UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Contribución al estudio de la función de las elastasas en la degradación de elastina aislada de piel humana

LEIDY CAROLINA GARCÍA MANOSALVA

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia

2024

Contribución al estudio de la función de las elastasas en la degradación de elastina aislada de piel humana

LEIDY CAROLINA GARCÍA MANOSALVA

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Farmacéuticas

Directora:
Dr. rer. nat. Angela Cristina Mora Huertas

Línea de Investigación:
Métodos para la evaluación de actividad biológica
Grupo de investigación en Tecnologías analíticas farmacéuticas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá D.C., Colombia
2024

A mi madre que siempre creyó en este proceso académico, a mi padre por su acompañamiento, y a mi esposo por su paciencia y colaboración

Agradecimientos

A Dios por proveerme las capacidades y los medios necesarios para lograr culminar este proceso.

A mi esposo, padres y familiares por el apoyo incondicional en los momentos difíciles.

A la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias - Departamento de Farmacia por darme la oportunidad de cursar el programa académico con los mejores docentes. Igualmente agradezco el soporte económico para desarrollar las diferentes actividades recibido a través del proyecto "*Determinación de nuevas dianas para la prevención y tratamiento cosmético del envejecimiento cutáneo*" Código Hermes 51042, financiado por la Convocatoria para el apoyo a proyectos de investigación, creación artística e innovación de la Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia – 2020.

A mi directora de trabajo de grado, la profesora Angela Cristina Mora Huertas, por su disposición, tiempo, conocimiento y constante motivación.

Al profesor Luis Fernando Ospina Giraldo, que gran ser humano y profesional, mi más profundo agradecimiento.

A los profesores Clara Eugenia Plazas Bonilla, Edelberto Silva Gómez, Fabio Aristizábal, Mary Trujillo González y María Helena Arias Marciales, por permitirme el acceso a los recursos instrumentales empleados en el desarrollo de esta tesis.

Al laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Departamento de Farmacia por el desarrollo de las pruebas de tinción.

Al doctor Leonardo Rojas Rojas y al Hospital Universitario Clínica San Rafael de Bogotá, por la colaboración para la obtención de las muestras de piel.

A la Secretaría de Salud de Boyacá y al Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses por haberme brindado la oportunidad de iniciar, asistir y finalizar el programa académico.

A Mary Daniella Hernández Tovar y Diego Alejandro Martínez Ruíz por su colaboración y disposición con el proyecto.

Resumen

La elastina es una proteína de la matriz extracelular que provee elasticidad y resiliencia a los tejidos. Durante su tiempo de vida media (74 años), continuamente es degradada principalmente por enzimas denominadas elastasas, lo que se asocia con la aparición de signos del envejecimiento cutáneo, desarrollo de enfermedades como aneurismas y aterosclerosis, entre otras. Es necesario entender los factores que influyen en la proteólisis enzimática de las fibras de elastina para en un futuro, poder retrasar o controlar este proceso.

Se han identificado en la piel doce elastasas pertenecientes a tres diferentes familias de proteasas: cistein, serin y metaloproteasas. El tejido de origen de la elastina y la integridad de la fibra pueden condicionar la acción de las enzimas; pocos reportes han evaluado el efecto de estos factores sobre la potencia elastolítica, y algunos han encontrado comportamientos disimiles entre ellos.

Para contribuir a la comprensión del efecto de la integridad de la fibra de elastina sobre la actividad de las elastasas, en esta tesis inicialmente se implementaron un método de aislamiento de elastina y dos metodologías analíticas para hacer el seguimiento a la degradación inducida por Catepsina G y V, Metaloproteinasa de la matriz 9 y Elastasa Pancreática. Los resultados obtenidos permiten concluir que el daño previo de la fibra no influye igual en la actividad de todas las enzimas y es necesario continuar estudiando la interacción entre tipo de elastasa y grado de degradación de la fibra, con el objetivo de establecer las enzimas de mayor relevancia en el inicio de la degradación de la elastina.

Palabras clave: Elastina, Elastasas, integridad de fibra, potencia elastolítica.

Abstract

Contribution to understanding the role of elastases in the degradation of elastin derived from human skin

Elastin is an extracellular matrix protein that provides elasticity and resilience to tissues. During its half-life (74 years), it is continuously degraded, mainly by enzymes called elastases. Elastin damage is associated with the appearance of signs of skin ageing and the development of diseases such as aneurysms and atherosclerosis, among others. Understanding the factors that influence the enzymatic proteolysis of elastin fibres is crucial for developing strategies to delay or control this process.

Twelve elastases belonging to three different families of proteases have been identified in the skin: cysteine, serin and metalloproteases. The tissue of elastin's origin and the fibre's integrity can condition the enzymes' action. Only some researchers have evaluated the effect of these factors on elastolytic activity, and some have found dissimilar behaviours between them.

To contribute to the understanding of the effect of the integrity of the elastin fibre on the activity of elastases, in this thesis, an elastin isolation method and two analytical methodologies were initially implemented to monitor the degradation induced by Cathepsin G and V, Matrix Metalloproteinase 9 and Pancreatic Elastase. The results allow us to conclude that previous damage to the fibre does not influence the activity of all enzymes in the same way, and it is necessary to continue studying the interaction between the type of elastase and the degree of fibre damage to establish the most relevant enzymes at the beginning of elastin degradation.

Keywords: Elastin, Elastases, fibre integrity, elastolytic power.

Contenido

Pág.

Resumen I

Abstract II

Listado de figuras V

Listado de gráficas VI

Lista de Símbolos y abreviaturas VII

Introducción 9

1. Marco Teórico 12

1.1 Estructura de la piel 12

1.2 Matriz extracelular en la piel 13

1.3 Fibras elásticas 14

1.4 Elastina 16

1.5 Degradación de elastina 20
- 1.5.1 Serín proteasas 21
- 1.5.2 Cisteín proteasas 24
- 1.5.3 Metaloproteasas de Matriz 26
- 1.5.4 Proteasas aspárticas 30

1.6 Envejecimiento cutáneo y degradación de elastina 31

1.7 Estudio de comparación de la actividad de elastasas en elastina 35

2. Objetivos 37

2.1 Objetivo General 37

2.2 Objetivos Específicos 37

3. Materiales y Métodos 38

3.1 Materiales 38
- 3.1.1 Reactivos 38
- 3.1.2 Enzimas, proteínas y aminoácidos 39
- 3.1.3 Buffers y soluciones 40
- 3.1.4 Muestras de piel 40

3.1.5 Instrumentos 41

3.2 Métodos 42
3.2.1 Aislamiento de elastina..... 42
3.2.2 Determinación cualitativa de elastina y colágeno. 43
3.2.3 Digestión enzimática de elastina. 43
3.2.4 Cuantificación de proteína total solubilizada mediante el método de ninhidrina 44
3.2.5 Cuantificación de desmosina..... 45
3.2.6 Tratamiento estadístico de datos..... 46

4. Resultados y discusión 47

4.1 Implementación de un protocolo para el aislamiento de elastina..... 47
4.1.1 Cantidad de elastina obtenida a partir de muestras de piel 52
4.1.2 Identificación de elastina y colágeno en el material aislado..... 53

4.2 Comparación de la actividad elastolítica de elastasas..... 55
4.2.1 Método gravimétrico 56
4.2.2 Contenido de proteína solubilizada mediante el método de ninhidrina. 57
4.2.2.1 Implementación de métodos analíticos para la determinación del grado de degradación de elastina..... 57
4.2.2.2 Determinación de la influencia de la integridad de la fibra sobre la actividad elastolítica de elastasas. 60
4.2.2.3 Comparación del efecto de tipo de enzima e integridad de la fibra sobre la actividad elastolítica de las elastasas..... 66

5. Conclusiones y recomendaciones 71

5.1 Conclusiones 71

5.2 Recomendaciones..... 71

Anexo 1: Comparación estudios actividad elastolítica de enzimas 73

6. Bibliografía 81

Listado de figuras

Pág.

Figura 1. Estructura de la piel con compartimentos tisulares. 12

Figura 2. Elastogénesis. 15

Figura 3. Formación del entrecruzamiento en elastina. 19

Figura 4. Estructura de las metaloproteasas. 28

Figura 5. Micrografías electrónicas de barrido de elastina de piel humana. 33

Figura 6. Muestra de piel después de su tratamiento con NaCl 1M. 49

Figura 7. Muestra de piel después de adición de solución de Tiocianato de sodio 2 N. 50

Figura 8. Muestra de piel tratadas con solución de NH_4OH 0,32 M en NaCl 1 M. 51

Figura 9. Microfotografías de tinción de muestra obtenidas del proceso de aislamiento. 54

Figura 10. Espectros UV obtenidos por RP-HPLC-DAD. 59

Figura 11. Cromatograma para estándar de Desmosina..... 59

Listado de gráficas

Gráfica 1. Contenido de elastina en piel humana de diferentes edades. 53

Gráfica 2. Resultados método gravimétrico degradación enzimática de elastina por Cat G, Cat V, EP y MMP-9. 56

Gráfica 3. Curva de Calibración de Albumina, Método de ninhidrina.....58

Gráfica 4. Curva de Calibración Desmosina método HPLC UV-VIS.....60

Gráfica 5. Elastina solubilizada por Cat G de acuerdo con el grupo etario. 62

Gráfica 6. Elastina solubilizada por Cat V de acuerdo con el grupo etario.....63

Gráfica 7. Elastina solubilizada por MMP-9 de acuerdo con el grupo etario. 65

Gráfica 8. Elastina solubilizada por EP de acuerdo con el grupo etario. 66

Gráfica 9. Diagrama de caja del efecto de las enzimas Cat G, Cat V, EP y MMP-9, en relación con la integridad de la fibra de elastina 67

Gráfica 10. Comparación de la solubilización de elastina por Cat G, Cat V y MMP-9 69

Gráfica 11. Comparación contenido DES/IDES según grupo etario y tipo de enzima. 70

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura / Símbolo	**Término**
AFM	Acetato de fenilmercurio
Cat G	Catepsina G
Cat V	Catepsina V
Cela1	Elastasa 1 similar a quimotripsina
DES	Desmosina
DTT	Ditiotreitol;
EP	Elastasa pancreática
EBP	Proteína de unión a elastina
GAG	Glucosaminoglicanos
HLE	Elastasa de neutrófilos humana
IDES	Isodesmosina
MMP	Metaloproteasa
MEC	Matriz extracelular
NEP	Neprilisina
RNAm	Ácido Ribonucleico mensajero
PR3	Proteinasa 3
TE	Tropoelastina
TFA	Ácido trifluoroacetico
TR	Tripsina
°C	Grados Celsius
mg	Miligramos
mL	Mililitros
g	Gramos
µL	Microlitros
cm^2	Centímetro cuadrado
nM	Concentración nanomolar
RSD	Coeficiente de variación
s.e.m	Error estándar de la media
ddH_2O	Agua Tipo I

Abreviaturas aminoácidos

Abreviatura	**Término**
Ácido Aspártico	Asp
Ácido Glutámico	Glu
Alanina	Ala
Arginina	Arg
Asparagina	Asn
Cisteína	Cys
Fenilalanina	Phe
Glicina	Gly

Glutamina	Gln
Histidina	His
Isoleucina	Ile
Leucina	Leu
Lisina	Lys
Metionina	Met
Prolina	Pro
Serina	Ser
Tirosina	Tyr
Treonina	Thr
Triptófano	Trp
Valina	Val

Introducción

La elastina es una proteína de la matriz extracelular cuya compleja estructura le permite proveer elasticidad y resiliencia a los tejidos y a la vez, le confiere una alta resistencia a la degradación e insolubilidad, reportándose para esta proteína tiempos de vida media de aproximadamente 74 años[1]. La formación de fibras de elastina en la mayoría de tejidos de los mamíferos alcanza su máximo en el periodo neonatal, sin embargo, en adultos continua la expresión de su RNAm pero a niveles bajos[2], el ensamblaje está inhibido por factores postranscripcionales[3] y deriva generalmente en fibras elásticas con funcionalidad límitada[4], lo que contribuye a que la piel de sujetos jóvenes muestre una red de elastina y colágeno más densa en comparación con la observada en sujetos de edad avanzada[5].

Esta proteína está continuamente sometida a procesos de proteólisis mediados principalmente por enzimas denominadas elastasas. Como resultado de la elastólisis se asocia la aparición de signos de envejecimiento cutáneo, desarrollo de enfermedades como aneurismas y aterosclerosis, entre otros. Similar a lo encontrado en la mayoría de los órganos, en la piel el daño a la fibra elástica no puede ser corregido y teniendo en cuenta que no se da la regeneración de estas fibras, es importante entender los factores que influyen en el proceso de degradación de las fibras para en un futuro, intervenir este mecanismo y retrasar el proceso de envejecimiento o el desarrollo de condiciones patológicas asociados a la degradación de las fibras de elastina.

Actualmente se han identificado en piel humana doce elastasas pertenecientes a tres familias diferentes: Cisteín proteasas, serín proteasas y metaloproteasas, de las cuales bajo condiciones fisiológicas se expresan: MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12, MMP-14, HLE, PR 3, Cat G, Cat K, Cat L, Cat S y Cat V[4]. El mecanismo molecular de su actividad elastolítica y su preferencia por algunos aminoácidos para ejercer la ruptura de los enlaces peptídicos en la elastina han sido previamente estudiados. Se ha identificado que el tejido de origen de la elastina condiciona la acción de las enzimas, dadas las diferencias en las estructuras organizacionales del tejido[6] . Sin embargo, existen pocos reportes en los que se compare la potencia de la actividad elastolítica entre enzimas y en algunos casos, los resultados obtenidos muestran comportamientos disímiles; por ejemplo, Schmelzer *et al.,*[7] reporta que la HLE no degrada elastina intacta y Cat G si lo hace, pero en el estudio

realizado por Boudier *et al.*[8], se identificó que Cat G fue menos activa sobre elastina de pulmón que HLE.

En la literatura también se encuentran discrepancias en la actividad de otras elastasas como MMP-7[9], MMP-9 [10,11], MMP-12 y Cat G [7,8]. Los estudios reportados han evaluado cualitativamente la actividad de estas enzimas en elastina de diferentes fuentes y métodos de obtención de la fibra. Según los resultados del estudio realizado por Schmelzer *et al.*[7] el método de obtención de la fibra de elastina tiene efectos en la calidad morfológica de la misma, y esto a su vez podría generar variaciones en la actividad elastolítica de las enzimas; la HLE degrada elastina obtenida por el método Starcher pero no tuvo acción sobre la fibra intacta de elastina obtenida por el nuevo método de aislamiento reportado por los autores. Esto también ha sido descrito en un estudio cualitativo de la actividad de la enzima neprilisina[12] y más recientemente, en un estudio cuantitativo que compara la actividad elastolítica de Cat K, S y V en elastina intacta y degradada obtenida de piel humana[5].

Sin embargo, no existen estudios cuantitativos para todas las enzimas que confirmen el efecto de la integridad de la fibra elástica sobre su actividad elastolítica, por lo que es necesario determinar la potencia elastolítica de cada enzima en fibras de elastina con diferente integridad, lo cual aporta información sobre la correlación entre la potencia de las enzimas y el grado de deterioro de la fibra.

Teniendo en cuenta el daño estructural de la superficie de las fibras de la elastina disponible comercialmente, durante el desarrollo de esta tesis se implementó un método de aislamiento de fibras de elastina a partir de muestras de piel humana, que conserva la integridad de la estructura de la fibra de elastina. La elastina aislada de muestras de piel provenientes de adultos jóvenes (26 a 31 años) y adultos mayores (66 a 86 años) fueron sometidas a degradación empleando Cat G, Cat V, MMP-9 y EP. Para realizar el seguimiento de la cantidad de elastina solubilizada por acción de las enzimas, se determinó la variación de peso del remanente de las muestras y se implementaron en el grupo de investigación el método de ninhidrina para la determinación de proteína total solubilizada y un método cromatográfico para la determinación de desmosina e isodesmosina. Los resultados obtenidos mediante el método de ninhidrina indican que ninguna de las elastasas presentes en la piel tiene una mayor actividad elastolítica que la

EP. Adicionalmente, cada una de las elastasas presenta un comportamiento diferente frente a la integridad de la fibra. Mediante el análisis estadístico de los resultados de proteína solubilizada, se demostró que el grado de degradación de la elastina por las enzimas estudiadas depende de la interacción entre el tipo de elastasa y el nivel de daño previo presentado por la fibra elástica; por lo tanto, no es posible generalizar que el deterioro de la estructura fibrilar de la elastina vinculado al envejecimiento incremente de la misma forma la actividad de todas las elastasas. Las enzimas que mostraron mayor degradación de elastina de adultos jóvenes fueron la Cat V y MMP-9, por lo que se sugiere continuar estudiando si su actividad es superior a la de otras elastasas presentes en la piel con el objetivo de establecer su relevancia en el inicio de la degradación de la elastina.

1. Marco Teórico

1.1 Estructura de la piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, y representa alrededor del 12 % al 16 % del peso corporal de un adulto[1]. Está constituida generalmente, por tres capas: epidermis, dermis y tejido subcutáneo[13] o hipodermis, nombradas en su orden desde la capa superficial hasta la más profunda Figura 1.

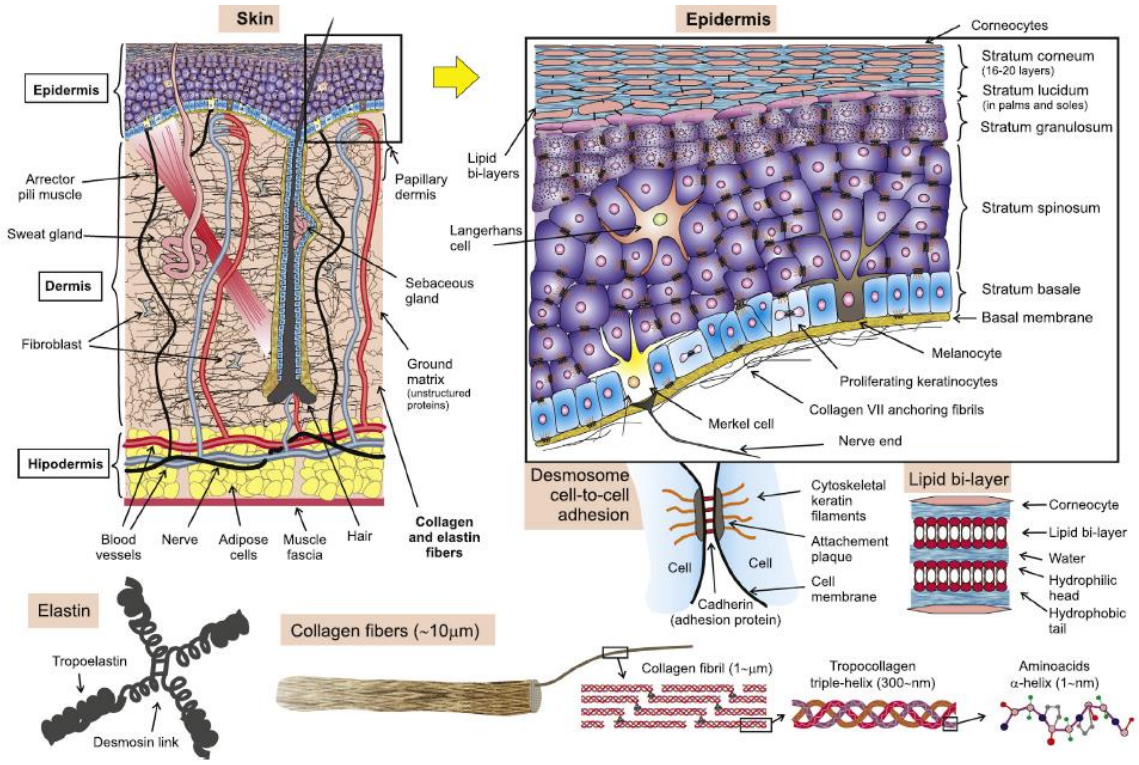


Figura 1. Estructura de la piel con compartimentos tisulares.
Tomada de "The mechanical behavior of skin; structures and models for the finite element analysis" por "J. M. B. et. al", 2017. Computers and Structures, p 77, doi: 10.1016/j.compstruc.2017.05.003. Copyright, 2017[13].

La epidermis tiene como función proteger al cuerpo de sustancias extrañas y retener la humedad[14], es una capa sin irrigación vascular, con inervación de fibras amielínicas que

cruzan la unión dermo-epidérmica y se extiende entre los queratinocitos[15], que es nutrida por procesos de difusión desde la dermis[16].

La dermis comprende la mayor parte de la piel humana[14], siendo 15 a 40 veces más gruesa que la epidermis[13], aunque su grosor varía de acuerdo con su ubicación, por ejemplo, es de 5 mm en la espalda y muslos y de 1 mm en los párpados[16]. La dermis contiene proteínas que proporcionan flexibilidad, elasticidad y resistencia a la tracción de la piel; protege al cuerpo de lesiones mecánicas y ayuda a la regulación térmica[14]. La dermis está dividida en dos capas: a) papilar que corresponde a la parte superior de aspecto holgado y, b) reticular que corresponde a la parte más profunda y de consistencia compacta[17]. A su vez, y distribuidos en estas dos capas, está el componente celular, formado principalmente por fibroblastos, macrófagos y mastocitos[13], ubicados principalmente en la capa papilar; y el componente extracelular denominado matriz extracelular (MEC). La MEC está compuesta de glucoproteínas, colágeno y fibras elásticas[18], estas últimas forman una superestructura alrededor de la fibra de colágeno[19]. A diferencia de la epidermis, la dermis presenta inervación nerviosa y vasos sanguíneos, adicionalmente se encuentran glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas y folículos pilosos[18].

La última capa de la piel corresponde al área subcutánea, compuesta de tejido graso para preservar la grasa neutral, amortiguar contra presiones físicas externas, retener humedad y generar calor[13].

1.2 Matriz extracelular en la piel

La MEC en la piel se diferencia a través de las diferentes capas, la epidermis es un compartimento pobre en MEC y varia a través de los diferentes estratos, siendo más lipofílica en las capas superiores y más hidrofílica en las capas inferiores[20].

La MEC a nivel de la dermis está constituida por dos tipos de componentes, los que forman fibras: colágeno, fibrina, fibronectina, vitronectina, elastina y fibrilina[21]; y moléculas estructurales que no forman fibras y componen la sustancia fundamental o amorfa:

principalmente proteoglicanos y glucosaminoglicanos, y proteínas matricelulares que modifican las interacciones entre las células y la matriz[21].

Las proteínas fibrosas definen la rigidez y elasticidad del tejido[21]; dentro de estas proteínas se encuentra el colágeno que constituye el 77 % del peso seco libre de grasa de la piel humana[21], es sintetizado en forma de procolágeno en los fibroblastos y finalmente es convertido en colágeno maduro[22], lo que le confiere características de resistencia frente a la degradación proteolítica[17] (la fibra de colágeno tiene una vida media de 15 años aproximadamente en piel)[23]. Esta proteína presenta estabilidad debido a la formación de una estructura de triple hélice, mediada por el aminoácido glicina ubicado cada tres posiciones[17]. Tiene como función proporcionar resistencia a la tracción y a la deformación plástica[17] en la MEC.

Otra de las proteínas fibrosas que hacen parte del componente extracelular es la elastina, que junto con la fibrilina finalmente formarán las fibras elásticas, que le confiere al tejido dérmico la capacidad de extenderse y retraerse[24] de acuerdo con las condiciones fisiológicas.

La sustancia fundamental o amorfa se ubica entre las fibras y las células de la dermis, y está compuesta de agua, electrolitos, proteínas plasmáticas y principalmente por proteoglicanos y glucosaminoglicanos, que tienen como función la hidratación, mantenimiento del pH y dispersión de fuerzas dentro del tejido[21].

1.3 Fibras elásticas

Las fibras elásticas contienen un núcleo interno insoluble de elastina que representa aproximadamente el 90 % de las fibras maduras, y un manto periférico de microfibrillas ricas en fibrilina[25]. Se forman a partir del ensamblaje de fibrilina (glucoproteínas) en microfibrillas y la asociación de estas microfibrillas con tropoelastina (TE)[26]; este monómero finalmente se entrecruza por la acción de la enzima lisil-oxidasa[17], para formar un núcleo interno de elastina reticulada[27]. Las fibras largas y gruesas de elastina reticulada se entrecruzan con las fibras de colágeno relativamente rígidas[22] para constituir la

estructura de la dermis reticular[24], mientras que en la dermis papilar las fibras elásticas establecen una estructura más fina que se eleva hacia la epidermis[24].

Este proceso de formación de las fibras elásticas se conoce como elastogénesis, y se realiza principalmente a nivel de los fibroblastos de la dermis[24], donde se sintetiza TE en polisomas unidos a la membrana y es transportada a través del aparato de Golgi a vesículas secretoras, que posteriormente son acumuladas en agregados globulares en la superficie celular donde iniciaran el proceso de reticulación, llamado microensamble[28]. Durante este proceso los monómeros se unen a una proteína de unión a elastina con el fin de formar un complejo para protegerlos de la proteólisis[24]. Posteriormente los glóbulos ubicados en la superficie celular se fusionan con la fibra elástica en proceso de desarrollo en la matriz extracelular[28] (Figura 2). Los monómeros se ensamblarán en el núcleo de las microfibrillas, por la acción de la lisil oxidasa para formar los entrecruzamientos de desmosina e isodesmosina[24].

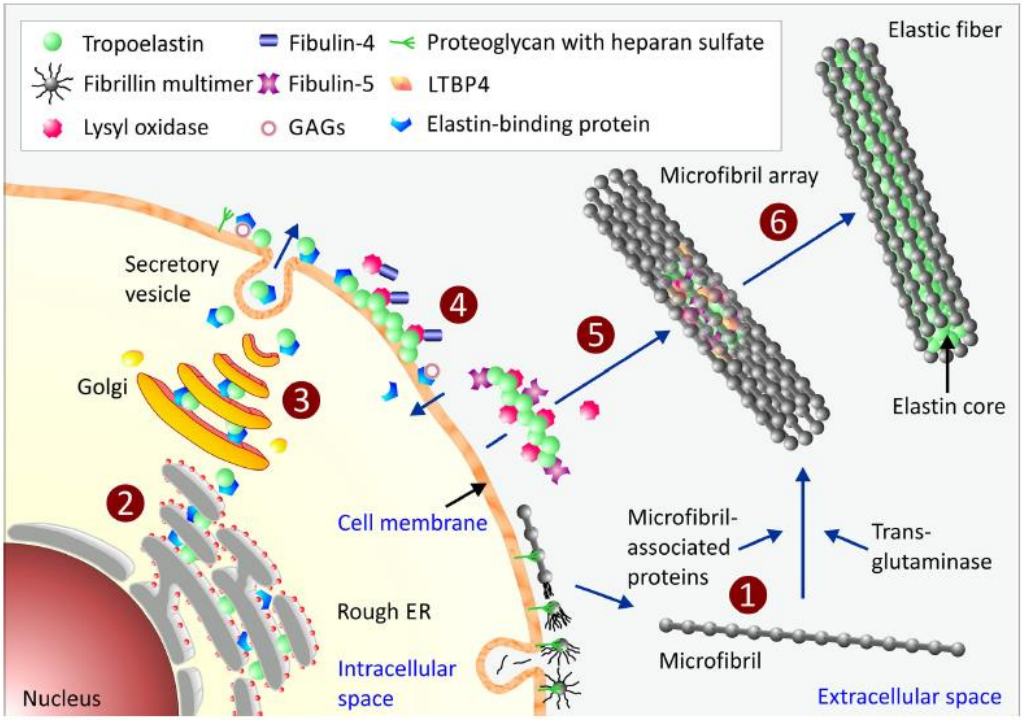


Figura 2. Elastogénesis.

(1) Las fibrilinas y otras proteínas asociadas con las microfibrillas se secretan, se multimerizan en la MEC y se ensamblan en una plantilla microfibrilar. (2) los monómeros de TE se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso donde se asocian

con una chaperona, la EBP. (3) este complejo se transporta a través del aparato de Golgi para ser secretado a la membrana plasmática. (4) la posterior disociación del complejo EBP-TE es inducida por la unión de GAG a EBP. las moléculas de TE se agregan en la superficie celular. la fibulina-4 media la alineación de las moléculas de TE y su interacción con lisil oxidasas. Este paso conduce a la desaminación oxidativa de los residuos de Lys e induce una secuencia de reacciones de condensación que dan lugar a entrecruzamientos intra e intermoleculares. (5) los grupos prematuros de elastina crecen mediante la adición de moléculas de TE y se desprenden de la superficie celular a medida que alcanzan un tamaño crítico. La fibulina-5 guía la elastina prematura hacia el andamio microfibrilar. (6) los grupos de elastina se fusionan en agregados más grandes y se entrecruzan aún más, completando la maduración de la fibra elástica.

Tomado de "Elastic fibers: formation, function, and fate during aging and disease" por "C. S. *et. al*", 2022, *FEBS Journal*, 289, p 3707, doi: 10.1111/febs.15899. Copyright, 2022[4].

Dependiendo del órgano y tejido, las redes de las fibras maduras de elastina difieren en sus configuraciones estructurales, por ejemplo, laminillas fenestradas concéntricas en la túnica media aórtica, redes de fibras reticulares en la dermis o estructuras espaciales en forma de panal en el cartílago elástico[4]. En la piel, la red de fibras elásticas se extiende desde la unión dermo-epidérmica hacia la dermis[22]; las fibras elásticas con mayor diámetro se ubican en la dermis reticular y se conectan a fibras de eulanina de menor diámetro en la dermis papilar y eventualmente con fibras de oxitalan que conectan la dermis papilar y epidermis, en la unión dérmica-epidérmica[26].

1.4 Elastina

La elastina es una proteína que se encuentra en vertebrados, excepto en algunos peces[29], y es la responsable de la elasticidad y resiliencia en tejidos como piel, arterias y pulmones[29]; en la piel representa del 2 % al 8 %, mientras que en otros tejidos como la aorta puede representar del 30 % al 57 % (basado en peso seco del tejido)[30]. Se caracteriza por ser una proteína insoluble, hidrofóbica y extensamente reticulada que forma fibras[29]. Los análisis de elastina humana por racemización de Asp y las mediciones de niveles de ^{14}C en tejidos *post mortem* han identificado una vida media de más de 70 años[4].

La elastina se forma a partir de la TE (~70 kDa)[31], la cual es producida como un monómero no glicosilado en diferentes isoformas, por fibroblastos, células endoteliales, células del músculo liso, condrocitos y queratinocitos[25]. Los aminoácidos más abundantes en este monómero son Gly (~ 30 %), Ala (~ 22.5 %), Val (~ 13 %) y Pro (~ 12.5 %), que juntos constituyen el 78 % de la secuencia de TE[4]. Arg, Gln, Ser, Asp, Cys y Glu constituyen el 3,6 % de la secuencia de TE[32]. Cys solamente se encuentra en el dominio 36[32], Arg y Ser están cerca del dominio de entrecruzamiento[32]. Los residuos de Trp, His y Met no se encuentran en TE, salvo pocas excepciones[4].

A diferencia de los múltiples tipos de procolágeno, los cuales son codificados por diferentes genes[33], solamente un gen es responsable de las 18 isoformas de TE con masas moleculares de 49 a 69 kDa[4]; estas variaciones son el resultado de empalmes alternativos[33]. El gen humano de elastina contiene 34 exones, y seis de ellos (exones 22, 23, 24, 26A, 32 y 33) se han asociado con procesos de empalme alternativos[34].

TE consiste en dominios alternos hidrofóbicos y dominios hidrofílicos que contienen lisina (dominios llamados KA y KP)[25]. Los dominios de KA típicamente contienen pares o tripletes de Lys con dos o tres residuos de Ala y ocasionalmente otros residuos entre ellos. En los dominios KP, hay al menos un residuo de Pro y, a menudo, otro residuo entre dos residuos de Lys[4]. Los dominios hidrofóbicos son responsables de la autoagregación y las propiedades de tracción de la elastina, y los dominios hidrofílicos están involucrados en la reticulación[25].

Particularmente la TE contiene secuencias de aminoácidos que se repiten tales como Val-Pro-Gly-Val-Gly o Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val las cuales forman β-giros que permiten que la cadena polipeptídica se pliegue sobre sí misma y forma β-espirales, una estructura única para la elastina[25].

La elastina se forma a través del entrecruzamiento de su precursor TE, en los residuos de Lys; la elastina madura contiene 14 dominios que están entrecruzados y contribuyen a la formación de redes[7]. Se forma una variedad de enlaces cruzados bi, tri y tetrafuncionales, que hacen que la proteína sea duradera por su resistencia a la escisión enzimática[35].

Adicionalmente, la estructura final tendrá secuencias cortas repetitivas de tres a nueve aminoácidos formando una estructura altamente dinámica y flexible[34].

Intracelularmente la TE se une a una chaperona, la EBP, que la protege de la degradación y coacervación intracelular, así como media la entrega a la membrana celular. Después de la secreción del complejo TE-EBP, este último interactúa con otras dos proteínas unidas a la membrana celular: la sialidasa transmembrana neuramidasa-1 (Neu-1) y la proteína protectora/catepsina A. Estas tres proteínas son las subunidades que forman juntas un heterodímero, el complejo receptor de elastina. Se cree que la posterior unión de glicosaminoglicanos al sitio de galactolectina de la EPB, provoca cambios en la conformación de la proteína de unión a elastina, lo que a su vez desencadena la liberación de TE del complejo[4].

La liberación de TE es seguida por la coacervación, generando un agregado esférico adherido a la superficie celular[4]. La enzima lisil oxidasa cataliza la desaminación oxidativa del grupo ε-amino de los residuos de peptidil Lys para formar el ácido α-aminoadípico-δ-semialdehido, también conocido como residuos de alisina (Lya)[4]. Posteriormente se forman enlaces cruzados intra e intermoleculares mediante condensación no enzimática, lo que produce aldol alisina o deshidrolisinonorleucina, que se condensan aún más para formar enlaces cruzados estables y no reducibles de desmosina (DES) e isodesmosina (IDES), exclusivos en la elastina[36] (Figura 3).

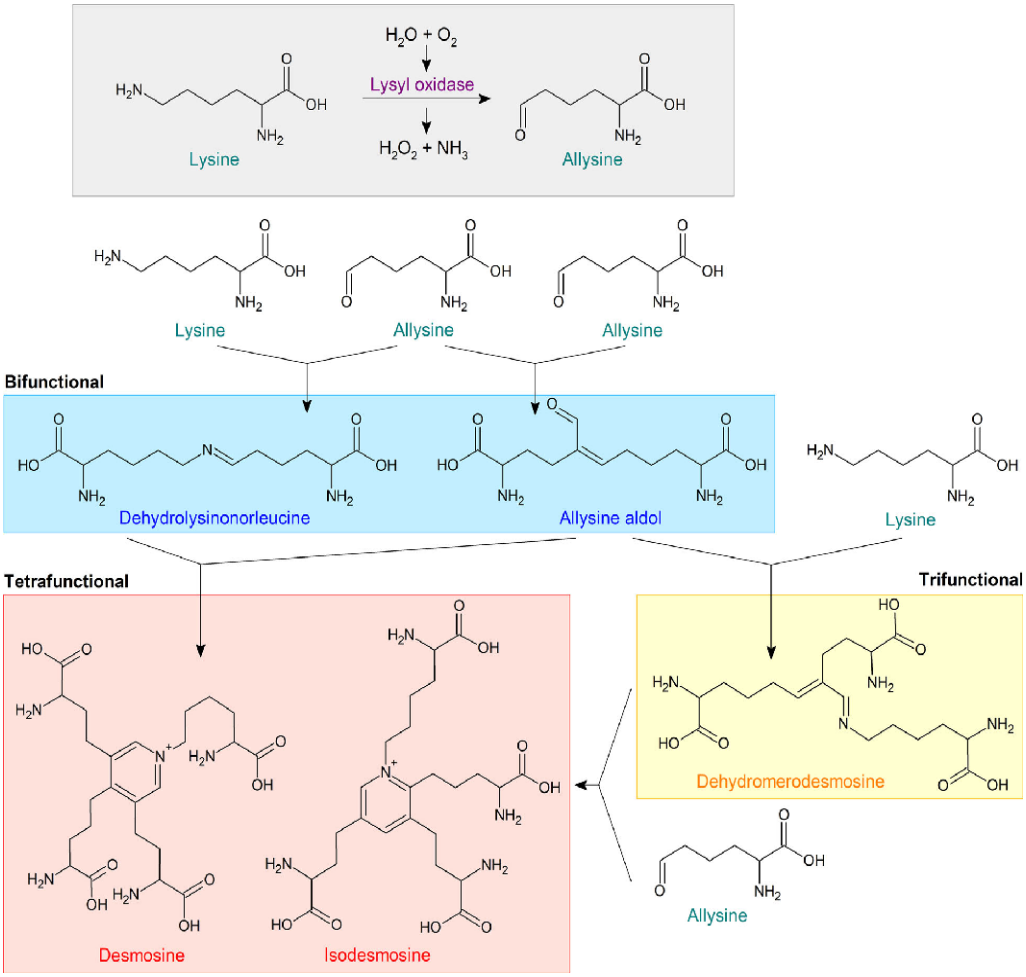


Figura 3. Formación del entrecruzamiento en elastina.
Tomada de "Elastic fibers: formation, function, and fate during aging and disease" por "C. S. *et. al*", 2022, FEBS Journal, 289, p 3710, doi: 10.1111/febs.15899. Copyright, 2022[4].

La adición de moléculas de TE a la elastina prematura continua en la superficie celular, para finalmente ser transportada al espacio extracelular[4]. El origen de las conformaciones α-helicoidales siempre se encuentra en las secuencias de polialanina de los dominios KA. Las hélices se forman presumiblemente tras la coacervación y muy probablemente sean necesarias para la formación de enlaces cruzados intramoleculares bifuncionales, que posteriormente dan lugar a enlaces cruzados funcionales más altos, como DES o IDES, a través de reacciones de condensación adicionales. Los dominios KA 6, 14, 17, 19, 25, 27 y 31 en elastina humana están involucrados en la formación de DES/IDES[4]. Como resultado, la elastina madura contiene 14 dominios que están entrecruzados y contribuyen

a la formación de redes[7] y los hidrolizados de elastina se caracterizan por carecer de His, Trp y Met, pero pueden contener una pequeña cantidad (dos residuos) de Cys[37].

1.5 Degradación de elastina

El entrecruzamiento de DES e IDES junto con el alto porcentaje (~78 %) de aminoácidos hidrofóbicos (Gly, Ala, Pro y Val)[38] que componen la secuencia total de la TE, le confieren el carácter hidrofóbico[38] y alta estabilidad a la elastina frente a los procesos de degradación[39].

A pesar de esto, la elastina experimenta degradación durante el envejecimiento asociada a diferentes factores como la fatiga mecánica, degradación enzimática y modificaciones químicas[4], que incluyen la glicación, carbamilación, calcificación, daño oxidativo, unión a lípidos y racemización con ácido aspártico[25]. De estos posibles mecanismos se ha demostrado que una combinación de los procesos de calcificación, unión a lípidos y degradación enzimática, que se promueven y potencian entre sí, tienen un fuerte impacto negativo sobre la fibra elástica[25].

Existe en la naturaleza una gran variedad de proteasas, pero son pocas las que se han identificado con la capacidad para degradar la elastina. Estas enzimas son denominadas elastasas, y se definen como endopeptidasas capaces de generar péptidos solubles de elastina[40]. Werb *et al*., han definido a una elastasa como una proteinasa que es capaz de solubilizar y degradar fibras de elastina insoluble[41], mientras que Bieth J. describió una elastasa como una proteasa capaz de degradar la elastina entrecruzada madura e indicó que una enzima que hidroliza elastina solubilizada químicamente o sustratos de elastina sintética no debe denominarse elastasa o proteinasa, si es incapaz de solubilizar la elastina fibrosa[37].

Las anteriores definiciones no incluyen el hecho que la escisión de elastina por ciertas enzimas requiere el daño previo de la elastina, como consecuencia del proceso de envejecimiento, por ejemplo, para la HLE o la metaloendopeptidasa neprilisina[36].

La degradación de elastina fibrilar por elastasas es influenciada particularmente por tres factores: la especificidad de los enlaces peptídicos de las elastasas, diferencias en las secuencias disponibles en la superficie de elastina que pueden ser reconocidas por el dominio catalítico y la presencia de los sitios remotos de contacto entre la enzima y el sustrato[11].

Las enzimas que cumplen las condiciones indicadas en alguna de las definiciones de elastasas pertenecen a cuatro familias: serín proteasas, cisteín proteasas, metaloproteasas y proteasa aspárticas, clasificadas de acuerdo con el sitio catalítico.

1.5.1 Serín proteasas

Estas proteasas se encuentran en el ser humano, donde se han identificado en procesos de digestión, cascada de la coagulación y la degradación de la matriz extracelular[42]. Se dividen en dos familias distintas: la familia de las substilisinas y quimotripsinas. De la familia de las quimotripsinas, se ha identificado que degradan elastina, en algún grado, la Tripsina (TR, EC 3.4.21.4), Quimotripsina (CTR, EC 3.4.21.1), Elastasa pancreática tipo II (EP, EC 3.4.21.71), Elastasa de neutrófilos humana (HLE, EC 3.4.21.37), Proteinasa 3 (PR3, EC 3.4.21.76), Catepsina G (Cat G, EC 3.4.21.20) y la elastasa 1 similar a quimotripsina (Cela1, EP Tipo I, EC 3.4.21.36)[36]. La familia de las substilisinas, que incluye enzimas bacterianas, difiere en sus estructuras 3D general, pero tienen la misma geometría de sitio activo y mecanismo catalítico[43].

La actividad elastolítica de la EP, HLE, Cat G, PR3, Cela1 se ha reportado[31, 44]; aunque la CTR puede degradar completamente la elastina, tiene una especificidad de escisión más estrecha que la EP ya que escinde en los residuos de Tyr, Trp, Phe y Leu, que se encuentran en la elastina solo en pequeñas cantidades[36]. La TR solamente escinde C-terminal de Lys y Arg, lo cual dificulta que degrade elastina madura, proteína que contiene el 88 % de los residuos de Lys modificados e involucrados en los enlaces del entrecruzamiento y la ausencia de residuos de Arg[4]. Por esta razón TR no rompe elastina madura, pero si TE con residuos de Lys accesibles[36].

La EP es una proteína de 26 kDa producida como un zimógeno en las células beta del páncreas y es activada en el intestino por TR[41]. Está compuesta por una cadena polipeptídica de 240 residuos de aminoácidos con cuatro puentes disulfuro[37], y tienen un sitio simple de unión a calcio compuesto de Glu-70 y Glu-80[37]. La EP porcina es una elastasa agresiva que escinde la elastina por el C-terminal en Gly, Val, Leu, Ala e Ile y, en menor medida Phe, Pro, Glu y Arg[45, 36]. Esta enzima no solamente escinde los enlaces Ala-X y Val-X sino también Gly-X los cuales representan el 33.1 % de enlaces totales en la elastina, lo que puede explicar porque la enzima presenta mayor actividad elastolítica que la HLE y Cat G[8].

Se ha reportado que las enzimas de este grupo que degradan elastina de la piel son HLE, PR3 y Cat G[5], que son secretadas por neutrófilos polimorfonucleares y son almacenados en sus formas activas en gránulos azurofílicos, para ser liberados en respuesta a un proceso inflamatorio[36]. Estas enzimas tienen actividad en una variedad de procesos fisiológicos incluyendo defensa contra infecciones, degradación de matriz extracelular, procesos inflamatorios, remodelado de tejidos, cicatrización de heridas, coagulación y fibrinolisis[32].

HLE, también denominada elastasa de leucocitos, cataliza la degradación de elastina, diferentes colágenos, fibronectina y lamininas, adicional a proteínas del plasma tales como inmunoglobulinas[36]. PR3, también denominada como mieloblastina, muestra un 54 % de homología en la secuencia con HLE y degrada elastina, fibronectina, lamininas y colágeno tipo IV[46]. HLE y PR3 escinden similarmente en C-terminal a residuos hidrofóbicos y/o alifáticos tales como Ala, Gly y Val en elastina y TE[36]. HLE no degrada elastina intacta de individuos jóvenes, pero hidroliza elastina derivada de piel de individuos mayores[7].

La Cat G muestra un 37 % de homología en la secuencia con HLE y escinde una variedad de substratos, incluyendo elastina, colágeno tipo IV, fibronectina, laminina y componentes del plasma tales como las inmunoglobulinas[36]. Es sintetizada como una proteína de 255 residuos de aminoácidos, incluyendo un péptido de señal de 18 residuos, un péptido de activación de dos residuos en el extremo N-terminal y una extensión carboxilo terminal[43]. La enzima madura contiene 235 residuos[47] y se almacena en gránulos primarios como una proteasa activa después de la eliminación del propéptido amino terminal Gly-Glu[43]. Los fibroblastos pueden producir y liberar Cat G y otras enzimas elastolíticas bajo ciertas

condiciones patológicas; se ha identificado que fibroblastos de piel expuesta al sol expresan altos niveles de Cat G, en comparación a fibroblastos de piel no expuesta al sol[48].

Cat G escinde C-terminal en residuos alifáticos y aromáticos voluminosos como Leu, Phe y Tyr en elastina, así como Lys/Phe>Arg/Leu>Met>Ala>Asp en sustratos modelos[43], y ha mostrado preferencia por el aminoácido cargado Lys en TE, mientras que en elastina no se ha identificado en P1 dado que los enlaces cruzados de elastina no se degradan enzimáticamente ya que la estructura de Lys se altera sustancialmente con el entrecruzamiento de la elastina[32]. Tres residuos cargados positivamente (Lys217, Lys192 y Arg41) residen en las inmediaciones del sitio activo de la Cat G y podrían contribuir a la especificidad de la proteasa[43].

El mecanismo de Cat G como elastasa es similar a HLE, implica un proceso dependiente del tiempo que consiste en una formación inicial lenta del complejo elastasa-elastina, seguida de una isomerización a un complejo estrechamente unido, que induce cambios estructurales locales en la elastina para catálisis, y un proceso de desorción para permitir que la elastasa se mueva sobre las fibrillas de elastina[32]. Al igual que HLE y PR3, Cat G presenta la tríada catalítica His57, Asp102 y Ser195[36] que les permite después de la unión a su sustrato, que la Ser195 realice un ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo del péptido escindible, formando un intermediario tetraédrico. Este efecto se ve favorecido por el efecto polarizante del ión carboxilato no solvatado de Asp102, unido por puente de hidrogeno a His57[49]. Lonky y Wohl propusieron dos modos potenciales de unión del complejo inicial Elastina-elastasa que incluyen una fuerte unión no catalítica vía interacciones electrostáticas, y una débil pero efectiva unión catalítica vía interacciones hidrofóbicas en el entrecruzamiento de la superficie de elastina rica en alanina[33].

Se ha identificado que Cat G puede degradar fibras de elastina de individuos jóvenes y adultos mayores[36, 7, 11] y tiene preferencia por las fibras delgadas de elastina[50]. Cat G liberó el mayor número de péptidos potencialmente bioactivos, cuando se compara con HLE y PR3, lo cual puede asociarse a que Cat G muestra un sitio de unión más grande y flexible que acomoda residuos alifáticos, hidrofóbicos, aromáticos y básicos de mayor tamaño en S1, en comparación con HLE y PR3[32]. En otro estudio, se comparó la actividad elastolítica de HLE y Cat G a una concentración de 1,1 µM y 1,5 µM respectivamente, y se identificó

que Cat G presento el 23 % de la actividad de HLE en la digestión de elastina aislada de pulmón humano, mientras que en muestras de piel *ex vivo,* la actividad de Cat G fue el 32,5 % de HLE, en las mismas concentraciones[50].

1.5.2 Cisteín proteasas

Las cisteín proteasas constituyen aproximadamente el 26 % de todas las proteasas humanas, agrupadas en siete superfamilias, denominadas como Clan CA, CD, CE, CF, CH, PA y PB[33]. Las cisteín catepsinas humanas son proteasas lisosomales que pertenecen al Clan CA, siendo el clan más grande[33] que comprende 11 miembros (Cat B, Cat C, Cat F, Cat H, Cat K, Cat L, Cat O, Cat S, Cat V, Cat W y Cat X) con varias actividades de mantenimiento intracelular, pero si son secretadas, también participan en la escisión de proteínas de MEC, como colágenos tipo I, II y IV, elastina, fibronectina y nidogeno[51]. Estas catepsinas contienen tres regiones funcionales incluyendo un péptido de señal, un propéptido y un péptido catalítico. El péptido de señal dirige la translocación de la proenzima hacia el retículo endoplásmico durante la traducción ribosómica[33]. Las cisteín catepsinas pueden activar pro-MMP, e inversamente MMPs puede convertir los zimógenos de cisteín catepsinas en formas activas[51].

La familia de la papaína del Clan CA, se ha dividido en dos subfamilias, de acuerdo con el análisis de secuencia: Similar a catepsina L (Cat L, Cat V, Cat K, Cat S, Cat W, Cat F y Cat H) y similar a catepsina B (Cat B, Cat C, Cat O, Cat X)[52].

