

Lej: 25



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Facultad de Ciencias

**ACTIVIDAD GELATINOLITICA EN PREPARACIONES  
DE COLAGENA**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**B I O L O G O**

P r e s e n t a :

**MARTHA CALAHORRA FUERTES**

México, D. F.

1983



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.

## ABREVIATURAS

Gly .- Glicina  
Pro .- Prolina  
HPro .- Hidroxiprolina  
Ile .- Isoleucina  
Leu .- Leucina  
Cis .- Cistefna  
APMA .- Aminofenilmercuricoacetato  
EDTA .- Acido etilendiamintetraacético  
PMSF .- Fenilmetilsulfonilfluoruro  
N-EM .- N- Etilmaleimida  
pCMB .- p-Cloromercuribenzoato  
SDS .- Dodecil sulfato de sodio  
DFP .- Di-isopropilfluorofosfato  
TCA .- Acido tricloro acético

## RESUMEN

Se ha demostrado que la colagenasa permanece unida a la colágena nativa durante el proceso de extracción y purificación de esta. Experimentos con colágena desnaturalizada (gelatina) sugieren además la presencia de actividad proteolítica inespecífica en las mismas preparaciones de colágena.

Diferentes procedimientos de extracción representan distintas formas identificables de colágena. Solventes salinos neutros extraen moléculas de colágena que no están unidas a fibras de colágena por enlaces covalentes intermoleculares. Soluciones de ácidos orgánicos solubilizan fibras donde prevalecen enlaces aldimina lábiles a pH ácido y la pepsina solubiliza mayor cantidad de fibras, ya que degrada porciones donde se encuentran enlaces covalentes.

En el presente trabajo se hicieron extracciones sucesivas de colágena de piel de cobayo, utilizando NaCl 0.15 M, NaCl 0.45 M, ácido acético 0.5 M y ác. acético 0.5 M + pepsina con el objeto de analizar si la actividad colagenolítica se encuentra preferentemente en alguna de estas y explorar la actividad gelatinolítica presente en ellas.

Los resultados observados por el método de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, indican que la actividad colagenolítica a 35°C se encuentra en preparaciones extraídas tanto en solución salina como ácida.

Se encontró igualmente en todas las extracciones la presencia de actividad gelatinolítica a 37°C a pH 5.5 inhibible por pCMB y a pH 8.5 no inhibible por ninguno de los inhibidores utilizados : EDTA, PMSF, N-EM, pCMB y cisteína.

## INTRODUCCION

El tejido conjuntivo es un tejido de sostén, una de cuyas funciones es la de unir otros tejidos y estructuras. Se origina a partir del mesodermo. Consta de células y sustancia intercelular; dentro de esta se encuentran fibras, entre ellas las formadas por colágena.

La colágena es una proteína que se encuentra como constituyente principal de hueso, cartílago, piel, tendones, dientes, etc., por lo que es una proteína muy abundante en los vertebrados ya que constituye entre un 30 a un 60 % de las proteínas de un organismo adulto completamente desarrollado (1).

Existen varios estudios que sugieren que las moléculas de colágena o las fibras derivadas de estas desempeñan un papel importante en los procesos de desarrollo, unión celular, quimiotaxis, etc. De este hecho se cuestiona el punto de vista tradicional de que la colágena actúa solo como una proteína estructural (2).

En su estructura primaria una tercera parte del número total de residuos es glicina y el 25 % del total es prolina e hidroxiprolina; la secuencia se representa como Gly X Y y es repetitiva, donde la prolina o la hidroxiprolina se pueden encontrar en posición X o Y, siendo en la mayoría de los casos la prolina en posición X y la hidroxiprolina en posición Y.

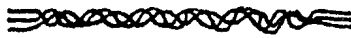
La prolina es un iminoácido donde el nitrógeno del grupo amino se encuentra unido formando un anillo. La consecuencia de esto es que el aminoácido previo unido a éste residuo iminoacil no tiene libertad de rotación en la unión N - C<sup>α</sup>. La hidroxiprolina es una prolina hidroxilada a la cual se le ha atribuido que da estabilidad térmica a la triple hélice, existiendo alrededor de cien residuos por cadena polipeptídica .

La molécula de colágena tiene forma de rodillo de 300 x 1.5 nm. Con

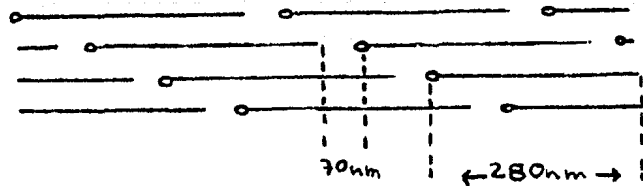
siste de tres cadenas polipeptídicas similares, enrolladas en hélice a la izquierda, denominadas cadenas  $\alpha$  y a su vez entre ellas mismas se enrollan a la derecha para formar una triple hélice. Cada cadena tiene cerca de 1,050 residuos. Por difracción de rayos X de gran ángulo se sabe que la hélice tiene un grosor de 0.95 nm con los aminoácidos espaciados axialmente por 0.285nm.

Para la biosíntesis de la colágena, que se lleva a cabo en fibroblastos se pueden distinguir varios pasos importantes a diferencia de otras proteínas, uno es que se sintetiza como un precursor y después hay una serie de modificaciones postraduccionales para constituirse como tal. Estos eventos son la conversión de prolina a 4 hidroxiprolina principalmente y 3 hidroxiprolina, la conversión de lisina a hidroxilisina, el rompimiento proteolítico de procolágena a colágena, entre otros. Al menos siete enzimas se encuentran involucradas en éstos procesos.

Al precursor de la colágena se le conoce como procolágena y difiere de ésta en que posee dos extensiones peptídicas adicionales a ambos lados de las tres cadenas de la molécula, a estas extensiones se les conoce como propéptidos, los cuales hacen a la procolágena más soluble y de esta forma es transportada evitándose la formación prematura de fibras durante el proceso de biosíntesis. Otra función importante que se le atribuye a los propéptidos es que son esenciales para la asociación de las tres cadenas polipeptídicas y formar la triple hélice de la molécula nativa. Las moléculas así formadas se agrupan con una orientación homogénea en haces paralelos formando fibras con un desplazamiento de 233 - 234 residuos (Miller 1976) dando lugar a la periodicidad característica de 70 nm observada en las fibras de colágena al microscopio electrónico (3).



TRIPLE HELICE



Se han caracterizado 6 tipos de colágenas, todas compuestas de tres cadenas polipeptídicas (tabla 1). Todas tienen forma de triple hélice y difieren entre sí en el tipo de cadenas y en el tiempo requerido para su síntesis y secreción. La colágena tipo IV es la que requiere mayor tiempo para sintetizarse y la colágena tipo I es la que requiere el menor (4).

Este aislamiento de 6 tipos de moléculas de colágena en diferentes tejidos sugiere que al menos en los organismos superiores existen 9 genes diferentes para la colágena. La existencia de colágenas genética y estructuralmente diferentes es uno de los más prominentes ejemplos conocidos de polimorfismo en proteínas (5).

La biosíntesis puede ser alterada en ciertas fases del desarrollo y en ciertas condiciones, por ejemplo se observa un incremento muy marcado en el depósito de colágena en la cicatrización de heridas, en fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, etc.. Esta acumulación puede deberse a un incremento en la síntesis de procolágena, pero se sabe poco acerca de los cambios bioquímicos que hacen que cambie la tasa de biosíntesis. Se cree que éste cambio se debe a un desajuste entre la tasa de degradación y de biosíntesis.

Los diferentes tipos de colágena no solo se diferencian en su velocidad de síntesis sino también en la susceptibilidad a las colagenasas. Por -

TABLA I

TIPOS GENETICOS DE COLAGENA

TIPO	COMPOSICION DE SU CADENA	DISTRIBUCION EN LOS TEJIDOS
I	$[\alpha_1(I)]_2 [\alpha_2(I)]$	Hueso, dentina, tendones, pared arterial, intestino, pared del útero, hígado, fibrocartílago, cicatrices, sinovio, válvulas del corazón.
	$[\alpha_1(I)]_3$	Células del fluido amniótico, - embrión de pollo, tendones.
II	$[\alpha_1(II)]_3$	Cartilago hialino, humor vítreo.
III	$[\alpha_1(III)]_3$	Dermis, pared arterial, pared - del útero, cápsula sinovial, tejido de cicatrización, válvulas del corazón, (usualmente coexiste con el tipo I).
IV	$[\alpha_1(IV)]_3$	Glomérulos renales, cápsula del cristalino, endotelio vascular, subepitelial, unión neuromuscular.
V	A B <sub>2</sub>	Membranas amniótica y coriónica, hígado, piel, nervio ciático, - placenta, aorta, membrana muscular, membrana del tendón, vari- as superficies celulares, fibro- blastos de piel, musculo liso.
	$[C P 5 5]_3$	Intima de la aorta, placenta, - glomérulos renales.



ejemplo la colágena de tipo II es más resistente al ataque de la colagenasa que los tipos I y III. Ciertos datos sugieren que podrían existir colagenasas específicas para cada tipo. La colagenasa de piel humana no ataca a las colágenas de tipo IV y V pero si a las tipo I, II, III (4). Estos descubrimientos son importantes porque proveen una base para el entendimiento de los procesos que regulan las proporciones relativas de los diferentes tipos de colágena en los tejidos.

Estos procesos de regulación son importantes para el mantenimiento del medio interno, mediante los cuales, entre otras cosas, los constituyentes del organismo son reemplazados continuamente. Todos los elementos que forman parte de los seres vivos están sujetos a un recambio continuo habiendo una variación en su permanencia en los tejidos, o sea, a su vida media. En éstos - procesos juegan un papel muy importante las enzimas, y en el caso particular de la colágena, no solo la colagenasa sino también otro tipo de proteasas son importantes ya que aunque la responsable del primer paso de la degradación de la colágena es la colagenasa, este paso es necesario para que puedan actuar - las demás proteasas.

Las colagenasas animales operan degradando colágena nativa en solución y colágena en fibras, bajo condiciones fisiológicas de pH y temperatura, rompiendo a la molécula en un solo punto aproximadamente tres cuartos a lo -- largo de la molécula a partir del N terminal. La enzima rompe las tres cadenas, dejando dos estructuras triple helicoidales llamadas  $TC_A$  y  $TC_B$  que representan el 75% y 25% respectivamente de la porción original de la molécula. A diferencia de la colágena intacta, estas estructuras son inestables bajo condiciones fisiológicas, estos fragmentos se desnaturalizan y pueden ser degradados por una variedad de proteasas neutras no colagenolíticas.

Todos los datos sugieren que las colagenasas tienen una especifici-

dad por la unión Gly - Ile y Gly - Leu y requieren que la molécula se encuentre en triple hélice (6). Esta condición específica en la cual la colágena es degradada por la colagenasa requiere de un alto grado de especificidad de la enzima por su sustrato. Además se requiere una regulación precisa de su síntesis, secreción, activación, inhibición y distribución de la enzima.

Estas enzimas han sido obtenidas de diferentes tejidos o cultivos de células de diferentes especies bajo condiciones tanto fisiológicas como patológicas y en los estudios se ha visto que a pesar de que los mecanismos de acción de todas las colagenasas parecen ser los mismos en cuanto a su sitio de ruptura, estas enzimas difieren en algunas de sus características tales como su peso molecular, número de rompimientos producidos en el sustrato, susceptibilidad a ciertos inhibidores (5).

