

87
209.



Universidad Nacional Autónoma
de México

FACULTAD DE CIENCIAS

ACTIVACION DE PROCOLAGENASA HUMANA
CON LIQUIDO DE EXPLANTES DE
GRANULOMA DE CARRAGENINA

T E S I S

Que para obtener el título de

B I O L O G O

presenta

LAILA GUTIERREZ KOBEH

México, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

CONTENIDO:

I. Introducción	
A. La colágena	1
B. Las colagenasas	4
1. Su regulación	7
2. Activación de proenzima	11
C. El granuloma de carragenina	14
II. Material y métodos	
A. Fracción activadora presente en el medio de cultivo de explantes de granuloma	17
B. Activación de procólagenasa humana	21
C. Purificación parcial de la fracción enzimática presente en el medio de cultivo de explantes de granuloma	22
III. Experimentos y resultados	24
IV. Discusión	31
V. Referencias bibliográficas	39

INTRODUCCION

El desarrollo de la vida multicelular trajo consigo no sólo la presencia de distintas poblaciones celulares sino además la relación entre ellas para el desempeño armónico de una serie de funciones. La posibilidad de conformar una estructura de sostén y relación pudo darse gracias a la presencia de moléculas estructurales constituyentes de una matriz intercelular, que debido al papel tan importante que desempeña en la plasticidad de los organismos multicelulares, presenta una gran versatilidad representada por la diversidad de estructuras a las que da origen y por los distintos cambios que puede sufrir ante estímulos del medio ya sea en situaciones fisiológicas o patológicas.^{1,2}

Esta versatilidad está dada por la variedad de elementos que componen a la matriz y por la diversidad tanto genética como química del más abundante de ellos constituido por una familia polimórfica de proteínas que son las proteínas colagénicas, que junto con la elastina se encuentran dentro de una matriz amorfa y polianiónica de proteoglicanos y glicoproteínas. La colágena está presente en la mayoría de los tejidos en proporciones variables.

Dentro del grupo de la colágena se han caracterizado, hasta ahora, doce tipos genéticos; de éstos el más abundante y estudiado es el tipo I cuyas propiedades se mencionan a continuación y muchas de éstas son compartidas por los demás tipos de colágena.³

La colágena

Geométricamente, la unidad estructural de la colágena es un cilindro de 300 nm de longitud, 1.4 nm de

diámetro⁴ y un peso molecular aproximado de 300,000.³ Este cilindro está formado por un dominio triple helicoidal que es la unión de tres cadenas polipeptídicas enrolladas hacia la derecha en la misma dirección⁴ con los grupos N terminal orientados hacia un lado de la molécula y los C terminal hacia el otro. Cada subunidad se denomina alfa, contiene aproximadamente 1050 residuos de aminoácidos, por lo que se encuentran entre los polipéptidos más largos del reino animal.⁴ Su estructura primaria se basa en la repetición del tripeptido Gly-X-Y, donde generalmente en la posición "X" se presenta prolina y en la posición "Y" 4-hidroxiprolina.^{7,8} El hecho de que casi el 33% del contenido total de residuos de aminoácidos lo constituya la glicina⁹ permite que exista una interacción muy cercana entre las cadenas, ya que el reducido tamaño del radical de este aminoácido le permite incorporarse al interior de la triple hélice. La presencia de los aminoácidos prolina e hidroxiprolina provee rigidez a la cadena debido a las restricciones estéricas que impone el anillo pirrólico y la 4-hidroxiprolina es esencial como elemento estabilizador, aparentemente por la formación de puentes de hidrógeno.^{5,10,11} La estructura tridimensional de triple hélice está asociada a la función biológica y se presenta tanto en la forma fibrilar como en solución.⁵

Además, las proteínas colagénicas están sujetas a una serie de modificaciones postraduccionales como hidroxilación de algunos de sus residuos y glicosilación. Estos cambios no son uniformes en todas las colágenas; análisis químicos de diferentes tejidos

han revelado diferencias en el contenido de hidroxilisina y en el de hidroxiprolina; existen también variaciones en el contenido total de hexosas y en la proporción de monosacáridos y disacáridos en colágenas genéticamente diferentes y de un mismo tipo.

En una fibra de colágena tipo I cada molécula está recorrida un cuarto de su longitud con respecto a otras y se asocian lateralmente lo que da una periodicidad característica de 70 nm observada en las fibras con el microscopio electrónico. Los arreglos de las diferentes moléculas de colágena además de su asociación con otras macromoléculas conforman infinidad de estructuras capaces de realizar funciones muy distintas. Por ejemplo, en estructuras rígidas como tendones, dentina o piel predomina la colágena tipo I que proporciona resistencia a la tensión. En cambio, en estructuras donde se requiere elasticidad como en el tejido vascular predomina la asociación de la colágena tipo I con la tipo III. La colágena tipo II se encuentra muy asociada con proteoglicanos, esta interacción forma estructuras poco deformables como el vítreo del ojo; la colágena tipo IV presenta mayor facilidad en formar retículos que fibras y conforma las membranas basales.¹⁰ Aparte de estos papeles estructurales hay interacciones entre colágena y célula que son importantes en procesos de desarrollo y diferenciación.

La colágena al igual que otras proteínas de secreción se sintetiza en forma de un precursor de mayor tamaño que sufre un cambio hacia una especie molecular de menor tamaño. Los pasos biosintéticos tienen lugar intracelularmente e involucran organelos como Aparato de Golgi y Reticulo Endoplásmico. A

partir de la transcripción del gene para un tipo específico de colágena y la traducción del ARN mensajero se sintetiza la procolágena que es el precursor que presenta los propéptidos que son fragmentos en los extremos tanto carboxilo como amino; le confieren propiedades de solubilidad y probablemente tienen alguna función en el transporte de la molécula al exterior de la célula. Estos propéptidos son cortados posteriormente en el exterior celular lo que hace insoluble a la molécula y viable para la formación de fibras.¹² Al mismo tiempo que se da el corte de los propéptidos se inicia la actividad de la lisil oxidasa que cataliza la oxidación de los residuos de lisina y formación posterior de enlaces covalentes intra e intercatenarios, lo cual da la estabilidad de la estructura fibrilar.¹³ Después de la traducción ocurren fenómenos como hidroxilación y glicosilación. La hidroxilación comienza en las cadenas polipeptídicas nacientes adheridas a ribosomas, la glicosilación es un fenómeno posterior ya que los carbohidratos se unen a los residuos de hidroxilisina.

Las colagenasas

Una característica más que unifica a las proteínas colagénicas es su susceptibilidad a ser degradadas en condiciones fisiológicas sólo por una enzima que es la colagenasa.¹⁴ La relación entre colágena y colagenasa está sujeta a mecanismos regulatorios específicos cuya alteración resulta en dos tipos de situaciones: un exceso en la degradación o una deficiencia anormal lo que conduce a distintos estados patológicos.⁹ Las situaciones de degradación específica aparecen en enfermedades como la artritis reumatoide, las ulceraciones de la cornea, el

colesteatoma, la invasión tumoral, la perionitoditis, etc. Por otro lado, ante deficiencias en la degradación se presentan cuadros fibróticos como la cirrosis hepática, la fibrosis pulmonar, la esclerodermia. Las alteraciones en la colagenolisis no son la causa directa o primordial de estas enfermedades, sino que representan el principal daño tisular asociado a los cuadros patológicos.¹⁴

La elevada vida media de la colágena presente en estructuras como piel o tendón hizo que por un tiempo fuera difícil observar su degradación. Fue en un modelo típico de reabsorción, como es la cola del renacuajo en metamorfosis, donde Gross y Lapiere en 1962¹⁵ descubrieron la primera colagenasa al observar degradación de geles de colágena reconstituida al incubar sobre éstos explantes de tejido de cola de renacuajo. A partir de ahí han sido muchas las colagenasas animales identificadas^{16,17,18} las cuales presentan una serie de características en común. Estas enzimas no se almacenan sino que se liberan de novo, sólo existe un caso de almacenamiento en leucocitos polimorfonucleares.¹⁹ Su peso molecular oscila entre 25000 y 60000,^{19,20} no se tiene evidencia de subunidades. Son metaloenzimas ya que requieren de iones Ca^{++21} y Zn^{++} para su actividad por lo que son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA¹⁴ y Ortofenantrolina. Su pH óptimo de actividad es cercano a la neutralidad²² y muestran mayor especificidad por el sustrato en estado nativo y poca afinidad por el sustrato desnaturalizado que es la gelatina.²³

Se ha obtenido enzima altamente purificada de cultivos de fibroblastos y se ha observado que, en general, las colagenasas

animales son específicas para proteínas colagénicas. Algunas degradan gelatina y por ejemplo la colagenasa de granulocitos puede atacar fibrinógeno y proteoglicanos. El paso limitante de la colagenolisis es el rompimiento del sustrato llevado a cabo por la colagenasa. Existe participación de otras enzimas interdependientes en donde unas generan el sustrato de las siguientes.^{19, 20, 24} Probablemente la degradación se inicie por un grupo de enzimas responsables de remover ciertos enlaces covalentes y otras moléculas unidas a la colágena como proteoglicanos. La siguiente intervención es la de la colagenasa que actúa sobre la triple hélice y requiere de la estabilidad de esta estructura. La enzima activada se une a la colágena fibrilar y después de romperla se une a otra molécula de colágena; sólo actúa en la superficie externa de la fibrilla, requiere de un exceso de sustrato y el proceso es lento probablemente debido a la presencia de moduladores. La mayoría de las colagenasas rompen sólo a las colágenas intersticiales I, II y III; ya se han reportado algunas colagenasas que degradan la tipo IV y V. Sobre la colágena tipo I se produce un solo corte en la posición 775-776 entre Gly-Ile de la cadena alfa 1 y en la unión Gly-Leu de la cadena alfa 2.¹⁹ Se producen dos fragmentos, el TCA que corresponde al amino terminal y abarca 3/4 de la molécula y el TCB en el extremo carboxilo con 1/4 de la longitud de la molécula.²² Se han observado cortes en otras posiciones llevados a cabo por preparaciones con colagenasas, pero no se sabe si son producidos por la propia colagenasa o por alguna proteasa contaminante en la preparación. Existe variación entre las diferentes colágenas en relación a su susceptibilidad a las

colagenasas; esto está relacionado en parte a la estructura del sustrato como por ejemplo grado de entrecruzamiento o mayor glicosilación. El tercer y último paso de la colagenolisis es la desnaturalización de los fragmentos resultantes en forma de gelatina,²⁵ los cuales pueden ser degradados extracelularmente por proteasas o pinocitados por células como macrófagos para su degradación posterior. Una forma alterna podría ser la fagocitosis de fragmentos de fibras llevada a cabo por macrófagos.²⁶

La distribución de las diferentes colágenas varía en los distintos tejidos, con la edad y en procesos de reparación. La heterogénea susceptibilidad de las colágenas puede representar un punto importante en la regulación del recambio y morfogénesis. En estructuras estables como piel o tendón la colágena presenta una vida media muy larga comparada con la de otras proteínas, con un recambio lento de semanas o meses. En cambio, ante una situación fisiológica específica como la involución del útero post parto su vida media disminuye de 40 días en condiciones basales a 24 horas en las dos primeras semanas después del nacimiento.^{24,27,28} Este comportamiento tan fino requiere de una regulación precisa del sistema colagenolítico.

Su regulación

La regulación de este sistema ha sido abordada a través de una serie de modelos experimentales y se sabe que se lleva a cabo en varios niveles:

- 1) Control de síntesis y subsecuente procesamiento de formas precursoras.

