

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castelló, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Los trabajos publicados en Serie Universitaria abarcan las siguientes especialidades: Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas; Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales; Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía; Física; Geología; Historia; Ingeniería; Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina, Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología. A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares que se reparte gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Fundación Juan March



FJM-Uni 197-Liz  
Caracterización molecular de las est  
Lizarbe Iracheta, María Antonia.  
1031523



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

María Antonia Lizarbe Iracheta

Caracterización molecular  
de las  
estructuras de colágeno

197 Caracterización molecular de las estructuras de colágeno / María Antonia Lizarbe Iracheta.

FJM  
Uni-  
197  
Liz  
197



Fundación Juan March

Serie Universitaria

197



María Antonia Lizarbe Iracheta

Caracterización molecular  
de las  
estructuras de colágeno



Fundación Juan March  
Castelló, 77. Teléf. 435 42 40  
Madrid-6

Fundación Juan March (Madrid)

*Este trabajo fue realizado con una Beca de la  
Convocatoria de Extranjero, 1981, individual*  
**PLAN DE BIOLOGIA MOLECULAR Y SUS APLICACIONES**  
*Centro de trabajo: Instituto Max-Planck de Bioquímica de  
Munich (Alemania)*  
*Dirección del trabajo: Dr. Robert Glanville*

Los textos publicados en esta Serie Universitaria son elaborados por  
los propios autores e impresos por reproducción fotostática.

Depósito Legal: M-1425-1983

I.S.B.N.: 84-7075-264-2

Impresión: Ediciones Peninsular. Tomelloso, 37. Madrid-26

# I N D I C E

	<u>Página</u>
INTRODUCCION . . . . .	7
EXTRACCION DE COLAGENO DE TEJIDOS . . . . .	16
AISLAMIENTO DE COLAGENOS INTERSTICIALES . . . . .	18
Caracterización de colágeno tipo I . . . . .	24
AISLAMIENTO DE COLAGENO TIPO IV . . . . .	29
Caracterización de colágeno tipo IV . . . . .	33
AISLAMIENTO DE COLAGENO 7S . . . . .	36
AISLAMIENTO DE COLAGENO TIPO V . . . . .	40
BIBLIOGRAFIA . . . . .	49



## INTRODUCCION

El colágeno es uno de los principales componentes del tejido conectivo a nivel de matriz extracelular. La importancia de esta proteína es evidente si se considera que constituye la tercera parte del contenido proteico total del cuerpo humano.

En un organismo, la organización de la matriz extracelular no solo depende del tejido sino también del estado del mismo, maduración y desarrollo, y es un reflejo de la asociación de la molécula de colágeno con otras estructuras (proteoglicanos, glicoproteínas, etc) en diferentes ordenaciones de superior complejidad, que confieren al tejido características especiales.

El colágeno está ampliamente distribuido, encontrándose diferentes tipos, en clara dependencia con la función fisiológica a desempeñar (tabla I).

La terminología empleada cuando se trata de la molécula de colágeno es compleja. Así, monómero es la estructura formada por tres cadenas polipeptídicas en conformación de triple hélice, estructura que como unidad integradora de la fibra de colágeno también ha sido denominada tropocolágeno. La variedad de cadenas  $\alpha$  que componen esta molécula dan lugar a los distintos tipos de colágeno y en el seno de la molécula de colágeno de un determinado tipo, las cadenas  $\alpha$  pueden ser iguales o diferentes. El término colágeno se emplea también para expresar de manera genérica a cualquiera de los tipos de colágeno, en su forma monomérica o en las distintas estructuras superiores que este monómero puede formar.

Como procolágeno o protropocolágeno se designa al precursor biosintético del colágeno, constituido por tres cadenas pro- $\alpha$ , con una región central en triple hélice y dos regiones no colagenosas que poseen características diferentes a la región en triple hélice, en las extensiones amino y carboxilo terminales de la molécula de procolágeno.

La molécula de procolágeno se puede clasificar dependiendo de que existan los dos dominios o uno solo de ellos, así se encuentran procolágenos con extensión sólo en la zona amino-terminal (pN) o en la zona carboxilo-terminal (pC). Ca

Tabla I. Tipos, distribución y características de la molécula de colágeno.

Tipo	Cadenas	Composición molecular	Características	Distribución	Biosíntesis
I	$\alpha_1, \alpha_2$ $\alpha_1$	$\alpha_1(I) \quad \alpha_2(I)$ $\alpha_1(I)_3$	Baja hidroxilación de Lys y bajo contenido en hidratos de carbono.	Piel, hueso, tendón aorta, ligamentos tejido conectivo intersticial.	Fibroblastos, osteoblastos y células del músculo liso.
II	$\alpha_1$	$\alpha_1(II)_3$	Hidroxiladas el 50% de Lys y todas las Hyl glucosiladas	Cartilago	Condrocitos
III	$\alpha_1$	$\alpha_1(III)_3$	Baja hidroxilación de Lys, contiene Cys, Gly 30% y 4-Hyp Pro.	Igual que el tipo I, excepto en hueso y tendón.	Fibroblastos y músculo liso.
IV	$\alpha_1, \alpha_2$ $\alpha_1$	$\alpha_1(IV) \quad \alpha_2(IV) ?$ $\alpha_1(IV)_3$	Contiene Cys, la mayoría de Lys hidroxiladas. Todas Hyl glucosiladas. Presencia de 3-Hyp.	Basamentos membranosos.	Células endoteliales y epiteliales
V	$\alpha_1, \alpha_2$	$\alpha_1(V) \quad \alpha_2(V) \quad 2$	Bajo contenido en Ala, alto en Hyl y en hidratos de carbono.	Membranas fetales, músculo liso y es triado.	Mioblastos y músculo liso.



da una de estas moléculas puede tener prolongada sólo 1 ó 2 de las cadenas  $\alpha$  corresponden estas estructuras a intermediarios en la conversión del procolágeno a colágeno.

El protocolágeno es la molécula de colágeno no hidroxilada o con baja proporción de hidroxilación, debido a que la biosíntesis no se ha producido normalmente.

Los componentes  $\beta$  son dímeros de las cadenas  $\alpha$  unidas por enlaces covalentes. Estas uniones pueden ser intramoleculares si derivan de una molécula de colágeno monomérico o intermoleculares si provienen de formas poliméricas del colágeno.

Los componentes  $\gamma$  son trímeros de cadenas  $\alpha$  unidas por enlaces covalentes, siendo diferente esta estructura a la molécula de colágeno ya que las cadenas que componen la forma  $\gamma$  provienen de distintas moléculas de colágeno.

El término que se utiliza para designar a la molécula de colágeno desnaturalizada, no formando triple hélice, la mezcla de cadenas libres o fragmentos de moléculas es gelatina.

De los cinco tipos de colágenos descritos hasta el momento, los más conocidos son los colágenos tipo I, II y III llamados colágenos intersticiales (Piez, 1976; Fietzek y Kühn, 1976; Miller, 1976) englobados en este gran grupo por una serie de características generales. El colágeno tipo IV, no tan caracterizado como los anteriores, y con unas propiedades diferentes (Sato y Spiro, 1976; Freytag et al., 1976; Timpl et al., 1978) formaría un segundo grupo denominado de basamentos membranosos. En este grupo también se incluye el colágeno tipo V pero las características y peculiaridades de este tipo de colágeno hacen que se parezca también a los colágenos intersticiales.

Recientemente en cartílago y cultivos celulares se han descrito dos nuevos tipos de colágenos, los denominados RST y M (Burgeson y Hollister, 1979).

La molécula de colágeno se puede representar como la estructura resultante

de la repetición del triplete Gly-X-Y. Por tanto, una tercera parte de los aminoácidos que componen esta proteína es glicoccla, que ocupa la primera posición en el triplete, requerimiento necesario para la formación de la triple hélice.

Otra característica en la composición de aminoácidos es la presencia de aminoácidos hidroxilados. Estos no se incorporan como tales en la etapa de traducción sino que residuos de prolina y lisina son hidroxilados en etapas postraduccionales, en la cadena polipeptídica (tabla II).

El contenido en iminoácidos es elevado, del 15 al 30% de los residuos, y la presencia de éstos está relacionada con la estabilidad de la triple hélice. La hidroxilación de prolina se produce en la posición 4, predominando la 4-hidroxiprolina en todos los tipos de colágeno sobre otro tipo de hidroxilación que se produce en la posición 3. La 3-hidroxiprolina es característica de colágenos de basamentos membranosos (Kefalides, 1975). En cuanto a la posición de los iminoácidos en el triplete, la prolina ocupa la posición X, al igual que la 3-hidroxiprolina y la 4-hidroxiprolina se encuentra preferentemente en la posición Y del triplete.

La presencia de hidroxilisina está delimitada a la posición Y del triplete, siendo la función de este residuo de lisina modificado doble; está al igual que la lisina implicado en el entrecruzamiento molecular y es el centro de unión de las moléculas de hidratos de carbono que se integran en la molécula de colágeno. La extensión de la hidroxilación depende del tipo de colágeno así como del tejido del que proceda el colágeno, puede oscilar desde un 20% de los residuos de lisina hidroxilados en piel o hueso hasta un 60% en cartílago.

El contenido en hidratos de carbono, relacionado con la presencia de hidroxilisina, difiere dentro del mismo animal en los diferentes tejidos. Se pueden encontrar glicosilados desde un 0.4% de los residuos de lisina en piel (Butter et al., 1967; Aguilar et al., 1973), un 4% en cartílago (miller, 1971) a un 12% en colágenos de basamentos membranosos (Kefalides, 1973).

Los principales hidratos de carbono que componen la molécula de colágeno son la glucosa y galactosa, encontrándose también otros diferentes en colágenos de invertebrados (Katzman y Kang, 1972) o en colágenos de basamentos membranosos (Kefalides, 1973).

La unión es de tipo 2-0- $\beta$  D-glucosil-0- $\beta$  D-galactosil-hidroxilisina o D- $\beta$  D galactosil-hidroxilisina, encontrándose la forma monosacárida y disacárida en igual proporción en colágenos intersticiales y preponderancia de disacáridos en colágenos de basamentos membranosos. Se unen preferentemente a hidroxilisinas situadas entre argininas y residuos hidrofóbicos (Salem y Traub, 1975).

La composición en aminoácidos y secuencia de las cadenas polipeptídicas que componen la molécula de colágeno es por tanto poco frecuente, distinta de las encontradas en el resto de las proteínas. La presencia de hidroxilisina e hidroxiprolina, casi exclusiva de las proteínas colagenosas determina en cierto modo la estructura de la molécula de colágeno y sirve para determinar el contenido de colágeno en tejidos.

La presencia de hidroxilisina está limitada al colágeno y a alguna glicoproteína estructural (Robert y Conte, 1968) pero el bajo contenido, de 4 a 7 residuos/1000 hacen difícil su determinación.

La hidroxiprolina se encuentra además en la elastina, aunque en baja proporción, 10 residuos /1000 frente a los 50-130/1000 en colágeno, en el componente C<sub>1q</sub> del complemento (Reid, 1974), en glicoproteínas (Bhattacharyya et al., 1975) y en acetilcolinesterasa (Anglister et al., 1976). La detección de este iminoácido, tras la digestión del material, se puede realizar por medio de métodos colorimétricos (LeRoy, 1967), utilizando marcadores isotópicos (Juva y Prockop, 1966) o por análisis de aminoácidos (Ehrlich et al., 1974).

La molécula de colágeno formada por tres cadenas  $\alpha$ , en la que cada cadena polipeptídica está en conformación helicoidal, surge por el enrollamiento de éstas sobre sí mismas, en una estructura en triple hélice a derechas. El avance de esta superhélice es de 2.9 Å y el número de residuos por vuelta es de 3.3.

Las tres cadenas se unen entre sí mediante puentes de hidrógeno, cuya dirección es transversa al eje longitudinal de la molécula de colágeno.

La molécula tiene un peso molecular de 280000, una longitud de 280 nm y un diámetro de 1.4 nm, pudiéndose distinguir en ella dos regiones de secuencia estructural y funcionalmente diferentes. A ambos lados de la región central en triple hélice se extienden unas zonas denominadas telopéptidos que pueden oscilar entre 5 y 50 residuos (Fietzek y Kühn, 1976) que no se encuentran en triple hélice. En estas regiones es donde se encuentran los grupos funcionales que permiten establecer los enlaces entre moléculas que estabilizan la fibra de colágeno, la lisina e hidroxilisina o sus correspondientes aldehidos.

La estructura de la molécula de colágeno no queda limitada a la triple hélice, se forman estructuras de orden superior por interacción entre distintas moléculas de colágeno. En colágenos intersticiales, esta estructura macromolecular o formación de fibrillas y fibras en el espacio extracelular es un proceso controlado por la distribución de aminoácidos y por la interacción con componentes no colagenosos. La distribución de aminoácidos cargados (Rautenberg y Kühn, 1968), residuos hidrofóbicos (Hulmes et al., 1973) y la presencia de carbohidratos son factores implicados en el ensamblaje molecular. La capacidad de agregar en fibras no sólo depende de la secuencia de aminoácidos ya que los distintos tipos de colágenos I, II y III con distinta secuencia agregan de la misma manera (Kühn y von der Mark, 1978).

La presencia de enlaces entrecruzados, intercadena y covalentes, estabilizan la fibra de colágeno. Estos enlaces covalentes entre las cadenas se establecen entre residuos de lisina o hidroxilisina y aldehidos derivados de estos en un proceso de desaminación oxidativa catalizado por la lisil oxidasa. Una de las características de estos enlaces es que pueden ser reducidos con la consiguiente pérdida de solubilidad del colágeno (Tanzer, 1973).

En el colágeno tipo IV la región helicoidal está interrumpida por secuencias no colagenosas formadas por la inclusión o delección de aminoácidos en el tri

plete Gly-X-Y (Timpl et al., 1978). Estas cortas secuencias cambian la dirección de la triple hélice produciendo unas estructuras con mayor flexibilidad pero hacen que este colágeno sea sensible al ataque proteolítico. La insolubilidad de los basamentos membranosos y esta última característica hacen que en su solubilización con pepsina aparezcan fragmentos con distinta longitud (Glanville y Rauter, 1981).