En cuanto a las colagenasas de invertebrados Eisen y Jeffrey 1973 (7) han encontrado que la colagenasa de hepatopáncreas del cangrejo Uca pugnator posee características únicas, como son, que rompe a la colágena en fragmentos amino terminales de 75%, 70% y 67%, es inhibible por DFP y no por EDTA o cisteína.

También a diferencia de las colagenasas de mamíferos, la colagenasa bacteriana extraída de Clostridium histolyticum por Seifter y Harper 1970 rompe a la colágena en varios sitios.

Debido a esta variedad de enzimas, desde 1962 y después de una serie de estudios por parte de Gross y sus colegas se le llamó colagenasa a cualquier enzima capaz de degradar la colágena nativa en fibrillas bajo condiciones fisiológicas de pH y temperatura. Se ha visto que estas colagenasas son metaloenzimas que requieren  $Ca^{++}$  y por lo tanto son inhibidas por agentes quelantes como EDTA, 1-10-0 Fenantrolina y cisteína, también son inhibidas por moléculas que se encuentran en el suero tales como  $\alpha_2$  macroglobulina ( $\alpha_2M$ ).

Nagai 1975 reportó que la colagenasa tiene mayor afinidad por el  $\alpha_2^M$  que por las fibras de colágena.

La cisteína además de ser quelante es un reductor de uniones disulfuro (6). La inhibición producida por estas moléculas en algunos casos puede ser reversible para algunas colagenasas mientras que para otras no.

El pH óptimo en el cual las colagenasas son activas está entre 7 y 8 perdiendo toda su actividad a un pH menor de 6. Su peso molecular oscila entre 25,000 a 60,000 y se han reportado pesos mayores (8).

En cuanto a su síntesis se refiere hay datos que indican que tanto las células epiteliales, como los fibroblastos, tienen la capacidad de producir colagenasa. Se ha reportado también que las células de Kupffer del hígado (9) al igual que los leucocitos (10) son capaces de sintetizar colagenasa.

Esta enzima es muy difícil de extraer ya que a partir de grandes cantidades de tejido se obtienen  $\mu\text{g}$ , a veces en forma inactiva, otras veces en forma activa. En estos casos hay datos a cerca de que existen dos mecanismos en muchos sistemas diferentes, uno válido para unos sistemas y el otro para otros.

El primer mecanismo consiste en la existencia de un zimógeno, ya sea que la enzima se active espontáneamente sin que ocurra ningún cambio aparente en su peso molecular, o que por ataque proteolítico de enzimas como tripsina se active a la enzima latente por pérdida de un péptido de bajo peso molecular (11). Hasta ahora solo se tiene evidencia de un zimógeno en leucocitos humanos (Murphy et.al. 1977), hueso de ratón (Vaes 1975) y renacuajo (12). Este zimógeno o procólagenasa puede ser activado exponiéndolo a tripsina. En la piel humana hay un material con un peso molecular muy alto que muestra identidad inmunológica con la colagenasa, pero es enzimáticamente inactivo y la actividad aparece una vez expuesto a tripsina (13).

El segundo mecanismo implica la separación de un complejo inhibidor

enzima.

Sellers et.al. 1977 fueron los primeros en demostrar que los compuestos orgánicos mercuriales podían activar a la colagenasa latente. Los compuestos que usaron fueron aminofenilmercuriicoacetato (APMA) y p-cloromercuri benzoato (p-CMB). Se ha visto que el APMA activa separando un complejo enzima inhibidor (14).

Como ya se mencionó antes la colagenasa se encuentra en varios tejidos y se ha tratado de localizar en ellos por medio de técnicas inmunohistoquímicas. Por estudios de inmunofluorescencia Montfort y Pérez T. encontraron que la colagenasa se encuentra pegada a la colágena en el útero normal de la rata (15). Reddick 1974 sugiere que en la piel humana, la colagenasa está tanto entre las células como entre las fibras de colágena extracelular de la dermis superior. Bauer 1977 demostró que la enzima se encontraba en elementos del estroma que rodea a células tumorales, Wolley 1977 la encontró en el cartílago articular y Sakamoto 1978 la encontró asociada al tejido conectivo, células endoteliales, osteoblastos, osteocitos y células cartilaginosas (16).

Otros autores como Pardo y Pérez T. describen que la colágena extraída de piel y parcialmente purificada tiene colagenasa, demostrando que la colágena se extrae con una colagenasa específica que permanece unida a ella a través de los procesos de extracción y purificación de la colágena (17).

Cuando la colágena se desnaturaliza por acción del calor toma el nombre de gelatina, esto involucra una conversión de la estructura rígida de triple hélice de la colágena a un enrollamiento aleatorio, diferente a la triple hélice (1).

Se ha reportado que proteasas capaces de degradar gelatina (Pardo - 1975, Harris 1980) también permanecen unidas a la colágena durante el proceso de extracción de la misma. Se sabe que esta actividad proteolítica no se debe

a la colagenasa, ya que la gelatina es resistente a ésta (17, 18). Mc Croskery et,al. demostraron que la colagenasa altamente purificada tiene muy poca capacidad de degradar gelatina intacta o fragmentos  $TC_A$  y  $TC_B$  a temperatura fisiológica y que la conformación secundaria de la colágena provee la estructura necesaria para el reconocimiento y catálisis por la colagenasa.

El presente trabajo tiene como objeto caracterizar ésta actividad gelatinolítica en extracciones secuenciales de colágena, así como determinar si la actividad colagenolítica copurifica con cada una de estas extracciones o no.

La extracción de colágena se puede realizar tanto en soluciones salinas como ácidas. Las soluciones salinas a pH neutro extraen principalmente moléculas de colágena que no se encuentran unidas a fibras por enlaces covalentes intermoleculares. Las soluciones ácidas solubilizan fibras donde prevalecen enlaces aldimina lábiles a p H ácido y agregando pepsina se solubilizan mayor cantidad de fibras ya que es capaz de degradar enlaces covalentes.

De esta forma cabe preguntar si al hacer la extracción secuencial de colágena, la enzima o enzimas se encuentran preferentemente unidas a alguna de estas extracciones y si se trata de la misma colagenasa que degrada a la gelatina o si se debe a la existencia de una gelatinasa.

## MATERIAL Y METODOS

### EXTRACCION DE COLAGENA

La preparación de las muestras de colágena involucra varios pasos que van desde la obtención del tejido apropiado, hasta la extracción y solubilización de la colágena tanto en soluciones salinas como ácidas.

Todo esto se trabajó a una temperatura de 4°C para evitar el crecimiento bacteriano, aumentar la solubilidad de la colágena nativa y retener su conformación (19).

Se trabajó con pieles de cobayo a las cuales se les eliminó el tejido adiposo subcutáneo. Las pieles se cortaron en pequeños fragmentos y se extrajo la colágena inicialmente en NaCl 0.15 M agitándose constantemente durante 48 h, esto se decantó guardando la solución para la purificación. Estos mismos fragmentos se extrajeron en NaCl 0.45 M repitiendo el mismo procedimiento, después en ácido acético 0.5 M y por último se extrajeron en ác. acético + pepsina a una concentración de 1 mg/l. Por lo que las cuatro extracciones son obtenidas de las mismas pieles.

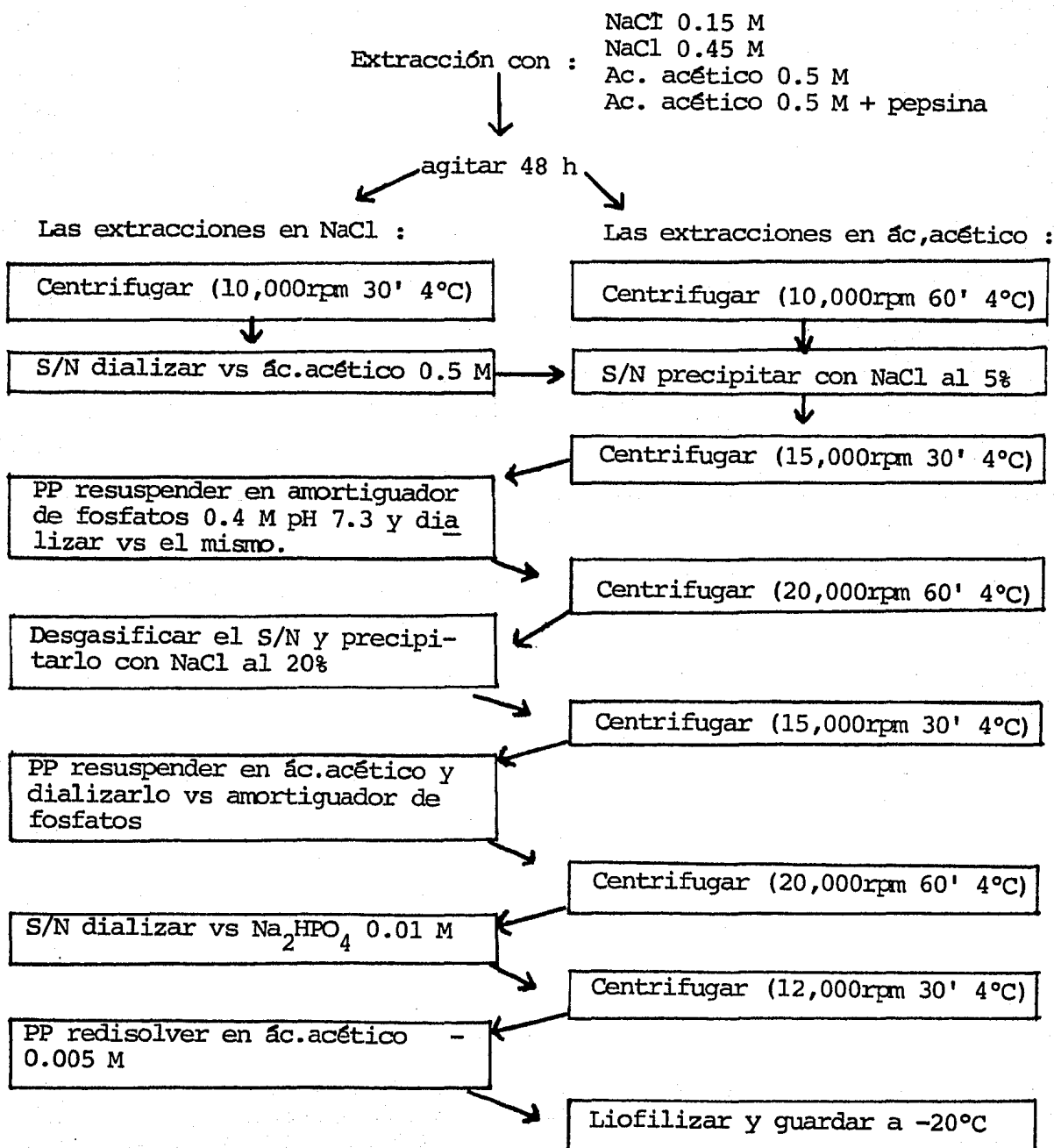
La nomenclatura que se va a utilizar para las diferentes extracciones secuenciales será que a la colágena extraída en NaCl 0.15 M se le denominará 0.15, a la extraída en NaCl 0.45 M se le denominará 0.45, a la extraída en ác. acético 0.5 M será la 0.5 y la extracción en ác. acético 0.5 M + pepsina será la 0.5p. La nomenclatura será la misma ya sea que se hable de la colágena o de su respectiva gelatina.