- 2) Empaquetamiento y secreción de la proenzima.
- 3) Activación de la procolagenasa.
- 4) Actividad en el medio extracelular.
- 5) Inhibición de la forma activa de la enzima.¹⁷

El estudio del primer nivel de regulación se ha abordado mediante la búsqueda de los factores que modifican la cantidad de colagenasa que se sintetiza. Estos factores como hormonas, proteasas, prostaglandinas, linfocinas, etc. han sido explorados en colagenolisis llevada a cabo en fenómenos inflamatorios o de remodelación extensa y no bajo condiciones normales de recambio.

En la inducción de la síntesis de la enzima intervienen factores como interacciones celulares. Por ejemplo, los fibroblastos sinoviales o de cornea aumentan la producción de colagenasa en presencia de algún estímulo como el factor celular mononuclear que es producido por macrófagos y monocitos, el cual a su vez puede ser inducido por complejos inmunes o colágeno tipo II o III;²⁰ el cultivo de células epiteliales junto con células estromales más la presencia de citocalasina B aumenta los niveles de producción de colagenasa. Se ha observado que la elevación de los niveles de progesterona previene la expresión de la colagenasa en el útero pre-parto de la rata y el descenso del nivel de la hormona después del parto puede ser la causa del comienzo de la degradación de la colágena.¹⁷ La síntesis de la procolagenasa se encuentra también sujeta a factores inhibitorios; para que la enzima sea sintetizada requiere de prostaglandina E2.¹⁷ Esta a su vez está regulada por la presencia de glucocorticoides que contrarrestan la producción de ácido

araquidónico que limita la producción de prostaglandina E₂.^{30,31}

En general la enzima no se almacena, aunque en leucocitos polimorfonucleares se ha encontrado almacenamiento intracelular.¹² Esto hace que su forma de secreción sea diferente a la de proteasas lisosomales y similar a la de proteínas estructurales e inmunoglobulinas.¹⁷

Las colagenasas estudiadas han sido obtenidas de medios de cultivo o directamente de los tejidos. Se sintetizan en forma latente y requieren ser activadas para poder llevar a cabo la colagenolisis. Las primeras formas precursoras de la colagenasa en vertebrados fueron identificadas independientemente por Harper en 1971 en tejido de renacuajo³² y por Vaes en 1972 en medio de cultivo de osteocitos de conejo.³³ La enzima latente puede ser activada mediante proteólisis limitada con tripsina,³⁴ mediante compuestos organomercuriales³⁵ o agentes caotrópicos. La enzima también puede autoactivarse bajo condiciones de almacenamiento.³⁴

Inicialmente la latencia de la enzima había sido explicada mediante dos hipótesis que parecían contradecirse entre sí; una que habla sobre la secreción de la enzima como un zimógeno y otra sobre la formación de un complejo enzima-inhibidor. Las últimas evidencias parecen indicar que estas hipótesis no están contrapuestas sino que son parte de diferentes niveles de regulación del sistema colagenolítico.

La secreción de la enzima como un zimógeno ha sido observada en diversos modelos experimentales; este zimógeno puede ser activado mediante la ruptura de un fragmento, lo que revela una modificación en el peso molecular, o un cambio conformacional. En experimentos de traducción de ARN mensajero y síntesis en

polisomas de células sinoviales existen evidencias de dos formas precursoras de la proenzima procesadas cotraduccionalmente dentro de membranas microsomales. Estas formas tienen un peso molecular idéntico a las formas encontradas en los medios de cultivo, las cuales son dos especies de procologenasa, aparecen como un dímero en electroforesis y son producto de glicosilación y ruptura proteolítica.²⁷ Actualmente se sabe que la liberación de la colagenasa en forma de proenzima es una situación muy generalizada, aunque se ha observado la liberación de la enzima activa por macrófagos peritoneales.^{28,29} Una de las formas de regulación de la actividad colagenolítica reside en la activación de la enzima latente, lo que involucra la acción de distintos activadores; este proceso será discutido posteriormente.

Como ya se había mencionado con anterioridad, el estado de agregación del sustrato es un factor regulador en la acción de la colagenasa;¹⁷ la colagenolisis es dependiente de la estructura de triple hélice y se ve disminuida en fibras insolubles³⁰ estabilizadas por enlaces intermoleculares. Estudios *in vitro* han demostrado que una colágena llamada polimérica insoluble, rica en enlaces intermoleculares, no es susceptible al ataque por la colagenasa sin antes incubarse con enzimas lisosomales o proteasas del tipo de la catepsina D.²²

El último nivel en la regulación de la actividad de la colagenasa es la inhibición de la enzima activa por diferentes tipos de sustancias presentes en el suero, extractos de tejido y medio de cultivo.

En el suero se encuentra la alfa 2 macroglobulina que es

responsable del 95% de la inhibición de la enzima. La colagenasa hidroliza una zona susceptible de la alfa 2 N y posteriormente es atrapada por esta gran glicoproteína que sólo inhibe a la enzima activa.⁴¹ Existe también en el suero un inhibidor específico para la colagenasa que es la Beta 1 anticolagenasa la cual cruza inmunológicamente con un grupo de inhibidores de metaloproteinasas presentes en cultivo de explantes de piel, tendón y hueso.⁴⁷ Estos inhibidores se conocen como TIMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases), se caracterizan por ser glucoproteínas y son afines a la enzima activa a la cual se unen en proporción estequiométrica 1 a 1.

Sellers y Reynolds⁴² hablan de la formación de un complejo enzima-inhibidor para lo cual existen algunas evidencias como la presencia de inhibidores de colagenasa en medios de cultivo y la posibilidad de activar a la colagenasa latente con compuestos organomercuriales o agentes castrópicos; este tipo de activación se acompaña de una disminución en el peso molecular. La adición de algún inhibidor a la enzima activada ocasiona la formación de un complejo con un peso molecular aproximado al peso molecular del complejo de la enzima latente.

Activación de proenzima

Dada la importancia del proceso de activación como factor de regulación en la colagenolisis, muchos han sido los sistemas de cultivo de células y explantes donde se han descrito activadores.

Se ha encontrado que proteasas con importancia fisiológica son capaces de activar a la procólagenasa, se han descrito activadores en diferentes medios de cultivo y se ha logrado

activar a la proenzima in vitro mediante distintos tratamientos.

Dentro del primer grupo de activadores encontramos que proteasas como la plasmina, kallikreina plasmática y tisular,⁴³ catepsina B, proteasas séricas,⁴⁴ proteasas de células cebadas,⁴⁵ tripsina³⁴ y quimotripsina⁴⁶ activan a la enzima mediante proteólisis limitada. Por ejemplo, en la procologenasa de células sinoviales esta acción proteolítica genera dos formas activas de 50 y 46 Kd.^{37,47} En el modelo de reabsorción de la cola del renacuajo se reportó la existencia de un sistema proteolítico formado por diversos componentes capaz de convertir a la procologenasa en su forma activa.^{32,48}

En cultivo de células sinoviales de conejo, útero de rata, piel humana, se han descrito activadores purificados por diferentes métodos y con mecanismos de activación distintos. En cultivo de células sinoviales de conejo se encontró un activador que fue purificado parcialmente por inmunoadsorción; en electroforesis en SDS se muestra como un dímero con un peso molecular cercano al de la procologenasa, la cual sin su presencia no puede ser activada con APMA o con tripsina. La activación se incrementa al aumentar la concentración de activador y el tiempo de incubación. Probablemente existe un proactivador capaz de ser activado por tripsina o APMA. En la activación no hay disminución en el peso molecular y el activador por si solo no tiene actividad colagenolítica, pero si proteolítica inespecífica sobre gelatina, azocaseína y proteoglicanos.⁴⁹

En útero de rata en involución y en explantes de piel humana se purificó un activador mediante intercambio iónico donde el

mecanismo no es catalítico; la activación del zimógeno es independiente del tiempo de incubación y sólo depende de la concentración del activador.⁵⁰

En medio de cultivo de macrófagos alveolares se descubrió un activador metaloproteínico⁵¹ y en cultivo de cola de renacuajo se logró la purificación parcial de un complejo pro-activador capaz de transformarse en activador activo por incubación a 37° C.⁵²

Por otra parte, neutrófilos estimulados liberan y simultáneamente activan su colagenasa, ambos mecanismos están asociados a un proceso oxidativo que requiere de la formación de metabolitos de oxígeno altamente reactivos.⁵³

Recientemente, en medio de cultivo de sinovio de bovino se identificó un factor con actividad de interleucina 1 capaz de activar condrocitos para que sintetizen una proteasa involucrada en la activación de procólagenasa (CAP). Esta proteína es ácida, aparece como una doble banda de peso molecular entre 56 y 57 Kd en electroforesis en SDS. La colagenasa es dependiente de la presencia de esta proteína para su activación; sin el activador no puede ser activada por tripsina o APMA.^{53,54}

Se ha observado que la colagenasa latente puede ser activada mediante una breve exposición a detergentes como el SDS en concentraciones del 1 a 2%, las cuales se consideran disociativas. Es probable que en este caso lo que está ocurriendo sea la separación de un complejo enzima-inhibidor.⁵⁵

La procólagenasa liberada por fibroblastos de piel humana puede activarse de manera espontánea que depende del tiempo y la temperatura y no manifiesta cambio en el peso molecular.⁵⁶

El granuloma de carragenina

En este trabajo buscamos un activador de procologenasa en el modelo experimental del granuloma de carragenina que es un modelo en el que se ha estudiado in vivo la síntesis y degradación de colágena. Este modelo parte de una inflamación provocada en el animal experimental por la inyección subcutánea del polisacárido carragenina^{24,27} que es un polímero sulfatado de unidades de galactosa. Esta inflamación se caracteriza por un depósito de colágena y su posterior reabsorción, además de la presencia heterogénea de poblaciones celulares que aumentan o disminuyen en forma secuencial. El proceso dura de dos a cuatro semanas;²⁴ las diferencias en duración se deben a la cantidad de carragenina inyectada y condiciones del animal experimental. En un principio se encuentran leucocitos polimorfonucleares y macrófagos conteniendo un material denso a los electrones en su citoplasma que puede deberse a la ingestión de la carragenina y desaparece después de catorce días. El número de macrófagos disminuye conforme avanza el desarrollo del granuloma y aumenta el número de fibroblastos, los cuales presentan ciertas características intracelulares que indican síntesis activa de colágena. La reabsorción de la colágena se lleva a cabo extracelularmente mediante la acción de una colagenasa, cuya presencia ha sido demostrada por pruebas experimentales como la degradación de la colágena tipo I de un tendón de rata introducido a un granuloma en reabsorción.²⁸

A partir de medio de cultivo de explantes se logró purificar parcialmente la colagenasa del granuloma mediante

cromatografía de afinidad en Sepharosa-4B acoplada a colágena.⁵⁹ El origen celular de la enzima se desconoce ya que son muchos los componentes celulares capaces de producir colagenasa en el sistema. La enzima comparte las características comunes de las colagenasas de vertebrados. Es inhibida por EDTA, cisteína y suero, su pH óptimo es neutro y muestra mayor actividad contra el sustrato en solución que sobre colágena reconstituida. Los fragmentos producidos por el corte representan el 75% y probablemente el 25% de la longitud original de la molécula. Esta enzima se encuentra presente tanto en la etapa de depósito como en la de reabsorción, lo que fue demostrado mediante un anticuerpo monoespecífico dirigido contra la colagenasa del granuloma. Sin embargo, esta técnica no permite conocer el estado de activación de la enzima. En homogenados de granuloma se obtuvo colagenasa latente⁶⁰ capaz de activarse por 4-APMA o mediante el paso de la preparación por una cromatografía de filtro molecular; en este caso la actividad se recupera en dos fracciones de diferente peso molecular y probablemente lo que ocurre es que se pierde un inhibidor por el paso de la columna, pero al probar la actividad inhibitoria el resultado fue negativo. En homogenados de granuloma incubados directamente contra la colágena endógena del tejido se demostró que existe actividad colagenolítica en ambas etapas; más de la mitad de la actividad colagenolítica durante la fase de depósito se encuentra en forma latente.

