

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Edson Delgado Rodrigues

ANÁLISE BIOQUÍMICA DE PROTEOGLICANOS DA MATRIZ EXTRACELULAR
EM ARTICULAÇÕES DA ASA DE FRANGO

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a)
Edson Delgado Rodrigues
e aprovada pela Comissão Julgadora.
05/02/2001 Gomes

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Biologia Celular e Estrutural na área de
Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Laurecir Gomes



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

R618a Rodrigues, Edson Delgado.
 Análise bioquímica de proteoglicanos da matriz
 extracelular em articulações da asa de frango / Edson
 Delgado Rodrigues. -- Campinas, SP : [s.n.], 2001.
 90f. : il.

 Orientador : Laurecir Gomes.
 Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
 Campinas, Instituto de Biologia.

 1. Frangos. 2. Cartilagem articular. 3. Proteoglicanos.
 I. Gomes, Laurecir. II. Universidade Estadual de
 Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	T/ UNICAMP
	R.618a
V.	Ex
TOMBO BC	46415
PROC.	16-392/01
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	15/09/01
1.º CPD	

Data da Defesa: 05/02/2001

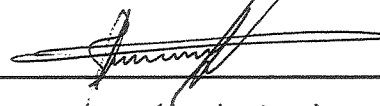
Banca Examinadora

Profa. Dra. Laurecir Gomes (Orientadora)



(Assinatura)

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel



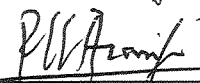
(Assinatura)

Prof. Dr. Hernandez Faustino de Carvalho



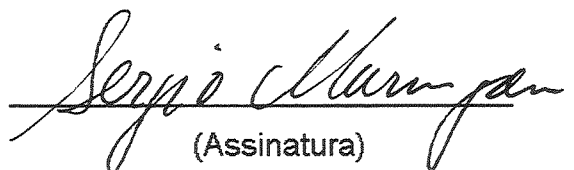
(Assinatura)

Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo



(Assinatura)

Prof. Dr. Sergio Marangoni



(Assinatura)

Prof. Dr. Alexandre Leite R. de Oliveira

(Assinatura)

Profa. Dra. Selma Candelária Genari

(Assinatura)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica da Matriz Extracelular do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, sob a orientação da Profa. Dra. Laurecir Gomes e com o suporte financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 97/010204-8.

AGRADECIMENTOS

Digo **muito obrigado** a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, ajudaram e incentivaram na elaboração deste trabalho.

Profa. Dra. Laurecir Gomes, pela orientação rigorosa e acompanhamento fundamental.

Prof. Dr. Edson R. Pimentel, Prof. Dr. Hernandes F. de Carvalho, Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo, Prof. Dr. Sergio Marangoni, Prof. Dr. Alexandre Leite R. de Oliveira, Profa. Dra. Selma Candelária Genari, pelos comentários, sugestões e leitura paciente deste trabalho.

Profs. Drs. Do Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural e do Departamento de Biologia Celular, pelos conceitos, informações e auxílio sempre disponível.

Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela formação privilegiada.

Prof. Dr. Paulo A. S. Mourão e Prof. Dr. Cláudio Werneck, do Laboratório do Tecido Conjuntivo do Departamento de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pelas informações e auxílio.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro.

Lílian, Francisco e Sidney, pelos favores, muitos e cotidianos.

Familiares, amigos e colegas, pela crítica construtiva e pelo suporte emocional. Sem vocês certamente a trilha percorrida seria mais difícil.

Agradeço, enfim, ao Insondável.

*“No infinito livro dos segredos da natureza
um pouco eu posso ler”*
W.S.

para minha companheira
Suzana

ABREVIATÖES

AH – ácido hialurônico

ANOVA - análise de variância

CS – condroitim sulfato

CsCl - cloreto de césio

D4 – fração 4 da ultracentrifugação em condições dissociativas

DAB – diaminobenzidina

DEAE- Sephacel – dietilaminoetil-Sephacel

DMMB – azul de dimetilmetileno

DS – dermatam sulfato

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

FM – fibromodulim

GAGs - glicosaminoglicano(s)

Gu-HCl - cloridrato de guanidina

Hp – região da cartilagem articular da epífise proximal do úmero

Hr – região da cartilagem articular da epífise distal do úmero em contato com o rádio

Hu - região da cartilagem articular da epífise distal do úmero em contato com a ulna

kDa – kilodalton

mA – miliampère

Mr – massa molecular aparente

MEC - matriz extracelular

PBS - solução de NaCl 0,15 M tamponada com fosfato de sódio 0,05M pH 7,2

PGs - proteoglicano(s)

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil

QS – queratam sulfato

Rp - região da cartilagem articular da epífise proximal do rádio em contato com o úmero

rpm - rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

Up - região da cartilagem articular da epífise proximal da ulna em contato com o úmero

β -Me – β -mercaptoetanol

ÍNDICE

Resumo	10
Abstract	12
Introdução	14
Objetivos	24
Artigos Anexos	
Artigo 1	25
Artigo 2	51
Conclusões	79
Bibliografia	80

RESUMO

A matriz extracelular é essencial para o desenvolvimento do organismo, desempenhando diferentes funções. Nas cartilagens das articulações, a composição da matriz determina uma estrutura com propriedades elásticas e de suporte mecânico que facilita os movimentos. O papel fisiológico da cartilagem depende da integridade dessa matriz, formada em geral por fibras de colágeno, principalmente do tipo II, proteoglicanos e glicoproteínas não colagênicas. Variações na concentração dos componentes e no tipo de constituição conferem propriedades biomecânicas especiais ao tecido. A análise bioquímica destes componentes tem sido descrita, especialmente em mamíferos, porém pouco se sabe dessa matriz na cartilagem de aves. Os proteoglicanos são importantes para a fisiologia do tecido, e a sua expressão pode variar sob a influência de diferentes fatores. Pequenos proteoglicanos, como fibromodulim e decorim, estão distribuídos de maneira diversa nas sub-regiões articulares, sugerindo uma relação entre a expressão dessas moléculas e as diferentes propriedades biomecânicas do tecido resultantes das forças em ação. Neste contexto, este trabalho teve como finalidade fazer a análise bioquímica da matriz extracelular de cartilagens das articulações escapulo-umeral, úmero-ulnar e úmero-radial de frangos, visando analisar pequenos proteoglicanos e identificar os tipos de glicosaminoglicanos presentes em cada região. As cartilagens provenientes do úmero proximal, úmero distal em contato com o rádio e úmero distal em contato com a ulna apresentaram maior conteúdo de ácido hexurônico e glicosaminoglicanos sulfatados quando comparados com as cartilagens oriundas da ulna proximal e rádio proximal. Variações significativas na concentração de proteína, ácido urônico e glicosaminoglicanos sulfatados foram obtidas no extrato total e na fração D4 de cada região. O glicosaminoglicano encontrado nas cartilagens estudadas foi o condroitim sulfato, com predominância de resíduos de ácido α -L-glicurônico e N-acetil β -D-galactosamina 4-O-sulfatados com uma relação de três Δ Di-4S para cada Δ Di-6S em todas as regiões, com exceção da cartilagem da região proximal do rádio, onde a razão foi de 2,5. As amostras

obtidas, após cromatografias de troca iônica e interação hidrofóbica das frações D4, apresentaram um perfil eletroforético semelhante em SDS-PAGE. Na ausência de β -mercaptoetanol ocorrem duas bandas de 160 e 200 kDa que após tratamento com β -mercaptoetanol ficam tênues e ocorre o aparecimento de uma banda com 57 kDa. Esse fenômeno pode representar interação com outros elementos de matriz ou mesmo auto-agregação. Duas moléculas parcialmente isoladas reagiram com anticorpos anti-fibromodulim e anti-decorim em *immunoblotting*, sugerindo uma correspondência com fibromodulim e decorim. Os resultados obtidos neste trabalho podem corresponder à fisiologia normal de tecidos sob diferentes condições de pressão mecânica. Esses resultados podem ser representativos para as condições que esses animais se encontravam, porém diferentes variações podem ocorrer quando essas cartilagens forem analisadas em diferentes idades, condições de criação, genótipo, etc.

ABSTRACT

The extracellular matrix is present in every tissue, but it is specially abundant in tendons and cartilages. In articular cartilages, the composition of the matrix determines a structure with elastic and structural properties that facilitate the movements. The physiological role of cartilage depends on the integrity of the matrix, made mainly by type II collagen fibers, proteoglycans and non collagen glycoproteins. Variations in the concentration and types of components may result in special biomechanical properties to the tissue. The biochemical analysis of extracellular matrix components has been carried out in several species, but it is scarce in avian. Proteoglycans are important for the tissue physiology and its expression may vary under the influence of different factors. Small proteoglycans, as the fibromodulin and decorin, are differentially distributed in the articular cartilage sub-regions, suggesting a relation among the expression of those molecules and the presence of different biomechanical properties of the tissue. According to that, this work was focused on the biochemical analysis of the extracellular matrix articular cartilages from scapular-humerus, ulnar-humerus and radial-humerus articulations of chicken, aiming to analyze small proteoglycans and identify the type of glycosaminoglycans present in each cartilage. The cartilages obtained from proximal humerus, distal humerus in contact with the radius and distal humerus in contact with the ulna, presented higher content of uronic acid and sulfated glycosaminoglycans, when compared with cartilages obtained from proximal ulna and proximal radius. Significant variations in the concentration of protein, uronic acid and sulfated glycosaminoglycan were obtained from the total extract and in the D4 fraction of each region. The glycosaminoglycan found in the different cartilages was chondroitin sulfate, with a predominance of α -L-glucuronic acid and N-acetyl β -D-galactosamine 4-O-sulfated residues with a relation of three Δ Di-4S for each Δ Di -6S in all regions, with the exception of cartilage from the radius proximal region, where the relation was of 2.5. Samples obtained after ion exchange and hydrophobic interaction chromatographies from D4 fraction

presented the same electrophoretic profile in SDS-PAGE. In the absence of β -mercaptoethanol two components of 160 and 200 kDa were detected, which after treatment with β -mercaptoethanol appear as a faint band; a polypeptide with 57 kDa was also present in reducing conditions. If the 57 kDa component arose from a oligomeric component or from some autoaggregation process remains to be studied. Immunoassays using anti-fibromodulin and anti-decorin, indicated that the components with 57 kDa and 70-90 kDa found in matrix of each joint analyzed are the small proteoglycans fibromodulin and decorin. Despite the different sites and functional properties of the different cartilages, no differences were found in the composition of the extracellular matrix of each one.

INTRODUÇÃO

A matriz extracelular (MEC), que circunda as células dos organismos, está organizada em uma malha protéica e de glicoconjugados com múltiplas funções. Os componentes da matriz conferem resistência mecânica e elasticidade, servem de substrato para migração e adesão celular, atuam como uma interface entre receptores de membranas celulares e ligantes do tipo proteínas estruturais, fatores de crescimento e citocinas, servem como barreira para a penetração de células e elementos filtrantes para macromoléculas (SCOTT, 1995; IOZZO, 1998). Assim, a MEC é essencial para os processos de desenvolvimento do organismo, ao regular a proliferação, diferenciação, adesão e migração celulares (NOYORI & JASIN, 1994).

Nas articulações, a cartilagem é um tecido adaptado para oferecer resistência duradoura e suportar as diferentes pressões mecânicas, de modo a facilitar os movimentos com o mínimo de fricção entre as interfaces da junta (BUCKWALTER & MANKIN, 1997). Esta condição biomecânica na articulação é um fator que exerce influência no desenvolvimento da cartilagem (MCMASTER & WEINERT JR, 1970; GRODZINSKY *et al.*, 1996).

As articulações do tipo diartrose permitem a locomoção e outras atividades. As juntas sinoviais são caracterizadas pela presença de uma cápsula fibrosa de revestimento, tecido e líquido sinovial e finas camadas de cartilagem sobre cada osso da articulação. Possuem diferentes formas geométricas, onde se destacam as juntas do tipo esferóide, presentes nas articulações do ombro e quadril e outras com geometria mais complexa, como as articulações do tipo gínglimo do joelho e cotovelo (RATCLIFFE & MOW, 1996).

O desenvolvimento da locomoção aérea pelas aves ocorreu sob adaptações anatômicas e fisiológicas através da evolução. Várias destas adaptações estão presentes na asa (KOCK, 1973).

Os ossos da extremidade a partir do ombro compõem a asa. O ombro é formado pela associação da escápula, clavícula e úmero. A extremidade distal da

escápula e clavícula forma uma cavidade revestida por cartilagem hialina e fibrocartilagem onde o úmero se articula. A região proximal do úmero possui uma geometria complexa com tuberosidades laterais e uma cabeça esferóide revestida de cartilagem hialina que, unida aos ossos do ombro, forma uma diartrose do tipo esferóide. A região distal do úmero tem uma geometria mais plana possuindo epicôndilos e uma tróclea evidente. Forma uma diartrose do tipo gínglimo com ossos do antebraço conhecidos como rádio e ulna. Cartilagem hialina recobre também as superfícies articulares neste sítio. Diferente do úmero, rádio e ulna são ossos finos que possuem endentações para acomodação de penas de vôo. A supinação e a pronação de ambos os ossos não é possível (KOCK, 1973; SPENCE, 1991).

As cartilagens articulares formam um importante modelo de estrutura biológica hierarquizada, onde os diferentes componentes e níveis de organização são responsáveis pela eficiência fisiológica da junta (MOW *et al.*, 1992). Como outros tecidos conjuntivos, incluindo tendões, ligamentos e meniscos, a cartilagem articular consiste basicamente de células, água, eletrólitos e a MEC, uma rede macromolecular de colágeno e proteoglicanos (PGs), responsáveis pela forma e diferentes propriedades mecânicas do tecido. A cartilagem articular é rica em PGs, especialmente agregam. Os glicosaminoglicanos (GAGs) presentes nos PGs possuem uma considerável densidade de carga negativa que determina uma alta pressão osmótica, contida pela rede de fibrilas (BROOM & SILYN-ROBERTS, 1990; SCHMIDT *et al.*, 1990; RATCLIFFE & MOW, 1996; BUCKWALTER & MANKIN, 1997).

A caracterização e a distribuição dos componentes da MEC presentes na cartilagem, associada à biomecânica, são tópicos importantes para o estudo da articulação normal e patológica (SIMON, 1977; KIVIRANTA *et al.*, 1987, 1992; CHIQUET *et al.*, 1996; LOTZ *et al.*, 1998; QUINN *et al.*, 1998; BUSCHMANN *et al.*, 1999; WONG *et al.*, 1999).

O papel fisiológico da cartilagem depende da estrutura físico-química e da integridade dessa MEC, sintetizada e mantida por condrócitos presentes no tecido (LOHMANDER & KIMURA, 1986). Variações na concentração e na constituição

conferem propriedades especiais à cartilagem. A caracterização bioquímica destes constituintes e, especialmente, a modulação e organização supramolecular ainda é discutida (HAGG *et al.*, 1998).

A composição e a organização dos componentes da MEC presentes nas cartilagens articulares normais determinam uma estrutura lisa, hialina e resistente com propriedades elásticas e de suporte, permitindo movimentos com baixa fricção entre as interfaces (RATCLIFFE & MOW, 1996; BUCKWALTER & MANKIN, 1997).

A MEC das cartilagens articulares é formada por uma estrutura fibrilar de colágeno. A estrutura fibrilar é heteropolimérica, contendo mais de um tipo de colágeno, como os tipos II, IX, XI, entre outros. A função primária do colágeno está relacionada com as propriedades de tensão da cartilagem (RATCLIFFE & MOW, 1996). Vários tipos de colágeno já foram descritos (VAN DER REST & GARRONE, 1991; MAYNE & BREWTON, 1993; LIU *et al.*, 1995). O colágeno é uma molécula que apresenta uma região em tripla hélice com uma distribuição característica de aminoácidos em seqüência Gly-X-Y, onde freqüentemente X representa prolina e Y hidroxiprolina. Ligações intra e intermoleculares permitem a formação de fibrilas de colágeno estabilizadas por pontes de hidrogênio e ligações cruzadas covalentes entre as cadeias (YAMAGUCHI *et al.*, 1988). A resistência à tensão no tecido é obtida devido a estas ligações cruzadas, as quais mantêm a rede de colágeno estável (SCHIMIDT & LINSENMAYER, 1990). Interações entre moléculas de colágeno e PG determinam a forma final da fibrila, onde PG podem ter participação efetiva na organização dos agregados macromoleculares, auxiliando nas propriedades mecânicas do tecido. A presença de outras moléculas associadas pode manter uma ordenação adequada para o espaçamento interfibrilar das moléculas de colágeno (HAGG *et al.*, 1998). Em cartilagem xifóide de frango foi demonstrada uma associação íntima entre os colágenos II, IX e XI (MENDLER *et al.*, 1989).

Os PGs presentes nas cartilagens são essenciais para a resistência da cartilagem articular às forças de compressão (FRANZÉN *et al.*, 1981a) e contribuem também na organização e nas propriedades físicas da MEC

(HASCALL, 1981). Estas moléculas têm a propriedade de criar um compartimento hidratado, atraindo os íons osmoticamente ativos através de sua carga negativa (HARDINGHAN & FOSANG, 1992). Esta composição de fibrilas e polímeros aniônicos é fundamental para a resistência da cartilagem à mecânica do movimento.

Os PGs da matriz são macromoléculas complexas formadas por um esqueleto protéico central, ao qual está covalentemente ligado um número variável de cadeias laterais de carboidratos carregados negativamente, em especial GAGs. A composição e estrutura do PG podem variar consideravelmente com a idade (BOLTON *et al.*, 1999; DEL SANTO JR *et al.*, 2000), estado patológico (CS-SZABÓ *et al.*, 1995), e diferentes sítios de um órgão (BJELLE *et al.*, 1974), entre outros fatores. PGs são encontrados em diferentes organismos e tecidos, como cartilagens (MICHELACCI *et al.*, 1979; SWANN *et al.*, 1979; SHINOMURA *et al.*, 1983; NORO *et al.*, 1983; ROUGHLEY & WHITE, 1989; HEINEGÅRD *et al.*, 1985; ESQUISATTO, 1996), membrana sinovial (COLEMAN *et al.*, 1998) e tendões (VOGEL & KOOB, 1989; CARVALHO *et al.*, 2000) com uma composição e estrutura variável (MICHELACCI *et al.*, 1979; HANDLEY *et al.*, 1985; HEINEGÅRD & SOMMARIN, 1987a; MICHELACCI & HORTON, 1989; BUCKWALTER *et al.*, 1994; DEUTSCH *et al.*, 1995; ROTH *et al.*, 1997; MURPHY *et al.*, 1999).

Os GAGs compreendem um complexo grupo de macromoléculas com diferentes propriedades e funções biológicas, incluindo ácido hialurônico (AH), condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparam sulfato (HS), heparina e queratam sulfato (QS). Os GAGs, exceto AH, ocorrem covalentemente ligados à proteínas e são em geral sulfatados. Todos eles são formados por cadeias de dissacarídeos em múltiplas combinações possibilitando a formação de um grande número de polímeros diferentes (SCOTT, 1995; SILBERT, 1996). Estes polímeros aniônicos são amplamente distribuídos na natureza, ocorrendo em uma grande variedade de organismos. Análise do conteúdo de GAG foi reportada em diferentes espécies e tecidos, incluindo cartilagem (MOURÃO *et al.*, 1976; OLSEN *et al.*, 1989; OSTENDORF *et al.*, 1995). As cadeias laterais de GAG são formadas principalmente por CS nos PGs de cartilagem articular. A quantidade relativa de

GAG pode variar de acordo com o tipo de cartilagem e estado fisiológico ou patológico (MANKIN & LIPPIELO, 1971; MICHELACCI *et al.*, 1979; MOURÃO *et al.*, 1979; MOURÃO, 1988; HARAB & MOURÃO, 1989; HEISE & TOLEDO, 1993).

Polissacarídeos do tipo CS têm sido designados de acordo com suas unidades de dissacarídeos dominantes. Assim, CS-A, CS-B, CS-C, CS-D, CS-E, and CS-K contêm predominantemente unidades repetitivas de GlcA β 1-3GalNAc(4SO₃), IdoA β 1-3GalNAc(4SO₃), GlcA β 1-3GalNAc(6SO₃), GlcA(2SO₃) β 1-3GalNAc(6SO₃), GlcA β 1-3GalNAc(4SO₃, 6SO₃) e GlcA(3SO₃) β 1-3GalNAc(4SO₃), respectivamente (CHAI, 1998).

Nas cartilagens, uma classe de PG, o agregam, tende a formar estruturas interagindo com AH (MÖRGELIN *et al.*, 1994). A formação de agregados ocorre através da ligação eletrostática entre o esqueleto protéico de vários monômeros de PGs com o AH (HARDINGHAN & MUIR, 1972, 1974). A ligação é estabilizada pela participação de proteínas de ligação (FRANZÉN *et al.*, 1981a). Cada molécula destes grandes PGs agregantes pode ter seu esqueleto protéico com até 200 cadeias de carboidratos associados. Isso pode representar uma Mr acima de 10⁶ daltons. A composição dos grandes PGs agregantes mostra um elevado conteúdo de cadeias de CS, cadeias de QS e oligossacarídeos (HEINEGÅRD & SOMMARIN, 1987b). A polidispersão, como uma característica derivada das variações no tamanho molecular, é típica nos grandes PGs agregantes. Pode haver uma variação no tamanho da molécula de proteína bem como no conteúdo de cadeias laterais, em função do grau de substituição pós-síntese e ação de proteases (HEINEGÅRD & SOMMARIN, 1987b).

Os grandes PGs agregantes formam subgrupos diferentes no tamanho do esqueleto protéico e no conteúdo de cadeias laterais (HEINEGÅRD *et al.*, 1985). A quantidade de GAGs pode variar entre as diferentes regiões de uma mesma cartilagem. Os PGs da superfície (até 200 μ m de profundidade) são diferentes daqueles das camadas mais profundas (240 – 1040 μ m). Nas regiões próximas à junção osso-cartilagem, os PGs são de menor tamanho, a região rica em CS diminui e a quantidade de PG não-agregantes é maior. Na região mais superficial,

a quantidade de CS é menor e quase todos os PGs interagem com AH (FRANZÉN *et al.*, 1981b).

PG de alto Mr que não formam agregados com AH são designados não-agregantes ($Mr > 10^6$). Em geral, os grandes PGs não-agregantes ocorrem em menor concentração quando comparados aos grandes PG agregantes nas cartilagens e representam um grupo distinto com semelhanças estruturais. Os PGs não-agregantes são encontrados em maior quantidade em disco intervertebral e cartilagem articular, estando em menor quantidade em cartilagem nasal (HEINEGARD & SOMMARIN, 1987b).

Os PGs de baixo Mr formam uma população que representa cerca de 10% do conteúdo de PGs da cartilagem. Essas moléculas possuem um esqueleto protéico rico em leucina (HOCKING *et al.*, 1998), ácido aspártico e ácido glutâmico. Não formam agregados com o ácido hialurônico e a composição de aminoácidos é diferente dos grandes PGs. Coletivamente, foram chamados de SLRPs (*small leucine-rich proteins*) por IOZZO e MURDOCH (1996). Estes pequenos PG são estruturalmente relacionadas mas geneticamente distintos, com ampla distribuição pelos tecidos dos vertebrados e expressão variada (FISCHER *et al.*, 1987).

A análise filogenética dividiu a família dos SLRPs em três grupos distintos, a partir do estudo da sequência de aminoácidos em moléculas de origem bovina. Decorin (PG-S2, PG II, PG40) e biglicam (PG-S1, PG I) formam o grupo 1; fibromodulim (FM-59KDa), lumicam, queratocam e osteoaderin fazem parte do grupo 2; epificam e osteoglicim formam o grupo 3 (HOCKING *et al.*, 1998; IOZZO, 1998). O grupo 3 e alguns componentes do grupo 2 não são abordados neste trabalho.

PGs de baixo Mr são associados às funções reguladoras da fibrilogênese do colágeno (FONT *et al.*, 1998; HOCKING *et al.*, 1998). Decorin e fibromodulim (FM) interagem com fibrilas de colágeno e afetam sua fibrilogênese *in vitro* (VOGEL *et al.*, 1984; CHANDRASEKHAR *et al.*, 1986; HEDBOM & HEINEGÅRD, 1989; FLEISCHMAJER *et al.*, 1991; HEDBOM & HEINEGÅRD, 1993). Resultados obtidos *in vivo* por HEDLUND *et al.* (1994) mostram a ligação de fibrilas

colagênicas com FM, indicando que este pequeno PG representa um fator regulador da gênese e fisiologia dos feixes de colágeno. Em tendão, o FM e o decorim parecem interagir com o colágeno e interferir em sua fibrilogênese (HEINEGÅRD & SOMMARIN, 1987b; EZURA *et al.*, 2000). A interação entre FM e a fibrila do colágeno em cartilagem e tendão bovinos se estabelece na região do intervalo da banda D da fibrila (HEDLUND *et al.*, 1994; SVENSSON *et al.*, 2000). Uma distribuição similar foi demonstrada para o decorim em associação com fibrilas de colágeno em pele humana (FLEISCHMAJER *et al.*, 1991).

Decorim é encontrado em pele, tendão, esclera e cartilagem (CHOI *et al.*, 1989; BIANCO *et al.*, 1990; ROSENBERG *et al.*, 1991). O decorim de mamíferos contém uma seqüência repetitiva de 25 aminoácidos e uma cadeia simples de CS ou DS ligada à extremidade N-terminal da proteína (SCHOLZEN *et al.*, 1994). Decorim de frango possui isoformas contendo uma ou duas cadeias de DS. A isoforma de decorim com 2 cadeias de DS pode ser um substituto funcional nas aves relacionado com o biglicam de mamíferos (BLASCHKE *et al.*, 1996). A estrutura do esqueleto protéico do decorim, modelada em computador a partir de cristalografia comparativa, apresenta a forma de um arco ou ferradura, com a cadeia de GAGs e oligossacarídeos N-ligados situados no mesmo lado da molécula, o que poderia aumentar a espessura do arco (WEBER *et al.*, 1996). A proteína central do decorim e do biglicam possui 55% de identidade de aminoácidos e padrões diferentes de expressão temporal e espacial, sugerindo funções diferenciadas. A comparação da seqüência de aminoácidos deduzida para o biglicam e decorim de camundongo, rato, boi e humanos revela uma homologia superior a 90% e 80%, respectivamente (HOCKING *et al.*, 1998; IOZZO, 1998).

Biglicam contém duas cadeias de CS ou DS localizados na mesma extremidade da molécula. Foi identificado em superfícies celulares e na região pericelular, estando envolvido na morfogênese e diferenciação (HARDINGHAM & FOSANG, 1992). Decorim e biglicam foram isolados da cartilagem nasal (cadeias de CS), articular (cadeias de DS) e outros tecidos (HEINEGÅRD & SOMMARIN, 1987a,b).

Decorim e biglicam podem estar associados à diferentes fibras de colágeno, em especial do tipo I e II (BIDANSET *et al.*, 1992). As interações SLRP-colágeno podem ser importantes em diferentes processos biológicos, como a manutenção e montagem da rede de fibras colágenas da MEC durante o crescimento e desenvolvimento (HAGG *et al.*, 1998). Decorim parece ocorrer preferencialmente em áreas de matriz interterritorial nas regiões mais profundas da cartilagem articular bovina enquanto colágeno IX tem uma distribuição territorial. Decorim está algumas vezes associado com colágeno IX na superfície da cartilagem. Uma função semelhante foi sugerida para o decorim de córnea e tendões (SCOTT, 1992). A ruptura do gene para decorim em camundongos determina a formação de indivíduos com fragilidade de pele, relacionada com fibrilas anormais de colágeno. Esta é uma evidência *in vivo* da função da molécula na formação das fibrilas de colágeno (DANIELSON *et al.*, 1997; SCOTT *et al.*, 1998). Um fenômeno semelhante é observado em camundongos que não expressam o gene para FM (SVENSSON, 1999). Frangos com problemas no desenvolvimento muscular possuem alterações na expressão de decorim e na montagem da fibrila de colágeno (VELLEMAN *et al.*, 1996).

Foi proposto que os SLPRs, especialmente o FM e o decorim, podem modular a atividade do TGF- β (*transforming growth factor β*), um fator de crescimento multifuncional para diferentes tipos celulares que participa do controle da proliferação, diferenciação e adesão celular, além da deposição da MEC (YAMAGUCHI *et al.* 1990; HILDEBRAND *et al.*, 1994; HÄKKINEN *et al.*, 1996). Decorim e biglicam podem modular ou reagir com diferentes moléculas, incluindo enzimas, fibronectina, trombospondina, β -amilóide, C1q, cofator II de heparina, hormônios, citocinas e outros (SCHIMIDT *et al.*, 1987; HUTTENLOCKER *et al.*, 1996). Recentemente, biglicam foi associado à função de CSF (*colony-stimulating factor*) e de agente neurotrófico (KIKUCHI *et al.*, 1995; JUNGHANS *et al.*, 1995; KOOPS *et al.*, 1996).

O FM apresenta 4 cadeias de QS em um domínio central e resíduos de tirosina sulfatados na porção N-terminal (OLDBERG *et al.*, 1989). FM pode ser isolado de cartilagem, especialmente de adultos, e diferentes tecidos (LAUDER *et*

al., 1994, 1998; ROUGHLEY *et al.*, 1996; WATANABE & KUBOTA, 1998; SZTROLOVICS *et al.*, 1999). Em cartilagem xifóide de frango, FM foi encontrado principalmente na região central da carina, podendo estar relacionado com a presença de maiores forças de compressão que ocorre nesta região (GOMES & PIMENTEL, 1994). A tíbia e a região da crista da face patelar do fêmur bovino indica que este PG se apresenta na forma de um agregado sob condições não-redutoras (ESQUISATTO *et al.*, manuscrito em preparação) e parece agregar com outros componentes de matriz (GOMES *et al.*, 1996), inclusive colágeno (VIDAL & VILARTA, 1988; SKERRY *et al.*, 1990).

As cartilagens articulares formam um importante modelo de estrutura biológica hierarquizada, onde os diferentes componentes e níveis de organização são responsáveis pela eficiência fisiológica da junta (MOW *et al.*, 1992). Por outro lado, o conhecimento da relação entre estrutura e função na cartilagem articular é importante para o estabelecimento de estratégias clínicas para artrites. As artrites compõem um grupo de doenças incapacitantes com alta incidência na população adulta, gerando um grave problema biomédico e sócio-econômico. Em humanos, o estudo da biomecânica associado à caracterização e a distribuição dos componentes da MEC presente na cartilagem, são tópicos importantes para o estudo dos processos degenerativos de articulações.

Galinhas e frangos podem ser afetados por diferentes desordens degenerativas nas articulações e ossos relacionadas com problemas no desenvolvimento normal do sistema esquelético. O peso do corpo e o genótipo da ave têm influência na patologia destas doenças e na distribuição de PGs na cartilagem articular (ANDERSON-MACKENZIE *et al.*, 1998). Em frangos, as articulações da asa estão aparentemente menos sujeitas a forças compressivas quando comparadas com articulações dos membros inferiores. Talvez esta seja a razão para uma baixa frequência de desordens esqueléticas naquelas articulações (RATH *et al.*, 1999). A prevenção e o controle destas desordens na criação de aves depende do avanço no conhecimento sobre os mecanismos fisiológicos que governam o crescimento esquelético normal e da biologia das desordens esqueléticas de aves (THORP, 1994). O estudo da formação de cartilagem assim

como da cartilagem normal adulta são importantes para a elucidação destes mecanismos (WATANABE *et al.*, 1998). Uma descrição histológica de articulações de frango foi feita por ITAY e cols. (1987), mas o comportamento biomecânico relacionado com a composição bioquímica das cartilagens de aves é pouco conhecido.

A análise bioquímica dessa MEC poderá contribuir com dados importantes, não só para estudos de biologia comparada mas também para o conhecimento da relação entre biomecânica e composição da MEC em cartilagem de aves, que tem sido pouco investigada.

OBJETIVOS

Caracterizar e avaliar a distribuição dos GAGs presentes em diferentes cartilagens da asa de frangos e analisar os pequenos PGs presentes nestes tecidos. Para este trabalho a cartilagem articular da asa de frango foi obtida das seguintes regiões: úmero-proximal (**Hp**), úmero-distal em contato com a ulna (**Hu**), úmero-distal em contato com o rádio (**Hr**), ulna-proximal (**Up**) e rádio-proximal (**Rp**).

ARTIGO 1

CARACTERIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS EM CARTILAGEM ARTICULAR DA ASA DE FRANGO

Este trabalho foi realizado no Laboratório do Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário e Departamento de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo A. S. Mourão e Prof. Dr. Cláudio Werneck.

RESUMO

A cartilagem articular de aves tem sido estudada, porém são poucas as informações a respeito de sua composição bioquímica. Neste trabalho, cartilagem articular da asa de frango foi analisada com relação ao tipo e conteúdo de glicosaminoglicano. Das cartilagens analisadas, aquelas provenientes do úmero proximal, úmero distal em contato com o rádio e úmero distal em contato com a ulna apresentaram conteúdo maior de ácido hexurônico e glicosaminoglicanos sulfatados quando comparados com as cartilagens oriundas da ulna proximal e rádio proximal. O glicosaminoglicano condroitim sulfato está presente em todas as regiões. Após digestão com papaína e análise em HPLC as cartilagens analisadas apresentaram predominância de resíduos de ácido α -L-glucurônico e N-acetil β -D-galactosamina. A relação Δ Di-4S e Δ Di-6S mostrou que a cartilagem da região proximal do rádio apresentou o menor valor (2,5) para esta relação enquanto as outras regiões apresentaram valores em torno de 3,0. Os resultados obtidos neste trabalho parecem refletir as diferenças funcionais existentes entre as articulações escapulo-umeral, úmero-ulnar e úmero-radial.

INTRODUÇÃO

Os proteoglicanos formam uma superfamília de moléculas que realizam uma variedade de funções biológicas nos tecidos conjuntivos e sua presença pode estar diretamente relacionada à fisiologia tecidual. Os proteoglicanos desempenham um papel essencial na fisiologia das cartilagens ao controlar a entrada e saída de água nos espaços entre as fibras de colágeno, evitando o colapso do tecido sob estresse mecânico (LOHMANDER, 1988). Agem como organizadores de tecidos, moduladores da atividade de fatores de crescimento e reguladores da fibrilogênese do colágeno, entre outras funções (IOZZO, 1998).

Os proteoglicanos são formados por uma proteína central à qual estão covalentemente ligadas cadeias laterais de glicosaminoglicanos. Os glicosaminoglicanos compreendem um grupo de moléculas aniônicas com múltiplas atividades biológicas nos organismos. Este grupo inclui o condroitim sulfato, dermatam sulfato, heparam sulfato, heparina e queratam sulfato. Os glicosaminoglicanos são formados por cadeias de dissacarídeos em diferentes combinações, permitindo um grande número de polímeros diferentes amplamente distribuídos na natureza (SCOTT, 1995; SILBERT, 1996). A análise do conteúdo de glicosaminoglicanos é reportada em diferentes espécies e tecidos, incluindo cartilagem. As quantidades relativas e o tipo de glicosaminoglicano podem variar de acordo com a cartilagem e seu estado fisiológico e patológico (MOURÃO *et al.*, 1976; MOURÃO *et al.*, 1979).

O condroitim sulfato é o glicosaminoglicano predominante nos proteoglicanos das cartilagens. Consiste de um dissacarídeo repetitivo formado por ácido glicurônico – N-acetilgalactosamina. Há em média um grupo éster sulfato por dissacarídeo, o qual pode estar ligado ao carbono 4 ou 6 da N-acetilgalactosamina (DAVIDSON & MEYER, 1955). Os dissacarídeos condroitin 4-sulfato ou condroitim 6-sulfato podem estar na mesma molécula de proteoglicano. Variações no tamanho da cadeia, grau de sulfatação e na razão condroitin 4-sulfato/condroitim 6-sulfato presentes nas moléculas estão associadas com a

fisiologia do tecido, idade do indivíduo e seu estado patológico (MANKIN & LIPPIELO, 1971; MICHELACCI *et al.*, 1979; MOURÃO *et al.*, 1979; HARAB & MOURÃO, 1989; HEISE & TOLEDO, 1993).

O polissacarídeo condroitim sulfato tem sido designado de acordo com a unidade dissacarídica dominante. Sendo assim, condroitim sulfato-A, condroitim sulfato-B, condroitim sulfato-C, condroitim sulfato-D, condroitim sulfato-E e condroitim sulfato-K contém predominantemente as unidades GlcA β 1-3GalNAc(4SO₃), IdoA β 1-3GalNAc(4SO₃), GlcA β 1-3GalNAc(6SO₃), GlcA(2SO₃) β 1-3GalNAc(6SO₃), GlcA β 1-3GalNAc(4SO₃, 6SO₃), e GlcA(3SO₃) β 1-3GalNAc(4SO₃), respectivamente (CHAI *et al.*, 1998).

Os glicosaminoglicanos podem ser removidos dos tecidos, livres das cadeias de proteína, após a digestão com enzimas proteolíticas ou ainda na forma de dissacarídeos após o tratamento com condroitinases (HARDINGHAN & MUIR, 1972). Análise quantitativa desses dissacarídeos derivados dos glicosaminoglicanos pode ser feita através da absorbância em 230 nm e diferentes métodos de cromatografia e eletroforese têm sido aplicados para análise quantitativa e qualitativa dos glicosaminoglicanos (IMANARI *et al.*, 1996).

As aves podem ser afetadas por diferentes patologias degenerativas nas juntas e ossos durante o desenvolvimento do sistema esquelético. A prevenção, assim como o controle das patologias do sistema esquelético em aves envolve o conhecimento dos componentes das cartilagens e ossos, assim como o mecanismo que está relacionado com o crescimento esquelético normal (THORP, 1994). O estudo da formação da cartilagem, assim como da sua composição é importante para a elucidação dos mecanismos do desenvolvimento e também das patologias das articulações (WATANABE *et al.*, 1998).

Trabalhando com cartilagem de embriões de frango, KITAMURA & YAMAGATA (1976) demonstraram a presença de condroitim sulfato como principal componente dos proteoglicanos. Este condroitim sulfato apresenta diferentes padrões de sulfatação em cartilagem de embriões e adultos, havendo predominância de condroitim 6-sulfato no animal adulto quando comparado com o embrião (SHULMAN & MEYER, 1970). Em cartilagem do tíbiotarso e

tarsometatarso de frangos, o glicosaminoglicano predominante é o condroitim sulfato (BELLINE *et al.*, submetido).

Poucos trabalhos estudaram a cartilagem de aves com relação à composição bioquímica da matriz extracelular. Esse trabalho tem como objetivo analisar a distribuição dos glicosaminoglicanos presentes em diferentes cartilagens articulares da asa de frangos.

MATERIAL E MÉTODOS

1- Material

Condroitim 4-sulfato de cartilagem de baleia, condroitim 6-sulfato de cartilagem de tubarão, dermatam sulfato de mucosa intestinal bovina, heparam sulfato de aorta humana, papaína bi-cristalizada (15 unidades/ mg de proteína), e padrões de dissacarídeos foram obtidos da Sigma (St.Louis, MO), condroitinase ABC (EC 4.2.2.4) de *Proteus vulgaris*, condroitinase AC II (EC 4.2.2.5) de *Arthrobacter aurescens* foram obtidos da Seikagaku Co. (Tokio), agarose (*standard low Mr*) da Bio-Rad Labs. (Richmond, CA), azul 1,9-dimetilmetileno (DMMB) da Aldrich Co..

2- Material biológico

Frangos *Hy-Line* (n=25) com 45 dias de idade foram obtidos no abatedouro. Logo após o sacrifício dos animais, as cartilagens articulares da asa foram separadas dos outros tecidos, fragmentadas e armazenadas a -70°C . As cartilagens utilizadas foram divididas em 5 regiões distintas, esquematizadas na **figura 01**: a porção proximal do úmero (**Hp**), a porção distal do úmero em contato com o rádio (**Hr**), a porção distal do úmero em contato com a ulna (**Hu**), a porção proximal do rádio (**Rp**) e a porção proximal da ulna (**Up**).

3- Tratamentos enzimáticos

Papaína

Para a extração de glicosaminoglicano a partir de peso seco, uma parte das amostras de cada região foi imersa em acetona por 24 horas a 4°C e o tecido seco (0,5 g) foi tratado em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 contendo 0,5 g de papaína bicristalizada (15 unidades/ mg de proteína), EDTA 5 mM e cisteína 5 mM (MICHELACCI *et al.*, 1979). Após uma incubação de 24 horas a 60°C , a mistura foi centrifugada e o sobrenadante da extração foi precipitado com 3 volumes de etanol por 24 horas à 10°C . O precipitado formado foi coletado por

centrifugação, seco à vácuo e dissolvido em água destilada para posterior análise em cromatografia.

Condroitinases

A caracterização, quantificação e análise das proporções relativas dos dissacarídeos no condroitim sulfato foi feita com o uso de condroitinases (SAITO *et al.*, 1968). Aproximadamente 100 µg de glicosaminoglicanos foram incubados com 0,01 unidade de condroitinase ABC (EC 4.2.2.4) ou ACII (EC 4.2.2.5) em tampão etilenodiamino/acetato 50 mM pH 8,0 a 37 °C por 18 horas. Os dissacarídeos obtidos após precipitação etanólica foram secos à vácuo e dissolvidos em água Milli-Q para posterior análise por HPLC. A atividade enzimática foi avaliada por eletroforese em gel de agarose.

4- Eletroforese em gel de agarose-propileno

Os glicosaminoglicanos obtidos das amostras tratadas com papaína e condroitinases foram analisados em gel de agarose segundo DIETRICH & DIETRICH (1976), usando condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato como padrões. As amostras foram aplicadas em um gel de agarose 0,5% em tampão 1,3-diaminopronano/acetato 50 mM pH 9,0. Após uma corrida de 1 h a 100 V, os géis foram fixados com brometo de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio (Cetavlon) 0,1% e corados com Azul de toluidina 0,1% em ácido acético/ etanol/ água (0,1:5:5, v/v).

5- Cromatografia em HPLC

O conteúdo de condroitim 4-sulfato e condroitim 6-sulfato nas amostras tratadas com papaína foi determinado por cromatografia após a degradação enzimática. Para determinar essa composição de dissacarídeos, o material incubado com as condroitinases foi aplicado em uma coluna Supelco/ Spherisorb SAX (45 mm x 250 mm) acoplada a um sistema para HPLC. A eluição dos dissacarídeos foi feita com um gradiente linear de NaCl de 0 a 1,0 M em água pH 3,5 sob um fluxo de 0,5 ml/min. O eluato foi monitorado pela absorbância em 232 nm.

6- Métodos analíticos

Ácido hexurônico foi determinado pela reação com Carbazol usando como padrão ácido glicurônico (DISCHE, 1947). A quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados presentes nas frações foi determinado pelo método do DMMB usando condroitim sulfato como padrão (FARNDALÉ *et al.*, 1986).

7- Análise estatística

As medidas das dosagens e quantificações foram comparadas pela análise de variância (ANOVA) com distribuição de Fischer. Todos os testes foram feitos com 5% de significância (BEIGUELMAN, 1991).

RESULTADOS

As cartilagens, que foram removidas de ossos da asa de frango para este trabalho, estão ilustradas na **figura 01**. As amostras não apresentavam sinais de degeneração ou lesões necróticas macroscópicas e foram usadas somente as interfaces entre as regiões em contato na articulação.

O conteúdo de ácido hexurônico de cada região foi analisado pelo método do carbazol e uma variação significativa ($p < 0,05$) foi encontrada entre as amostras (**figura 02**). As cartilagens das regiões **Hp**, **Hr** e **Hu** mostraram maiores valores no conteúdo de ácido hexurônico, ao redor 90 mg/g de tecido seco. A concentração de ácido hexurônico foi menor na região **Up** (75 mg/g de tecido seco) e na região **Rp** (65 mg/g de tecido seco), quando comparadas com as outras regiões.

A quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados (**figura 02**) presentes nas amostras foi feita pelo método do DMMB e variações significativas foram observadas ($p < 0,05$). As regiões de cartilagem **Hp**, **Hr** e **Hu** apresentaram valores em torno de 200 mg de glicosaminoglicano/g de tecido seco, enquanto **Up** e **Rp** apresentaram valores em torno de 130 mg e 80 mg de glicosaminoglicano/g de tecido seco, respectivamente.

A eletroforese em gel de agarose (**figura 03**) do material obtido após digestão com papaína mostrou um componente migrando na posição de condroitim sulfato, porém com uma mobilidade eletroforética levemente retardada quando comparado com o padrão analisado em paralelo. Após o tratamento com as condroitinases ABC e AC nenhuma banda foi detectada em gel de agarose (dados não apresentados) ficando demonstrado que esse glicosaminoglicano é do tipo condroitim sulfato.

A análise de dissacarídeos presentes nos glicosaminoglicanos, obtidos nas amostras de cartilagem usadas neste estudo, foi feita após a digestão com a condroitinase ABC seguida de avaliação em HPLC. Os resultados obtidos estão representados em cromatograma na **figura 04**, juntamente com o perfil de eluição

de padrões de dissacarídeos. Os produtos formados pela digestão usando condroitinases indicaram a presença de condroitim sulfato em todas as cartilagens analisadas, com predominância de resíduos de ácido α -L-glucurônico e N-Acetil- β -D-galactosamina 4-O-sulfatada [GlcA β 1-3GalNAc(4SO₃)].

Os principais dissacarídeos obtidos de condroitim sulfato de frango foram α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc(4SO₄) (~67%), derivado de condroitim 4-sulfato, seguido por α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc(6SO₄) (~22%), derivado de condroitim 6-sulfato e α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc (~9%) (**Tabela 01**). Pode ser visto ainda nesta tabela que somente traços de dissacarídeos di- e tri-sulfatados foram formados, compreendendo 2% do total. A diferença entre o conteúdo de dissacarídeos oriundos do tratamento com condroitinase ABC e ACII indicaram traços de dermatam sulfato.

A relação Δ Di-4S e Δ Di-6S está representada na **tabela 02**. A região Rp apresentou o menor valor para a relação condroitin 4-sulfato/condroitim 6-sulfato (2,51) enquanto que todas as outras regiões apresentaram uma relação em torno de 3.

DISCUSSÃO

A análise do conteúdo de glicosaminoglicano tem sido reportada em cartilagem, incluindo variações nas quantidades relativas e no tipo de glicosaminoglicano de acordo com a cartilagem e seu estado fisiológico e patológico (MICHELACCI, *et al.*, 1979; MOURÃO *et al.*, 1979; MOURÃO, 1988; HARAB & MOURÃO, 1989; HEISE & TOLEDO, 1993; IMANARI *et al.*, 1996). Neste trabalho as cartilagens analisadas foram obtidas das regiões de contato na articulação. Sendo assim, as diferenças observadas no conteúdo de ácido hexurônico, glicosaminoglicanos sulfatados e nas proporções de condroitim 4- e 6-sulfato nas cartilagens retiradas da asa do frango podem ser relacionadas às condições fisiológicas presentes em cada região, dependendo da presença de forças biomecânicas e da idade. Um aspecto que merece ser considerado nessas diferenças é o próprio tipo de movimento. Na articulação escapulo-umeral o movimento é triaxial enquanto nas articulações úmero-ulnar e úmero-radial o movimento é uniaxial, conferindo a estas juntas propriedades biomecânicas diferentes (SPENCE, 1991).

As amostras de cartilagem tratadas com enzimas apresentaram glicosaminoglicanos sulfatados migrando na posição do padrão condroitim sulfato em todas as regiões analisadas. Após o tratamento com a condroitinase ABC o condroitim sulfato foi digerido, não havendo produtos detectáveis em eletroforese em gel de agarose-propileno. KITAMURA & YAMAGATA (1976) demonstraram que o condroitim sulfato é o glicosaminoglicano mais abundante nos proteoglicanos em cartilagem de embrião de frango. A presença de condroitim sulfato como principal componente em cartilagem era esperado pois o conteúdo deste glicosaminoglicano corresponde a 10 % do peso seco do material (HEINEGÅRD & PAULSSON, 1984). A mobilidade eletroforética levemente retardada em relação ao padrão de condroitim sulfato pode ser observada neste material, podendo indicar um padrão de sulfatação diferenciado para este condroitim sulfato, como observado para o dermatam sulfato de ascídia e

dermatam super-sulfatado de mamíferos (PAVÃO *et al.*, 1998; CAVALCANTE *et al.*, 1999). Esta migração lenta do condroitim sulfato também foi observada em cartilagem do tibiotarso e tarsometatarso de frangos (BELLINE, comunicação pessoal). Além da sulfatação, o tamanho das cadeias de glicosaminoglicanos pode influenciar na migração.

A quantidade e o tipo de glicosaminoglicano pode variar entre os tecidos pela influência de diferentes fatores. Em cartilagem bovina foi observado que os proteoglicanos da superfície (até 200µm de profundidade) diferem daqueles de camadas mais profundas (FRANZÉN *et al.*, 1981). Cartilagem de pacientes com artrites, comparada com cartilagem normal, apresenta um aumento significativo na concentração de condroitim sulfato e diminuição na de queratam sulfato, com pouca alteração no conteúdo total de glicosaminoglicanos presentes (MANKIN & LIPPIELLO, 1971). Trabalhando com cartilagem patelar de humanos, OLSEN e cols. (1989) verificaram que as cartilagens em degeneração apresentavam um aumento na concentração de dermatam sulfato e ácido hialurônico, uma diminuição de condroitim sulfato e pequena alteração para queratam sulfato quando comparadas à cartilagem normal. Glicosaminoglicanos extraídos de aorta humana de diferentes idades apresentam um conteúdo total que aumenta nos primeiros quarenta anos de vida, especialmente o isômero condroitim 6-sulfato (TOVAR *et al.*, 1998). HEISE & TOLEDO (1993) demonstraram que o conteúdo de glicosaminoglicanos é homogêneo nas diferentes regiões analisadas do joelho de coelho, apesar das prováveis diferenças na intensidade de forças compressivas. Em cães, a cartilagem tibial apresenta uma maior concentração de glicosaminoglicanos que os côndilos do fêmur (KIVIRANTA *et al.*, 1987). Esses dados, aparentemente conflitantes, estão relacionados aos aspectos mecânicos, anatômicos e fisiológicos particulares de cada articulação. Assim, fica evidente que variações podem ocorrer na constituição bioquímica do tecido.

O glicosaminoglicano condroitim sulfato tem sido designado de acordo com seus dissacarídeos dominantes. Assim, condroitim sulfato-A, condroitim sulfato-B (ou dermatam sulfato) e condroitim sulfato-C possuem predominantemente unidades repetitivas de GlcA β 1-3GalNAc(4SO₃), IdoA β 1-3GalNAc(4SO₃), GlcA β 1-

3GalNAc(6SO₃), respectivamente (CHAI *et al.*, 1998). Baseado nas proporções relativas dos dissacarídeos formados pelas condroitinase e pelo conteúdo de ácido hexurônico, é possível calcular a concentração absoluta de condroitim 4-sulfato e condroitim 6-sulfato na cartilagem. Condroitinases digerem ácido hialurônico e condroitim sulfato formando Δ Di-AH e Δ Di-OS como produtos de digestão. Estes dissacarídeos diferem somente por serem epímeros da porção hexosamina da molécula, dificultando a separação (IMANARI *et al.*, 1996).

Neste trabalho, os produtos formados pela digestão com condroitinases indicam que o condroitim sulfato presente nas diferentes regiões analisadas tem uma preponderância dos resíduos de ácido α -L-glicurônico e N-acetil- β -D-galactosamina 4-O-sulfatada. O principal dissacarídeo obtido do condroitim sulfato de frango é o α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc(4SO₄) (~67%), derivado do condroitim 4-sulfato, seguido de α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc(6SO₄) (~22%), derivado do condroitim 6-sulfato e α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc (~9%). Do total obtido, somente traços de dissacarídeos bi- e tri-sulfatados são formados, compreendendo 2%. Os resultados deste trabalho indicam uma sulfatação predominante na posição 4. Em humanos, cartilagem articular e discos intervertebrais contêm uma média de 82% de condroitim 6-sulfato e 18% de condroitim 4-sulfato, enquanto as cartilagens subarticular de diferentes regiões contêm uma média de 55% de condroitim 4-sulfato e 45% de condroitim 6-sulfato (MOURÃO *et al.*, 1976).

A diferença entre o conteúdo de dissacarídeos obtidos após o tratamento com condroitinase ABC e ACII indica traços de dermatam sulfato. A quantificação de dermatam sulfato, usualmente obtida por esta diferença, baseia-se no fato de que a molécula não pode ser digerida por condroitinase AC.

Foi demonstrado que a região de cartilagem proximal do rádio apresentou o menor valor para a relação 4S/6S (2,51) enquanto que todas as outras regiões apresentaram uma relação em torno de 3.

A distribuição de glicosaminoglicanos em cartilagens é espécie-específica e amplamente variável. Uma concentração predominante de condroitim 4-sulfato em cartilagem de frangos pode estar relacionada com o rápido desenvolvimento destas aves na criação industrial. Em humanos (MOURÃO *et al.*, 1976) e cães

(HARAB & MOURÃO, 1989), a presença de condroitim 4-sulfato em cartilagens em crescimento de indivíduos jovens e o seu desaparecimento após os processos de calcificação dos adultos, sugere que este glicosaminoglicano pode ser um dos componentes da matriz extracelular envolvido com os processos de calcificação, enquanto condroitim 6-sulfato pode ser um componente importante responsável pela integridade da cartilagem articular, possuindo um papel secundário nos processos de calcificação. Em humanos, as proporções relativas de condroitim 4-sulfato e condroitim 6-sulfato se alteram com a idade e em processos artríticos (MICHELACCI, *et al.*, 1979; MOURÃO *et al.*, 1979; MOURÃO, 1988; TOVAR, *et al.*, 1998).

A expressão de proteoglicanos e glicosaminoglicanos pode variar durante o desenvolvimento do frango. Na miogênese, ocorre uma síntese primária de grandes proteoglicanos, em geral versicam (CS-PG), que culmina com uma síntese predominante de pequenos proteoglicanos nos últimos estágios da formação do músculo. Aproximadamente 90% dos dissacarídeos do versicam extraído de tecidos musculares são sulfatados na posição 6, formando um padrão distinto de sulfatação quando comparado aos proteoglicanos de outros tecidos, como a cartilagem (CARRINO *et al.*, 1999).

Em uma possível relação entre a polimerização do condroitim sulfato e padrões de sulfatação, a presença ou ausência de sulfato poderia afetar a incorporação de moléculas de carboidratos, regulando o crescimento da cadeia. A presença de éster sulfato na posição 4 nas moléculas do terminal não-redutor da cadeia impede a incorporação de carboidratos, enquanto a incorporação de éster sulfato na posição 6 não determina qualquer efeito. A incorporação diferencial do éster sulfato nestas posições poderia ser um mecanismo para limitar o tamanho da cadeia de glicosaminoglicano (SILBERT, 1996).

Frangos, galinhas poedeiras e aves usadas como estoque para reprodução podem ser afetados por diferentes desordens degenerativas das articulações e ossos, relacionadas com problemas no desenvolvimento normal do sistema esquelético. Desordens degenerativas na forma de perda e destruição de cartilagem e suas seqüelas, como osteocondrose e osteoartrose, são tópicos

importantes na ciência relacionada com a criação de aves (NAKANO & SIM, 1995). A degeneração progressiva da cartilagem articular resulta em artrite, dor e conseqüente diminuição na capacidade reprodutiva. A prevenção e o controle de desordens esqueléticas na criação de aves depende dos avanços de nosso entendimento dos mecanismos fisiológicos que governam o crescimento esquelético normal e da biologia destas desordens aviárias (THORP, 1994). O estudo da formação da cartilagem pode contribuir para a elucidação dos mecanismos do desenvolvimento esquelético e das doenças articulares.

Os resultados deste trabalho, obtidos de amostras de cartilagem da asa de frango, podem ser representativos para as condições fisiológicas normais destas aves. A análise bioquímica de glicosaminoglicanos sulfatados em diferentes cartilagens obtidas dessas aves, bem como outras espécies de aves, podem ser futuramente elaboradas, permitindo comparações entre aves em diferentes condições de criação, idade, sexo e genótipo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEIGUELMAN, B. (1991) Curso prático de bioestatística, Sociedade Brasileira de Genética 2ª Ed. São Paulo.
- CARRINO, D.A., SORRELL, J.M., AND CAPLAN A.I. (1999) Dynamic expression of proteoglycans during chicken skeletal muscle development and maturation *Poultry Sci.* **78**:769-77.
- CAVALCANTE, M.C.M., MOURÃO P.A.S., AND PAVÃO, M.S.G. Isolation and characterization of a highly sulfated heparan sulfate from ascidians. *BBA* **1428**: 77-87, 1999.
- CHAI, W., LAWSON, A.M., GRADWELL, M.J., AND KOGELBERG, H. (1998) Structural characterization of two hexasaccharides and an octasaccharide from chondroitin sulphate C containing the unusual sequence (4-sulpho)-N-acetylgalactosamine- β 1-4-(2-sulpho)-glucuronic acid- β 1-3-(6-sulpho)-N-acetylgalactosamine *Eur. J. Biochem.* **251**, 114-21.
- DAVIDSON, E.A., AND MEYER, K. (1955) Structural studies on chondroitin sulfuric acid. 2. The glucuronidic linkage *J. Am. Chem. Soc.* **77**(18):4796-98.
- DIETRICH, C.P., AND DIETRICH, S.M.C. (1976) Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers *Anal. Biochem.* **70**, 645-47.
- DISCHE, Z. (1947) A new specific color reaction of hexuronic acids *J. Biol. Chem.* **167**, 189-98.
- FARNDAL, R.W.; BUTTLE, P.J. AND BARRET, A.J. (1986) Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue *BBA* **883**: 173-177.
- FRANZÉN A., INEROT, S., HYDERUP, S.O., AND HEINEGÅRD, D. (1981) Variations in the composition of bovine hip articular cartilage with distance from the articular surface *Biochem. J* **195**: 535-43.
- HARAB, R.C. AND MOURÃO, P.A.S. (1989) Increase of chondroitin 4-sulfate concentration in the endochondral ossification cartilage of normal dogs. *BBA*, **992**:237-240.

- HARDINGHAM, T.E., AND MUIR, H. (1972) The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans *Biochim. Biophys. Acta* **279**, 401-5.
- HEINEGÅRD, D., AND PAULSSON, M. (1984) Structure and metabolism of proteoglycan in Extracellular Matrix Biochemistry (Prez, K.A., and Reddi, A.H., eds.) pp. 277-328 Elsevier Science Publishing Co. New York.
- HEISE N., AND TOLEDO O.M.S. (1993) Age-related changes in glycosaminoglycans distribution in different anatomical sites on the surface of knee-joint articular cartilage in young rabbits. *Ann. Anat.* **175**:35-40.
- IMANARI, T., TOIDA, T., KOSHIISHI, I., AND TOYODA, H. (1996) High-performance liquid chromatographic analysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides *J. Chromat. A*, **720**: 275-93.
- IOZZO R.V. (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:609-52.
- KITAMURA, K., AND YAMAGATA, T. (1976) The occurrence of a new type of proteochondroitin sulfate in the developing chick embryo *FEBS Letters* **71**(2):337-40.
- KIVIRANTA I., JURVELIN J., TAMMI M., SAAMANEM AM., AND HELMINEN HI. (1987) Weight bearing controls glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young beagle dogs. *Arthritis Rheum.* **30**(7): 801-9.
- LOHMANDER, S. (1988) Proteoglycans of joint cartilage: structure, function turnover and role as markers of joint disease. *Baillière's Clinical Rheumatol.* **2**(1):37-62.
- MANKIN H.J., AND LIPPIELO L. (1971) The glycosaminoglycans of normal and arthritic cartilage. *The J. Clin. Investigation* **50**:1712-1719.
- MICHELACCI, Y.M., MOURÃO, P.A.S., LAREDO, J., AND DIETRICH, C.P. (1979) Chondroitin sulfates and proteoglycans from normal and arthrosic human cartilage *Connect. Tissue Res.* **7**, 29-36.
- MOURÃO, P.A.S. (1988) Distribution of chondroitin 4-sulfate and chondroitin 6-sulfate in human articular and growth cartilage *Arthritis Rheum.* **31**, 1028-33.

- MOURÃO, P.A.S., MICHELACCI, Y.M., AND TOLEDO, O.M.S. (1979) Glycosaminoglycan and proteoglycan of normal and tumoral cartilages of human and rats *Cancer Res.* **39**(7): 2802-2806.
- MOURÃO, P.A.S., ROZENFELD, S., LAREDO, J., AND DIETRICH, C.P. (1976) The distribution of chondroitin sulfates in articular and growth cartilages of human bones *Biochim. Biophys. Acta*, **428**, 19-26.
- NAKANO, T., AND SIM, J.S. (1995) A study of the chemical composition of the proximal tibial articular cartilage and growth plate of broiler chickens *Poult. Sci.* **74**(3):538-50.
- OLSEN E.B., TRIER K., AND MOLLER H. (1989) Glycosaminoglycan in patellar cartilage. *Acta Orthop. Scand.* **60**(1):23-25.
- PAVÃO, M.S.G., AIELLO, K.R.M., WERNECK, C.C., SILVA, L.C.F., VALENTE, A.P., MULLOY, B., COLWELL, N.S., TOLLEFSEN, D.M., AND MOURÃO P.A.S. (1998) Highly sulfated dermatan sulfates from ascidians. Structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans *J. Biol. Chem.* **273**(43):27848-57.
- PETTINGILL JR, O.S. (1970) Ornithology in laboratory and field Burgess Publ. Co. Minneapolis
- SAITO, H., YAMAGATA, T., AND SUZUKI, S. (1968) Enzymatic methods for the determination of small quantities of isomeric chondroitin sulfates *J. Biol. Chem.* **243**, 1536-42.
- SCOTT J.E. (1995) Extracellular matrix, supramolecular organization and shape. *J. Anat.* **187**:259-269.
- SHULMAN, H.J., AND MEYER, K. (1970) Keratan sulfate-containing protein-polysaccharide of chicken cartilage and chondrocyte cell cultures *Fed. Proc.* **29**(2) :A928-34.
- SILBERT, J.E. (1996) Organization of glycosaminoglycan sulfation in the biosynthesis of proteochondroitin sulfate and proteodermatan sulfate *Glycoconjugate J.* **13**: 907-12.
- SPENCE, A.P. (1991) Articulações in *Anatomia Humana Básica* (Spence, A.P., ed.) pp. 157-183 Ed. Manole LTDA São Paulo.

- THORP, B.H. (1994) Skeletal disorders in the fowl: a review *Avian Pathology* **23**, 203-36.
- TOVAR, A.M.F., CESAR, D.C.F., LETA, G.C., AND MOURÃO, P.A.S. (1998) Age-related changes in populations of aortic glycosaminoglycans. Species with low affinity for plasma low-density lipoproteins, and not species with high affinity, are preferentially affected *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**: 604-14.
- VOLPI, N. (1999) Disaccharide analysis and molecular mass determination to microgram level of single sulfated glycosaminoglycan species in mixtures following agarose-gel electrophoresis *Anal. Biochem.* **273**, 229-239.
- WATANABE, H., YAMADA, Y., AND KIMATA, K. (1998) Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function *J.Biochem.* **124**, 687-93.

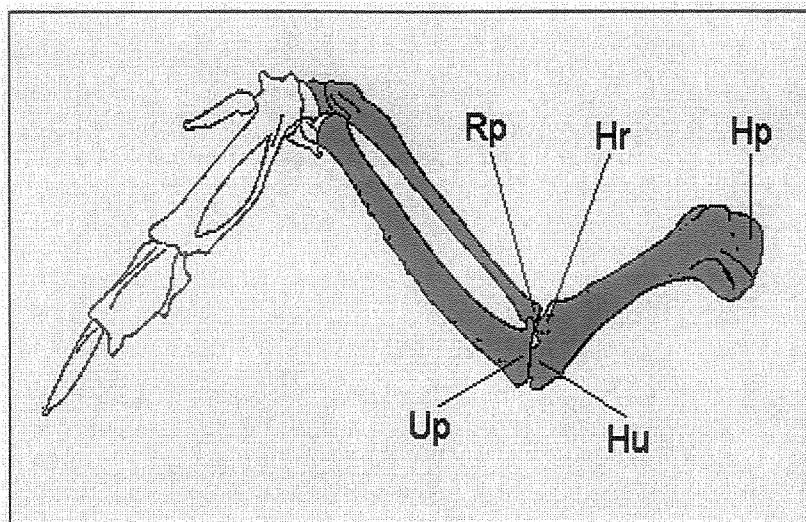


Figura 01. Desenho esquemático das regiões anatômicas da asa de frango. Estão indicadas nesta figura as regiões de cartilagem articular do úmero proximal (**Hp**), úmero distal em contato com o rádio (**Hr**), úmero distal em contato com a ulna (**Hu**), ulna proximal (**Up**) e rádio proximal (**Rp**) (Adaptado de PETTINGILL Jr., 1970).

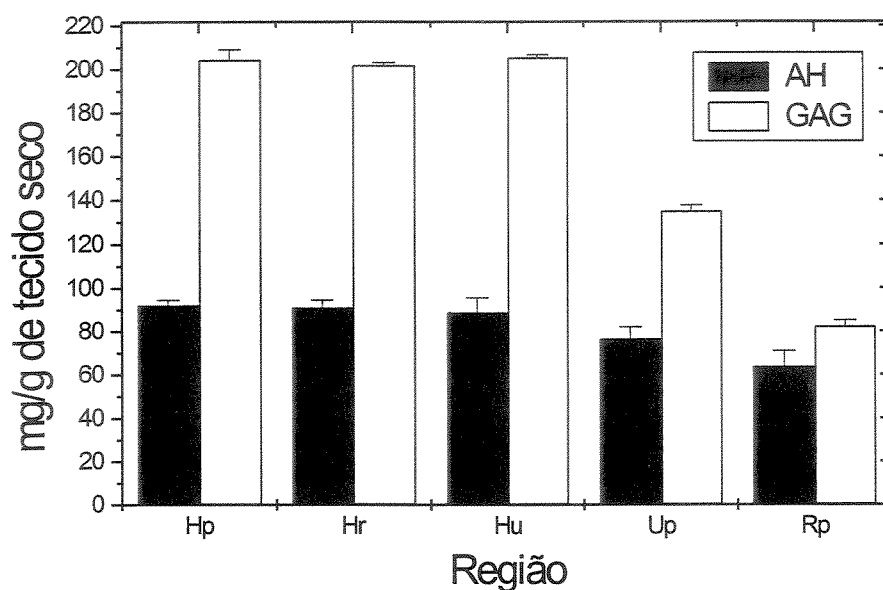


Figura 02. Dosagem de ácido hexurônico (AH) pelo método do carbazol e glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) pelo método do DMMB das amostras após tratamento com papaína. As médias estão apresentadas como mg/g de tecido seco. Diferenças significativas foram encontradas quando se compara as médias obtidas das cartilagens escapulo-umeral, úmero-ulnar e úmero-radial avaliadas por análise de variância com distribuição de Fischer com 5% de significância. As amostras estão apresentadas como **Hp** - úmero proximal, **Hr** - úmero distal em contato com o rádio, **Hu** - úmero distal em contato com a ulna, **Up** - ulna proximal e **Rp** - rádio proximal.

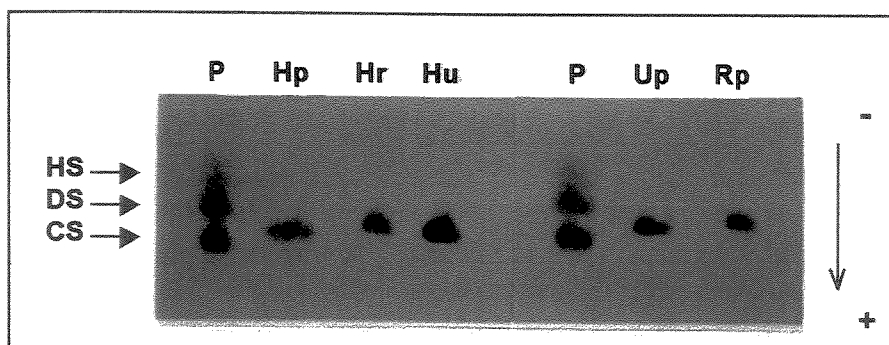
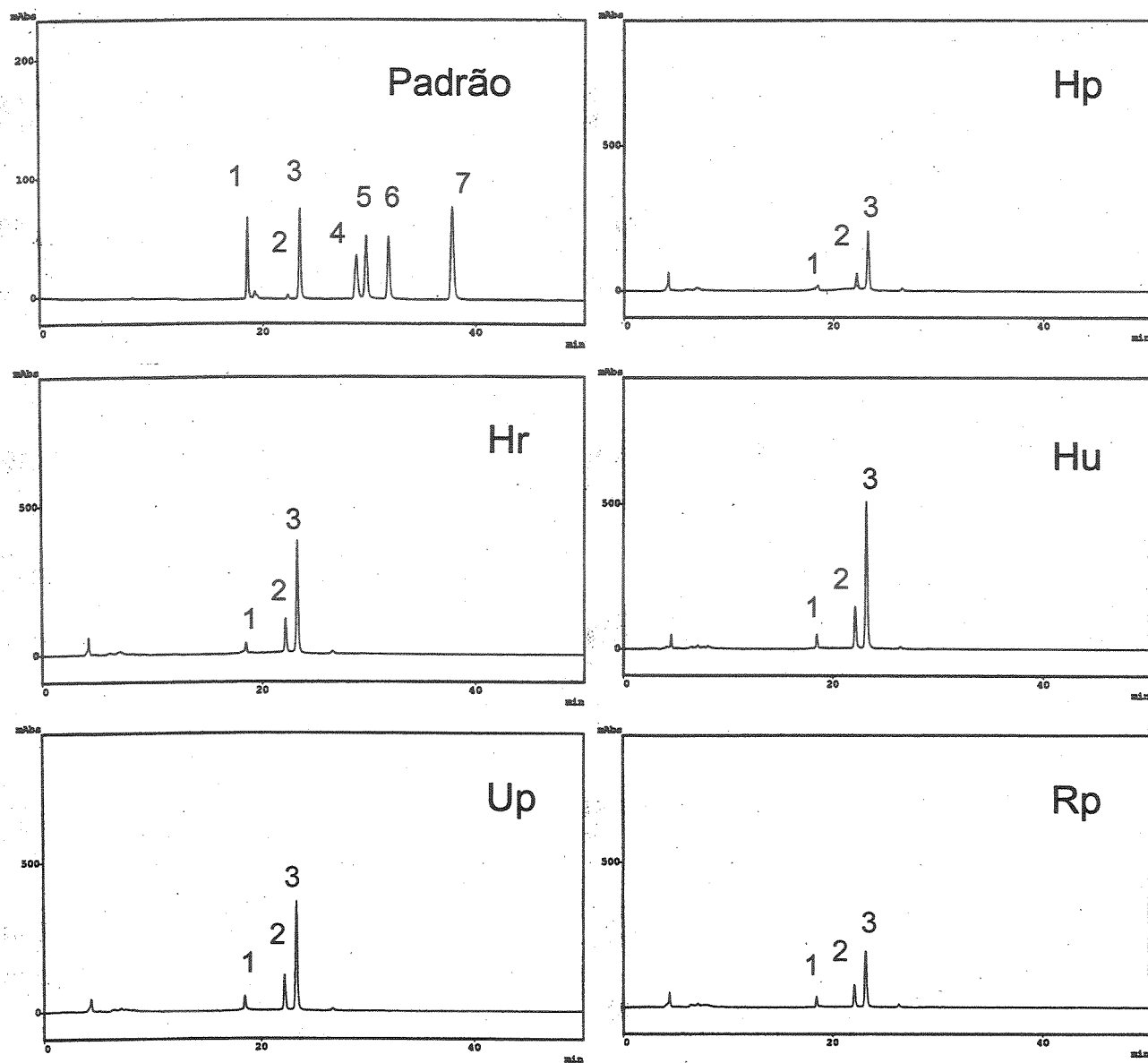


Figura 03. Eletroforese em gel de agarose-propilenodiamino analisando os glicosaminoglicanos presentes em diferentes regiões de asa de frango. Condroitim sulfato é o glicosaminoglicano principal. Padrão (P) contendo condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS) foi utilizado em paralelo. A coloração foi feita com Azul de toluidina. As amostras estão apresentadas como Hp - úmero proximal, Hr - úmero distal em contato com o rádio, Hu - úmero distal em contato com a ulna, Up - ulna proximal e Rp - rádio proximal.



Tempo de retenção

Figura 04. Análise dos dissacarídeos formados após digestão da cartilagem de frango por condroitinase ABC em *HPLC* usando troca aniônica. A coluna com Spherisorb-SAX foi eluída com um gradiente de NaCl 0 a 1.0 M. O eluato foi monitorado por absorvância de UV em 232 nm. Cada região (**Hp** - úmero proximal, **Hr** - úmero distal em contato com o rádio, **Hu** - úmero distal em contato com a ulna, **Up** - ulna proximal e **Rp** - rádio proximal) foi analisada separadamente. Os picos numerados correspondem aos tempos de retenção de diferentes padrões de dissacarídeos como se segue: **Pico 1**, α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc; **Pico 2**, α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc(6SO₄); **Pico 3**, α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc(4SO₄); **Pico 4**, α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc(2/6); **Pico 5**, α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc(4/6SO₄); **Pico 6**, α - Δ UA (2SO₄)-1 \rightarrow 3-GalNAc; **Pico 7**, α - Δ UA (2SO₄)-1 \rightarrow 3-GalNAc(4,6SO₄).

TABELA 01. Composição dos dissacarídeos do glicosaminoglicano CS obtidos após digestão com condroitinase ABC das diferentes cartilagens analisadas.

Todas as regiões apresentaram um conteúdo elevado do dissacarídeo α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc(4SO₄) seguido de α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc(6SO₄) e α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc.

Pico ^a	Dissacarídeo	t _R ^b (min)	Proporção dos dissacarídeos (% total)				
			Hp	Hr	Hu	Up	Rp
1	α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc	18.6	10.45	8.23	8.01	9.26	10.56
2	α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc(6SO ₄)	22.2	21.25	21.62	20.54	22.96	25.46
3	α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc(4SO ₄)	23.4	67.12	69.59	71.31	67.6	63.65
4	α - Δ UA(2SO ₄)-1 \rightarrow 3-GalNAc(6SO ₄)	28.7	<1	<1	<1	<1	<1
5	α - Δ UA-1 \rightarrow 3-GalNAc(4,6-diSO ₄)	29.6	1	<1	<1	<1	<1
6	α - Δ UA(2SO ₄)-1 \rightarrow 3-GalNAc(4SO ₄)	31.7	<1	-	-	-	-
7	α - Δ UA(2SO ₄)-1 \rightarrow 3-GalNAc(4,6-diSO ₄)	37.8	<1	-	-	-	-

a) Diferentes picos de padrões em ordem de eluição

b) Tempo de retenção dos dissacarídeos na coluna Spherisorb-SAX ligada ao sistema HPLC

Tabela 02. Dissacarídeos produzidos e proporção relativa de condroitim 4- e 6-sulfato formado pela ação de condroitinase ABC sobre glicosaminoglicanos de diferentes cartilagens da asa do frango.

Composto*	Região de cartilagem				
	Hp	Hr	Hu	Up	Rp
Δ Di-4S	7.52	8.55	8.98	7.17	6.06
Δ Di-6S	2.42	2.64	2.58	2.43	2.41
Razão 4S/6S	3.1	3.23	3.48	2.95	2.51

* Δ Di-6S, dissacarídeo 6-sulfato insaturado; Δ Di-4S, dissacarídeo 4- sulfato insaturado; razão = Δ Di-4S / Δ Di-6S)

ARTIGO 2**CARACTERIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE PEQUENOS PROTEOGLICANOS
EM CARTILAGENS ARTICULARES DA ASA DE FRANGO**

RESUMO

A matriz extracelular de cartilagem articular está associada a diferentes processos biológicos, entre eles, a manutenção das propriedades biomecânicas dos tecidos. Os proteoglicanos formam um conjunto de moléculas aniônicas relacionadas com a estrutura e a fisiologia da matriz extracelular. A sua expressão pode variar no tecido de acordo com o desenvolvimento, sexo, estado fisiopatológico, genótipo, entre outros fatores. As forças biomecânicas atuantes no tecido também podem condicionar a expressão de proteoglicanos em diferentes sítios da cartilagem. Neste trabalho foi verificada a distribuição de pequenos proteoglicanos em diferentes regiões de cartilagem da asa do frango com o isolamento e caracterização parcial das moléculas presentes. As frações D4 das diferentes regiões foram cromatografadas por troca iônica em DEAE-Sephacel seguida de interação hidrofóbica em octil-Sepharose. Nas dosagens do extrato total a região de cartilagem proximal do úmero apresentou a maior concentração de proteína e glicosaminoglicano sulfatado, enquanto a região de cartilagem proximal do rádio apresentou o maior conteúdo de ácido urônico. A região de cartilagem proximal da ulna apresentou a menor concentração de ácido urônico e glicosaminoglicanos sulfatados e a região de cartilagem distal em contato com a ulna a menor concentração protéica. Para as frações D4, as regiões de cartilagem proximal do úmero e proximal do rádio apresentaram os maiores valores de proteína. Todas as regiões apresentam moléculas semelhantes aos pequenos proteoglicanos fibromodulim (57 kDa) e decorim (70 a 90 kDa). Na ausência de β -mercaptoetanol duas bandas com 160 e 200 kDa podem ser vistas, podendo representar uma forma de agregação da molécula com outros componentes da matriz extracelular ou um fenômeno de auto-agregação. Após o tratamento com o agente redutor pode ser vista uma molécula com 57 kDa. Dois pequenos proteoglicanos foram parcialmente isolados em cromatografia de interação hidrofóbica. O *immunoblotting* sugere que as duas proteínas semi-purificadas correspondam aos pequenos proteoglicanos fibromodulim (57 kDa) e decorim (70

a 90 kDa). Os dados obtidos neste trabalho podem trazer subsídios para a análise da cartilagem de frango em estado fisiológico normal e comparar depois com cartilagem submetidas à diferentes forças mecânicas.

INTRODUÇÃO

Nas articulações, a cartilagem é um tecido adaptado para oferecer resistência e suportar as diferentes pressões mecânicas, de modo a facilitar os movimentos articulares (BUCKWALTER & MANKIN, 1997). A matriz extracelular presente na cartilagem articular, formada por colágeno tipo II, proteoglicanos e outras moléculas protéicas, está associada com diferentes processos biológicos do tecido, entre eles, a manutenção das propriedades biomecânicas (HEINEGÅRD & OLDBERG, 1989; EYRE, 1991).

As cartilagens não são homogêneas e as espessuras que apresentam não correspondem necessariamente às suas propriedades biomecânicas. A presença de proteoglicanos em determinadas regiões está relacionada à pouca deformação do tecido (COTTA & PUHL, 1978). As fibras de colágeno apresentam diferentes orientações e o conteúdo de glicosaminoglicanos e água influencia na resposta do tecido às forças mecânicas (SIMON, 1970). A heterogeneidade da cartilagem permite verificar variações morfológicas e bioquímicas em diferentes regiões que suportam diferentes forças biomecânicas (BULLOUGH *et al.*, 1985). Por outro lado não podem ser descartados outros fatores como sexo, idade, influência genética, estado patológico, nutricional e características próprias que regulam as propriedades fisiológicas do tecido (AYDELOTE *et al.*, 1992).

Uma classe de proteoglicanos de baixo peso molecular compõe uma família de moléculas estruturalmente relacionadas mas geneticamente distintas com ampla distribuição entre os vertebrados (FISCHER *et al.*, 1987). Recentemente, foram designados como SLRPs (*small leucine-rich proteins*) por IOZZO e MURDOCH (1996). Proteoglicanos de baixo peso foram detectados em pele (FRANSSOM & MALMSTROM, 1971), tendões (SCOTT & ORFORD, 1981), esclera (COSTER & FRANSSOM, 1981) e cartilagem (ROSEMBERG *et al.*, 1985). Essas moléculas apresentam a capacidade de interagir com fatores de crescimento do tipo $TGF-\beta$, que têm importância na regulação do crescimento e diferenciação celular (YAMAGUCHI *et al.*, 1990; HILDEBRAND *et al.*, 1994).

Decorim (PG-S2, PG II, PG40) e biglicam (PG-S1, PG I) foram isolados de diferentes tecidos, como cartilagem nasal e articular, pele e tendão (HEINEGÅRD & SOMMARIN, 1987; CHOI *et al.*, 1989; IOZZO, 1998). Possuem uma proteína central onde o decorim tem 1 ou 2 cadeias de condroitim sulfato ou dermatam sulfato (MANN *et al.*, 1990; WEBER *et al.*, 1996), enquanto biglicam contém duas cadeias de condroitim sulfato ou dermatam sulfato ligadas à extremidade N-terminal da proteína para os dois proteoglicanos.

O fibromodulim (59 kDa) pode ser encontrado em cartilagem articular e outros tecidos. A molécula apresenta 4 cadeias de queratam sulfato em um domínio central e vários resíduos de tirosina sulfatados na porção N-terminal (OLDBERG *et al.*, 1989).

Fibromodulim e decorim estão associados com funções reguladoras da fibrilogênese do colágeno e podem ajustar o espaçamento apropriado das fibrilas de colágeno durante o crescimento axial das fibrilas de colágeno e talvez durante fusão lateral destas moléculas (IOZZO, 1998). Fibromodulim e decorim interagem com fibrilas de colágeno e afetam sua fibrilogênese *in vitro* (VOGEL *et al.*, 1984; CHANDRASEKHAR *et al.*, 1986; HEINEGÅRD & SOMMARIN, 1987; HEDBOM AND HEINEGÅRD, 1989; FLEISCHMAJER *et al.*, 1991; HEDBOM AND HEINEGÅRD, 1993). Resultados obtidos *in vivo* mostram a ligação de fibrilas colagênicas com fibromodulim (HEDLUND *et al.*, 1994) e decorim (FLEISCHMAJER *et al.*, 1991; DANIELSON *et al.*, 1997).

Na cartilagem, a ligação de fibromodulim e decorim com moléculas de colágeno poderia, além de modular a fibrilogênese, regular as propriedades do colágeno presente na superfície do tecido, proporcionando interação molecular entre as fibrilas de colágeno e auxiliando na resistência das mesmas (HAGG *et al.*, 1998).

Os proteoglicanos contribuem também para a organização molecular do tecido graças à sua estrutura e a capacidade de interação com outros componentes da matriz extracelular (VIDAL & MELLO, 1984). A organização molecular de componentes da matriz extracelular de cartilagens, principalmente

colágeno e proteoglicanos, tem sido estudada e relacionada às propriedades biomecânicas do tecido (VIDAL & VILARTA, 1988; SKERRY *et al.*, 1990).

As cartilagens articulares formam um importante modelo de estrutura biológica hierarquizada, onde os diferentes componentes e níveis de organização são responsáveis pela eficiência fisiológica da junta (MOW *et al.*, 1992).

Diferentemente de outras juntas, nas articulações escapulo-umeral, úmero-ulnar e úmero-radial parece haver uma presença menor de forças compressivas, mas elas existem e não ocorrem de maneira uniforme sobre as superfícies articulares, especialmente considerando que os movimentos da articulação escapulo-umeral são diferentes dos movimentos das juntas úmero-ulnar e úmero-radial (SPENCE, 1991). Os estudos bioquímicos aqui realizados levaram em conta as regiões das superfícies articulares onde provavelmente forças com diferentes intensidades estavam presentes.

Galinhas e frangos podem ser afetados por desordens degenerativas das articulações e ossos relacionadas com problemas no desenvolvimento normal do sistema esquelético (RATH *et al.*, 1999). A prevenção e controle destas desordens nas aves depende do avanço no conhecimento sobre os mecanismos fisiológicos que governam o crescimento esquelético normal e da biologia das desordens esqueléticas de aves (THORP, 1994). O estudo bioquímico de cartilagem é importante para a elucidação destes mecanismos (WATANABE *et al.*, 1998) contribuindo com dados importantes, não só para estudos de biologia comparada mas também para conhecer a composição da MEC em cartilagem articular de aves.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material biológico

Frangos *Hy-Line* (n=25) com 45 dias de idade foram obtidos no abatedouro após o sacrifício dos animais. As cartilagens articulares, obtidas da asa após o abate do animal, foram separadas dos outros tecidos, fragmentadas e armazenadas a -70°C . As cartilagens utilizadas foram divididas em 5 regiões distintas, esquematizadas na **figura 1**: a porção proximal do úmero (**Hp**), a porção distal do úmero em contato com o rádio (**Hr**), a porção distal do úmero em contato com a ulna (**Hu**), a proximal do rádio (**Rp**) e a proximal da ulna (**Up**) .

2. Extração dos componentes da matriz

O material de cada região foi homogeneizado com o uso de homogeneizador Polytron™ (Kinematica, Switzerland) a 4°C em 15 volumes de PBS (tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,4 e NaCl 0,15M) contendo inibidores de proteases (PMSF 1 mM, EDTA 20 mM). Após centrifugação em 18.000 rpm (centrífuga Beckman modelo J2-21, rotor JA-20), o precipitado foi utilizado para extração de componentes da matriz extracelular.

A extração foi feita com Gu-HCl 4M em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,8 contendo PMSF 1mM e EDTA 10mM, a 4°C por 24 horas sob agitação constante. O material foi centrifugado a 20.000 rpm por 30 minutos (centrífuga Beckman modelo J2-21, rotor JA-20). O sobrenadante do material extraído e o precipitado foram estocados separadamente a -20°C .

3. Ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério (CsCl)

O método foi realizado segundo HASCALL & SADJERA (1969). Após a adição de CsCl na proporção de 0,35g/g de extrato, para uma densidade final de 1,35 g/ml de extrato, o material foi centrifugado a 34.000 rpm a 15°C por 62 horas (centrífuga Beckman modelo L8-M, rotor 80Ti). As frações D1 (fundo), D2, D3 e

D4 (topo) (HEINEGÅRD & SOMMARIN, 1987) de cada região foram estocadas a -20° C.

4. Métodos analíticos

A dosagem de proteínas foi feita de acordo com o método de BRADFORD (1976), usando curvas padrão de albumina sérica bovina. O conteúdo de ácido urônico foi determinado pelo método de orcinol segundo BROWN (1946), usando como padrão glucuronolactona. A quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados presentes nas frações foi determinado pelo método do DMMB descrito por FARNDAL *et al.* (1986), usando como padrão condroitim sulfato.

5. Cromatografias

Cromatografia de troca iônica

As frações D4 foram dialisadas contra 30 volumes de uréia 7 M em tampão Tris-acetato 50 mM pH 8,0 (3 trocas). Todas as frações, contendo 2 mg de proteína, foram cromatografadas em coluna de DEAE-Sepharcel (Amersham Pharmacia Biotech). A resina foi equilibrada com o tampão citado acima. O material não ligado à resina foi removido pela lavagem da coluna com uréia 7 M tamponada. A eluição do material ligado foi feita no mesmo tampão utilizando um gradiente de NaCl de 0 a 1,0 M, com fluxo aproximado de 1 ml/min. A eluição de proteínas foi monitorada por absorvância em 280 nm e as frações contendo proteínas foram analisadas em SDS-PAGE.

Cromatografia de Interação hidrofóbica

As frações ricas em proteoglicano obtidas da cromatografia de troca iônica foram reunidas e submetidas à cromatografia de interação hidrofóbica. Para essa cromatografia o material foi dialisado contra 30 volumes de tampão acetato de sódio 50 mM pH 6,3 contendo GuHCl 2M (3 trocas). O material foi cromatografado em coluna contendo Octyl-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com o tampão acima. A amostra foi aplicada à coluna e por um período de 4 horas ficou circulando pela resina. A eluição foi feita com um gradiente de 2 – 6 M de

GuHCl em tampão acetato de sódio 50 mM pH 6,3. O material eluído foi analisado em SDS-PAGE.

6. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

O método foi realizado de acordo com ZINGALES (1984) em gradiente de acrilamida (4 - 16%). Padrões de peso molecular estabelecidos foram analisados em paralelo. As amostras obtidas de cada cromatografia foram precipitadas com tampão acetato de sódio 0,5M pH 7,4 e etanol a 4 °C por 24 horas. Os precipitados foram dissolvidos em tampão de amostra para SDS-PAGE. Para cada gel foi aplicada uma corrente de 30mA durante aproximadamente 3 horas. A coloração do gel foi realizada pelo método da prata segundo BLUM *et al.* (1987).

7. Transferência elétrica de proteína para nitrocelulose - Immunoblotting

O material isolado em cromatografia de interação hidrofóbica e analisado por SDS-PAGE foi precipitado e ressuspendido em tampão de eletroforese. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose de acordo com TOWBIN & GORDON (1979). A transferência foi feita utilizando 70 volts por 4 horas a 4°C. A membrana teve os sítios livres bloqueados com tampão Tris 10 mM, NaCl 0,15 M e Tween 20 (0,2 %, v/v) em pH 7,4. Para a análise do fibromodulim foi utilizado um soro de coelho anti-fibromodulim de frango diluído 1:20 e para o decorim foi utilizado soro de coelho anti-decorim humano (Gibco) diluído 1:100. O anticorpo secundário para ambos foi um soro de porco anti-Ig total de coelho marcado com peroxidase, diluído 1:500. A reação enzimática foi desenvolvida com diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂.

8. Análise estatística

As medidas das dosagens e quantificações foram comparadas pela análise de variância (ANOVA) com distribuição de Fischer. Todos os testes foram feitos com 5% de significância (BEIGUELMAN, 1991).

RESULTADOS

Os valores obtidos nas dosagens de proteínas, ácido urônico e glicosaminoglicanos sulfatados nos extratos totais obtidos das cartilagens estão apresentados na **figura 02**. A análise de variância mostrou que há diferença significativa nas médias de dosagem obtidas de cada região. A região **Hp** apresentou a maior concentração de proteínas (7,45 mg/g) e glicosaminoglicanos sulfatados (9,28 mg/g), enquanto que **Rp** apresentou maior conteúdo de ácido urônico. A região **Up** foi a que apresentou menor concentração de ácido urônico (1,98 mg/g) e glicosaminoglicanos sulfatados (3,54 mg/g), enquanto a região **Hu** teve a menor concentração protéica (4,90 mg/g).

As frações D4 contendo pequenos proteoglicanos, colágeno e outras proteínas, obtidas após ultracentrifugação dos extratos de cartilagem da asa, foram analisadas. O conteúdo de proteínas, ácido urônico e glicosaminoglicanos sulfatados presentes nestas frações foram avaliados (**figura 03**). As regiões **Hp** e **Rp** apresentaram valores maiores de proteína, respectivamente 1,03 mg/ml e 1,25 mg/ml. A análise de variância estatística mostrou que as médias de concentração protéica obtidas para as frações D4 variam entre si ($p < 0,05$). As concentrações relativas de ácido urônico e glicosaminoglicanos sulfatados são significativamente menores que os valores obtidos para proteína nas frações D4, variando entre 0 e 0,10 mg/ml de extrato.

As frações D4 foram dialisadas e cromatografadas por troca iônica. As frações eluídas após o gradiente foram analisadas em SDS-PAGE (4-16%) para as diferentes regiões estudadas (**figura 04**).

Após o gradiente de NaCl pode ser observado um padrão de eluição semelhante para todas as regiões sob análise, com um pico de eluição entre as frações 13 e 20. O pico de eluição do material ligado à coluna ocorreu em torno de uma concentração de NaCl 0,2 M. O perfil eletroforético, em condições não redutoras, apresenta duas bandas com aproximadamente 160 e 200 kDa. Quando essas amostras foram tratadas com β -mercaptoetanol, a intensidade destas bandas diminuiu e uma banda com 57 kDa pode ser observada. O perfil

eletroforético da proteína com 57 kDa é semelhante ao pequeno proteoglicano fibromodulim. Esta molécula está praticamente distribuída em todas as frações do pico, porém sua eluição é mais pronunciada com a concentração salina a 0,2 M.

Uma banda polidispersa semelhante ao decorim, com Mr variando entre 70 e 90 kDa, foi observada em todas as regiões, especialmente quando as amostras foram tratadas com β -mercaptoetanol. Nas regiões Hp e Rp esta molécula apareceu menos evidente na ausência do agente redutor. A molécula foi eluída da coluna de troca iônica com um gradiente variando entre 0,3 e 0,4 M.

As frações ricas no componente com 57 kDa, obtidas após troca iônica, foram reunidas e utilizadas nas cromatografias de interação hidrofóbica (**figura 05A**). O mesmo procedimento foi feito com as frações ricas no componente com 70-90 kDa (**figura 06A**). Para esta cromatografia não foi possível obter leitura em 280 nm. Todas as regiões analisadas apresentaram o mesmo perfil eletroforético, aqui representado por uma das regiões analisadas.

Todas as regiões apresentaram uma molécula parcialmente purificada com padrão de migração eletroforética diferenciado dependendo das condições de tratamento das amostras. Na ausência de β -mercaptoetanol, ela migrou como uma banda de aproximadamente 200 kDa, enquanto que em condições redutoras esta banda migrou em 57 kDa. Após a transferência eletroforética para nitrocelulose e o uso de anticorpo anti-fibromodulim (**figura 5B**), foi observada uma reação positiva com esta molécula.

Os resultados obtidos da cromatografia de interação hidrofóbica, para obtenção de decorim, foram semelhantes entre as cartilagens estudadas. A **figura 6A** mostra que a molécula sob análise foi eluída da coluna simultaneamente com fibromodulim, que apresentou o mesmo perfil eletroforético (**figura 5A**). O decorim ficou mais evidente na presença de β -Mercaptoetanol. A análise por *immunoblotting* evidenciou uma reação positiva desta banda polidispersa usando o anticorpo anti-decorim (**figura 6B**).

DISCUSSÃO

Neste trabalho, somente as regiões de contato central em cada superfície articular foram usadas para os procedimentos de extração. As regiões periféricas de contato entre as cartilagens foram descartadas na preparação das amostras. As superfícies articulares utilizadas não apresentavam sinais de degradação ou lesões necróticas comuns em doenças degenerativas de cartilagem. Aves de abate podem ser afetadas por doenças degenerativas das juntas que, entre outras consequências, determinam alterações na distribuição de proteoglicanos na cartilagem articular (ANDERSON-MACKENZIE *et al.*, 1998).

A função fisiológica da cartilagem articular é resistir às forças de compressão e dissipar as forças de peso e movimento aplicadas à junta (CATERSON, 1991). A distribuição e integridade de sua matriz extracelular é fundamental para a manutenção das propriedades biomecânicas do tecido (LOHMANDER, 1988; HAGG *et al.*, 1998). Proteoglicanos presentes na matriz extracelular são componentes importantes para a fisiologia do tecido e sua expressão está associada com diferentes processos biológicos. A caracterização de proteoglicanos é feita em diferentes modelos, sugerindo uma variação complexa.

As dosagens de proteína, ácido urônico e glicosaminoglicanos sulfatados para o extrato total e para as frações D4 de cada cartilagem articular apresentaram algumas variações estatísticas significativas. Glicosaminoglicanos sulfatados estão mais concentrados no extrato total da região Hp comparado com as outras regiões de cartilagem. A concentração de proteína foi maior nas frações D4 das regiões Hp e Rp. As outras dosagens do extrato total e das frações D4 não apresentaram diferenças significativas para as cartilagens analisadas. As diferenças de concentração observadas entre as regiões podem ser decorrentes das forças que atuam de maneira diferenciada em cada região. NAKANO e SIM (1995) observaram variações na composição química entre a cartilagem articular e subcondral da tibia de frangos.

O estudo dos proteoglicanos de cartilagens de diferentes regiões anatômicas e de diferentes modelos, como epífise distal de fêmur bovino (BJELLE *et al.*, 1974), articulação metacarpo-falangiana de bovino (SWANN *et al.*, 1979), articulações de coelhos e cães (MANICOURT *et al.*, 1986), cartilagem xifóide e articular de frango (GOMES & PIMENTEL, 1994), tem mostrado semelhanças e diferenças na composição e distribuição de proteoglicanos, sugerindo uma variação complexa.

Nas diferentes regiões de cartilagem articular da asa de frango analisadas neste trabalho foi possível verificar que na ausência de β -mercaptoetanol ocorrem duas bandas entre 160 e 200 kDa que ficaram tênues em condições redutoras. Entretanto, na presença do agente redutor, uma banda com 57 kDa e padrão de migração semelhante ao fibromodulim ficou mais evidente. Esse resultado mostrou que pode estar ocorrendo uma possível interação desse pequeno PG com elementos da MEC, podendo ser neste caso cadeias de colágeno ou ainda auto-agregação de fibromodulim. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por GOMES e cols. (1996) em cartilagem do tibiotarso de frango, onde um complexo de 250 kDa migra como um componente de 59 kDa no SDS-PAGE sob condições redutoras. BIDANSET e cols. (1992) demonstraram que decorim, biglicam e FM podem se ligar ao colágeno tipo VI via esqueleto protéico, especialmente na sequência rica em leucina. Talvez uma interação de um tipo semelhante esteja acontecendo entre esses pequenos PG e elementos da matriz extracelular, uma vez que ROUGHLEY & WHITE (1989) demonstraram que só há migração independente entre os DS-PG e os agregantes na presença de SDS e 2-Me.

As possíveis interações entre pequenos proteoglicanos e moléculas de colágeno ou pequenos proteoglicanos entre si como resultado de auto-agregação, não dependeriam de pontes dissulfeto intercadeia. Porém, a manutenção das pontes dissulfeto no esqueleto protéico dos pequenos proteoglicanos seria importante para manter a conformação dos pequenos proteoglicanos favorecendo os processos de interação.

Esses proteoglicanos de baixo peso foram isolados inicialmente de cartilagem bovina por ROSENBERG e cols. (1985) e CHOI e cols. (1989). Esses autores comprovaram imunologicamente a individualidade de cada uma delas, bem como a presença de DS ligado covalentemente ao esqueleto protéico. Em joelho humano ROUGHLEY & WHITE (1989) isolaram e caracterizaram DS-PG em epífise proximal da tíbia e distal do fêmur.

Todas as regiões apresentaram uma molécula como uma banda polidispersa entre 70 a 90 kDa. Esta molécula parece estar menos concentrada na região **Rp**. A presença de β -mercaptoetanol não altera seu perfil eletroforético semelhante ao decorim.

Na tentativa de fazer a purificação parcial e caracterização das moléculas separadas por troca iônica, frações ricas em moléculas semelhantes ao fibromodulim e ao decorim foram reunidas e submetidas a cromatografia de interação hidrofóbica. Foi possível isolar a molécula de 57 kDa e mostrar pelo *immunoblotting* que era fibromodulim. A interação hidrofóbica foi ineficiente para a separar decorim de fibromodulim, mas o *immunoblotting* identificou a molécula de 70-90 kDa como decorim.

A presença não uniforme destes pequenos proteoglicanos nas diferentes cartilagens aqui estudadas pode estar relacionada com possíveis diferenças na distribuição de forças biomecânicas. Em cartilagem xifóide de frango, fibromodulim foi encontrado principalmente na região central da carina, podendo estar relacionado com a maior presença provavelmente maior de força de compressão que ocorre nesta região (GOMES & PIMENTEL, 1994). A presença em forma de agregado deste pequeno proteoglicano foi recentemente observada em cartilagem da tíbia e face patelar da cartilagem femural de boi (ESQUISATTO *et al.*, manuscrito em preparação).

A ação mecânica exercida sobre as articulações da asa durante o voo é menos compressiva, quando comparada à outras articulações, como a do joelho e quadril, onde a carga sobre as superfícies articulares é elevada. Estudos comparativos entre articulações análogas de humanos e aves foram realizados

por BARNET (1954), e revelam semelhanças e diferenças anatomo-fisiológicas, apesar do distanciamento filogenético.

Os dados obtidos neste trabalho trazem informações sobre a composição de cartilagens da asa de frango que poderão ser relacionadas no futuro com propriedades biomecânicas das articulações da asa. Além disso, nossos dados poderão auxiliar no estudo da cartilagem afetada por diferentes desordens degenerativas das articulações e ossos, relacionados com problemas no desenvolvimento do sistema esquelético (ANDERSON-MACKENZIE *et al.*, 1998). O estudo da formação e composição das cartilagens é importante para a elucidação dos mecanismos de desenvolvimento esquelético e das doenças relacionadas à articulações (NAKANO & SIM, 1995; WATANABE *et al.*, 1998). A prevenção e o controle destas desordens na criação de aves depende do avanço no conhecimento da biologia das desordens esqueléticas e nos mecanismos fisiológicos que governam o crescimento esquelético normal (THORP, 1994).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON-MACKENZIE, J.M., HULMES, D.J., AND THORP, B.H. (1998) effects of body mass and genotype on avian degenerative joint disease pathology and articular cartilage proteoglycan distribution *Clin. Exp. Rheumatol.* **16**(4):403-8.
- AYDELOTE, M.B., SCHUMACHER, B.L., AND KUTTNER, H.E. (1992) Heterogeneity of articular chondrocytes in Articular cartilage and osteoarthritis (Kuettner, K.E., Schleyerbach, R., Peyron, J.G., Hascall, V.C., eds.) pp.237-250 Raven Press New York.
- BARNET, C.H. (1954) A comparison of the human knee and avian ankle *J. Anat.* **88**:59-70.
- BEIGUELMAN B. Curso prático de bioestatística, 2ª Ed. Sociedade Brasileira de Genética, 231p.
- BIDANSET, D.J., GUIDRY, C., ROSEMBERG, L.C., CHOI, H.U., TIMPL, R., AND HOOK, M. (1992) Binding of the proteoglycan decorin to collagen type II. *J. Biol. Chem.* **267**: 5250-5256.
- BJELLE A., GARDELL S., AND HEINEGÅRD D. (1974) Proteoglycans of articular cartilage from bovine lower femoral epiphysis. Extraction and characterization of proteoglycans from two sites within the same joint. *Conn. Tiss. Res.* **2**:111-116.
- BLUM, B., BEIER, H., AND GROSS, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels *Electrophoresis* **8**:93-99.
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- BROWN, A.H. (1946) Determination of pentose in the presence of large quantities of glucose. *Arch. Biochem.* **11**:269-278.
- BUCKWALTER, J.A., AND MANKIN, H.J. (1997) Articular cartilage *J. Bone and Joint Surgery* **79-A**(4):600-11.

- BULLOUGH, P.G., YAWITZ, P.S., TAFA, L., AND BOSHEY, A.L. (1985) Topographical variations in the morphology and biochemistry of adult canine tibial plateau articular cartilage *J. Orthop. Res.* **3**:1-16.
- CATERSON, B. (1991) Immunological aspects of markers of joint disease. *J. Rheum.* **18** (27): 19-23.
- CHANDRASEKHAR, S., LAURIE, G.W., CANNON, F.B., MARTIN, G.R., AND KLEINMAN, H.K. (1986) *In vitro* regulation of cartilage matrix assembly by a Mr 54,000 collagen-binding protein *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:5126-30.
- CHOI H.U., JOHNSON T.L., PAL S., TANG L.H., ROSENBERG L., AND NEAME J.P. (1989) Characterization of the dermatan sulfate proteoglycans, DS-PG I and DS-PG II, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-sepharose chromatography. *J. Biol. Chem.* **264**(5):2876-84.
- COSTER, L., AND FRANSSON, L.A. (1981) isolation And characterization of dermatan sulfate proteoglycans from bovine sclera *Biochem. J.* **193**(1):143-53.
- COTTA, H., AND PUHL, W. (1978) The pathophysiology of damage of articular cartilage in *The Knee* (Hastings, D.E., ed.) pp. 15-31, Springer, Berlin.
- DANIELSON K.G., BARIBAULT H., HOLMES D.F., GRAHAN H., KADLER K.E., AND IOZZO R.V. (1997) Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J. Cell Biol.* **136**: 729-43.
- EYRE, D.R. (1991) The collagens of articular cartilage *Sem. Arthr. Rheumat.* **21**(3):2-11.
- FARNDAL, R.W.; BUTTLE, P.J. AND BARRET, A.J. (1986) Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *BBA* **883**: 173-177.
- FISCHER, L.W.; HAWKINS, G.R.; TUROSS, N. AND TERNINE, J.D. (1987) Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral component of developing human bone. *J. Biol. Chem.* **262**: 702-708.
- FLEISCHMAJER, R., FISHER, L.W., MACDONALD, E.D. (1991) Decorin interacts with fibrillar collagen of embryonic and adult human skin *J. Struct. Biol.* **106**(1):82-90.

- FRANSSON, L.A., AND MALSMSTRON, A. (1971) Structure of pig skin dermatan sulfate .1. Distribution of D-glucuronic acid residues *Eur. J. Biochem.* **18**(3):422-30.
- GOMES, L. AND PIMENTEL, E.R. (1994) Detection of a small proteoglycan present in xiphoid cartilage regions submitted to different biochemical forces. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**: 2117-2124.
- GOMES, L.; ESQUISATTO, M.A.M.; BELLINE, P. AND PIMENTEL, E.R. (1996) Is there a relationship between the state of aggregation of small proteoglycans and the biomechanical properties of tissues? *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**:1243-1246.
- HAGG R., BRUCKNER P., AND HEDBOM E. (1998) Cartilage fibrils of mammals are biochemically heterogeneous: differential distribution of decorin and collagen IX. *The J. Cell Biol.* **142**(1):285-94.
- HASCALL, V.C., AND SADJERA, S.W. (1969) Protein-polysaccharide complex from bovine nasal cartilage: the function of glycoprotein in the formation of aggregates. *J. Biol. Chem.* **244**: 2384-2396.
- HEDBOM, E., AND HEINEGÅRD, D. (1989) Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix proteins with collagen type I and II *J. Biol. Chem.* **264**: 6898-905.
- HEDBOM, E., AND HEINEGÅRD, D. (1993) Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar colagens *J. Biol. Chem.* **268**: 27307-12.
- HEDLUND, H., MENGARELLI-WIDHOLM, S., HEINEGÅRD, D., REINHOLT, F.P., AND SVENSSON, O. (1994) Fibromodulin distribution and association with collagen *Matrix Biology* **14**: 227-32.
- HEINEGÅRD, D., AND OLDEBERG, A. (1989) Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* **3**(9): 2042-2051.
- HEINEGÅRD, D., AND SOMMARIN, Y. (1987) Isolation and characterization of proteoglycan in *Methods in Enzymology*, **144**, part D. Structural and contractile proteins. Cap. 16 pp. 319-72.
- HILDEBRAND, A., ROMARIN, M., RASMUSSEN, L.M., HEINEGÅRD, D., TWARDZIK, D.R., BORDER, W.A., AND RUOSLATI, E. (1994) Interaction

- of the small interstitial proteoglycan byglycan, decorin, and fibromodulin with transforming growth factor β *Biochem. J.* **302**:527-34.
- HOCKING A.M., SHINOMURA T., AND MCQUILLAN D.J. (1998) Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biology* **17**:1-19.
- IOZZO R.V. (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:609-52.
- IOZZO R.V., AND MURDOCK A.D. (1996) Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.* **10**:598-614.
- LOHMANDER, S. (1988) Proteoglycans of joint cartilage: structure, function turnover and role as markers of joint disease. *Baillière's Clinical Rheumatol.* **2**(1):37-62.
- MANICOURT D.H., PITA J.C., PEZON C., AND HOWELL D.S. (1986) Characterization of the proteoglycan recovered under nondissociative conditions from normal articular cartilage of rabbits and dogs. *J. Biol. Chem.* **261**:5426-5433.
- MANN D.M., YAMAGUCHI Y., BOURDON M.A., AND RUOSLAHTI E. (1990) Analysis of glycosaminoglycan substitution in decorin by site directed mutagenesis *J. Biol. Chem.* **265**: 5317-5323.
- MOW V.C., RATCLIFFE A., AND POOLE A.R. (1992) Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* **13**(2):67-97.
- NAKANO, T., AND SIM, J.S. (1995) A study of the chemical composition of the proximal tibial articular cartilage and growth plate of broiler chickens *Poult. Sci.* **74**(3):538-50.
- OLDBERG A., ANTONSSON P., LINDBLOM K., AND HEINEGARD D. (1989) A collagen-binding 59-kD protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *EMBO J.* **8**(9):2601-2604.
- PETTINGILL JR, O.S. (1970) Ornithology in laboratory and field Burgess Publ. Co. Minneapolis.

- RATH, N.C., BALOG, J.M., HUFF, G.R., KULKARNI, G.B., AND TIERCE, J.F. (1999) Comparative differences in the composition and biochemical properties of tibiae of seven- and seventy-two-week-old male and female broiler breeder chickens *Poult. Sci.* **78**(8): 1232-1239.
- ROSEMBERG, L.C., CHOI, H.U., TANG, L.H., JOHNSON, T.L., AND PAL, S. (1985) Isolation of dermatan sulphate proteoglycans from mature bovine articular cartilage. *J. Biol. Chem.* **260**: 6304-6313.
- ROUGHLEY, P.J., AND WHITE, R.J. (1989) Dermatan sulphate proteoglycans of human articular cartilage. The properties of dermatan sulphate proteoglycan I and II. *Biochem. J.* **262**: 823-827.
- SCOTT, J.E., AND ORFORD, C.R. (1981) Dermatan sulfate-rich proteoglycan associates with rat tail tendon collagen at the D-band in the gap region *Biochem. J.* **197**(1):213-24.
- SIMON, W.H. (1970) Scale effects in animal joints. I. Articular cartilage thickness and compressive stress *Arth. Rheumat.* **13**:244-55.
- SKERRY, T.M.; SUSWILLO, R.; EL HAJ, A.J.; ALI, N.N.; DODDS, R.A., AND LANYON, L.E. (1990) Load-induced proteoglycan orientation in bone tissue in vivo and in vitro. *Calcif. Tissue Int.* **46**: 318-326.
- SPENCE, A.P. (1991) Articulações in *Anatomia Humana Básica* (Spence, A.P., ed.) pp. 157-183 Ed. Manole LTDA São Paulo.
- SWANN D.A., POWELL S., AND SOTMAN S. (1979) The heterogeneity of cartilage proteoglycans. Isolation of different types of proteoglycans from bovine articular cartilage. *J. Biol. Chem.* **254**:945-954.
- THORP, B.H. (1994) Skeletal disorders in the fowl: a review. *Avian Pathology* **23**, 203-236.
- TOWBIN, T., AND GORDON, S. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- VIDAL, B.C., AND VILARTA, R. (1988) Articular cartilage: collagen II-proteoglycans interactions. Availability of reactive groups. Variation in

- birrefringence and differences as compared to collagen I. *Acta Histochem.* **83**: 189-205.
- VIDAL, B.D., AND MELLO, M.L.S. (1984) Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles *Cell. Mol. Biol.* **30**(3):195-204.
- VOGEL, K.G., PAULSSON, M., AND HEINEGÅRD, D. (1984) Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon *Biochemistry J.* **223**: 587-97.
- WATANABE, H., YAMADA, Y., AND KIMATA, K. (1998) Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J.Biochem.* **124**, 687-693.
- WEBER I.T., HARRISON R.W., AND IOZZO R.V. (1996) Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis *J. Biol. Chem.* **271**:31767-70.
- YAMAGUCHI N., MANN D.M., AND RUOSLAHTI E. (1990) Negative regulation of transforming growth factor beta by the proteoglycan decorin. *Nature* **336**:281-284.
- ZINGALES, B. (1984) Analysis of protein sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Genes and antigens of parasites*. (Ed. Morel, C.M.) