

ACTUALIZACIONES

I. BIOQUIMICA DEL COLAGENO

Dr. Héctor Alfredo Molina, Profesor Adjunto.

Cátedra de Química Biológica.

Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

RESUMEN

El tejido conectivo contiene reticulina, colágeno y elastina. Las fibras del colágeno predominan en estos tejidos y el colágeno es la escleroproteína más abundante de nuestro organismo. Conociendo el contenido de hidroxiprolina de un tejido se lo refiere a su proporción en colágeno.

Es de suma importancia actualizarse sobre la bioquímica de esta proteína por ser uno de los componentes que a modo de barrera previenen sobre agentes productores de distintas enfermedades encerradas confusamente como colagenopatías.

SUMMARY

Connective tissue contains collagen, reticulin and elastic fibers. Collagen fibers predominate in connective tissue, and collagen, the protein of which the fibers are formed, is the albuminoid type and is the most abundant protein in the body. The collagen of tissues is obtained by determination of their hydroxyproline contents.

Connective tissues provide barriers against infective agents and are of primary importance in wound healing. They are involved in the so-called collagen diseases. So it's very important to know the new information relative to the collagen.

INTRODUCCION

El tejido conectivo está formado esencialmente por: a) la sustancia fundamental o amorfa, y b) fibras representadas por colágeno, reticulina y elastina.

La sustancia amorfa es la matriz sobre la que se forman las fibras, de las cuales las del colágeno son las más estudiadas.

COLAGENO

Cuantitativamente el colágeno es la proteína que más abunda en el cuerpo, ya que representa alrededor de un tercio de la proteína total. Filogenéticamente es una proteína hallada en todos los vertebrados y en algunos invertebrados. El vocablo colágeno significa "formador de colas", por la propiedad que tiene la piel de animales, huesos, tendones, etc., de formar colas y gelatinas. Pero estrictamente el colágeno responde sólo a las fibras de tales tejidos.

Propiedades físico-químicas

a) Funcionalmente es una proteína estructural o de sostén y soporte primario de los tejidos, semejante a la celulosa vegetal. Es una escleroproteína.

b) Cuando se lo encuentra maduro y al estado nativo es fibroso y extracelular e insoluble en agua y soluciones salinas, en condiciones fisiológicas.

c) Si se lo calienta sumergido en agua a 65° C se encoge un tercio de su longitud por contracción de fibras: "temperatura de encogimiento".

d) Si se lo calienta, en agua, a 100° C sus fibras se desnaturalizan y se convierten en gelatina, que es una proteína soluble desnaturalizada. Soluciones al 4 % de gelatina (o más) enfriadas a menos de 15° C forman un "gel elástico" característico, usada antes como pasta ectográfica.

e) El colágeno llevado a pH muy ácido o muy alcalino puede hincharse absorbiendo agua hasta 10 veces su volumen, aun sin disolverse.

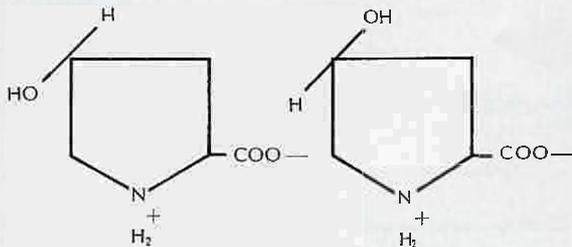
f) Las cadenas peptídicas del colágeno contienen, además de las clásicas uniones $\text{CO}-\text{NH}-$, propias de las proteínas, uniones éster y glutamíamida.

g) El colágeno carece de triptófano y cisteína; un tercio de sus aminoácidos son glicocola y el otro tercio son prolina, hidroxiprolina y alanina, completando el tercio restante los diferentes aminoácidos. En realidad la configuración de sus cadenas está determinada por sólo 4 aminoácidos: Gly, Pro, Hipro y Ala. La cantidad de aminoácidos ácidos y básicos es equimolecular.

h) Por hidrólisis especial se obtienen algunos dipéptidos como: Gly-Pro, Hipro-Gly, Ser-Gly, Ala-Gly, Tre-Gly, siendo el primero y el segundo los más importantes cuantitativamente.

i) La Hipro se forma a partir de la Pro, luego que ésta se ha incorporado a la cadena proteica. La biosíntesis de colágeno requiere aportes de vitamina "C" y adecuada concentración de hidrógeno.

j) La cantidad de Hipro de un tejido se considera como un índice del contenido del colágeno del mismo. Este aminoácido se encuentra en forma "cis" (90 %) y en forma "trans" (10 %).



k) Las uniones peptídicas en el colágeno están sometidas a las dos restricciones comunes a todas las proteínas; por un lado, los ángulos de unión de los diferentes elementos en secuencia primaria, dando valores fijos, y por otro lado, la rigidez de la unión peptídica por su estereoisomería. Pero además para el colágeno existe una tercera restricción impuesta por la alta concentración de Pro e Hipro, dado que no puede haber libre rotación alrededor del eje C-N del anillo pirrolídico. Pero aun con estas tres restricciones hay cierta flexibilidad en la cadena de colágeno.

Fibras en el colágeno

El colágeno aparece en los tejidos como material fibrilar enteramente extracelular. El tejido que forma el colágeno sirve de nido para las células conectivas. Hay colágeno en todos los tejidos conectivos, pero en proporciones diferentes.

Ejemplos:

1. Tendones: 100 % de colágeno y fibras de 100 a 200 micrones de diámetro.
2. Corión de piel: 80 % de colágeno y de 10 a 50 micrones de diámetro.

3. Cartílagos: 50 % de colágeno.

4. Hueso y dientes: 30 % de colágeno (cifras menores en dientes).

En las dos últimas las fibras tienen entre 1 a 10 micrones de diámetro.

En ciertos tejidos conectivos se han observado fibras de colágeno de 0,5 a 0,2 micrones. En realidad las fibras de colágeno aparecen en una continua degradación de diámetro, aun en una sola molécula de colágeno, por ejemplo de 14 Å a 1 mm. Por tal motivo histoquímicamente se clasifican en: fibras (las de mayor tamaño), siguen las fibrillas, filamentos y, finalmente, las de menor tamaño, las protofibrillas.

No siempre se disponen uniformemente las fibras, así en los tendones son haces paralelos y en cartílagos o tejidos conectivos laxos forman una malla irregular alineada en todas las direcciones.

Hay dos formas naturales en el colágeno:

- a) Fibras maduras insolubles o colágeno propiamente dicho.
- b) Fibras inmaduras solubles o tropocolágeno, extraído de tejidos en rápido crecimiento o formas jóvenes. Se puede agregar también una tercera.
- c) Fibras modificadas, atribuibles a artificios de técnica.

Las principales diferencias entre colágeno y tropocolágeno hasta ahora conocidas son las siguientes:

Tropocolágeno

Se sintetiza en el interior de las células y luego pasa a ser extracelular y rápidamente convertido en fibras de colágeno. Sin embargo sufre una pequeña hidrólisis intracelular y sus metabolitos pueden pasar a sangre y orina. La estructura en bandas es semejante al colágeno con residuos de aminoácidos polares concentrados y no polares también formando una red característica. Las bandas "A" oscuras y anchas corresponden a la región polar y las bandas "B" claras y angostas corresponden a la región no polar. Si se precipita tropocolágeno con una solución 0,15 M de NaCl y se examina al microscopio electrónico, se observan bandas semejantes al colágeno y espaciamientos de 640 Å.

A una temperatura de 0° C se aísla tropocolágeno soluble, presentando una gran viscosidad en agua. Químicamente el tropocolágeno es una molécula formada por tres cadenas peptídicas entrelazadas entre sí, formando una espiral, cada una con un P.M. de 10.000 (total: 30.000).

Una solución neutra de tropocolágeno al 0,2 % y calentada a 37° C se convierte en forma reversible en un gel elástico. También las fibras de tropocolágeno a un pH de 4 y a 40° C dan soluciones de gelatina.

Colágeno

En mamíferos adultos, salvo excepciones, todas las fibras son de colágeno, maduro e insoluble. Estas fibras son gruesas y finas, aparien-

cia tosca no ramificada y coloreable de rojo por la técnica de Von Gieson. Su superficie presenta estriaciones transversales regulares. Forma bandas A oscuras, anchas y largas, y bandas B claras, angostas y cortas. Las bandas se repiten a intervalos de 640 Å. Dentro de cada banda aparecen también una serie de "sub-bandas" claras oscuras paralelas que se alternan también en forma regular, llegando a contarse en 640 Å entre 5 a 15 sub-bandas, nombrándose con letras a, b, c... etcétera.

Si al colágeno se lo precipita con solución de NaCl 0,3 M se observan al microscopio electrónico bandas de 210 Å; si se usan soluciones de NaCl 1 M, no aparecen bandas, y si se precipita con glucoproteínas (condroitín sulfatos) se obtienen bandas de 2.600 Å, llamadas "fibras de Gran Espacio".

Finalmente, si al colágeno se lo precipita con ATP se observan bandas superiores a 2.600 Å, llamadas "segmentos de Gran Espacio".

Es interesante destacar que tanto colágenos como tropocolágenos contienen hasta 1% de glúcidos (hexosas), enlazados por covalencia a la cadena polipeptídica, prevaleciendo unidades glucopiranosil y galactopiranosil.

Se sabe actualmente que la unión glucosídica se realiza con el hidroxilo del aminoácido hidroxilisina.

COLAGENASA

El colágeno no es sustrato verdadero como lo es la albúmina o la Hb. Ya se han descrito las propiedades, aún discutidas, del colágeno. De todas las formas de colágeno conocidas, aquellas que mantienen la estructura helicoidal, natural, son susceptibles del ataque de la pepsina y tripsina sólo en determinadas zonas (telepéptidos), dejando en libertad macromoléculas que semejan al tropocolágeno. Sin embargo las formas degradadas y desnaturalizadas de colágeno, que han perdido la estructura 2ª y 3ª parcial o totalmente son con facilidad hidrolizadas por la pepsina y tripsina. Sin dudas, para llamarse "colagenasa" debe hidrolizar al colágeno nativo, soluble o no a un pH fisiológico. En el hombre es más correcto hablar de enzimas con actividad de colagenasas. Hay algunas fuentes de colagenasas obtenidas de filtrados de cultivos de *Clostridium histolyticum* y *Perfringens* tipo A, que son las usadas con más frecuencia.

Debe haber, no obstante, colagenasas para la remodelación fisiológica y constante de huesos y su colágeno. Debe intervenir una colagenasa para la involución del útero luego del parto o para la reabsorción de la cola de los renacuajos durante su metamorfosis; en este último caso la degradación se produce hasta estado de aminoácidos.

Parece luego claro que la presencia de colagenasa activa en tejidos animales debe estar acompañada de una eficiente regulación para mantener la integridad del animal, lo que presume que la enzima debe estar perfectamente localizada y ser producida en cantidad suficiente para su acción.

Todavía el panorama es confuso porque no se conoce un método para estudiar colagenasa *in vivo*. Es un tema excitante para los bioquímicos.

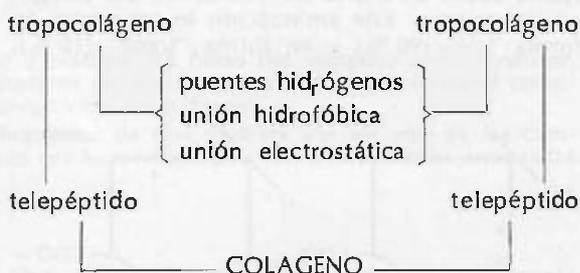
Las colagenasas del *Clostridium* hidrolizan todos los colágenos: nativos o degradados, solubles o no, gelatinas, etc., pero hasta péptidos y no hasta aminoácidos. Estas colagenasas pueden hidrolizar a la reticulina, pero no a la elastina, queratinas, fibrinas, hemoglobinas, ni albúminas. Luego son bastante específicas.

CONCLUSIONES

El pasaje de tropocolágeno extracelular a colágeno atrae a los investigadores. Se sabe que la mayoría de los colágenos son sintetizados por los fibroblastos, pero todavía no se ha identificado el mRNA específico para la molécula de esta escleroproteína.

Desde el punto de vista estructural, el colágeno es una molécula excepcional, corroborado por el diagrama de difracción de Rx.

Sin tratar de dar un modelo de ordenamiento molecular se puede resumir de la siguiente forma la molécula organizada de colágeno:



Y es interesante detallar los aminoácidos del colágeno del hueso humano, donde los números representan los residuos de aminoácidos por mil unidades de hidrólisis.

Gly	320	Ala	110
Glu	72	Asp.	47
Lis	28	Leu	26
Fen	14	Lleu	13
Hilis	4	Tir	4
Pro	124	Hipro	101
Arg	47	Ser	36
Val	24	Treo	18
His	6	Met	5

Todo lo que contribuya a un mejor conocimiento de esta proteína fibrilar insoluble ayudará en la interpretación bioquímica clínica de numerosas colagenopatías cuya etiología y diagnóstico todavía concurren por la senda de lo inexplorado y débilmente interpretado.

BIBLIOGRAFIA

1. "Crosslinking of Collagen". Original Articles Series, 2, 5-9, 1980. Nueva York.
2. "The Proteins". Academic Press, 1971-1980.
3. "The Epidermis". Academic Press, 1980.