### PURIFICACION DE LA COLAGENA

Esta purificación se realizó básicamente de acuerdo al método de Trelstad y Gross (20) con algunas modificaciones (tabla II).

TABLA II

ESQUEMA DEL METODO DE PURIFICACION DE LA COLAGENA



Una vez purificada la colágena se corren en electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS entre 20 y 30  $\mu$ g con el objeto de ver si no existen contaminantes detectables por esta técnica. En caso de no encontrarse totalmente purificada o de haber sufrido degradación, es posible observar por debajo de las bandas  $\alpha$  otras bandas, que bien pueden corresponder a fragmentos de colágena producidos por la acción enzimática o bien a alguna impureza presente a lo largo de la purificación, en cuyo caso se procede a una precipitación con alcohol al 14%.

La concentración de colágena se calculó midiendo el contenido de HPro. en alícuotas por el método de Woessner.

#### ELECTROFORESIS SDS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Esta electroforesis se realizó según la técnica de Laemmli (21) para las diferentes incubaciones de las pruebas de actividad tanto colagenolítica como gelatinolítica, ya que los productos de degradación tanto de la colágena como de la gelatina tienen un peso molecular menor que la colágena nativa, por lo que presentan un patrón electroforético identificable.

A todas las muestras de las incubaciones, antes de correrlas en electroforesis, se les agregó SDS y glicerina, ambos a una concentración final de 10 g/l según la técnica, una gotita de azul de bromofenol 0.5 g/l como frente y se gelatinizaron en agua hirviendo durante 2 min.

Se hicieron los cálculos necesarios para que la concentración corrida fuera siempre la misma y estuviera entre 20 y 30  $\mu$ g. La concentración de acrilamida utilizada en el gel inferior fue de 7.5% y del gel superior fue de 3%.

La tinción y revelado del gel se realizó tificando con azul de coomassie R-250 1 g/l, metanol, ác. acético, agua (45:10:45) y se destañaron en metanol, ác.acético, agua (25:8:65) durante 2 h y después en una proporción



de (15:8:75) hasta que se destiñeran totalmente (22).

Se probaron también tinciones con TCA 50 g/l y azul de coomasie R-250 10 g/l agregándolos en una proporción de 30:1 respectivamente (23) ya que frecuentemente existe el problema de que las preparaciones se desteñan.

#### DETERMINACION DE HIDROXIPROLINA

Con este procedimiento se pudo cuantificar la concentración de colágena, ya que es una de las pocas proteínas que contiene este iminoácido.

Se determinó por el método de Stegemann modificado por Woessner (24) Este método involucra la oxidación de la hidroxiprolina con la cloramina T 0.05 M, la reacción se detiene con ácido perclórico 3.15 M y se colorea con p-dimetil amino benzaldehído al 20% en eter monometílico de etilén glicol. Se lee la absorción a 557 nm y se multiplica por un factor de corrección el cual ha sido calculado a partir de la cantidad de residuos de HPro que hay en una molécula de colágena y es de 7.46.

#### DETERMINACION DE ACTIVIDAD COLAGENOLITICA

Se siguió el procedimiento descrito por Pardo y Pérez Tamayo (17) para determinar la actividad de colagenasa unida a colágena. Se colocaron 0.2 ml de muestra de colágena de las extracciones en NaCl 0.15 M = 0.15, NaCl 0.45 M = 0.45, ácido acético 0.5 M = 0.5 y ácido acético 0.5 M + pepsina = 0.5p que previamente se habían disuelto en ácido acético 0.005 M a una concentración de 2 mg/ml agregándoles 0.2 ml de un amortiguador que contiene Tris HCl 0.1 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 0.4 M a pH 7.3, incubando una serie a temperatura ambiente y otra a 35°C durante 72 h. De cada una de estas muestras se incubaba un control con EDTA a una concentración final de 40 mM.

Esta misma prueba se realizó en presencia de glucosa a una concentración de 1 M según la técnica de Terato y Nagai (25) que conserva la colágena soluble a esta temperatura evitando la formación de fibras.

Estas pruebas se realizaron con el objeto de observar si la colagenasa que se ha descrito que permanece unida a la colágena durante el proceso de purificación de la misma, se encuentra en los cuatro tipos de extracciones secuenciales, ya que este fenómeno se ha descrito solo para colágena extraída en ácido acético o en NaCl pero no secuencialmente.

#### ACTIVACION DE LA COLAGENASA

Se ha descrito que el APMA es un activador de la colagenasa latente y con el objeto de ver si la colagenasa unida a colágena se encuentra en estado latente como sugiere Harris (26), se activó incubando a una temperatura de 35°C. El activador se utilizó a una concentración de 10 mM.

#### PRESENCIA DE COLAGENASA

Con base en lo descrito por Pardo et.al. (27) la colagenasa unida a colágena puede detectarse en electroforesis a pH 8.1 ya que la colágena permanece en el origen y corre únicamente la enzima que migra a cierta distancia hacia el ánodo.

#### ELECTROFORESIS PH 8.1

La electroforesis en gel de poliacrilamida a pH 8.1 se realizó según la técnica de Davis (28) y Ornstein (29) tanto en tubo como en placa.

Todas las muestras estaban disueltas en ácido acético 0.005 M a una concentración de 2 mg/ml. El gel se preparó a una concentración de acrilamida

del 5%. La tinción de los geles se llevó a cabo por la técnica de Blakesley (30) que utiliza azul de coomasie G-250 y  $H_2SO_4$  y se destiñe con agua destilada.

#### ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Se siguió la técnica de O'Farrell (31) con la salvedad de que el primer gel que se corrió fue en electroforesis en tubo a pH 8.1 y no por punto isoelectrico y luego este se colocó en la parte superior de un gel en placa con SDS y se vuelve a correr otra electroforesis.

#### PRUEBAS DE ACTIVIDAD GELATINOLITICA

##### a) Procedimiento de gelatinización.

La gelatinización de las diferentes muestras de colágena se llevó a cabo calentándolas a 60°C durante 15 min., lo cual asegura una desnaturalización completa de la colágena.

##### b) Tiempos de incubación.

Para establecer si existía actividad gelatinolítica y determinar el tiempo óptimo de incubación se incubó la gelatina de las diferentes extracciones a 37°C pH 7.3 a diferentes tiempos que fueron de 15 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, y 72 h.

##### c) Prueba de actividad a diferente pH

Se realizó preparando el amortiguador de incubación antes descrito para la actividad colagenolítica de Tris HCl 0.1 M,  $CaCl_2$  10 mM y NaCl 0.4 M a pH 5.5 y a pH 7. Para el pH 8.5 el amortiguador se preparó con Tris 0.2 M, glicina 0.4 M, NaCl 0.4 M y  $CaCl_2$  10 mM. Se incubaron durante 24 h a 37°C.

d) Efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad gelatinolítica.

Esta incubación se llevó a cabo con diferentes inhibidores de proteasas agregándolos a la mezcla de incubación antes de gelatinizarla.

Los inhibidores utilizados fueron PMSF 2 mM, N-EM 10 mM, pCMB 1 mM Cis 4 mM y EDTA 40 mM. Estos inhibidores se dividen en tres grupos, aquellos que son quelantes como el EDTA y la Cis la cual además reduce enlaces disulfuro, los que bloquean grupos sulfhidrilo como la N-EM y el pCMB y los que -inhiben proteasas con un residuo serina en su sitio activo como el PMSF.

Se incubó también a 37°C durante 24 h.

## RESULTADOS

### 1.- OBTENCION TOTAL DE COLAGENA

A partir de 12 pieles de cobayo, a las cuales se les extrajo la colágena en solución salina y en solución ácida secuencialmente, el rendimiento de colágena total obtenido para cada una de las extracciones es de 0.1342 g - en NaCl 0.15 M, 0.5381 g en NaCl 0.45 M, 3.7963 g en ác.acético 0.5 M y 4.21 g en ác.acético 0.5 M + pepsina.

### 2.- MOVILIDAD EN ELECTROFORESIS

El patrón de bandas que se obtiene muestra dos componentes con distintas movilidades que corresponden a las cadenas  $\alpha$  , además hay otras bandas con menor movilidad que corresponden a dímeros que son asociaciones de cadenas  $\alpha$  , denominadas  $\beta$  y también se presenta un componente que por lo general entra muy poco al gel que se denomina  $\delta$  .

El patrón electroforético que se observa en la figura 1 corresponde al patrón normal de las colágenas .

Todas las preparaciones mostraron una pureza aceptable ya que no se presentaron bandas por debajo de las cadenas  $\alpha$  .

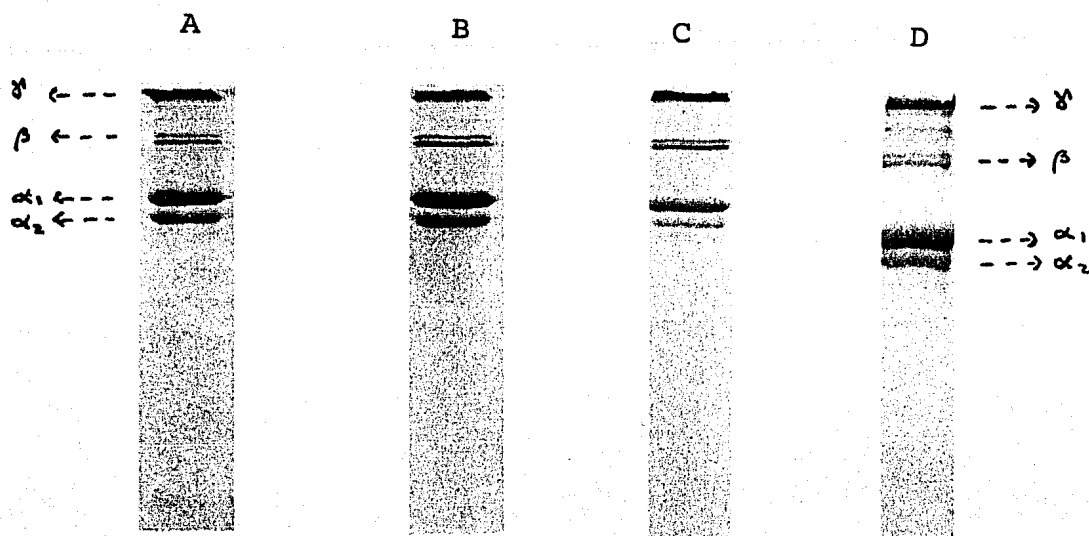


Fig. 1 Patrón electroforético de la colágena de las diferentes extracciones, mostrando la distribución de las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ .

A - extracción en NaCl 0.15 M  
 B - extracción en NaCl 0.45 M  
 C - extracción en ác.acético 0.5 M  
 D - extracción en ác.acético 0.5 M + pepsina

### 3.- ACTIVIDAD COLAGENOLITICA

La actividad colagenolítica se presentó en las colágenas extraídas en NaCl 0.15 M y 0.45 M y en la de ác.acético 0.5 M incubadas a 35°C. A temperatura ambiente solo se presentó actividad en la extracción de NaCl 0.45 M siendo esta actividad inhibida en todos los casos por EDTA 40 mM.

En la extracción con ác.acético 0.5 M + pepsina no se presentó actividad colagenolítica (fig.2).

La actividad presente en las extracciones se ejemplifica en la figura 3 con la extracción en ác.acético 0.5 M tanto a 35°C como a temperatura ambiente. En las extracciones de NaCl se observa básicamente lo mismo aunque no se muestran las fotografías.

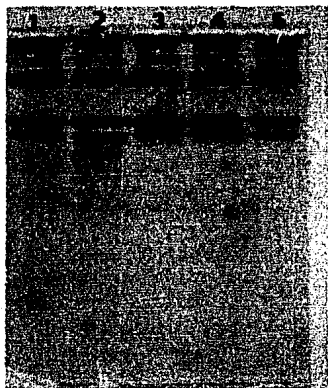


Fig. 2 Electroforesis SDS en gel de poliacrilamida de la colágena extraída en ác. acético 0.5 M. 1) sin incubar 2) sin inhibidor a 35°C 3) con EDTA a 35°C 4) sin inh. a temp. amb. 5) con EDTA a temp. amb.



Fig. 3 Electroforesis SDS en gel de poliacrilamida de la colágena extraída en ác. acético 0.5 M + pepsina - incubada 72 h a 35°C 1) con EDTA 2) sin inh.

Los resultados obtenidos por electroforesis de la actividad colagenolítica se resumen en la tabla III donde la actividad se representa (+) y la no actividad como (-).

		35°C		temp. ambiente	
		S/ inh.	EDTA	S/ inh	EDTA
NaCl	0.15	+	-	-	-
	0.45	+	-	+	-
ácido acético	0.5	+	-	-	-
	0.5p	-	-	-	-

Tabla III Resultados de la actividad colagenolítica de las diferentes extracciones incubadas 72 h a 35°C y a temp. amb. Actividad (+) No actividad (-).

Las pruebas realizadas inicialmente con glucosa no fueron satisfactorias ya que no se observó actividad, por lo que todas las incubaciones posteriores se realizaron sin ella.

#### 4.- ACTIVACION DE LA COLAGENASA

En las pruebas realizadas con el APMA 10 mM no se observó un incremento aparente de la actividad por el método electroforético, aunque hay que considerar que este método no es cuantitativo.

#### 5.- ELECTROFORESIS A PH 8.1

En las electroforesis de las distintas colágenas realizadas a pH 8.1 se observa la presencia de una banda semejante a la descrita como colagenasa por Pardo et.al. (17). Esta banda se presenta en las colágenas extraídas en NaCl 0.15 M y 0.45 M y en la extraída con ác.acético 0.5 M, mientras que en la extraída con ác.acético 0.5 M + pepsina no se puede apreciar esta banda. La diferencia entre ellas es que en las extracciones con NaCl esta banda es más gruesa e intensa, en la extracción con ác, acético apenas se distingue.

Estas mismas electroforesis efectuadas en placa mostraron que en lugar de una sola banda se observan dos bandas en las extracciones de NaCl como se puede ver en la figura 4.

#### 6.- ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Esta electroforesis se efectuó con el fin de ver la posición de la banda de la electroforesis a pH 8.1 en la electroforesis SDS y tratar de explicar los diferentes resultados que se obtuvieron en la electroforesis a pH



8.1 dado que en tubo se obtiene una sola banda y en placa se obtienen dos.

Corriendo los geles de tubo de una sola banda en la electroforesis bidimensional, no fue posible identificar nada en relación a la colagenasa, - lo único que se logró identificar es lo que queda en la parte superior del - gel a pH 8.1 que es la colágena, presentando el patrón normal de ésta.



Fig. 4 Electroforesis en gel de poliacrilamida a pH 8.1  
1) extracción en NaCl 0.15M  
2) extracción en NaCl 0.45M  
3) extracción en ác.ac.0.5M  
4) extracción en ác.ac.0.5M + pepsina

↑↑

#### 7.- ACTIVIDAD GELATINOLITICA

Se encontró que esta actividad se hace aparente a partir de las 6 h de incubación incrementándose el número de bandas conforma la incubación lleva más tiempo.

El tiempo óptimo de incubación fue de 24 h, ya que a tiempos mayores

la diferencia en el número e intensidad de las bandas de degradación es mínima.

Esta prueba se realizó con todas las extracciones obteniéndose el mismo resultado, el cual se ejemplifica en la figura 5 con la gelatina de la extracción en NaCl 0.15 M.

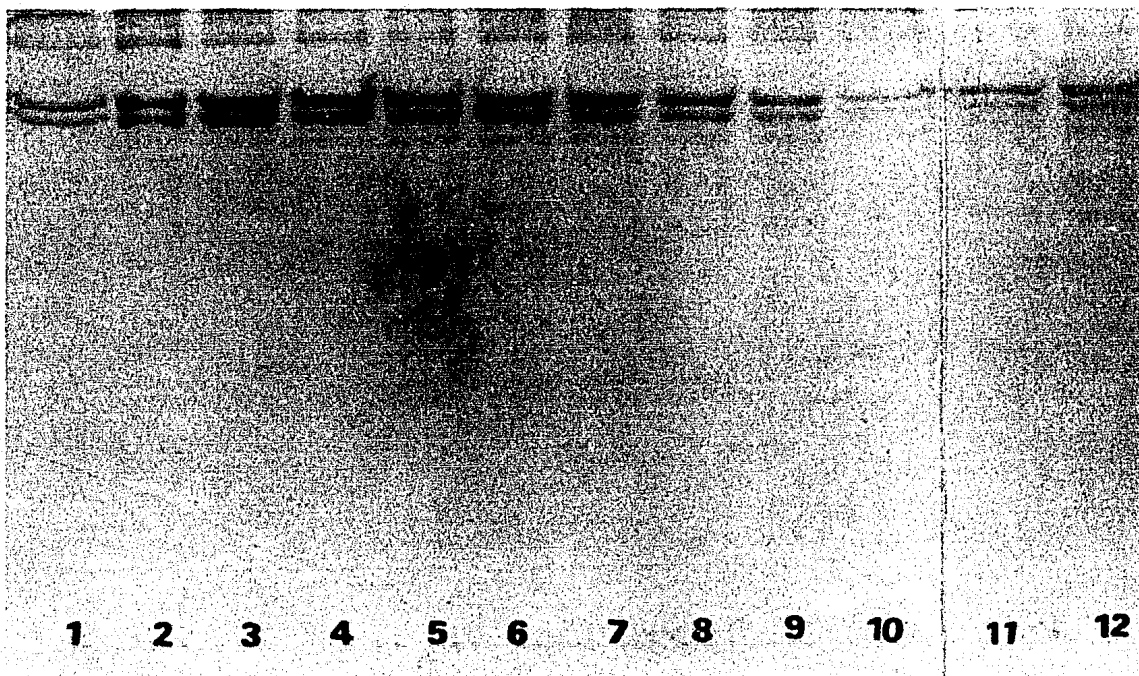


Fig. 5 Electroforesis SDS en gel de poliacrilamida de la gelatina de la extracción con NaCl 0.15 M incubada a diferentes tiempos. 1) gelatina sin incubar 2) 3 h 3 y 4) 6 h 5 y 6) 12 h 7 y 8) 24 h 9 y 10) 48 h 11 y 12) 72 h. A 37°C pH 7.3

Los resultados obtenidos a los diferentes pH así como con los diferentes inhibidores se presentarán más adelante en forma conjunta para todas las extracciones.

Los resultados obtenidos a pH 5.5 nos indican que para la gelatina de la colágena de la extracción en NaCl 0.15 M se presenta una clara actividad gelatinolítica (fig.6) la cual es parcialmente inhibida por EDTA si se to

ma en cuenta en relación a la actividad observada sin inhibidor donde se presentan mayor número de bandas, también se observa que hay una disminución en la intensidad de las bandas correspondientes a los dímeros  $\beta$  con respecto al control, o sea, la gelatina sin incubar, las cuales se recuperan en presencia de pCMB, esto quiere decir que hay inhibición parcial de la actividad en presencia de este inhibidor aún cuando se presenten algunas bandas por debajo de las cadenas  $\alpha$ .

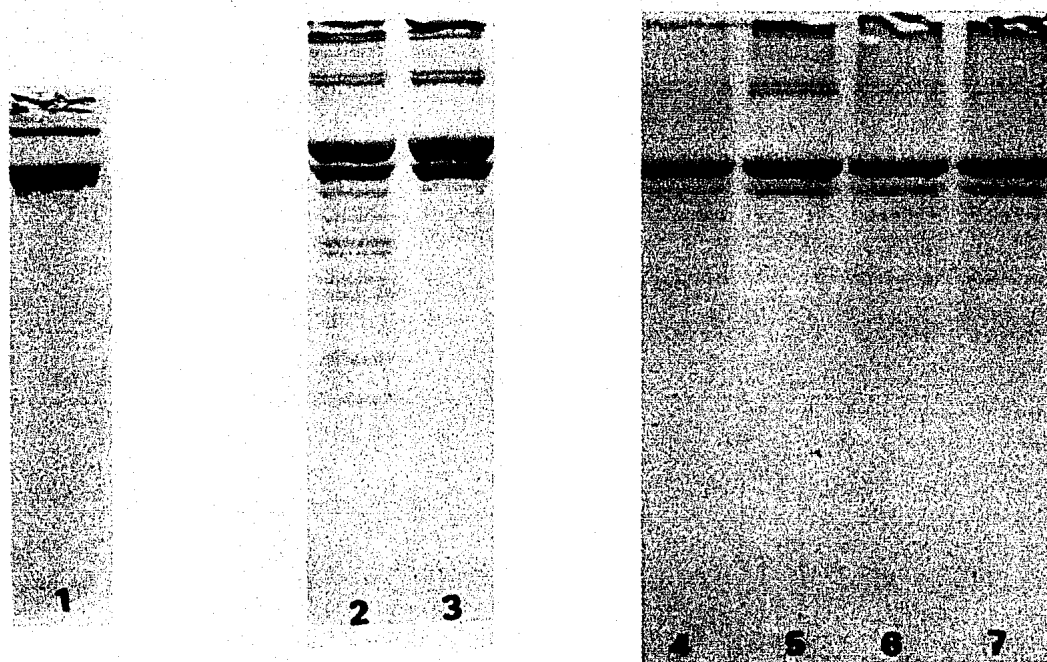


Fig. 6 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS de la gelatina de la extracción en NaCl 0.15 M incubada 24 h a pH 5.5 con diferentes inhibidores. 1) Gelatina sin incubar 2) Gelatina incubada sin inhibidor. Gelatina incubada en presencia de : 3) EDTA 4) Cis 5) pCMB 6) N-EM 7) PMSF

En el caso de la gelatina de la extracción en NaCl 0.45 M se puede observar en la figura 7 que existe inhibición total de la actividad al incubarse en presencia de pCMB. Con cisteína se observa una disminución de la intensidad de las bandas que corresponden a la gelatina no degradada, sugiriendo -

que se ha degradado la gelatina aún cuando no se observen bandas por debajo de las cadenas  $\alpha$ , debido a que la concentración aplicada de las muestras en la electroforesis es la misma en todas.

