

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

BIOSINTESIS Y DEGRADACION  
DE COLAGENA EN EL  
GRANULOMA DE CARRAGENINA

T E S I S

Que para obtener el título de:

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

presenta :

THALIA FIGUERAS MONTPELLIER

México, D. F. 1985



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de  
Bioquímica de la Facultad de Ciencias, bajo  
la dirección de la Dra. Annie Pardo Semc.

---

A Federico  
por la magia de ser tan felices.

a Annie

con un profundo agradecimiento

a mi Madre

a mis amigos

"Somos de la misma tela de que están hechos los sueños, y nuestra insignificante vida de sueños está cercada".

W. Shakespeare. LA TEMPESTAD.

## A G R A D E C I M I E N T O S .

Agradezco a Annie, Alfonso y Ricardo que siempre están dispuestos a escuchar, cooperar y ayudar.

A los Doctores Annie Pardo, Alfonso Torre Blanco, Yvonne Rosenstein, Gerardo Vázquez Nin, Jorge Dreyfus, Sergio Sánchez Armass y Carlos Arámburo por sus valiosos consejos durante la revisión del manuscrito.

Al Bioterio de la Facultad de Ciencias y al Laboratorio de Biología Molecular por las facilidades prestadas durante la realización de este trabajo.

# CONTENIDO

## INTRODUCCION

- Algunas generalidades sobre la colágena -2-
- Biosíntesis de colágena -7-
- Degradación de colágena -13-
- El granuloma de carragenina -20-
- Antecedentes -21-
- Planteamiento del problema -24-
- Objetivos -25-

## MATERIAL Y METODOS

- (A) Obtención de granulomas -26-
- (B) Determinación del peso seco -27-
- (C) Determinación del contenido de colágena -27-
- (D) Determinación de biosíntesis de colágena -28-
- (E) Determinación de actividad colagenolítica -32-

## RESULTADOS

- (A) Peso de los granulomas -37-
- (B) Contenido de colágena -37-
- (C) Biosíntesis de colágena -39-
- (D) Actividad colagenolítica -42-

DISCUSION -53-

CONCLUSIONES -67-

REFERENCIAS -68-



## INTRODUCCION

El componente más abundante del tejido conjuntivo es la colágena que representa el 25% del total de proteína que contiene un mamífero adulto. La matriz extracelular formada principalmente por colágena y proteoglicanos confiere a este tejido sus propiedades características de resistencia, sostén y capacidad de transmitir fuerzas mecánicas. El término genérico de colágena engloba a varios "tipos" distintos de moléculas, que son trímeros provenientes de diferentes productos genéticos.

A pesar de que la molécula de colágena posee una estructura sumamente estable, se ha demostrado que presenta un recambio metabólico, y que los organismos normales tienen la información necesaria para regular el contenido y distribución de colágena en sus propias estructuras de sostén.

La pérdida irreversible de los mecanismos responsables de esta fina regulación podría ser la causa de muchas enfermedades (1): Existen gran número de condiciones fisiopatológicas en donde ocurren alteraciones en los tejidos como resultado de una aparente falta de coordinación entre la síntesis y degradación de la colágena.

En las respuestas fibroproliferativas, hay una acumulación excesiva de colágena en el tejido afectado. Como

ejemplo tenemos aquellos procesos que en los vasos sanguíneos pueden ocasionar el depósito de placas fibrosas conocidas como lesiones arteroescleróticas. En los órganos parenquimatosos estos procesos pueden conducir a la destrucción de la arquitectura normal y pérdida de la funcionalidad del órgano, como es el caso de la cirrosis hepática (1,2,3). En el otro extremo tendríamos cuadros que involucran la destrucción del tejido, como los procesos inflamatorios agudos en donde el te  
jido conjuntivo proliferante puede adquirir características agresivas, debido a la alta producción de enzimas proteolíticas; el ejemplo típico es la artritis reumatoide.

¿ Cuáles son los factores que en estos tejidos inducen a la pérdida de los mecanismos de regulación y coordi  
nación entre la síntesis y degradación de colágena y demás componentes del tejido conjuntivo ?

Esta es una pregunta que aún no se puede responder. La investigación y mejor comprensión de los mecanismos involucrados en el metabolismo de la colágena, ayudarán a encontrar alternativas terapéuticas para ciertas condiciones patológicas que en este momento son muy severas e irreversibles.

## ALGUNAS GENERALIDADES SOBRE LA COLAGENA.

La diversidad en las propiedades fisiológicas y mecánicas de los distintos tipos de tejido conjuntivo, se puede explicar en parte por la heterogeneidad en las macromoléculas que los constituyen; éstas son principalmente colágenas, proteoglicanos y glicoproteínas. Las distintas combinaciones de estos componentes dan origen a una gran variedad de organizaciones estructurales.

Las colágenas tipo I, II y III denominadas "colágenas intersticiales" comparten varias características; su molécula está constituida por tres cadenas peptídicas llamadas  $\alpha$ , cada una con alrededor de mil aminoácidos. Las tres cadenas  $\alpha$  se disponen una alrededor de otra formando una molécula de estructura triple helicoidal de 300 nm de largo y 1.5 nm de ancho. La estructura primaria de las cadenas  $\alpha$  presenta una glicina en cada tercera posición y un alto contenido de prolina e hidroxiprolina (ver figura 1). La estructura cíclica de la prolina e hidroxiprolina y la pequeñez de la glicina, favorecen la conformación helicoidal de la molécula; en tanto que el grupo hidroxilo de la hidroxiprolina permite el establecimiento de puentes de hidrógeno entre las cadenas  $\alpha$  que forman la triple hélice. Estos atributos hacen que la colágena sea una molécula rígida y estable. Otro aminoácido abundante en la colágena es la lisina, ésta puede hidroxilarse en su quinto átomo de carbono. El hidroxilo de

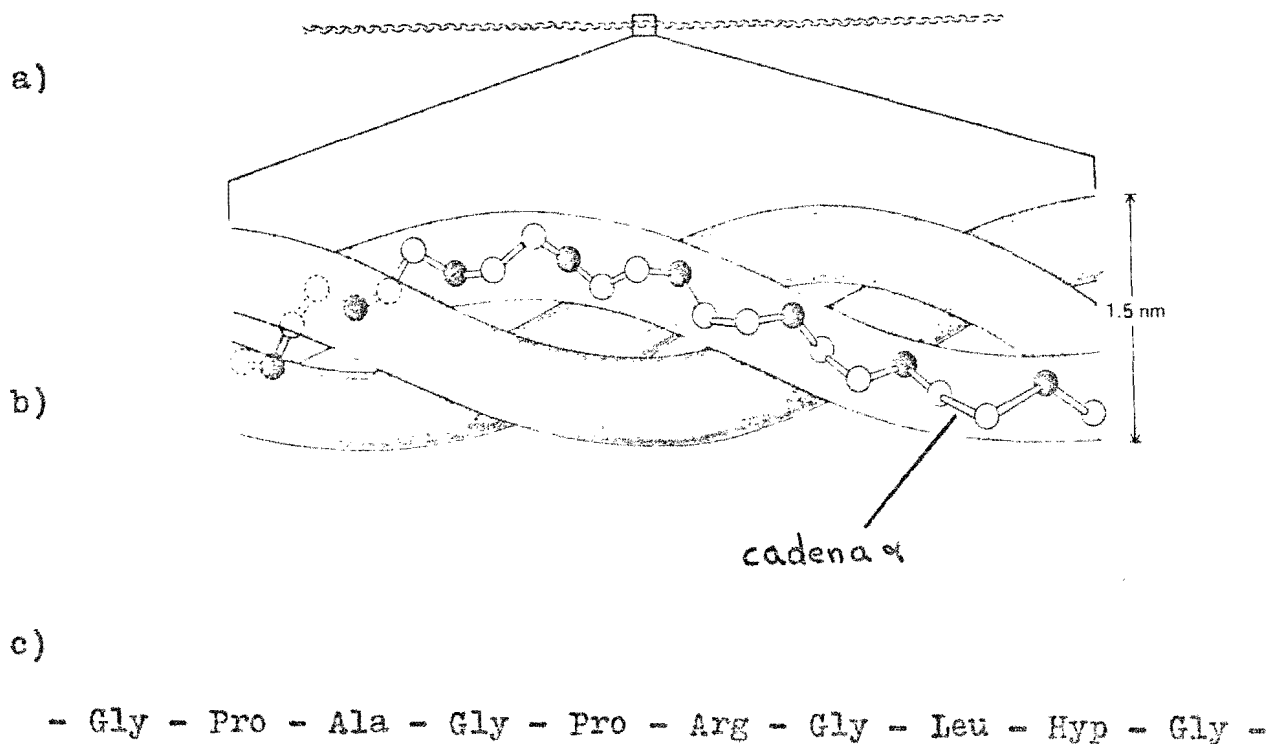


FIGURA 1

- a) Representación esquemática de una molécula de colágena.
- b) Las tres cadenas  $\alpha$  se encuentran una alrededor de otra formando una triple hélice. En la cadena  $\alpha$  cada tercer residuo es glicina (representada en obscuro).
- c) Secuencia de aminoácidos de la cadena  $\alpha$  1(I) de pollo. Se encuentran representados los residuos 4 a 13.
- (a) y b) tomados de (7), c) tomado de (10))

la hidroxilisina establece uniones covalentes con carbohidratos y éstos a su vez permiten la unión entre distintas moléculas para formar una fibra (4,5).

En la colágena tipo I, la más abundante de todas hay dos cadenas  $\alpha 1(I)$  y una  $\alpha 2(I)$ ; en las colágenas tipos II y III las tres cadenas son idénticas (ver figura 2). Existen otras colágenas no intersticiales en membranas basales y en otros tejidos. La colágena tipo IV es una proteína colagénica proveniente de membranas basales, rica en hidroxilisina e hidroxiprolina. Esta difiere de las colágenas intersticiales en su susceptibilidad a la pepsina y en su inhabilidad para formar fibras. La colágena tipo V es parecida en cuanto a su composición de aminoácidos a la de membrana basal. Se ha localizado en las laminae basales, aunque por su habilidad para formar fibras, propiedades fisicoquímicas y localización en tejidos mesenquimatosos parecería tener una relación más estrecha con las colágenas intersticiales (2). Estos son los principales componentes de esta familia de proteínas. Actualmente se han descrito ya diez tipos distintos de colágena, provenientes de distintos tejidos, pero los tipos recientemente hallados no han sido totalmente caracterizados.

Cada tipo de tejido conjuntivo tiene una composición característica de colágena. El papel mecánico y estructural que juega en los tejidos está bastante bien establecido; pero es interesante mencionar que juega un papel importante, junto con la fibronectina y otras proteínas de la matriz, en el establecimiento de las células sobre un sustrato. Hay mu-

COLAGENA	CONFIGURACION MOLECULAR	DISTRIBUCION EN LOS TEJIDOS PRINCIPALES
Tipo I trímero	$(\alpha 1(I))_2 \alpha 2(I)$	piel, hueso, tendones, ligamentos, córnea, órganos internos.
Tipo I	$(\alpha 1(I))_3$	tejidos embrionarios e inflamatorios.
Tipo II	$(\alpha 1(II))_3$	cartílago, cuerpo vítreo.
Tipo III	$(\alpha 1(III))_3$	vasos sanguíneos, piel, órganos internos.
Tipo IV	$(\alpha 1(IV))_3$	membranas basales.
Tipo V	$(\alpha 1(V))_2 \alpha 2(V)$	membranas basales, órganos internos.

FIGURA 2

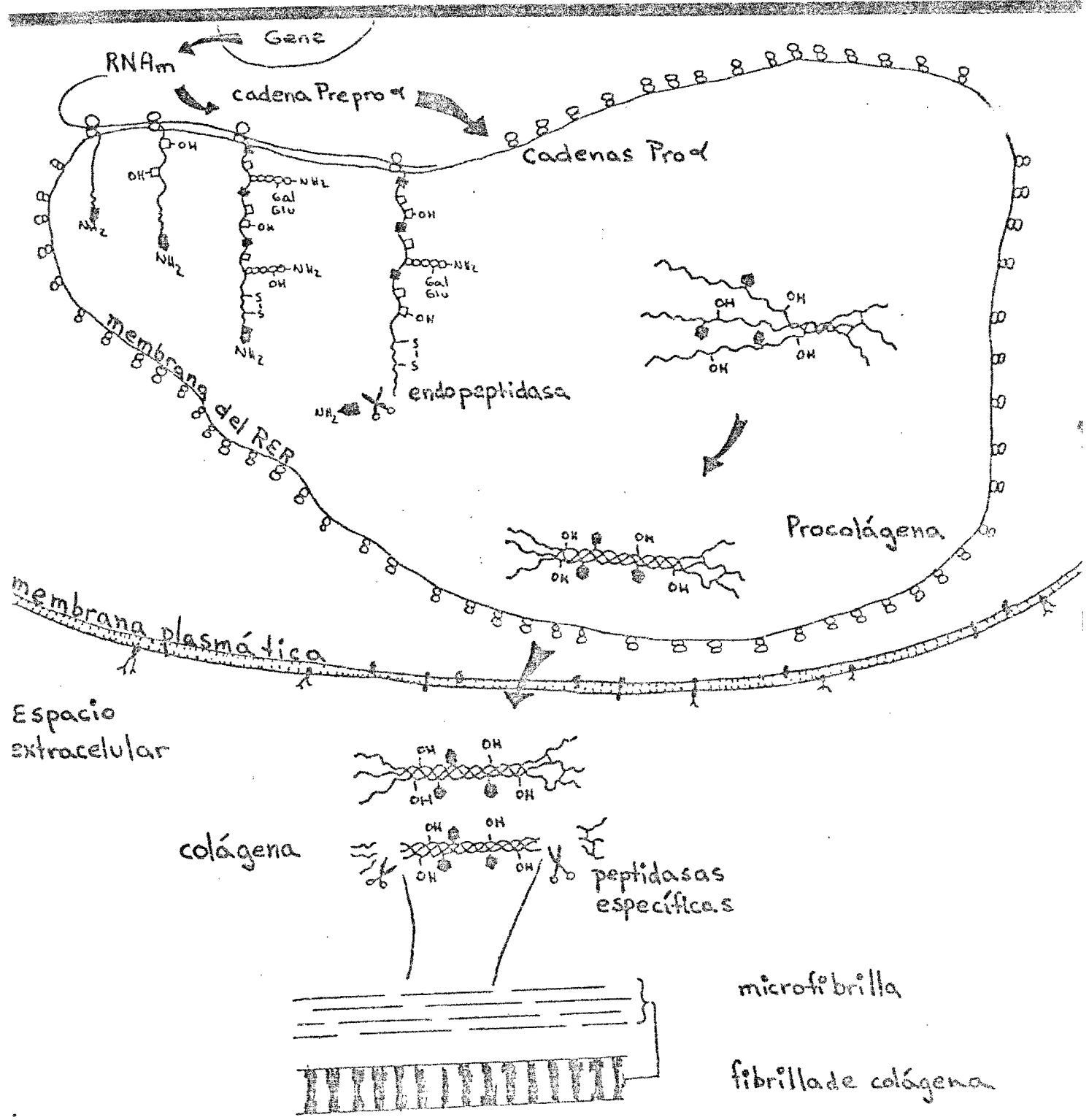
PRINCIPALES TIPOS DE COLAGENA. SU DISTRIBUCION EN EL ORGANISMO.  
(basada en (4)).

chas observaciones acerca de los requerimientos de este establecimiento celular sobre matrices de colágena para que se lleve a cabo tanto el crecimiento como la diferenciación celular (6). Se piensa que la matriz extracelular juega un papel activo en la regulación de las células con las que tiene contacto, influyendo en su desarrollo, migración, proliferación, forma y funciones metabólicas (7). Para ejemplificar, tenemos el papel que juega en fenómenos como la agregación de plaquetas y la calcificación del hueso (7,8,9).