La triple hélice responsable del ensamblaje molecular en estructuras fibrosas resultado de la distribución de aminoácidos cargados e hidrofóbicos en determinadas regiones de la molécula en el caso de colágenos intersticiales, no da cuenta en el caso de colágenos de membranas basales de la formación de fibras

El colágeno tipo V ha sido aislado de membranas fetales (Burgeson et al., 1976 de piel y paredes de aorta (Chung et al., 1976). El peso molecular y la resistencia al ataque proteolítico en estado nativo le confieren características de colágeno intersticial, así como la distribución de aminoácidos cargados, que es semejante a las de los colágenos tipo I y tipo III. A pesar de estas analogías, este colágeno no forma fibras y al igual que el colágeno tipo IV no es hidrolizado por colagenasas que degradan a los colágenos intersticiales.

La biosíntesis de la molécula de colágeno transcurre en varias etapas, intracelulares y extracelulares, resumidas en la tabla II.

El precursor biosintético del colágeno es el procolágeno. Está formado por un dominio central en triple hélice (correspondiente a lo que posteriormente será la molécula de colágeno) y dos regiones no en triple hélice que son eliminadas por proteólisis en la conversión a colágeno. La composición de aminoácidos de la región amino-terminal y carboxilo-terminal difieren de la de las cadenas  $\alpha$  y no son compatibles con una estructura en triple hélice.

En la región amino-terminal existe una zona en la que se repite el triplete (Gly-Pro-Hyp), separada de la región central por un pequeño segmento en el cual la secuencia se interrumpe, siendo éste el punto de ataque para que la peptidasa lo convierta en colágeno (Becker et al., 1976).

Otra característica de estas regiones es la presencia de cisteína que salvo en el colágeno tipo III, no aparece en la región colagenosa. Se han descrito puentes disulfuro en las cadenas pro- $\alpha$  (Fesslaer et al., 1973), quedando limitados los puentes disulfuro intercadena a la región carboxilo-terminal (Byers et al., 1975). En el dominio carboxilo-terminal también se ha detectado la presencia de triptofano y heteropolisacáridos compuestos por manosa y N-acetil-glucosamina (Duksin y Bornstein, 1977).

Varias funciones biológicas se han asignado al procolágeno, es el responsable de la correcta asociación intramolecular o alineamiento de cadenas que facilita la formación de la triple hélice, inhibe la fibrillogénesis intracelular, facilita el transporte al espacio extracelular y, asociándose a moléculas de colágeno, se produce la agregación apropiada para la formación de la fibra.

Tabla II. Etapas y sistemas enzimáticos implicados en la biosíntesis de colágeno

<u>INTRACELULARES</u>	
-TRANSCRIPCIÓN y TRADUCCIÓN	
-POSTRADUCCIONALES	
Hidroxilación de prolina y lisina	Prolil-4-hidroxilasa Prolil-3-hidroxilasa Lisil-hidroxilasa
Glicosilación	Galactosil-transferasa Glucosil-transferasa Manosil-transferasa
Formación de puentes disulfuro	
Formación de la triple hélice	
Transporte al complejo de Golgi	
-SECRECIÓN	
<u>EXTRACELULARES</u>	
-Procolágeno $\rightarrow$ colágeno	Procolágeno-N-peptidasa Procolágeno C-peptidasa
-FIBRILLOGÉNESIS	
-FORMACIÓN DE ENTRECruzAMIENTOS	Lisil-oxidasa

Estudios inmunológicos sobre la molécula de colágeno indican que la actividad antigénica reside en ambas cadenas,  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  en el colágeno tipo I; depende del mantenimiento de la estructura nativa pero también se produce reacción antigénica frente a colágeno desnaturalizado. Beil et al. (1973) clasifican los determinantes antigénicos en cuatro grupos diferentes:

- No aparecen al inmunizar con colágeno desnaturalizado, localizados en la zona central de la triple hélice, por lo tanto determinantes antigénicos conformacionales (cuaternarios).
- Desaparecen al tratar al colágeno nativo con proteasa y son independientes del estado del colágeno. Aparecen inmunizando con colágeno nativo o con gelatina. Están localizados en la región no helicoidal, en las regiones terminales de los telopéptidos y son determinantes secuenciales.
- Aparecen inmunizando con colágeno tratado con proteasas o con colágeno desnaturalizado, localizados en la región central de la molécula, en la zona de la triple hélice pero son determinantes antigénicos secuenciales.
- Si la molécula con la que se realiza la inmunización es procolágeno, aparecen otra serie de anticuerpos además de los que corresponderían a las zonas antes mencionadas de la molécula de colágeno. Estos determinantes antigénicos están localizados en este caso en las extensiones no colagenosas y son determinantes de secuencia y conformacionales.

Los principales determinantes antigénicos están localizados en los telopéptidos. La región central posee antigenicidad aunque menor (Steffen et al., 1968) Inmunizando con colágeno tipo I, los anticuerpos formados en un primer momento reaccionan frente a las zonas carboxilo-terminales de las cadenas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  y posteriormente se biosintetizan anticuerpos frente a la región aminoterminal de  $\alpha_2$  con la consiguiente disminución de los anteriores (Timpl et al., 1972). El tamaño de los determinantes varía de 4 a 6 residuos, todos incluyen Lys-Gly y dos incluyen un residuo de Tyr en posición 2. La secuencia de la región aminoterminal reconocida es: Tyr-Ser-Asp-Lys-Gly-Val-Ala-Gly (Furthmayr y Timpl, 1972)

## EXTRACCION DE COLAGENO DE TEJIDOS

En condiciones fisiológicas, la molécula de colágeno se encuentra en forma insoluble, formando fibras. El procolágeno o las formas intermedias entre el precursor y el colágeno recién biosintetizados se pueden solubilizar más fácilmente.

La selección del método de extracción depende de la naturaleza del tejido y en último término de los tipos de colágeno que contenga el tejido seleccionado. El procedimiento utilizado, variación de condiciones experimentales como temperatura, pH y fuerza iónica, incidirá en la extracción. La interacción del colágeno con otros constituyentes del tejido conectivo también condicionan el método experimental. Así, por ejemplo, el hueso se debe desmineralizar (Glimcher et al., 1966) o eliminar proteoglicanos del cartílago (Miller y Lund, 1973) antes de proceder a la extracción del colágeno.

Las características estructurales de los dos grandes grupos, colágenos intersticiales y de basamentos membranosos, condicionan la selección del material biológico, de acuerdo con el tipo de colágeno que se desee aislar.

Para el aislamiento de colágenos intersticiales se seleccionan tejidos jóvenes, en desarrollo (embriones, pieles fetales etc.) que permitan no sólo la obtención de la molécula de colágeno sino también la de los precursores de ésta. En este tipo de tejidos está incrementada la biosíntesis de colágeno y las fibras no presentan muchos enlaces entrecruzados, que posteriormente, con la maduración del tejido aparecerán, dificultando la extracción de la molécula de colágeno.

Otro tipo de tejidos utilizados en estos aislamientos son los procedentes de animales a los que se les administra  $\beta$ -aminopropionitrilo, animales latíricos: Como consecuencia de la inhibición de la lisil-oxidasa por el  $\beta$ -aminopropionitrilo, estos animales adultos contienen fibras de colágeno con poco entrecruzamiento molecular, facilitándose la extracción de colágeno.

Las peculiaridades estructurales o diferencias que se observan en el colágeno



tipo IV y colágeno tipo V con respecto a los colágenos intersticiales hacen que los procesos de extracción en estos casos sean diferentes. En el aislamiento de colágeno tipo IV, no se obtiene la molécula intacta, ésta se recombina a partir de los fragmentos obtenidos en digestiones con enzimas proteolíticas.

Los métodos generales de extracción se basan en la eliminación de diferentes tipos de enlace que estabilizan la fibra de colágeno. Se agrupan en:

- Eliminación de interacciones no covalentes con agentes que de una forma no degradativa despolimericen la fibra de colágeno, como es la utilización de sales neutras (0.15-1 M) (Jackson y Bentley, 1960) o tampones citrato o ácidos diluidos (Rauterberg y Kühn, 1971). Estos métodos se basan en la hidrólisis del enlace entrecruzado aldimina.

El pH es uno de los factores experimentales que se debe controlar más, ya que la extracción en medio ácido o neutro puede conducir a la parcial proteólisis, por enzimas endógenas, de la fracción de procolágeno presente en el tejido.

Estos métodos no degradativos se utilizan para extraer colágeno tipo I. El colágeno tipo II, III, IV y V son más insolubles y se extraen mejor por digestión con enzimas proteolíticas (Epstein, 1974).

Tratamientos con enzimas proteolíticas como pepsina o pronasa que eliminan la región de los telopéptidos donde residen los enlaces entrecruzados. La región de la triple hélice se obtiene intacta, resiste la acción proteolítica cuando la temperatura de incubación es menor a la de desnaturalización del colágeno (Borstein y Piez, 1964).

Empleo de agentes desnaturalizantes como urea o cloruro de guanidinio en los tampones de extracción conduce a una mayor accesibilidad del disolvente a la matriz sólida. La molécula de colágeno se desnaturaliza, obteniéndose gelatina. Sales como cloruro cálcico o sulfocianuro potásico reducen la temperatura de desnaturalización del colágeno (von Hippel, 1967) y también son agen

tes utilizados en las extracciones.

Las características químicas tan semejantes de los colágenos no hacen posible seleccionar una técnica para extraer un solo tipo de colágeno. La separación de los diferentes tipos de colágeno, una vez obtenido el extracto de colágeno se realiza por fraccionamiento salino, en dependencia del límite de precipitación de los diferentes tipos.

Las técnicas cromatográficas se utilizan también para la separación de diferentes tipos de colágenos y para la separación de las distintas cadenas que componen la molécula de colágeno.

#### AISLAMIENTO DE COLAGENOS INTERSTICIALES

El material seleccionado es piel fetal bovina. El esquema de aislamiento (Esquema 1) empleado es una modificación del método de Timpl et al.(1975).

El proceso de extracción de la molécula de colágeno es una extracción salina con lo cual en este tratamiento se va a obtener colágeno tipo I, tipo III y también procolágeno; en este caso, por tratarse de piel fetal bovina, la molécula de procolágeno que se encuentra en mayor proporción es el procolágeno tipo III con sólo la extensión adicional en el extremo amino-terminal, el pN III. Esto condiciona todo el proceso de preparación del material biológico, debe ser rápido, llevarse a baja temperatura y, una vez homogeneizado el material, se deben añadir al tampón salino de extracción inhibidores de las actividades proteásicas que actuarían sobre moléculas de pN III convirtiéndolas en colágeno tipo III.

El colágeno extraído del tejido se separa de las proteínas solubilizadas en el mismo tampón por medio de una precipitación salina a 2.5 M de Na Cl, precipitación que puede realizarse con NaCl sólido ya que lo que se persigue es precipitar la fracción colagenosa total. La precipitación de todos los tipos de colágenos presentes se consigue tras la agitación a 4°C durante un mínimo de 4 horas.

El precipitado obtenido en esta etapa sirve como material de partida para la

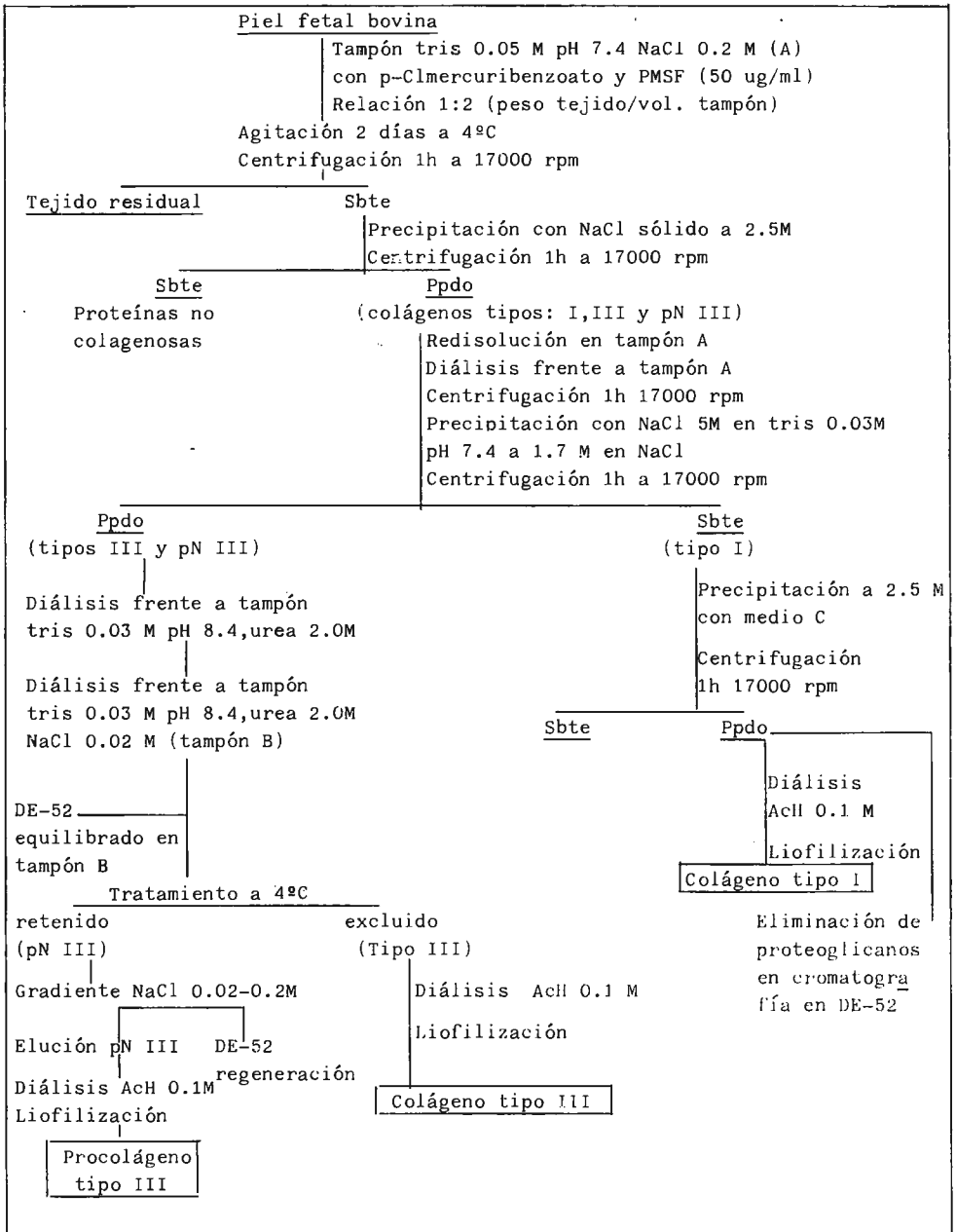
separación de los distintos colágenos, por lo cual el precipitado se resuspende y dializa a una concentración de NaCl a la que todos los colágenos son solubles. Esta etapa permite también eliminar proteínas no colagenosas insolubles ocluidas en el precipitado.