El hecho de que en la etapa de depósito haya enzima latente y en reabsorción sólo se presente la forma activa, indica la presencia de un mecanismo responsable de la activación.

Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue buscar una sustancia endógena en el granuloma de carragenina capaz de activar colagenasa latente; así como purificar parcialmente a la enzima a partir de explantes de granuloma. Debido a que la latencia de la enzima en el granuloma aún no está bien caracterizada y se desconoce la proporción de enzima activa con respecto a la latente, se decidió emplear como sustrato para probar la capacidad activadora de las fracciones procólagenasa purificada de fibroblastos de piel humana. Esta enzima se sintetiza en forma de pre-proenzima con un peso molecular de 50,092 d con un péptido señal de 19 aminoácidos de longitud. Los productos de secreción primaria de la enzima consisten en una forma glicosilada con un peso molecular de 57,000 y otro péptido que no sufre modificaciones con un peso molecular de 51,900. La activación proteolítica de la enzima resulta de la remoción de 81 residuos de aminoácidos de la porción amino terminal de la enzima.⁴¹

MATERIAL Y METODOS

Fracción activadora presente en el medio de cultivo de explantes de granuloma.

1. Obtención de granulomas

Se emplearon cobayos de ambos sexos con un peso aproximado de 500 g, proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Ciencias. Se estimularon con 5 ml de una solución estéril de carragenina al 1% en NaCl 0.15 N mediante inyección subcutánea del polisacárido. El modelo se dejó que prosiguiera durante 7 días para los granulomas de depósito y 14 días para los de reabsorción. Se escogieron granulomas de 7 días como exponentes de la primera fase del proceso, caracterizada por la biosíntesis y depósito de colágena, y de 14 días como representantes de la fase de reabsorción. La razón de esta elección fue que bajo las condiciones experimentales empleadas en este trabajo los granulomas alcanzan su máximo peso húmedo y contenido total de colágena aproximadamente a los 9 días después de la inyección. Cumplidos estos tiempos los cobayos fueron anestesiados con éter y sacrificados por extirpación cardíaca. Los granulomas se extrajeron, se limpiaron cuidadosamente de tejido adiposo y muscular y se cortaron en pequeños fragmentos de aproximadamente 2 mm².

2. Cultivo de explantes

Explantes de granulomas tanto de depósito como de reabsorción fueron cultivados en cajas de Petri de vidrio de 5 cm de diámetro con 5 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco

(GIBCO lab. cat. No. 430-2100, Chagrin Falls, Ohio) libre de suero y preparado con antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomocina 100 µg/ml) y Fungizone (Anfotericina B) 50µg/ml.

Los cultivos se mantuvieron durante 7 días a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% aire. El medio de cultivo se colectó cada 24 h y se cambió por medio nuevo. Se centrifugó y neutralizó inmediatamente para mantener a la preparación en condiciones adecuadas de pH. Posteriormente se concentró por uno de los dos métodos siguientes: a) introduciéndolo en una bolsa de diálisis y cubriéndolo con azúcar glass; una vez concentrado, el medio se dializó contra amortiguador Tris-HCl 0.05 N, pH 7.4, CaCl₂ 0.01 M. b) Por precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, el precipitado se recuperó centrifugando a 800g, se redisolvió en amortiguador Tris-HCl 0.05N, CaCl₂ 0.01N y se dializó exhaustivamente. Los medios concentrados se almacenaron a -20° hasta ser utilizados.

3. Actividad colagenolítica de los medios de cultivo

La actividad de colagenasa se determinó de acuerdo al método de Terato y Nagai (1976),⁴² extrayendo selectivamente los productos de degradación solubles en una solución de diclorano-metanol 4:1. El sustrato radioactivo empleado fue ³H colágena con una actividad específica de 1 104 000 c.p.m./mg de colágena.

Se incubaron 100 µl del medio de cultivo concentrado con 100 µl de ³H colágena (1mg/ml) disuelta en ácido acético 0.05N y preparada volumen a volumen en amortiguador Tris-HCl 0.05N, pH 7.4, CaCl₂ 0.01N, NaCl 0.2N, durante 12 horas a 33°C en presencia o ausencia del inhibidor. Al término de la incubación

se agregaron los inhibidores además de 50 μ l de colágena fría (1mg/ml) disuelta en Tris-HCl 0.05M, pH 7.4, CaCl_2 0.01M, NaCl 0.2M. El volumen de reacción fue de 0.3 ml. La colágena no degradada se precipitó con un volumen de 0.3 ml de diclorano metanol a una temperatura de 8°C. Los fragmentos producidos por acción de la enzima se separaron centrifugando a 800g, 40 min a temperatura ambiente. Se colectaron 200 μ l del sobrenadante y se adicionaron a 10 ml de solución de Bray para determinar la radioactividad liberada en un contador de centelleo líquido.

Los inhibidores utilizados fueron 40 μ l de Etilendiaminotetraacetato (EDTA) 0.1M (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.) o 50 μ l de suero humano descomplementado diluido 1:10 en el amortiguador de reacción.

La temperatura de incubación fue de 33°C para evitar la desnaturalización térmica del sustrato, el cual se desnaturaliza a una temperatura menor de 37°C porque es más inestable debido al proceso de acetilación.⁴³

Los resultados se expresan como el porcentaje que representan los péptidos solubles en diclorano-metanol con respecto a la radioactividad total incubada, restando a cada preparación su control inhibido.

4. Activación de las preparaciones

La presencia de actividad colagenolítica latente puede ser revelada mediante proteólisis limitada con tripsina o tratamiento con compuestos organomercuriales. Para la activación con tripsina se incubaron 100 μ l de medio concentrado con diferentes concentraciones de tripsina (0.5, 1.5 y 3 μ g/ml) disuelta en el amortiguador de reacción, a temperatura ambiente (25°C), durante

diez minutos; posteriormente se agregó inhibidor de tripsina del frijol de soya (SBTI) cinco veces más concentrado que la enzima y se procedió a determinar la actividad colagenolítica de la muestra activada. La relación de concentración tripsina/proteína fue variable, el rango estuvo entre 1:100 y 1:75.

Se juntaron los medios de cultivo con mayor actividad colagenolítica, con lo cual se obtuvo una fracción total de depósito y una fracción total de reabsorción. Se determinó la concentración de proteína de estas fracciones mediante el método descrito por Bradford (1976)⁴⁴ utilizando una curva patrón de albúmina sérica bovina y los reactivos de Bio Rad laboratories.

5. Fraccionamiento

Con el propósito de separar la fracción enzimática, a la que se asocia la actividad colagenolítica, de otra fracción sin actividad donde esperábamos encontrar el activador de procólagenasa, se llevó a cabo una cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa. La resina se empacó en una columna de 2 x 10 cm y se equilibró con amortiguador Tris-HCl 0.05N, pH 7.4, CaCl₂ 0.01M. 30ml de la fracción total tanto de depósito como de reabsorción se pasaron por este sistema a una velocidad de flujo de 30ml/h colectando fracciones de 7ml. La columna se lavó con el mismo amortiguador hasta que la absorbancia de las fracciones medida a 230 nm disminuyó a cero. La proteína unida a la resina se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0 a 0.25M) en 400 ml del amortiguador inicial.

Se determinó la actividad colagenolítica de las fracciones eluidas con Tris-HCl 0.05N, CaCl₂ 0.01N y de las fracciones

eluidas con el gradiente de NaCl tanto de depósito como de reabsorción. Asimismo, se determinó la capacidad de activar procolagenasa humana.

6. Activación de procolagenasa humana

La activación de la procolagenasa humana con las fracciones probadas se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se incubaron 25µl de procolagenasa humana (obsequio del Dr. Bauer de la Washington University de St. Louis Mo.) con 100µl de la fracción que se probó y 100µl del sustrato radioactivo. Se eligieron estos volúmenes ya que con ellos se observó la mayor activación después de realizar varias titulaciones. La incubación se llevó a cabo por 3 horas o por 12 horas a 33°C. Posteriormente se agregó el inhibidor (EDTA), colágena fría y se realizó la precipitación con diclorano-metanol en la forma descrita en el punto 3.

En todos los ensayos de activación de la procolagenasa humana con las fracciones probadas se realizaron también titulaciones con distintas concentraciones de tripsina para constatar que la proenzima es activable. Se incubaron 25 µl de procolagenasa humana con diferentes concentraciones de tripsina (0.5, 1.5 y 3µg/ml) a temperatura ambiente durante diez minutos, posteriormente se agregó inhibidor de tripsina del frijol de soya cinco veces más concentrado que la enzima.

Como activador de la proenzima se empleó también el compuesto orgánico mercurial 4-aminofenilacetato de mercurio (4 APMA); la solución se preparó en agua destilada al momento de ser utilizada y el pH se ajustó a 10. Se agregó a la muestra la

cantidad necesaria para obtener una concentración final de 1mM.

Con el objeto de conocer la estabilidad térmica del activador, en algunas pruebas de activación las fracciones fueron calentadas en un baño con agua en ebullición por 10 min previo a la incubación con la procólagenasa y sustrato radiactivo.

7. Purificación parcial de la fracción activadora

Localizada la fracción con características activadoras de procólagenasa humana, se procedió a un fraccionamiento posterior a través de una columna de filtración molecular en Ultrogel AcA 44. La resina se empacó en una columna de 1.5 x 90 cm y se equilibró con amortiguador Tris-HCl 0.05M, pH 7.4, CaCl₂ 0.01M. La velocidad de flujo fue de 15 ml/h y se colectaron fracciones de 5 ml hasta que la absorbancia medida a 230 nm disminuyó a 0. Por este sistema sólo se pasó la fracción eluida con Tris HCl de la columna de DEAE celulosa de la etapa de reabsorción en un volumen de 5ml.

A las fracciones obtenidas de la filtración molecular en Ultrogel AcA 44 se les probó su capacidad de activar procólagenasa humana así como su estabilidad térmica de acuerdo a la forma descrita en el punto 2.

8. Purificación parcial de la fracción enzimática presente en el medio de cultivo de explantes de granuloma.

Con el objeto de llevar a cabo una purificación parcial de la actividad enzimática presente en la fracción que se une al DEAE celulosa y que se eluyó con el gradiente de NaCl se empleó

heparina-sepharosa. La heparina-sepharosa se empacó en una columna de 1.5 x 2.2 cm y se equilibró con amortiguador Tris-HCl 0.05M, pH 7.4, CaCl₂ 0.01M. Las fracciones concentradas de la elución de NaCl de la columna de DEAE celulosa de ambas fases fueron pasadas por este sistema a una velocidad de flujo de 25ml/h. La columna se lavó con el amortiguador con el que se equilibró hasta que la absorbancia de las fracciones medida a 230 nm disminuyó a cero. Posteriormente la proteína unida se eluyó con NaCl 1M disuelto en el mismo amortiguador y a la misma velocidad de flujo. Se obtuvo el perfil cromatográfico y se determinó la actividad colagenolítica de las diferentes fracciones.