#### BIOSÍNTESIS DE COLÁGENA.

Los genes de las cadenas  $\alpha$  de colágena son de los más complejos que se conocen, con cerca de 50 exones separados, el gene es diez veces mayor que el RNAm funcional. Después de la transcripción el mensajero se procesa y pasa al citoplasma en donde se lleva a cabo la síntesis de los péptidos de colágena, en polisomas unidos a las membranas del retículo endoplásmico rugoso (RER) (ver figura 3). En estudios de traducción de RNAm en sistemas libres de células, se ha visto que las cadenas  $\alpha$  se sintetizan como pre-pro $\alpha$  que contienen secuencias señal hidrofóbicas en el extremo amino-terminal. Esta secuencia facilita el paso de la cadena hacia el lumen del RER, siendo hidrolizada posteriormente por endopeptidasas intramembranales. Durante la biosíntesis suceden los

FIGURA 3.  
REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA SECUENCIA DE EVENTOS  
DURANTE LA BIOSINTESIS DE COLAGENA.



(basado en (4) y (7)).



siguientes eventos cotraduccionales:

1) Hidroxilación: La hidroxilación de los residuos de prolina y lisina se lleva a cabo por medio de tres hidroxilasas que se encuentran localizadas en el RER. Las tres enzimas convierten algunos de los residuos de prolina en 4-hidroxiprolina o 3-hidroxiprolina y algunos de los residuos de lisina en hidroxilisina. Estas hidroxilasas requieren de oxígeno molecular,  $\alpha$  cetoglutarato, ascorbato y hierro ferroso; el sustrato peptídico debe encontrarse en conformación no-helicoidal y los residuos de prolina y lisina en una secuencia específica. La prolil-4-hidroxilasa y la lisil-hidroxilasa hidroxilan solamente residuos de prolina y lisina en posición Y de los péptidos que presentan la secuencia X-Y-Gly (11); en tanto que la prolil-3-hidroxilasa hidroxila únicamente residuos de prolina que se encuentren en posición X de los péptidos que presentan la secuencia X-Hyp-Gly. El grado de hidroxilación de los distintos tipos de colágena difiere, aunque en la mayor parte de las colágenas de vertebrados el 45-50% de los residuos de prolina se hidroxilan (ver figura 4).

La prolil-4-hidroxilasa se ha purificado de diversos tejidos y es un tetrámero de 240 000 daltones, con dos tipos de subunidades:  $\alpha_2 \beta_2$ . Cada subunidad tiene un peso molecular de alrededor de 60 000, se localiza en el RER y el hecho de que se extraiga fácilmente con tratamientos de detergente suave parece indicar que no es una proteína integral de la membrana del RER. En contraste, la lisil-hidroxilasa se encuentra firmemente unida a dicha membrana.

	Cadenas de Colágenas intersticiales				y Membranas basales		
	$\alpha 1(I)$	$\alpha 2(I)$	$\alpha 1(II)$	$\alpha 1(III)$	$\alpha 1(IV)$	$\alpha 1(V)$	$\alpha 2(V)$
3Hyp	1	1	2	0	7	5	3
4Hyp	108	93	97	125	133	110	106
Pro	124	113	120	107	65	130	107
Gly	333	338	333	350	328	332	331
Ala	115	102	103	96	37	39	54
Hyls	9	12	20	5	49	36	23
Gal-Hyls	1	1	4	-	2	5	3
Glc-Gal-Hyls	1	2	12	-	30	29	5

(residuos/1000 residuos)

FIGURA 4  
 COMPONENTES PRINCIPALES DE LAS CADENAS  $\alpha$  DE DISTINTOS  
 TIPOS DE COLAGENA DE HUMANO. (tomado de (2) ).

2) Glicosilación: A medida que los residuos de lisina se hidroxilan en las cadenas pro $\alpha$  de colágena se van agregando residuos de carbohidratos a las hidroxilisinas. La glicosilación es catalizada por glicotransferasas. La galactosiltransferasa agrega galactosa a los residuos de hidroxilisina, en tanto que la glucosiltransferasa añade glucosa a la galactosilhidroxilisina. Estas enzimas son glicoproteínas y requieren de cationes divalentes, del carbohidrato en forma de uridina difosfato y de la cadena pro $\alpha$  en conformación no-helicoidal. La glicosilación se inicia cuando los péptidos aún se encuentran en los ribosomas, terminando cuando la molécula adquiere la conformación triple helicoidal. Las extensiones peptídicas carboxilo-terminales contienen oligosacáridos unidos a residuos de asparagina semejantes a los de otras glicoproteínas con N-acetilglucosamina y manosa.

Una vez traducida y modificada la cadena pro $\alpha$ , se alinea con otras dos para formar la triple hélice; el proceso de ensamble se inicia en las cisternas del RER. Se piensa que las secuencias terminales de la procolágena tienen el papel de alinear en forma adecuada a las tres cadenas. En las procolágenas tipo I y II, las extensiones carboxilo-terminales contienen puentes disulfuro intercatenarios y en la tipo III, también se presentan en las amino-terminales. La formación de la triple hélice ocurre inmediatamente después del establecimiento de los puentes disulfuro, por un proceso espontáneo que no requiere de enzimas específicas (3). El transporte hacia el exterior de la célula, es similar al de

otras proteínas, se lleva a cabo en vesículas provenientes del aparato de Golgi y son secretadas por exocitosis (2,12).

En el espacio extracelular los pequeños agregados de procolágena pierden sus extensiones amino y carboxilo terminal no-helicoidales por medio de las enzimas aminopeptidasa y carboxipeptidasa extracelulares, de esta manera la molécula de procolágena se convierte en colágena (ver figura 3).

En algún paso del proceso de secreción, las fibrillas recientemente formadas son reconocidas por la lisil-oxidasa que transforma a algunas de las lisinas e hidroxilisinas en aldehídos. La lisil-oxidasa cataliza la desaminación oxidativa de algunos residuos de lisina e hidroxilisina, es una amino-oxidasa extracelular que requiere cobre, oxígeno molecular y probablemente piridoxal (2,12,13). Los aldehídos resultantes de la desaminación oxidativa reaccionan con los grupos  $\epsilon$ - amino de aquellas lisinas o hidroxilisinas no desaminadas que se encuentran en moléculas adyacentes, estableciéndose de esta manera uniones intermoleculares entre los residuos de lisina que en un principio son bases de Schiff ( $R_1-HC=N-R_2$ ), pero que durante el proceso de maduración del tejido conjuntivo se transforman en enlaces covalentes más estables. Este tipo de uniones confieren a la fibra de colágena una gran fuerza tensil.

## DEGRADACION DE LA COLAGENA.

Durante muchos años se desconocieron los mecanismos de degradación de la colágena en condiciones fisiológicas, en parte por la idea de que la molécula de colágena tiene una naturaleza sumamente estable y en parte por los resultados obtenidos en estudios sobre el recambio de esta proteína en el organismo (1).

En 1954 Harkness, M. y Harkness, R. publicaron un trabajo sobre la disminución en el contenido de colágena sufrida por el útero de la rata en el posparto (14).

La búsqueda de mecanismos endógenos de degradación de la colágena comenzó en 1960; pero las técnicas existentes no permitieron su demostración sino hasta 1962 cuando Gross, J. y Lapière, C. descubrieron la primera colagenasa de eucariontes (15). Ellos encontraron que al cultivar explantes de tejido de cola de renacuajo se liberaba al medio de cultivo una colagenasa activa a pH, temperatura y fuerza iónica fisiológicos, con especificidad para hidrolizar la porción helicoidal de la molécula de colágena. Este trabajo abrió nuevos horizontes en el campo de la degradación de la colágena enfocándose tanto a situaciones normales, como a situaciones patológicas.

Cuando la colágena se encuentra en estado nativo no es susceptible a ser degradada por enzimas proteolíticas inespecíficas; salvo la elastasa de leucocitos polimorfo-

nucleares y la catepsina G que atacan a la molécula en sus regiones no-helicoidales (16). Las colagenasas son las únicas enzimas capaces de iniciar la proteólisis de las colagenas intersticiales (tipos I, II y III) hidrolizando las tres cadenas  $\alpha$  de la triple hélice. Hacen un corte específico en la unión glicina-isoleucina que ocupa la posición 772-773 de la cadena  $\alpha$  1(I) y en la unión homóloga de la cadena  $\alpha$  2(I) en la colágena tipo I (17). Para las colágenas tipo II y III el sitio de ruptura es análogo (18), produciéndose dos fragmentos característicos: el amino-terminal que constituye las tres cuartas partes de la molécula y que se denomina  $TC^A_{75}$ , y el carboxilo terminal que representa la cuarta parte restante de la molécula, el  $TC^B_{25}$  (en contraste las colagenasas bacterianas producen varios fragmentos). Una vez rota la molécula, en condiciones fisiológicas los productos de degradación se vuelven susceptibles a posterior degradación por parte de gelatinasas y proteasas neutras que se encuentran en el espacio extracelular (16,17,18,19).

Actualmente se han descrito ya un gran número de colagenasas provenientes de distintos tejidos de vertebrados. Todas comparten varias de sus características: son metaloproteínas dependientes de calcio y zinc (20,21), siendo por lo tanto susceptibles a ser inhibidas por agentes quelantes como el EDTA (19), atacan a la colágena en el mismo sitio específico y su peso molecular oscila entre 45 000 y 65 000 (16); son inhibidas por proteínas del suero sanguíneo como la  $\alpha$ -2-macroglobulina y la  $\beta$ -tromboglobulina (17,22). La cola-

genasa del granuloma de carragenina posee también estas propiedades (23).

Las colagenasas se han obtenido de una gran variedad de tejidos en cultivo. La enzima es secretada por las células en forma inactiva lo que probablemente juegue un papel importante en el mecanismo de regulación de la degradación de la colágena. Se ha visto que la colagenasa puede activarse experimentalmente con proteólisis limitada (24) o incubando con compuestos organomercuriales (25). En algunos casos el almacenamiento de la enzima a bajas temperaturas (26) y la incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  dan como resultado la activación de la enzima por un proceso al parecer espontáneo.

Hasta hace poco tiempo, la naturaleza de la latencia de la colagenasa fué motivo de debate ya que la activación puede o no involucrar cambio evidente en el peso molecular de la enzima. La pregunta era si se trataba de un zimógeno que requiere para su activación un cambio conformacional o la pérdida de ciertos aminoácidos; o bien si la latencia involucra la formación de un complejo enzima-inhibidor. Teóricamente cualquiera de las dos alternativas pueden explicar la aparición de una enzima activa a partir de una latente y los datos experimentales en cada caso son:

La colagenasa latente producida en cultivo por tejido de útero de conejo tiene un peso molecular de 39 000. Cuando se activa con 4-aminofenilmercurico-acetato, que es un agente que interactúa con grupos sulfhidrilo, se obtiene una enzima de 26 000 daltones. Si la enzima latente se activa

con tripsina, la colagenasa presenta un peso molecular de 27 000. Cuando la enzima activa se inhibe con un inhibidor que produce el hueso de conejo en cultivo, se obtiene una enzima inactiva con un peso molecular de 40 000, que es muy parecida a la enzima latente (29). Observaciones parecidas se obtuvieron con la colagenasa latente de leucocitos polimorfonucleares, en este caso, la enzima latente tiene un peso molecular de 80 000 la activación con cistina da lugar a una enzima de 65 000 y hace posible la separación de un inhibidor de 24 000 daltones (este último contiene grupos sulfhidrilo) (30).

Por otra parte casi todos los tipos de tejido conjuntivo producen inhibidores de la colagenasa de mamífero. Entre éstos tenemos un grupo de proteínas catiónicas de bajo peso molecular que se han obtenido de cartílago y aorta bovinos (31,32,33). Hay otro grupo de inhibidores denominados "Inhibidores de Metaloproteasas de Tejidos" (TIMP) que son glucoproteínas de alrededor de 30 000 daltones y que se unen estequiométricamente a la colagenasa activa así como a otras proteasas del tejido conjuntivo. Estos inhibidores se han encontrado en hueso de conejo, líquido sinovial y amniótico (34), piel humana (35) y otros tejidos.

La amplia lista de inhibidores encontrados y las observaciones de los cambios en el peso molecular de la enzima latente al ser activada apoyan que la enzima latente en estos sistemas es un complejo enzima-inhibidor.

Por el otro lado los datos que sostienen que



se trata de un zimógeno son: que la colagenasa inactiva de fibroblastos de piel humana se activa espontáneamente sin cambio aparente en el peso molecular (27,28). Se sugiere entonces que la enzima sufre cambios conformacionales que permiten que el sitio activo quede expuesto (36).

Recientemente se aisló el RNAm de la colagenasa de fibroblastos sinoviales de conejo, y se tradujo en un sistema libre de células. En ausencia de membranas microsomales se obtiene un solo péptido de pre-procolagenasa de 59 mil daltones, que inmunoprecipita con un anticuerpo anticolagenasa. En presencia de membranas microsomales, el polipéptido se procesa y se obtiene una procolagenasa de 57 000 daltones, idéntica a la colagenasa latente que secretan las células sinoviales en cultivo. Ambas pueden activarse con tripsina lo que da lugar a un decremento en el peso molecular. En virtud de que no se encuentra ningún inhibidor asociado, se concluyó que al menos esta colagenasa se produce en forma de zimógeno (16,36,37,38). En este mismo sistema se ha encontrado una proteína que actúa como activador de la colagenasa, es una metaloenzima y se requiere de su presencia para que la colagenasa latente pueda ser activada con tripsina y 4-aminofenilmercurio-acetato (39). Para complicar las cosas todavía más, el activador producido por los fibroblastos sinoviales en cultivo está en forma de proactivador y a su vez puede activarse con tripsina (36).

Como se puede ver el panorama es bastante complejo, y los datos con los que se cuenta provienen de sistemas muy diversos. Es posible que en cada sistema la colage-

nasa latente sea distinta, pero también es factible que el zimógeno y el complejo enzima-inhibidor representen distintos niveles de regulación de la degradación de colágena ya que la colagenasa en forma activa en el espacio extracelular representa un peligro durante su tránsito hacia el sitio de degradación de colágena.