En el mecanismo de catálisis de este grupo de proteasas, la diada de Cys e His preforman un par iónico mediante la transferencia del protón del grupo tiol del residuo de Cys al residuo de His antes de la unión del sustrato. Durante la catálisis, la Cys desprotonada actúa como un nucleófilo que ataca el carbono carbonilo del enlace escindible del sustrato y forma un intermedio de oxianión tetraédrico. Esta estructura generalmente se estabiliza mediante un residuo de Gln a través de un enlace H para formar un agujero de oxianión. Posteriormente, la His dona su protón adicional a la amina en la región C-terminal del sustrato, lo que ayuda a la transformación del intermedio tetraédrico en la enzima acilo mediante la liberación de la amina. En este proceso, se cree que un residuo de Asn en el sitio catalítico orienta la His durante su catálisis ácido-base. Para complementar la escisión del sustrato, se requiere una molécula de agua para liberar la enzima del extremo N del

sustrato. Nuevamente este paso se lleva a cabo mediante la desprotonación del agua por la His para crear un nucleófilo más fuerte[33].

Dentro de este grupo, la Cat S (EC 3.4.22.27), Cat K (EC 3.4.22.38), y Cat V (EC 3.4.22.43), degradan la elastina en la piel, pero requieren para su actividad condiciones de pH ácidas (5,5 y 6,5)[25], por lo que su actividad puede estar condicionada a procesos patológicos donde cursen modificaciones del pH, como pueden ser los procesos infecciosos[53]. De acuerdo con Panwar *et al.*, la expresión de las Cat V, Cat S y Cat K es menor en muestras de piel de donantes ancianos (70 a 86 años) que en muestras de sujetos jóvenes (30 a 40 años) y la mayor potencia elastolítica la presenta Cat V seguida por Cat K y Cat S[5]. Otro estudio mostró que Cat V es la elastasa más potente seguida por las catepsinas K, S, F, L y B[36]. La Cat K, Cat S y Cat V prefieren escindir en C-terminal de Gly>>Ala/Val en TE y elastina, en P2, las tres enzimas prefieren Gly, Val, Ala y Pro[36]. En general, Cat K, Cat S y Cat V mostraron patrones de escisión similares y escindieron predominantemente entre residuos hidrofóbicos alifáticos que estaban presentes en los dominios repetidos de TE[5].

Aún no se ha elucidado el mecanismo exacto a través del cual las catepsinas degradan los componentes de la matriz extracelular. Se ha propuesto algunos mecanismos, el primero de ellos implica la fagocitosis de fibras de elastina y colágeno por células residentes dérmicas como fibroblastos, macrófagos, mastocitos y células dendríticas; el segundo propone la pérdida lenta y progresiva de fibras de elastina causada por la secreción de catepsinas desde el estrato basal epidérmico hacia la dermis, donde se puede alcanzar un entorno dérmico ligeramente acidificado por la acción de las anhidrasas carbónicas intracelulares I y II, y las anhidrasas carbónicas inducibles por hipoxia IX y XII, que se expresan altamente en la parte basal de la epidermis. Este entorno a pesar de no ser el óptimo para las Cat K y Cat V, es un pH adecuado para generar su efecto[5].

La Cat V, llamada también Catepsina L2, tiene un peso molecular de 37,3 kDa, 334 residuos de aminoácidos que contienen un péptido de señal de 17 residuos, un propéptido con 96 residuos y una enzima madura con una longitud de 221 residuos[54]. El sitio activo está formado por los residuos conservados de Cys25 y His159[55] y dos sitios de N-glicosilación en Asn108-Glu-Thr y Asn179-Asn-Ser presentes en el péptido maduro.

Ambos sitios de glicosilación han demostrado ser importantes para el tráfico intracelular e intercelular de la enzima[33]. El subsitio S1, está formado por Asn64, Gly23, Gly65, y el oxígeno carbonilo de Cys63. Este es poco profundo[55] y conlleva a una baja especificidad por el sustrato[33]. En contraste, el subsitio S2, es el principal determinante de la especificidad en la familia de las cisteín proteasas de la papaína[55].

Se ha identificado la expresión de Cat V en la epidermis, timo, testículos, córnea, corteza cerebral e hipocampo[33, 5], así como también en macrófagos, donde contribuye en más del 20 % de la actividad elastolítica de las cisteín proteasas[56, 25]. Las muestras de piel de adultos mayores (70 – 86 años) han mostrado una reducción significativa (50 % - 80 %) de la expresión de catepsinas en comparación con las muestras de adultos jóvenes (30 - 40 años), asociada a la reducción durante el envejecimiento de las células que expresan catepsinas (principalmente macrófagos y fibroblastos)[5]. Otro estudio identificó que el nivel de expresión de Cat V es de alrededor del 25 % de Cat S en los macrófagos, con una actividad de degradación de elastina tres a cuatro veces más alta que Cat S, y Cat K y una tasa de degradación entre dos y seis veces más alta que EP y MMP-12, lo que permitió a los autores afirmar que Cat V presenta la actividad elastolítica más potente en células de mamífero[56]. Cat V contribuye a la degradación de elastina de la matriz extracelular vía endocitosis[33] y su actividad elastolítica ha demostrado una alta dependencia de sus exositios que se unen a la elastina[11, 33].

1.5.3 Metaloproteasas de Matriz

Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc[57] que actúan en procesos de remodelado del tejido conectivo y degradación de varias proteínas de la matriz extracelular, a través de sus efectos en la migración, diferenciación y crecimiento celular, como también en procesos de inflamación, angiogénesis y apoptosis[36]. La producción de MMP se incrementa en algunas condiciones fisiológicas y patológicas como son la cicatrización, el envejecimiento cutáneo, aterosclerosis, artritis, enfisema pulmonar, infarto de miocardio, crecimiento tumoral, metástasis y algunas enfermedades ampollosas en las que se produce fibrosis dérmica (epidermólisis ampollosa y penfigoide ampolloso)[36].

En vertebrados se han reportado 28 diferentes tipos de MMPs, de los cuales al menos 23 son expresadas en humanos[58]. La mayoría de las MMP son sintetizadas como zimógenos

o proenzimas secretadas o transmembrana, y para su activación se requiere la eliminación de un propéptido[35] compuesto de aproximadamente 80 residuos que se extiende del dominio N-terminal al dominio catalítico y es responsable por la latencia de la enzima[59]. El dominio catalítico contiene alrededor de 170 aminoácidos[35]. Además de contener el ion de zinc catalítico, coordinado por tres residuos de His[60], todos los dominios catalíticos de MMP poseen otro ion de zinc, el zinc estructural, y uno (MMP-11, MMP-13), dos (MMP-8, MMP-2; MMP-14, MMP-16), o tres (MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12) iones de calcio unidos[61]. MMP-2 y MMP-9 adicionalmente tienen un dominio de fibronectina tipo II, con aproximadamente 175 aminoácidos[61]. El dominio tipo hemopexina en la posición carboxi-terminal, se involucra en el reconocimiento del sustrato; el dominio catalítico es unido al dominio similar a hemopexina, por un segmento denominado enlazador o región bisagra[38]. Las MMP de membrana tiene un dominio transmembrana asociado a la membrana plasmática[37]. El reconocimiento de sustrato por MMPs puede estar fuertemente modulado por dominios auxiliares de la hendidura catalítica, como el dominio de hemopexina o las repeticiones de fibronectina tipo II en gelatinasas[62] (Figura 4).

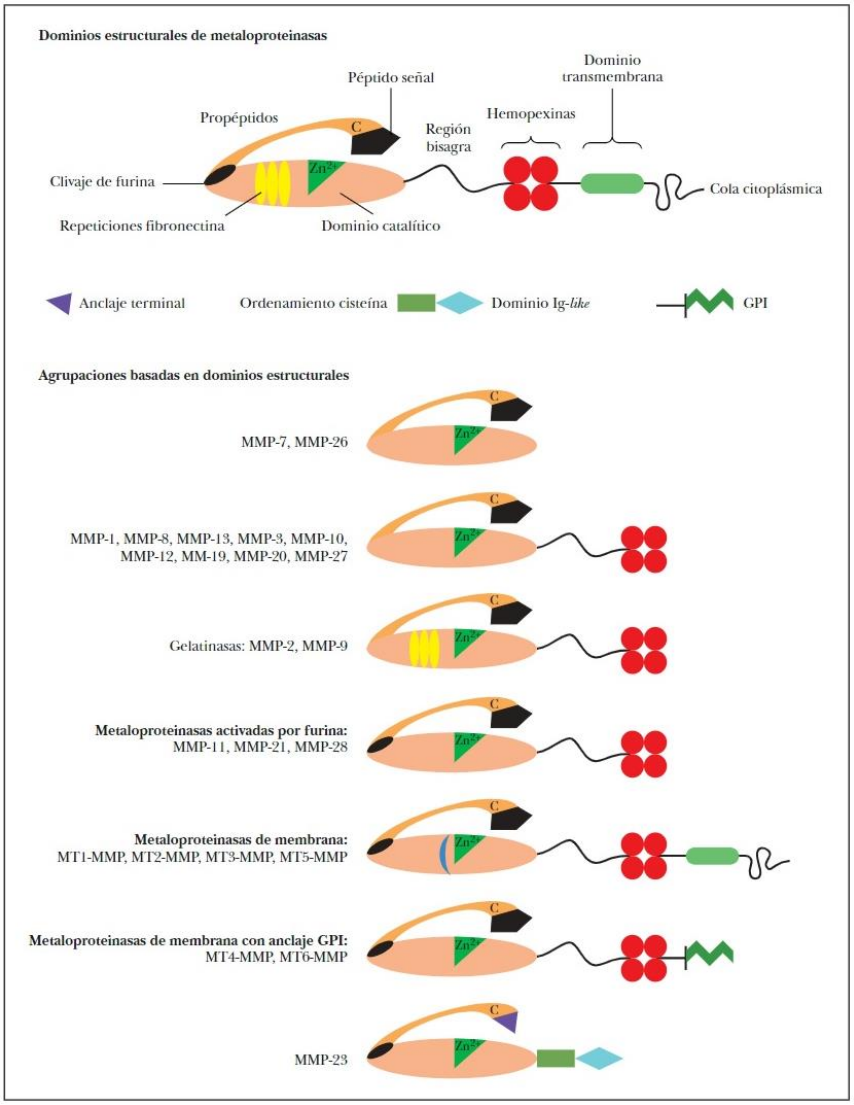


Figura 4. Estructura de las metaloproteasas.
Tomada de "Metaloproteinasas y piel" por "L. P. G.", 2004, *Actas Dermo-Sililiográficas*, 95, p 415, doi: 10.1016/S0001-7310(04)76850-7 Copyright, 2004[63].

En el mecanismo catalítico, el ion Zn^{2+} es coordinado por tres residuos de His; en la ausencia de un sustrato o inhibidor, una molécula de agua es coordinada por el ion Zn^{2+} como un cuarto ligando, quedando atrapado entre el metal y el residuo catalítico de Glu perteneciente a His-Glu-X-X-His-X-X-Gly-X-X-His. El grupo carbonilo del enlace peptídico escindible se direcciona hacia el ion Zn^{2+}, con lo cual se genera la polarización. La hidrólisis del péptido también es asistida por el pKa relativamente alto del grupo carbonilo del residuo catalítico de Glu, que se protona a pH neutro[59], por la extracción del protón de una molécula

de agua, convirtiéndolo en OH^-, que posteriormente ataca e hidroliza directamente el enlace amida del sustrato unido[64]. Esta característica facilita el ataque nucleofílico de la molécula de agua al átomo de carbono del carbonilo del enlace del péptido escindible, que tiene un carácter carbocatiónico debido a la polarización inducida por el ion Zn^{2+}. Esta reacción da lugar al intermediario tetraédrico, estabilizado tanto por el ion Zn^{2+} como por un grupo carbonilo de un enlace peptídico cercano, lo que conduce a la escisión del enlace peptídico escindible cuando un segundo residuo (generalmente de His, que disminuye su pKa) dona un átomo de hidrógeno al átomo de nitrógeno de la porción imido del enlace peptídico[59].

En condiciones fisiológicas, la acción de las MMPs es controlada por los inhibidores tisulares de las MMP (TIMP)[35]. La familia TIMP actualmente incluye cuatro miembros diferentes (TIMP 1–4), que muestran una identidad de secuencia del 41 % al 52 %. TIMP-1 tiene la capacidad de unirse a MMP-9, y TIMP-3 tiene la capacidad de unirse a MMP-2 y MMP-9[61].

Las proteasas de este grupo para las cuales se ha encontrado evidencia de actividad elastolítica son: MMP-12 (EC 3.4.24.65), MMP-9 (EC 3.4.24.35), MMP-2 (EC 3.4.24.24), MMP-7 (EC 3.4.24.23) y MMP-14 (EC 3.4.24.80)[40,35]. En condiciones fisiológicas de la piel se sobreexpresan MMP-2 y MMP-7, y están en bajos niveles MMP-9 y MMP-12; estas dos últimas elastasas elevan su expresión en fotodaño[65].

La MMP-9 (Gelatinasa B) es una endopeptidasa[66] producida por los queratinocitos y almacenada por los neutrófilos, eosinófilos[63], macrófagos, varias células malignas[36] y fibroblastos[67]. Fisiológicamente se expresa principalmente por células del sistema inmune y la descomposición proteolítica de los sustratos a menudo ocurre en asociación con condiciones anti-homeostáticas[59], como es el caso de la exposición a la radiación UV, para la cual se ha identificado que MMP-9 aumenta 5.3 veces la expresión en piel fotodañada comparada con piel humana no expuesta[65]. MMP-9 existe fisiológicamente como monómero, dímero o asociada a la proteína de transporte de lipocalina[59]. Se ha demostrado que escinde diferentes tipos de colágeno, laminina y plasminógeno[36], como también elastina[11].

Para la activación de MMP-9 se requiere el clivaje del propéptido, el cual es desplazado *in vivo* por muchas proteasas solubles, principalmente MMP-3, MMP-2, MMP-7, MMP-13 y otras como la calicreína, la TR o el activador del plasminógeno tipo uroquinasa[59]. El dominio enlazador de MMP-9 es inusualmente largo (54 residuos), con alto contenido de residuos de Ser y Thr con un patrón variable de O y N-glicosilación, haciendo muy improbable su estrecha interacción y confiriendo una extraordinaria flexibilidad a la enzima[61, 59]. La presencia de repeticiones similares a la fibronectina tipo II insertadas en tándem en el dominio catalítico MMP-9 es necesaria para la unión de la enzima a elastina[68], como también la unión del dominio OG[11].

Se ha comparado la actividad elastolítica de MMPs en diferente estudios, obteniendo resultados que difieren entre algunos de ellos; en el estudio realizado por Umeda *et al*.[69] se reportó que la única enzima que libero desmosina e isodesmosina del grupo de MMPs que se evaluaron (Dominio catalítico MMP-12, MMP-9, dominio catalítico MMP-2), es MMP-12; mientras que Senior *et al*.,[70] reporto que MMP-9 y MMP-2 tiene actividad elastolítica; el estudio de Berton *et al*.[71], reporto no haber identificado actividad de este tipo para MMP-2, mientras que HLE y MMP-9 evidenciaron alterar la longitud de la fibra elástica. Finalmente, en el estudio de Murphy *et al*.[72], se reportó a MMP-2 como la enzima con mayor actividad elastolítica y MMP-9 la enzima menos eficiente.

1.5.4 Proteasas aspárticas

Las proteasas aspárticas tienen un peso molecular aproximado de 35 KDa y alrededor de 330 residuos de aminoácidos de longitud, con aproximadamente un 5 % de conservación de la secuencia entre los miembros de esta familia. El zimógeno de las proteasas aspárticas tiene un propéptido N-terminal de hasta 50 residuos de aminoácidos que se escinde para generar la proteasa activa. La parte enzimática de la molécula tiene un alto contenido de aminoácidos dicarboxílicos y β-hidroxi, y un bajo contenido de residuos básicos[73].

En el genoma humano las proteasas aspárticas son la clase más pequeña con 15 miembros que se encuentran en 2 clanes, el clan AA y el clan AD, lo que refleja sus diferentes estructuras terciarias. El clan AA tiene dos familias, la familia A1 que contiene las proteasas aspárticas clásicas (renina, pepsina A, pepsina C, Cat D, Cat E, BACE1,

BACE2 y napsina A) y la familia A2 que incluye proteasas que son integradas por retrovirus en el genoma humano como las proteasas del VIH[74].

La escisión del enlace peptídico se produce mediante un mecanismo catalítico general ácido-base. Uno de los dos residuos aspárticos catalíticos se protona en el complejo enzima-sustrato. El otro residuo Asp actúa como una base general activando una molécula de agua que luego ataca el carbono carbonilo del enlace amida escindible, lo que da como resultado la formación de un intermedio de diol germinal tetraédrico. La desprotonación subsiguiente del grupo hidroxilo por uno de los aspartatos catalíticos y la activación simultánea de la amina saliente por el otro residuo aspártico protonado finalmente conduce a la escisión del enlace peptídico[74].

La pepsina (PEP; EC 3.4.23.1) se encuentra en el estómago de muchos organismos donde es activa en condiciones muy ácidas (pH < 3), y se inactiva de forma irreversible en pH superiores a 5-6; generalmente produce mezclas complejas de péptidos comparada con otras enzimas que escinden de forma más especifica[75]. Esta enzima es secretada en la forma inactiva del precursor pepsinógeno, el cual es activado por H^+ en la luz del estómago, resultando en un cambio conformacional y exposición del sitio catalíticamente activo[36]. En general la PEP prefiere escindir después de Phe y Leu, mientras que rara vez escinde después de His y Lys a menos que estén adyacentes a Leu, Phe[75]. Sin embargo, en el estudio de Schmelzer *et al*., realizado en elastina de piel se encontró que la proteasa escinde con frecuencia el extremo C de los residuos Gly, Val, Ala, Leu y Phe[36].

1.6 Envejecimiento cutáneo y degradación de elastina

Estudios histológicos y ultraestructurales han revelado que durante el envejecimiento de la piel la mayor alteración se localiza en la matriz extracelular de la dermis[76]. A pesar de que las proteínas de la matriz extracelular tienen una marcada longevidad *in vivo*[26], el daño en su estructura puede ser mediado por diferentes factores tanto intrínsecos,

principalmente el efecto cronológico, como extrínsecos, que pueden ser fotoexposición, polución y consumo de cigarrillo[30], entre otros.

El envejecimiento intrínseco se produce como consecuencia de cambios fisiológicos a través del tiempo debido a factores genéticos y cambios en el metabolismo celular y estructura del tejido[34]. La piel envejecida intrínsecamente es delgada y su elasticidad es menor, no presenta cambios en la pigmentación ni arrugas profundas; por el contrario, la piel fotoenvejecida presenta arrugas finas y profundas, manchas generadas por cambios en la pigmentación, textura áspera, mayor fragilidad, aumento de la vascularización y angiogénesis[22]. Estas alteraciones generalmente se presentan por un desequilibrio entre la degradación y formación de las estructuras de soporte de la matriz extracelular (el colágeno y la elastina), lo que lleva a la acumulación de fragmentos reticulados, pérdida de elasticidad dérmica y deterioro en la función de fibroblastos dérmicos[17]. En la piel severamente fotoenvejecida se distribuyen abundantes depósitos de fragmentos de fibras elásticas altamente desorganizadas a través de la dermis[26], lo que se conoce con el nombre de elastolisis[77].

Sumado al daño producido en las fibras elásticas por factores intrínsecos y extrínsecos, también se produce un daño a nivel de los fibroblastos, situación que puede llegar a explicar que el recambio de las fibras de elastina reticulada madura en los seres humanos es muy lento[41], llegando a ser casi inexistente en los mayores de 20 años, por lo que los procesos de elastólisis que se generan producen una alteración permanente en la piel difícil de revertir.

Las fibras de elastina aisladas de sujetos jóvenes son más delgadas y entrelazadas que las de sujetos ancianos (Figura 5). De igual manera, el diámetro de la fibra aumenta con la edad[5]. La piel envejecida presenta estructuras macroporosas con tamaños de poros mayores en comparación con la piel de donantes jóvenes[5]. El envejecimiento intrínseco puede llevar a la separación de elastina fibrilar, formación de espacios quísticos y a la fragmentación de fibras elásticas en adultos mayores[11], principalmente en las capas dérmicas papilar y reticular superior[5].

La degradación enzimática de elastina ocurre durante la expresión constitutiva de proteasas en tejidos sanos y en condiciones inflamatorias[36]. Las proteasas reportadas con actividad elastolítica en tejidos humanos son:

- Serín proteasas: Cat G, PR3, HLE y Cela1.
- Metaloproteasas: MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12, MMP-14 y NEP.
- Cisteín proteasas: Cat B, Cat F, Cat K, Cat L, Cat S y Cat V
- Proteasas aspárticas: PEP[36].

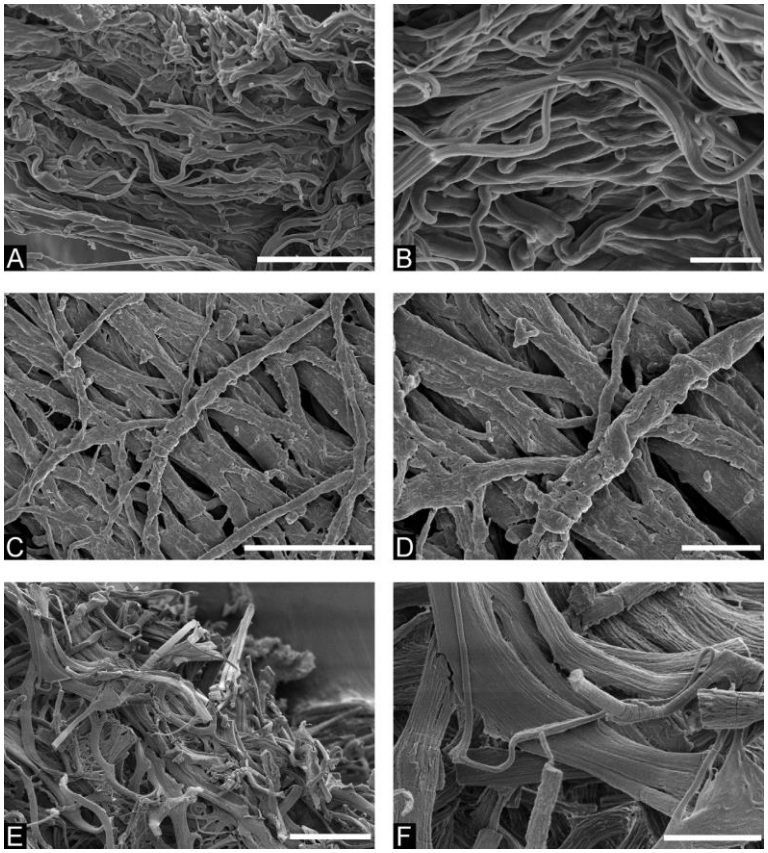


Figura 5. Micrografías electrónicas de barrido de elastina de piel humana. Donantes jóvenes – 6 años (a, b), individuos adultos – 43 años (c, d) e individuos adultos mayores -90 años (e, f). aumentos de 20 mm para a, c, e y 6 mm para b, d, f.

Tomado de "Molecular-level insights into aging processes of skin elastin" por "A. M. *et. al*", 2016, *Biochimie*, 128-129, p 166, doi: 10.1016/j.biochi.2016.08.010. Copyright, 2016[30].

Adicional a los efectos estructurales producidos por la degradación de la elastina, se conoce que esta fragmentación libera péptidos bioactivos, denominados elastoquinas, con funciones biológicas como el aumento de la angiogénesis, regulación de diversas actividades celulares, incluidas la adhesión celular, activación de proteasas, apoptosis[36], efectos quimiotácticos de monocitos y fibroblastos, estimulación de la proliferación celular del músculo liso, inducción de respuesta osteogénica en células del músculo liso y vasorelajación[30]. Las elastoquinas conocidas se derivan de los dominios hidrofóbicos no reticulados, cuyos componentes básicos son GX, PX, GGX y PGX, con X=Gly, Ala, Val, Leu o Ile[36].

La liberación de elastoquinas a partir de la degradación de la elastina respalda un fenotipo senil de fibroblastos de la piel que disminuye la producción de proteínas de la MEC, incluida la elastina, y aumenta la expresión de proteasas que contribuyen a una mayor degradación de la elastina. Sin embargo, también existen hallazgos opuestos en los que se ha considerado que las elastoquinas desempeñan un papel protector en el fotoenvejecimiento al reducir las actividades de la elastasa, prevenir la apoptosis de los fibroblastos y aumentar su tasa de proliferación[5].

A nivel molecular, el envejecimiento intrínseco en TE se asocia con escisiones en toda la molécula con preferencia en los grandes dominios hidrofóbicos en las partes central y C-terminal de TE[30]. En las fibras elásticas ocurre daño oxidativo a través de oxidantes extracelulares como iones metálicos, complejos de oxidasa unidas a la membrana, peroxidasas extracelulares, precursores de radicales óxido nítrico sintasas y otros agentes exógenos; formación de productos finales de glicación de elastina por reacción no enzimática, principalmente en los residuos de Lys y Arg, debido a la baja renovación de esta molécula; calcificación de elastina y otras moléculas de MEC; racemización y acumulación de D-aspartato que puede inducir cambios conformacionales. Una mayor reticulación y susceptibilidad a la degradación enzimática, unión de elastina y péptidos de elastina a lípidos, carbamilación de elastina y fatiga mecánica[25].

Mientras que en el envejecimiento extrínseco las escisiones en TE se asocian con mayor destrucción de las partes N-terminal y central de esta molécula y una mayor susceptibilidad a la degradación enzimatica[30]; los efectos del envejecimiento extrínseco son aditivos a los inducidos por el envejecimiento intrínseco, y se relaciona con la infiltración de células

inflamatorias, macrófagos y mastocitos, lo que puede llevar a un aumento de la expresión de proteasas por el efecto de algunos factores como el consumo de tabaco, polución y la radiación UV; este último se ha asociado a la deposición de material elastolítico que exhibe estructuras fibrosas engrosadas, desorganizadas y no funcionales[25].

Estructuras ricas en cromóforos UV (Cys, Trp, Tyr), como los dímeros de fibronectina y las microfibrillas de fibrilina, desempeñan un papel protector ya que se degradan con la exposición a la radicación UV para reducir el daño del tejido[25]. Adicionalmente, se ha demostrado que la radiación UV y exposición a altas temperaturas pueden inducir la expresión de la isoforma de TE que contiene el exón 26A, el cual puede generar fibras con una estructura alterada las cuales son observadas en piel humana fotoenvejecida con elastosis solar[34]. Estudios ultraestructurales han demostrado importantes cambios en la arquitectura y estructura del tejido elástico en piel expuesta a sol. En los estados iniciales, la característica más prominente es un incremento en el componente microfibrilar, mientras que en etapas posteriores las fibras elásticas tienen la apariencia de agregados de material granular o incluso amorfo[48].

1.7 Estudio de comparación de la actividad de elastasas en elastina

La elastina se distribuye principalmente en vasos sanguíneos, pulmones y piel. El daño de esta proteína está asociado con trastornos patológicos como son enfisema, aneurismas, ateroesclerosis y elastolisis solar[31]. Debido al gran impacto de estas alteraciones, algunos grupos de investigación han orientado sus esfuerzos en identificar cuáles enzimas tienen actividad elastolítica y así poder establecer dianas farmacológicas para disminuir el impacto por la activación de estas proteasas.

Estas investigaciones han recurrido a múltiples métodos para determinar la degradación o alteración de la elastina (Tabla A1, Anexo 1). Dentro de estos métodos se encuentran: análisis morfométrico de la fibra elástica[50, 71], determinación de fluorescencia de péptidos marcados de elastina[6], espectrofotometría (280 nm y 490 nm)[8, 50, 56], electroforesis[70], recuento de centelleo de [^{3}H]-elastina soluble[70, 72, 78, 79], liberación de desmosina e

isodesmosina de la fibra y su identificación por HPLC (UV-VIS)[69], identificación de los péptidos liberados como producto de la degradación de elastina por HPLC acoplado a espectrometría de masas[80, 32, 7, 10, 11, 51, 5], inmunoensayo para la determinación de desmosina[51, 5], cuantificación por peso[51, 5] y determinación de péptidos liberados de elastina por el método de ninhidrina[81], los cuales han permitido identificar y comparar la actividad elastolítica entre diferentes enzimas, en algunos casos a través de una técnica analítica y en otros, a través de la combinación de algunos de estas.

Igualmente, se identifica una amplia variación de sustratos usados para determinar la actividad elastolítica; algunos investigadores han realizado la evaluación en elastina obtenida comercialmente por el método Starcher [9, 82], en tejido *ex vivo* [71], y en TE [83], [84], lo que podría interferir en los resultados obtenidos, dado que se presume que la integridad de la fibra de elastina puede modificar la actividad de las elastasas; en un estudio se identificó que neprilisina tiene la capacidad de degradar fibras de elastina obtenidas de piel de donantes adultos mayor, la cual presenta un daño previo, mientras que sobre las fibras de piel de donantes jóvenes no presenta actividad elastolítica[12].

En la literatura se encuentran reportes con resultados diferentes respecto a la actividad elastolítica de las enzimas, por ejemplo, Barroso *et al.*, reporta que la cantidad de péptidos liberados por MMP-9 no son apreciables[80], indicando con ello que la actividad como elastasa no es significativa, mientras que en el estudio realizado por Berton *et al.*[71], se encontró que MMP-9 induce un 50 % de elastolisis con respecto a la actividad de elastasa de neutrófilos. Posiblemente estas discrepancias se presentan debido a diferencias en el tipo, tejido de origen e integridad del sustrato, relación de concentración enzima:sustrato y condiciones propias de la digestión, dado que para el primer caso se trabajó con elastina de pulmón humano de tipo comercial, mientras que en el segundo caso se evaluó en elastina *ex vivo* de piel humana. Igualmente, esta discrepancia se podría asociar al método utilizado para determinar la actividad elastolítica, dado que Barroso *et al*., determino los péptidos liberados de la elastina y los cuantificó por HPLC acoplado a detector de masas, y Berton *et al*., realizó un análisis morfométrico computarizado.

Estas diferencias entre la actividad de las enzimas aún permanecen sin entenderse, dado que se han realizado pocos estudios donde se evalúa la potencia de las enzimas empleando elastina de diferente origen o método de aislamiento (ver anexo 1).

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Contribuir a la investigación de las elastasas en la degradación de fibras de elastina obtenidas de piel humana.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la potencia elastolítica de al menos dos elastasas asociadas a procesos de envejecimiento cutáneo.

- Evaluar cuantitativamente el efecto de la integridad de la fibra elástica sobre la actividad elastolitica de las elastasas seleccionadas.

- Contribuir a la determinación de un posible sinergismo en el desarrollo de la actividad elastolítica de las enzimas evaluadas en la degradación de elastina derivada de piel humana.

3. Materiales y Métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos

Nombre común (Denominación IUPAC)	**Fórmula Química**	**CAS**	**Fabricante**
Ácido Trifluoroacetico (Ácido 2,2,2-Trifluoroacético)	CF_3COOH	76-05-1	Carlo Erba Reagents
Hidróxido de potasio	KOH	1310-58-3	Merck
Fosfato monobásico de potasio	KH_2PO_4	7778-77-0	J.T.Baker
Cloroformo estabilizado con Etanol Puro	$CHCl_3$	67-66-3	PanReac AppliChem
Urea	CON_2H_4	57-13-6	SIGMA
Sulfato de sodio Anhidro	Na_2SO_4	7757-82-6	PanReac AppliChem
TRIS	$C_4H_{11}NO_3$	77-86-1	Loba Chemie pvt.LTD
Dodecilsulfato Sódico	$NaC_{12}H_{25}SO_4$	151-21-3	Merck
Dietilenglicol	$C_4H_{10}O_3$	111-46-6	Sigma
Bicarbonato de amonio	NH_4HCO_3	066-33-7	Merck
Ninhidrina (2,2-Dihydroxyindane-1,3-dione)	$C_9H_6O_4$	485-47-2	Biobasic
Cloruro de Sodio	NaCl	7647-14-5	Merck
Cloruro de Potasio	KCl	7447-40-7	Scharlau
Hidrógeno Fosfato Disódico	Na_2HPO_4	10028-24-7	Merck
Dietil Éter Estabilizado con 6 ppm de BHT	$(C_2H_5)_2O$	60-29-7	PanReac AppliChem

Ácido Fórmico	CH_2O_2	64-18-6	PanReac AppliChem
Acetona	C_3H_6O	67-64-1	PanReac AppliChem
Metanol	CH_3OH	67-56-1	LiChrosolv
Hidróxido de Potasio	KOH	1310-58-3	PanReac AppliChem
DTT	$C_4H_{10}O_2S_2$	3483-12-3	Thermoscientific
DMSO	C_2H_6OS	67-68-5	PanReac AppliChem

3.1.2 Enzimas, proteínas y aminoácidos

Nombre	**EC o CAS**	**Proveedor**
Catepsina V (Proteína recombinante humana)	EC 3.4.22.43	R&D Systems a biotechne brand
Catepsina G (Polvo liofilizado de leucocitos humanos)	EC 3.4.21.20	SIGMA
Elastasa Pancreática Tipo I de porcino	EC 3.4.21.36	SIGMA
rhMMP-9	EC 3.4.24.35	R&D Systems a biotechne brand
Tripsina	EC 3.4.21.4	Gibco by life Technologies
Albúmina de suero bovino	9048-46-8	SIGMA
Desmosina	11003-57-9	ELASTIN PRODUCTS CO., INC

3.1.3 Buffers y soluciones

Nombre	**Composición**
Buffer para EP y CatG	Tris 50 mM en ddH_2O, pH 7,5
Buffer para Cat V	Buffer de acetato 100 mM, DTT 2,5 mM y 2,5 mM EDTA; pH 5,5
Buffer para MMP-9	Tris 50 mM, $CaCl_2$ 10 mM y NaCl 150mM; pH: 7,5
Solución activación MMP-9	AFM (acetato de fenilmercurio) 10 mM en ddH_2O
Solución caotrópica	Tris 0,3 M que contiene 2-mercaptoetanol 1,5 M y urea 4 M
Solución de clivaje	Bromuro de cianógeno 3 % en ácido fórmico al 98 %
Solución de tripsinización	NH_4HCO_3 100 mM que contenía 8000 unidades BAEE de tripsina
Reactivo de ninhidrina	Ninhidrina 200 mg en 7,5 mL etilenglicol, 2,5 mL de Buffer acetato 4 N y 250 µL de $SnCl_2$ 530 mM en etilenglicol

3.1.4 Muestras de piel

Muestras de piel entre 3 cm^2 y 10 cm^2 fueron obtenidas como remanentes de procedimientos reconstructivos y/o estéticos del área abdominal realizados a mujeres adultas con fenotipo de piel III y/o IV según la escala de Fitzpatrick, no fumadoras y sin diagnóstico de patologías dérmicas, pertenecientes a los siguientes grupos etarios: Adultos jóvenes (26 a 31 años; n=5) y Adultos mayores (66 a 86 años; n=5). Los procedimientos quirúrgicos se realizaron en el Hospital Clínica San Rafael de la ciudad de Bogotá D.C. Las muestras se lavaron y mantuvieron en solución salina para su transporte a -4°C hasta la Universidad Nacional de Colombia en donde fueron almacenadas a -8 °C hasta su uso.

El estudio contó con la aprobación de los Comités de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia y del Hospital Universitario Clínica San Rafael, y se desarrolló dando cumplimiento a lo establecido en la Declaración de Helsinki; para la participación en el estudio, cada una de las voluntarias dio su consentimiento por escrito y

el tratamiento de datos personales se realizó acogiendo lo indicado en la Ley 1581 de 2012 (*Hábeas Data*).

3.1.5 Instrumentos

Nombre	**Marca**
Tubos Eppendorf (Tubos de 2.0 mL LoBind Protein)	Eppendorf
Balanza Semimicro analítica MSE225S (d=0,01 mg)	Sartorius
Centrífuga	Ortoalresa
Estufa IsoTemp Vaccum	Fisher
Bloque de calentamiento CTB 2008	UN-CEIF
Cabina de flujo laminar	C4Pascal
Cabina de extracción	AIRTEC
Baño de agitación Shack-R Bath	Lab-Line
Potenciómetro	HORIBA Scientific
Micropipetas de (0,2-2 µL, 2-20 µL, 20-100 µL, 100- 1000 µL)	Thermoscientific
Vortex MX-S	SCILOGEX
Termomezclador Multi-Therm	Benchmark KASAI

3.2 Métodos

3.2.1 Aislamiento de elastina

Las muestras de piel humana fueron descongeladas y cortadas en fragmentos de 1 cm^2 y posteriormente pesadas. Para la separación de la epidermis se adaptó el procedimiento descrito por Baumberger *et al.*[85], tratando cada muestra con NH_4OH 0.32 M en NaCl 1 M durante 90 minutos a temperatura ambiente y posterior remoción mecánica de la epidermis. Las muestras se sometieron a lavados consecutivos con NaCl 1 M por 10 minutos y agitación, hasta alcanzar pH neutro.

Para el aislamiento de elastina se implementó con pequeñas variaciones el método descrito por Schmelzer *et al.*[7] Los fragmentos de dermis fueron tratados con NaCl 1 M durante dos horas, seguido de una mezcla de Agua:Etanol [1:1] v/v durante toda la noche. En el segundo día las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm, se retiró el solvente de lavado y se realizaron lavados consecutivos durante una hora con agua:etanol [1:1] v/v, etanol, mezcla de cloroformo: metanol [2:1] v/v (dos veces), éter etílico, acetona y etanol; después del tratamiento con cada solvente, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm antes de retirar el solvente. Posteriormente, se adicionó solución de clivaje (Bromuro de cianógeno 3 % en ácido fórmico al 98 %) y se dejaron en agitación durante 16 horas. Al iniciar el tercer día, el material insoluble fue recuperado por centrifugación a 10.000 rpm por 10 minutos, y se adicionó nueva solución de clivaje, dejando en agitación durante 6 horas. Las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos y se realizaron tres lavados consecutivos con mezcla de agua: etanol [1:1] v/v. A continuación, los pellets fueron resuspendidos en solución caotrópica (Tris/HCl 0.3 M que contenía 2-mercaptoetanol 1.5 M y urea 4 M), y se mantuvieron durante toda la noche con agitación. En el cuarto día, la solución caotrópica fue renovada posterior a la recuperación del material insoluble por centrifugación a 10.000 rpm por 10 minutos y las muestras fueron sometidas a agitación 3 horas; este último paso se repitió una vez más. Inmediatamente se realizaron tres lavados, precedidos de centrifugación a 10.000 rpm, con una mezcla de agua: etanol [1:1] v/v, agitación y una duración de 10 minutos para cada lavado. Al finalizar el cuarto día las muestras fueron resuspendidas en solución de tripsinización (NH_4HCO_3 100 mM que contenía 8000 unidades BAEE de tripsina) y se dejaron en agitación durante

16 horas. En el quinto día se adicionó agente caotrópico a las muestras y se mantuvo en agitación durante 1 hora. El pellet obtenido fue lavado con agitación durante 10 minutos con una mezcla de acetonitrilo:Agua- ácido fórmico 0.1 % [1:1] v/v (dos veces), agua:etanol [1:1] v/v y agua:etanol [3:7] v/v. El último lavado se realizó con etanol al 99 %. Finalmente, las muestras se secaron a temperatura ambiente bajo cabina de flujo laminar durante 6 horas, se pesaron y fueron almacenadas a -8 °C hasta su posterior análisis.

3.2.2 Determinación cualitativa de elastina y colágeno.

Las muestras obtenidas en el proceso de aislamiento fueron fijadas en formalina y sometidas al proceso histológico para obtener secciones de 5 µm de espesor, las cuales fueron procesadas por tinción de Verhoeff-Van Gieson y Tricrómico de Masson con modificación de Gomory. Las secciones fueron fotografiadas con un microscopio de luz marca Nikon Elipse 50i conectado a una cámara digital utilizando el programa de captura de NIS elements. Las secciones teñidas se observaron bajo microscopio óptico y se analizaron con aumentos de 4X, 10X y 40X para determinar su morfología y el resultado de las tinciones de Verhoeff-Van Gieson y Tricrómico de Masson con modificación de Gomory. Este estudio fue realizado por el Laboratorio del Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos de la Universidad Nacional de Colombia.

3.2.3 Digestión enzimática de elastina.

Las muestras de elastina aisladas a partir de la piel de donantes jóvenes y adultos mayores (n=5) fueron sometidas a un proceso de secado bajo cabina de flujo laminar durante 4 horas previo a la realización de la pesada. Posteriormente, las muestras se incubaron separadamente con cada una de las enzimas empleando su buffer respectivo:

Cat G: Buffer Tris 50 mM; pH: 7,5

Cat V: Buffer acetato 100 mM; 2,5 mM DTT y 2,5 mM EDTA; pH 5,5

EP: Buffer Tris 50 mM; pH: 7,5

MMP-9: Tris 50 mM, $CaCl_2$ 10 mM, NaCl 150mM; pH: 7,5

En todos los casos se empleó una relación de 50 µg de elastina por 1 nM de enzima y se llevó a un volumen final constante de 250 µL; La incubación de las muestras de elastina con cada una de las enzimas se realizó durante 76 horas a 37 °C y agitación constante. Adicionalmente se sometieron a estas condiciones de incubación, un blanco de enzima que contenía el buffer y la enzima respectiva. Para el caso de la MMP-9, 48 horas antes de iniciar la digestión se realizó la activación de la enzima a 37 °C mediante incubación con acetato de fenilmercurio en DMSO a una concentración final de 1 mM.

La reacción enzimática se detuvo por la adición de ácido trifluoroacético para alcanzar una concentración final de 0.5 % v/v. Posteriormente se retiró el pellet remanente de elastina a otro vial. El sobrenadante y los pellets de elastina fueron almacenados a -8 °C para realizar los análisis posteriores.

3.2.4 Cuantificación de proteína total solubilizada mediante el método de ninhidrina

La cantidad de proteína total solubilizada por la acción enzimática fue establecida mediante el método de Ninhidrina, de acuerdo con lo descrito por Starcher[86] y Sun *et al*.[87]. Los sobrenadantes obtenidos de la digestión enzimática fueron descongelados y homogeneizados. En viales tapa rosca se colocaron 100 µL del sobrenadante de la digestión enzimática de cada una de las muestras, sus blancos y una solución de albúmina de 2,5 mg/mL y se les adicionó 100 µL de HCl 6N, las cuales se mantuvieron 24 horas a 92 °C. La solución resultante se evaporó en estufa con vacío a 60 °C y 15 psi durante 24 horas; las muestras fueron almacenadas a -8 °C hasta su posterior análisis de cuantificación de proteína total y contenido de desmosina.

Para la determinación de la cantidad de proteína total solubilizada, las muestras de elastina tratadas con las diferentes enzimas, blancos de cada enzima y albúmina fueron descongeladas, reconstituidas adicionando 100 µL de ddH_2O y se agitaron hasta la solubilización del residuo de la digestión ácida. Tres réplicas de cada muestra (elastina tratada con cada enzima, blanco de cada enzima, blanco de reactivo (reactivo de ninhidrina sin adición de muestra) y albúmina en concentraciones entre 0,1 mg/mL y 0,5 mg/mL) fueron incluidas en el ensayo. Entre 1,0 µL y 5,0 µL de cada muestra se colocaron en

placas de 96 pozos y se llevaron a un volumen de 25 µL con ddH_2O. Posteriormente se adicionó 100 µL de reactivo de ninhidrina, se agitó y se llevó la placa a calentamiento en baño de maría durante 15 minutos. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la absorbancia a 575 nm se determinó empleando un lector de placas Twinkle LB 970. Para determinar la cantidad de proteína total solubilizada en las muestras de elastina tratadas con las enzimas, a la absorbancia obtenida para cada muestra se les restó el promedio de la respuesta del blanco de la enzima correspondiente; este valor se interpola en la curva de calibración construida con las absorbancias obtenidas para cada una de las concentraciones de las muestras de Albúmina menos el blanco de reactivo. Finalmente, empleando los factores de dilución correspondientes se expresan los resultados como contenido de proteína total (mg albúmina/mL) en 250 µL de digestión enzimática.

3.2.5 Cuantificación de desmosina

Para la determinación de la cantidad de desmosina presente en los sobrenadantes de las muestras de elastina digeridas con las diferentes enzimas, se implementó con modificaciones el método descrito por Umeda *et al*.[88]. Los análisis fueron realizados empleando un HPLC Hitachi PrimaideTM con detector UV de arreglo de diodos. La columna empleada fue una C18 Phenomenex (250 mm x 4.60 mm x 5 µm) y una fase móvil compuesta de la solución A (buffer fosfato 0,1 M pH 4,5 y acetonitrilo (80:20) que contiene dodecilsulfato de sodio 10 mM) y acetonitrilo. El análisis se realizó en modo isocrático empleando solución A: acetonitrilo (97:3), a un flujo de 0,8 mL/min y una temperatura de 30 °C. La columna se equilibró durante 1 hora antes de iniciar el análisis. Para la cuantificación de desmosina se realizó una curva de estándar de desmosina con concentraciones entre 3 ppm y 30 ppm. Las soluciones de desmosina y las muestras de elastina obtenidas posterior a la digestión enzimática e hidrólisis ácida fueron inyectadas (10 µL) y la absorbancia fue determinada a 275 nm. La cantidad de desmosina fue calculada por interpolación en la curva de calibración de desmosina.

3.2.6 Tratamiento estadístico de datos

Los resultados de la determinación de proteína total solubilizada mediante el método de Ninhidrina, variación de peso y determinación de desmosina liberada son expresados como el promedio ± el error estándar. Todas las pruebas estadísticas aplicadas se analizaron con un nivel de significancia (α) de 0,05. Inicialmente se realizó un rechazo de datos atípicos sin reemplazo de datos mediante la Prueba de Chauvenet. Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos entre los grupos de jóvenes y adultos mayores para cada enzima, se determinó el cumplimiento de los supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y homocedasticidad mediante la Prueba de Levene. A los grupos de datos por enzima que presentaron normalidad y homocedasticidad se les aplicó la prueba t de Student para varianzas iguales. Los grupos de datos que no cumplieron con el supuesto de normalidad, fueron comparados empleando la prueba de Mann Whitney U.

Finalmente, el efecto del tipo de enzima y la integridad de la fibra fue analizado conjuntamente empleando un ANOVA de dos vías desbalanceado con efectos fijos.

Las diferentes pruebas estadísticas se realizaron empleando el sitio web (https://www.statskingdom.com/index.html) y la función de análisis de datos de Excel de Microsoft 365 para empresas.

4. Resultados y discusión

4.1 Implementación de un protocolo para el aislamiento de elastina

Las muestras de piel obtenidas para el presente estudio fueron tomadas del área abdominal para obtener fibras de elastina que estén sometidas principalmente al efecto del envejecimiento intrínseco, esto con el objetivo de disminuir la variabilidad en el daño de la elastina asociada al efecto de los factores extrínsecos como la polución y los rayos UV. En los fragmentos de piel de un área de 1 cm^2 previo a cualquier tratamiento se evidencia que el peso del tejido de donantes adultos mayores (0,4604 g ± 0,0123) es aproximadamente un 18 % menor al obtenido con las muestras del grupo de adultos jóvenes (0,5656 g ± 0,0288), lo cual concuerda con reportes previos que relacionan el envejecimiento de la piel con la disminución en el grosor de las capas de epidermis y dermis[5]. Adicionalmente, durante la manipulación de las muestras se identificó una menor resistencia a la tracción mecánica de las muestras de donantes mayores comparadas con las de adultos jóvenes, posiblemente asociado a la pérdida de las proteínas de la MEC durante el envejecimiento.

Para la purificación de la elastina se realizaron ensayos preliminares en los que se evaluaron los métodos de Lansing[89] y una modificación del método de Schmelzer *et al*[7]. Con el método de aislamiento de Lansing el producto obtenido presentó alto contenido de colágeno identificado mediante tinción de Tricrómico de Masson y no se logró identificar elastina a través de la tinción de Verhoeff-Van Gieson. La modificación del método de Schmelzer, aunque presenta un menor contenido de colágeno que el determinado para las fibras obtenidas por el método de Lansing, aun es mayor el área de tinción con colágeno que las de elastina. Adicionalmente, el método de Schmelzer no logra remover la epidermis de las muestras y en algunas muestras se observó que la elastina y el colágeno quedan encapsulados por la epidermis ya que no se presenta respuesta con las tinciones. Por esta razón, como una primera fase de la implementación del método de aislamiento de la elastina fue necesario evaluar diferentes métodos para la eliminación de la epidermis.