9. Electroforesis SDS en geles de poliacrilamida

Con el fin de comparar las proteínas presentes en los diferentes pasos del fraccionamiento tanto de la muestra de depósito como de la de reabsorción, se corrieron las muestras en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. La técnica se realizó de acuerdo a Laemmli (1970)⁴⁸ utilizando geles preparados al 11%. Las preparaciones se diluyeron con el amortiguador de la muestra descrito en este sistema ajustando la concentración de proteína a menos de 30 µg. La electroforesis se corrió a 5mA por placa hasta que el frente del colorante se introdujo en el gel inferior, en este momento la corriente se aumentó a 30 mA por placa y se detuvo cuando el colorante alcanzó el extremo anódico del gel. Las placas se tiñeron con azul de Coomassie R-250 al 1% y se destiñeron con una solución de metanol al 5% y ácido acético al 7.5%

EXPERIMENTOS Y RESULTADOS:

1. Actividad colagenolítica en los medios de cultivo de granulomas de depósito y reabsorción.

Los explantes de granuloma tanto de la fase de depósito de tejido conectivo como en la de reabsorción liberaron colagenasa al medio de cultivo. Los ensayos con tripsina revelaron que en la etapa de depósito parte de la enzima se encuentra latente y parte activa y en la etapa de reabsorción toda la enzima se encuentra activa. Las figs. 1 y 2 muestran los datos de un experimento representativo de depósito y uno de reabsorción.

En el medio de cultivo de granuloma de depósito la actividad colagenolítica aumenta al preincubar con tripsina lo que demuestra la presencia de actividad latente. (Fig. 1). La tripsina, en cambio, no mostró efecto de activación sobre las preparaciones de medio de cultivo de la fase de reabsorción (Fig. 2)

2. Fraccionamiento de las preparaciones totales de depósito y de reabsorción de explantes de granuloma de carragenina.

Mediante el empleo de la resina DEAE celulosa se separó la actividad colagenolítica de una fracción proteica con muy poca actividad. En la figura 3 se muestra el perfil cromatográfico de la fracción total de depósito así como las actividades específicas de la fracción que se une a la resina y la que no se une. Se observa que eluye una fracción que no interacciona con la resina. Esta fracción muestra una actividad colagenolítica muy baja en comparación con la fracción aniónica que interactúa con

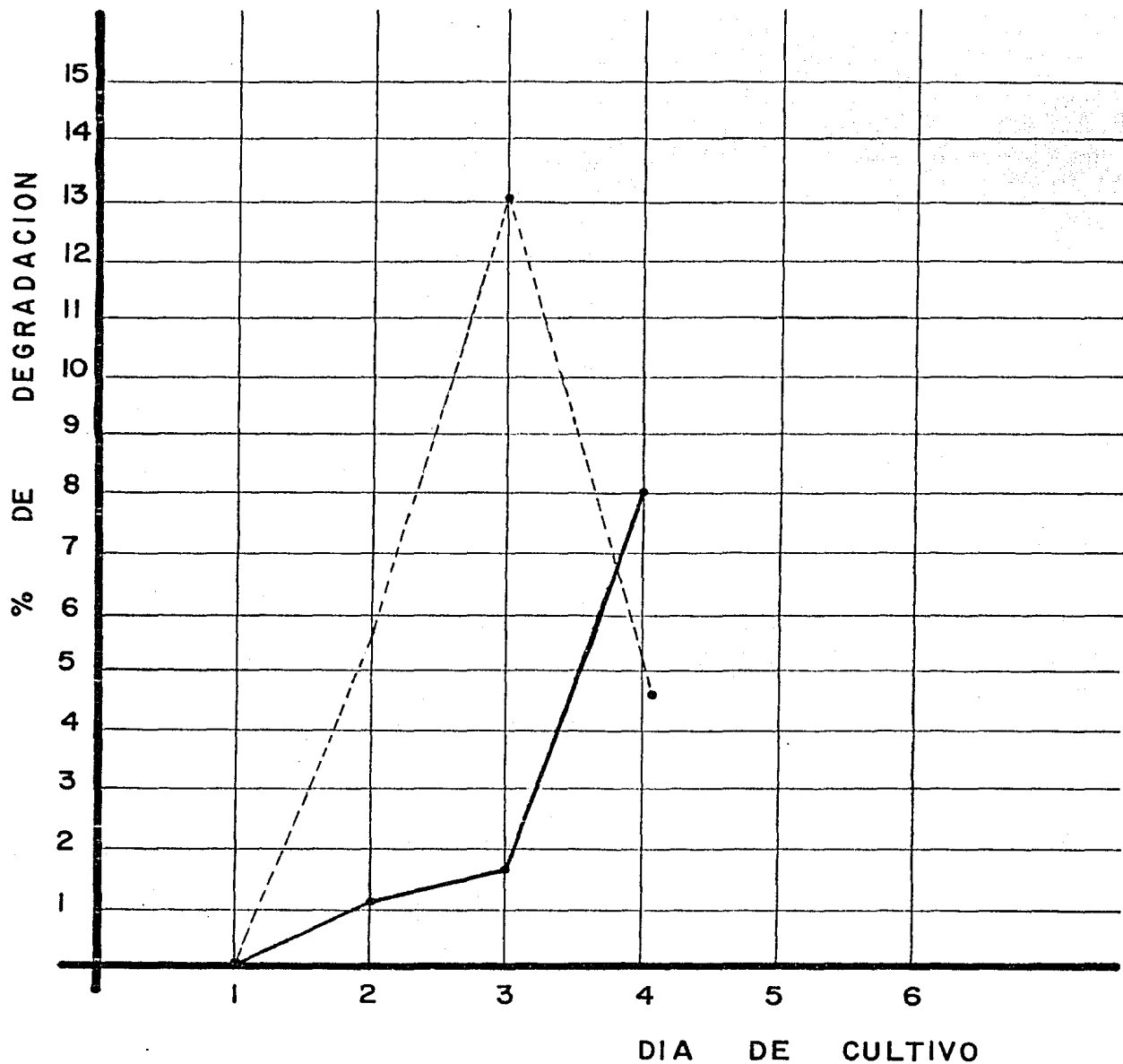


FIG 1: Actividad colagenolítica en el medio de diferentes días de cultivo de explantes de granuloma en la fase de depósito. Sin tripsina (—), con tripsina (---). La incubación se llevo a cabo a 33° C por 12 hrs.

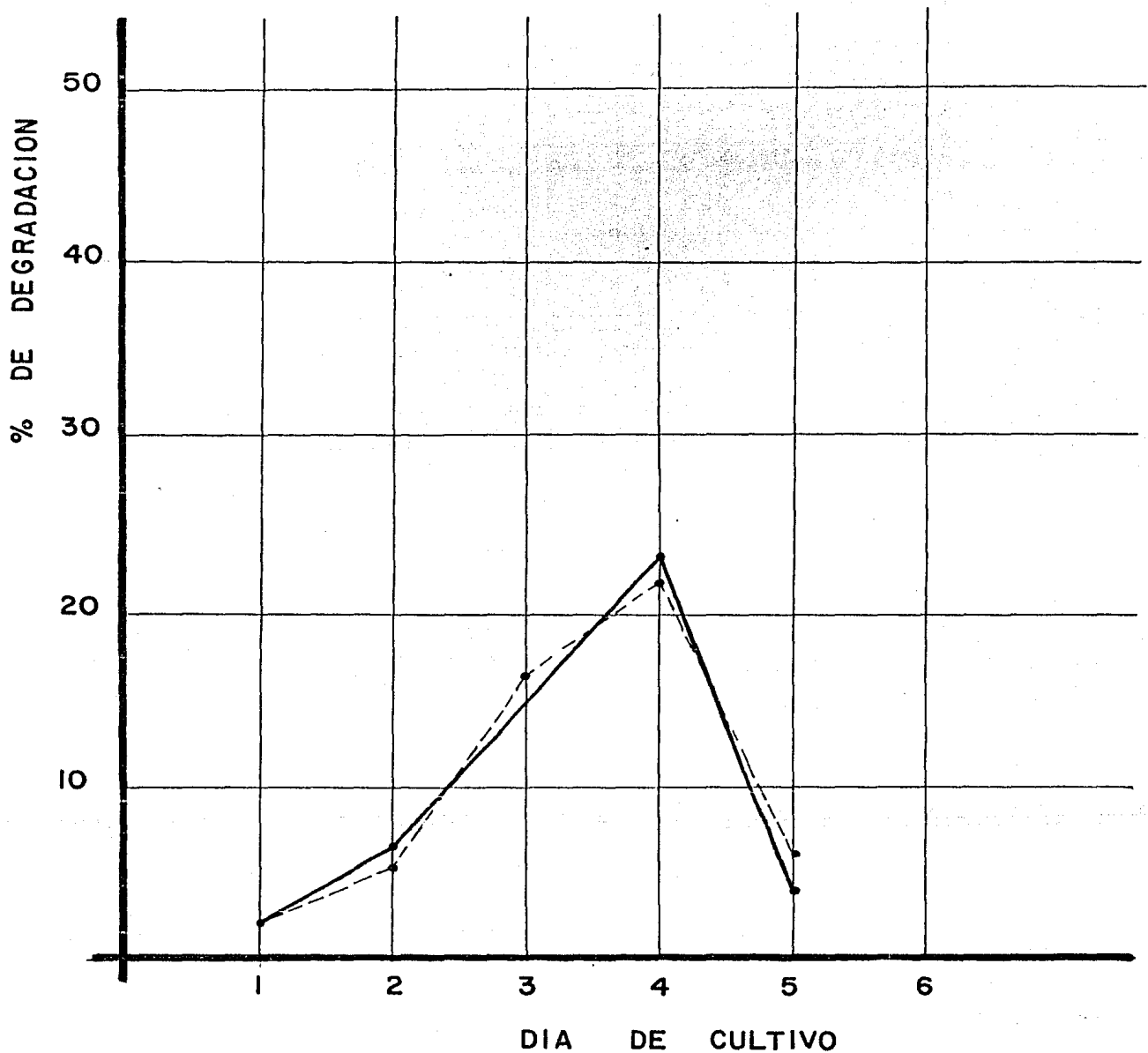


FIG. 2: Actividad colagenolítica en el medio de diferentes días de cultivo de explantes de granuloma en la fase de reabsorción. Sin tripsina (—), con tripsina (---)

Act. Esp = $\frac{\% \text{ degr}}{\mu\text{g/ml}} \times 100$ (---)

D.O 230 nm
(—)

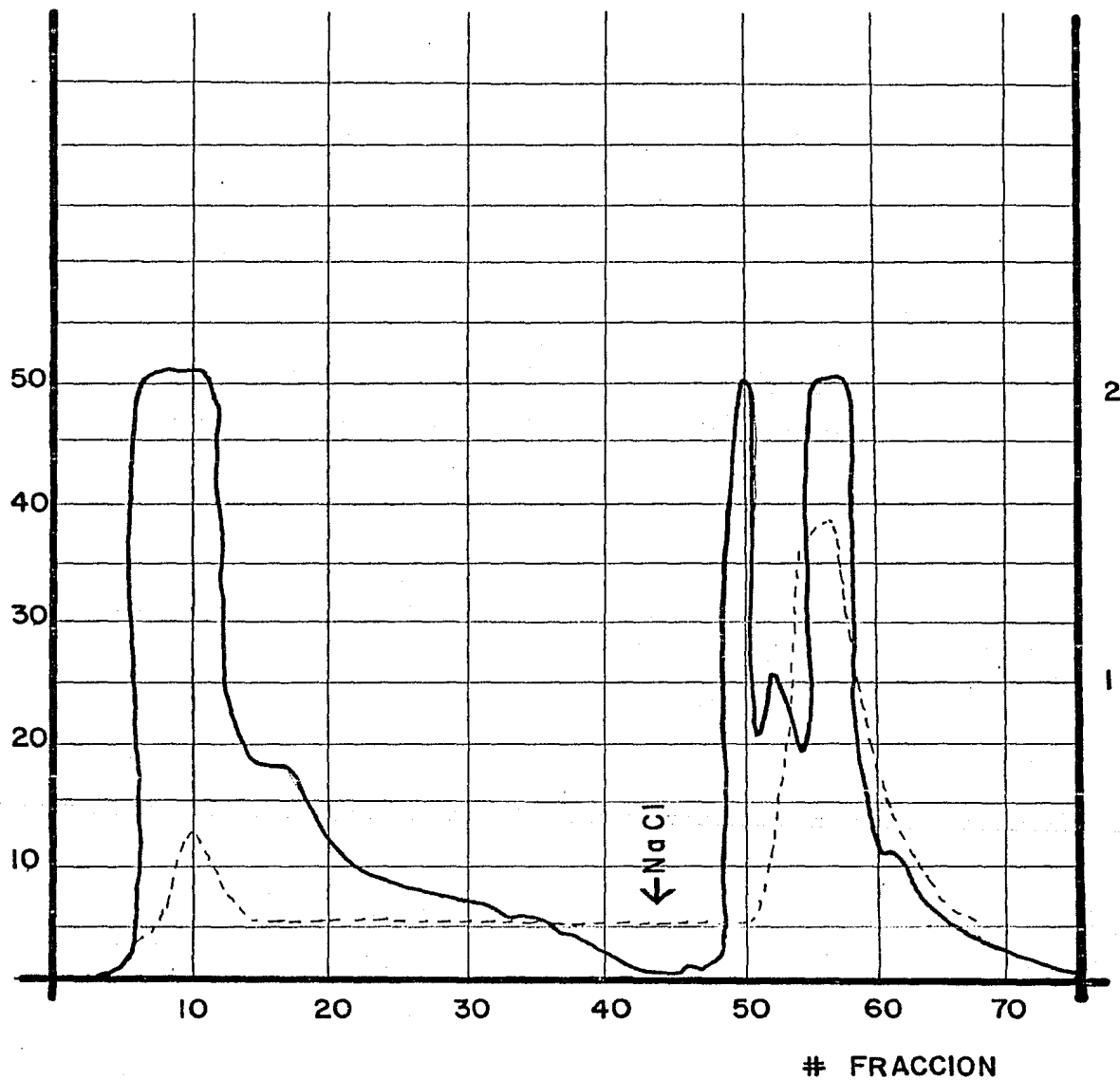


FIG. 3: Perfil cromatográfico de la muestra total de depósito al correrla en la resina DEAE celulosa.

la resina, la cual concentra la actividad colagenolítica observada en los medios.

En la figura 4 se muestra el perfil cromatográfico y las actividades específicas de la muestra total de reabsorción. Durante esta fase se observa el mismo comportamiento que en la preparación anterior; sin embargo, la actividad específica de la fracción aniónica es 40% mayor que la observada en depósito.

En ambos casos la actividad colagenolítica se concentra en el pico que se une a la resina. En la tabla 1 se muestran los valores de actividad específica de las fracciones totales de depósito y reabsorción así como de las fracciones obtenidas al pasar por la DEAE celulosa. En adelante nos referiremos a la fracción que no se une a la resina como fracción 1 y a la que se une a la resina como fracción 2.

Muestra	Actividad Específica	<u>% de degr. x 100</u> mg x ml
Depósito total	5.8	
Reabsorción total	16.0	
Fracción 1 de depósito	7.0	
Fracción 1 de reabsorción	15.3	
Fracción 2 depósito	27.6	
Fracción 2 reabsorción	49.7	

Tabla 1: Actividad colagenolítica específica de las muestras totales y eluciones de la columna de DEAE celulosa

Estos datos indican que la enzima se une al DEAE, aunque una pequeña fracción con actividad colagenolítica se detecta en la elución con Tris-HCl 0.05N.

$$\text{Act. Esp} = \frac{\% \text{ degr}}{\mu\text{g/ml}} \times 100 \quad (---)$$

D.O(230 nm)
(—)

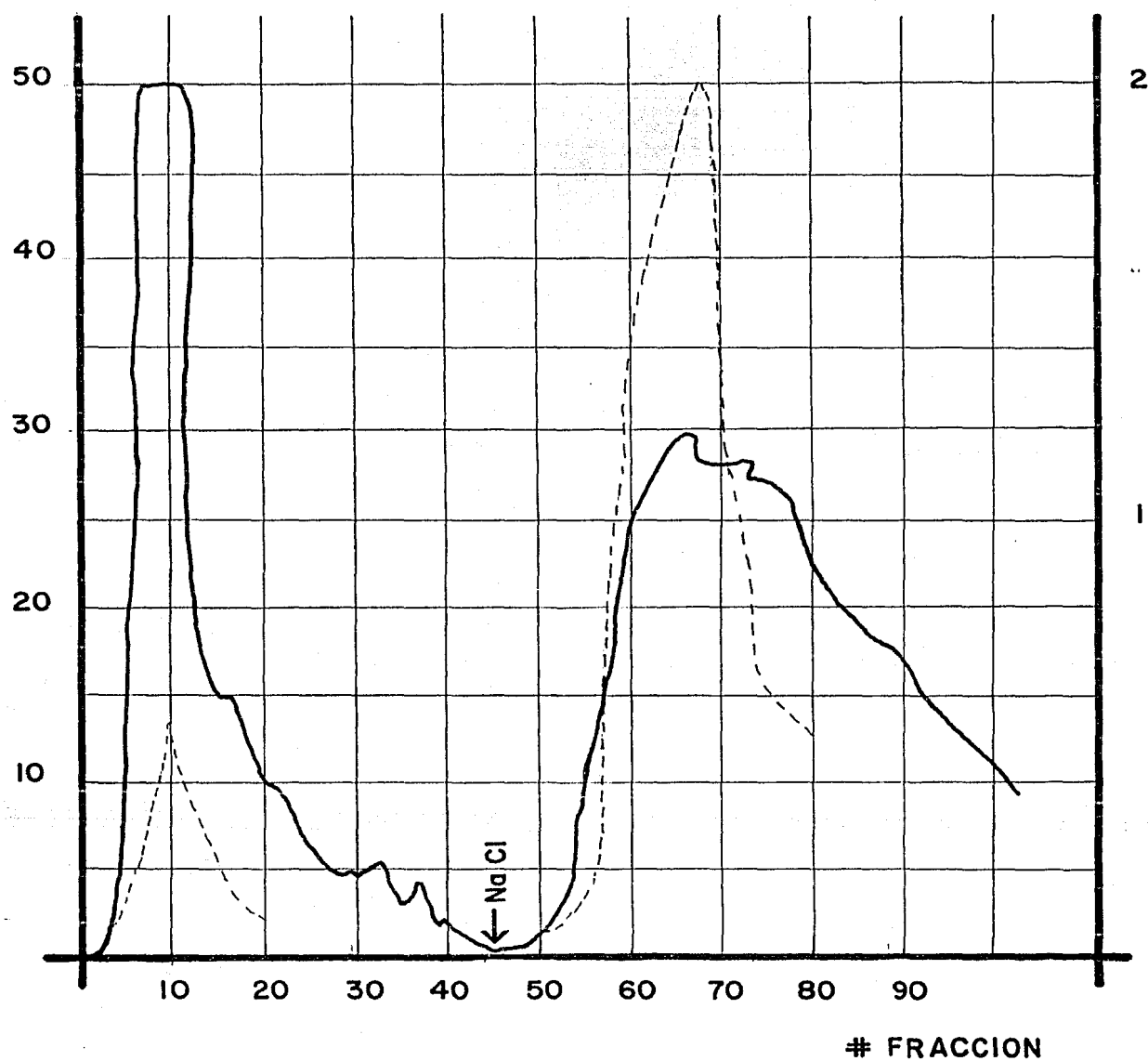


FIG. 4: Perfil cromatográfico de la muestra total de reabsorción al correrla en la resina DEAE celulosa.

3. Localización del activador

Una vez separadas las dos fracciones, una que concentra la actividad colagenolítica y otra que muestra poca actividad, procedimos a probar su capacidad de activar procolagenasa humana.

Mediante el ensayo de proteólisis limitada se constató que la proenzima era activable, ya que existen datos en la literatura en donde se ha reportado autoactivación espontánea de procolagenasas, de tal forma que se requiere conocer el estado de activación de la proenzima para evaluar correctamente la actividad del activador. En la tabla 2 se muestran los porcentajes de degradación del sustrato radioactivo incubado con procolagenasa sola y procolagenasa activada con tripsina, APMA y fracciones 1 y 2 tanto de depósito como de reabsorción.

Muestra	Porcentaje de degradación
Procolagenasa	3.2%
Procolagenasa + tripsina	8.0%
Procolagenasa + APMA	0
Procolagenasa + fracción 1 dep.	19.6%
Procolagenasa + fracción 2 dep.	6.2%
Procolagenasa + fracción 1 reabs.	19.7%
Procolagenasa + fracción 2 reabs.	4.8%

Tabla 2: Activación de procolagenasa humana con las fracciones de depósito y reabsorción eluidas de DEAE celulosa.

Los resultados muestran que la capacidad de activar procolagenasa humana se encuentra en la fracción 1 tanto de depósito como de reabsorción, es decir, la que no se une a la DEAE celulosa.

4. Cromatografía de filtración molecular en Ultrogel AcA 44.

Con la finalidad de lograr una mejor purificación de la fracción con capacidad de activar procolagenasa humana, se pasó esta fracción de la fase de reabsorción por una columna de filtración molecular de Ultrogel AcA 44. El perfil cromatográfico y los porcentajes de activación obtenidos al incubar algunas fracciones del pico de Ultrogel con procolagenasa se muestran en la figura 5.

En la tabla 3 se muestran los porcentajes de degradación del sustrato radioactivo incubado con la procolagenasa humana sola y activada con tripsina y con diferentes fracciones del pico obtenido de la columna de Ultrogel AcA 44 (U). Se muestran también los porcentajes de degradación obtenidos al incubar las fracciones del Ultrogel con la 3H colágena.

Muestra	Porcentaje de degradación
Procolagenasa	14
Procolagenasa + tripsina	27.2
U14	0
U14 + procolagenasa	27.7
U19	12.3
U19 + procolagenasa	37.4
U22	19.4
U22 + procolagenasa	41.9
U28	6.2
U28 + procolagenasa	26.6
U33	1.9
U33 + procolagenasa	19.9
U43	1.7
U43 + procolagenasa	14.4
U72	3.4
U72 + procolagenasa	17.3

Tabla 3: Porcentajes de degradación obtenidos al incubar 100ug de 3H colágena con las fracciones obtenidas de la columna de Ultrogel AcA 44 solas e incubadas con procolagenasa.

D.O (230 nm)
(—)

% de activacion
(---)

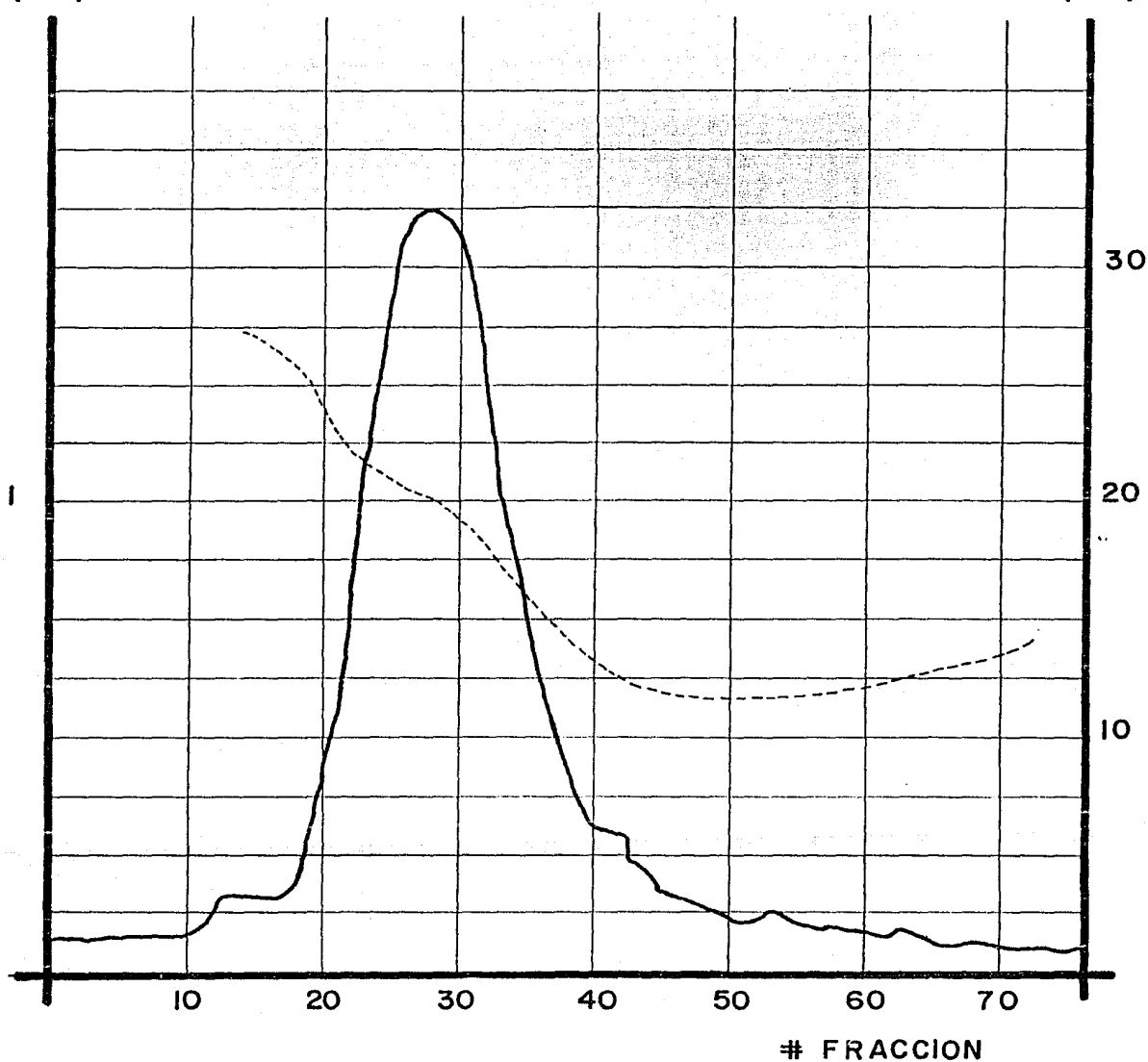


FIG 5: Perfil cromatográfico obtenido al correr la fracción de reabsorción que no se le une al DEAE por una columna de Ultragel AcA - 44.

5. Susceptibilidad al calor de las fracciones activadoras.

Se probó la susceptibilidad al calor de las fracciones obtenidas al pasar la fracción I de reabsorción por la columna de Ultrogel AcA 44. En la tabla 4 se muestran los porcentajes de degradación obtenidos al incubar las fracciones calentadas y sin calentar con la procolagenasa humana y el sustrato radioactivo.

Muestra	Porcentaje de degradación
Procolagenasa	1.4
Procolagenasa + tripsina	3.8
U14	0
U14 + procolagenasa	6.8
U14 + calor	0
U14 + calor + procol.	3.6
U19	0
U19 + procolagenasa	5.0
U19 + calor	0
U19 + calor + procol.	7.6
U22	2.6
U22 + procolagenasa	7.6
U22 + calor	0
U22 + calor + procol.	7.4
U28	0
U28 + procolagenasa	4.5
U28 + calor	0
U28 + calor + procol.	4.6

Tabla 4: Porcentajes de degradación del sustrato radioactivo al incubarlo con procolagenasa activada con las fracciones II de reabsorción calentadas y sin calentar.

6. Cromatografía de afinidad heparina-sepharosa.

Con la finalidad de purificar parcialmente la colagenasa del granuloma de carragenina para emplearla como sustrato de las fracciones activadoras se empleó la resina heparina-sepharosa a través de la cual se pasaron las fracciones 2 tanto de depósito como de reabsorción. Los perfiles cromatográficos se muestran en las figuras 6 y 7. Se observó que la actividad específica de la

Act.Esp = $\frac{\% \text{ degr}}{\mu\text{g / ml}} \times 100$ (---)

D.O (230)
(—)

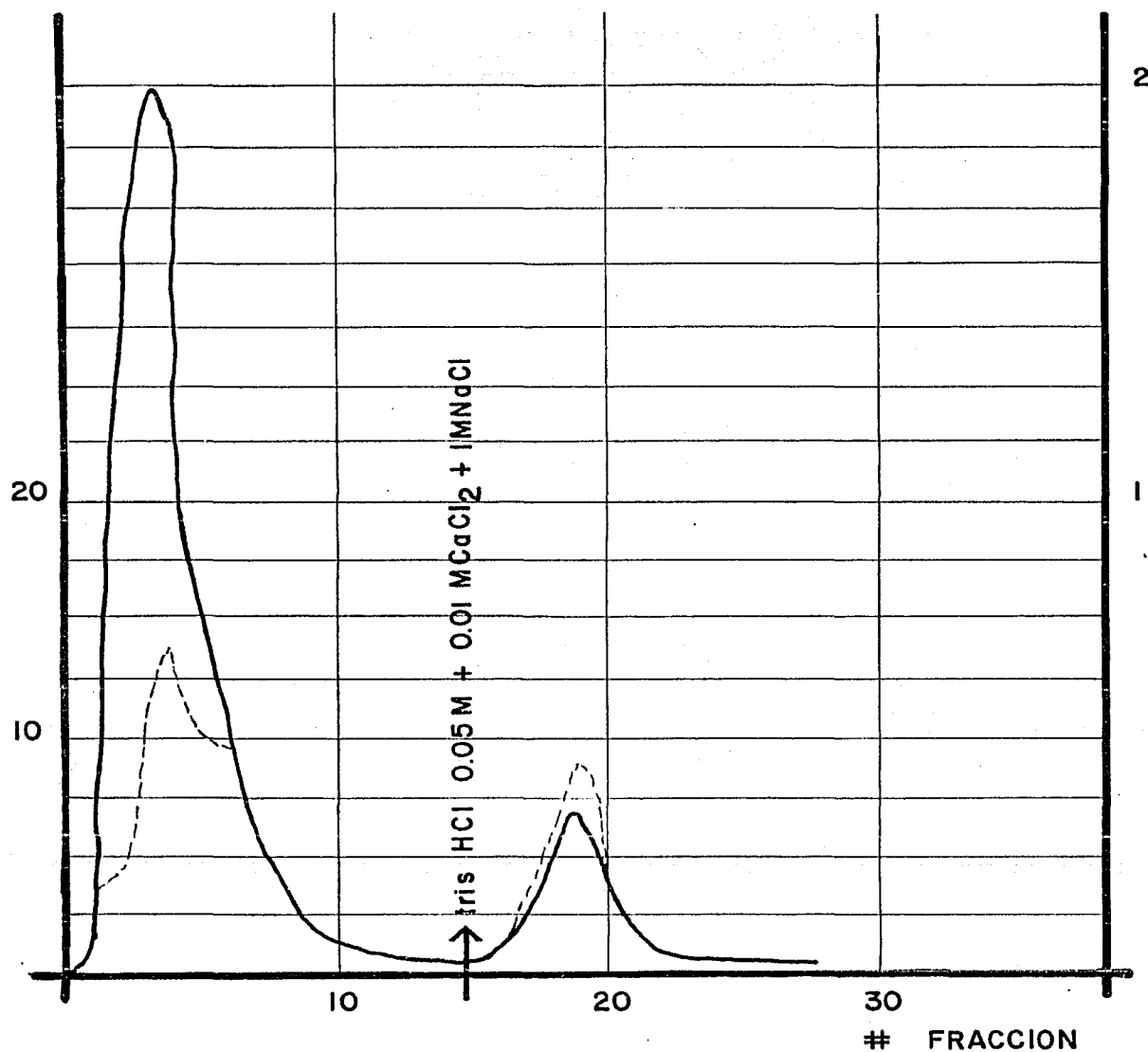


FIG. 6: Perfil cromatográfico de la actividad colagenolítica presente en la fracción de reabsorción que se une al DEAE al correrla en heparina-sepharosa.

$$\text{Act. Esp} = \frac{\% \text{ deq}}{\mu\text{g/ml}} \times 100 \quad (---)$$

D.O. (230 nm)
(—)

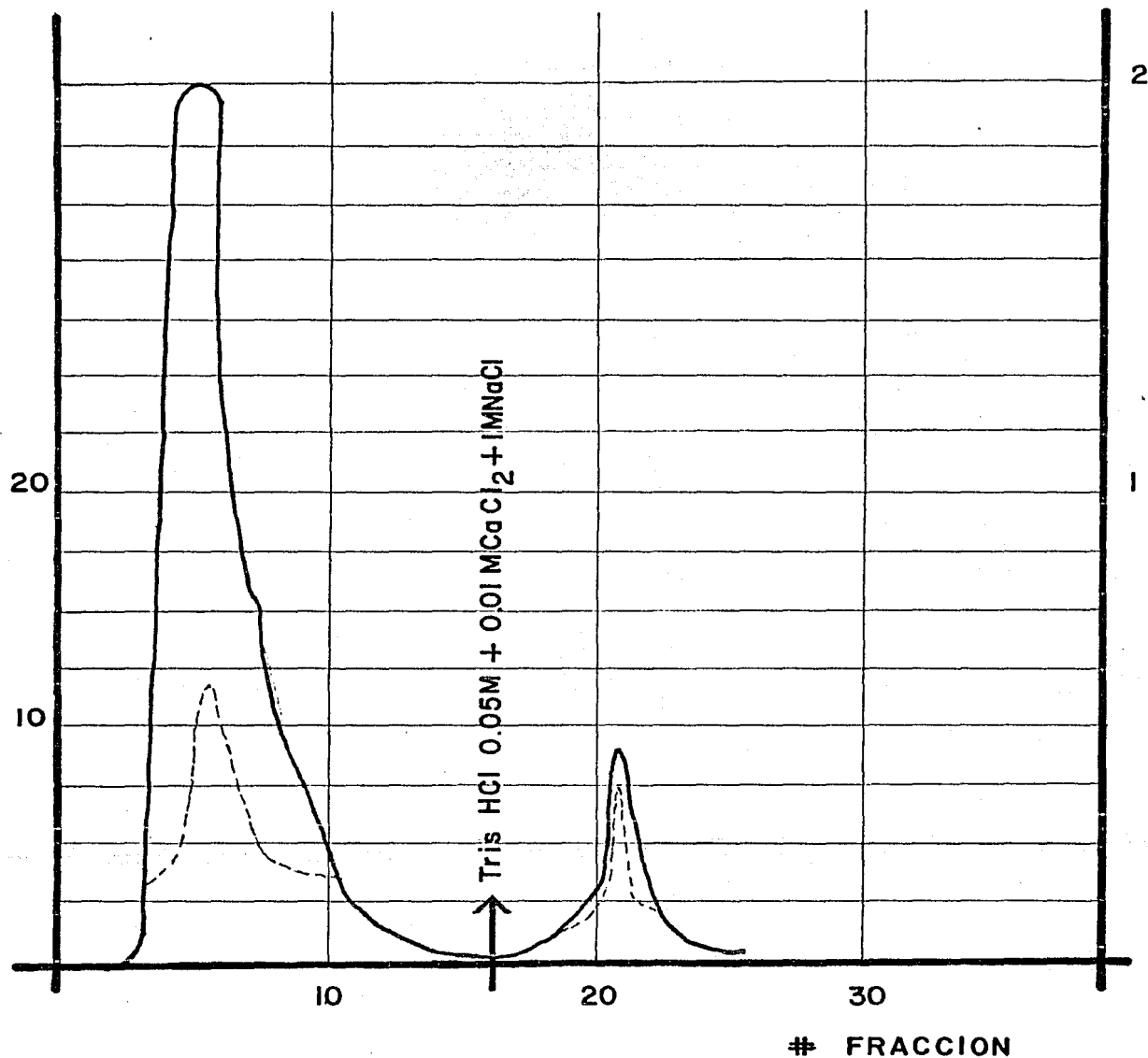


FIG. 7: Perfil cromatográfico de la actividad colagenolítica presente en la fracción de depósito que se une al DEAE al correrla en heparina-sepharosa.

fracción con afinidad es mayor que la actividad de la fracción sin afinidad. Sin embargo, no se concentró toda la enzima en la resina probablemente porque ésta estaba saturada.

7. Electroforesis SDS en geles de poliacrilamida.

Con el fin de observar el patrón de bandas presente en los diferentes pasos del fraccionamiento de las muestras totales de depósito y reabsorción, se tomaron alícuotas de cada una de las fracciones y se corrieron en geles de poliacrilamida a una concentración del 11%. En la figura 8 se observa el patrón de bandas de las muestras totales de depósito y reabsorción.

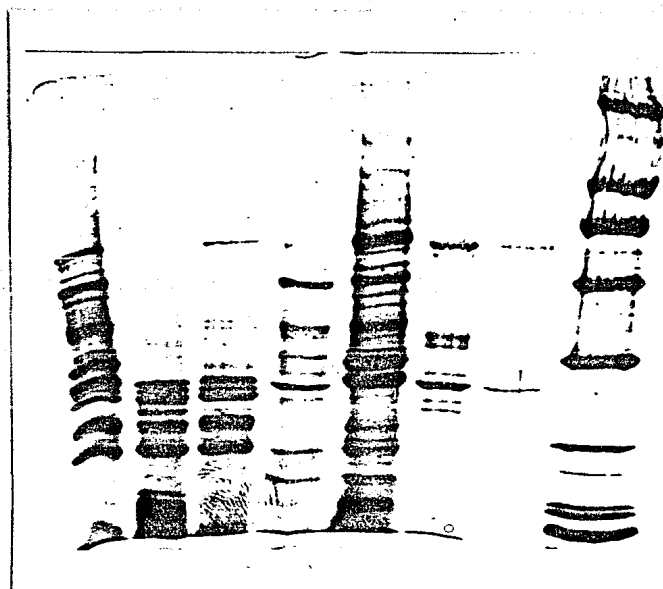


Fig. 8 Electroforesis SDS de las muestras de depósito. De izquierda a derecha: Carriles 1 y 5 Fracción total, carriles 2 y 3 fracción 1, carriles 4 y 6 fracción 2, carril 7 pico heparina-sepharose, carril 9 marcadores de peso molecular.

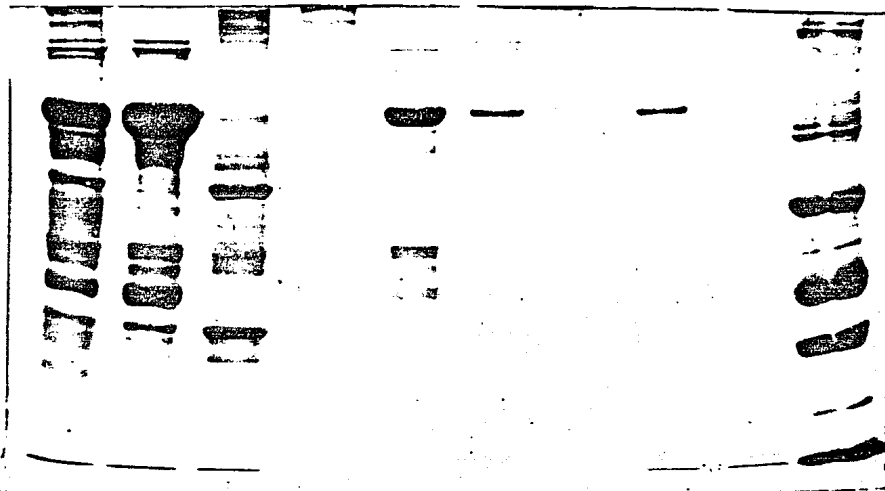


Fig. 9 Electroforesis SDS de las fracciones de reabsorción. De izquierda a derecha: Carril 1 fracción total, carril 2 fracción 1, carril 3 fracción 2, carril 4 pico heparina-sepharosa, carriles 5 a 9 fracciones U14, U19, U22, U28, U33, carril 10, marcadores de peso molecular.

DISCUSION:

Se han detectado numerosas formas inactivas de colagenasas de vertebrados en varios sistemas de cultivo de células y explantes. 49, 49, 50, 51, 52, 53 El modelo del granuloma de carragenina permite estudiar diversos factores de la remodelación del tejido conectivo ya que presenta una fase de depósito y otra

de reabsorción. En este sistema ha sido demostrado que la degradación de la colágena se lleva a cabo por una colagenasa⁴⁹ que comparte las características de las colagenasas de vertebrados y está presente en ambas etapas. Posteriormente se demostró que en la etapa de depósito parte de la enzima se encuentra latente y parte activa mientras que en la etapa de reabsorción toda la enzima se encuentra activa.⁵⁰ En este trabajo estudiamos la activación llevada a cabo por una fracción obtenida tanto de la fase de depósito como de la de reabsorción del granuloma sobre proenzima purificada de fibroblastos de piel humana. Decidimos emplear este sustrato ya que se encuentra muy purificado y caracterizado lo cual no sucede con la colagenasa latente del granuloma, en donde se desconoce la proporción que guardan la colagenasa activa y la latente.

Los explantes de granuloma de carragenina de ambas etapas liberan colagenasa al medio, en mayor cantidad entre el 3er y 4o día de cultivo. La actividad colagenolítica fue detectada al incubar las preparaciones con colágena soluble y cuantificar los productos de degradación mediante el ensayo radioactivo. Existe variación en la cantidad de enzima liberada por distintas preparaciones de explantes de granuloma de una misma fase o de diferente. La presencia de la enzima latente fue demostrada únicamente en explantes obtenidos de granulomas de depósito. Este resultado concuerda con el obtenido en homogenados de tejido de granuloma que demostró la presencia de la enzima en forma latente y activa en la fase de depósito y sólo en forma activa en la fase de reabsorción.⁵⁰

La enzima es inhibida por agentes quelantes como el EDTA y ortofenantrolina debido a que requiere de iones Ca^{++} y Zn^{++} para su correcto funcionamiento. También la actividad de la enzima pudo inhibirse con suero homólogo debido a la presencia de inhibidores en el suero como la alfa 2 macroglobulina y beta 1 anticolagenasa.⁴⁷ En este trabajo las preparaciones enzimáticas se mantuvieron siempre en presencia de Ca 0.01M para mantener la estabilidad de la enzima.

Resultados preliminares obtenidos al inicio de este trabajo demostraron que el tratamiento en "batch" con la resina DEAE celulosa de una preparación de explantes de granuloma de carragenina permite separar una fracción capaz de activar procolagenasa humana. Posteriormente, al pasar los medios de cultivo de explantes de granuloma por una cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa se obtuvo la actividad colagenolítica en la fracción que se une a la resina. Este comportamiento resultó ser distinto al descrito para muchas colagenasas que no se unen a la DEAE celulosa.⁴⁸ Sin embargo, algunas otras como la de útero y riñón de rata si se unen a la resina.⁴⁹ Lo anterior probablemente refleje la exposición de regiones determinadas de la proteína enzimática que pueden o no estar expuestas dependiendo del estado de activación.

El empleo de esta resina permitió separar una fracción con baja actividad colagenolítica que demostró ser capaz de activar procolagenasa humana. Observamos que no toda la actividad se concentra en la fracción que se une a la resina, sino que en la fracción que eluye con Tris-HCl se detecta actividad colagenolítica. Para lograr eliminarla de nuestra preparación de

activador probablemente se requiera pasar la preparación nuevamente por una columna de DEAE celulosa o seguir algún otro método de purificación. El hallazgo de una fracción con capacidad de activar procologenasa humana concuerda con el resultado obtenido en el sistema de cultivo de útero de rata y piel humana donde obtuvieron la fracción activadora mediante intercambio iónico; en este caso la capacidad de activación de la fracción libre de actividad colagenolítica se probó sobre proenzima obtenida del mismo sistema.

Nosotros tratamos de activar colagenasa latente de la etapa de depósito del granuloma con las fracciones que activaron a la procologenasa humana (resultados no mostrados) y el resultado fue negativo. Es posible que la concentración del activador haya sido insuficiente o que exista un inhibidor en el sistema cuya unión con la enzima no es afectada por el activador. La primera posibilidad de explicación se refiere a que la cantidad de activador no haya sido suficiente debido a una concentración mayor de proteínas en el sistema lo que pudiera generar una competencia entre éstas y la proteólisis fuera general. En relación a la segunda explicación existen datos de la posible existencia de un inhibidor en este sistema, el cual se separa en ultragel; sin embargo, no se ha logrado recuperar la actividad inhibitoria una vez separado el inhibidor de la enzima.

La activación de la proenzima presente en depósito fue probada también con el compuesto orgánico mercurico 4-APMA. En ningún caso logramos ver activación al preincubar con este compuesto, de donde no podemos establecer alguna conclusión con

respecto a la latencia de la enzima presente en los explantes de granuloma de depósito.

La secreción de la colagenasa de fibroblastos de piel humana como un zimógeno es una situación bien establecida, sin embargo, ha sido posible activarla con compuestos organomercuriales que son indicativos de la presencia de complejos enzima-inhibidor. La activación completa de la procolagenasa por mercuriales es dependiente de la presencia continua de concentraciones relativamente elevadas del compuesto.²⁵ Probablemente utilizando concentraciones más altas de APNA se pueda observar algún efecto activador sobre la proenzima del granuloma.

Al pasar la fracción activadora de la etapa de reabsorción por una columna de filtración molecular en Ultrogel ACA 44 se obtuvo un solo pico del cual se probaron diferentes fracciones con las que se logró activar a la proenzima. Dados los resultados obtenidos en la electroforesis donde se ve que hay más de una banda presente en las diferentes fracciones del pico, pensamos que probablemente su adecuada separación se resuelva al aumentar la altura de la columna. Observamos en el gel de electroforesis que una de las primeras fracciones del pico de Ultrogel (U22) muestra bandas de menor peso molecular que las presentes en fracciones que eluyeron posteriormente; esto lo adjudicamos a una degradación de las proteínas presentes en la fracción. Se observa, sin embargo, que aunque el perfil muestra un solo pico, la capacidad activadora no se encuentra distribuida uniformemente en todo el pico sino que se presenta en mayor porcentaje en las fracciones iniciales.

Se probó la estabilidad térmica de las fracciones

activadoras del pico de Ultrogel. En este ensayo los porcentajes de degradación obtenidos con las fracciones del pico de Ultrogel fueron menores que los obtenidos anteriormente. Este fenómeno nos ocurrió frecuentemente y con distintas preparaciones en donde la actividad disminuía con el tiempo y condiciones de almacenamiento. Se observó que el calor no modificó el efecto activador. Este último resultado concuerda con observaciones hechas con activadores de otros sistemas como cartilago articular⁵⁴ y medio condicionado de fibroblastos⁴⁹, los cuales presentan una termestabilidad atípica, característica de moléculas muy estables, ya que para inhibir su capacidad activadora de actividad colagenolítica se requiere incubar a 90° por 20 min.