Los resultados provenientes de distintos sistemas hacen suponer que la colagenolisis es un proceso con varios niveles de regulación (36): Un primer nivel de regulación en la degradación de colágena sería el de la expresión genética. La estimulación de la biosíntesis de colagenasa se ha estudiado en distintos sistemas y parece ser un fenómeno de interacción celular (36). Al menos en condiciones "in vitro" se ha visto que el factor de células mononucleares (MCP) y otros productos similares provenientes de monocitos y macrófagos estimulados, inducen a los condrocitos, fibroblastos y células sinoviales a producir colagenasa (16,40).

La enzima inmediatamente después de ser sintetizada, es secretada al medio extracelular; la forma de zimógeno pudiera ser un mecanismo regulador de la actividad colagenolítica que permita a la colagenasa llegar desde el sitio de secreción hasta el sitio en donde se requiere la lisis de colágena sin que inhibidores extracelulares la inactiven irreversiblemente, evitándose además que durante su tránsito degrade colágena en aquellos sitios en los que no se requiere de la degradación. El siguiente nivel de regulación sería la presencia de un activador en el sitio en el que se requiere la colagenolisis. He hablado ya de un activador de la colagenasa que

es producido por los fibroblastos sinoviales en cultivo (36), éste probablemente jugaría un papel importante en este nivel de regulación, pero también otras proteinasas como la plasmina o las enzimas lisosomales liberadas al espacio extracelular podrían desempeñar este papel (36), ya que también activan a la colagenasa latente. Una vez activa la colagenasa se enfrentaría a otro nivel de regulación en el cual su actividad se vería modulada por inhibidores específicos que se unen a ella formando un complejo enzima-inhibidor o por inhibidores no específicos presentes en el suero como la  $\alpha_2$ -macroglobulina. Y el último nivel de regulación estaría dado por la susceptibilidad del sustrato a ser degradado, la vida media de la enzima y las condiciones microambientales como pH y temperatura. La susceptibilidad de la colágena a ser degradada se debe a cambios conformacionales que exponen uniones peptídicas susceptibles así como, posición de la molécula en la fibra, tipo genético, grado de entrecruzamiento y efectos de otras moléculas asociadas. La suma de distintos factores fisiológicos por lo tanto puede desencadenar que en un momento dado se lleve a cabo la degradación de la colágena (41).

## EL GRANULOMA DE CARRAGENINA.

La carragenina es un polisacárido sulfatado que se obtiene del alga Chondrus chispus, comercialmente se utiliza como estabilizador y gelificante de algunos alimentos. Se compone de dos polímeros  $\kappa$  y  $\lambda$ . Al inyectarla subcutáneamente en el abdomen del cobayo produce una reacción bifásica, que consiste en inflamación aguda y depósito de tejido conjuntivo en la etapa temprana y una posterior degradación que involucra aun al tejido circundante. Este modelo experimental se llama granuloma de carragenina y en el cobayo llega a tener una duración de alrededor de tres semanas, dependiendo de la dosis de carragenina utilizada (42,43,44).

Después del estímulo con carragenina, hay migración de células fagocíticas hacia la zona lesionada, la posterior multiplicación de estas células en el sitio de inflamación va acompañada por una rápida síntesis de colágena, parte de la cual tiene una rápida maduración (44). En estos primeros días se han observado leucocitos polimorfonucleares y macrófagos como las células más abundantes de la etapa de depósito del granuloma; también se encuentran fibroblastos pero en menor cantidad. Alrededor de los siete días después de la inyección de carragenina el granuloma llega a su máximo desarrollo (43). La carragenina desaparece del espacio extracelular hacia el día décimo de evolución y las células inflamatorias van disminuyendo, mientras que la población de fibroblastos aumenta y hacia

la segunda semana del desarrollo del granuloma son ya las células predominantes. Concomitantemente el tamaño del granuloma empieza a disminuir hasta que hacia el día veinticinco casi ha desaparecido. Esta etapa de reabsorción se caracteriza por la destrucción del tejido conectivo antes depositado, que se hace patente aun a nivel de ultraestructura (43). Finalmente el granuloma desaparece y es reemplazado por tejido adiposo (44).

Como puede verse, en este modelo la carragenina desencadena un fenómeno que se caracteriza no solamente por la proliferación celular y acelerado depósito de colágena, sino que además hay una dramática degradación y remodelación del te jido. Fenómenos que ocurren en una gran variedad de condiciones tanto normales como patológicas cuyos mecanismos aún distan mucho de ser completamente compendidos. Es por estos moti vos que el modelo experimental del granuloma de carragenina es ideal para el estudio del metabolismo de la colágena.

#### A N T E C E D E N T E S .

La caracterización histológica del granuloma de carragenina durante toda su evolución se llevó a cabo en 1970 por Pérez-Tamayo (43). El hecho de que la colágena, durante la fase de reabsorción del granuloma, tenga una vida media de cinco a seis días, en tanto que algunos tejidos normales (no en estado de remodelación) presentan colágenas con vida media de trescientos días (45) condujo al estudio de algunas de las

propiedades fisicoquímicas de la colágena. El objeto fue el de averiguar si las características de la colágena del granuloma eran las responsables de la susceptibilidad de la proteína a ser degradada. Se realizó un estudio comparativo entre la colágena del granuloma de carragenina y la de piel del mismo animal (46) encontrándose que las dos colágenas prácticamente son indistinguibles salvo porque la colágena del granuloma al ser analizada en electroforesis presenta mayor concentración de subunidades  $\alpha$  y menor de subunidades  $\beta$  que la colágena extraída de piel. Esto último significa que la colágena del granuloma contiene menor cantidad de enlaces covalentes. Esta diferencia se interpretó aludiendo la reciente síntesis de la colágena del granuloma. En la fecha en la que se desarrolló este trabajo aún no se sabía de la existencia de distintos tipos de colágena: la colágena se consideraba como una proteína única, por lo tanto no se sugirió alternativamente la presencia de otros tipos de colágena para explicar la diferencia encontrada, y obviamente tampoco se determinó el tipo de colágena encontrada.

Por otra parte un ingenioso experimento, en el que se insertó un fragmento de tendón de cola de rata en el seno del granuloma, demostró al ser degradado que el granuloma contenía colagenasa (47), enzima específica que cataliza la degradación de la colágena. Más tarde el cultivo de explantes de tejido de granuloma proveniente de la etapa de reabsorción, hizo posible la purificación parcial y caracterización de la colagenasa del granuloma de carragenina. Asimismo se observó que la colagenasa liberada al medio de cultivo por los explantes de tejido durante los primeros días requería el paso por una colag

na Sephadex G-150 para manifestar su actividad; en tanto que la enzima liberada al medio de cultivo a partir del quinto día se encontraba ya activa (23).

Este tipo de técnicas de cultivo de tejidos, en un momento dado puede ser que reflejen las potencialidades del tejido para sintetizar enzimas bajo condiciones "artificiales" más que la verdadera actividad del tejido "in vivo". Partiendo de esta idea, se buscaron nuevas estrategias para demostrar la presencia de la colagenasa en sistemas que representaran condiciones más semejantes a las del tejido "in vivo". Una de estas estrategias fue la de determinar la actividad colagenolítica en distintos extractos de granulomas en etapa de reabsorción, incubándolos con colágena en condiciones fisiológicas (48). En este estudio, el tejido homogeneizado del granuloma presentaba actividad colagenolítica, pero en distintas extracciones llevadas a cabo no se recuperó dicha actividad, lo que sugería que la colagenasa no se extrae en forma soluble, sino que queda unida a su sustrato en la fracción insoluble. Utilizando distintas técnicas de extracción se demostró recientemente que en la etapa de depósito del granuloma la colagenasa se extrae en forma inactiva y requiere ser activada para demostrar su presencia. La activación de la enzima se logró con un agente organomercurio, el 4-APMA. La colagenasa se recuperó después de una cromatografía en Ultrogel AcA-44 unida a su sustrato y libre en una fracción con peso molecular de 60 000 (49). El hallazgo de colagenasa en la etapa de depósito del granuloma de carragenina coincide con las observaciones hechas con la técnica de inmunofluorescencia que se habían realizado anterior

mente, en donde con el anticuerpo anticolagenasa de granuloma se demostró la presencia de la proteína enzimática tanto en la etapa de depósito como en la de reabsorción (50).

#### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Con toda la información que se dispone hasta el momento, quedan aún muchas preguntas que responder para lograr esclarecer el fenómeno del granuloma de carragenina.

Los datos encontrados con la técnica de inmunofluorescencia demostraron que en ambas etapas del granuloma se encuentra presente la colagenasa (50). Sabemos que en la etapa de depósito se puede extraer la enzima en estado latente; pero ¿ es así como se encuentra la enzima durante esta etapa en el tejido "in vivo", o es que estamos viendo un artefacto producido por los métodos tradicionales de purificación ?

¿ Si la enzima se encuentra inactiva en la etapa de depósito en el tejido "in vivo", es esta inactividad lo que da como resultado el fenómeno de depósito de colágena que estamos viendo ? ¿ Serían entonces los mecanismos de activación de la colagenasa los responsables de dar paso a la fase de reabsorción del granuloma al iniciar con la activación de la enzima la desintegración del tejido conjuntivo antes acumulado ? ¿ En la fase de reabsorción se detiene la biosíntesis de colágena iniciada en la etapa de depósito ? A partir de estas interrogan-



tes, se establecieron los siguientes objetivos:

#### O B J E T I V O S .

Utilizando tejido homogeneizado de granuloma recién extraído del animal (que al contener sus propios elementos endógenos reflejará más parecido con las condiciones que el tejido presenta "in vivo") se compararán las características de ambas etapas del granuloma con el objeto de investigar:

1) Si hay diferencias en la tasa de biosíntesis de colágena en ambas etapas del granuloma.

2) Si hay diferencias en la actividad colagenolítica entre la etapa de depósito y la de reabsorción.

3) Si hay colagenasa en estado inactivo en alguna de las dos etapas, o en las dos.

## MATERIAL Y METODOS

- 1) Se utilizaron cobayos de ambos sexos con un peso aproximado de 500 g, éstos fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM.
- 2) La carragenina Viscarin 402 se obtuvo de Marine Colloids Inc. Springfield, N.J.
- 3) El medio de cultivo utilizado fue "Dulbecco's Eagle modified" de Grand Island Biological, Co. Gran. N.Y.
- 4) La L-(2,3-<sup>3</sup>H)Prolina se obtuvo de New England Nuclear, Boston, (Mass.) y tenía una actividad específica de 40 Ci/mmol.
- 5) La tripsina utilizada fue Tripsina de páncreas porcino tipo IX. No. T-0134 (F.C.E. 3.4.21.4.) de Sigma Chemical Co. (St.Louis Mo.) USA.
- 6) El inhibidor de tripsina de soya tipo 11-S se obtuvo de Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo.) USA. No.T-9128.

Todos los demás reactivos utilizados, fueron de grado analítico.

### (A) OBTENCION DE GRANULOMAS .

Cobayos de ambos sexos se inyectan en la región abdominal con 5 ml de una solución estéril de carragenina al

1% en NaCl 0.15 M . A los siete días, un grupo de animales con granulomas en etapa de depósito se anestesian con éter y se sacrifican por exsanguinación cardíaca. Se extraen los granulomas y se limpian cuidadosamente de tejido adiposo y muscular, se lavan en amortiguador Tris HCl 0.05 M; NaCl 0.15 M;  $\text{CaCl}_2$  0.01 M; pH 7.6, se secan con una gasa estéril y se pesan.

A los catorce días, otro grupo de animales con granulomas en etapa de reabsorción se sacrifican y en las mismas condiciones se obtienen los granulomas.

#### (B) DETERMINACION DEL PESO SECO .

Se toman fragmentos de tejido de granuloma de aproximadamente 50 mg, se secan con papel filtro estéril y se llevan a peso constante deshidratando el tejido en una estufa a  $100^{\circ}\text{C}$ . Con los datos de peso húmedo y seco se calcula el porcentaje de humedad en cada muestra.

#### (C) DETERMINACION DEL CONTENIDO DE COLAGENA .

La muestra a la que se le determinará contenido de colágena se hidroliza en ampollitas de vidrio selladas, a  $110^{\circ}\text{C}$  durante veinticuatro horas en presencia de HCl 6 N. El ácido se evapora a sequedad y las muestras se lavan dos veces

en agua destilada que también se evapora a sequedad. El material se recupera y neutraliza en un volumen final de 2 ml. Las muestras se centrifugan a 4°C a 1 300 x g para eliminar cualquier material insoluble. El contenido de colágena se determina por el método de Rojkind y González (51), que esencialmente se basa en la detección colorimétrica de hidroxiprolina mediante las siguientes reacciones: oxidación del iminoácido con cloramina T, transformación del producto de oxidación a un pirrol y obtención de un cromóforo al tratar con 4-dimetilaminobenzaldehído. En cada determinación se elaboró una curva patrón de absorbancia contra concentración de hidroxiprolina. Después de medir la absorbancia del compuesto colorido a 560nm se calcula el contenido de hidroxiprolina en la muestra y se multiplica por el factor 7.42; que relaciona el número de residuos de hidroxiprolina que hay en la molécula de colágena. Con este dato se calcula el contenido total de colágena en la muestra.

#### (D) DETERMINACION DE BIOSINTESIS DE COLAGENA.

La técnica para establecer la capacidad biosintética de colágena de un tejido consiste en incubar un fragmento de éste en un medio que cumple con todos los requerimientos para la biosíntesis de esta proteína, en presencia de prolina tritiada. La incorporación de este iminoácido y posterior hidroxilación son prueba de que se está llevando a cabo biosíntesis.

sis de colágena, ya que esta proteína es una de las pocas que contienen hidroxiprolina.