La remoción de la epidermis favorece la obtención de fibras de elastina sin alto contenido de colágeno y otras proteínas. Adicionalmente, la epidermis no contiene elastina por lo que no se afecta la cantidad de elastina a recuperar durante el proceso de aislamiento. Se evaluaron los siguientes procedimientos para la remoción de la epidermis:

a. *Tratamiento de la piel con NaCl 1M por 2 horas con agitación constante a temperatura ambiente y remoción mecánica de la epidermis*. Este procedimiento ha sido empleado en estudios con muestras de piel humana[7], sin embargo, bajo las condiciones evaluadas en el presente estudio no permitió la eliminación de la capa de epidermis. Las diferencias en los resultados obtenidos frente a lo reportado en la literatura pueden asociarse al efecto que genera la radiación solar sobre la piel, de acuerdo con la latitud de geolocalización del donante de la muestra de piel, dado que se ha identificado que las zonas de mayor exposición a la radiación UV se encuentran cercanas a la línea ecuatorial[90], sumado a que también se ha identificado que el espesor de la capa de epidermis aumenta a mayor exposición a radiación UV[91], incluso cuando se compara diferentes partes del cuerpo, con diferentes grados de exposición a radiación solar (rostro vs abdomen) en diferentes décadas de la vida[92]. Esto explicaría el mayor contenido y efecto de encapsulamiento que generó la epidermis de las muestras trabajadas en el presente estudio, cuyos donantes habitan en latitudes cercanas al Ecuador frente a lo reportado en estudios realizados con donantes de países europeos. La muestra a nivel de la dermis evidencia que presenta hinchamiento (Figura 6), sin embargo, no fue posible su remoción empleando medios mecánicos.

Figura 6. Muestra de piel después de su tratamiento con NaCl 1M.

b. *Tratamiento con solución de Tiocianato de sodio 2 N por 25 minutos y remoción mecánica de la epidérmis.* Mediante este procedimiento se separó fácilmente la epidermis de la dermis (Figura 7); el tiocianato de sodio permite el hinchamiento de las fibras de colágeno generando la separación efectiva de la capa de epidermis[93], sin embargo, los lavados posteriores realizados a las muestras no garantizaron la eliminación total del tiocianato, el cual puede reaccionar con el medio ácido (ácido fórmico) al que se someten las muestras durante el aislamiento de elastina, y así desencadenarse la reacción que se presenta en la Ecuación 1.

$$H^+ + SCN^- \rightleftharpoons HCNS + H^+ \rightleftharpoons H_2CNS^+ + H_2O \rightleftharpoons \quad NH_3^+ \;\; CO \cdot SH$$

Ecuación 1. Reacción del tiocianato de sodio en medio ácido.

Esta reacción puede implicar la degradación de la muestra de dermis y la interferencia con la integridad de la superficie de la fibra de elastina, por lo que, aunque se remueve fácilmente la epidermis este método no fue seleccionado.

Figura 7. Muestra de piel después de adición de solución de Tiocianato de sodio 2 N.

c. *Tratamiento con solución de NH_4OH 0,32 M en NaCl 1 M y remoción mecánica de la epidermis.* Mediante el uso de una base débil como el NH_4OH se garantizó la separación de la capa de epidermis (Figura 8) en forma similar a la obtenida con el tratamiento con tiocianato de sodio 2 N. Bajo las condiciones de pH alcanzadas se ha reportado que las proteínas no se desnaturalizan[85] y se genera un hinchamiento de las fibras de colágeno[94], debido a que el pH supera el punto isoeléctrico de la proteína (9,3)[95] de forma rápida, por la penetración de las moléculas no disociadas de NH_4OH y NH_3 [85], permitiendo la hidratación y aumento de casi el 100 % del volumen de estas fibras[85], lo que conlleva a la liberación rápida y completa de la epidermis.

Figura 8. Muestra de piel tratadas con solución de NH_4OH 0,32 M en NaCl 1 M.

Adicionalmente, como parte del acondicionamiento de la muestra de piel se requirió incluir una etapa de remoción mecánica de los vellos presentes en la muestra ya que estos no son eliminados durante el proceso de aislamiento de la elastina.

Las modificaciones propuestas al método de Schmelzer indicadas anteriormente consistieron en el remplazo del bromuro de cianógeno por colagenasa tipo I, con el fin de disminuir el impacto ambiental derivado de la alta toxicidad del bromuro de cianogeno[96]. El bromuro de cianógeno degrada colágeno, pero no elastina por la ausencia de metionina en esta última[7], mientras que la colagenasa tipo I tiene especificidad en su acción catalítica por enlaces entre aminoácidos neutros y Gly en la secuencia Pro-X-Gly-Pro[97]; esta última secuencia no se encuentra en la TE por lo que no se generara efecto catalítico de la elastina. Sin embargo, los resultados en el trabajo de Martínez *et al*[96] evidenciaron que el alto contenido de colágeno en el aislamiento de elastina empleando colagenasa puede estar asociado a la inactivación de la enzima por los remanentes de 2-mercaptoetanol, necesario para eliminar las microfibrillinas de fibrilina, y usado previamente en el proceso para romper los puentes disulfuro de estas estructuras, las cuales contienen aproximadamente un 14 % de residuos de cisteina[98], y forman los puentes disulfuro para estabilizar la molécula. De otro lado se ha reportado previamente que la colagenasa tipo I, no tiene la capacidad de degradar colágeno tipo VI[99], el cual se expresa a nivel de la dermis papilar y hace parte de los 20 diferentes tipos de colágenos que se han identificado en piel

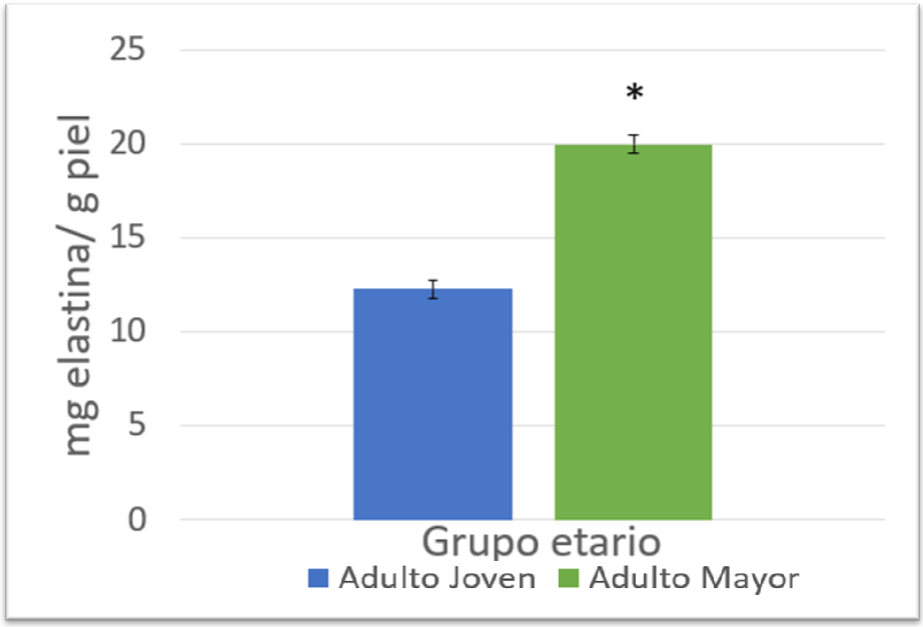
humana[100], lo que también puede explicar que la colagenasa no degradara completamente el colágeno presente en las muestras.

En consecuencia, el aislamiento de elastina a partir de dermis humana se basó en el método propuesto por Schmelzer *et al*.[7], en el cual se realizan lavados iniciales con solución salina para eliminar las proteínas hidrosolubles, con posteriores lavados con solventes orgánicos que de acuerdo con la polaridad eliminan contenido lipídico. La solución de bromuro de cianógeno en ácido fórmico escinde los enlaces peptídicos con residuos de metionina presentes en las fibras de colágeno, y ausentes en elastina; adicionalmente, el ácido fórmico permite el retiro de lípidos que aún puedan permanecer contenidos, por la alta solubilidad de estos componentes en este ácido[101]. La solución de agente caotrópico que contiene el 2-mercaptoetanol permite la reducción de los puentes disulfuro presente en las microfibrillas, inestabilizando la estructura y permitiendo su ruptura. Finalmente, la digestión con tripsina permite remover las microfibrillas remanentes, a través de la lisis que genera en los residuos de Lys y Arg[102], los cuales también se encuentran en la molécula de elastina, pero están involucrados en la formación de desmosina e isodesmosina, por lo cual no se encuentran disponibles para la acción de la enzima.

4.1.1 Cantidad de elastina obtenida a partir de muestras de piel

La cantidad de elastina obtenida a partir de las muestras de piel por grupos etarios (adulto joven y adulto mayor) se presentan en la Gráfica 1. Se evidencia un mayor contenido de elastina por gramo de piel en el grupo etario de adulto mayor (20,0 mg elastina/g piel; 2,0 %), mientras que en las muestras de donantes jóvenes fue de 12,3 mg elastina/g piel (1,2 %). Los porcentajes obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura, en la cual se indica que en la piel la elastina representa del 2 % al 8 % (basado en peso seco del tejido)[30]. Adicionalmente, estos resultados se correlacionan con estudios previos donde se ha identificado que el fotoenvejecimiento de la piel, al igual que en el envejecimiento intrínseco, pero en menor grado, se forman depósitos de material elástico por el aumento del número de las fibras elásticas y el engrosamiento[103]; lo anterior posiblemente asociado a que la degradación de elastina es más lenta que la síntesis, lo que lleva a una

acumulación de fibras parcialmente degradadas[104]. Adicionalmente, el mayor porcentaje de elastina por gramo de piel del grupo de adulto mayor también puede verse influenciado por la pérdida de otros componentes de la MEC que se presenta en las muestras de piel de adultos. Sin embargo, también se han reportado resultados opuestos a los obtenidos en el presente estudio, donde se indica que el porcentaje de elastina disminuye en piel protegida del sol a través de las décadas[92]; estas diferencias pueden ser relacionadas a las técnicas empleadas en su determinación y al contenido de agua presente en las muestras.



Gráfica 1. Contenido de elastina en piel humana de diferentes edades.
*Resultados presentados como media ± s.e.m (n = 25); * p<0.05.*

4.1.2 Identificación de elastina y colágeno en el material aislado

Con el fin de identificar la presencia de elastina y colágeno en el material obtenido posterior al proceso de aislamiento, se sometieron muestras al proceso de tinción con Verhoeff-Van Gieson y Tricrómico de Masson; los resultados se presentan en la Figura 9.

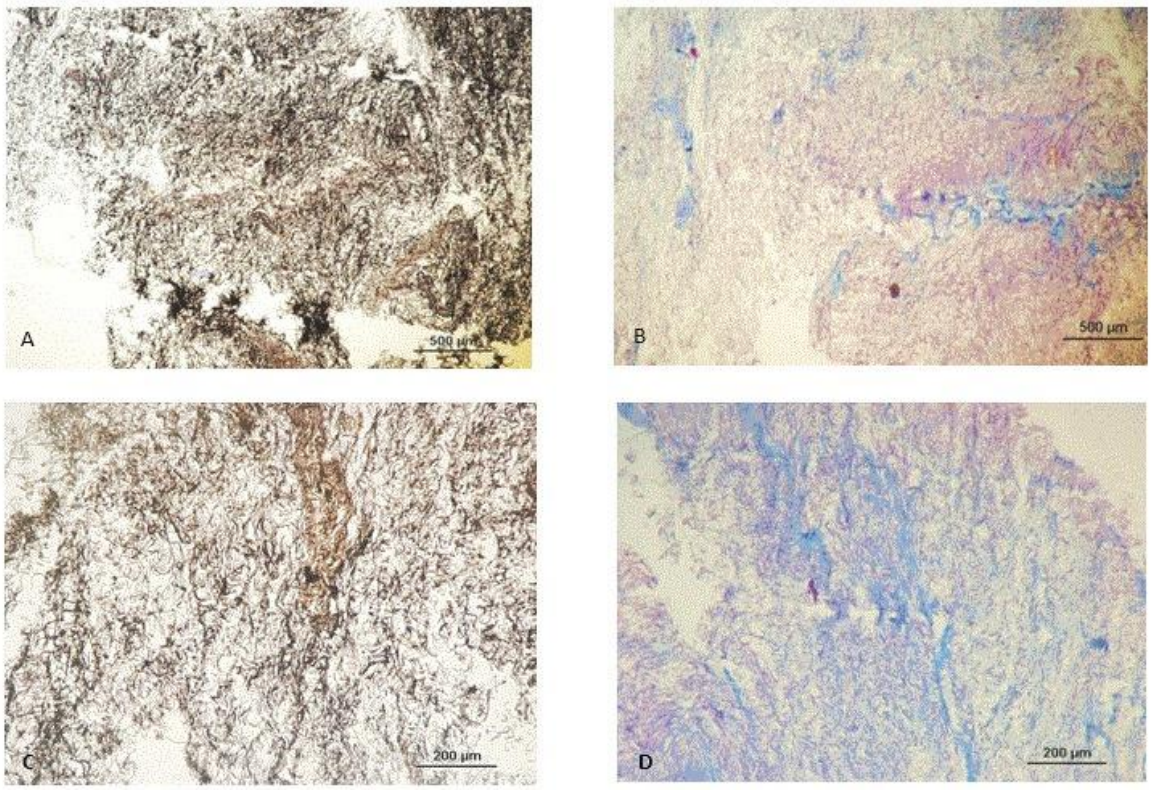


Figura 9. Microfotografías de tinción de muestra obtenidas del proceso de aislamiento.
(A) Verhoeff Van Gieson escala 500 µm (B) Tricrómico de Manson escala 500 µm (C) Verhoeff Van Gieson escala 200 µm (D) Tricrómico de Manson escala 200 µm

La tinción de Verhoeff-Van Gieson revela estructuras en forma fibrilar que de acuerdo con la coloración oscura corresponden a fibras elásticas, mientras que la tinción de Tricrómico de Masson evidencia algunos depósitos sectorizados de colágeno, coloración azul, el cual puede corresponder a colágeno Tipo III, que solo crece hasta aproximadamente 30-40 nm[105], permitiendo su incrustación dentro de la fibra de elastina y dificultando la remoción durante el proceso de aislamiento. Sin embargo, como se observa en la Figura 9B, la elastina y otras proteínas de la MEC se observan como tinción color rosa, ocupando la mayoría del campo de observación (Figura 9B). Teniendo en cuenta el alto contenido de colágeno en la piel, siendo aproximadamente el 80 % del peso seco de la piel humana[106], se puede concluir que el método de aislamiento es adecuado y permite obtener muestras de elastina con pocos residuos de colágeno.

4.2 Comparación de la actividad elastolítica de elastasas

Para realizar el estudio del efecto de la integridad de las fibras de elastina obtenidas de piel de los dos grupos etarios, se definieron como criterios para la selección de las enzimas a estudiar: incluir una representante de cada una de las familias de elastasas, que se exprese en piel humana, se tenga establecido para ésta la preferencia de clivaje y requerimiento de exositios, y finalmente, que tuvieran reportes contradictorios en estudios que comparan su actividad frente a otras elastasas o que la literatura las reportara en todos los casos, como la enzima de mayor actividad dentro de su familia.

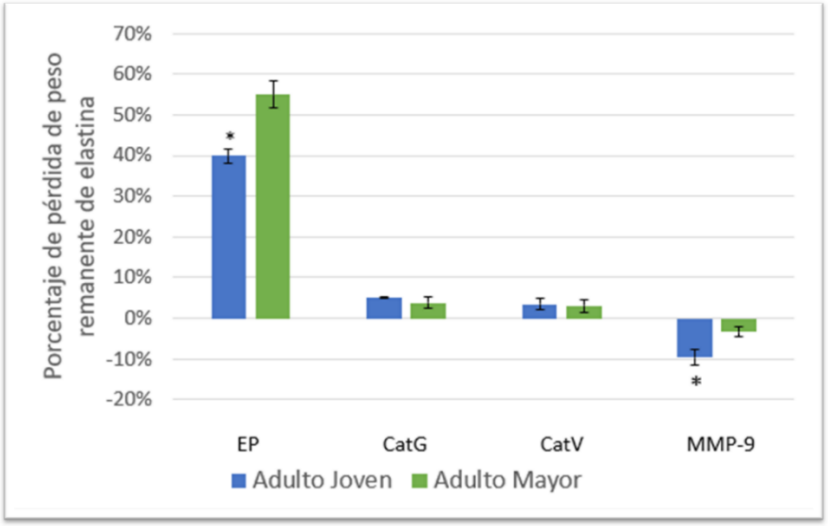
Teniendo en cuenta que la única enzima del grupo de proteasas aspárticas con actividad elastolítica es PEP y esta no se expresa en piel, esta familia no se tuvo en cuenta. De la familia de serín proteasas se incluyó la EP, que se expresa en piel[107], es referenciada en la literatura como una de las más potentes y se estableció como referente para comparar la actividad elastolítica, y Cat G por la controversia en la información disponible, dado que algunos estudios reportan tener menor actividad que otras enzimas de su mismo grupo[81, 8, 50], mientras que otros la han identificado como la enzima de mayor potencia como elastasa en fibra intacta comparada con HLE y PR3[32, 7, 11]. De las cisteín proteasas se seleccionó la Cat V, por ser la elastasa de mayor potencia elastolítica dentro de esta familia reportada hasta la fecha, mientras que MMP-9 fue escogida por presentar reportes contradictorios en la capacidad catalítica frente a fibras de elastina integra; algunos reportes indican que puede degradar elastina integra[71, 10, 11], mientras que otros no han identificado esta capacidad[72], o han identificado que actúa solamente sobre fibra integra, mas no sobre elastina previamente degradada[11].

Para cada una de las enzimas se determinó por búsqueda bibliográfica las condiciones óptimas para su actividad catalítica frente al sustrato elastina, las cuales fueron mencionadas previamente en el capítulo de materiales y métodos. De otro lado y con el fin de implementar una metodología robusta que permita cuantificar la actividad elastolítica, en las condiciones del presente estudio, se evaluó un método gravimétrico para identificar diferencias en el remanente de elastina, y se ajustaron e implementaron las condiciones para la cuantificación de proteína solubilizada por el método de ninhidrina que indica la

hidrólisis de dominios hidrofóbicos y entrecruzamiento de la elastina, y la determinación de DES/IDES, como marcador de la solubilización de la parte entrecruzada de la elastina.

4.2.1 Método gravimétrico

Los remantes de las digestiones de elastina con cada una de las enzimas fueron pesados para establecer si el método gravímetro empleando una balanza analítica (d=0,1 mg) permite cuantificar el cambio asociado a la liberación de péptidos. Los datos para cada una de las enzimas se presentan en la Gráfica 2. Los pesos establecidos presentan una alta variabilidad y no en todos los casos se correlacionan con los obtenidos por el método de ninhidrina y de DES/IDES. Es posible que la limitación de exactitud de la balanza analítica no permita establecer cambios menores a 10 mg para las enzimas que presentan menor potencia elastolítica. Esta técnica puede emplearse para determinar modificaciones empleando elastasas con potencia similar a la PE. Adicionalmente, los resultados se ven influenciados por la dificultad para eliminar el contenido de agua o en el caso de MMP-9, por la adherencia del agente activador en las fibras, lo que se confirmó posteriormente mediante la microscopia electrónica de barrido, lo que generó el aumento en el peso. Esta técnica puede llegar a ser útil si se dispone de una balanza de mayor sensibilidad que permita determinar las variaciones a nivel de microgramos.



Gráfica 2. Resultados método gravimétrico degradación enzimática de elastina por Cat G, Cat V, EP y MMP-9.
*Resultados presentados como media ± s.e.m (n = 4 o 5); * p<0.05.*

4.2.2 Contenido de proteína solubilizada mediante el método de ninhidrina.

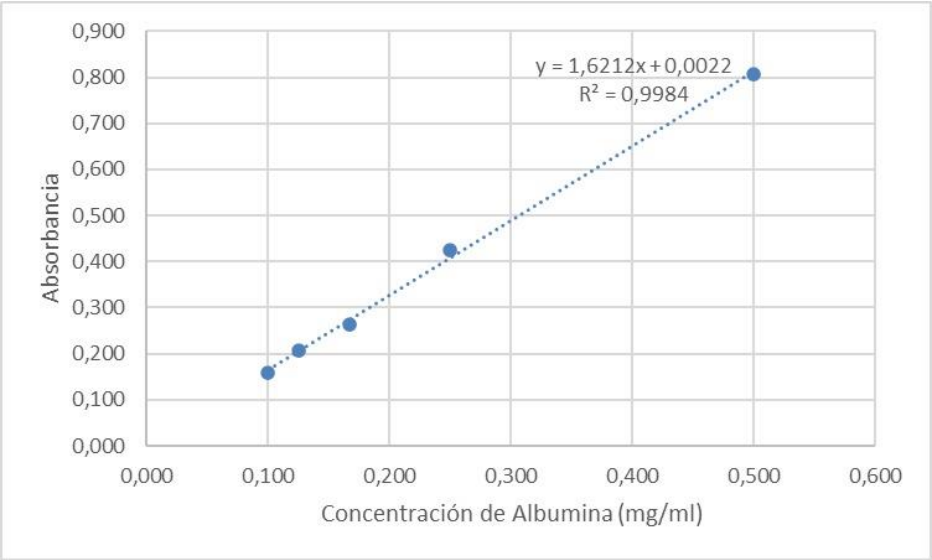
4.2.2.1 Implementación de métodos analíticos para la determinación del grado de degradación de elastina

Teniendo en cuenta que la elastina es una proteína insoluble, su degradación puede determinarse cuantificando el contenido de péptidos o proteína total que se encuentra en solución posterior al tratamiento de las fibras de elastina con las elastasas, ya que los péptidos liberados son solubles en medios acuosos. Como se observa en el Anexo 1, existen diferentes métodos empleados para la cuantificación de la degradación de la elastina; en los últimos años se ha incrementado el número de estudios que emplean métodos por HPLC acoplado a espectrometría de masas, sin embargo, estos métodos solo pueden determinar algunos de los péptidos de los dominios hidrofóbicos de la proteína ya que el secuenciamiento del entrecruzamiento no es posible empleando softwares convencionales y el número de péptidos esta influenciado adicionalmente por el tratamiento de la muestra y la retención en la columna cromatográfica. Adicionalmente, otros métodos por HPLC - UV/VIS, no reflejan la cantidad total de péptidos solubilizados ya que la elastina no contiene una alta cantidad de aminoácidos aromáticos que absorban a estas longitudes de onda[108]. Teniendo en cuenta esto, se seleccionó un método general colorimétrico para la cuantificación de proteína total en el sobrenadante, que tuviera baja selectividad y reaccionara con los aminoácidos que se encuentran mayoritariamente en la secuencia de la TE.

El método de ninhidrina fue seleccionado ya que su rango lineal se encuentra entre 0,1 µg/mL a 50,0 µg/mL de albumina y reacciona con la mayoría de aminoácidos[109], lo que permitió garantizar la cuantificación de los péptidos liberados de elastina, con grupo amino primario (575 nm), exceptuando la Pro que no absorbe a esta longitud de onda , ya que la digestión ácida de las muestras previa a la adición del reactivo de ninhidrina permite la obtención de los aminoácidos libres, excepto para los péptidos Ile-Ile, Ile-Val, Val-Val que se han reportado como resistentes a la hidrolisis[110] efectuada bajo las condiciones implementadas en el presente trabajo, las cuales minimizan la degradación de

aminoácidos termolábiles (Ser, Thr, Tyr)[110], también presentes en bajas cantidades en TE. De otro lado, en el monómero de TE, solamente se encuentra la secuencia Val-Val en 5 posiciones, por lo tanto, el método de hidrolisis permite el análisis de la mayoría de los péptidos que se encuentren en solución.

Para la expresión de los resultados, se construyó una curva de calibración entre 0,1 y 0,5 mg/mL de albúmina bovina (Gráfica 3), para la cual se estableció una relación lineal entre la concentración y la absorbancia (R^2= 0,9984) que permite la interpolación de la respuesta de las muestras obtenidas por la degradación de la elastina con las diferentes enzimas.



Gráfica 3. Curva de Calibración de Albumina, Método de ninhidrina.

Teniendo en cuenta que las muestras de elastina aisladas contienen remanentes de colágeno, adicionalmente se implementó un método para la determinación total de DES, ya que está presente exclusivamente en elastina. La DES es un aminoácido polar, soluble en medio acuoso lo que facilita su aislamiento y posterior cuantificación. Se decidió implementar un método por HPLC-UV/Vis empleando par iónico, debido a la facilidad de análisis y disponibilidad de equipos y reactivos. En la bibliografía consultada se encontró que las determinaciones se realizan a 268 nm; 240 nm y 275 nm. Como se observa en la Figura 10 la DES presenta dos picos a 235 nm y 275 nm. Sin embargo, teniendo en cuenta

el contenido de aminoácidos de la elastina, en la secuencia de TE solo la Tyr y el Trp absorben a esa longitud de onda, por lo que por su bajo contenido en la elastina no se espera que generen una alta interferencia en el método[111].

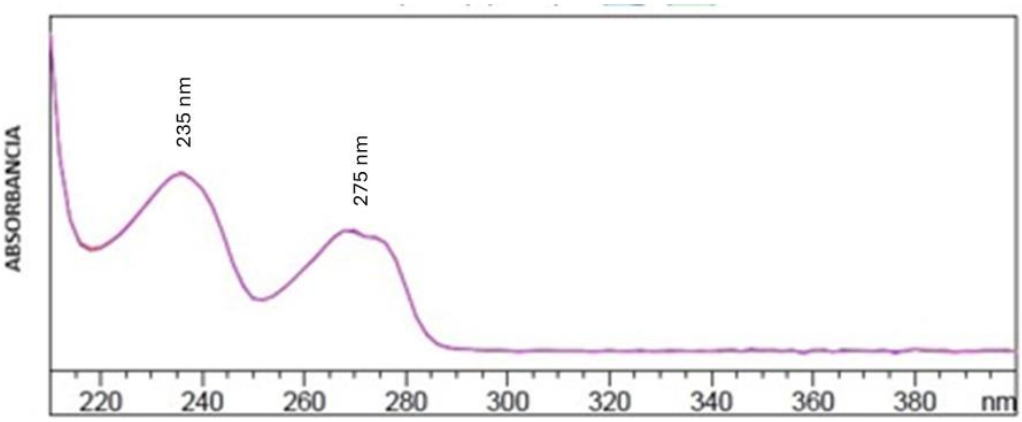


Figura 10. Espectros UV obtenidos por RP-HPLC-DAD.

El método permite la separación de la DES de la IDES (Figura 11), eluyendo primero la IDES[112]. La respuesta fue expresada como DES/IDES tanto en la curva de calibración como en las muestras, y fue calculada como la suma de las áreas de los picos de DES e IDES.

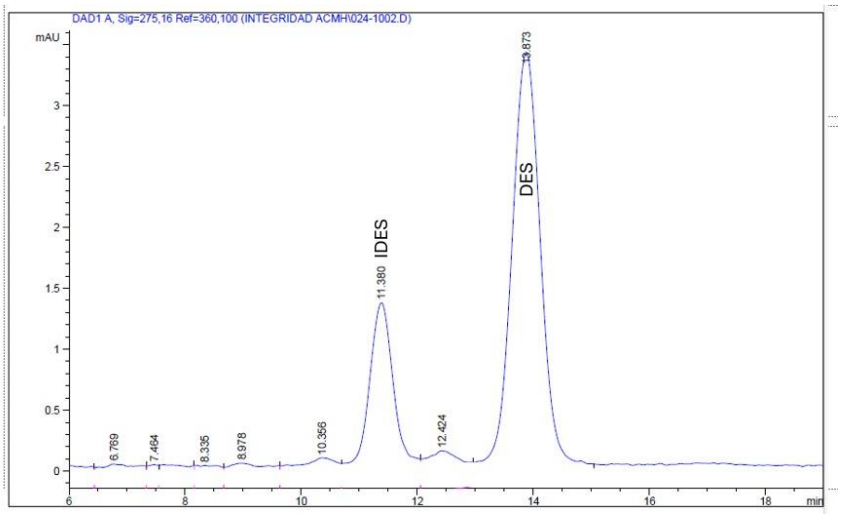
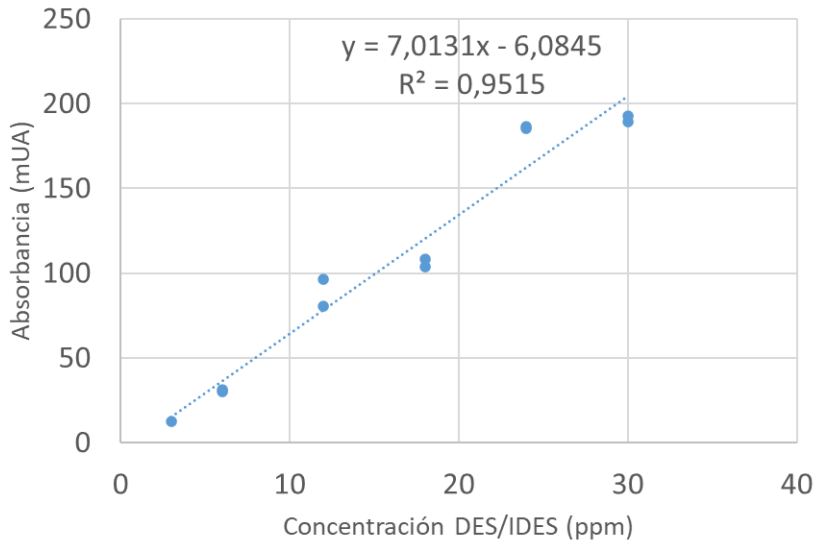


Figura 11. Cromatograma para estándar de Desmosina

La curva de calibración en un rango de concentraciones de 3 ppm a 30 ppm fue construida empleando un estándar externo de desmosina (Gráfica 4). A pesar de que los datos presentan un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9515, si existe regresión entre las variables, determinado mediante la prueba de ANOVA de regresión ($p=3{,}223\ e^{-7} < \alpha\ (0.05)$), por lo cual la curva puede emplearse para la interpolación de la respuesta de las muestras de elastina degradada con las diferentes enzimas.



Gráfica 4. Curva de Calibración Desmosina método HPLC UV-VIS

4.2.2.2 Determinación de la influencia de la integridad de la fibra sobre la actividad elastolítica de elastasas.

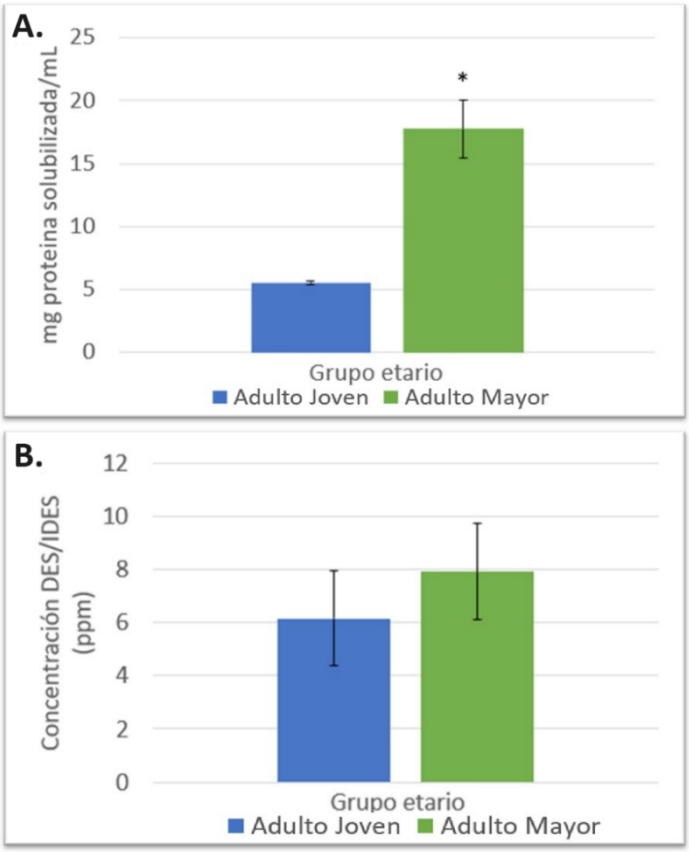
De acuerdo con las definiciones de Werb *et al*[41] y Bieth J[50] las diferentes enzimas evaluadas pueden considerarse elastasas ya que degradan, en diferente cantidad, las fibras de elastina. A diferencia de enzimas como la HLE y neprilisina[12] que requieren el daño previo de la elastina, las elastasas evaluadas pueden degradar tanto la fibra de elastina degradada como la intacta.

Aunque existen diferentes mecanismos que generan la degradación de la fibra elástica, en el presente estudio se hace referencia al término degradación como sinónimo de hidrolisis enzimática.

- *Actividad elastolítica de Cat G*

En la Gráfica 5A se presentan los resultados de proteína total solubilizada por Cat G en los dos grupos etarios empleando el método de ninhidrina. Se determinó una diferencia estadísticamente significativa entre ellos, siendo mayor la actividad elastolítica sobre fibras de elastina previamente degradadas. Cat G muestra un sitio de unión más grande y flexible que acomoda residuos alifáticos, hidrofóbicos, aromáticos y básicos de mayor tamaño en S1[32], los cuales pueden encontrarse más expuestos en fibras degradadas que en fibras intactas ya que en el envejecimiento, especialmente el influenciado por factores extrínsecos, las escisiones en TE se asocian con mayor destrucción de las partes N-terminal y central de esta molécula y una mayor susceptibilidad a la degradación enzimática[30]. Cat G degrada colágeno tipo IV[32], VI[113] y fibronectina[32], componentes de la MEC de la dermis de la piel[100], que aún pueden estar presentes como impurezas y, por tanto, ser cuantificados por el método de ninhidrina.

Mediante la cuantificación de DES/IDES (Gráfica 5B) se encontró que la cantidad de DES liberada a partir de las muestras de adulto mayor (7,92 ppm DES/IDES) es ligeramente superior a la obtenida con las muestras de adultos jóvenes (6,17 ppm). Sin embargo, la alta variabilidad de los datos no permite evidenciar que las diferencias sean estadísticamente significativas.



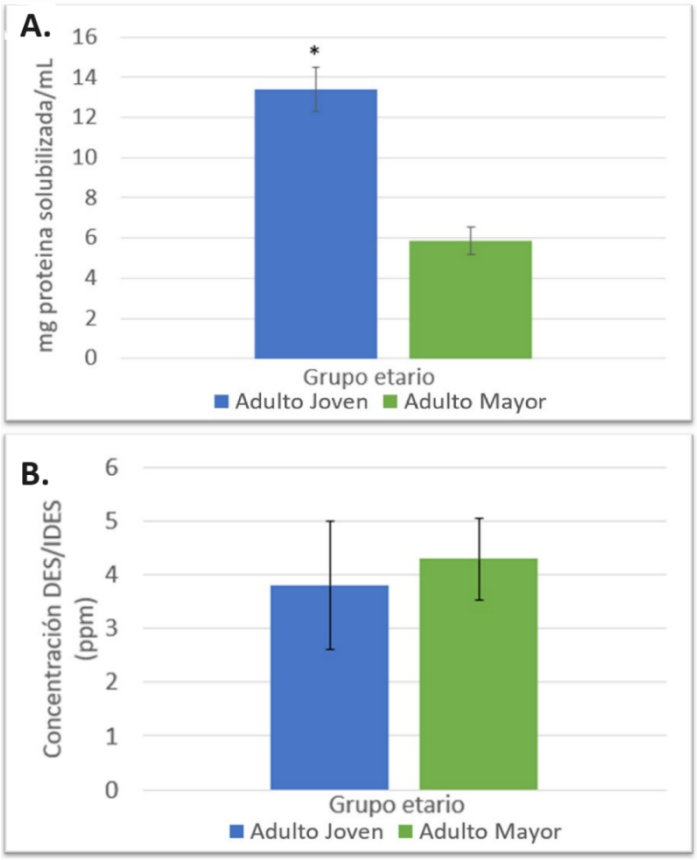
Gráfica 5. Elastina solubilizada por Cat G de acuerdo con el grupo etario.
A. Proteína total expresada en mg de albumina/mL (Método de ninhidrina). Resultados presentados como media ± s.e.m (n = 4 o 5); p<0.05.*

*B. Contenido de DES/IDES. Resultados presentados como media ± s.e.m (n = 5); * p<0.05.*

Estudios previos que evaluaron el efecto de la integridad de la fibra frente a la acción de la Cat G no establecieron diferencias estadísticamente significativas[7, 11]; esta divergencia puede estar relacionada con el método de cuantificación de la degradación, dado que los estudios reportados en la literatura compararon la sumatoria del número de péptidos liberados e identificados por detector de masas, lo cual se limita a la detección en el rango de m/z seleccionado, a la sensibilidad del detector de masas empleado y a la posibilidad de secuenciación de los péptidos identificados, mientras que en el presente estudio se determinó a través del total de proteína solubilizada y posteriormente hidrolizada, que permitió detectar los grupos amino primarios de los residuos de aminoácidos liberados, incluyendo DES/IDES, al igual que por el contenido del marcador DES/IDES.

- *Actividad elastolítica de Cat V*

Comparando los resultados obtenidos para la degradación de elastina con Cat V (Gráfica 6A y 6B), la cantidad de proteína total indica un mayor efecto elastolítico de la enzima sobre el sustrato de fibra de elastina de donantes jóvenes y no diferencias significativas entre los promedios de DES total.



Gráfica 6. Elastina solubilizada por Cat V de acuerdo con el grupo etario.
*A. Proteína total expresada en mg de albumina/mL (Método de ninhidrina). Resultados presentados como media ± s.e.m. (n= 5); * p<0.05*
*B. Contenido de DES/IDES. Resultados presentados como media ± s.e.m (n = 5); * p<0.05*

La diferencia en la respuesta de los dos métodos de cuantificación empleados en este estudio podría asociarse a su selectividad. Adicionalmente, la Cat V puede degradar otras proteínas como la fibrilina[114], presente en la MEC, proteína que[52] puede estar presente como impureza en las muestras de elastina aislada; teniendo en cuenta que el método de

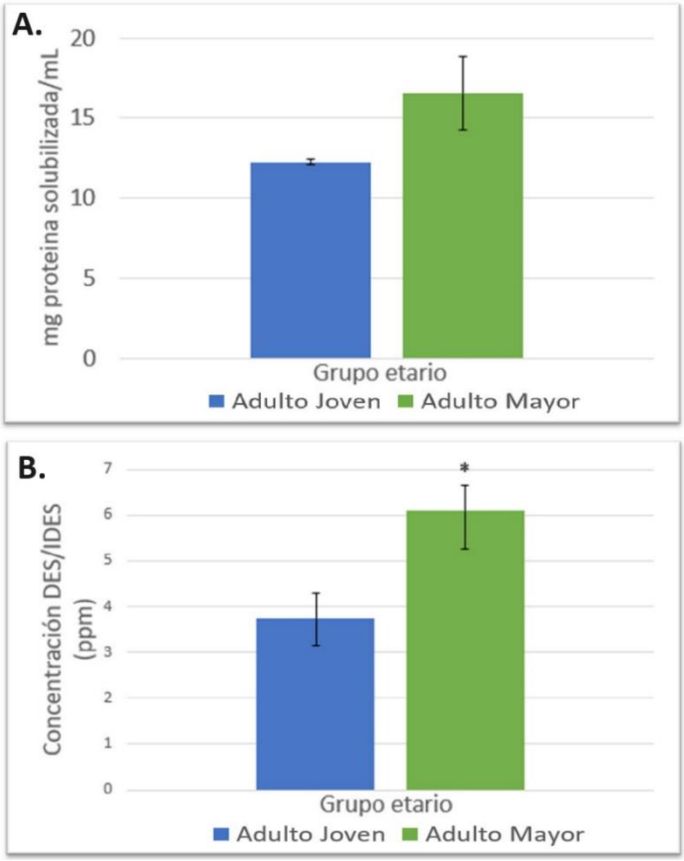
ninhidrina es poco selectivo, no podría diferenciar entre los aminoácidos provenientes de elastina y fibrilina.

Los resultados obtenidos durante este estudio con el método de ninhidrina difieren de los reportados por Panwar *et al*.[5], en donde se identificó a través de la determinación de DES por el método ELISA y análisis de perfil de péptidos por HPLC, que Cat V presenta mayor actividad sobre la fibra de elastina obtenida de piel de adultos mayores. Estas diferencias pueden estar asociadas a que IDES es 35 veces menos reactiva con el anticuerpo antidesmosina, lo que indica que el ensayo solamente determina DES[115], y dado que el contenido de DES e IDES en elastina de piel es de 13,2 pmol/µg y 9,5 pmol/µg[116], respectivamente, también indicaría que solo se detecta la fracción de los péptidos liberados que contiene esta molécula. La determinación por HPLC en el estudio de Panwar, cuantifica el área bajo la curva de los fragmentos retenidos en el tiempo de corrida establecido, lo que no garantiza que se estén cuantificando la totalidad de los péptidos liberados por la enzima. A diferencia de estos métodos, la determinación a través del método de ninhidrina cuantifica la mayoría de los aminoácidos de los péptidos liberados, teniendo en cuenta que el único aminoácido que no se determina a la longitud de onda (575 nm) es la Pro que representa aproximadamente el 12,5 % de la secuencia de TE[4].

- *Actividad elastolítica de MMP-9*

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio para MMP-9, Gráfica 7A y B, se evidencia que no hay diferencia estadísticamente significativa en solubilizar elastina de acuerdo con el grupo etario (Adulto jóvenes: 12,23 ± 0,15, Adulto mayor: 16,53 ± 2,28), pero si se establecen diferencias mediante la cuantificación de DES. Ambos métodos muestran un comportamiento similar de mayor degradación de la elastina en el grupo de adultos mayores, aunque este es opuesto al reportado en estudios previos[11]. Así como se ha comentado anteriormente, estas diferencias pueden estar asociadas al método de cuantificación, dado que en el estudio de Mora, se realizó la lectura directa a una longitud de onda de 280 nm, que permite identificar principalmente desmosina, isodesmosina y en menor grado tirosina[8], mientras que la lectura de la reacción con ninhidrina a una longitud de onda de 575 nm permite identificar los residuos de aminoácidos que presentan amina primaria[115], identificando todos los residuos libres excepto Pro. Otros componentes de la MEC de la dermis que degrada MMP-9 y pueden estar aún presentes como impurezas,

son colágeno tipo IV y V[117]. Los péptidos liberados de estos componentes pueden ser cuantificados por el método de ninhidrina.

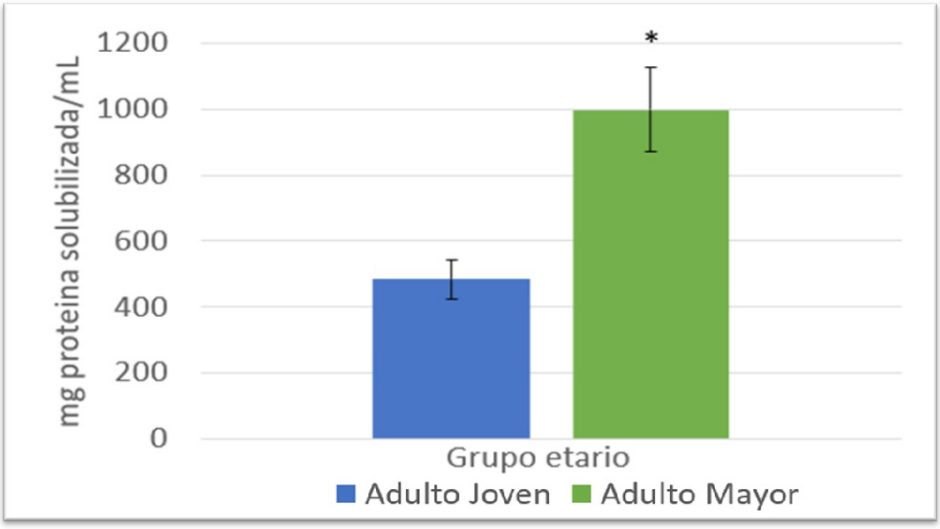


Gráfica 7. Elastina solubilizada por MMP-9 de acuerdo con el grupo etario.
*A. Proteína total expresada en mg de albumina/mL (Método de ninhidrina) Resultados presentados como media ± s.e.m (n = 4 o 5); * p<0.05.*
*B. Contenido de DES/IDES. Resultados presentados como media ± s.e.m (n = 5); * p<0.05*

- *Actividad elastolítica de EP*

En la Gráfica 8 se presentan los resultados de la fracción solubilizada de elastina por la acción elastolítica de EP, los cuales concuerdan con reportes previos[7]. En el presente estudio los resultados muestran que la enzima degrada tanto la fibra de elastina integra como la parcialmente alterada, y de acuerdo al análisis estadístico, la acción sobre la fibra de adultos mayores es significativamente superior a la de fibra de donantes jóvenes; esto podría estar asociado a los dominios sobres los cuales actúa, indicando que el efecto

catalítico es compartido entre dominios expuestos al solvente, hidrofóbicos, como en dominios no expuestos, los hidrofílicos.



Gráfica 8. Elastina solubilizada por EP de acuerdo con el grupo etario. *Proteína total expresada en mg de albumina/mL (Método de ninhidrina). Resultados presentados como media ± s.e.m (n = 5); * p<0.05*

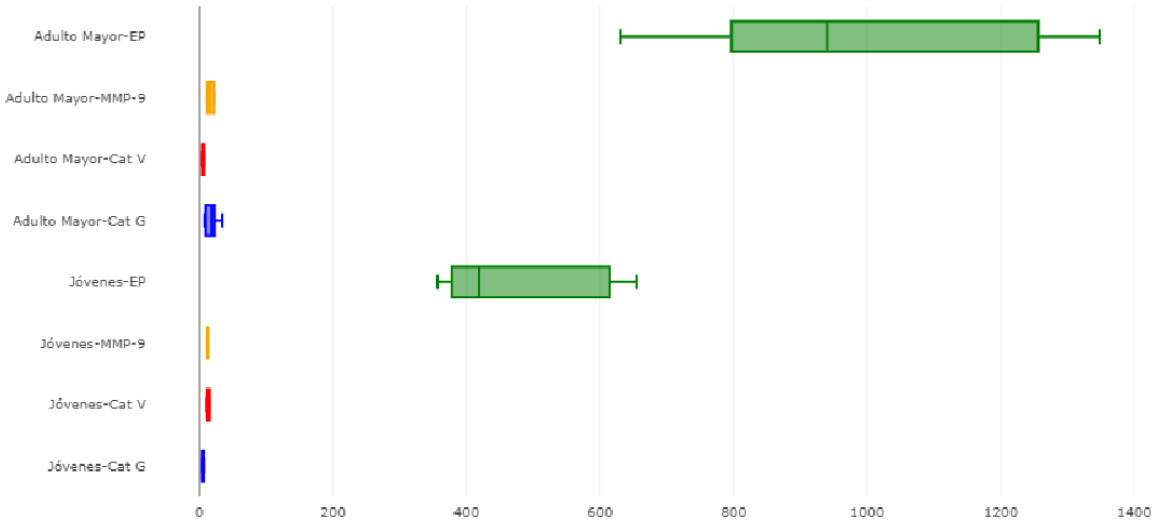
4.2.2.3 Comparación del efecto de tipo de enzima e integridad de la fibra sobre la actividad elastolítica de las elastasas

En la literatura se ha reportado que la degradación de elastina fibrilar por elastasas es influenciada por la especificidad de los enlaces peptídicos de las elastasas, diferencias en las secuencias disponibles en la superficie de elastina que pueden ser reconocidas por el dominio catalítico y la presencia de los sitios remotos de contacto entre la enzima y el sustrato[11].

El análisis estadístico de los resultados de proteína total solubilizada (método de ninhidrina) realizado mediante un ANOVA de dos vías, inicialmente evidencia que la EP generó la mayor degradación de la elastina entre las elastasas evaluadas (Gráfica 9). En reportes previos, se ha descrito que EP Tipo I es una elastasa agresiva que hidroliza

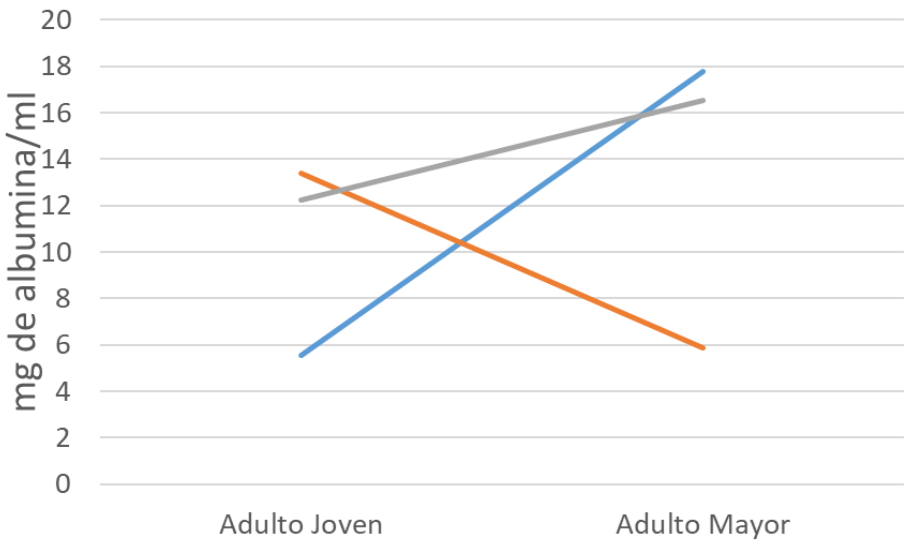
elastina a través de los enlaces Ala-X y Val-X[118] los cuales representan aproximadamente el 35 % de los residuos de aminoácidos totales en la TE. Igualmente, los resultados obtenidos concuerdan con los reportes previos en los que se indica que la EP presenta mayor actividad elastolítica que la Cat G[8]. Sin embargo, difieren frente a lo reportado para Cat V [56] en el que esta enzima presenta la actividad elastolítica más potente en células de mamífero evaluada frente a EP y MMP-12 entre otras elastasas. Estas diferencias pueden asociarse al sustrato empleado (elastina marcada con rojo Congo) y el método de cuantificación basado en la determinación específica del complejo péptido-rojo Congo.

Adicionalmente, en el análisis estadístico comparativo se determinó que ninguna de las elastasas expresadas en la piel (Cat G, Cat V y MMP-9) presenta actividad significativamente mayor al compararlas entre sí (Gráfica 9). Como se indicaba en la sección anterior, algunas de estas enzimas tienen mayor actividad sobre elastina aislada de un grupo etario en particular, por lo que el no establecer diferencias estadísticamente significativas podría asociarse a la dispersión de los resultados, que se relaciona con la variabilidad biológica sumada a la variabilidad de la actividad enzimática que se presenta a pesar de la estandarización de los criterios de selección de los participantes en el estudio y de las condiciones de digestión con las enzimas.



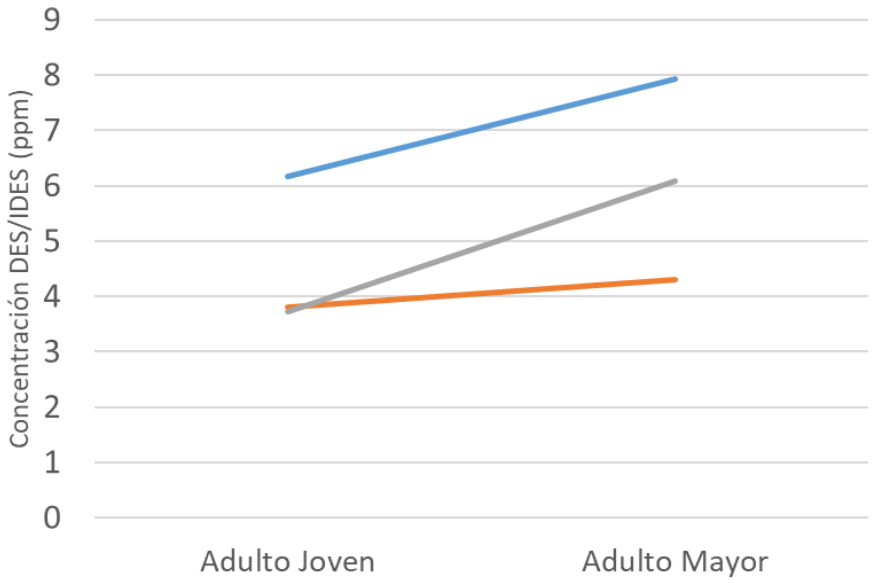
Gráfica 9. Diagrama de caja del efecto de las enzimas Cat G, Cat V, EP y MMP-9, en relación con la integridad de la fibra de elastina
(p<0.05)*

Adicionalmente, mediante el análisis de ANOVA de dos vías se estableció que existe interacción entre los factores evaluados (tipo de enzima y la integridad de la fibra de elastina empleada como sustrato), lo cual se evidencia en la Gráfica 10 como la intersección entre la respuesta de las diferentes enzimas en las elastinas aisladas de los donores adultos jóvenes y adultos ancianos. Las elastinas aisladas de los diferentes grupos etarios presentan diferente grado de daño en la estructura de la fibra de elastina asociado al efecto del envejecimiento intrínseco principalmente, por lo que no es posible generalizar que el envejecimiento conlleve a una mayor susceptibilidad de la elastina frente a la degradación enzimática, sino que debe tenerse en cuenta el tipo de enzima y el sustrato en el cual se está evaluando. Las enzimas de la familia serín proteasas (EP y Cat G) se comportan de forma similar de acuerdo a la integridad de la fibra, con mayor efecto catalítico sobre la fibra de elastina previamente dañada; mientras que la Cat V actúa sobre la fibra intacta, lo que podría sugerir que los dominios expuestos al solvente son su blanco catalítico, y en caso de alterarse estos fragmentos por otras enzimas o por la acción del envejecimiento intrínseco, posiblemente la actividad elastolítica de la enzima disminuya. Con respecto a la MMP-9, como se mencionó previamente, el efecto parece mantenerse de forma independiente a la integridad de la fibra de elastina. Adicionalmente, estos resultados sugieren que algunas enzimas como la Cat V y MMP-9, podrían tener un rol preponderante en el inicio del daño de la fibra de elastina, lo cual favorecería la actividad de otras enzimas como la Cat G que tienen una mayor actividad en fibras de elastina degradadas por efecto del envejecimiento. Sin embargo, esto debe verificarse en estudios posteriores.



Gráfica 10. Comparación de la solubilización de elastina por Cat G, Cat V y MMP-9
Cat G (azul), Cat V (naranja) y MMP-9 (gris).

En el análisis mediante ANOVA de dos vías de los resultados de DES e IDES obtenidos para Cat G, Cat V y MMP-9 (Gráfica 11), no se identifica que la liberación de DES/IDES obedezca a la interacción entre el tipo de enzima y la integridad de la fibra, lo cual podría indicar que la degradación de la región reticulada de la elastina es altamente influenciada por el tipo de enzima. Las enzimas Cat G y MMP-9 degradan las fibras de elastina a nivel de los dominios hidrofílicos en los dos grupos etarios, sin embargo, presentan mayor actividad en la fibra de elastina obtenida de donantes mayores, lo que podría estar asociado a la degradación previa y, por consiguiente, mayor exposición de estos dominios para generar el efecto catalítico, con la liberación de los aminoácidos polares DES/IDES, presentes en el entrecruzamiento. Mientras que los resultados de Cat V no presentan diferencias estadísticamente significativas en los dos grupos etarios, posiblemente por el requerimiento de sitios remotos intactos, que permitan la unión a los exositios[119] previamente reportados, y necesarios para generar el efecto catalítico sobre la fibra de elastina. En consecuencia, tampoco es posible generalizar que el efecto del envejecimiento y por lo tanto, el grado degradación de la fibra de elastina, se asocie a una mayor actividad enzimática de todas las elastasas evaluadas.



Gráfica 11. Comparación contenido DES/IDES según grupo etario y tipo de enzima.
Cat G (azul), Cat V (naranja) y MMP-9 (gris).

De acuerdo con los resultados obtenidos, la cantidad de péptidos liberados durante la degradación de elastina por parte de las elastasas podría asociarse primero, a la pérdida de la integridad de la estructura de la fibra de elastina y por lo tanto, a diferencias en las secuencias disponibles en la superficie que puedan ser reconocidas por el dominio catalítico y de secuencias de elastina que permitan la unión de la enzima a la elastina, los cuales han sido referenciados previamente como factores que afectan la degradación de la elastina fibrilar por elastasas. Segundo, al tipo de enzima evaluada, lo cual puede asociarse a la especificidad del clivaje de las enzimas y requerimiento de exositios para su acción. El efecto de estos factores no es independiente; la interacción del tipo de enzima y la integridad de la fibra podría explicar las diferencias de la potencia de la actividad de las elastasas reportadas en estudios previos, por lo que un daño en la fibra de elastina como el que se asocia al efecto del envejecimiento no genera una mayor susceptibilidad de la proteína a la degradación por todas las elastasas.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se determinó que la potencia elastolítica de Cat G, Cat V y MMP-9 no presenta diferencias estadísticamente significativas entre sí y son inferiores a la actividad elastolítica de EP.

Estadísticamente se demostró que la interacción entre la integridad de la fibra de elastina y la elastasa evaluada determina la cantidad de péptidos totales hidrolizados por las enzimas evaluadas; se estableció que el daño estructural de la fibra de elastina asociado al envejecimiento no genera para todas las elastasas un incremento en su potencia elastolítica.

Las enzimas Cat V y MMP-9 presentaron la mayor degradación de elastina de adultos jóvenes sugiriendo que pueden llegar a favorecer la actividad de otras enzimas como la Cat G y EP que presentan una mayor actividad en fibras de elastina degradada, sin embargo, se requieren estudios experimentales posteriores para establecer la existencia de este sinergismo.

Se implementaron métodos para el aislamiento de elastina, cuantificación de los resultados de la hidrolisis por espectrofotometría y cromatografía líquida que permiten continuar con el estudio comparativo de la actividad de las elastasas.

5.2 Recomendaciones

Continuar evaluando comparativamente la actividad elastolítica de otras elastasas expresadas en la piel humana para determinar posibles dianas que permitan retrasar el inicio del envejecimiento cutáneo.

Evaluar la actividad de las enzimas en elastina obtenida de piel de hombres que permita comparar con los resultados obtenidos en el presente trabajo y determinar si la variabilidad

asociada con el género modifica el daño de la fibra elástica y la actividad catalítica de las elastasas.

Desarrollar e implementar métodos analíticos por HPLC acoplado a masas para realizar la caracterización de los péptidos liberados por las enzimas, que permitan correlacionar los resultados obtenidos con los dominios de la estructura de la TE.

Anexo 1: Comparación estudios actividad elastolítica de enzimas

Año - Estudio	**Enzimas y concentraciones evaluadas**	**Elastina y método de purificación de Elastina**	**Método de identificación y/o cuantificación degradación de elastina**	**Resultados**
1980 -The degradation of human lung elastin by neutrophil proteinases[81]	EP porcina y HLE - 20 µg HLE y Cat G - 50 µg	10 mg elastina de pulmón humano. Métodos: 1. Degradativo - Método Lansing 2. No degradación: tratamiento con guanidina-HCl y colagenasa	Método de ninhidrina	EP porcina solubilizo elastina obtenida por los dos métodos de aislamiento, en aproximadamente 6 veces mayor tasa que HLE, en condiciones que no favorecen la elastólisis por parte de EP. Las digestiones con EP y HLE, de elastina tratadas con colagenasa se producen a una velocidad cuatro veces superior a las digestiones con elastina aislada por el método de Lansing. De acuerdo con el análisis de aminoácidos de los péptidos solubilizados, se descarta que los resultados estén asociados a la presencia de impurezas con el método de aislamiento con colagenasa. Cat G solubilizo elastina en una menor velocidad que HLE (12 % de HLE). Cat G no hidrolizó el péptido sintético evaluado, a pesar de su actividad elastolítica.
1981 - Stimulation of the Elastolytic Activity of Leukocyte Elastase by Leukocyte Cathepsin G[8]	Cat G, HLE, EP - 2 µM, 1 µM, 1 µM, respectivamente.	9 mg elastina insoluble de pulmón humano. Método Lansing	Péptidos solubilizados determinados por absorbancia de 280 nm, principalmente debido a DES e IDES y en menor grado Tyr	Cat G fue 5 veces menos activa sobre elastina de pulmón que HLE. HLE fue 21 veces menos activa sobre la elastina de pulmón que EP. Cat G estimulo la actividad de HLE.

1991 - Human 92- and 72-kilodalton Type IV Collagenases Are Elastases[70]	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, HLE, TR - 0,5 µg, 0,5 µg, 0,5 µg, 0,6 µg, 0,15 µg, respectivamente.	40 µg κ-elastina soluble/ml de gel Método KOH Etanol	Electroforesis	MMP-2 y MMP-9 evidenciaron tener actividad catalítica sobre el sustrato κ-elastina gel. MMP-1 y MMP-3 no evidenciaron tener actividad catalítica sobre el sustrato κ-elastina gel. HLE presento cierto retraso en la migración electroforética, presumiblemente, debido a la unión extremadamente estrecha de la enzima y al sustrato de elastina. TR no produjo efecto catalítico sobre el sustrato k-elastina (no se muestran los datos).
	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, HLE - 10 µg/mL	35 µg [^{3}H]-elastina de ligamento bovino radiomarcada Método Lansing	Recuento de centello ([^{3}H]-elastina soluble)	MMP-2 y MMP-9 solubilizaron [^{3}H]-elastina cuando se incubaron con APMA. MMP-9 recombinante mostro mayor actividad elastolítica que MMP-9 nativa, incluso en ausencia de APMA y su actividad elastolítica se duplicó cuando se incubo con APMA. MMP-1 y MMP-3 no mostraron capacidad para degradar elastina insoluble. En base molar, MMP-9 tuvo el 30 % de la actividad de HLE, para solubilizar [^{3}H]-elastina.
1991 - The Elastolytic Activity of Cathepsin G: An Ex Vivo Study with Dermal Elastin[50]	HLE y Cat G - 0,76 µM - 1,56 µM, respectivamente.	Elastina de piel humana no expuesta al sol (donantes de 18 a 20 años) *6* µm de espesor. *Ex vivo*	Análisis morfométrico	En las muestras de piel se identificó que el volumen que ocupa la fibra elástica corresponde al 2,8 % del volumen de la dermis. El tratamiento enzimático de las secciones de piel, evidencio un ligero aumento del diámetro medio de las fibras elásticas. Las secciones tratadas con HLE, Cat G o mezcla de las dos enzimas presentaron promedios de diámetro de las fibras elásticas de 3 %, 14,5 % y 7,4 % mayor que el promedio del diámetro del control, respectivamente.

	HLE y Cat G - 1,1 µM - 1,5 µM, respectivamente.	9 mg elastina insoluble de pulmón humano. Método Lansing	Péptidos solubilizados determinados por absorbancia de 280 nm, principalmente debido a DES e IDES y en menor grado Tyr	La actividad de 1,5 µM de Cat G, fue del 23 % de 1,1 µM de HLE. Cat G y HLE degradaron el 56,8 % de elastina cuando están presentes simultáneamente en la solución de las secciones de tejido. La actividad de la mezcla de las dos enzimas fue 1,9 veces mayor que la suma de las actividades individuales. Cat G tuvo del 20 al 30 % de la capacidad de HLE para solubilizar elastina.
1991 - Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan[72]	MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10 No reportan la concentración en estudio.	50 µg [^{3}H]-elastina insoluble donada (no permite identificar método de aislamiento)	Recuento de centello [^{3}H]-elastina soluble	MMP-2 fue la enzima de mayor actividad a pH 7.5. MMP-7 mostro similar actividad a pH 8.5. MMP-9 fue la menos eficiente, se destaca contaminación con TIMP-1 (inactivador), sin embargo, pudo estar parcialmente desnaturalizada. MMP-3 y MMP-10 tuvieron baja actividad elastolítica.
1996 - Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase[78]	MMP-12, HLE - Tres concentraciones diferentes en el rango aproximado de 10 nM a 50 nM	1 µg [^{3}H]-elastina de ligamento nucal bovino Método Starcher	Recuento de centello [^{3}H]-elastina soluble	MMP-12 tuvo un tercio de la capacidad elastolítica de HLE.
2000 - Analysis of the ex vivo specificity of human gelatinases A and B towards skin collagen and elastic fibers by computerized morphometry[71]	MMP-2, MMP-9, HLE - [10 – 100 nM], [10 – 200 nM], [10 – 50 µM], respectivamente.	Elastina de piel humana de prepucio (donante de 10 años) 8 µm de espesor. *Ex vivo*	Análisis morfométrico	A una concentración de 50 nM de MMP-9 se evidencio degradación de todos los tipos de fibras elásticas. La fibra de elastina redujo en aproximadamente un 50 % su longitud, cuando se incubo con MMP-9 y HLE a concentración de 25 nM y 25 µM, respectivamente. En base molar, MMP-9 fue 1000 veces más eficiente que HLE en hidrolizar fibra elástica de piel *ex vivo.* El grado de hidrolisis de la fibra elástica por MMP-2 (10 - 100 nM), no excedió el 10 % Concentraciones de MMP-9 de hasta 200 nM no produjeron un aumento importante en la degradación de la fibra elástica (los datos no se muestran). HLE fue activa solo en concentraciones µM y alcanzó la desaparición casi completa de las fibras elásticas a una concentración de 50 µM.

2003 - Matrilysin-dependent Elastolysis by Human Macrophages[79]	MMP-9, MMP-12, MMP-7 – 1 pmol	8 mg elastina (tipo E60) Método de Partridge	Recuento de centello [^{3}H]- elastina soluble	MMP-9 y MMP-12 degradaron elastina. MMP-7 mostro ser 6 veces más eficiente en la actividad elastolítica, comparada con MMP-9 y MMP-12. No se detectó interacciones sinérgicas entre las tres MMPs.
2004 - Cathepsin V, a Novel and Potent Elastolytic Activity Expressed in Activated Macrophages[56]	Cat V, Cat K, Cat S, HLE, EP, MMP-2, MMP-12 - 1 µM	10 mg elastina rojo Congo Método Starcher	Absorbancia a 490 nm (determinación del colorante liberado)	Cat K es fue menos estable en las condiciones evaluadas, y muestra 4 veces menos actividad al comparase con Cat V. Cat V mostró tener de 2 a 8 veces mayor actividad elastolítica entre las elastasas evaluadas. Se demostró que Cat V contribuye en más del 20 % de la actividad elastolítica del grupo de las cistein proteasas de macrófagos. Cat V fue identificada como la enzima elastolítica más potente en mamíferos.
2006 - Study of human lung elastin degradation by different elastases using high-performace liquid chromatography/mass spectrometry[80]	HLE, MMP-9, MMP-12, Cat K - 500 µg	500 µg elastina de pulmón humano Método Starcher	HPLC-UV-ESI-MS	MMP-9 no generó cantidades detectables de péptidos pequeños. Mayores tiempos de incubación, incrementaron la concentración de péptidos producidos, pero no generaron nuevos péptidos. Cantidades crecientes de HLE generaron nuevos péptidos. Cat K y MMP-12 produjeron los péptidos más pequeños y largos, respectivamente.

2007 - Interaction between human cathepsins K, L, and S and elastins[6]	Cat K, Cat L, Cat S - 285 nM, 100 nM, 100 nM, respectivamente.	1 mg elastina bovina: • ligamento de cuello • aorta • pulmón. Método Starcher:	Fluorescencia del péptido marcado a 390 nm y 480 nm.	Cat L fue la enzima más potente cuando se comparó la velocidad de liberación de péptidos de elastina soluble, seguido por Cat S con el 90 % de la actividad de Cat L, y Cat K con el 55 % de la actividad de Cat L. Las tres catepsinas tuvieron preferencia por la degradación de elastina de aorta, comparada con elastina de pulmón y de ligamento de cuello. Cat L y Cat S fueron similares en su acción, con una preferencia de acuerdo al siguiente orden: ligamento de cuello<pulmón<aorta. Cat K fue la más activa para degradar elastina de ligamento de cuello y aorta, pero mostro escasa actividad en elastina de pulmón. Cat L fue la enzima más eficiente en degradar elastina de pulmón. Con todos los sustratos Cat L mostro la mayor actividad elastolítica en comparación con Cat S.
2011 - Liberation of desmosine and isodesmosine as amino acids from insoluble elastin by elastolytic proteases[69]	Dominio catalítico de MMP-12, MMP-9, dominio catalítico de MMP-2, HLE, Cat S, Cat L, Cat K - 1 µg	10 mg elastina de aorta bovina Método Lansing	HPLC	De las enzimas evaluadas, solamente MMP-12 y HLE liberaron IDES y en menor medida DES de elastina insoluble. Cuando se expuso elastina oxidada a MMP-12 libero más DES e IDES. Estos resultados reafirman la hipótesis que modificaciones oxidativas pueden promover la degradación enzimática de elastina. Al silenciar MMP-9, aumento la liberación de DES e IDES por la acción de MMP-12 y HLE, esto se puede deber a que aumenta la accesibilidad de MMP-12 activa o HLE a regiones de DES e IDES en elastina insoluble.

2011 - The action of neutrophil serine proteases on elastin and its precursor[32]	HLE, PR3, Cat G - 1:50, 1:15, 1:15 (w/w)	1 mg elastina/mL de piel humana. Método Starcher	nanoHPLC/MALDI-TOF/TOF MS y MS/MS	El mayor número de sitios de escisión y péptidos se identificó para Cat G, mientras que HLE no pareció escindir la elastina madura con tanta eficacia. Cat G exhibió la especificidad de escisión más amplia de todas las elastasas evaluadas, lo que probablemente condujo a una degradación más completa de elastina reticulada en comparación con HLE y PR3.
2012 - Does human leukocyte elastase degrade intact skin elastin[7]	HLE, EP - 1:50 (w/w)	1 mg elastina/mL de piel humana donantes de 35 y 36 años Método Starcher	nanoHPLC/MALDI-TOF/TOF MS y MS/MS	El número de péptidos identificados de la digestión con HLE (30 péptidos) fue relativamente menor al compararse con los péptidos de la digestión con EP (150 péptidos). Los péptidos obtenidos con HLE fueron del orden de 18 kDa, mientras que los obtenidos con EP fueron menores a 4 kDa
	HLE, Cat G- 1:50 (w/w)	1 mg elastina/mL de piel humana de donantes de 35, 36, 87 y 90 años Método Schmelzer	nanoHPLC/MALDI-TOF/TOF MS y MS/MS	HLE no genero la liberación de ningún péptido de elastina obtenidas de donantes jóvenes aisladas por el método Schmelzer, mientras que las muestras de elastina de donantes mayores fueron degradadas. Cat G solubilizó todas las muestras de elastina, independientemente de la edad del donante, con una distribución en el rango de masas de < 1 a 6 kDa, sugiriendo que la elastina fue completamente clivada.
2012 - Measurement of MMP-9 and MMP-12 degraded elastin (ELM) provides unique information on lung tissue degradation[10]	MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-9, Cat K, Cat S - 2 µg	0,33 mg elastina/mL de aorta humana Método Starcher	nano LC-MS-MS	Se identifico que todas las enzimas evaluadas generaron péptidos: 6 por MMP-1 7 por MMP-3 11 por MMP-8 4 por MMP-9 10 por Cat K 12 por Cat S

	MMP-9, MMP-12 - 2 µg	0,33 mg elastina/mL de aorta, pulmón no soluble Método Starcher 0,33 mg elastina soluble de aorta y pulmón Método Partridge		MMP-9 no produjo el clivaje de elastina insoluble, evaluando la liberación del péptido ELN-441; mientras que MMP-12 si. MMP-9 libero el péptido ELN-441 de elastina soluble. MMP-12 es más rápida para degradar elastina de aorta que MMP-9.
2017 - Degradation of skin elastin in ageing and disease: An ex vivo quantitative proteomic approach[11]	EP, Cat G, NEP, MMP-9 - 1:50, 1:100, 1:100, 1:100	1 mg elastina/mL de piel humana Método Schmelzer	nano HPLC nano ESI QqTOF MALDI TOF	Cat G degrada elastina obtenida de las muestras de donantes adultos mayores y jóvenes. NEP degrada elastina de adultos mayores MMP-9 degrada elastina de donantes jóvenes.
2019 - Elastolytic activity K, S, and V promotes vascular calcification[51]	Cat K, Cat S, Cat V - 2µM	20 mg elastina/mL de cuello bovino. Método Starcher	Análisis SEM Peso Inmunoensayo – Desmosina Perfil cromatográfico HPLC nanoHPLC/MALDI-TOF/TOF MS y MS/MS	Cat V redujo drásticamente la longitud y espesor de las fibras de elastina. Elastina mineralizada revelo menos degradación (aprox 25 – 30 %) después de ser expuestas a Cat K, S y V comparada a las fibras no mineralizados. Cat K, S y V degradaron fibras mineralizadas, sin embargo, la cantidad de desmosina liberada de las fibras mineralizadas fue menor (aproximadamente el 50 %) en comparación con elastina nativa. Los resultados de las áreas bajo la curva de los cromatogramas de los sobrenadantes de las digestiones evidenciaron una reducción del 47 % en los fragmentos liberados de elastina mineralizada para Cat K, del 54 % para Cat S y del 56 % para Cat V, en comparación con la fibra nativa.

2020 - Expression of elastolytic cathepsins in human skin and their involvement in age-dependent elastin degradation[5]	Cat K, Cat S, Cat V – 1 µM	1 mg elastina de piel humana de donantes de 6-10 años, 30-40 años y 70-86 años. Método Schmelzer	Peso. Inmunoensayo - Desmosina Perfil cromatográfico HPLC nanoHPLC/MALDI-TOF/TOF MS y MS/MS	La actividad de Cat V causo la mayor fragmentación de las fibras y produjo las fibrillas más pequeñas. Cat V demostró ser la elastasa más potente a través de la determinación de DES, seguida por Cat K y S. Se evidenciaron en las muestras de piel de donantes adultos mayores, niveles de expresión reducidos de Cat K, S y V en epidermis y dermis, comparada con muestras de donantes jóvenes.

6. Bibliografía

1. Shapiro S, Endicott S, Province M, Pierce J, Campbell E. (1991). Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *The Journal Clinical Investigation,* 87:1828-1834. DOI: 10.1172/JCI115204.

2. Procknow SS, Kozel BA. (2022). Emerging mechanisms of elastin transcriptional regulation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 323(3):C666-C677. DOI:10.1152/ajpcell.00228.2022.

3. Parks W, Pierce R, Lee K, Mecham R. (1993). Elastin En: Kleinman H, ed. *Advances in Molecular and Cell Biology*. 134-182. [JAI Press]. Recuperado de: DOI:10.1016/S1569-2558(08)60201-5.

4. Schmelzer CEH, Duca L. (2022). Elastic fibers: formation, function, and fate during aging and disease. *FEBS Journal*. 289(13):3704-3730. DOI:10.1111/febs.15899.

5. Panwar P, Hedtke T, Heinz A, et al. (2020). Expression of elastolytic cathepsins in human skin and their involvement in age-dependent elastin degradation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 1864(5):129544. DOI:10.1016/j.bbagen.2020.129544.

6. Novinec M, Grass RN, Stark WJ, Turk V, Baici A, Lenarčič B. (2007). Interaction between human cathepsins K, L, and S and elastins. *Journal of Biological Chemistry*. 282(11):7893-7902. DOI:10.1074/jbc.M610107200.

7. Schmelzer CEH, Jung MC, Wohlrab J, Neubert RHH, Heinz A. (2012). Does human leukocyte elastase degrade intact skin elastin? *FEBS Journal*. 279(22):4191-4200. DOI:10.1111/febs.12012.

8. Boudier C, Holle C, Bieth JG. (1981). Stimulation of the elastolytic activity of leukocyte elastase by leukocyte cathepsin G. *Journal of Biological Chemistry*. 10256-1025(20):10256-10258. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)68612-6.

9. Heinz A, Taddese S, Sippl W, Neubert RHH, Schmelzer CEH. (2011). Insights into the degradation of human elastin by matrilysin-1. *Biochimie*. 93(2):187-194. DOI:10.1016/j.biochi.2010.09.011.

10. Skjøt-Arkil H, Clausen RE, Nguyen QHT, et al. (2012). Measurement of MMP-9 and -12 degraded elastin (ELM) provides unique information on lung tissue degradation. *BMC Pulm Med*. 12. DOI:10.1186/1471-2466-12-34.

11. Mora Huertas AC. (2017). *Degradation of Skin Elastin in Ageing and Disease: An Ex Vivo Quantitative Proteomic Approach* (Tesis doctoral). Martin-Luther-Universität Halle-Wittemberg; Alemania.

12. Mora Huertas AC, Schmelzer CEH, Luise C, et al. (2017) Degradation of tropoelastin and skin elastin by neprilysin. *Biochimie*. 146:73-78. DOI:10.1016/j.biochi.2017.11.018.

13. Shimizu H. (2007). *Shimizu's Textbook of Dermatology*. JA KUBU.

14. Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. (2011). Anatomy and Physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses´Association,* 3(4), 203-213. DOI:10.1097/JDN.0b013e3182274a98.

15. Thomas S, Enders J, Kaiser A, et al. (2023). Abnormal intraepidermal nerve fiber density in disease: A scoping review. *Front Neurol*. 14:1161077. DOI:10.3389/fneur.2023.1161077.

16. Bettley FR. (2004). *Textbook of Dermatology*. *British Medical Journal.* 1(5428), 178. DOI:10.1136/bmj.2.4835.546.

17. Cole MA, Quan T, Voorhees JJ, Fisher GJ. (2018). Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging. *J Cell Commun Signal*. 12(1):35-43. DOI:10.1007/s12079-018-0459-1.

18. Hwa C, Bauer EA, Cohen DE. (2011). Skin biology. *Dermatol Ther*.;24(5):464-470. DOI:10.1111/j.1529-8019.2012.01460.x.

19. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. (2016). The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol*. 25(2):92-98. doi:10.1111/exd.12832.

20. Dengjel J, Bruckner-Tuderman L, Nyström A. (2020). Skin proteomics–analysis of the extracellular matrix in health and disease. *Expert Rev Proteomics*. 17(5):377-391. DOI:10.1080/14789450.2020.1773261.

21. Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ. (2016). Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 5(3):119-136. DOI:10.1089/wound.2014.0561.

22. Ghosh R. (2017). Role of proteases in photo-aging of the skin. En: *Proteases in Physiology and Pathology*. 435. DOI:10.1007/978-981-10-2513-6.

23. Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, et al. (2000). Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *Journal of Biological Chemistry*. 275(50):39027-39031. DOI:10.1074/jbc.M006700200.

24. Aziz J, Shezali H, Radzi Z, et al. (2016). Molecular Mechanisms of Stress-Responsive Changes in Collagen and Elastin Networks in Skin. *Skin Pharmacol Physiol*. 29(4):190-203. DOI:10.1159/000447017.

25. Heinz A. (2021). Elastic fibers during aging and disease. *Ageing Res Rev*. 66, 101255. DOI:10.1016/j.arr.2021.101255.

26. Sherratt MJ. (2009). Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *Age (Omaha)*. 31(4):305-325. DOI:10.1007/s11357-009-9103-6.

27. El-Khoury J, Kurban M, Abbas O. (2014). Elastophagocytosis: Underlying mechanisms and associated cutaneous entities. *J Am Acad Dermatol*. 70(5):934-944. DOI:10.1016/j.jaad.2013.12.012.

28. Mecham RP. (2011). Extracellular Matrix: An Overview. *Current protocols in cell biology*. 57(1), 10-1. DOI:10.1007/978-3-642-16861-1.

29. Debelle L, Alix AJP. (1999). The structures of elastins and their function. *Biochimie*. 81(10):981-994. DOI:10.1016/S0300-9084(99)00221-7.

30. Mora Huertas AC, Schmelzer CEH, Hoehenwarter W, Heyroth F, Heinz A. (2016). Molecular-level insights into aging processes of skin elastin. *Biochimie*. 128-129:163-173. DOI:10.1016/j.biochi.2016.08.010.

31. Parks W.C., Mecham R., eds. (2011). *Extracellular Matrix Degradation*. Springer Science & Business Media. DOI:10.1007/978-3-642-16861-1.

32. Heinz A, Jung MC, Jahreis G, et al. (2012). The action of neutrophil serine proteases on elastin and its precursor. *Biochimie*. 94(1):192-202. DOI:10.1016/j.biochi.2011.10.006.

33. Du X. (2013). *Structural Requirements for the Elasotolytic and Collagenolytic Activities of Cathepsins and the Identification of Exosite Inhibitors* (Tesis Doctoral) University of British Columbia.

34. Weihermann AC, Lorencini M, Brohem CA, de Carvalho CM. (2017). Elastin structure and its involvement in skin photoageing. *Int J Cosmet Sci*. 39(3):241-247. DOI:10.1111/ics.12372.

35. Miekus N, Luise C, Sippl W, Baczek T, Schmelzer CEH, Heinz A. (2019). MMP-14 degrades tropoelastin and elastin. *Biochimie*. 165:32-39. DOI:10.1016/j.biochi.2019.07.001.

36. Heinz A. (2020). Elastases and elastokines: elastin degradation and its significance in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 55(3):252-273. DOI:10.1080/10409238.2020.1768208.

37. Mecham RP, ed. (2012). *Regulation of Matrix Accumulation*. Academic Press.

38. Schmelzer CEH, Getie M, Neubert RHH. (2005). Mass spectrometric characterization of human skin elastin peptides produced by proteolytic digestion with pepsin and thermitase. *J Chromatogr A*. 1083(1-2):120-126. DOI:10.1016/j.chroma.2005.06.034.

39. Eyre DR., Paz MA, Gallop PM. (1984). Cross-linking in collagen and elastin. *Annual review of biochemistry,* 53(1),717-748*.* DOI: 10.1146/annurev.bi.53.070184.003441.

40. Hornebeck W, Emonard H. (2011).The Cell-Elastin-Elastase(s) Interacting Triade Directs Elastolysis. *Front Biosci.* 16(1), 707-722. DOI: 10.2741/3714.

41. Werb Z, Banda MJ, McKerrow JH, Sandhaus RA. (1982). Elastases and elastin degradation. *The Journal of Investive Dermatology*. 79:154-159. DOI:10.1038/jid.1982.28.

42. Kamolz LP, Lumenta LPK DB. (2013). Dermal Replacements in general, burn, and plastic surgery. *Tissue Engineering in Clinical Practice,* 226.

43. Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F. (2007). Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: Physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie*. 90(2):227-242. DOI:10.1016/j.biochi.2007.10.009.

44. Joshi R, Heinz A, Fan Q, et al. (2018). Role for cela1 in postnatal lung remodeling and alpha-1 antitrypsin–deficient emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 59(2):167-178. DOI:10.1165/rcmb.2017-0361OC.

45. Brandt de Oliveira E, Salgado MCO. (2013). Pancreatic Elastases. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 3:2639-2645. DOI:10.1016/B978-0-12-382219-2.00584-6.

46. Owen CA, Campbell EJ. (1999). The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol*. 65(2):137-150. DOI:10.1002/jlb.65.2.137.

47. Korkmaz B, Horwitz M, Jenne D, Gauthier F. (2010). Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol Rev*. 62(4):726-759. DOI:10.1124/pr.110.002733.726.

48. Cavarra E, Fimiani M, Lungarella G, et al. (2002). UVA light stimulates the production of cathepsin G and elastase-like enzymes by dermal fibroblasts: A possible contribution to the remodeling of elastotic areas in sun-damaged skin. *Biol Chem*. 383(1):199-206. DOI:10.1515/BC.2002.020.

49. Voet D, Voet JG, Pratt CW. (2007). *Fundamentos de Bioquímica La Vida a Nivel Molecular.* México.

50. Boudier C, Godeau G, Hornebeck W, Robert L, Bieth JG. (1991*).* The Elastolytic Activity of Cathepsin G: An Ex Vivo Study with Dermal Elastin. *Am J Respir Cell Mol Biol,* 4(6), 497-503. DOI:10.1165/ajrcmb/4.6.497.

51. Andrault P marie, Panwar P, Mackenzie NCW, Brömme D. (2019). Elastolytic activity of cysteine cathepsins K, S, and V promotes vascular calcification. *Sci Rep*. 9:1-13. DOI:10.1038/s41598-019-45918-1.

52. Verma S, Dixit R, Pandey KC. (2016). Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Frontiers in Pharmacology*. 7, 193290. DOI:10.3389/fphar.2016.00107.

53. Codriansky KA, Quintanilla-Dieck MJ, Gan S, Keady M, Bhawan J, Rünger TM. (2009). Intracellular degradation of elastin by cathepsin k in skin fibroblasts - A possible role in photoaging. *Photochem Photobiol*. 85(6):1356-1363. DOI:10.1111/j.1751-1097.2009.00592.x.

54. Brömme D, Li Z, Barnes M, Mehler E. (1999). Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization. *Biochemistry*. 38(8):2377-2385. DOI:10.1021/bi982175f.

55. Somoza JR, Zhan H, Bowman KK, et al. (2000). Crystal structure of human cathepsin V. *Biochemistry*. 39(41):12543-12551. DOI:10.1021/bi000951p.

56. Yasuda Y, Li Z, Greenbaum D, Bogyo M, Weber E, Brömme D. (2004). Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 279(35):36761-36770. DOI:10.1074/jbc.M403986200.

57. Cui N, Hu M, Khalil RA. (2017). Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. En: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 147, 1-73. DOI:10.1016/bs.pmbts.2017.02.005.

58. Laronha H, Caldeira J. (2020). Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells*. 9(5). DOI:10.3390/cells9051076.

59. Sbardella D, Fasciglione GF, Gioia M, et al. (2012). Human matrix metalloproteinases: An ubiquitarian class of enzymes involved in several pathological processes. *Mol Aspects Med*. 33:119-208. DOI:10.1016/j.mam.2011.10.015.

60. Zucker S, Pei D, Cao J, Lopez-Otin C. (2003). Membrane Type-Matrix Metalloproteinases (MT-MMP*). Current Topics in Developmental Biology.* 54, 1-74. DOI: 10.1016/S0070-2153(03)54004-2.

61. Maskos K, Bode W. (2003). Structural Basis of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Molecular biotechnology.* 25, 241-266. DOI: 10.1385/mb:25:3:241.

62. Kridel SJ, Sawai H, Ratnikov BI, et al. (2002). A unique substrate binding mode discriminates membrane type-1 matrix metalloproteinase from other matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*. 277(26):23788-23793. DOI:10.1074/jbc.M111574200.

63. Pérez-García LJ. (2004). Metaloproteinasas y piel. *Actas Dermo-Sifiliograficas*. 95(7):413-423. DOI: 10.1016/S0001-7310(04)76850-7.

64. Eckhard U, Huesgen PF, Schilling O, et al. (2016). Active site specificity profiling of the matrix metalloproteinase family: Proteomic identification of 4300 cleavage sites by nine MMPs explored with structural and synthetic peptide cleavage analyses. *Matrix Biology*. 49:37-60. DOI:10.1016/j.matbio.2015.09.003.

65. Quan T, Little E, Quan H, Qin Z, Voorhees JJ, Fisher GJ. (2013). Elevated matrix metalloproteinases and collagen fragmentation in photodamaged human skin: Impact of altered extracellular matrix microenvironment on dermal fibroblast function. *Journal of Investigative Dermatology*. 133(5):1362-1366. DOI:10.1038/jid.2012.509.

66. Isnard N, Péterszegi G, Robert AM, Robert L. (2002). Regulation of Elastase-Type Endopeptidase Activity, MMP-2 and MMP-9 Expression and Activation in Human Dermal Fibroblasts by Fucose and a Fucose-Rich Polysaccharide. *Biomedicine & pharmacotherapy,* 56(5), 258-264. DOI: 10.1016/S0753-3322(02)00196-8.

67. Van Den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. (2002). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 37(6):375-536. DOI:10.1080/10409230290771546.

68. Antonicelli F, Bellon G, Debelle L, Hornebeck W. (2007). Elastin-Elastases and Inflamm-Aging. *Curr Top Dev Biol*. 79(06):99-155. DOI:10.1016/S0070-2153(06)79005-6.

69. Umeda H, Aikawa M, Libby P. (2011). Liberation of desmosine and isodesmosine as amino acids from insoluble elastin by elastolytic proteases. *Biochem Biophys Res Commun*. 411(2):281-286. DOI:10.1016/j.bbrc.2011.06.124.

70. Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG. (1991). Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *Journal of Biological Chemistry*. 266(12):7870-7875. DOI: 10.1016/S0021-9258(20)89530-1.

71. Berton A, Godeau G, Emonard H, et al. (2000). Analysis of the ex vivo specificity of human gelatinases A and B towards skin collagen and elastic fibers by computerized morphometry. *Matrix Biology*. 19(2):139-148. DOI:10.1016/S0945-053X(00)00057-3.

72. Murphy G, Cockett MI, Ward R V, Docherty AJ. (1991). Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem J*. 277 (Pt 1(June):277-279. DOI:10.1042/bj2770277.

73. Szecsi PB. (1992). The aspartic proteases. *Scand J Clin Lab Invest*. 52:5-22. DOI:10.3109/00365519209104650.

74. Eder J, Hommel U, Cumin F, Martoglio B, Gerhartz B. (2007). Aspartic Proteases in Drug Discovery. *Pharmaceutical Desing.* 13(3), 271-285. DOI: 10.2174/138161207779313560.

75. Ahn J, Cao MJ, Yu YQ, Engen JR. (2013). Accessing the reproducibility and specificity of pepsin and other aspartic proteases. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 1834(6):1222-1229. DOI:10.1016/j.bbapap.2012.10.003.

76. Quan T, Fisher GJ. (2015). Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: A mini-review. *Gerontology*. 61(5):427-434. DOI:10.1159/000371708.

77. Freitas-Rodríguez S, Folgueras AR, López-Otín C. (2017). The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 1864(11):2015-2025. DOI:10.1016/j.bbamcr.2017.05.007.

78. Gronski TJ, Martin RL, Kobayashi DK, et al. (1997). Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *Journal of Biological Chemistry*. 272(18):12189-12194. DOI:10.1074/jbc.272.18.12189.

79. Filippov S, Caras I, Murray R, et al. (2003). Matrilysin-dependent Elastolysis by Human Macrophages. *J Exp Med*. 198(6):925-935. DOI:10.1084/jem.20030626.

80. Barroso B, Abello N, Bischoff R. (2006). Study of human lung elastin degradation by different elastases using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem*. 358(2):216-224. DOI:10.1016/j.ab.2006.07.011.

81. Reilly CF, Travis J. (1980). The degradation of human Lung elastin by neutrophil proteinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure.* 621(1):147-157. DOI: 10.1016/0005-2795(80)90070-7.

82. Taddese S, Weiss AS, Neubert RHH, Schmelzer CEH. (2008). Mapping of macrophage elastase cleavage sites in insoluble human skin elastin. *Matrix Biology*. 27(5):420-428. DOI:10.1016/j.matbio.2008.02.001.

83. Heinz A, Jung MC, Duca L, et al. (2010). Degradation of tropoelastin by matrix metalloproteinases - Cleavage site specificities and release of matrikines. *FEBS Journal*. 277(8):1939-1956. DOI:10.1111/j.1742-4658.2010.07616.x.

84. Taddese S, Weiss AS, Jahreis G, Neubert RHH, Schmelzer CEH. (2009). In vitro degradation of human tropoelastin by MMP-12 and the generation of matrikines from domain 24. *Matrix Biology*. 28(2):84-91. DOI:10.1016/j.matbio.2008.12.002.

85. Baumberger JP, Suntzeff V, Cowdry EV. (1942). Methods for the Separation of Epidermis from Dermis and Some Physiologic and Chemical Properties of Isolated Epidermis. *J Natl Cancer Inst*. 2(5), 413-423. DOI: 10.1093/jnci/2.5.413.

86. Starcher B. (2001). A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples. *Anal Biochem*. 292(1):125-129. DOI:10.1006/abio.2001.5050.

87. Sun SW, Lin YC, Weng YM, Chen MJ. (2006). Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19(2-3):112-117. DOI:10.1016/j.jfca.2005.04.006.

88. Umeda H, Takeuchi M, Suyama K. (2001). Two new elastin cross-links having pyridine skeleton. Implication of ammonia in elastin cross-linking in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 276(16):12579-12587. DOI:10.1074/jbc.M009744200.

89. Lansing AI, Rosenthal TB, Alex M, Dempsey' EW. (1952). The Structure and Chemical Characterization of Elastic Fibers as Revealed by Elastase and by Electron Miscroscopy. *The Anatomical Record.* 114(4), 555-575. DOI: 10.1002/ar.1091140404.

90. D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. (2013). UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci*. 14(6):12222-12248. DOI:10.3390/ijms140612222.

91. Olsen J, Gaetti G, Grandahl K, Jemec GBE. (2021). Optical coherence tomography quantifying photo aging: skin microvasculature depth, epidermal thickness and UV exposure. *Arch Dermatol Res*. 314(5):469-476. DOI:10.1007/s00403-021-02245-8.

92. El-Domyati AM, Attia S, Saleh F, et al. (2002). Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol*. 11:398-405. DOI: 10.1034/j.1600-0625.2002.110502.x.

93. Diaz LA, Heaphy MR, Calvanico NJ, Tomasi TB, Jordon RE. (1977). Separation of epidermis from dermis with sodium thiocyanate. *Journal of Investigative Dermatology*. 68(1):36-38. DOI:10.1111/1523-1747.ep12485156.

94. Felsher Z. (1946). Studies on the adherence of the epidermis to the corium. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 8(1):35-47. DOI:10.1038/jid.1947.7.

95. Li Y, Asadi A, Monroe MR, Douglas EP. (2009). pH effects on collagen fibrillogenesis in vitro: Electrostatic interactions and phosphate binding. *Materials Science and Engineering C*. 29(5):1643-1649. DOI:10.1016/j.msec.2009.01.001.

96. Martínez Ruiz DA, Mora Huertas AC. (2021). Contribución a La Implementación de Métodos de Extracción de Elastina (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia.

97. Gibco by Life Solution. (2013). Manual of technical information. Collagenase, Gibco by life Solution. *Publication Number MAN0007350*. Rev 1.00.

98. Sakai LY, Keene DR, Glanville RW, Bachinger HP. (1991). Purification and Partial Characterization of Fibrillin, a Cysteine-rich Structural Component of Connective Tissue Microfibrils. *Journal of Biological Chemistry*. 266(22):14763-14770. DOI:10.1016/s0021-9258(18)98752-1.

99. Shi L, Ermis R, Garcia A, Telgenhoff D, Aust D. (2010). Degradation of human collagen isoforms by Clostridium collagenase and the effects of degradation products on cell migration. *Int Wound J*. 7(2):87-95. DOI:10.1111/j.1742-481X.2010.00659.x

100. Theocharidis G, Connelly JT. (2019). Minor collagens of the skin with not so minor functions. *J Anat*. 235(2):418-429. DOI:10.1111/joa.12584.

101. Rasmussen BL, Bruenger E, Sandberg LB. (1975). A New Method for Purification of Mature Elastin. *Anal Biochem*. 9:255-259. DOI: 10.1016/0003-2697(75)90426-1.

102. Daamen WF, Sc M, Hafmans T, Sc B, Veerkamp JH, Ph D. (2005). Isolation of Intact Elastin Fibers Devoid of Microfibrils. *Tissue Eng*. 11:1168-1176. DOI: 10.1089/ten.2005.11.1168.

103. Braverman IM, Fonferko E. (1982). Studies in Cutaneous Aging: The Elastic Fiber Network. *J Invest Dermatol*. 78:434-443. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12507866.

104. Waller JM, Maibach HI. (2006). Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): Protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. *Skin Research and Technology*. 12(3):145-154. DOI:10.1111/j.0909-752X.2006.00146.x.

105. Chen VL, Fleischmajer R, Schwartz E, Palaia M, Timpl R. (1986). Immunochemistry of elastotic material in sun-damaged skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 87(3):334-337. DOI:10.1111/1523-1747.ep12524421.

106. Pu SY, Huang YL, Pu CM, et al. (2023). Effects of Oral Collagen for Skin Anti-Aging: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 15(9). DOI:10.3390/nu15092080.

107. Talas U, Dunlop J, Khalaf S, Leigh IM, Kelsell DP. (2000). Human elastase 1: evidence for expression in the skin and the identification of a frequent frameshift polymorphism. *Journal of Investigative Dermatology*. 114(1):165-170. DOI:10.1046/j.1523-1747.2000.00825.x.

108. Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. (2009). Proteomics by mass spectrometry: Approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 11:49-79. DOI:10.1146/annurev-bioeng-061008-124934.

109. Matissek R, Schnepel FM, Steiner G. (1998). Análisis de Los Alimentos, Fundamentos, Métodos, Aplicaciones. Editorial ACRIBIA; España.

110. Fountoulakis M, Lahm HW. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *J Chromatogr A*. 826:109-134. DOI:10.1016/S0021-9673(98)00721-3.

111. Chaparro Gómez D. (2023). *Desarrollo de Un Método Analítico Para La Cuantificación de La Degradación Enzimática de Elastina* (Trabajo de pregrado). Universidad Nacional de Colombia.

112. Schwartz E, Cruickshank FA. (1990). Determination of Desmosines in Elastin-Related Skin Disorders by Isocratic High-Performance Liquid Chromatography. *Experimental and molecular pathology,* 52(1), 63-68. DOI: 10.1016/0014-4800(90)90059-M.

113. Kielty CM, Lees M, Shuttleworth A, Woolley D. (1993). Catabolism of intact type VI Collagen microfibrils: susceptibility to degradation by serine proteinases. *Biochemical and Biophysical Reserch Communications*. 191(3):1230-1236. DOI:10.1006/bbrc.1993.1349.

114. Lecaille F, Chazeirat T, Saidi A, Lalmanach G. (2022). Cathepsin V: molecular characteristics and significance in health and disease. *Mol Aspects Med*. 8:101086. DOI: 10.1016/j.mam.2022.101086.

115. Stoilov I, Starcher BC, Mecham RP, Broekelmann TJ. (2018). Measurement of elastin, collagen, and total protein levels in tissues. In: *Methods in Cell Biology*. Vol 143. Academic Press Inc.; 133-146. DOI:10.1016/bs.mcb.2017.08.008.

116. Hedtke T, Schrader C, Heinz A, et al. (2019). A comprehensive map of human elastin cross-linking during elastogenesis. *FEBS J*. 286:3594-3610. DOI:10.1111/febs.14929.

117. Laronha H, Caldeira J. (2020). Structure and function of human matrix metalloproteinases. *Cells*. 9(5). DOI:10.3390/cells9051076.

118. Dominici R, Franzini C. (2002). Fecal Elastase-1 as a Test for Pancreatic Function. *Clin Chem Lab Med*. 40(4):325-332. DOI: 10.1515/CCLM.2002.051.

119. Du X, Chen NLH, Wong A, Craik CS, Brömme D. (2013). Elastin degradation by cathepsin v requires two exosites. Journal of Biological Chemistry. 288(48):34871-34881. DOI:10.1074/jbc.M113.510008.