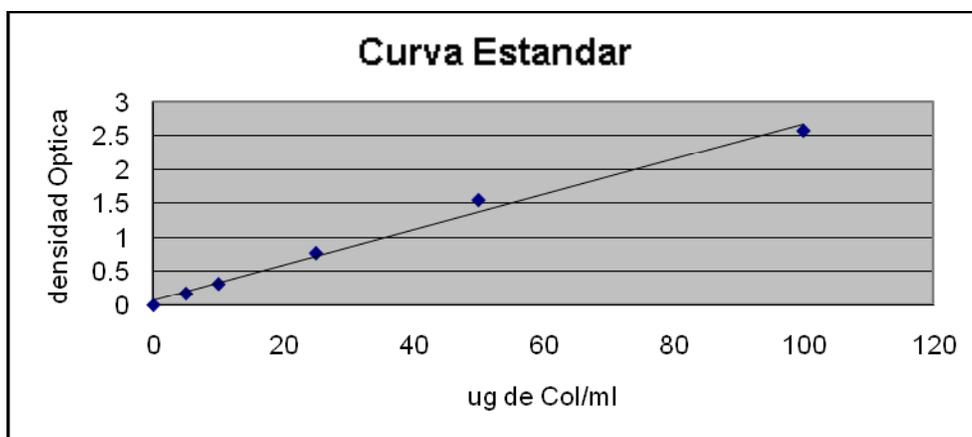


Figura 10

En la tabla 2 se muestran los resultados de las muestras de pulmón donde la colágena se extrajo con pepsina a  $4^{\circ}\text{C}$  y cuando se extrajo con pepsina a temperatura ambiente.

Como puede observarse la extracción de colágena con pepsina a  $4^{\circ}\text{C}$  muestran una desviación estándar muy alta. Por otro lado las muestras extraídas con pepsina a temperatura ambiente muestran una mejor cuantificación de colágena con resultados más homogéneos donde la concentración de colágena tiene un promedio de 9.87 con DV 2.27.

Columna1	# Muestra	ug Col en mg. Tej.
4°C	1	1.8
	2	9.8
	3	2.2
	4	3.8
	Promedio	4.4
	Desvst	3.7
		ug Col en mg. Tej.
Temp.. Amb.	5	13.2
	6	9.3
	7	8.1
	8	8.9
Tabla 2	Promedio	9.87
	Desvst	2.27

Tabla 2

□g de colágena contenidos en mg de tejido obtenidos

Con ensayo de Sircol

La comparación de los resultados obtenidos por el método de Woessner con el obtenido por el ensayo de Sircol se muestran en la tabla 3.

Columna1	Woessner	Sircol 4°C	Woessner2	Sircol T.A.
Muestra	ug Col/mg Tej	ug Col en mg. Tej.	ug Col en mg. Tej.	ug Col en mg. Tej.
1	27.02	1.8	26.62	13.17
2	17.17	9.8	22.7	9.29
3	23.64	2.2	22.37	8.12
4	34.59	3.8	28.55	8.89
Promedio	25.60	4.4	25.06	9.86
Desvst	7.25	3.7	3.02	2.25

Tabla 3

Como se puede observar la recuperación de colágena es significativamente mayor por el método de Woessner comparada con el método de Sircol y los resultados no son equivalentes, ya que existe una diferencia en la cantidad de colágena contenida en miligramos de tejido obtenida por ambos métodos. También se observa que la temperatura a la cual se solubiliza la colágena utilizando pepsina para realizar el ensayo de Sircol <sup>TM</sup> es importante ya que se obtuvieron resultados diferentes como se observa en la Tabla 2, cuando la colágena se solubiliza a temperatura ambiente el resultado muestra una cantidad mayor de colágena contenida en un miligramo de tejido, comparado con una solubilización a una temperatura de 4° C.

Después de realizar la digestión con pepsina, se recuperó el botón que quedó en el tubo de centrifuga y se le realizó el ensayo de determinación de Hidroxiprolina de Woessner para poder observar si la incubación con pepsina fue total, encontrando que el botón contenía hidroxiprolina (Tabla4).

Muestra	ug Col/mg Tej
1	7.06
2	10.74
3	7.79
4	4.36
5	11.65
6	6.9
7	6.63
8	5.83
Promedio	7.62
DesvSt	2.43

Tabla 4

## DISCUSIÓN

Las técnicas de medición son básicas para cualquier estudio en la ciencia, y es igual de importante el saber cuáles técnicas son las apropiadas para resolver las dudas que nos planteamos al realizar una investigación, constantemente las técnicas o ensayos que utilizamos en el estudio de la bioquímica y de las ciencias en general se modifican o se adaptan dependiendo de los avances en la misma ciencia. Todo el tiempo surgen nuevas técnicas y es importante conocer esas técnicas y saber si son útiles para el estudio que realicemos.

En esta tesis se compararon dos técnicas para la medición de colágena, ambas son técnicas de determinación colorimétricas, sin embargo no miden lo mismo ya que el ensayo de Sircol™ mide la colágena de manera indirecta, utilizando rojo de sirio, cuya estructura se une a las cadenas laterales de colágena y el método de Woessner mide también la colágena de manera indirecta ya que mide la hidroxiprolina que es un iminoácido modificado, el cual se encuentra casi de manera exclusiva en colágena y al realizar la comparación de los resultados de ambas técnicas se puede observar que existen diferencias.

Como ya he mencionado anteriormente al realizar una investigación es necesario saber si las técnicas utilizadas son las correctas para obtener los resultados buscados. El método de Woessner es un método utilizado ampliamente desde hace más de cuarenta años y es un método que aún se utiliza, en cambio el ensayo de Sircol™ es una técnica relativamente nueva, la cual tiene la ventaja de que es más rápida de realizar que el método de Woessner obteniendo resultados hasta dos semanas más rápido, aunque también es mucho más cara.

Los resultados nos sugieren que es mejor utilizar el método de Woessner cuando se realicen mediciones en tejido, ya que se extrae toda la colágena y los resultados comparativos hacen referencia a la colágena total. Al realizar las comparaciones de los ensayos se observa que con el método de Woessner se obtienen mejores resultados que con el Sircol™. Por otro lado, datos en nuestro laboratorio muestran que el ensayo de Sircol™ es conveniente para medir colágena producto de cultivo de células, ya que ahí toda la colágena contenida en el medio de cultivo es recientemente sintetizada.

Por otro lado el ensayo de Sircol requiere que la colágena se solubilice previo al ensayo, la solubilización se realizó con pepsina como lo indica el kit, esta enzima solubiliza la colágena recientemente sintetizada pero no la colágena que tiene enlaces intermoleculares. En este contexto, nuestros resultados reflejan que con el ensayo de Sircol no se obtiene la misma cantidad de colágena que con el método de Woessner y eso se puede explicar debido a la colágena que no es solubilizada por la pepsina.

## REFERENCIAS:

- 1.- Pardo A. La Matriz Extracelular y los Diferentes tipos de Colágena. \*Rev. Inst. Nal. Enf. Resp\* 6:156-163, 1993.
- 2.- Pardo A, Selman M. Matriz Extracelular en: Biología celular y molecular, págs: 515-540. Jiménez LF y Merchant H. eds. Prentice Hall, 2003.
3. – Alberts B. Biología Molecular de la Célula 4ª Ed. Omega, Barcelona, 2004.
4. –Heino J. The collagen family members as cell adhesion proteins. \*BioEssays\* 29:1001-1010, 2007.
- 5.-Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. \*Trends Genet\* 20:33-43, 2004.
- 6.- Stryer . Biochemistry 3ª Ed. W.H.Freeman and Company N.Y. 1988.
- 7.-Hopkins D, Keles S, Greenspan D. The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. \*Matrix Biol\* 10: 1-16, 2007.
- 8.-Timpl R. Structure and Biological activity of basement membrane proteins. \*Eur J Biochem\* 180: 487-502, 1989.
- 9.-Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. \*Anal Biochem\* 72, 248-254, 1976.

10.-Woessner J.F. Jr. The Determination of Hydroxiprolin in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportions of this Imino Acid. \*Archives of Biochemistry and Biophysics\* 93: 440-447, 1961.

11.-Hostikka S.L, Edy R.L, Byers M.G, Hoyhtya M, Shows T.B, Trygvason K. Identification of a distinct type IV collagen alpha chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. \*Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU\* 87:1606-1610, 1990.

12.-Jara P. Tesis: Actividad gelatinolitica en fibrosis Pulmonar Inducida por Bleomicina en Ratones Transgenicos que sobreexpresan MMP-9. \* UNAM\* México 2006.

13.-Lehninger A. Principios de Bioquímica 3er Ed. Omega, Barcelona, 2001.

14.-Phillips R, Burdick M, Hong K, Lutz M, Murray L, Xue Y, Belperio J, Keane M, Strieter M. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. \*J of Clinical Investigation\* 114: 438-446, 2004.

15.-Parks W, Shaphiro S. Matrix metalloproteinases in lung biology. \*Respir Res\* 2: 10-19, 2001.

16.-Li S, Arita M, Fertala A, Bao Y, Kopen G, Langsjo T, Hyttinen M, Helminen H, Prockop D. Transgenic mice with inactive alleles for procollagen N-proteinase (ADAMTS-2) develop fragile skin and male sterility. \*Biochem J\* 355: 271-278, 2001.

17.-Ruiz V, Ordoñez RM, Berumen J, Ramírez R, Uhal B, Becerril C, Pardo A, Selman M. Unbalanced collagenases 7 TIMP-1 expression and epithelial

apoptosis in experimental lung fibrosis.\* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol\*  
285: L1026-L1036, 2003.