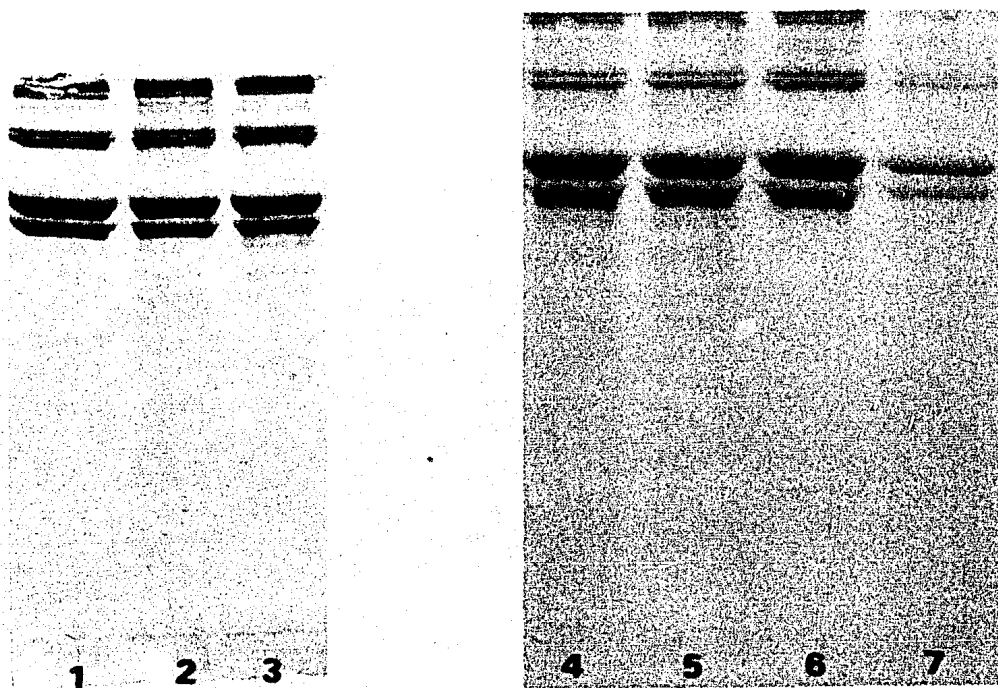


Fig. 7 Electroforesis SDS en gel de poliacrilamida de la gelatina de la extracción en NaCl 0.45 M incubada 24 h a pH 5.5 con diferentes inhibidores. 1) Gelatina sin incubar 2) Gelatina incubada sin inhibidor 3) Gelatina incubada en presencia de : 3) EDTA 4) PMSF 5) N-EM 6) pCMB 7) Cis

La gelatina de la extracción en  $\text{ác. acético}$  0.5 M como se muestra en la figura 8, también presentó inhibición de la actividad gelatinolítica por pCMB y con la cisteína se presenta el mismo fenómeno observado anteriormente en la gelatina de la extracción en NaCl 0.45 M.

La gelatina de la extracción en  $\text{ác. acético}$  0.5 M + pepsina tiene gran actividad gelatinolítica a pH 5.5, la cual es inhibida por EDTA y pCMB. Con la cisteína tal parece que la actividad aumenta ya que las bandas de alto

peso molecular desaparecen, como se puede ver en la figura 9.

Los resultados observados en las electroforesis de las gelatinas de las diferentes extracciones se resumen en la tabla IV en la cual la actividad visible como bandas de degradación se clasificó de dos maneras : intensa, a la cual nos referimos como ++ y menos intensa +. La inhibición parcial se representa como + - y la inhibición total como -.

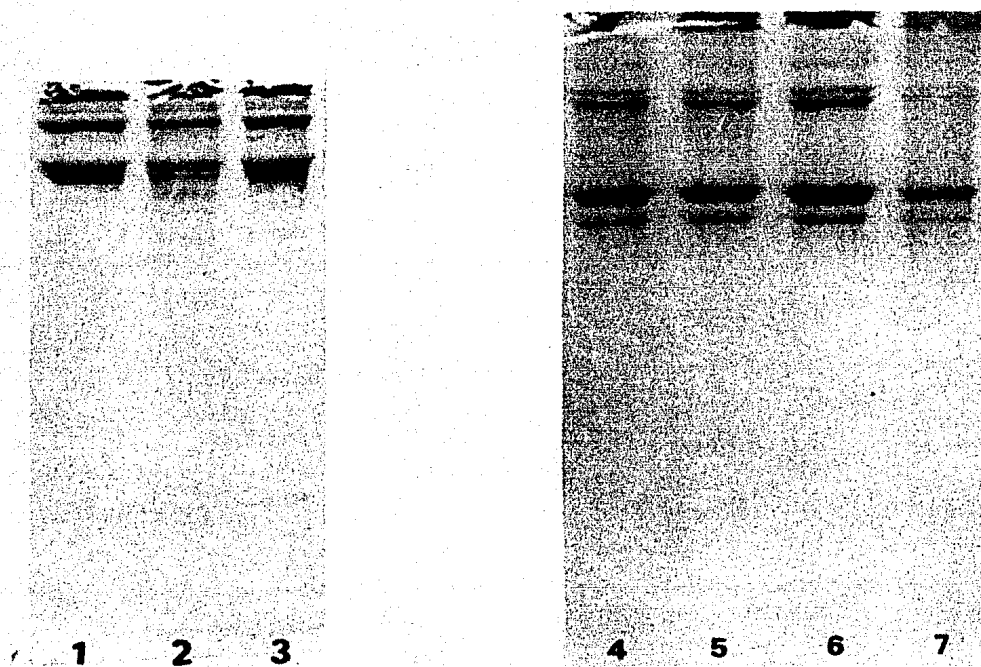


Fig. 8 Electroforesis SDS en gel de poliacrilamida de la gelatina de la extracción en  $\text{ác. acético}$  0.5 M incubada 24 h a pH 5.5 con diferentes inhibidores. 1) Gelatina sin incubar 2) Gelatina incubada sin inhibidor 3) Gelatina incubada en presencia de : 3) EDTA 4) PMSF 5) N-EM 6) pCMB 7) Cis

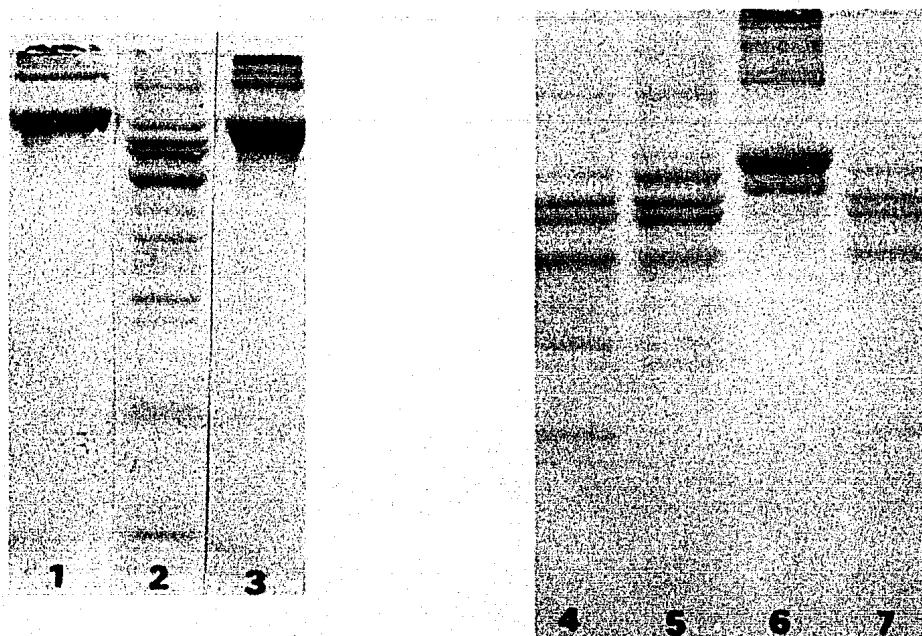


Fig. 9 Electroforesis SDS en gel de poliacrilamida de la gelatina de la extracción en ác. acético 0.5 M + pepsina incubada 24 h a pH 5.5  
 1) Gelatina sin incubar 2) Gelatina incubada sin inhibidor 3) Gelatina incubada en presencia de : 3) EDTA 4) PMSF 5) N-EM 6) pCMB 7) Cis

	S/ inh.	EDTA	PMSF	N-EM	pCMB	Cis
NaCl	0.15	++	+ -	++	+	++
	0.45	+	+	+	-	+
ácido acét.	0.5	+	+	+	-	+
	0.5p	++	+ -	++	+	++

Tabla IV Resumen de los resultados de la incubación a pH 5.5 de las gelatinas de las diferentes extracciones con los distintos inhibidores. Actividad intensa (++) menos intensa (+) inhibición parcial (+ -) inhibición total (-)

En los resultados obtenidos en las gelatinas de las diferentes extracciones incubadas a pH 7 durante 24 h a 37°C con los distintos inhibidores se ve que en la gelatina de la extracción en NaCl 0.15 M (fig.10) en la de la extracción en NaCl 0.45 M (fig.11) y la de ácido acético 0.5 M (fig.12) - presentan actividad gelatinolítica, no inhibible por ninguno de los inhibidores utilizados.

La gelatina de la extracción en ácido acético 0.5 M + pepsina (fig.13) también presenta actividad a este pH inhibible por EDTA y pCMB.

Los resultados observados en las electroforesis de las gelatinas - de las diferentes extracciones incubadas a pH 7 se resumen en la tabla III - donde la actividad se representa como + y la inhibición como - .

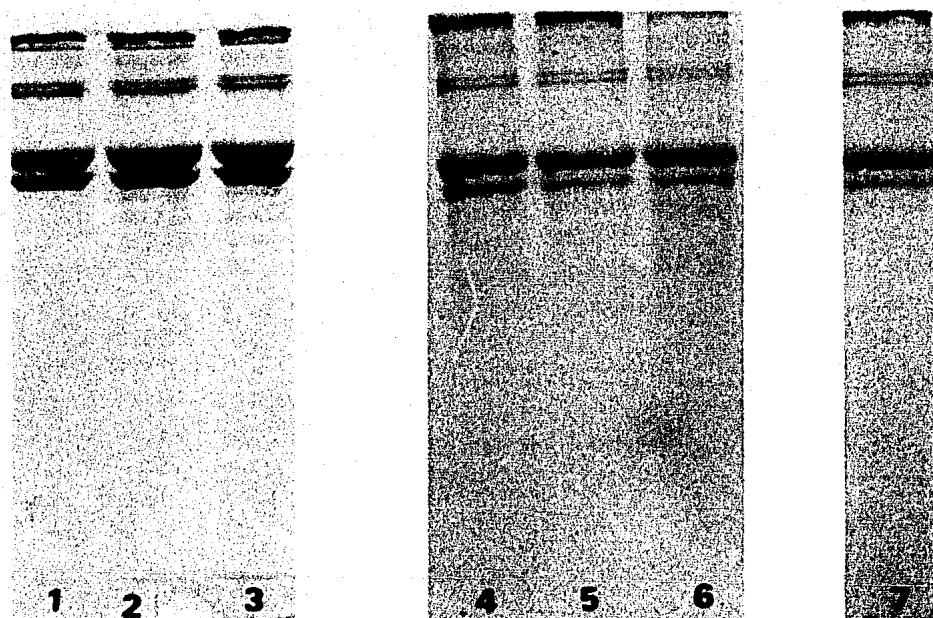


Fig. 10 Electroforesis SDS en gel de poliacrilamida de la gelatina de la extracción en NaCl 0.15 M incubada a pH 7 durante 24 h a 37°C.  
 1) Gelatina sin incubar 2) Gelatina incubada sin inhibidor -  
 Gelatina incubada en presencia de : 3) EDTA 4) N-EM 5) pCMB  
 6) Cis 7) PMSF

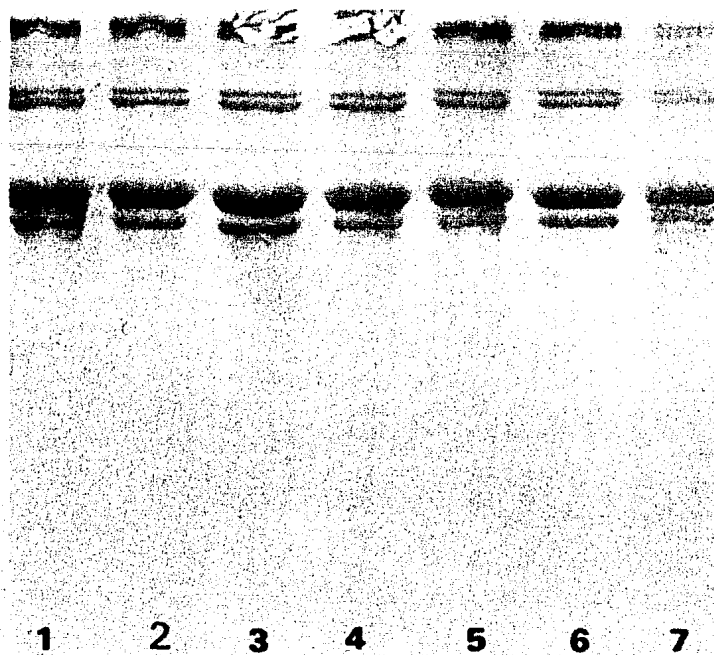


Fig. 11 Electroforesis SDS en gel de poliacrilamida de la gelatina de la extracción en NaCl 0.45 M incubada 24 h a 37°C a pH 7 1) Gelatina sin incubar 2) Gelatina incubada sin inhibidor 3) Gelatina incubada en presencia de : 3) EDTA 4) PMSF 5) N-EM 6) pCMB 7) Cis

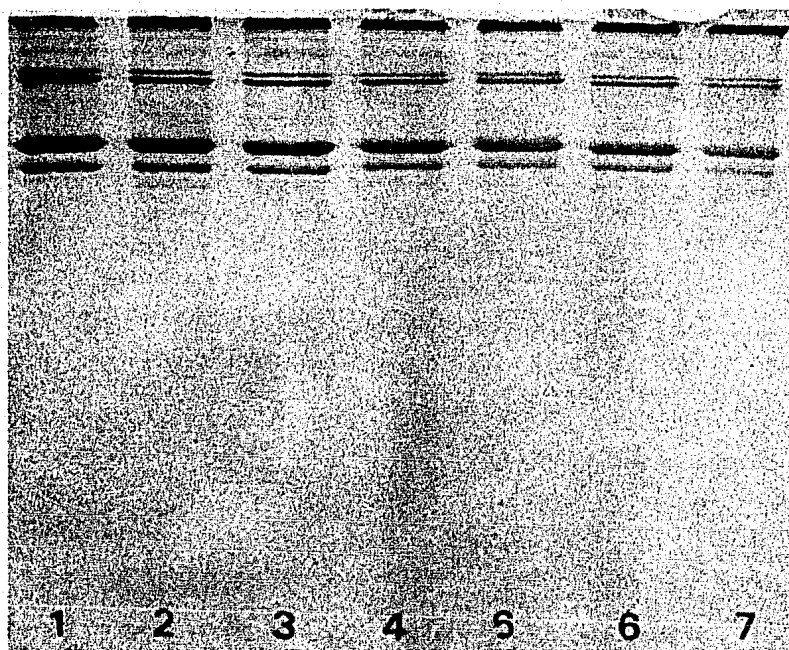


Fig. 12 Electroforesis SDS en gel de poliacrilamida de la gelatina de la extracción en ác.acético 0.5 M incubada 24 h a 37°C a pH 7 1) Gelatina sin incubar 2) Gelatina incubada sin inhibidor 3) Gelatina incubada en presencia de : 3) EDTA 4) PMSF 5) N-EM 6) pCMB 7) Cis



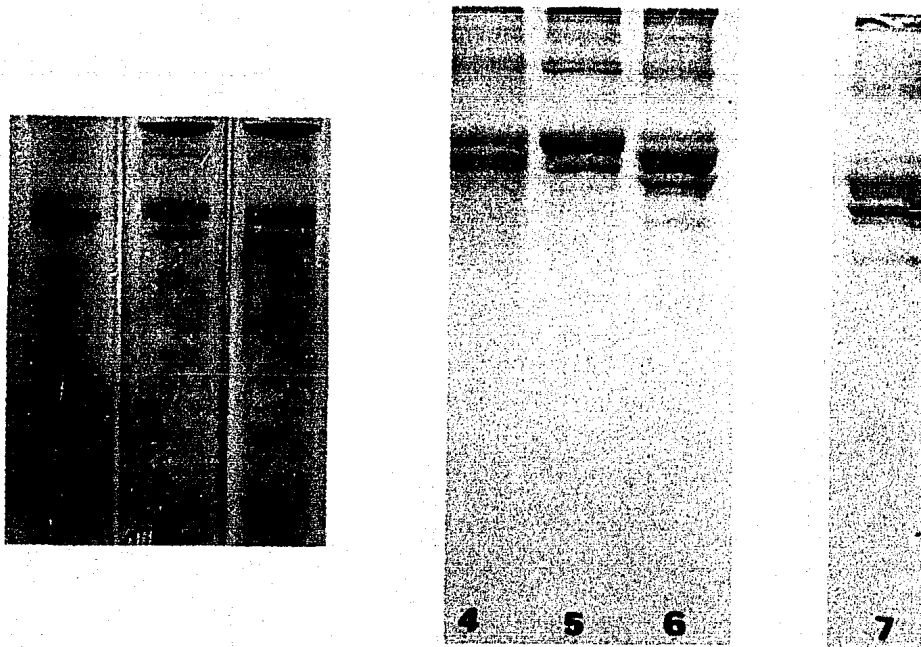


Fig. 13 Electroforesis SDS en gel de poliacrilamida de la gelatina de la extracción en ác.acético 0.5 M + pepsina incubada 24 h a 37 °C a pH 7 1) Gelatina incubada sin inhibidor 2) Gelatina incubada con EDTA 3) Gelatina sin incubar Gelatina incubada en presencia de : 4) Cis 5) pCMB 6) N-EM 7) PMSF

	S/ inh.	EDTA	PMSF	N-EM	pCMB	Cis
NaCl	0.15	+	+	+	+	+
	0.45	+	+	+	+	+
ác. acét.	0.5	+	+	+	+	+
	0.5p	+	-	+	-	+

Tabla V Resumen de los resultados de la incubación a pH 7 de las gelatinas de todas las extracciones con los diferentes inhibidores. Actividad (+) no actividad (-)

En los resultados obtenidos en la incubación de las gelatinas de las diferentes extracciones a pH 8.5 durante 24 h a 37°C con los distintos inhibidores, se observa la existencia de actividad gelatinolítica en todas las extracciones a este pH no inhibible, en ningún caso, por los inhibidores utilizados (figuras 14, 15, 16, 17).

En la tabla VI se resumen los resultados de la incubación de las gelatinas de las diferentes extracciones a pH 8.5 donde la actividad se representa como + .

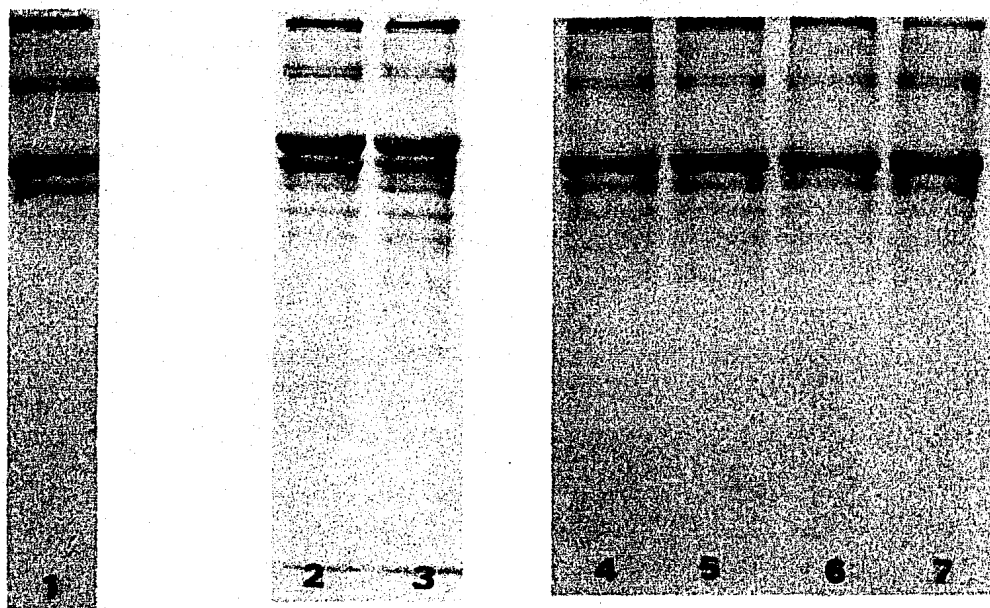


Fig. 14 Electroforesis SDS en gel de poliacrilamida de la gelatina de la extracción en NaCl 0.15 M incubada a pH 8.5 durante 24 h a 37°C  
1) Gelatina sin incubar 2) Gelatina incubada sin inhibidor -  
Gelatina incubada en presencia de : 3) EDTA 4) PMSF 5) N-EM  
6) pCMB 7) Cis