En las distintas pruebas de activación con la procolagenasa se observó un comportamiento variable por parte de la proenzima ya que en algunos casos reveló mucho mayor actividad al ser tratada con tripsina que en otros. Observamos que el manejo de la proenzima, como por ejemplo congelamiento y descongelamiento, influye notablemente en su activación.

En un intento de purificar la fracción con actividad colagenolítica presente en el granuloma de carragenina se empleó la resina heparina-sepharosa. Se ha descrito que colagenasas obtenidas de diferentes fuentes presentan afinidad por heparina y se han utilizado resinas acopladas a este compuesto para purificar a la enzima.⁴⁴⁻⁴⁷ Se realizaron diferentes ensayos con diversas preparaciones tanto de depósito como de reabsorción y no se logró obtener por completo la actividad colagenolítica en

la fracción que se une a la resina. Al correr en electroforesis la fracción con afinidad por la heparina-sepharosa se observó la eliminación de una serie de bandas presentes en las fracciones de los pasos anteriores de la purificación, esto se puede ver con mayor claridad en la fracción de depósito e indica que se logró cierta purificación de la fracción enzimática aunque no toda la actividad se haya concentrado en la fracción afin por heparina-sepharosa. Es probable que ésta última se haya saturado por lo que sea conveniente aumentar las dimensiones de la columna.

Al correr en electroforesis las fracciones obtenidas de los diferentes pasos del fraccionamiento se observa la eliminación de una serie de bandas. En la fracción que se une a la DEAE celulosa, de la preparación de depósito y reabsorción, predominan dos bandas; una que migra en la región de 70 kd y otra en la región que corresponde a 40 kd. En la preparación de depósito se observa además otra banda de 88 kd; ésta junto con la de 40 kd son las bandas que se presentan en la fracción con afinidad por la heparina. Se encuentran en el rango en el que se ha descrito que migran distintas formas moleculares de la enzima obtenidas de otras fuentes. Para poder establecer si alguna de estas dos bandas corresponde a una forma molecular de la colagenasa del granuloma se requiere lograr una mejor purificación de la preparación.

La degradación de fibras de colágeno es un fenómeno involucrado en muchos procesos biológicos como construcción, recambio y reparación de estructuras en donde se logra un adecuado balance entre la presencia y ausencia de esta proteína gracias a una regulación precisa del sistema colagenolítico, el

cual en caso de desequilibrio conduce a situaciones patológicas.

Diversos aspectos de la degradación de las fibras de colágena han podido ser abordados gracias a estudios en distintos modelos experimentales. La degradación de la colágena en el modelo del granuloma de carragenina ha sido un tema de estudio desde hace muchos años; muchas han sido las explicaciones propuestas sobre la forma como esta degradación se desencadena posterior al periodo de siete a diez días, en donde se deposita la colágena. Inicialmente se pensó que la enzima no estaba presente durante la etapa de depósito, posteriormente se demostró la presencia de la colagenasa durante toda la evolución del granuloma²⁹. Ahora se sabe también que parte de la enzima se encuentra en estado latente durante la fase de depósito y que en reabsorción toda ella está activa. El hallazgo de una fracción activadora en el granuloma mediante la técnica de explantes, es un avance más en la comprensión de este proceso de degradación. Quedan todavía varios aspectos por demostrar como la activación de la proenzima del propio granuloma, lograr una mayor purificación y caracterización del activador, así como dilucidar el mecanismo molecular del proceso de activación. Sin embargo, el hallazgo de esta tesis tiene una importancia fisiológica relevante ya que el estado de activación de la enzima dependerá de las contribuciones parciales de activadores, inhibidores y concentración de proteína enzimática, dando por resultado los porcentajes variables de enzima activa que en cada sistema determinan eficientemente una ordenada regulación de la estructura, proporcionando durante el crecimiento, el desarrollo

o ante situaciones patológicas, el armazón extracelular adecuado a los distintos procesos de la vida.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. Reddi, A.H. en Extracellular Matrix Biochemistry (Piez, K.A. & Reddi, A.H. eds.): 355-454; Elsevier, New York, 1984.
2. Hay, E.D., Cell. Biol. 91: 205; 1981.
3. Martin, G.R. et al., TIBS. July, 1985: 285-287.
4. Trelstad, R.L., Mundo Científico. 1(3): 284-295; 1981.

5. Piez, K.A. en Biochemistry of Collagen (Ramachandran, G.N. ed.): 1-40. Plenum Press, New York; 1976.
6. Piez, K.A. en Treatise on Collagen (Ramachandran, G.N. ed.): 207. Academic Press, New York, 1967.
7. Traub, W., Piez, K.A., Adv. Prot. Chem. 25: 243; 1971.
8. Eyre, D.R., Science. 207: 1315-1322; 1980.
9. Pérez Tamayo, R. en Los perfiles de la bioquímica en México (Morá, J. ed.): 495-514. UNAM. México; 1974.
10. Bornstein, P., Ann. Rev. Biochem. 49: 957-1003; 1980.
11. Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C. en Biochemistry of Collagen (Ramachandran, G.N., Reddi, A.H. eds.) Plenum Press, New York, 1976.
12. Fessler, L.I., Ann. Rev. Biochem. 47: 129-167; 1978.
13. Siegel, R.C., Int. Rev. Conn. Tiss. Res. 2: 73; 1978.
14. Pérez Tamayo, R., Am. J. Pathol. 92: 411, 1978.
15. Gross, J., Lapiere, C.M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 40: 1014, 1942.
16. Gross, J. en Chemistry and Molecular Biology of the Intracellular Matrix (Balasz, E.A. ed.): 1623-1636. Acad. Press, New York; 1970.
17. Harris, E.D. Jr., Welgus, H.G., Krane, S., Coll. Rel. Res. 4: 493-512; 1984.
18. Tschache, H., Mc Cartney en Collagen Degradation and Mammalian Collagenase (Tsuchiya, N., et. al. eds.): 27-40 Excerpta Medica, Amsterdam; 1982.
19. Gross, J., et. al. en Collagenase in Normal and Pathological Connective Tissues (Woolley, D.E., Evanson, J.M. eds.): 11 John Wiley & Sons Ltd, Chichester; 1980.
20. Werb, I. en Collagen in Health and Disease (Weiss, J., Jayson, E. eds.): 121. Churchill Livingstone, London; 1982.
21. Seltzer, J.L., Welgus, H., Jeffrey, E.E., Eisen, A.Z., Arch. Biochem. Biophys. 173: 355-361; 1976.
27. Harris, E.D. Jr., Krane, S.M., N. Engl. J. Med. 291: 557, 605, 652; 1974.
23. Mc. Creamery, P.A., Wood, S. Jr., Harris, E.D. Jr., Science.

182: 70-71; 1973.

24. Nimmi, M. E., *Sem. Arth. Rheumat.* 13: 1, 1983.
25. Sunada, H., Nagai, Y., *Biom. Res.* 4 (1): 61-70; 1983.
26. Woessner, J. F., Brewer, T.H., *Fed. Proc.* 19: 335; 1960.
27. Montfort, I., Pérez Tamayo, R., *Lab. Invest.* 10: 1240; 1961.
28. Morrione, T.G., Seifter, S.J., *Exp. Med.* 115: 357; 1962.
29. Dayer, J. M., Breard, J., Chess, L., Krane, S. M., *J. Clin. Invest.* 64: 1386-1392; 1979.
30. Salo, T., Oikarinen, J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 130(2): 588-595; 1985.
31. Koob, T.J., Jeffrey, J.J., Eisen, A.Z., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 61: 1083-1088; 1974.
32. Harper, E., Bloch, K., Gross, J., *Biochemistry.* 10: 3035; 1971.
33. Vaes, G., *Biochem. J.* 126: 275; 1972.
34. Werb, Z., Burleigh, M.C., *Biochem. J.* 137: 373-385; 1974.
35. Stricklin, G.P., Jeffrey, J.J., Roswit, W. T., Eisen, A.Z., *Biochemistry.* 22: 61-68; 1983.
36. Stricklin, G. P., Bauer, E. A., Jeffrey, J. J., Eisen, A.Z. *Biochemistry.* 16: 1607-1615, 1977.
37. Nagase, H., Jackson, R.C., Brinckerhoff, C.E., Vater, C.A., Harris, D.E. Jr., *J. Biol. Chem.* 256: 11951-11954; 1981.
38. Boxer, P.A., Leibovich, J.S., *BBA* 444: 626-632; 1976.
39. Horwitz, A.L., Crystal, R.G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 69(2): 296-303; 1976.
40. Harris, E.D., Farrell, M.E., *BBA* 278: 133-141; 1981.
41. Barret, A.J. *Meth. Enzymol.* 80: 737-754; 1981.41.
42. Sellers, A., Catwright, E., Murphy, G., Reynolds, J., *Biochem. J.* 163: 303; 1977.
43. Eechout, Y., Vaes, G., *FERS Lett.* 28: 198; 1972.
44. Woessner, J.F., *Biochem. J.* 161: 535; 1977.
45. Birkedal-Hansen, H., Cobb, C.M., Taylor, R.E., Fullmer, H.M., *BBA* 438: 273, 1976.

46. Eisenberg, N., Johnson, L., Kenneth, M., *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 125: 279; 1984.
47. Nagase, H., et. al. en *Collagen Degradation and Mammalian Collagenase* (Tsuchiya, M., Pérez Tamayo, R., Okasaki, I., Maruyama, K. eds.): 20-26, *Excerpta Medica, Amsterdam*; 1982
48. Harper, E., Gross, J., *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 48: 1147-1152; 1972.
49. Vater, C.A., Nagase, H., Harris, E.D.Jr., *J. Biol. Chem.* 258(15): 9374-9382; 1983.
50. Tyree, R., et. al., *Arch. Biochem. Biophys.* 208(2): 440-443; 1981.
51. Horwitz, A.L., Kellman, J.A., Crystal, R.G., *Nature* 264: 772; 1976.
52. Weiss, S.J., et. al., *Science* 227: 747-749; 1985.
53. Treadwell, B.V., *Arch. Biochem. Biophys.* 251(2): 724-731; 1986.
54. Treadwell, B.V., *Arch. Biochem. Biophys.* 251(2): 715-723; 1986.
55. Birkedal-Hansen, H., Taylor, R.E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 107(4): 1173-1178; 1982.
56. Pérez Tamayo, R., *Lab. Invest.* 22(2): 137; 1970.
57. Pérez Tamayo, R., *Lab. Invest.* 22(2): 142; 1970.
58. Rojkind, M., Pérez Tamayo, R., *Arch. Path.* 74: 455; 1962.
59. Pardo, A., Pérez Tamayo, R., *Conn. Tiss. Res.* 2: 243-252; 1974.
60. Figueras, T., y Pardo, A., *Collagen Rel. Res.* 6: 379-386; 1986.
61. Goldberg, G.I., Wilhelm, S.M., Kronberger, A., Bauer, E.A., Grant, G.A., Eisen, A.I. *J. Biol. Chem.* 261(14): 6600-6605; 1986.
62. Terato, K., Nagai, y. Kawanishi, K., Yamamoto, S., *BRA* 44: 753-762; 1976.
63. Lefevre, M.F., Slegers, G.A., Claeys, A.F. *Clinica Chimica Acta* 22: 165-167; 1974.
64. Bradford, M., *Anal. Biochem.* 72: 248; 1976.

65. Laemmli, U.K., *Nature* 227: 680; 1970.
66. Cawston, T. E. y Tyler, A. J., *Biochem. J.* 183: 647-656; 1979.
67. Sakamoto, S., et. al. *B.B.A.*, 385: 41-50; 1981.
68. Harris, E. D. Jr, y Vater, C. A. en *Methods in Enzymology* (Cunningham, L.W. y Frederiksen, D.W. eds.) 82: 423-452; 1982.
69. Vellido, F. Comunicación personal.