La separación de los diferentes tipos de colágenos, una vez solubilizados, se realiza por medio de precipitaciones fraccionadas en función de la distinta solubilidad de las moléculas (tabla III). Para evitar la coprecipitación, en este caso, en el momento de realizar un fraccionamiento, no se utiliza NaCl sólido para la precipitación sino que la concentración de NaCl se incrementa adicionando al medio lentamente una solución tampón con NaCl 5 M. El tiempo en esta etapa es por tanto un factor a considerar, utilizándose normalmente 12 horas para la precipitación salina de un tipo de colágeno.

Tabla III. Diferencias en la solubilidad de distintos tipos de colágeno.

Tipo	Origen	Rango de concentración molar de NaCl requerido para la precipitación.	
		pH ácido	pH neutro
I	piel	0.7-0.9	2.6
I trímero	piel	0.7-0.9	4.0
II	cartílago	0.7-0.9	3.5- 4.4
III	piel fetal	0.7-0.9	1.5- 1.7
IV	placenta	1.2	1.7- 2.0
V	placenta	1.2	3.6- 4.5

La primera precipitación fraccionada se realiza a 1.7 M de NaCl con lo cual se consigue la separación del colágeno tipo I, con rango de fraccionamiento de 1.7 a 2.5 M, que permanece en el sobrenadante; el colágeno tipo III y el procolágeno III quedan en el precipitado.



Esquema nº1. Aislamiento y purificación de colágenos intersticiales.

El colágeno tipo I se obtiene precipitando el sobrenadante anterior a 2.5 M de cloruro sódico. El sedimento tras diálisis en ácido acético 0.1 M se liofiliza y se conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Este colágeno tipo I, obtenido sólo por precipitación salina tiene color grisáceo, debido a la presencia de azúcares, mucopolisacáridos y proteoglicanos. Estas moléculas pueden ser eliminadas en una cromatografía de intercambio iónico, en condiciones experimentales semejantes a las descritas para la separación del colágeno tipo III y procolágeno tipo III.

El precipitado 1.7 M, conteniendo colágeno tipo III y pN III, se redisuelve en el tampón original y se reprecipita a 1.7M. Esta reprecipitación es necesaria para eliminar totalmente el colágeno tipo I, componente mayoritario del tejido y que posee propiedades cromatográficas similares a las del tipo III, ya que contaminaría en las etapas posteriores de purificación al colágeno tipo III.

El precipitado conteniendo solamente colágeno tipo III y procolágeno tipo III se dializa frente al medio en el que se va a realizar la primera etapa cromatográfica, tampón tris 0.03 M, NaCl 0.2 M y urea 2.0 M. La urea es necesaria ya que el colágeno a baja fuerza iónica puede precipitar y en esta etapa avanzada de la purificación no quedaría soluble tras la diálisis. La concentración de urea no modifica la estructura de la molécula de colágeno, se necesitan concentraciones mucho más elevadas de agente desnaturizante para que se produzca la desnaturalización de la molécula de colágeno.

La primera etapa cromatográfica se utiliza para eliminar contaminantes no colagenosos. El colágeno en estas condiciones no queda retenido en la resina, no interacciona con el DE-52 y si lo hacen otros componentes no colagenosos, por ejemplo y por citar sólo uno de los componentes del tejido conectivo, los proteoglicanos que acompañan al colágeno en todo el proceso de extracción salina quedan retenidos en la resina cromatográfica.

La parte no retenida en el DE-52, fracción conteniendo colágeno tipo III y procolágeno tipo III se dializa frente a tampón tris 0.03 M, urea 2.0 M,

NaCl 0.02 M ya que la separación del colágeno tipo III y el pN III se va a basar en la diferente interacción de éstos con una resina de intercambio iónico.

Con el tampón de diálisis se equilibra la columna de DE-52 y se carga la muestra. Durante el proceso el flujo de la cromatografía puede disminuir debido a que las muestras son muy viscosas. Después de la carga y lavado, cuando la absorción a 224 nm es nula, se aplica un gradiente lineal de NaCl entre 0.02 y 0.2 M de NaCl en el tampón tris.

El diagrama de esta cromatografía está representado en la figura nº1.

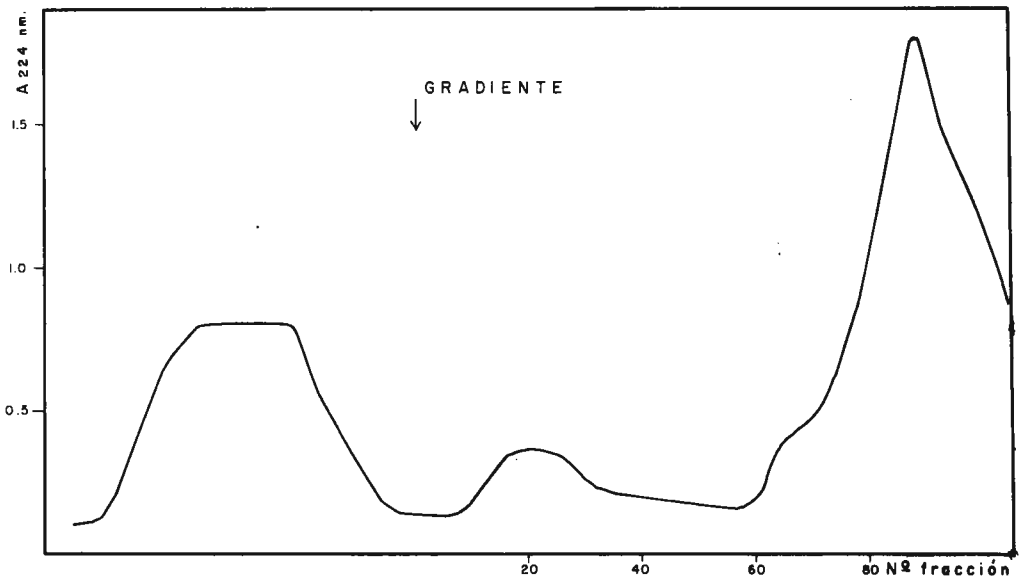


Figura nº 1. Perfil del eluido de la cromatografía en DE-52 (5 x 20 cm), equilibrada en tampón tris 0.03 M, urea 2.0 M, NaCl 0.02 M pH 8.4. La elución se realiza con un gradiente lineal de cloruro sódico entre los límites 0.02 y 0.2 M.

Las fracciones de la parte excluida en la cromatografía corresponden a colágeno tipo III y en el gradiente se eluye el procolágeno tipo III. Por la naturaleza del tejido o por el proceso de extracción, en el gradiente aparecen otras fracciones (minoritarias), además del pN III. Estas corresponden a pro

colágenos que contienen en distinta extensión la región amino-terminal y aparecen como productos de degradación de proteasa intracelulares.

Alicuotas de cada etapa de purificación se dializan frente a ácido acético 0.1 M y liofilizan para realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato sódico (SDS) que en estos procesos es la técnica empleada como criterio de pureza. En la figura nº 2 se puede observar la movilidad relativa de las cadenas que constituyen la molécula de colágeno.

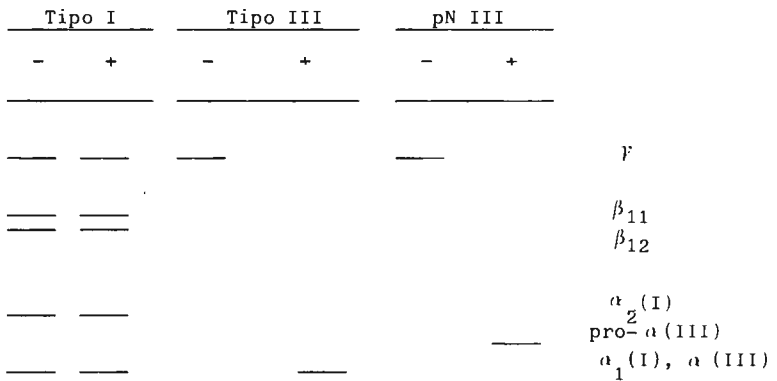


Figura nº 2. Diagrama de una electroforesis en gel de poliacrilamida (4.5%) en presencia de SDS. Muestra desnaturalizada por la acción del detergente y la temperatura (-). Muestra en las mismas condiciones pero en presencia de 2-mercapto-etanol (+).

El tratamiento con 2-mercapto-etanol no modifica el diagrama electroforético del colágeno tipo I y en él se observa la presencia de las dos cadenas  $\alpha$  que componen dicha molécula. Aunque las dos cadenas  $\alpha_1(I)$  y  $\alpha_2(I)$  tienen el mismo peso molecular (95 000), se observa un comportamiento electroforético anormal. La electroforesis se realiza en presencia de SDS, por tanto en función del peso molecular pero las cadenas se separan por la presencia de hidratos de carbono que modifican la interacción con el detergente. También se puede observar la existencia de componentes  $\beta$ ,  $\beta_{11}$  y  $\beta_{12}$ , índice de la presencia de enlaces entrecruzados covalentes, ya que el aislamiento de esta molécula

la se realiza mediante una extracción salina. Si en el proceso de extracción se utiliza una enzima proteolítica, la zona de los telopéptidos que contienen los enlaces entrecruzados se hidroliza y no aparecen en gran proporción estos componentes de peso molecular elevado.

El colágeno tipo III y pN III quedan en la parte superior del gel, la movilidad electroforética de ambos colágenos es pequeña ya que la molécula presenta como característica propia la presencia de puentes disulfuro en la región carboxilo terminal. Al reducir con 2-mercapto-etanol el colágeno tipo III aparece como una banda en la posición correspondiente a las cadenas  $\alpha$ , la  $\alpha$  (III). Comparando la movilidad de esta cadena con las del colágeno tipo I, se observa que la movilidad electroforética de la cadena  $\alpha$  (III) es semejante a la de la cadena  $\alpha_1$  (I). La cadena pro- $\alpha$  tiene una movilidad inferior a las de las cadenas  $\alpha$  (I) o  $\alpha$  (III). La molécula de procolágeno se aísla o solubiliza como tal, no forma fibras y por lo tanto no posee enlaces entrecruzados, no observándose en este caso la presencia de componentes  $\beta$  o  $\gamma$ .

#### Caracterización de colágeno tipo I.

La separación de los distintos componentes en función del tamaño molecular se realiza mediante una cromatografía de penetrabilidad en Agarosa 5.0m. El diagrama de elución se puede observar en la figura nº3.

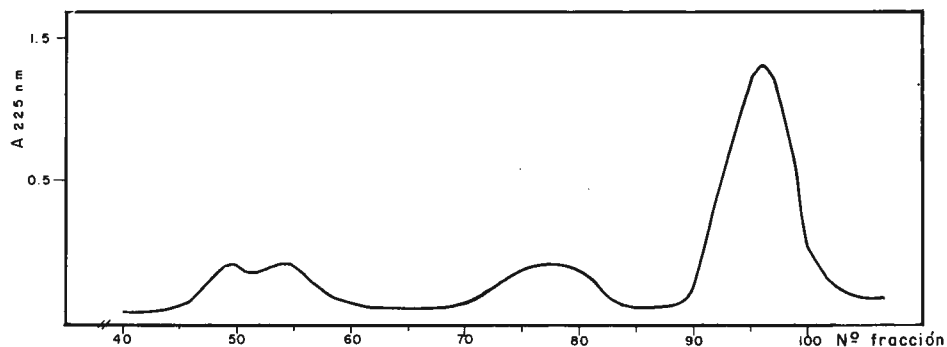


Figura nº3. Perfil del eluido en la cromatografía en Agarosa 5.0 m (4 x 150 cm) Elución en tampón tris 0.03 M pH 7.5 conteniendo  $\text{CaCl}_2$  1 M y azida sódica al 0.002%.



Los componentes de mayor peso molecular, polímeros y componentes  $\gamma$  eluyen en primer lugar (fracciones 45-60). Entre las fracciones 72-82 eluyen los componentes  $\beta_{11}$  y  $\beta_{12}$ . En último lugar eluyen las cadenas  $\alpha_1$  (I) y  $\alpha_2$  (I) en un solo pico. La separación se realiza en presencia de iones calcio para evitar la renaturalización del colágeno que previamente se desnaturaliza termicamente.

La separación de las cadenas que componen la molécula de colágeno se efectúa por cromatografía de intercambio iónico, utilizando como soporte cromatográfico carboximetil-celulosa. La muestra se desnaturaliza termicamente para separar las cadenas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  y todo el proceso cromatográfico se realiza a 45°C. El orden de elución en esta cromatografía es: cadena  $\alpha_1$ , componentes  $\beta_{11}$ , componentes  $\beta_{12}$  y cadena  $\alpha_2$  (figura nº4).

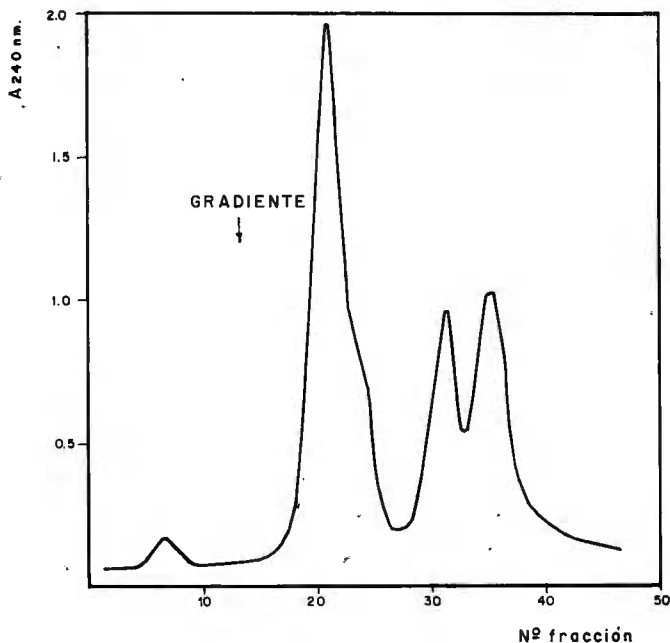


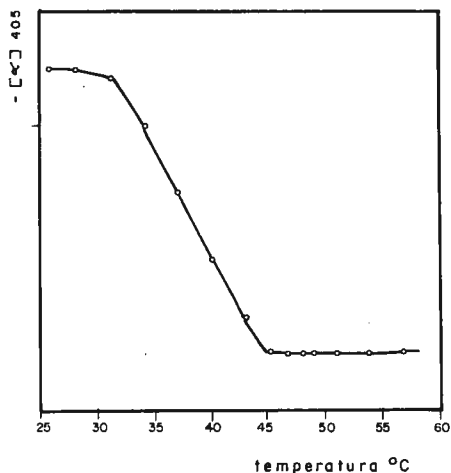
Figura nº4. Diagrama de elución de la cromatografía en carboximetil-celulosa del colágeno tipo I (—) y mezcla de cadenas obtenidas en la cromatografía en Agarosa 5.0m (---).

La muestra se disuelve en tampón acetato 0.04 M pH 4.8 conteniendo urea 2M y la desnaturalización térmica se consigue manteniendo la muestra a 45°C durante 30 minutos. Los polímeros y componentes no aparecen ya que no se solubilizan en estas condiciones.

La elución se efectúa con un gradiente lineal de cloruro sódico entre 0.01 y 0.1 M en el tampón acetato. Las fracciones correspondientes a la cadena  $\alpha_1(I)$  absorben más que las de la cadena  $\alpha_2(I)$  no por una diferente composición en aminoácidos aromáticos sino porque la concentración de éstas es doble, ya que la estequiometría de la molécula es  $\alpha_1(I) : \alpha_2(I) = 2:1$ .

Las medidas de desnaturalización térmica se realizan disolviendo el colágeno en tampón citrato 0.025 M pH 3.9 a una concentración comprendida entre 0.5 y 1 mg/ml a temperatura ambiente. La temperatura en el polarímetro se incrementa constantemente, 12°C en una hora, midiendo la rotación óptica cada 15 minutos.

La temperatura de desnaturalización para el colágeno tipo I es 37.4°C (figura nº5).



El conocimiento del valor de la rotación óptica a 405 nm permite calcular la concentración de una solución de colágeno ya que estos valores están relacionados por las ecuaciones (I) para la molécula de colágeno en estado nativo y

(II) para la molécula de colágeno desnaturalizada.

$$(I) \quad (mg/ml) = \frac{[\alpha] 1000}{1040}$$

$$(II) \quad (mg/ml) = \frac{[\alpha] 1000}{360}$$

La microscopía electrónica es utilizada en la caracterización de las moléculas de colágeno para conocer la forma de éstas, longitud y tipos de enlaces entre cruzados. El colágeno tipo I aparece como una varilla con solo puntos de flexibilidad en la región de los telopéptidos. La molécula de procolágeno presenta en los extremos zonas globulares, correspondientes a los extremos amino y carboxilo-terminales.

La técnica SLS específica para colágeno permite establecer homologías entre la secuencia de aminoácidos de los distintos tipos de colágeno, específicamente sirve para determinar la distribución de aminoácidos polares. La adición de ATP a una eolución ácida de colágeno provoca la agregación lateral y paralela de las moléculas de colágeno, formando segmentos alineados. Después de teñir con acetato de uranilo, que se une a aminoácidos ácidos, o ácido fosfotúngstico, que se une a aminoácidos básicos, se obtiene un diagrama de bandas alternantes claras y oscuras. Las regiones oscuras son localizaciones de aminoácidos polares y las bandas claras regiones con aminoácidos neutros.

La secuencia de aminoácidos, por lo tanto el tipo de colágeno, determinará el diagrama obtenido. Una banda característica para el colágeno tipo I es la llamada banda m y para el colágeno tipo III la banda n (figura nº6).

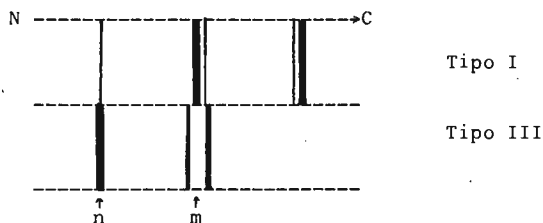


Figura nº6. Diagrama SLS (segment long spacing) de colágeno tipo I y colágeno tipo III. Sólo se representan las diferencias más significativas de todo el diagrama.

La composición de aminoácidos de los colágenos intersticiales aislados de piel fetal bovina: tipo I, tipo III y procolágeno tipo III, se recogen a continuación.

	<u>Tipo I</u>	<u>Tipo III</u>	<u>p N III</u>
4- Hyp	89	119	111
Asp	43	47	54
Thr	13	16	18
Ser	35	48	50
Glu	80	71	75
Pro	141	106	110
Gly	341	341	321
Ala	125	95	87
Val	19	16	19
Ile	9	14	17
Leu	22	18	20
Tyr	4	4	6
Phe	13	9	9
His	3	7	8
Hyl	5	7	6
Lys	33	28	27
Arg	52	45	44
Cys		1	10

Los resultados se expresan como residuos/ 1000 aminoácidos tras una hidrólisis con HCl 6N durante 24 horas. Se pueden observar todas las características de la composición de aminoácidos anteriormente ya comentadas.

## AISLAMIENTO DE COLAGENO TIPO IV

La insolubilidad de los basamentos membranosos, donde se encuentra este tipo de colágeno, hace necesario recurrir a un procedimiento diferente para extraer la molécula de colágeno. Los distintos puntos de flexibilidad creados en las regiones no colagenosas, en los que la secuencia del triplete Gly-X-Y queda alterada por la inclusión o delección de algún aminoácido, hacen que las características del colágeno tipo IV sean diferentes a las de otros tipos de colágenos (Glanville y Rauter, 1981) y este hecho es la base del proceso de extracción.

La solubilización del colágeno se efectúa en este caso con la ayuda de una enzima proteolítica, la pepsina. La digestión con pepsina solubiliza del basamento membranoso al colágeno tipo IV, pero la acción proteolítica recae en diferentes puntos de la molécula, obteniéndose por tanto, no una molécula intacta sino fragmentos colagenosos pertenecientes a la molécula de colágeno tipo IV. A partir de la caracterización de todos estos fragmentos obtenidos se reconstruye la hipotética estructura del colágeno de basamentos membranosos.

El proceso de extracción seguido es una modificación del método descrito por Glanville et al (1979) y queda recogido en el esquema nº2.

El medio en el que se realiza la extracción, ya que el pH óptimo de actuación de la pepsina es ácido, es ácido fórmico 0.5 M o ácido acético 0.5 M. El tiempo óptimo de digestión se fija en 16-20 horas a 4°C.

La presencia de zonas sensibles al ataque proteolítico de esta estructura singular hace necesario un control de todas las condiciones de digestión: tiempo, temperatura y cantidad de enzima proteolítica. En condiciones drásticas, a 20°C, digiriendo el tejido durante 20 horas y con una relación 1/10 de tejido/pepsina, el colágeno tipo IV se llega a degradar totalmente.

El extracto de colágeno se precipita con cloruro sódico al 10% eliminando así proteínas no colagenosas que hayan resistido la acción de la pepsina.

En la etapa siguiente, al igual que en el esquema anterior, se lleva a cabo una

Placenta (lavada con AcNa 0.4 M)

Trituración

Suspensión en ácido fórmico 0.5 M (1:3 p/v)

Digestión con pepsina 1/2000 (p/v)

Agitación 16-20 horas a 4°C

Centrifugación 1h a 17000 rpm

Tejido residualPpdo

(Colágenos tipos: I, III, IV y V)

Redisolución y diálisis en  
tampón tris 0.03 M pH 7.4  
NaCl 0.2 M

Centrifugación 1h a 17000 rpm

Ppdo

(tipos III y IV)

Sbte

(tipos I y V)

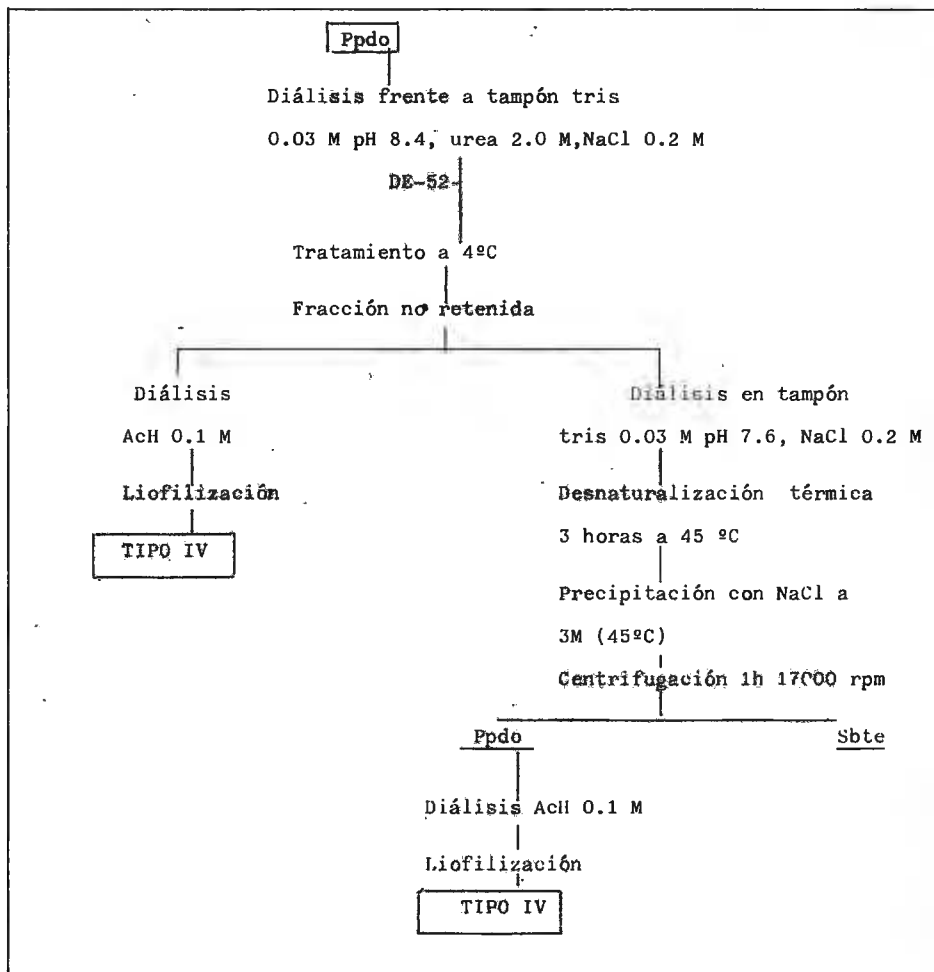
Redisolución en tampón  
tris 1 M pH 8.0Reducción con 2-mercapto-etanol  
0.02 M en atmósfera de N<sub>2</sub>Carboximetilación con  
iodoacetato

Diálisis frente a ácido fórmico

Digestión con pepsina (16 horas a 4°C)  
en iguales condiciones a la 1ª digestiónPrecipitación con NaCl sólido  
al 6%

Centrifugación 1h a 17000 rpm

PpdoSbte



Esquema nº 2. Aislamiento de colágeno tipo IV de placenta humana.

resuspensión de la fracción colagenosa para proceder a la precipitación fraccionada. Ya que el precipitado proviene de una precipitación en medio ácido y la resuspensión se realiza a pH neutro, es necesario un control del pH del medio en esta etapa ( pH a 7.4) debido a que los límites de precipitación son dependientes del pH (tabla nº 3). De este modo también se consigue la eliminación de contaminantes que sean insolubles en medios neutros.

Por la naturaleza del material biológico, además de colágeno tipo IV, se encuentran aunque en menor cantidad los colágenos tipos I,III y V. La separación inicial se realiza por precipitación fraccionada.

En el precipitado 1.8 M se encuentran los colágenos tipo III y tipo IV. En el sobrenadante de esta precipitación los colágenos tipos I y tipo V, que se separarán según se indica posteriormente por precipitación salina, ya que este sobrenadante es el punto de partida para el aislamiento del colágeno tipo V. Los rangos de precipitación del colágeno tipo IV y colágeno tipo III son similares, la separación de ambos colágenos no estará basada por tanto en diferencias de solubilidad.

El procedimiento que se sigue para lograr esta separación consiste en una reducción con 2-mercapto-etanol, en atmósfera de nitrógeno, de los puentes disulfuro del colágeno tipo III y posterior carboxilación de los grupos tiólicos con iodoacetato. Al romper los puentes disulfuro e impedir la posibilidad de una nueva reoxidación con la reacción o bloqueo de los grupos con iodoacetato, se provoca una distorsión en la molécula de colágeno tipo III haciendo que la estructura sea sensible al ataque proteolítico.

El iodoacetato en exceso se elimina del medio por una diálisis frente a ácido fórmico 0.5 M, preparando de este modo también el medio para la digestión con pepsina.

La última etapa del aislamiento es una precipitación con cloruro sódico al 6%. Sin embargo, es necesario incluir otra serie de tratamientos para separar la posible contaminación de colágeno tipo III si no se ha producido en toda su



extensión la reacción de reducción y carboximetilación. Estos tratamientos consisten en una etapa cromatográfica y una desnaturalización a 45°C. La diferencia de estabilidad térmica entre el colágeno tipo IV y III, que a esta temperatura está totalmente desnaturalizado, es lo que permite la ulterior separación del colágeno tipo IV por precipitación salina.

#### Caracterización de colágeno tipo IV

La disociación del colágeno tipo IV en los componentes que integran esta estructura se realiza en presencia de cloruro cálcico ( von Hippel, 1967). En dependencia del tiempo de redisolución en un medio que contenga calcio, el colágeno tipo IV se disocia en distinto grado. Esta disociación puede ser observada en cromatografía de penetrabilidad en Agarosa 5.0 m. Un tratamiento incompleto o redisolución rápida conduce al perfil cromatográfico ( - - - ) de la figura nº 8, perfil que varía considerablemente cuando la muestra se disociación lentamente, a tiempos largos de contacto con el medio que contiene calcio.

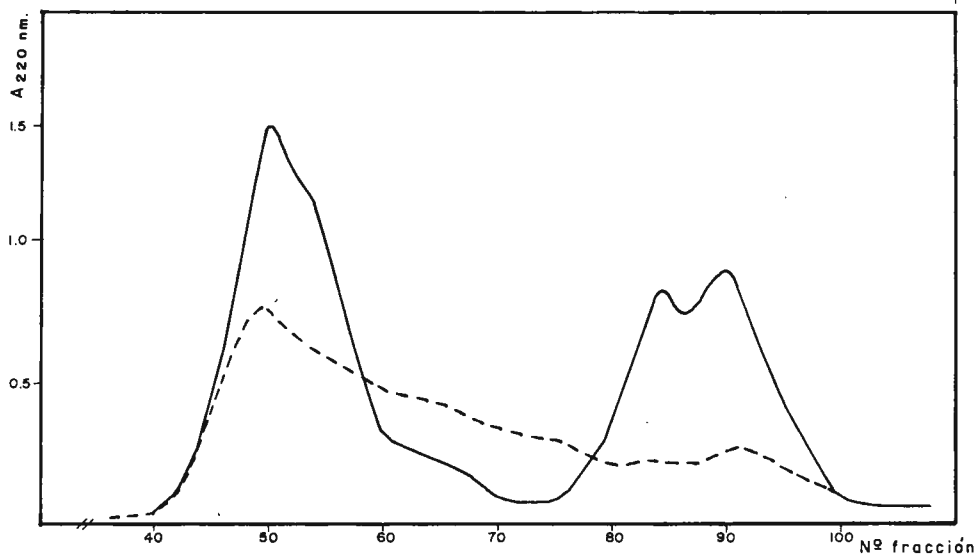


Figura nº 8. Perfil de elución del colágeno tipo IV en Agarosa 5.0 m (4 x 150 cm) Elución en tampón tris 0.03 M pH 7.5, CaCl<sub>2</sub> 1 M y azida sódica 0.002%. Disociación rápida ( - - - ); disociación lenta ( ——— ).

El colágeno tipo IV de placenta humana está compuesto por dos cadenas polipeptídicas  $\alpha_1$ (IV) y  $\alpha_2$ (IV) de pesos moleculares 95000 y 70000 y otros componentes de elevado peso molecular. La reducción del colágeno tipo IV provoca la aparición de una serie de componentes proteicos de diversos pesos moleculares que provienen de los polímeros de elevado peso molecular (figura nº9).

En la cromatografía en Agarosa se separan en una primera fracción los componentes de peso molecular elevado en un pico asimétrico y posteriormente eluyen las cadenas  $\alpha$ . El volumen de elución de la cadena  $\alpha_1$ (IV) es el correspondiente a la cadena  $\alpha_1$ (I).

La movilidad electroforética del colágeno tipo IV y las fracciones obtenidas en la cromatografía en agarosa se representan en la figura nº 9.

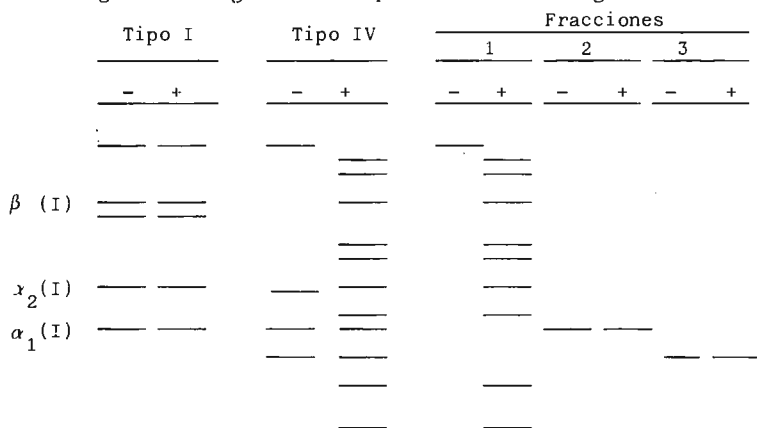


Figura nº 9. Diagrama de una electroforesis en gel de poliacrilamida (4.5%) en presencia de SDS. Muestra desnaturalizada por la acción del detergente y la temperatura (-). Muestra en las mismas condiciones pero en presencia de 2-mercapto etanol (+).

La movilidad electroforética de los componentes elementales  $\alpha_1$ (IV) y  $\alpha_2$ (IV) no se modifica en el proceso de reducción. El cambio observado en la reducción del colágeno tipo IV es debido a la reducción de los polímeros de elevado peso molecular (fracción 1).

Las curvas de desnaturalización térmica del colágeno tipo IV difieren de las

obtenidas para otros colágenos. Se calculan dos temperaturas de desnaturalización. Una centrada a los 37°C, correspondiente a la desnaturalización de la triple hélice y otra a los 70°C que corresponde a la desnaturalización del componente de peso molecular elevado.

Por microscopía electrónica las diferencias de este colágeno con los intersticiales también se ponen de manifiesto. Se obtienen distintos diagramas de bandas al obtener los "segment long spacing". La molécula de colágeno tipo IV vista al microscopio electrónico presenta un aspecto peculiar. En la figura nº 10 se representa el colágeno tipo IV. Este colágeno está constituido por más de una triple hélice, cuatro triples hélices se asocian para componer la molécula en una estructura superior que en orden equivale a la formación de fibras en los colágenos intersticiales. La asociación en ciertas localizaciones de cuatro hélices capacita a este colágeno para formar una red o malla muy flexible.

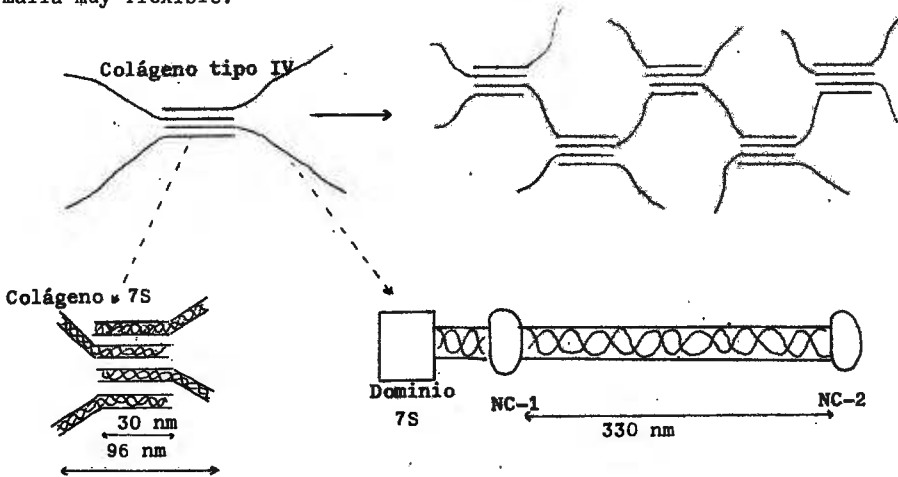


Figura nº 10. Estructura de la molécula de colágeno tipo IV.

La asociación de cuatro hélices se localiza en la zona de la molécula denominada "dominio 7S". El dominio no colagenoso 1 ("NC-1") daría cuenta de la asociación entre dos triples hélices para generar la matriz tridimensional.

Además de este dominio globular, próximo a la región 7S existe otro dominio no colagenoso, también globular, el "NC-2", que confiere a la molécula en esa región una amplia flexibilidad (Timpl et al., 1982).

#### AISLAMIENTO DE COLAGENO 7S

La porción colagenosa aislada de placenta humana denominada colágeno 7S posee una zona central con un gran número de entrecruzamientos y unos brazos o cadenas en triple hélice (Figura nº10). La extensión o longitud de los brazos confieren heterogeneidad a la molécula, dando origen a distintos tipos de colágenos 7S que diferirán en su tamaño molecular. Este colágeno correspondería a la zona de unión de las cuatro triples hélices que forman el colágeno tipo IV. Como parte de la molécula de colágeno tipo IV o como componente colagenoso de la placenta, el esquema indicado para extraer el colágeno tipo IV, es el origen de este aislamiento. La obtención de las distintas especies moleculares será resultado de la metodología empleada en el aislamiento.

La fracción colagenosa total se conserva dializando frente a ácido acético 0.1 M y liofilizando. El liofilizado conservado a -20°C se utiliza para comparar el efecto de las digestiones con pepsina y colagenasa y diferentes condiciones de tratamiento proteolítico.

El liofilizado rediseuelto a temperatura ambiente en ácido fórmico durante una noche, eliminando la parte no solubilizada por centrifugación, se digiere con pepsina. El tiempo de tratamiento en todos los casos es de 16 horas, variando las relaciones pepsina /muestra ( 1/10 y 1/100) y la temperatura de incubación. Finalizada la digestión, con una diálisis y liofilización se obtiene el material digerido. La comparación se puede establecer por electroforesis en gel de poliacrilamida o por cromatografía de filtración en gel.

El incremento de la relación de pepsina de 1/100 a 1/10 en la incubación no afecta cuando la temperatura es de 45°C, sin embargo a 30°C se observa una degradación de la cadena  $\alpha_2(I)$  así como de los componentes de elevado peso molecular, reflejada en un pequeño incremento de la movilidad electroforética y

nitidez de la banda.

El interés en este caso se centra al observar las variaciones ejercidas al mo dificar la temperatura de incubación. En las muestras tratadas a 20 y 30°C, se observa la presencia de bandas en posiciones correspondientes a las cadenas de colágeno tipo I, tipo V y componentes de elevado peso molecular que dan cuenta de la presencia de colágeno tipo III y tipo IV. La presencia de colágeno tipo IV se aprecia en la muestra reducida, por la aparición de las multiples bandas características de este colágeno.

A 37°C se produce un cambio sustancial en el patrón electroforético. Los componentes correspondientes a colágeno tipo I ,tipo V y tipo III desaparecen, permaneciendo solo la banda correspondiente al dominio 7S. Esto es un reflejo de la estabilidad térmica de los distintos colágenos. A 37°C, temperatura proxima a la de desnaturalización, las moléculas pierden la estructura en triple hélice que le confiere resistencia al ataque proteolítico. Los colágenos intersticiales y colágeno tipo V pierden esta propiedad, haciendose sensibles a la pepsina y por tanto degradados.

La estructura del colágeno tipo 7S, reflejada en la diferente curva de transición térmica, se mantiene a esa temperatura presentando resistencia al ataque proteolítico. Es necesario desnaturalizar a 70°C el dominio 7S para que pueda ser degradado totalmente, como en el caso de los colágenos intersticiales, por la pepsina. No obstante, el incremento de la relación pepsina/tejido en el tratamiento a 45°C conduce a un desdoblamiento de la banda de peso molecular elevado, en dos bandas no totalmente diferenciadas, indicando la posibilidad de obtener por tanto diferentes estructuras en dependencia de la relación colágeno/pepsina.

El medio de incubación para la digestión con colagenasa es tampón tris 0.02 M pH 7.6, NaCl 0.2 M y CaCl<sub>2</sub> 10 mM. Se procede como en el caso anterior pero antes de añadir la colagenasa de bacterias se desnaturaliza al muestra a 45°C. La incubación enzimática se realiza a esa temperatura y se varia la cantidad de colagenasa en el medio.

El componente de mayor peso molecular, a medida que se incrementa la concentración de colagenasa, se degrada convirtiéndose la banda neta en difuminada, índice de una pérdida de peso molecular y la consiguiente aparición de una estructura no homogénea. La evolución del dominio 7S hacia otros componentes queda también de manifiesto en los geles reducidos. El correspondiente al control de la muestra presenta las bandas características del colágeno tipo IV, mientras que en el tratamiento con colagenasa se obtiene una estructura más resistente a la reducción con 2-mercapto-etanol.

Las diferentes estructuras obtenidas con las digestiones con pepsina y colagenasa de bacterias se han estudiado también por cromatografía de filtración en gel. La elevada resolución requerida se obtiene con una columna de Agarosa 5.0 m (5 x 150 cm), equilibrada en tampón tris 0.03 M pH 7.0 con  $\text{CaCl}_2$  1 M. La calibración de la columna se realiza eluyendo colágeno tipo I. Los resultados obtenidos en estas cromatografías se recogen en la figura nº11. Sólo se comparan cuatro muestra, y el control utilizado para la digestión con colagenasa, se utiliza de control para comparar las variaciones que se producen en los tratamientos proteolíticos.

El diagrama de elución presenta un primer pico con un máximo en la fracción 47, correspondiente a polímeros de elevado peso molecular, otro centrado en la fracción 68 que corresponde a colágeno tipo IV y a partir de la fracción 100 eluyen una serie de componentes con una amplia distribución de pesos moleculares. En las últimas fracciones predominan los de peso molecular bajo, correspondientes a productos de degradación de la digestión inicial de la placenta con pepsina.

En las siguientes cromatografías se observa la transformación del control. Los polímeros de elevado peso molecular permanecen en las digestiones con pepsina 1/10 a 37°C y 1/100 a 45°C, sin embargo desaparecen totalmente en el caso de realizarse el tratamiento a una relación 1/10 y 45°C.

El interés de la comparación se centra en las zonas cromatográficas de elución entre las fracciones 60-90. Se observa la transformación del control, desplaza

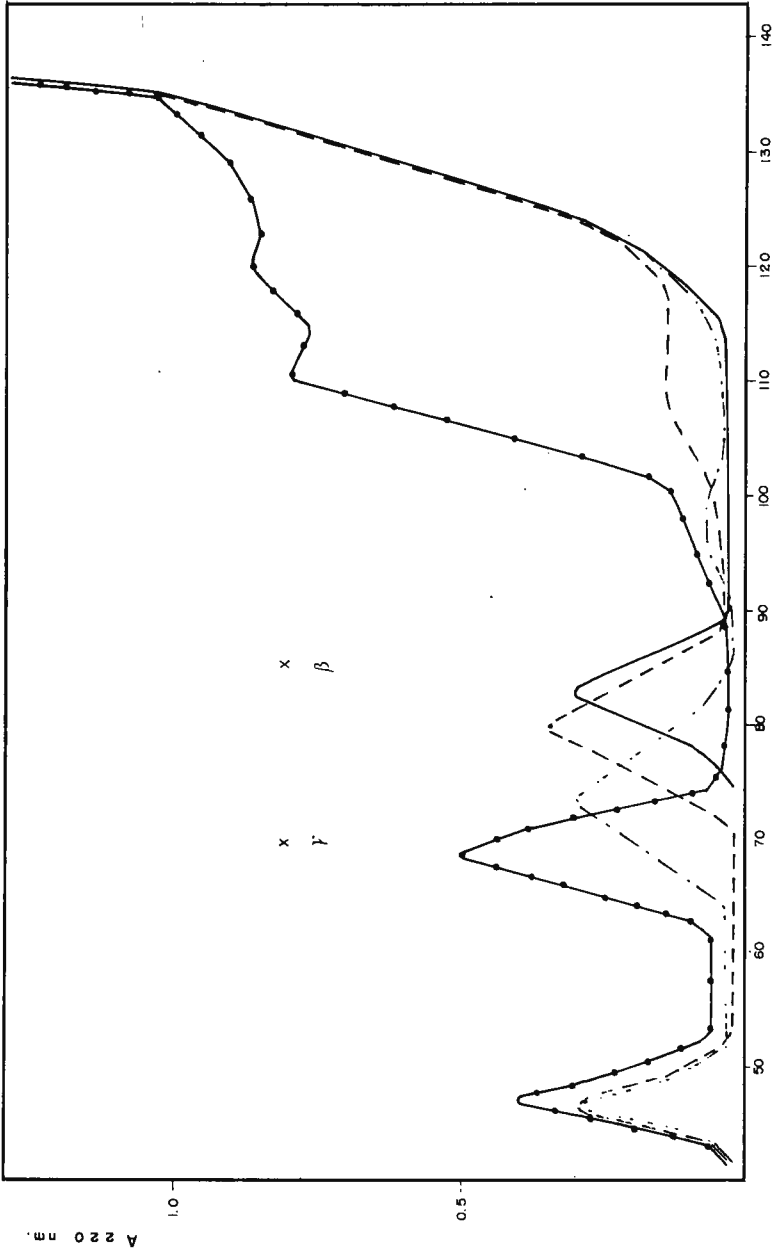


Figura nº 11. Cromatografía de penetrabilidad de la fracción colagenosa total de placenta humana después de digerir con pepsina. (-----) control, (- - - -) 1/10 a 37°C, (- . - . -) 1/100 a 37°C y (——) 1/10 a 45°C.

miento del máximo de la fracción 68 hacia volúmenes superiores (tabla nºIV), incrementándose esta diferencia cuando el tratamiento proteolítico se desarrolla en condiciones más drásticas.

Tabla IV. Modificación del volumen de elución de la fracción correspondiente al dominio 7S en distintos tratamientos.

<u>Tratamiento</u>	<u>Fracciones</u>	<u>Máximo a 220 nm</u>
Control	62 - 74	68
Digestión con pepsina		
1/10 a 37°C	65 - 83	73
1/100 a 45°C	71 - 87	80
1/10 a 45°C	75 - 87	83

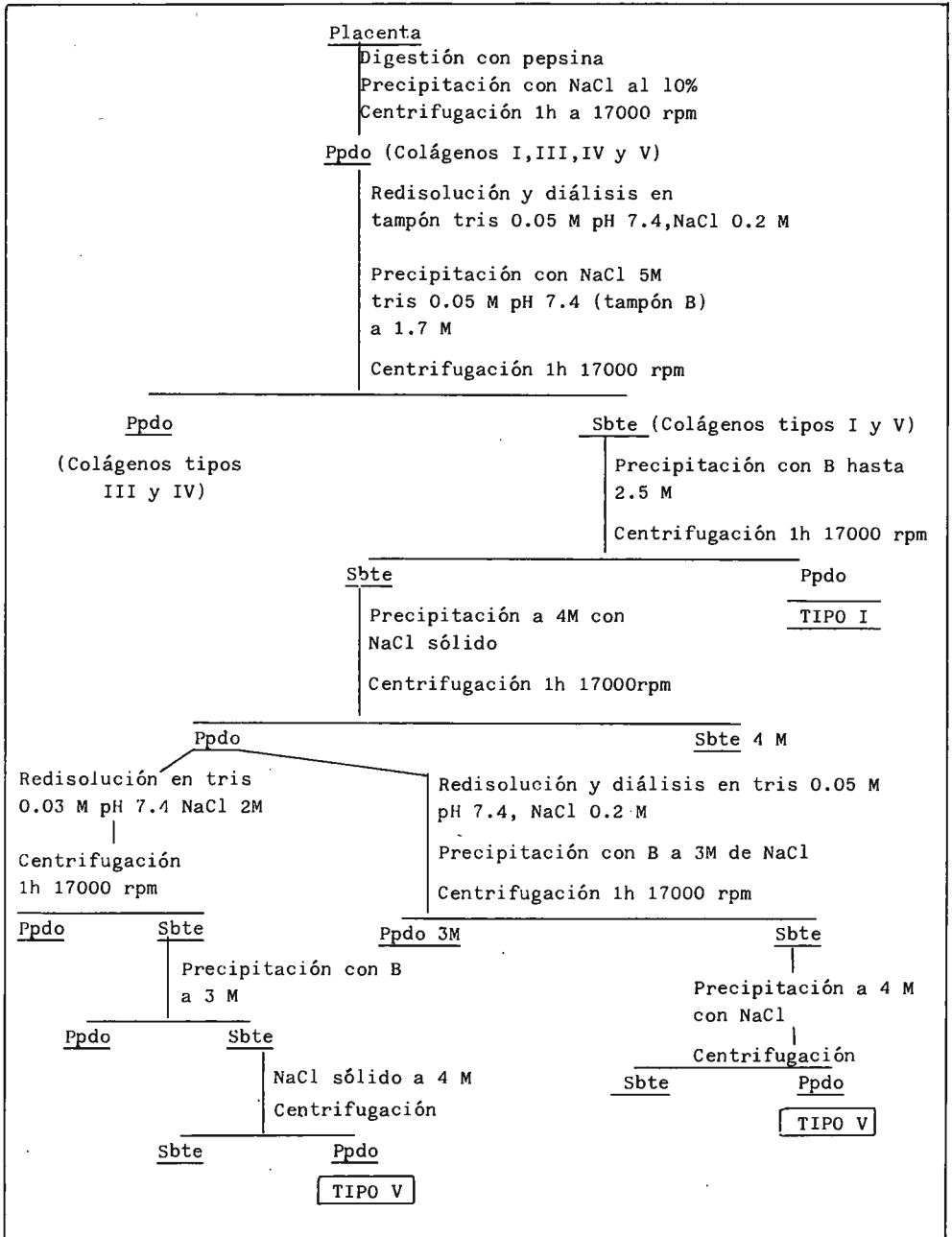
#### AISLAMIENTO DE COLAGENO TIPO V

El colágeno tipo V se ha aislado de placenta humana. Las primeras etapas son comunes al aislamiento del colágeno tipo IV, hasta la precipitación con cloruro sódico a 1.7 M. En el sobrenadante de dicha precipitación se encuentra el colágeno tipo I, acompañando al colágeno tipo V. Ambos se pueden separar por una precipitación salina basándose en el diferente intervalo de precipitación (tabla III) según el esquema nº3.

Las movilidades electroforéticas de las cadenas que componen el colágeno tipo V son menores a las del colágeno tipo I. Está compuesto por dos tipos de cadenas, llamadas  $\alpha_1(V)$  y  $\alpha_2(V)$  o A y B, en estequiometría  $AB_2$ , siendo la movilidad de la cadena A superior a la de la B.

La electroforesis de la fracción denominada tipo V presenta una característica diferencial del clásico colágeno tipo V. Se ha descrito la presencia de una banda que acompaña a estas dos, la denominada banda C o  $\alpha_3(V)$ . El colágeno tipo  $AB_2$  se aísla cuando se utiliza como material biológico de extracción parte de la placenta humana, las membranas amnion y corion (Sage et al.,





Esquema nº 3. Aislamiento de colágeno tipo V.

1981). Si en la experimentación se utiliza placenta humana a la que sólo se le elimina el cordón umbilical (contaminación de colágeno tipo II), la cadena C aparece en las preparaciones.

En el material utilizado para el aislamiento de colágeno tipo V, placenta humana aparece la cadena C, por tanto el trabajo con este tipo de colágeno se centra en un intento de explicar cual puede ser la relación de esta cadena con las normales caracterizadas para el colágeno tipo V, las cadenas A y B.

Según las conclusiones publicadas por Rhodes y Miller, las tres cadenas se encuentran en relación 1:1:1 por los resultados obtenidos en electroforesis en gel de poliacrilamida. Así, se podría afirmar la presencia de dos tipos de moléculas de colágeno tipo V, AB<sub>2</sub> y ABC. Sin embargo, en las electroforesis realizadas se ha observado que la intensidad de la banda correspondiente a la cadena C es menor que la de las otras cadenas y con una movilidad electroforética semejante a la de la cadena B.

La presencia en este precipitado, 3-4 M de cloruro sódico, de polímeros de elevado peso molecular así como de un componente no descrito de bajo peso molecular que acompañan al colágeno tipo V indujo a introducir nuevas etapas en la purificación de este colágeno.

Siguiendo la metodología empleada por Benz et al. (1978), se procede a la utilización de métodos cromatográficos para separar los polímeros. Los resultados obtenidos en las distintas cromatografías realizadas a 15°C en columna de DE-52 se recogen en la figura nº12. La elución se realiza con un gradiente lineal de cloruro sódico entre los límites 0.02 a 0.32 M en tampón tris 0.05 M, pH 8.5 y urea 2 M.

En esta separación cromatográfica no sólo se eliminan los polímeros, sino también se puede conseguir separar la proteína de bajo peso molecular. En las fracciones excluidas aparece el colágeno tipo V desnaturalizado. Las cadenas A, B y C se eluyen en las primeras fracciones del gradiente. En la segunda zona cromatográfica se encuentra el componente de bajo peso molecular y por

último eluyen los polímeros de alto peso molecular. Los proteoglicanos que acompañan al colágeno se retienen fuertemente en la resina y se eluyen posteriormente en el proceso de regenerado del DE-52.

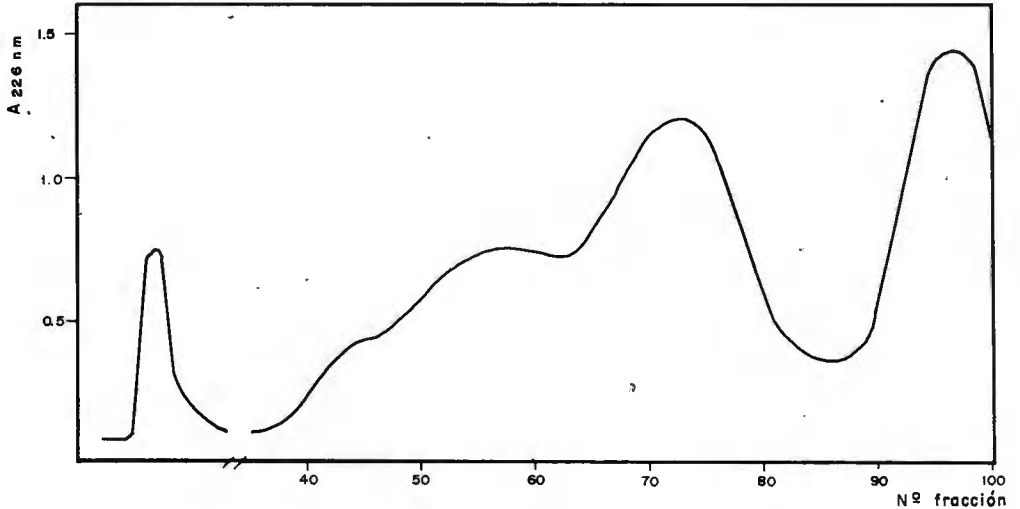


Figura nº 12. Perfil del eluido de la cromatografía en DE-52 (2.5 x 25 cm), equilibrada en tampón tris 0.05 M pH 8.5, urea 2.0 M y NaCl 0.02 M. Elución con un gradiente lineal de NaCl de 0.02 a 0.32 M.

La movilidad electroforética del colágeno tipo V y de las fracciones obtenidas en la cromatografía de intercambio iónico se representan en la figura 13.

Tipo I	Tipo V( $AB_2$ )	Tipo V(placenta)	Fracciones		
			1	2	3
—		—			
—		—			
—		—			
—	—	—	—	—	
—	—	—	—	—	
—		—			
		—			—
				—	—

Figura nº 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida (4.5%) en presencia de SDS.

La proximidad o solapamiento entre las fracciones correspondientes a las cadenas de colágeno tipo V y el componente de bajo peso molecular se resuelve en etapas recromatográficas (figura nº 14).

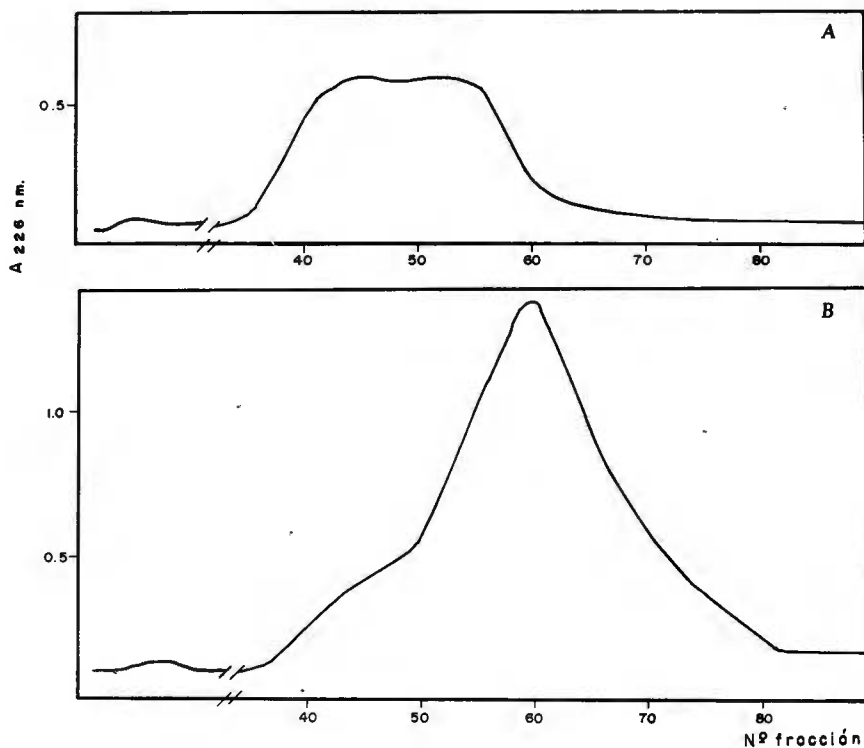


Figura nº 14. Perfiles de elución de las recromatografías de las fracciones obtenidas en la separación cromatográfica del colágeno tipo V. Las condiciones experimentales son iguales a las de la cromatografía de la figura nº12. (A) Recromatografía de las fracciones 38-50, (B) de las fracciones 51-65.

Dos hechos se pueden resaltar, el primero de ellos es la ausencia del componente de bajo peso molecular en las primeras fracciones del eluido y la aparición del mismo posteriormente, contaminando a las cadenas que componen el colágeno tipo V. El segundo de ellos se refiere a las cadenas  $\alpha$  del colágeno tipo V. En la electroforesis se aprecia la distinta presencia de la cade

na C. Aparece en las primeras fracciones y con la aparición del componente de bajo peso molecular, no se detecta. Así, la presencia de las tres cadenas u homogeneidad en la fracción del colágeno tipo V no queda totalmente clara.

La pérdida de rendimiento en las etapas recromatográficas hace necesario la búsqueda de nuevas condiciones de elución. Los límites de cloruro sódico en el gradiente lineal se restringen a 0.0 - 0.15 M. Los resultados obtenidos en estas condiciones se recogen en la figura nº 15.

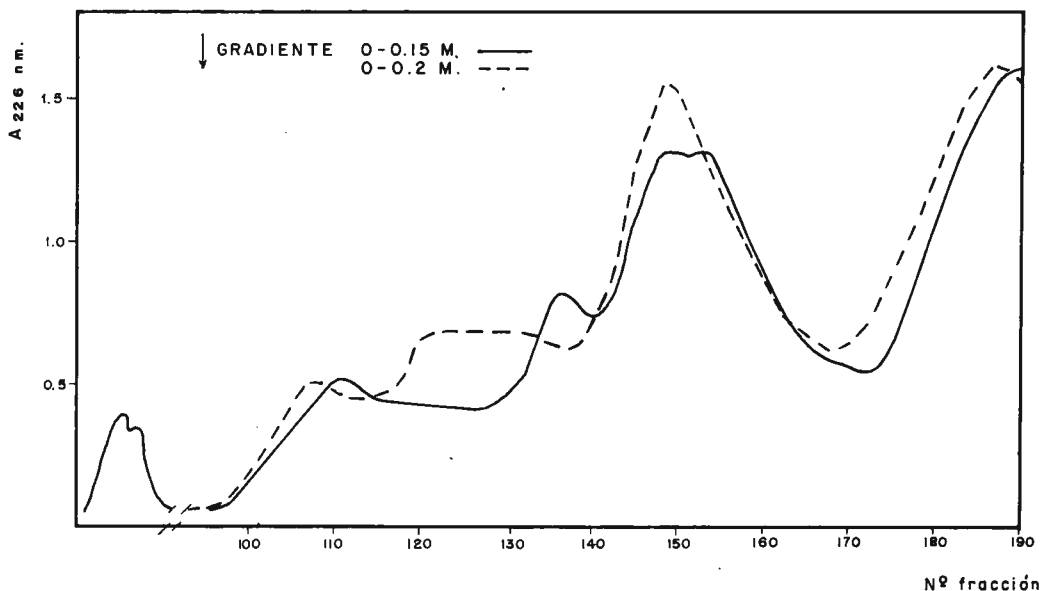


Figura nº15. Perfils de elució en diferents condicions de la fracció col·lagenosa corresponent al col·lagen tip V.

En estas cromatografías, la fracción excluída corresponde al producto de una parcial desnaturalización, como componente mayoritario aparece la cadena B. Al aplicar el gradiente el diagrama de elució se modifica, se amplia la zona o fracciones donde eluye el colágeno tipo V.

En los primeros eluidos aparecen como componentes mayoritarios las cadenas de colágeno tipo V y no se aprecia la presencia de la banda de bajo peso mo

lecular, que si contamina a las últimas fracciones donde eluyen las cadenas de tipo V. A continuación, eluye este componente y por último, la fracción más retenida son los polímeros.

La electroforesis de estas fracciones (figura nº16) revela la presencia en las primeras fracciones eluidas de solo dos bandas, correspondientes a cadenas A y C. Esto indica la presencia de otra molécula de colágeno tipo V. En la molécula de este tipo de colágeno, la presencia de la cadena C está explicada por su asociación a la cadena A, formando una nueva molécula de colágeno no descrita hasta ahora.

La intensidad de las bandas parece indicar que las cadenas A y C se encuentran en una relación estequiométrica 2:1. La composición molecular de este nuevo tipo de colágeno aislado parece ser por tanto  $A_2C$ .

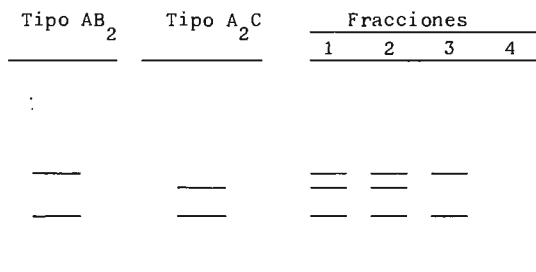


Figura nº 16. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de colágeno tipo V.

La posibilidad de que la cadena C provenga de una degradación proteolítica de la cadena B que cambie sus propiedades químicas debe descartarse. Las experiencias realizadas cambiando condiciones de digestión con pepsina indican la presencia constante de esta cadena en todas las preparaciones, y es independiente de las condiciones experimentales de extracción.

¿Es esta nueva molécula de colágeno aislado, el colágeno  $A_2C$ , una molécula de colágeno nativo o es simplemente un artefacto obtenido en el aislamiento? Los estudios de Dicroísmo Circular realizados con la molécula  $A_2C$  han evidenciado la presencia de una banda positiva a 220 nm, indicando por tanto que

esta estructura corresponde a una molécula de colágeno nativo.

Si esta molécula existe como entidad propia, ¿la cadena A que acompaña a esta nueva cadena C es la misma que forma parte del colágeno tipo  $AB_2$ ? o ¿es una cadena polipeptídica con las mismas propiedades electroforéticas que la que compone el colágeno  $AB_2$  pero con diferente composición en aminoácidos?.

El aislamiento de las cadenas A, B y C para separarlas posteriormente y poder establecer comparaciones en cuanto a la composición de aminoácidos se realiza en una cromatografía de filtración en gel en Agarosa 5.0 m, en las condiciones descritas anteriormente. Los resultados obtenidos, al desnaturalizar la fracción colágeno tipo V indican la presencia de polímeros, eluido con un máximo en la fracción nº 50, moléculas intactas, no disociadas (60-90), cadenas individuales (90-100) y componente de bajo peso molecular (115-125) (figura nº17).

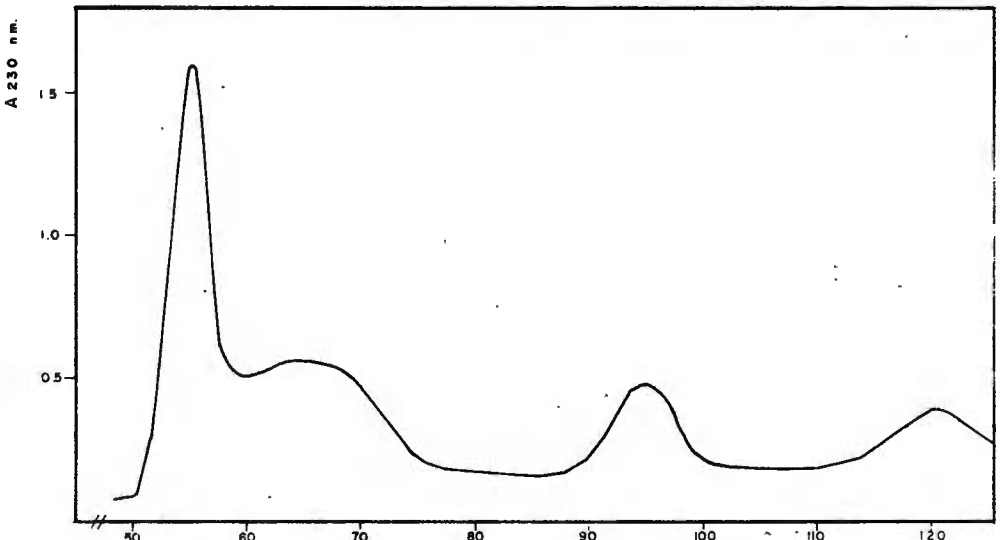


Figura nº 17. Perfil del eluido de la cromatografía en Agarosa 5.0 m del colágeno tipo V.

La separación de las cadenas de la molécula de colágeno tipo V, fracciones 90-100 de la cromatografía anterior se realiza por medio de una cromatografía

líquido de alta eficacia...En la figura nº 18 se compara el perfil obtenido para esta muestra con el del colágeno tipo  $AB_2$  y colágeno tipo  $A_2C$ . La cadena C puede ser separada de las otras dos, pero se necesitan distintas condiciones para lograr la separación de las cadenas A y B y poder establecer la comparación entre ambos tipos de colágenos.

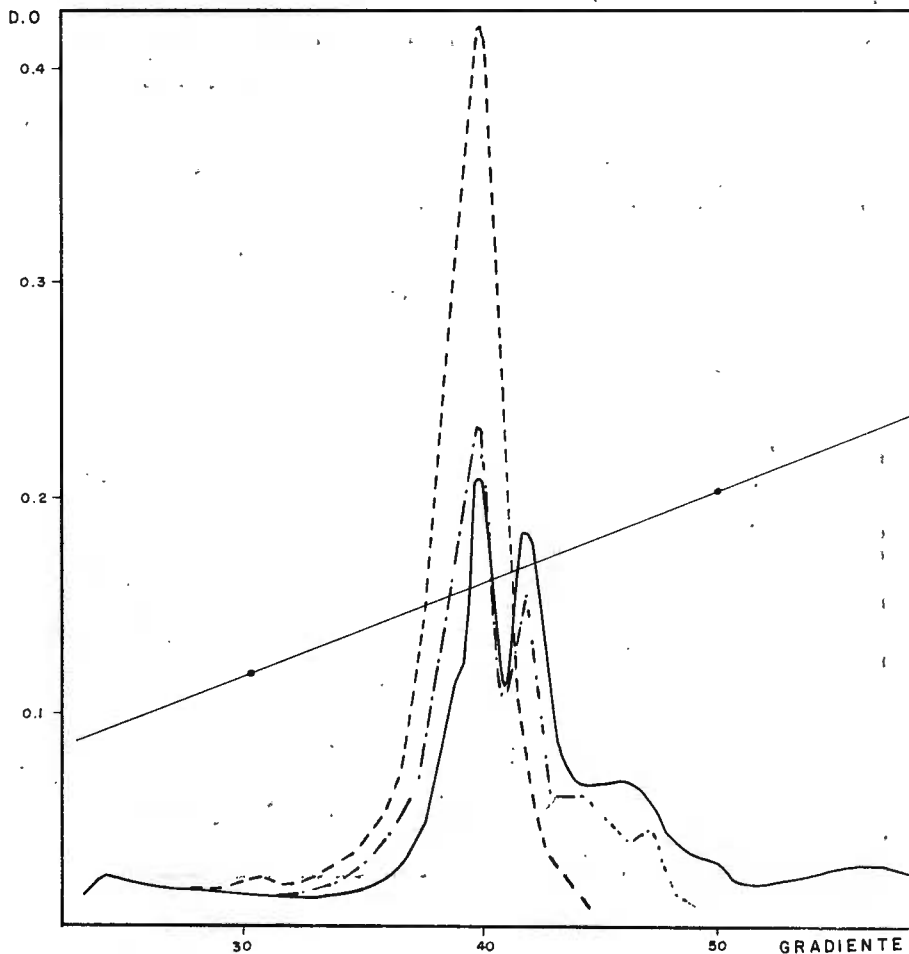


Figura nº 18. Separación en cromatografía líquida de alta eficacia de las cadenas que componen el colágeno tipo V. (---)  $AB_2$ ; (—)  $A_2C$ ; (-·-·-) mezcla ABC.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aguilar, J.H., Jacobs, H.G., Butler, W.T. y Cunningham, L.W. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 5106.
- 2.- Anglister, L., Rogozinski, S. y Silman, I. (1976) *FEBS. Lett.* 69, 129.
- 3.- Becker, U.; Fietzek, P.P., Nowack, H. y Timpl, R. (1976) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357, 1409.
- 4.- Bhattacharyya, S.N., Passero, M.A., DiAguatine, R.P. y Lynn, W.S. (1975) *J. Clin. Invest.* 55, 914.
- 5.- Beil, W., Timpl, R. y Furthmayr, H. (1973) *Immunology* 24, 13.
- 6.- Bentz, H., Bächinger, H.P., Glanville, R. y Kühn, K. (1978) *Eur. J. Biochem* 92, 563.
- 7.- Berguson, R.T., El Adli, F.A., Kailila, I.I. y Hollister, D.W. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2579.
- 8.- Bornstein, P. y Piez, K.A. (1964) *J. Clin. Invest.* 43, 1813
- 9.- Burgeson, R. E. y Hollister, D.W. (1979) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 87, 1124.
- 10.- Butler, W.T., Piez, K.A. y Bornstein, P. (1976) *Biochemistry* 6, 3771.
- 11.- Byers, P.H., Click, E.M., Harper, E. y Bornstein, P. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3009.
- 12.- Duksin, D. y Bornstein, P. (1977) *J. Biol. Chem.*
- 13.- Chung, E., Rhodes, R.K. y Miller, E.J. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 1167.
- 14.- Ehrlich, H.P., Ross, R. y Bornstein, P. (1974) *J. Cell. Biol.* 62, 390.
- 15.- Epstein, E.H. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 3225.
- 16.- Fessler, L.T., Burgenson, R.E., Morris, U.P. y Fessler, J.H. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2993.
- 17.- Fietzek, P.P. y Kühn, K. (1976) *Int. Rev. Conn. Tiss. Res.* 7, 1.
- 18.- Freytag, J.W., Ohno, M. y Hudson, B.G. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 796.
- 19.- Furthmayr, H. y Timpl, R. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 944.
- 20.- Glanville, R.W., Rauter, A. y Fietzek, R. (1979) *Eur. J. Biochem.* 96, 383.
- 21.- Glanville, R.W. y Rauter, A. (1981) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd* 362, 943.
- 22.- Glimcher, M.J., Fribreg, H.A., Orloff, S. y Groo, J. (1966) *J. Ultra. Struct. Res.* 15, 74.
- 23.- Hulmes, D.J.S., Miller, A., Parry, D.A.D., Piez, K.A. y Woodhead-Galloway, I. (1973) *J. Mol. Biol.* 79, 137.
- 24.- Jackson, D.S. y Bentley, T.P. (1960) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7, 37.
- 25.- Juva, K. y Prockop, D.J. (1966) *Anal. Biochem.* 15, 77.
- 26.- Katzman, R.L. y Kang, A.H. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 5486.
- 27.- Kefalides, N.A. (1973) *Int. Rev. Conn. Tiss. Res.* 6, 63.
- 28.- Kefalides, N.A. (1975) *J. Invest. Dermatol.* 65, 85.
- 29.- Kühn, K. y von der Mark, K. (1978) "Collagen Platelet Interaction" Ed. Gastpar New York pp 123.

- 30.- Le Roy, E.C. (1967) Adv.Clin. Chem. 10, 213.
- 31.- Miller, E.J. (1971) Biochemistry 10, 1652.
- 32.- Miller, E.J. y Lunde, L. G. (1973) Biochemistry 12, 3153.
- 33.- Miller, E.J. (1976) "Biochemistry of collagen" Ed. G.N. Ramachandran, H. Reddi. Plenum press. New York, pp85.
- 34.- Piez, K.A. (1976) "Biochemistry of collagen" (Ed. G.N. Ramachandran and A.H. Reddi. Plenum Press, New York pp, 1.
- 35.- Rauterberg, J. y Kühn, K. (1968) FEBS. Lett. 1, 230.
- 36.- Rauterberg, J. y Kühn, K. (1971) Eur.J. Biochem. 19, 398.
- 37.- Reid, K.B.M. (1974) Biochem.J. 141, 189.
- 38.- Robert, L. y Conte, P. (1968) Life Sciences 7, 493.
- 39.- Sage, H., Pritzl, P. y Bornstein, P. (1981) Biochemistry 20, 3778.
- 40.- Salem, G. y Traub, W. (1975) FEBS.Lett. 51, 94.
- 41.- Sato, T. y Spiro, R.G. (1976) J. biol. Chem. 251, 4062.
- 42.- Steffer, C., Timpl, R. y Wolff, I. (1968) Immunology 15, 135.
- 43.- Tanzer, M.L. (1973) Science 180, 561.
- 44.- Timpl, R., Furthmayr, H. y Beil, W. (1972) J. Immunol. 108, 119.
- 45.- Timpl, R., Glanville, R.W., Nowack, H., Wiedemann, H., Fietzek, P.P. y Kühn, K. (1975) Hoppe- Seyler's' Z. Physiol. Chem. 356, 1783.
- 46.- Timpl, R., Martin, G.R., Bruckner, P., Wick, G. y Wiedemann, H. (1978) Eur.J. Biochem. 84, 43.
- 47.- Timpl, R., Oberbäumer, I., Futhmayr, H. y Kühn, K. (1982) "New trends in Basement Membrane Research". Ed. Raven Press. New York .
- 48.- Von Hippel, P.H. (1967) "Treatise on collagen " ( G. N. Ramachandran, ed) Vol.1, pp 253. Academic Press, New York.



# FUNDACION JUAN MARCH

## SERIE UNIVERSITARIA

### TITULOS PUBLICADOS

### Serie Verde

(Matemáticas, Física, Química, Biología, Medicina)

- |    |                                                                                                                                        |    |                                                                                                                     |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2  | Mulet, A.:<br><b>Estudio del control y regulación, mediante un calculador numérico, de una operación de rectificación discontinua.</b> | 28 | Zugasti Arbizu, V.:<br><b>Analizador diferencial digital para control en tiempo real.</b>                           |
| 4  | Santiuste, J. M.:<br><b>Combustión de compuestos oxigenados.</b>                                                                       | 29 | Alonso, J. A.:<br><b>Transferencia de carga en aleaciones binarias.</b>                                             |
| 5  | Vicent López, J. L.:<br><b>Películas ferromagnéticas a baja temperatura.</b>                                                           | 30 | Sebastián Franco, J. L.:<br><b>Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.</b>            |
| 7  | Salvá Lacombe, J. A.:<br><b>Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental.</b>                                       | 39 | Blasco Olcina, J. L.:<br><b>Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos.</b>   |
| 8  | Plá Carrera, J.:<br><b>Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos.</b>                                                 | 44 | Sánchez Rodríguez, L.:<br><b>Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae.</b>                                   |
| 11 | Drake Moyano, J. M.:<br><b>Simulación electrónica del aparato vestibular.</b>                                                          | 45 | Acha Catalina, J. I.:<br><b>Sistema automático para la exploración del campo visual.</b>                            |
| 19 | Purroy Unanua, A.:<br><b>Estudios sobre la hormona Natriurética.</b>                                                                   | 47 | García-Sancho Martín, F. J.:<br><b>Uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular.</b>                 |
| 20 | Serrano Molina, J. S.:<br><b>Análisis de acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos.</b>                                    | 48 | García García, A.:<br><b>Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina.</b>         |
| 22 | Pascual Acosta, A.:<br><b>Algunos tópicos sobre teoría de la información.</b>                                                          | 49 | Trillas, E., y Alsina C.:<br><b>Introducción a los espacios métricos generalizados.</b>                             |
| 25 | I Semana de Biología:<br><b>Neurobiología.</b>                                                                                         | 50 | Pando Ramos, E.:<br><b>Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados.</b>                                  |
| 26 | I Semana de Biología:<br><b>Genética.</b>                                                                                              | 51 | Orozco, F., y López-Fanjul, C.:<br><b>Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora.</b> |
| 27 | I Semana de Biología:<br><b>Genética.</b>                                                                                              |    |                                                                                                                     |

- 52 Gallego Fernández, A.:  
**Adaptación visual.**
- 55 Castellet Solanas, M.:  
**Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.**
- 56 Sánchez Lazo, P.:  
**Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.**
- 57 Carrasco Llamas, L.:  
**Estudios sobre la expresión genética de virus animales.**
- 59 Afonso Rodríguez, C. N.:  
**Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.**
- 63 Vidal Costa, F.:  
**A la escucha de los sonidos cerca de  $T_{\lambda}$  en el  $4^{re}$  líquido.**
- 65 Andréu Morales, J. M.:  
**Una proteína asociada a membrana y sus subunidades.**
- 66 Blázquez Fernández, E.:  
**Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón.**
- 69 Vallejo Vicente, M.:  
**Razas vacunas autóctonas en vías de extinción.**
- 76 Martín Pérez, R. C.:  
**Estudio de la susceptibilidad magnetoeléctrica en el  $Cr_2O_3$  policristalino.**
- 80 Guerra Suárez, M.ª D.:  
**Reacción de Amidas con compuestos organoaluminicos.**
- 82 Lamas de León, L.:  
**Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroides.**
- 84 Repollés Moliner, J.:  
**Nitrosación de amlinas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental.**
- 86 II Semana de Biología:  
**Flora y fauna acuáticas.**
- 87 II Semana de Biología:  
**Botánica.**
- 88 II Semana de Biología:  
**Zoología.**
- 89 II Semana de Biología:  
**Zoología.**
- 91 Viéitez Martín, J. M.:  
**Ecología comparada de dos playas de las Rías de Pontevedra y Vigo.**
- 92 Cortijo Mérida, M., y García Blanco, F.:  
**Estudios estructurales de la glucógeno fosforilasa b.**
- 93 Aguilar Benítez de Lugo, E.:  
**Regulación de la secreción de LH y prolactina en cuadros anovulatorios experimentales.**
- 95 Bueno de las Heras, J. L.:  
**Empleo de polielectrolitos para la floculación de suspensiones de partículas de carbón.**
- 96 Núñez Alvarez, C., y Ballester Pérez, A.:  
**Lixiviación del cinabrio mediante el empleo de agentes complejantes.**
- 101 Fernández de Heredia, C.:  
**Regulación de la expresión genética a nivel de transcripción durante la diferenciación de Artemia salina.**
- 103 Guix Pericas, M.:  
**Estudio morfométrico, óptico y ultraestructural de los inmunocitos en la enfermedad celíaca.**
- 105 Llobera i Sande, M.:  
**Gluconeogénesis «in vivo» en ratas sometidas a distintos estados tiroideos.**
- 106 Usón Finkenzeller, J. M.:  
**Estudio clásico de las correcciones radiactivas en el átomo de hidrógeno.**
- 107 Gallán Jiménez, R.:  
**Teoría de la dimensión.**
- 111 Obregón Perea, J. M.:  
**Detección precoz del hipotiroidismo congénito.**

- 115 Cacicedo Egües, L.:  
**Mecanismos moleculares de acción de hormonas tiroideas sobre la regulación de la hormona tirótopa.**
- 121 Rodríguez García, R.:  
**Caracterización de lisoenzimas de diferentes especies.**
- 122 Carravedo Fantova, M.:  
**Introducción a las Orquídeas Españolas.**
- 125 Martínez-Almoyna Rullán, C.:  
**Contribución al estudio de la Manometría Ano-rectal en niños normales y con alteraciones de la continencia anal.**
- 127 Marro, J.:  
**Dinámica de transiciones de fase: Teoría y simulación numérica de la evolución temporal de aleaciones metálicas enfriadas rápidamente.**
- 129 Gracia García, M.:  
**Estudio de cerámicas de interés arqueológico por espectroscopia Mössbauer.**
- 131 García Sevilla, J. A.:  
**Receptores opiáceos, endorfinas y regulación de la síntesis de monoaminas en el sistema nervioso central.**
- 132 Rodríguez de Bodas, A.:  
**Aplicación de la espectroscopia de RPE al estudio conformacional del ribosoma y el tRNA.**
- 136 Aragón Reyes, J. J.:  
**Interacción del Ciclo de los Purín Nucleótidos con el Ciclo del Acido Cítrico en Músculo Esquelético de Rata durante el Ejercicio.**
- 139 Genís Gálvez, J. M.:  
**Estudio citológico de la retina del camaleón.**
- 140 Segura Cámara, P. M.:  
**Las sales de tiazolio ancladas a soporte polimérico insoluble como catalizadores en química orgánica.**
- 141 Vicent López, J. L.:  
**Efectos anómalos de transporte eléctrico en conductores a baja temperatura.**
- 143 Nieto Vesperinas, M.:  
**Técnicas de prolongación analítica en el problema de reconstrucción del objeto en óptica.**
- 145 Arias Pérez, J.:  
**Encefalopatía portosistémica experimental.**
- 147 Palanca Soler, A.:  
**Aspectos Faunísticos y Ecológicos de Carábidos Altoaragoneses.**
- 150 Vioque Cubero, B.:  
**Estudio de procesos bioquímicos implicados en la abscisión de la acetuna.**
- 151 González López, J.:  
**La verdadera morfología y fisiología de Azotobacter: células germinales.**
- 152 Calle García, C.:  
**Papel modulador de los glucocorticoides en la población de receptores para insulina y glucagón.**
- 154 Alberdi Alonso, M.<sup>a</sup> T.:  
**Paleoecología del yacimiento del Neógeno continental de Los Valles de Fuentidueña (Segovia).**
- 156 Gella Tomás, F. J.:  
**Estudio de la fosforilasa kinasa de hígado y leucocitos: purificación, características y regulación de su actividad.**
- 157 Margalef Mir, R.:  
**Distribución de los macrofitos de las aguas dulces y salobres del E. y NE. de España y dependencia de la composición química del medio.**
- 158 Alvarez Fernández-Represa, J.:  
**Reimplantación experimental de la extremidad posterior en perros.**
- 161 Tomás Ferré, J. M.<sup>a</sup>:  
**Secreción y reutilización de trifosfato de adenosina (ATP) por sinaptosomas colinérgicos.**
- 163 Ferrándiz Leal, J. M.:  
**Estudio analítico del movimiento de rotación lunar.**

- 164 Rubió Lois, M.; Uriz Lespe, M.ª J., y Bibiloni Rotger, M.ª A.:  
**Contribución a la fauna de esponjas del litoral catalán. Esponjas córneas.**
- 165 Velasco Rodríguez, V. R.:  
**Propiedades dinámicas y termodinámicas de superficies de sólidos.**
- 166 Moreno Castillo, I.:  
**Ciclo anual del zooplancton costero de Gijón.**
- 168 Durán García, S.:  
**Receptores insulínicos en hipotálamo de rata: localización subcelular y mecanismo (s) de regulación.**
- 169 Martínez Pardo, R.:  
**Estudio del mecanismo secretor de hormona juvenil en oncopeltus fasciatus.**
- 171 García Jiménez, J.:  
**Fusariosis del gladiolo: un estudio preliminar.**
- 173 Fernández Aláez, C.:  
**Análisis estructural en sabinares de la provincia de León.**
- 174 Furio Egea, J.:  
**Citokinas en agrilos. Actividades endógenas, efectos fisiológicos y aplicaciones.**
- 180 Moreno Rodríguez, J. M.:  
**Estudios ecológicos en jarales (clitium laurifolii): Variación anual de algunos factores del entorno y manifestaciones fenológicas.**
- 182 Pons Vallés, M.:  
**Estudios espectroscópicos de fosfolípidos polimerizables.**
- 183 Herrero Ruiz de Loizaga, V. J.:  
**Estudio de reacciones químicas por haces moleculares. Aplicación a la reacción  $C_2H_5Br + KBr + C_2H_5$ .**
- 193 Martín García, V. S.:  
**Utilización sintética en química orgánica de metales pesados como catalizadores. Oxidación asimétrica.**
- 195 Badía Sancho, A.:  
**Receptores presinápticos en el conducto deferente de rata.**
- 196 Estévez Toranzo, A.:  
**Supervivencia de patógenos bacterianos y virales de peces en sistemas de cultivo.**