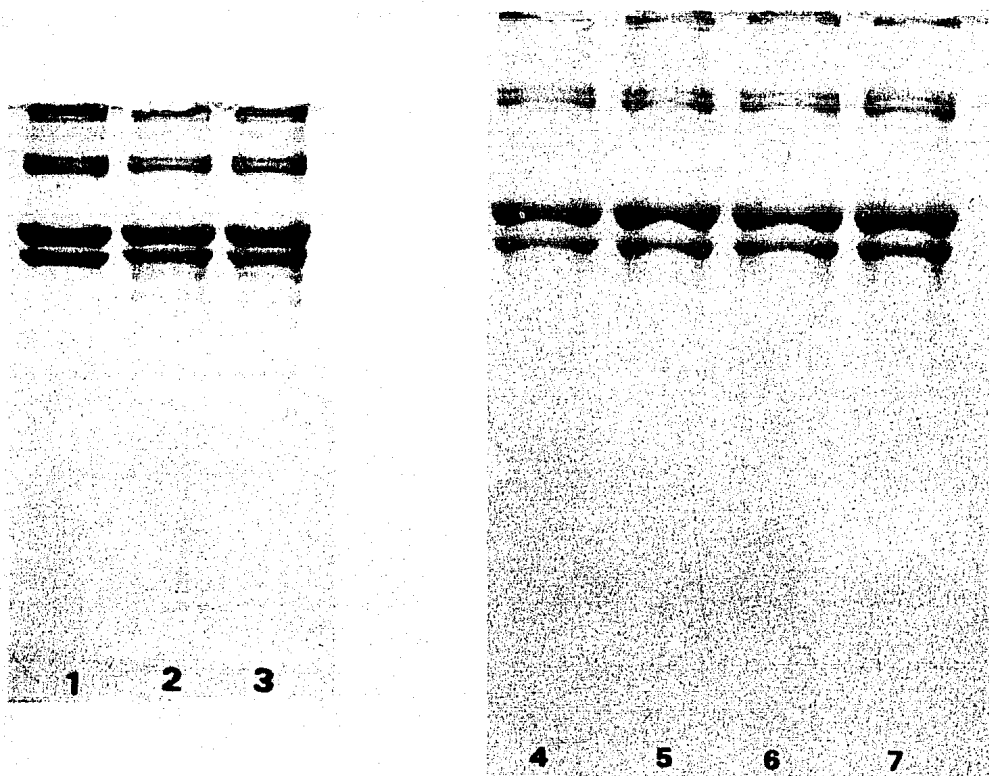


Fig. 15 Electroforesis SDS en gel de poliacrilamida de la gelatina de la extracción en NaCl 0.45 M incubada a pH 8.5 durante 24 h a 37°C  
 1) Gelatina sin incubar 2) Gelatina incubada sin inhibidor - Gelatina incubada en presencia de : 3) EDTA 4) PMSF 5) N-EM 6) pCMB 7) Cis

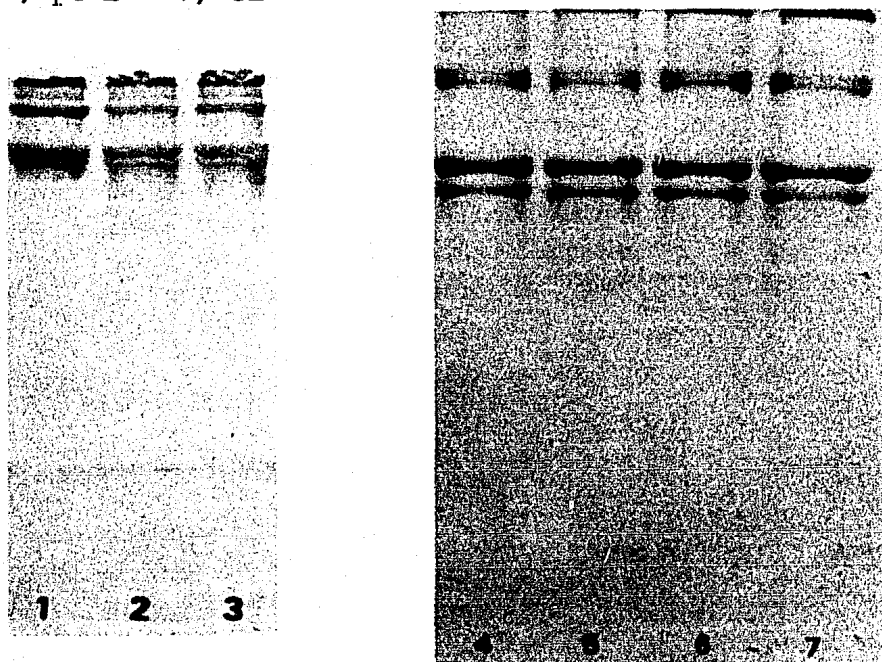


Fig. 16 Electroforesis SDS en gel de poliacrilamida de la gelatina de la extracción en ác.acético 0.5 M incubada a pH 8.5 durante 24 h a 37°C  
 1) Gelatina sin incubar 2) Gelatina incubada sin inhibidor Gelatina incubada en presencia de : 3) EDTA 4) PMSF -- 5) N-EM 6) pCMB 7) Cis

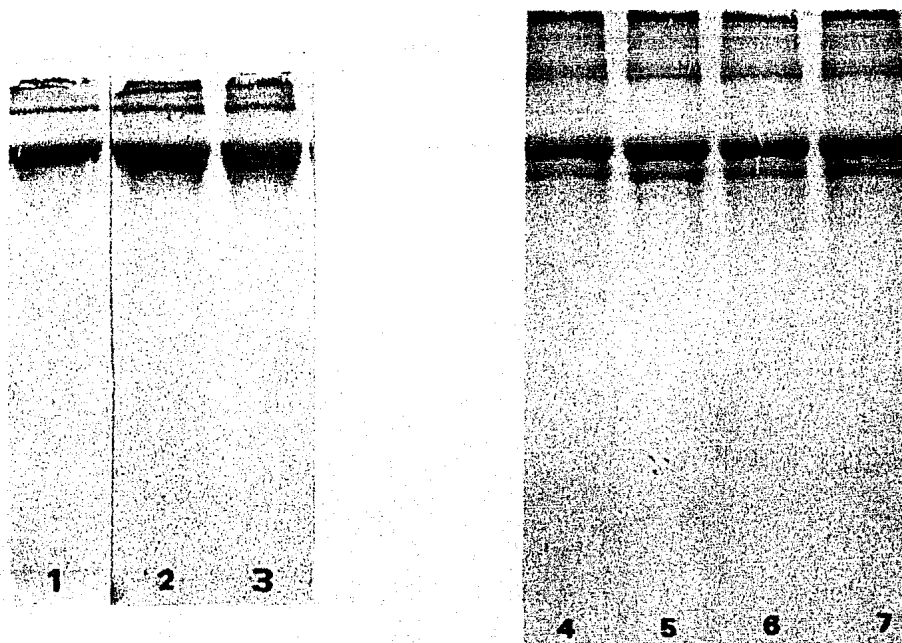


Fig. 17 Electroforesis SDS en gel de poliacrilamida de la gelatina de la extracción en ác.acético 0.5 M + pepsina incubada a pH 8.5 durante 24 h a 37°C 1) Gelatina sin incubar 2) Gelatina incubada sin inhibidor 3) Gelatina incubada en presencia de : 3) EDTA --- 4) PMSF 5) N-EM 6) pCMB 7) Cis

	S/inh.	EDTA	PMSF	N-EM	pCMB	Cis
NaCl	0.15	+	+	+	+	+
	0.45	+	+	+	+	+
ácido acético	0.5	+	+	+	+	+
	0.5p	+	+	+	+	+

Tabla VI Resumen de los resultados de la incubación a pH 8.5 de las gelatinas de todas las extracciones con los diferentes inhibidores. Actividad (+)

## DISCUSION

El rendimiento obtenido en la extracción secuencial y purificación de las colágenas, nos indica que la colágena que se extrae en solución salina, que es la que no está unida a fibras por enlaces covalentes intermoleculares, o sea, la colágena recientemente sintetizada, es muy poca en relación a la extraída en ácido acético, observándose que la mayor cantidad obtenida es cuando se extrae con pepsina ya que ésta es capaz de degradar los enlaces covalentes que se encuentran en los extremos de la molécula de colágena, lográndose así una mayor solubilización (19).

Por medio de la electroforesis con SDS se pudo saber que la colágena extraída estaba purificada puesto que no se observan bandas por debajo de las  $\alpha$ , gracias a esto se pudieron efectuar los experimentos con la seguridad de que los datos obtenidos en la actividad colagenolítica se deben al efecto de una colagenasa que se mantuvo unida a la colágena a través del proceso de purificación, además mediante la electroforesis a pH 8.1 se pudo demostrar la presencia de la colagenasa en todas las extracciones excepto en la de ácido acético + pepsina, observándose que la banda correspondiente a la colagenasa se encontraba en las extracciones que presentaban actividad colagenolítica.

La colagenasa se encuentra pegada tanto a la colágena recientemente sintetizada que se extrae en solución salina, como en la colágena extraída en ácido acético. Era de esperarse que en la colágena extraída con NaCl 0.15 M se presentara mayor actividad colagenolítica, ya que se reporta que probablemente en la colágena recientemente sintetizada se encuentre mayor cantidad de enzima por el recambio metabólico que se efectúa en ella, sin embargo solo la colágena extraída en NaCl 0.45 M presenta actividad colagenolítica tanto a 35°C como a temperatura ambiente, por lo que debido a esto tal -

vez sea esta fracción donde hay mayor concentración de enzima además de que a altas concentraciones salinas se extrae más fácilmente la enzima. En la colágena extraída con pepsina no se logró observar actividad. Pardo et.al. (27) reportan que con pepsina han logrado purificar de colagenasa a la colágena, encontrando que la colagenasa es susceptible a la pepsina (32), tal vez a esto se debe la ausencia tanto de la banda en la electroforesis a pH 8.1 como a su correspondiente actividad.

La aparición de una doble banda en la electroforesis en placa a pH 8.1 en las extracciones de NaCl se puede deber a un contaminante del sistema empleado, ya que Soto (32) habiendo utilizado el mismo sistema reporta que en geles corridos sin proteína aparecía una banda que migraba muy cerca al frente del amortiguador, por delante de la banda correspondiente a la colagenasa, sin haber podido identificar de donde provenía este contaminante.

Con el activador de colagenasa, el APMA, aparentemente no se observa mayor degradación con el método electroforético, lo cual sugeriría que esta colagenasa no es activable, no existiendo como colagenasa latente por la presencia de un inhibidor.

En las incubaciones que se realizaron con glucosa, para evitar la formación de fibras, se observó menor actividad, por lo que todas las pruebas se realizaron sin ella, debido también a que se ha reportado que la glucosa inhibe colagenasa (33).

Mediante la incubación de la gelatina a diferentes tiempos se pudo demostrar la presencia de una actividad proteolítica que se encuentra unida a la colágena "purificada" por métodos estándar. Esta proteasa o proteasas se encuentran presentes en todas las extracciones, donde la magnitud de su actividad guarda una relación con el tiempo de incubación. Los productos de degradación son diferentes en cada extracción, como se puede observar el las ---

electroforesis de cada una de ellas.

Con las incubaciones a diferente pH y con los distintos inhibidores se trató de caracterizar parcialmente las propiedades de esta gelatinasa (s), encontrándose que existe una proteasa cuya actividad depende de grupos sulfhidrilo, ya que es inhibible por pCMB a pH ácido, el cual parece ser el pH óptimo al cual actúa esta enzima por lo que tal vez sea una proteasa ácida del tipo de la catepsina B (35).

El N-EM también inhibe a proteasas dependientes de grupos sulfhidrilo como el pCMB, sin embargo no se observa inhibición con este compuesto. En estos experimentos solo se utilizó una concentración de los inhibidores, tal vez si se aumentara la concentración de N-EM se observaría inhibición de la actividad gelatinolítica, aunque en el caso de que se trate de una catepsina, como se propone, no se ha reportado que estas enzimas sean inhibidas por N-EM (35,36).

Hartley (34) ha propuesto la clasificación de enzimas proteolíticas como proteasas dependientes de serina, dependientes de un grupo tiol, ácidas y metálicas. El grupo dependiente de serina incluye enzimas como quimotripsina tripsina, elastasa y plasmina cuyo sitio activo contiene un residuo serina que reacciona con compuestos organofosfóricos y no son susceptibles a la inhibición por EDTA. Las proteasas dependientes de un grupo tiol como la papaína y la catepsina B, pueden ser estabilizadas y activadas por agentes reductores y metaloquelantes y son particularmente sensibles tanto a la oxidación como a los metales pesados. Las proteasas ácidas incluyen entre otras a la pepsina que tiene su actividad óptima a pH menor de 6.

Hay varios reportes (35, 36, 37, 38, 39) acerca de la degradación tanto de gelatina como de colágena, bajo condiciones de pH ácido, por preparaciones enzimáticas crudas lisosomales de hígado de rata. Se ha propuesto -

que la responsable de la degradación de la colágena bajo estas condiciones es la catepsina D (36,37) y de la gelatina la catepsina B (35, 36). Sin embargo Scott reporta que la catepsina D tiene acción limitada sobre gelatina (38). Estas enzimas poseen un grupo tiol esencial para su actividad, por lo que son inhibidas por compuestos mercurícos como el pCMB (38,40) y por agentes alquilantes (35) y es activada por EDTA y cisteína (40). El pH al cual actúan varía de 3 a 6 (35, 36, 40) dependiendo del sustrato (36).

Las catepsinas son enzimas que se encuentran en los lisosomas por lo que es poco probable que se encuentre unida a la colágena extracelularmente, sin embargo durante el proceso de extracción y purificación es posible que haya rompimiento de células y la catepsina así libre se pueda pegar a la colágena de tal manera que permanezca unida a ella a través de la purificación.

En la degradación de la región helicoidal de la colágena bajo condiciones fisiológicas el mecanismo importante es la acción de colagenasa específicas en la matriz extracelular, después de eso la degradación se lleva a cabo en las células mediante la catepsina B. Ambas enzimas tienen propiedades diferentes; la colagenasa es más activa a pH 7 - 8, requiere de  $Ca^{++}$ , mientras que la catepsina B es más activa a pH 3 - 5 y es inestable a pH mayor de 7 (40).

Los resultados obtenidos a pH 8.5 muestran que también hay actividad gelatinolítica no inhibible por los inhibidores utilizados. En caso de que se tratase de la misma enzima que actúa a pH 5.5 o de la que presentó actividad a pH 7 y que actuó también a pH 8.5 se esperaría que al menos los productos de degradación fueran iguales en todos los casos, pero el resultado no es así, ya que son productos diferentes los obtenidos a los diferentes pH así como los de cada extracción, por lo que pueden existir dos hipótesis para explicarlo. Una es que se deba al efecto del pH sobre la enzima o que



se trate de una enzima diferente a las catepsinas y que actúa a pH alcalino. Parece ser más bien una enzima que actúa a pH alcalino pero no puede ser caracterizada debido a que no presentó inhibición con los inhibidores utilizados, no pudiendo averiguar de que tipo de enzima se trata.

A pH 7 los resultados indican que también hay actividad gelatinolítica en todas las extracciones. Esta actividad es mucho menor que a pH 5.5 y 8.5 y no es inhibible por los inhibidores utilizados excepto en el caso de la extracción en ácido acético + pepsina cuya actividad es inhibible a este pH por EDTA y pCMB. Esta actividad se asemeja a la de una proteasa neutra aislada por Harris (40) de cultivos primarios de nódulos reumatóides subcutáneos la cual es inhibida por quelantes y suero, al igual que una gelatinasa aislada de piel humana por Seltzer (41), la cual es inhibida por EDTA y EGTA y su pH óptimo está entre 7 y 7.5, dicha gelatinasa se asemeja a la de sinovio reumatoide y a la de leucocitos humanos en términos de tamaño aparente, especificidad por el sustrato y susceptibilidad a inhibidores.

Sellers et.al. (43) también aislaron una proteasa neutra cuya actividad fue separada cromatográficamente de la collagenasa, dicha proteasa es inhibida por 1-10 Fenantrolina y EDTA.

Las proteasas neutras anteriormente mencionadas son inactivas a pH menor de 5 (41, 42).

Las proteasas gelatinolíticas han sido extraídas de varias fuentes como la fracción granular de leucocitos (12, 42, 44) piel humana homogenada libre de suero (41) de hueso (45) y de cultivo de cápsula sinovial reumatoide (40).

Debido a esto y sobre todo a los resultados obtenidos, creemos que no es solo la collagenasa y la catepsina B las enzimas que se extraen unidas a la colágena, sino que existen una serie de proteasas, las cuales no pudie-

ron ser caracterizadas, pero por electroforesis se ve que tienen actividad gelatinolítica y que se extraen unidas a colágena, cuya actividad se obtiene tanto a pH 7 como a pH 8.5 y no son inhibibles por los inhibidores utilizados.

Como ya se mencionó anteriormente las enzimas que poseen un grupo tiol son inhibidas por pCMB y son activadas por EDTA, los resultados aquí obtenidos muestran que la actividad inhibible por pCMB no parece ser activable por EDTA, sin embargo es interesante hacer notar dos cosas, una es que cuando el EDTA se agrega después de la gelatinización activa la degradación, no así, si este se agrega antes de gelatinizar, obteniéndose una inhibición parcial de la actividad; y la otra es que con la cisteína se observa una mayor degradación en las gelatinas de las extracciones incubadas a pH 5.5 y en las de NaCl incubadas a pH 7.

Como vemos, aún cuando mediante los procesos de purificación y por electroforesis creemos tener un sustrato puro, vemos que no es así, ya que por incubaciones a diferentes pH se pudo demostrar la presencia de enzimas unidas a ese sustrato. Confirmandose así la hipótesis planteada sobre la existencia de proteasas gelatinolíticas que se extraen unidas a la colágena en extracciones tanto salinas como ácidas y se encuentran presentes en todas ellas.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Trelstad, R.L. 1981. Mundo Científico. 1 (3). 289-293.
- 2.- Gay, S., Miller, E.J. 1978. Collagen in the Physiology and Pathology of Connective Tissue. Gustav Verlag. Stuttgart.
- 3.- Ramachandran, A.H., Ramakrishnan, C. 1976. in Biochemistry of Collagen. (Ramachandran, A.H. Reddi eds.);45-84.
- 4.- Gadek, J.E. et.al. 1980. Biochem. Bioph. Res. Comm. 95:4 1815-1822.
- 5.- Vaes, G. 1980. Cellular Secretion and Tissue Breakdown. Agents and Action. 10:6 Birkhäuser Verlag. Basel.
- 6.- Gross, J. 1976. in Biochemistry of Collagen. (Ramachandran, A.H. Reddi - eds) 275-315.
- 7.- Eisen, A. et.al. 1973. Biochemistry. 12:9 1814-1822.
- 8.- Gross, J. et.al. 1980. in Collagenase in Normal and Pathological Connective Tissues. (Woolley, D.E. Evanson, J.M. eds.) : 11-35 John Wiley & Sons Ltd.
- 9.- Harris, E.D., Krane, S.M. 1974. Medical Progress. 291:12 Sep.
- 10.- Murphy, G. et.al. 1980. Biochem. J. 192. 517-525.
- 11.- Welgus, H.G. et.al. 1979 J. Biol. Chem. 254-293.
- 12.- Harper, E. et.al. 1971. Biochemistry. 10. 3035-3041.
- 13.- Eisen, A. et.al. 1971. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68:248.
- 14.- Murphy, G. Sellers, A. 1980. in Collagenase in Normal and Pathological - Connective Tissues. (Woolley, D. Evanson, J.M.eds.) : 66-81
- 15.- Montfort, I., Pérez T. R. 1975. J. Histochem. Cytochem. 23:910.
- 16.- Woolley, D. et.al. 1980. in Collagenase in Normal and Pathological Connective Tissues. (Woolley, D. Evanson, J.M.eds.) : 105-125.
- 17.- Pardo, A., Pérez T.R. 1975. Biochem. Bioph. Acta. 392. 121-130.
- 18.- Mc Croskery, P. et.al. 1973. Science. 180. 70-71.
- 19.- Miller, E. Rhodes, K. 1982. in Methods in Enzymology. (Sidney Colowick & - Nathan o. Kaplan eds.) vol.82. 33-64.

- 20.- Gross, J. 1958. *J. Exp. Med.* 107:247.
- 21.- Laemmli, U.K. 1970. *Nature. London.* 227. 680-685.
- 22.- Tanaka, Sh. et.al. 1981. *Collagen Rel. Res.* 1. 237-246.
- 23.- Maizel, J.V. 1969. in *Fundamental Techniques in Virology.* (Habel, K. Saltman, N.P. eds) Academic Press. N.Y. 334-362.
- 24.- Woessner, J.F. 1961. *Arch. of Biochem. and Bioph.* 93. 440-447.
- 25.- Terato, K., Nagai, Y. 1976. *Biochem. Bioph. Acta.* 445. 753-762.
- 26.- Harris, E., Vater, C. 1980. in *Collagenases in Normal and Pathological Connective Tissues.* (Woolley, E. Evanson, J. eds.) : 37
- 63
- 27.- Pardo, A. et.al. 1980. *Conn. Tis. Res.* 7. 253-261.
- 28.- Davis, B.J. 1964. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121-404.
- 29.- Ornstein, L. 1964. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121-321.
- 30.- Blakesley, R. Boezi, J. 1977. *Analytical Biochemistry.* 82. 580-582.
- 31.- O'Farrell, P.H. 1975. *J. Biol. Chem.* 250. 4007-4021.
- 32.- Soto, H. 1977. *Tesis Profesional. Facultad de Química. UNAM.*
- 33.- Ishikawa, T., Nirmi, M.E. 1979. *Anal. Biochem.* 136-143.
- 34.- Hartley, B.S. 1960. *Anal Rev. Biochem.* 9:45.
- 35.- Etherington, D.J., Evans, P.J. 1977. *Acta Biol. Med. Germ. Band 36 Seite* 1555-1563.
- 36.- Burleigh, M. et.al. 1974. *Biochem. J.* 1937. 387-398.
- 37.- Scott, P., Pearson, H. 1978. *Febs. Letters* 88:1 41-45.
- 38.- Scott, P., Pearson, H. 1981. *Eur. J. Biochem.* 114. 59-62.
- 39.- Ohlsson, K., Olsson, I. 1973. *Eur. J. Biochem.* 36. 473-481.
- 40.- Harris, E.D., Krane, S.M. 1972. *Biochem. Bioph. Acta.* 258. 566-576.
- 41.- Seltzer, L. et.al. 1981. *J of Biological Chem.* 2:9 4662-4668.
- 42.- Sopata, I., Danciewicz, A. 1974. *Biochem. Bioph. Acta.* 370. 510-523.
- 43.- Sellers, A. et.al. 1978. *Biochem. J.* 171. 493-496.
- 44.- Kobayashi, S., Nagai, Y. 1978. *J. Biochem.* 84. 559-567.

45.- Malemud, C. et.al. 1981. Biochem. Bioph. Acta. 657. 517-529.