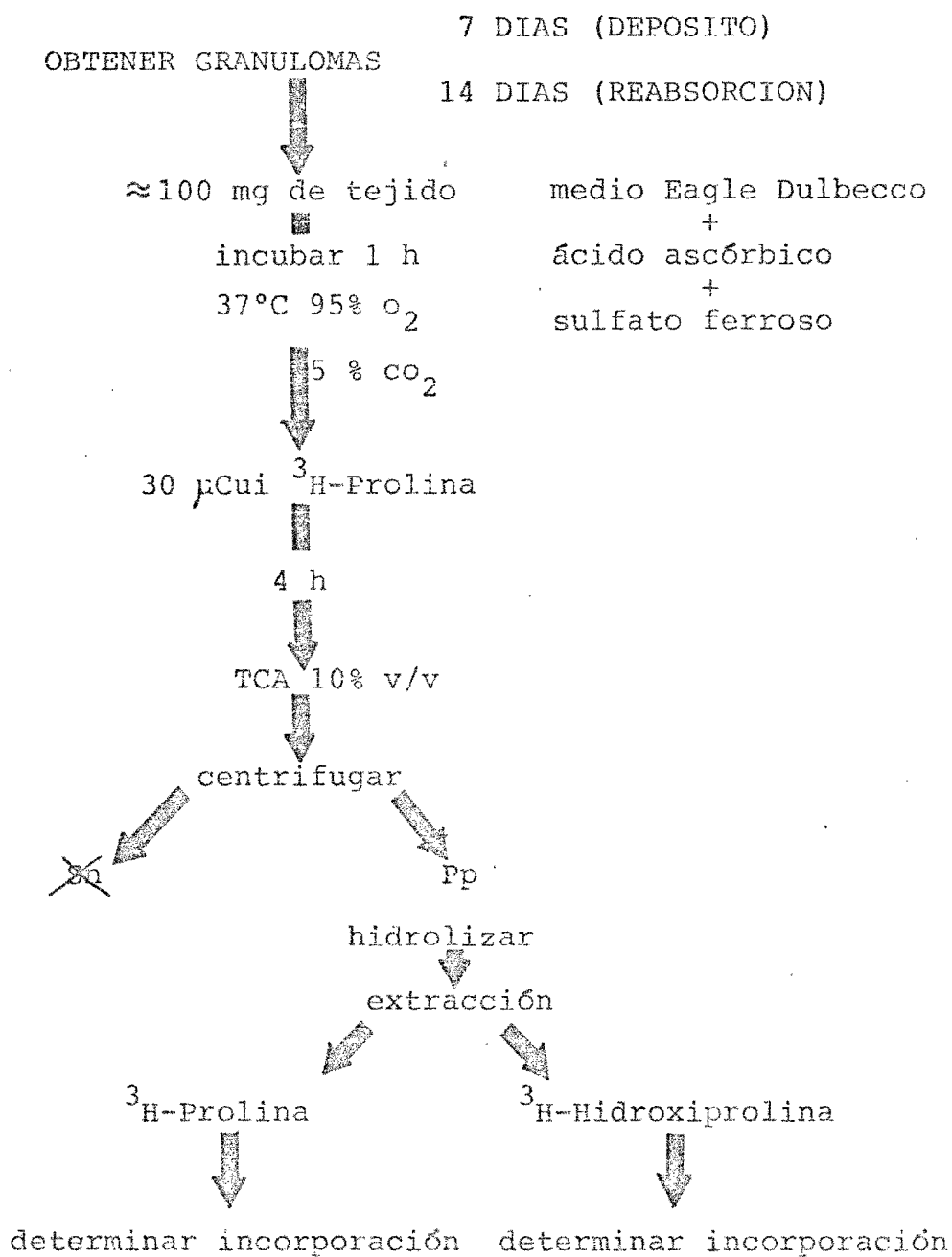
Se utiliza medio de cultivo con antibióticos adicionado con sulfato ferroso (53.8 µg/ml), y ácido ascórbico (15.4 µg/ml) que se agregan justo antes de utilizar el medio.

#### (D.1) INCUBACION Y MARCAJE .

Un fragmento de tejido de alrededor de 100 mg, recién extraído del animal se pone en un tubo de ensayo estéril con 3 ml del medio de cultivo antes mencionado. Después de incubar a 37°C en un ambiente de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> durante una hora, se renueva el medio de cultivo y se agregan 30 µCi de L-(2,3-<sup>3</sup>H)Prolina. Se continúa incubando en presencia y ausencia de suero de cobayo descomplementado al 10% v/v por espacio de cuatro horas. Y luego el tejido se homogeneiza junto con el medio de cultivo. Se agrega ácido tricloroacético a una concentración final de 5% y se deja a 4°C durante 12 horas. Se centrifuga a 1 300 x g durante 15 minutos y se desecha el sobrenadante; en este proceso y los lavados subsecuentes, que son dos, se desecha toda la marca que no quedó incorporada. Los dos últimos lavados se llevan a cabo con ácido tricloroacético al 2.5% (52). Al final del proceso se toma el precipitado y se hidroliza en ampollitas de vidrio selladas, a 110°C durante 24 horas en presencia de HCl 6 N.

# DETERMINACION DE BIOSINTESIS

## DE COLAGENA



(D.2) EXTRACCION Y CUANTIFICACION DE  
<sup>3</sup>H-PROLINA Y <sup>3</sup>H-HIDROXIPROLINA .

El método utilizado (51) se basa en la oxidación de los iminoácidos con cloramina-T y la extracción diferencial de los productos de oxidación de la prolina e hidroxiprolina en tolueno. El  $\Delta^1$ -pirroline, que es el producto de oxidación de la prolina se extrae primero, en esta primera extracción la recuperación de prolina fue del 68.2%  $\pm$  10.6. Se llevan a cabo dos extracciones más en las que se elimina la prolina restante. Posteriormente al calentar la fase acuosa, el ácido pirrol carboxílico producto de oxidación de la hidroxiprolina, se convierte en un pirrol que también se extrae en tolueno, en este caso se recuperó el 46.7%  $\pm$  3.43. Ambas extracciones se cuentan por separado en líquido de centelleo Tolueno-PPO con un contador de centelleo líquido Packard Auto-Gamma Scintillation Spectrometer 3255.

Se calcula la incorporación de prolina e hidroxiprolina y se determina el porcentaje de biosíntesis de colágena con respecto a proteínas no-colagénicas en cada una de las muestras de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$\begin{array}{l} \text{\% biosíntesis de colágena} \\ \text{respecto a proteínas no-colagénicas} \end{array} = \frac{2(\text{cpm Hyp incorporada}) \times 100}{2(\text{cpm Hyp incorporada}) + 5.04(\text{cpm Pro incorporada})}$$

Nota: En la expresión se toman en consideración tanto la recuperación de cada uno de los iminoácidos, como la contaminación del otro en la extracción, que en cada caso fué menor del 1.5%.

en donde:

2(cpm Hyp incorporada) : representa a la proteína colagénica biosintetizada durante el ensayo, ya que la hidroxiprolina se presenta casi exclusivamente en la colágena. Se multiplica por dos porque se toma en consideración que en la colágena el 50% de la prolina incorporada se hidroxila, por lo tanto el dato incluye tanto a la prolina como a la hidroxiprolina incorporadas a la colágena recientemente sintetizada.

5.04(cpm Pro incorporada) : representa el valor correspondiente a la proteína no-colagénica biosintetizada durante el ensayo, ya que la prolina se incorpora indistintamente a proteínas. En proteínas no-colagénicas, por cada 100 residuos de aminoácidos 5.04 residuos son prolina, por eso se multiplica por este factor (53,54).

La suma de 2(cpm Hyp incorporada) más 5.05(cpm Pro incorporada) representa por lo tanto el total de proteínas que se biosintetizaron durante el ensayo.

#### (E) DETERMINACION DE ACTIVIDAD COLAGENOLITICA .

El método descrito por Ryan y Woessner (55) se basa en el principio de que en homogeneizados de tejido incubados a 37<sup>o</sup>C el sistema colagenolítico que se encuentra en el tejido degradará a la colágena endógena. La colágena insoluble se separa de los productos de degradación solubles por centrifugación y las dos fracciones se cuantifican por su conte-



nido de hidroxiprolina.

(E.1) PREPARACION DEL TEJIDO .

El granuloma obtenido en cualquiera de sus dos etapas se homogeneiza a 10<sup>0</sup>C en un amortiguador Tris 0.05 M; NaCl 0.15 M; pH 7.6 y concentraciones variables de CaCl<sub>2</sub> según el experimento. La homogeneización se lleva a cabo a razón de 0.5 g de tejido por mililitro.

(E.2) DISTRIBUCION DEL TEJIDO .

El tejido homogeneizado se distribuye en alícuotas de 1 ml para obtener los siguientes lotes experimentales:

- I) Efecto de la concentración de calcio sobre la actividad colagenolítica.

Se probaron concentraciones crecientes de CaCl<sub>2</sub>: 0.01, 0.03 y 0.05M en amortiguador Tris HCl 0.05M; NaCl 0.15M; pH 7.6. Cada muestra experimental tiene un control que, además de contener el tejido en las mismas condiciones, se incubaba en presencia de EDTA a una concentración final de 0.04M.

## II) Pruebas de activación de la colagenasa latente.

Se probaron dos activadores de la colagenasa latente: 4-aminofenilmercúrico-acetato (4-APMA) y tripsina. El 4-APMA se prepara a una concentración de 0.01M, la solución se prepara en el momento de ser utilizada, solubilizando en agua destilada y el pH se ajusta a 10 (56). Se agrega a la muestra la cantidad necesaria para obtener una concentración final de 4-APMA 0.001M. y permanece en el tejido durante todo el ensayo. En este caso se cuenta con un control en el que la actividad colagenolítica se determina en ausencia del 4-APMA. Tanto la muestra incubada en presencia de 4-APMA como la que se incubaba en ausencia de éste cuentan con su propio control interno que contiene el tejido en las mismas condiciones y EDTA 0.04M.

Para la prueba de activación con tripsina el tejido homogeneizado se incuba por 10 minutos a 37°C con distintas concentraciones de tripsina: 30, 50, 100 y 150 µg de tripsina/ml y se suspende la reacción agregando inhibidor de tripsina de soya a una concentración cinco veces mayor a la utilizada de tripsina. La incubación de las muestras tratadas con tripsina se hizo con dos diferentes concentraciones de CaCl<sub>2</sub>, 0.01M y 0.03M. También en este caso se cuenta con controles en los que la actividad colagenolítica se determina en ausencia de tripsina. Tanto las muestras incubadas en ausencia como en presencia de tripsina cuentan con sus controles internos que además contienen EDTA a una concentración final de 0.04M.

(E.3) CONDICIONES DE INCUBACION .

Todos los lotes experimentales se incuban a 37°C durante 22 horas en un baño de agitación constante. Al final de la incubación se agrega EDTA a aquellas muestras que no lo contenían y se centrifugan a 20°C durante 60 minutos a 59 600 x g. Tanto el sobrenadante como el precipitado de la centrifugación se hidrolizan por separado y se les determina el contenido de colágena.

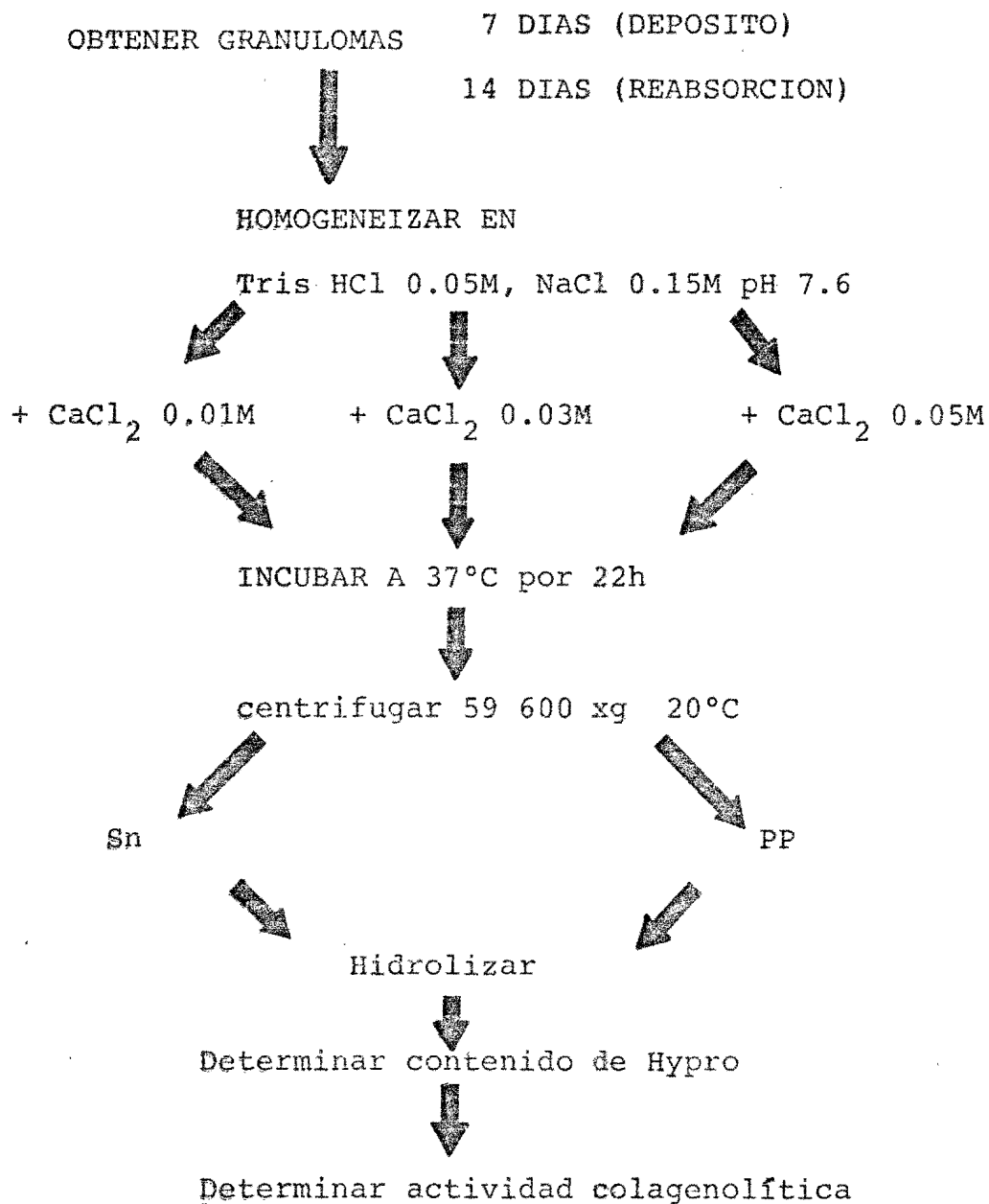
Para expresar la actividad colagenolítica se calcula el contenido de colágena total en cada muestra, sumando el contenido de colágena presente en el sobrenadante más la que se encuentra en el precipitado:

mg		mg		mg
colágena total en la		colágena presente en		colágena presente en
muestra incubada	=	el sobrenadante	+	el precipitado

Se calcula entonces el porcentaje de colágena soluble, con respecto al total de colágena en cada una de las muestras. Los porcentajes de colágena soluble de las muestras experimentales que contienen EDTA (controles) se restan a los porcentajes de sus respectivas muestras experimentales. La actividad colagenolítica de la muestra experimental se expresa como  $\mu\text{g}$  de colágena degradada en 22 horas a 37°C/mg de colágena incubada.

Los datos se presentan como promedios, más menos la desviación estandar y se comparan estadísticamente con la prueba de "t de student" (57).

DETERMINACION DE ACTIVIDAD  
COLAGENOLITICA



## RESULTADOS

### (A) PESO DE LOS GRANULOMAS.

En el granuloma de carragenina el peso húmedo es mayor a los 7 días, en la etapa de depósito que a los 14, en la etapa de reabsorción. Como se puede ver en la tabla # 1, a los 7 días el granuloma tiene un peso húmedo que oscila de 14.3 a 21 gramos; con un promedio de humedad del 89.8% , esto significa que el peso seco promedio es de  $1.78 \pm 0.31$  g (n=5).

En la etapa de reabsorción el peso húmedo del granuloma oscila ente 2.9 y 4.7 gramos, en este caso la humedad promedio es del 82.6%, lo que da un valor de peso seco promedio de  $0.65 \pm 0.12$  g (n=6). Es interesante hacer notar que para el día catorce se ha perdido el 78% del peso total alcanzado en la etapa de depósito y el 63% del peso seco alcanzado en esta misma etapa, lo que sugiere que se ha perdido agua, pero también proteínas y otros componentes del tejido.

### (B) CONTENIDO DE COLAGENA .

En la tabla # 2 se puede observar que el conte-

T A B L A # 1.

Peso húmedo y seco en granulomas de carragenina en etapas de depósito y reabsorción.

ETAPA DE DEPOSITO 7 DIAS		ETAPA DE REABSORCION 14 DIAS	
Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)
21.0	2.14	4.7	0.81
20.1	2.05	4.6	0.80
17.7	1.80	3.7	0.64
14.6	1.49	3.6	0.62
14.3	1.46	3.1	0.54
		2.9	0.50
$\bar{x}$ 17.54 $\pm$ 3.07	1.78 $\pm$ 0.31	3.77 $\pm$ 0.75	0.65 $\pm$ 0.12
$\pm$ s.d.			
contenido de humedad = 89.8%		contenido de humedad = 82.6%	

nido de colágena total en el granuloma es mayor a los 7 días de evolución: el promedio es de  $85.68 \pm 13.25$  mg comparado con  $33.9 \pm 7.0$  mg de colágena total que obtenemos de valor promedio a los 14 días de evolución del granuloma. Sin embargo la relación colágena-peso seco se conserva en ambas etapas del granuloma ya que a los 7 días encontramos  $48.42 \pm 8.1$   $\mu$ g de colágena/mg de peso seco, en tanto que a los 14 días la relación  $52.6 \pm 10.1$ . Esto indica que la disminución en peso seco del granuloma durante su desarrollo conlleva a una disminución proporcional en el contenido de colágena.

### (C) BIOSINTESIS DE COLAGENA .

La capacidad biosintética de colágena se determinó en fragmentos de tejido provenientes de las dos etapas del granuloma. El suero se utilizó con el fin de inhibir la posible degradación de la colágena naciente, ya que el suero contiene inhibidores de la colagenasa como la  $\alpha$ 2-macroglobulina. Los resultados se expresan como porcentaje de biosíntesis de colágena con respecto a proteínas no-colagénicas y aparecen representados en la tabla # 3. En las dos condiciones en que se determinó la biosíntesis de colágena se observa que el tejido proveniente de la etapa de depósito biosintetiza más colágena con respecto a proteína no-colagénica que el tejido proveniente de la etapa de reabsorción.

Cuando el ensayo se hace en presencia de suero

T A B L A # 2.

Contenido de colágena en granulomas de carragenina  
en etapas de depósito y reabsorción.

ETAPA DE DEPOSITO			ETAPA DE REABSORCION			
7 DIAS			14 DIAS			
colágena total (mg)	$\mu\text{g}$ colágena mg peso seco ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$\mu\text{g}$ colágena mg peso húmedo ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	colágena total (mg)	$\mu\text{g}$ colágena mg peso seco ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$\mu\text{g}$ colagena mg peso húmedo ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	
96.25	44.9	4.58	44.3	54.7	9.43	
88.10	42.9	4.38	33.81	42.3	7.37	
91.41	50.7	5.16	36.45	56.9	9.85	
62.6	42.0	4.29	25.06	40.4	6.96	
90.04	61.6	6.30	36.62	67.8	12.02	
			27.04	54.0	9.32	
$\bar{x}$ =	85.68	48.42	4.94	33.89	52.68	9.15
s.d.=	$\pm 13.25$	$\pm 8.10$	$\pm 0.83$	$\pm 7.03$	$\pm 10.10$	$\pm 1.80$



TABLA 3.- % Biosíntesis de colágena en relación a proteínas no colágenicas.

ETAPA DE DEPOSITO 7 DIAS		ETAPA DE REABSORCION 14 DIAS	
con suero	sin suero	con suero	sin suero
	3.75	4.38	
6.3		4.34	3.06
	3.14	3.46	
7.78	4.09	3.56	2.86
6.51	4.57	3.75	
5.52	4.84	3.26	2.6
$\bar{x} \pm s.d.$ 6.53 $\pm$ .94	4.08 $\pm$ .67	3.79 $\pm$ .46	2.83 $\pm$ .23

obtenemos un promedio de  $6.53 \pm 0.94\%$  de biosíntesis de colágena con respecto a proteínas no-colagénicas en la etapa de depósito (n=4) y  $3.79 \pm 0.46\%$  en la etapa de reabsorción (n=6), la diferencia entre estos dos datos es significativa ( $P < 0.005$ ).

Cuando la incubación se realiza en ausencia de suero obtenemos un promedio de  $4.08 \pm 0.67\%$  en la etapa de depósito (n=5) y  $2.84 \pm 0.23\%$  en la etapa de reabsorción (n=3), la diferencia entre estos dos datos es significativa ( $P < 0.05$ ).

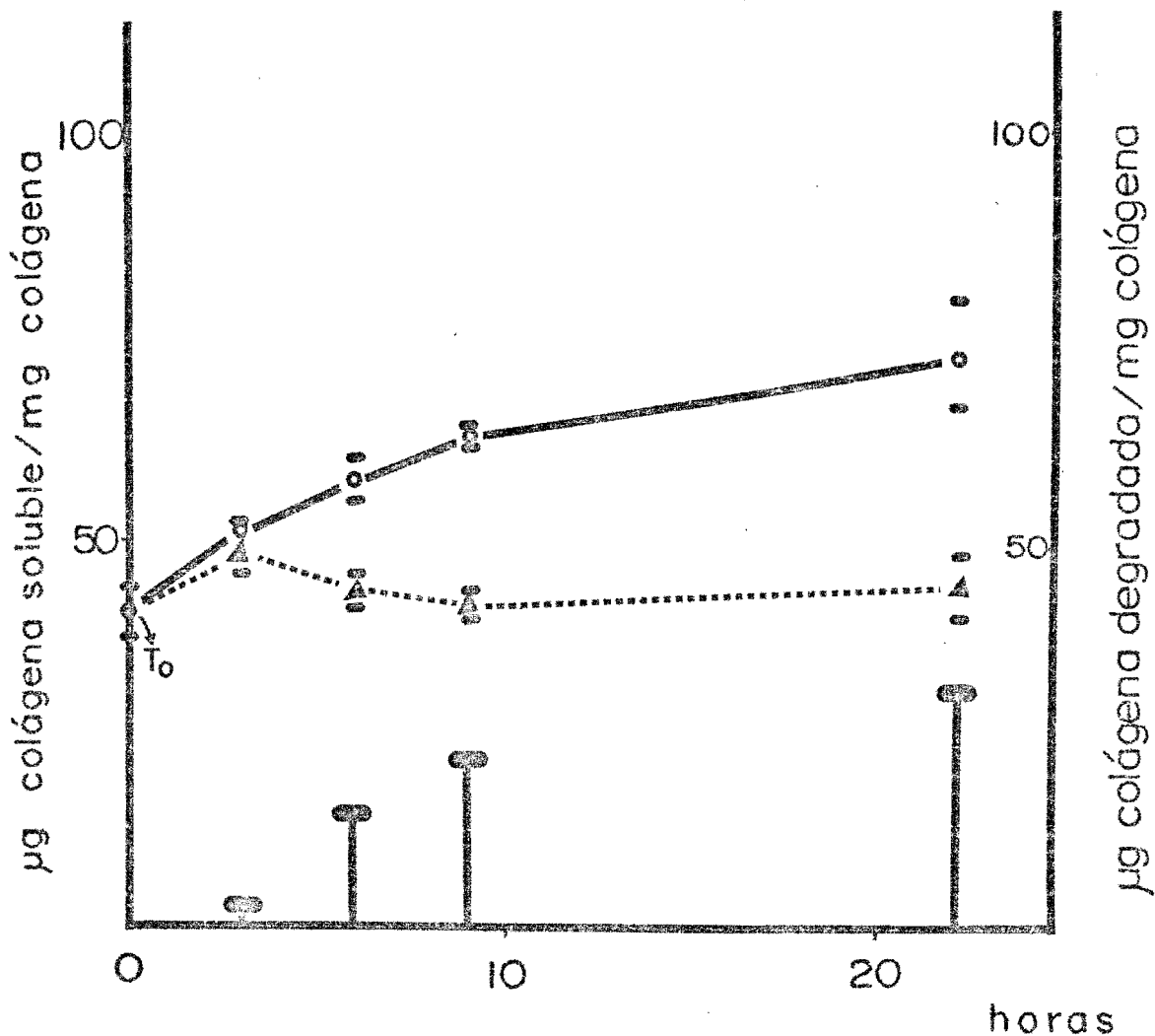
Por otro lado, en cada etapa, el valor que se obtiene en las determinaciones hechas sin suero es menor que el que se obtiene en las determinaciones en presencia de suero. En ambos casos las diferencias son estadísticamente significativas.

#### (D) ACTIVIDAD COLAGENOLITICA .

En la gráfica # 1 se observa el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad colagenolítica. Los resultados se ven expresados en términos de  $\mu\text{g}$  de colágena soluble por  $\text{mg}$  de colágena en cada muestra. Es de hacer notar que las muestras experimentales presentan un aumento de colágena soluble conforme va pasando el tiempo, en tanto que sus controles con EDTA se mantienen siempre en el mismo nivel. Otro dato que se observa en la gráfica es que en el tiempo inicial, inmediatamente después de homogeneizar el tejido ya encontramos colágena soluble en el granuloma. Esta colágena soluble es índice

GRAFICA # 1

EFFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE  
LA ACTIVIDAD COLAGENOLITICA .



- — Granuloma en etapa de depósito, homogeneizado en Tris HCl 0.05 M; NaCl 0.15 M; CaCl<sub>2</sub> 0.01M; pH 7.6. Promedio de 2 muestras + desviación estandar.
- △ ..... El mismo tejido homogeneizado en las mismas condiciones, pero adicionando EDTA 0.04 M. Promedio de 2 muestras + desviación estandar.
- ⊥ Actividad colagenolítica, en cada caso se resta el control que contiene EDTA.

de que en el granuloma hay colagenolisis, pero también hay solubilización de colágena recientemente sintetizada que aún no ha alcanzado a formar fibras. Al restar el contenido de colágena soluble en el control con EDTA se están considerando estos fenómenos en la expresión de la actividad colagenolítica de cada muestra. También se observa que a tiempos cortos de incubación la actividad colagenolítica es muy baja, encontrándose niveles máximos de actividad a las 22 horas. La incubación no se continuó a tiempos más prolongados porque el tejido ya no se conservaba en buen estado; por este motivo, en los siguientes experimentos se utilizó un tiempo de incubación de 22 horas para determinar la actividad colagenolítica.

(D.1) Efecto de la Concentración de Calcio en la Actividad Colagenolítica.

La actividad colagenolítica en los tejidos homogeneizados cuando se incuban con concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  0.01M se determinó en cada granuloma proveniente de las dos etapas de desarrollo y los resultados aparecen en la tabla # 4. Los datos indican que la actividad colagenolítica es mayor en la etapa de reabsorción que en la de depósito. Ya que en la reabsorción se obtiene un promedio de actividad colagenolítica de  $54.6 \pm 12.5$   $\mu\text{g}$  de colágena degradada/ $\mu\text{g}$  de colágena incubada (n=9), en tanto que en el depósito la actividad es de  $32.14 \pm 6.5$  (n=9). Los datos tienen una diferencia esta-

TABLA 4.- Actividad colagenolítica:  $\mu\text{g}$  colágena degradada por mg de colágena incubada en 22 h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

$\text{CaCl}_2$  10 m M

ETAPA DE DEPOSITO 7 DIAS	ETAPA DE REABSORCION 14 días
42.32	80.1
40.0	57.3
36.3	50.3
32.2	59.5
32.2	53.2
31.0	38.4
23.3	45.8
28.0	43.0
24.0	64.0
$\bar{x} \pm \text{s.d.}$ 32.14 $\pm$ 6.5	$\bar{x} \pm \text{s.d.}$ 54.6 $\pm$ 12.5

dísticamente significativa ( $P < 0.005$ ).

En la tabla # 5 se encuentra representada la actividad colagenolítica de los tejidos homogeneizados en presencia de  $\text{CaCl}_2$  0.03M. En dicha tabla se observa que en la etapa de depósito encontramos un promedio de  $148.6 \pm 17.7$   $\mu\text{g}$  de colágena degradada en 22 h a  $37^\circ\text{C}$ /mg de colágena incubada ( $n=4$ ), en tanto que en presencia de  $\text{CaCl}_2$  0.01M obteníamos una actividad de 32.1 (compárese con la tabla # 4). En estas condiciones el valor encontrado es 4.6 veces mayor que cuando el ensayo se lleva a cabo con  $\text{CaCl}_2$  0.01M. En el caso de la reabsorción, tenemos un promedio de  $275.03 \pm 67.9$   $\mu\text{g}$  de colágena degradada en 22 h a  $37^\circ\text{C}$ /mg de colágena incubada ( $n=5$ ), mientras que con  $\text{CaCl}_2$  0.01M teníamos un promedio de  $54.6 \pm 12.5$  (ver tabla # 4) que significa que en  $\text{CaCl}_2$  0.03M el incremento en la actividad colagenolítica es de 5 veces.

La prueba de "t de student" aplicada a los promedios de actividad colagenolítica en estas condiciones de incubación indica que hay diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre los valores encontrados para la actividad colagenolítica de cada una de las dos etapas del granuloma.

Resumiendo, la actividad colagenolítica en los tejidos homogeneizados de granulomas en etapa de depósito y reabsorción en presencia de  $\text{CaCl}_2$  0.03M demuestra un claro aumento con respecto a la actividad colagenolítica encontrada con  $\text{CaCl}_2$  0.01 M, en ambas etapas del granuloma. Una vez más encontramos que la actividad colagenolítica es más elevada en la etapa de reabsorción. Sin embargo, la relación entre las actividades encontradas en las dos etapas se conserva:  $32.14/54.6 =$

TABLA 5.- Actividad colagenolítica.  $\mu\text{g}$  de  
colágena degradada por mg de colágena  
incubada en 22 h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

$\text{CaCl}_2$  30 m M

ETAPA DE DEPOSITO 7 DIAS	ETAPA DE REABSORCION 14 DIAS
159.98	308.1
138.49	251.86
129.25	238.67
167.0	201.33
	375.40
$\bar{X} \pm \text{s.d. } 148.68 \pm 17.7$	$\bar{X} \pm \text{s.d. } 275.08 \pm 67.9$

0.58 y  $148.68/275.08 = 0.53$ , lo que significa que el aumento es proporcional en ambos casos.

(D.2) Efecto de los Activadores de la Colagenasa Latente.

El objeto de probar distintos activadores de la colagenasa sobre los tejidos homogeneizados del granuloma de carragenina en sus dos fases fue el de investigar si existía enzima en estado latente en los tejidos. Se utilizaron dos activadores de la colagenasa inactiva: el 4-APMA y la tripsina.

En los ensayos llevados a cabo con 4-APMA 0.001M en presencia de  $\text{CaCl}_2$  0.01 M no se observó efecto de activación ni en la etapa de depósito ni en la etapa de reabsorción (los datos no se muestran).

La tripsina se ha descrito también como activador de la colagenasa, los efectos encontrados en el tratamiento con esta proteasa sobre los tejidos homogeneizados se resumen en la tabla # 6. En el caso de la etapa de depósito, cuando la activación se lleva a cabo en presencia de  $\text{CaCl}_2$  0.01M se obtiene la máxima activación con 100  $\mu\text{g}$  de tripsina/ml. La actividad resultante es 2.4 veces mayor a la obtenida cuando la incubación se lleva a cabo en ausencia de tripsina. La utilización de concentraciones mayores de tripsina disminuyen la actividad enzimática del tejido (el dato no se muestra). También se observa activación de la colagenasa al tratar el tejido con tripsina en presencia de  $\text{CaCl}_2$  0.03 M, en este caso el aumento de actividad es 1.9 veces mayor al obtenido en ausencia



TABLA 6.- Efecto de Tripsina sobre la actividad colagenolítica.  $\mu\text{g}$  de colágena degradada por mg de colágena incubada 22h a 37°C.

	CaCl <sub>2</sub> 10 m M		CaCl <sub>2</sub> 30 m M	
	Control	Tripsina	Control	Tripsina
Depósito				
7 días.	34.3 $\pm$ 2.82 (n=2)	83.88 $\pm$ 13.54 (n=2)	148.68 $\pm$ 17.7 (n=4)	286.1 $\pm$ 69.9 (n=4)
Reabsorción				
14 días	59.5 $\pm$ 9.2 (n=3)	77.7 $\pm$ 17.39 (n=2)	275.08 $\pm$ 67.9 (n=5)	159.2 $\pm$ 7.2 (n=4)

## NOTAS .

- Se reportan promedios y desviación estandar en cada caso.
- La concentración de tripsina utilizada fue de 30 a 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Se reporta en cada caso la máxima activación, ver más detalles en el texto.

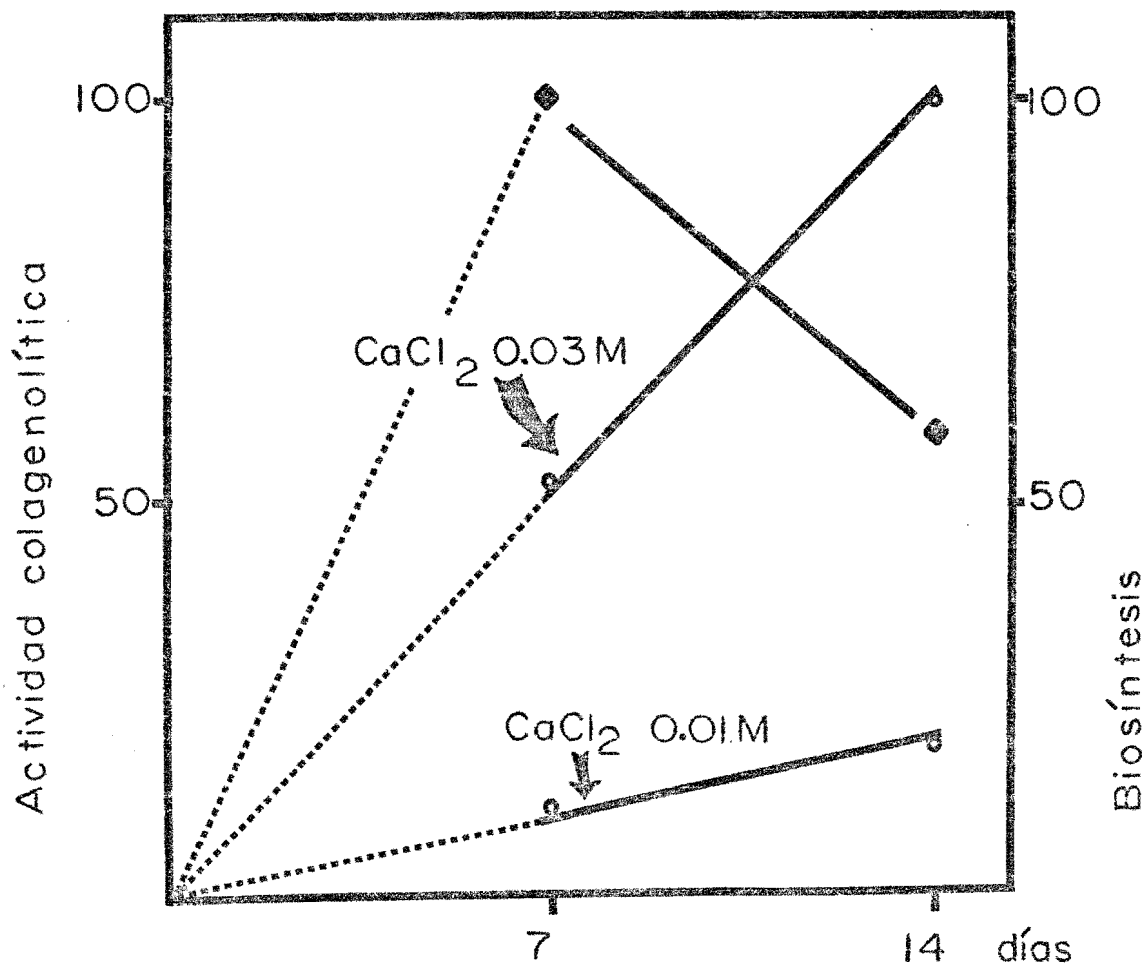
de tripsina (ver tabla 6). En ambos casos las diferencias son estadísticamente significativas ( $P < 0.005$ ).

En el caso de la etapa de reabsorción concentraciones de 30, 50 y 100  $\mu\text{g}$  de tripsina/ml no tienen ningún efecto sobre la enzima (no se muestran los datos), en el caso de la activación llevada a cabo en presencia de  $\text{CaCl}_2$  0.01 M se observa un ligero aumento de actividad colagenolítica si se utilizan 150  $\mu\text{g}$  de tripsina/ml (ver tabla # 6), pero dadas las diferencias, el aumento no parece ser significativo. Como se puede observar, la incubación con tripsina en presencia de  $\text{CaCl}_2$  0.03 M no sólo no activa a la colagenasa, sino que la actividad colagenolítica se ve disminuída lo que indicaría que la enzima en esta etapa se encuentra ya activa y la tripsina la destruye durante el tratamiento de activación.

Las gráficas 2 y 3 resumen los resultados encontrados en las determinaciones de biosíntesis y degradación de colágena en el granuloma de carragenina. La gráfica # 2 representa los datos que aparecen en las tablas 3, 4, y 5, pero tomando a los valores máximos encontrados como el cien por ciento. La gráfica 3 representa los datos de la tabla # 6, muestra como la actividad colagenolítica total en el granuloma es semejante en las dos etapas del granuloma; pero en la etapa de depósito parte de la colagenasa se encuentra en estado latente.

GRAFICA # 2.

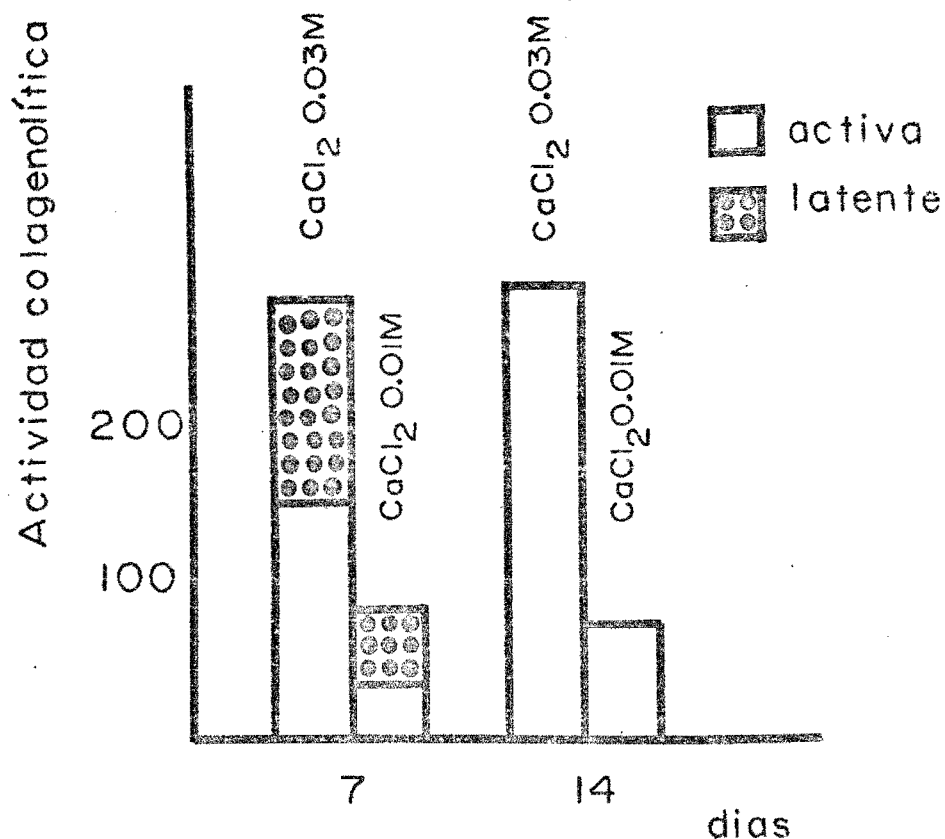
BIOSINTESIS Y DEGRADACION DE COLAGENA EN EL  
DESARROLLO DEL GRANULOMA DE CARRAGENINA .



- % de actividad colagenolítica. Los datos aparecen expresados tomando la máxima actividad colagenolítica como el 100% de actividad.
- % de biosíntesis de colágena. Los datos se expresan tomando el resultado de la etapa de depósito (con suero) como el 100% .

GRAFICA # 3

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA EN EL GRANULOMA DE CARRAGENINA .



Actividad colagenolítica expresada en µg de colágena degradada en 22h a 37°C/mg de colágena incubada. Tejido homogeneizado de granuloma de carragenina en etapas de depósito y reabsorción, en presencia de - CaCl<sub>2</sub> 0.01M y 0.03M.

## DISCUSION

Un granuloma es una alteración en una zona localizada y que consiste en la inflamación de un tejido, que se genera en respuesta a irritantes persistentes. Prácticamente todas las reacciones inflamatorias granulomatosas van acompañadas de cierto grado de daño tisular y fibrosis recuperativa (58). Se ha visto que durante la respuesta inflamatoria, la piel y probablemente otros tejidos sufren cambios en el patrón de síntesis de colágena. En el cobayo, la formación de una cicatriz va acompañada de un aumento en la síntesis de colágena que puede durar seis meses o más (8). La cicatrización involucra una elevada síntesis de colágena tipo III. Asimismo, la colágena tipo III ha sido encontrada en altas concentraciones en el tejido granulomatoso formado en respuesta a la implantación de esponja o a la inyección de aguarrás en la rata y el cobayo (8). La mayoría de los biomateriales causan inflamación en el tejido del hospedero dando lugar a síntesis y depósito de colágena alrededor del material implantado (2). La carragenina inyectada en la región subcutánea del cobayo produce también estos efectos.

El desarrollo del granuloma de carragenina es un proceso dramático. A los siete días después de haberse aplicado el estímulo el granuloma alcanza un poco húmedo de alc-

dedor de 17 gramos. Si tomamos en cuenta que el cobayo pesa 500 gramos, el tejido granulomatoso formado en siete días representa el 4% del peso del animal. Gran parte de este peso se debe al contenido de agua del tejido (89.8% de humedad) ya que el peso seco del granuloma es de alrededor de 1.8 gramos (ver tabla 1). A los catorce días se ha perdido ya el 78% del peso húmedo alcanzado; el hecho de que el peso seco se pierda proporcionalmente y que la relación colágena-peso seco se conserve durante todo el proceso (ver tabla 2) sugiere que la reabsorción del granuloma involucra probablemente a todos los elementos del granuloma.

Por otro lado el análisis comparativo de la potencialidad de biosíntesis de colágena en los tejido provenientes de cada una de las etapas, indica que en la etapa de depósito el tejido es capaz de biosintetizar mayor porcentaje de colágena con respecto a proteínas no-colagénicas que el tejido proveniente de la etapa de reabsorción. En la tabla # 3 se demostró que tanto en presencia como en ausencia de suero, la biosíntesis de colágena es más elevada en la etapa de depósito con respecto a lo encontrado en la etapa de reabsorción. En este punto es importante hacer mención que la expresión de biosíntesis de colágena en términos relativos tiene sus limitaciones para la expresión de los datos ya que durante el ensayo se están determinando varias reacciones a la vez:

1) Por un lado la velocidad de transporte de aminoácidos, que puede ser variable dependiendo del estado fisiológico de la población celular. Por ejemplo, la velocidad de transporte de prolina es mayor en células que se están dividiendo

que el de las que se encuentran en fase estacionaria (53). Por lo tanto la cantidad de prolina incorporada podría variar de tejido a tejido con lo cual se debe de tener cuidado en el momento de establecer comparaciones. Sin embargo, éste es el inconveniente de todos los métodos que utilizan como marcadores aminoácidos radiactivos para determinar biosíntesis de proteínas, y aunque pudiera expresar los datos en términos absolutos, tendría que contemplar este factor limitante.

2) También se está midiendo la hidroxilación de la prolina incorporada. En la expresión de los datos se está asumiendo que el 50% de la prolina incorporada está siendo hidroxilada, pero si se hidroxilara menor porcentaje de prolina, entonces se estaría subestimando la biosíntesis de colágena. Este inconveniente se puede controlar, como de hecho se hizo, adicionando al medio de cultivo suficientes cantidades de ácido ascórbico,  $\alpha$  cetoglutarato y sulfato ferroso, que son los cofactores necesarios para que se lleve a cabo la hidroxilación de la prolina.

3) La otra reacción que se está midiendo es la biosíntesis de proteínas no-colagénicas; el inconveniente es que al utilizar prolina radiactiva como marcador, el método asume que se está incorporando una cantidad promedio de este iminoácido en proteínas no-colagénicas; pero no se puede descartar que podría haber variaciones de incorporación. Por este motivo la comparación entre distintos tejidos en términos de biosíntesis de colágena con respecto a proteínas no-colagénicas deberá hacerse con cautela.

Una mejor alternativa para establecer la compa-

ración entre la biosíntesis de colágena que los tejidos de ambas etapas son capaces de llevar a cabo, sería expresar los datos en términos absolutos. Desgraciadamente, el método para lograrlo requiere de colagenasa bacteriana con un elevado grado de pureza; lo que resulta demasiado caro para nuestras posibilidades. Pero como un primer enfoque al problema, queda sentada la base de que en términos relativos la biosíntesis de colágena disminuye en la etapa de reabsorción del granuloma. Más adelante el problema se podría abordar cuantificando los niveles de RNAm de colágena en los tejidos provenientes de las dos etapas del granuloma y esta alternativa quizás presente menos inconvenientes para la comparación de los datos.

La diferencia encontrada entre el potencial biosintético de los tejidos en presencia y ausencia de suero se puede explicar proponiendo la existencia de actividad degradativa de la colágena que está siendo sintetizada y que actúa a nivel extracelular, ya que la degradación intracelular no es inhibida por factores del suero (59,60). En los ensayos llevados a cabo en presencia de suero, los inhibidores de proteasas que contiene el suero (61) evitan la degradación de la colágena recién secretada y por esto obtenemos mayor cantidad de colágena sintetizada en las dos etapas del granuloma con respecto a los ensayos llevados a cabo en ausencia de suero.

No se descarta el hecho de que el suero contiene varios factores reguladores del crecimiento y metabolismo de los fibroblastos (54). Se ha visto que el suero de pacientes con ciertas enfermedades fibróticas estimula a los fibroblastos a sintetizar colágena y ácido hialurónico (2), con lo



cual podríamos explicar las diferencias entre los resultados obtenidos con y sin suero, en términos de estimulación de la biosíntesis de colágena por factores presentes en el suero ya que además se ha reportado un aumento en la actividad de la prolil hidroxilasa en presencia de albúmina sérica (62). Analizando pues los datos bajo este contexto podríamos estar observando una mezcla de efectos que dan como resultado una mayor biosíntesis de colágena cuando el ensayo se hace en presencia de suero: por un lado estimulación de la biosíntesis de colágena y por el otro colágena recientemente sintetizada que no se degrada.

Con los resultados obtenidos cabría entonces preguntarse ¿cuáles son los moduladores que determinan el aumento de biosíntesis de colágena en la etapa de depósito del granuloma "in vivo" ?

Se piensa que las linfocinas participan en la generación y mantenimiento de la hipersensibilidad en la inflamación de tipo granulomatosa (58,63). Estos mediadores provenientes de linfocitos se han reportado como activadores de la síntesis de colágena por fibroblastos en distintos sistemas de células en cultivo (2) y se han encontrado en el sistema circulatorio de ratones con granulomas pulmonares (58). La movilización de macrófagos hacia las lesiones inflamatorias parece estar mediada por el suero o por factores químicos derivados de los tejidos como las prostaglandinas y los componentes del complemento y del sistema de coagulación. Asimismo, "in vitro" se ha demostrado quimiotaxis en fibroblastos inducida por componentes del complemento y los productos de degradación

de la colágena que podrían explicar el reclutamiento de los fibroblastos hacia la zona inflamada. Lo anterior sugiere que la respuesta inmune mediada por células podría ser la responsable de aumentar la síntesis de colágena en el granuloma inflamatorio durante la etapa de depósito (2,58).

En la etapa de reabsorción del granuloma, la síntesis de colágena ha disminuido significativamente, el tejido presenta ya niveles semejantes a los que encontramos en tejidos normales; la piel de cobayo en ausencia de suero biosintetiza 2.6% de colágena con respecto a proteínas no-colagénicas (Pardo, A. comunicación personal). En tanto que el pulmón biosintetiza 2.08% en condiciones análogas (Montaño, M. comunicación personal), ambos datos son semejantes al que obtuvimos en el tejido proveniente de la etapa de reabsorción del granuloma en ausencia de suero.

He mencionado ya en la introducción de este trabajo que ciertas condiciones patológicas pueden dar origen a alteraciones en los componentes del tejido conectivo. En casos extremos se puede llegar a la pérdida de funcionalidad del órgano. En la inflamación crónica o aguda puede presentarse ya sea degradación de los componentes de la matriz extracelular, o acumulación excesiva que puede conducir a estados avanzados de fibrosis (65).

En el granuloma de carragenina tenemos ambos eventos; una biosíntesis acelerada de colágena como primera respuesta y una posterior degradación que involucra incluso al tejido circundante. Aún no sabemos cuál es el tipo de colágena que produce el granuloma en esta fase temprana; desconocemos

asimismo si habrá cambios de tipos de colágena durante toda la evolución del granuloma como sucede por ejemplo en el proceso de cicatrización. Se ha visto que en procesos inflamatorios hay cambios en los tipos de colágena sintetizada: los condrocitos, en la artritis reumatoide, dejan de sintetizar colágena tipo II para sintetizar tipo I; en la inflamación gingival se han encontrado elevadas concentraciones de colágena tipo V y trímero tipo I (65). Los estudios hechos con la colágena del granuloma de carragenina muestran únicamente una mayor concentración de componentes  $\alpha$  y menor de subunidades  $\beta$  que lo que presenta la colágena de piel al ser analizadas en electroforesis; esta sutil diferencia podría deberse a que la colágena en el granuloma de carragenina al ser recientemente sintetizada no haya aún alcanzado a formar enlaces covalentes (46); pero también podríamos sospechar de distintos tipos de colágena presentes en el granuloma. De hecho, el tema está en investigación actualmente en el laboratorio.

El cuadro histológico del desarrollo y evolución del granuloma de carragenina se conoce actualmente con detalle (43). Al hacer dicha descripción se encontró que: alrededor del séptimo día el granuloma alcanza su mayor desarrollo y después progresivamente su tamaño va disminuyendo; por este motivo los días escogidos para tomar las muestras de granuloma en el presente trabajo fueron el séptimo, como representativo de la etapa de depósito y el catorceavo como representativo de la etapa de reabsorción. En cuanto a los eventos bioquímicos que suceden en el seno del granuloma, aún nos quedan muchas interrogantes.

En cuanto a la degradación de colágena, en este trabajo, se demuestra actividad colagenolítica en ambas etapas del granuloma de carragenina (ver tablas 4 y 5) y en condiciones que aunque "in vitro", reflejan probablemente las condiciones "in vivo" porque el tejido se separa del animal durante veintidós horas en las que se lleva a cabo una incubación con todos los componentes que el sistema presenta "in situ". Los resultados de este trabajo coinciden con los obtenidos con la técnica de inmunofluorescencia (50), en donde se encontraba que en ambas etapas del granuloma existía proteína capaz de unirse al anticuerpo anticolagenasa del granuloma de carragenina.

En el presente trabajo se encontró que la actividad colagenolítica de la etapa de depósito es menor a la que se encuentra en la etapa de reabsorción; si tomamos en cuenta que la biosíntesis de colágena es mayor en la etapa de depósito, la resultante es una acumulación de colágena en esta fase. En apariencia las diferencias podrían resultar pequeñas; pero tomando en cuenta que el contenido de colágena que se presenta en la etapa de reabsorción junto con un aumento en la capacidad degradativa, tendremos como resultante una elevación en la velocidad degradativa del tejido y por ende desaparición del mismo.

En este sentido el granuloma de carragenina es muy distinto al útero posparto; en el que la colagenasa es detectable únicamente en la fase de degradación, no habiéndose encontrado antes del parto (36). En el granuloma, en contraste, la colagenasa se encuentra también en la etapa en que la

colágena está siendo acumulada. Podríamos sugerir cierta similitud con algunas características del tejido reumatoide, en el que a raíz de la formación de un complejo antígeno-anticuerpo en los espacios sinoviales, la activación del complemento y la liberación de factores difundibles forman un gradiente de quimioatrayentes que conduce a la invasión de leucocitos polimorfonucleares; éstos engullen a las partículas antígeno-anticuerpo, liberando grandes cantidades de enzimas lisosomales hacia el líquido sinovial y tejido circundante que ocasionan la destrucción del tejido (16). En el granuloma de carragenina se ha demostrado la presencia de leucocitos polimorfonucleares en la etapa temprana del desarrollo (43); éstos aparecen con granulaciones electrondensas en su interior, al igual que los macrófagos que los acompañan. El hecho de que la carragenina desaparezca del espacio extracelular hacia el día décimo del desarrollo y la aparición de las granulaciones electrondensas podría indicar que el polisacárido es removido por estos dos tipos de células (64) lo que pudiera ocasionar la liberación de enzimas lisosomales de manera análoga a lo que sucede en el tejido reumatoide. Es sabido que los leucocitos polimorfonucleares secretan colagenasa, con lo cual al menos parte de la colagenasa que encontramos en la etapa de depósito del granuloma podría provenir de este tipo celular; aunque no habrán de ignorarse las potencialidades para producir colagenasa de las demás células que coexisten al mismo tiempo en el granuloma, ya que se ha visto que los macrófagos estimulados "in vitro" con carragenina son capaces de producir colagenasa (López Escalera, R comunicación personal). Tampoco se ignorará que cier

tos mecanismos de interacción celular estimulan a ciertas células a producir colagenasa, como es el caso entre macrófagos y fibroblastos (36,66) ambas células presentes en el granuloma de carragenina.

Con el objeto de investigar si la colagenasa se encontraba latente en alguna de las etapas del granuloma de carragenina, los ensayos de determinación de actividad colagenolítica se llevaron a cabo también en presencia de activadores de dicha enzima. Uno de los tratamientos que se uso fue incubar el tejido con 4-APMA. Este agente organomercúrico interactúa con grupos sulfhidrilo; y se había utilizado como activador de la colagenasa (49), demostrándose que la colagenasa soluble extraída de la etapa de depósito del granuloma se encontraba latente. En el presente trabajo no se encontró activación al tratar con 4-APMA los tejidos homogeneizados de ninguna de las dos etapas. No se probaron distintas concentraciones para determinar la activación de la enzima en el ensayo; pero alternativamente se utilizó la tripsina.

La tripsina se ha descrito también como activador de la colagenasa. No se sabe con exactitud el mecanismo por medio del cual activa, pero existen varias posibilidades entre las que podríamos considerar: la hidrólisis de un inhibidor asociado a la colagenasa (25,29), o que la enzima en estado de zimógeno al sufrir hidrólisis en algún sitio se active (37,38); o bien, que la tripsina active a un proactivador del zimógeno y el primero active a su vez a la colagenasa (36,39). Los efectos del tratamiento con tripsina se resumen en la tabla 6 y en la gráfica 3. En este estudio únicamente encontra-

mos activación en el caso de la etapa de depósito. Nótese que más de la mitad de la enzima presente en este tejido se encontraba latente, cosa que no sucede en la etapa de reabsorción, en donde la enzima se encuentra totalmente activa; los mismos resultados se obtienen cuando la incubación se hace en presencia de  $\text{CaCl}_2$  0.03 M. Lo que es más, en la etapa de reabsorción encontramos que los tratamientos con tripsina no sólo no activan a la enzima sino que aparentemente la destruyen ya que a menudo se encontró disminución en la actividad colagenolítica al tratar el tejido de esta etapa con tripsina.

En cuanto a los efectos del calcio al aumentar las concentraciones en el sistema, tenemos que al utilizar  $\text{CaCl}_2$  0.03 M encontramos un claro aumento en la actividad colagenolítica en las dos etapas de evolución del granuloma (ver tablas 5 y 6 y gráfica 2). El efecto "activador" del calcio en la etapa de depósito parece ser distinto al que observamos con tripsina ya que la incubación en presencia de  $\text{CaCl}_2$  0.03 M y tripsina aumenta aún más la actividad colagenolítica que cuando se utiliza sólo uno o la otra. Además, en la etapa de reabsorción el  $\text{CaCl}_2$  0.03M estimula la actividad, cosa que no sucede en presencia de tripsina. Esto sugiere que esta última tiene efectos a nivel de activación de la colagenasa la latente y el tipo de interacción con el calcio es de otra índole. En presencia de  $\text{CaCl}_2$  0.03 M se sigue observando que en la etapa de depósito la actividad colagenolítica es menor que en la reabsorción; como se encontró en presencia de  $\text{CaCl}_2$  0.01 M. La dramática elevación de actividad colagenolítica puede tener varias explicaciones: 1) que la concentración de calcio esencial para la actividad de la colagenasa (21) se convierta en un factor limi-

tante, el aumento de calcio en el sistema eliminaría por lo tanto esta limitante. Es importante mencionar que todos los métodos tradicionales para la determinación de actividad colagenolítica utilizan concentraciones de calcio de 0.005, 0.01 y 0.013 M (55,27,28,29,30,67,68).

2) Otra posibilidad es que el calcio desempeñe un papel estabilizador de la colagenasa. Ha sido demostrado que la colágenasa de piel humana muestra un aumento de actividad al incrementar la concentración de calcio en el ensayo (21); la máxima activación se logra a concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  0.04M y la utilización de concentraciones mayores ya inhiben a la enzima. Estos resultados concuerdan con los aquí obtenidos ya que cuando probamos concentraciones de 0.05 M  $\text{CaCl}_2$  observamos una disminución en la actividad colagenolítica en ambas etapas del granuloma (los datos no se muestran). El papel asignado para el calcio, según estos autores, es conferir estabilidad a la colagenasa de piel humana. Es importante mencionar que en todos sus experimentos demostraron la estabilidad de su sustrato, ya que hay evidencias de que el calcio a concentraciones elevadas, puede desestabilizar a la colágena.

Por otro lado, en el espacio extracelular la concentración de calcio es de alrededor de 0.01 M (7) y rara vez varía por lo tanto es difícil imaginar que éste juegue algún papel fisiológico en la modulación de la enzima.

3) La otra alternativa para explicar la elevación de la actividad, es que, como lo ha sugerido Gallop (69), el calcio juegue el papel de facilitar la unión enzima-sustrato.

El hecho de que ciertas concentraciones de cal-



cio aumenten la actividad de la colagenasa y mayores concentraciones la inhiban podría explicarse de la siguiente manera: Weeks et al (70) diseñaron un método de extracción de la colagenasa en el que agregando un exceso de calcio liberan a la enzima de su sustrato, la utilización de NaCl para obtener la misma fuerza iónica no les da el mismo resultado; por lo tanto podríamos sugerir que ciertas concentraciones de calcio estabilizan a la enzima y/o ayudan al establecimiento de la unión enzima-sustrato pero concentraciones más elevadas inhiben su unión y desestabilizan a la enzima.

Resumiendo podríamos describir al granuloma de carragenina de la manera siguiente: después del estímulo tenemos una etapa que se caracteriza por una reacción inflamatoria en la que la población celular en el tejido está compuesta principalmente por macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y algunos fibroblastos, en este trabajo se demostró que hay una elevada biosíntesis de colágena y que más de la mitad de la colagenasa que contiene el tejido se encuentra en estado latente; la suma de los dos fenómenos da como resultado una acumulación de colágena en esta etapa. Estos resultados dan una visión general del comportamiento del sistema y sientan las bases para dilucidar en un futuro algunos de los aspectos de la regulación del metabolismo de la colágena que aún no han sido investigados. Por ejemplo, desconocemos el mecanismo modulador que mantiene a la colagenasa inactiva en la etapa de depósito; por un lado podría deberse a la existencia de inhibidores endógenos en el tejido, por el otro a la falta de activadores de la colagenasa latente. El mecanismo endógeno de activación de la enzima tam-

bién se desconoce; pero parecería probable que este mecanismo fuera el que diera origen al proceso de reabsorción del tejido en la siguiente etapa del granuloma. Sería interesante investigar ahora la parte intermedia del desarrollo del granuloma en busca de estos moduladores de la degradación de la colágena.

Por otra parte en la etapa de reabsorción existe una población celular formada casi exclusivamente por fibroblastos y algunos macrófagos. La biosíntesis de colágena se ha disminuido llegando a los niveles que presentan otros tejidos como la piel y el pulmón, además la colagenasa se encuentra ya totalmente activa lo que da como resultado una mayor degradación: ambos fenómenos se expresan en la reabsorción del granuloma.

Es interesante ver que en este modelo experimental los fenómenos de síntesis y degradación de colágena conviven en un mismo tiempo, pero a tasas distintas, lo que sugiere que se encuentran muy finamente regulados y aún queda por saber cuáles son sus mecanismos de regulación: ¿ Por qué se inicia la síntesis de colágena en la etapa de depósito ? y ¿ Qué determina la degradación posterior de colágena que ocurre durante la etapa de reabsorción ?

## CONCLUSIONES

1) En este trabajo se encontró que en la etapa de depósito del granuloma de carragenina el % de biosíntesis de colágena con respecto a proteínas no-colagénicas se encuentra elevado con respecto a la etapa de reabsorción.

2) Se hizo una demostración directa de la existencia de colagenasa en las dos etapas del granuloma de carragenina. Durante la demostración se observó que la actividad colagenolítica es mayor en la etapa de reabsorción.

3) El estudio reveló que durante la etapa de depósito aproximadamente el 50% de la colagenasa se encuentra en estado latente, en tanto que en la etapa de reabsorción se encuentra totalmente activa.

4) En las condiciones utilizadas para la determinación de la actividad colagenolítica, se encontró que al variar las concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  de 0.01 a 0.03 M la actividad colagenolítica en las dos etapas del granuloma se eleva 4 a 5 veces, se piensa que el calcio estabiliza a la colagenasa y probablemente ayude al establecimiento del complejo enzima-sustrato.

## REFERENCIAS

- 1) Pérez-Tamayo, R. (1978) Pathology of collagen degradation. *Am. J. Path.* 92:509-566.
- 2) Nimni, M.E. (1983) Collagen: structure, function and metabolism in normal and fibrotic tissues. *Sem. in Arth. and Rheum.* 13:1-86.
- 3) Gay, S., Miller, F.J. (1978) Collagen in the Physiology of Connective Tissue. pp.1-106. Gustav Fisher Verlag. Stuttgart. N.Y.
- 4) Trelstad, R. (1961) Le collagène. *La Recherche.* 10:312-321.
- 5) Jackson, D.S. (1980) The substrate collagen. En: Collagenases in Normal and Pathological Connective Tissues. (Woolley, D.E., Evanson, J.M. eds.) pp.1-10. John Wiley & Sons. LTD.
- 6) Rojkind, M., Gatmaitan, Z., Mackensen, S., Giambrone, M.A., Ponce, P., Reid, L.M. (1980) Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long term cultures of normal hepatocytes. *J. Cell Biol.* 87:255-263.
- 7) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1983) Molecular Biology of the Cell pp.692-701. Garland Publishing, Inc. N.Y. London.
- 8) Bornstein, P., Sage, H. (1980) Structurally distinct collagen Types. *Ann. Rev. Biochem.* 49:957-1003.
- 9) von der Mark, K., Sasse, J., von der Mark, H., Kuhl, U. (1982) Changes in the distribution of collagen types during es-

- bryonic development. *Conn. Tiss. Res.* 10:37-42.
- 10) Kang, A.H., Gross, J. (1970) Amino acid sequence of cyanogen bromide peptides from the amino-terminal region of chick skin collagen. *Biochem.* 9:796-804.
  - 11) Kivirikko, K.L., Myllyä, R. (1980) The hydroxylation of prolyl and lysyl residues. En: The Enzymology of Posttranslational Modification of Proteins (Friedman, R.B., Hawkins, H.C. eds.) pp.53. Academic Press, N.Y.
  - 12) Pesciotta, D.M., Olsen, B.R. (1982). The cell biology of collagen secretion. En: Immunochemistry of the Extracellular Matrix (Furthmayr, H. ed) Vol. II pp.1-18. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
  - 13) Adams, E., Frank, K.L. (1980) Metabolism of proline and the hydroxyprolines. *Ann. Rev. Biochem.* 49:1005-1061.
  - 14) Harkness, M.L., Harkness, R.D. (1954) The collagen content of the reproductive tract of the rat during pregnancy and lactation. *J. Physiol.* 123:492.
  - 15) Gross, J., Lapiere, C. (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissues. A tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 48:1014.
  - 16) Brinckerhoff, C.E. (1982) Collagenase and Rheumatoid Arthritis: Regulation of collagenase synthesis by synovial cells. En: Collagen Degradation and Mammalian Collagenase (Tschia, M., Pérez-Tamayo, R., Okasaki, I., Maruyama, K. eds.) pp. 201-222. International Congress Series 601. Excerpta Medica, Amsterdam.
  - 17) Gross, J., Highberger, J.H., Johnson-Wint, B., Biswas, C. (1980) Mode action and regulation of tissue collagenase. En: Collagenase in Normal and Pathological Connective Tissues

(Wooley, E., Evanson, J.M. eds.) pp.11-35. John Wiley & Sons LTD.

- 18) Krane, S. (1982) Collagen degradation. *Conn. Tiss. Res.* 10: 51-59.
- 19) Harris, E.D., Krane, S.M. (1974) Collagenases. *New. Engl. J. Med.* 291:557-661.
- 20) Seltzer, J.L., Jeffrey, J.J., Eisen, A.Z. (1977) Evidence for Mammalian collagenases as zinc ion metalloenzymes. *Biochem. Biophys. Acta* 485:179-187.
- 21) Seltzer, J.L., Welgus, H.G., Jeffrey, J.J., Eisen, A.Z. (1976) The function of  $Ca^{2+}$  in the action of mammalian collagenases. *Arch. Biochem. Biophys.* 173:355-361.
- 22) Laskowski, M., Kato, I. (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 49:593-626.
- 23) Pardo, A., Pérez-Tamayo, R. (1974) The collagenase of carragenin granuloma. *Conn. Tiss. Res.* 2:243-252.
- 24) Bauer, E.A., Stricklin, G.P., Jeffrey, J.J., Eisen, A.Z. (1975) Collagenase production by skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 64:232-240.
- 25) Reynolds, J.J., Sellers, A., Murphy, G., Cartwright, E. (1977) A new factor that may control collagen resorption. *The Lancet*. Aug. 333-335.
- 26) Tyler, J.A., Cawston, E.E. (1980) Properties of pig sinovial collagenase. *Biochem. J.* 189:349-375.
- 27) Stricklin, G.P., Bauer, E.A., Jeffrey, J.J., Eisen, A.Z. (1977) Human skin collagenase: isolation of precursor and active forms from fibroblast and organ cultures. *Biochem.* 16:1607-1615.

- 28) Stricklin, G.P., Eisen, A.Z., Bauer, E.A., Jeffrey, J.J. (1978) Human skin fibroblast collagenase: chemical properties of precursor and active forms. *Biochem.* 17:2331-2337.
- 29) Sellers, A., Cartwright, E., Murphy, G., Reynolds, J.J. (1977) Evidence that latent collagenases are enzyme-inhibitor complexes. *Biochem. J.* 163:303.
- 30) McCartney, H.W., Tscheshe, H. (1980) Latent collagenase from human polymorphonuclear leucocytes and activation to collagenase by removal of an inhibitor. *FEBS Letters.* 119:327-332.
- 31) Kuettner, K.E., Hiti, J., Eisenstein, R., Harper, E. (1976) Collagenase inhibition by cationic proteins derived from cartilage and aorta. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 72:40-46.
- 32) Langer, R., Brein, H., Falterman, K., Klein, M., Folkman, J. (1976) Isolation of a cartilage factor that inhibits tumor neovascularization. *Science.* 193:70-71.
- 33) Horton, J.F., Wezeman, F.H., Kuettner, E.E. (1978) Inhibition of bone resorption in vitro by a cartilage-derived anticollagenase factor. *Science.* 199:1342-1345.
- 34) Murphy, G., Cawston, T.F., Reynolds, J.J. (1981) An inhibitor of collagenase from human amniotic fluid. *Biochem. J.* 195:167-170.
- 35) Stricklin, G.P., Welgus, H.G. (1983) Human skin fibroblast collagenase inhibitor: purification and biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 258:12252-12258.
- 36) Harris, E.D. (1984) Regulation of the mammalian collagenases. *Coll. Rel. Res.* 4:493-512.
- 37) Nagase, H., Jackson, R.C., Brinckerhoff, C.E., Vater, C.A.,

- Harris, D.E. Jr. (1981) A precursor form of latent collagenase produced in a cell-free system with mRNA from rabbit synovial cells. *J. Biol. Chem.* 256:11951-11954.
- 38) Nagase, H., Brinckerhoff, C.E., Sheldon, L., Vater, C.A. Harris, E.D. Jr. (1982) Biosynthesis of rabbit synovial procollagenase. In: Collagen Degradation and Mammalian Collagenase (Tsuchiya, M., Pérez-Tamayo, R., Okasaki, I., Maruyama, K. eds.) pp.20-26. International Congress Series 601 Excerpta Medica, Amsterdam.
- 39) Vater, C.A., Nagase, H., Harris, E.D. Jr. (1983) Purification of an endogenous activator of procollagenase from rabbit synovial fibroblast culture medium. *J. Biol. Chem.* 258: 9734-9382.
- 40) Mizel, S.B., Dayer, J.M., Krane, S.M., Negenhagen, S.E. (1981) Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte-activating factor (interleukin I). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:2474-2477.
- 41) Pérez-Tamayo, R., Monfort, I., Pardo, A. (1980) What controls collagen resorption in vivo? *Med. Hypoth.* 6:711-726.
- 42) Pérez-Tamayo, R. (1970) Collagen resorption in carragenin Granulomas. I. Collagenolytic activity in "in vitro" explants. *Lab. Invest.* 22:137-141.
- 43) Pérez-Tamayo, R. (1970) Collagen resorption in carragenin granulomas. II. Ultrastructure of collagen resorption. *Lab. Invest.* 22:142-159.
- 44) Fukuhara, M. (1972) Modifications of collagen and non-fibrillar proteins and cathepsin activity in the carragenin gr-



- nuloma. Path. Biol. 20:887-893.
- 45) Jackson, D.S., Bentley, J.P. (1957) Connective tissue growth stimulated by carragenin. I. The formation and removal of collagen. Biochem. J. 65:277.
  - 46) Del Arrenal, P., Pérez-Tamayo, R. (1973) The nature of collagen in the carrageenin granuloma. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 142:1031-1035.
  - 47) Rojkind, M., Pérez-Tamayo, R. (1962) Studies in autologous tendon implanted in formalin and carragenin granulomas. Arch. Path. 74:455.
  - 48) Rosenstein, Y. (1975) Demostración de actividad colagenolítica en homogenados de granuloma de carragenina. Tesis Profesional. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
  - 49) Figueras, T. (1982) Actividad latente de colagenasa en el granuloma de carragenina. Tesis Profesional. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
  - 50) Pardo, A., Rosenstein, Y., Monfort, I., Pérez-Tamayo, R. (1983) Immunohistochemical identification of collagenase in carragenin granuloma. J. Histochem. and Cytochem. 31:641-646.
  - 51) Rojkind, M., González, E. (1974) An improved method for determining specific radioactivities of proline-<sup>14</sup>C and hydroxyproline-<sup>14</sup>C in collagen and non-collagenous proteins. Anal. Biochem. 57:1
  - 52) Rojkind, M., Kershenovich, D. (1975) Effect of colchicine on collagen, albumin and transferrin synthesis by cirrotic liver slices. Biochim. Biophys. Acta. 378:415-423.
  - 53) Peterkofsky, B., Chojkier, M., Bateman, J. (1982) Determination of collagen synthesis in tissue and cell culture sys-

- systems. En: Immunochemistry of the extracellular Matrix.  
(Furthmayr, H. ed.) Vol. II. pp.20-27. CSR Press, Boca Ra-  
ton, Florida.
- 54) Phan, S.H., Thrall, R.S. (1982) The role of soluble factors  
in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Am. J. Path. 106:  
156-164.
- 55) Ryan, J., Woessner, F. (1971) Mammalian collagenase: Direct  
demonstration in homogenates of involuting rat uterus. Bio-  
chem. and Biophys. Res. Comm. 44:144-149.
- 56) Sellers, A., Reynolds, J.J. (1977) Identification and par-  
tial characterization of collagenase from rabbit bone.  
Biochem. J. 167:353-360
- 57) Murray, R. Spiegel. (1961) Estadística. Serie de Compendios  
Shaum. pp.192-194. McGraw-Hill. México.
- 58) Boros, D.L., Lande, M.A., Carrick, L.Jr. (1981) The arti-  
ficial granuloma. Clin. Immunopathol. 18:276-286.
- 59) Imberman, M., Oppenheim, F., Franzblau, C. (1982) The appearen-  
ce of free hydroxyproline as the mayor product of degrada-  
tion of newly synthesized collagen in cell culture. Biochem.  
et Biophys. Acta. 719:480-488.
- 60) Palotie, A. (1983) Effect of elevated temperature on the in-  
tracellular degradation of different collagen types. Col.  
Rel. Res. 3:105-113.
- 61) Jaskowsky, M., Kato, I. (1980) Protein inhibitors of prote-  
inases. Ann. Rev. Biochem. 49:593-626.
- 62) Peterkofsky, B., Di Blasio, R. (1975) Modification of the  
tritium-release assays for prolyl and lysyl hydroxylases  
using Dowex-50 columns. Anal. Biochem. :279-288.

- 63) Rocklin, R.E. (1981) Lymphokines: mediators of delayed hypersensitivity. En: The Lymphocyte. Progress in Clinical and Biological Research. (Sell, K.W., Miller, W.V. eds) Vol. 58. pp.7-12. Alan R. Liss, Inc. N.Y.
- 64) Bowers, R.R., Birch, M.L., Thomas, D.W. (1985) A biochemical study of the carrageenan-induced granuloma in the rat lung. Conn. Tiss. Res. 13:191-206.
- 65) Narayan, A.S. (1984) Action of mammalian collagenases on type I trimer collagen. Col. Rel Res. 4:289-296.
- 66) Vaes, G., Peeters, C., Emons, X., Hauser, P., Huybrechts, G., Laub, R. (1981) Cellular interactions in the inflammatory degradation of connective tissue. En: Collagen Degradation and Mammalian Collagenase. (Tschia, H., Pérez-Tamayo, R., Okasaki, I., Maruyama, K. eds.) pp.49-59. International Congress Series 601. Excerpta Medica, Amsterdam.
- 67) Harris, E.D.Jr., Vater, C.A. (1982) Vertebrate collagenases. En: Methods in Enzymology. (Cunningham, L.W., Frederiksen, D.W. eds.) Vol. 82:423-452.
- 68) Harris, E.D.Jr., Vater, C. (1980) Methodology of collagenase Research: substrate preparation, Enzyme activation and Purification. En: Collagenase in Normal and Pathological Connective Tissues. (Wooley, D.E., Evanson, J.M. eds.) pp.37-63. John Wiley & Sons. LTD.
- 69) Gallop, P.M., Seifter, S., Neilman, E. (1957) The partial purification, assay and mode of activation of Bacterial collagenase. J. Biol. Chem. 227:891-906.
- 70) Weeks, J.G., Halme, J., Woessner, F. (1976) Extraction of collagenase from the involuting rat uterus. Biochem. et Biophys. Acta. 445:205-214.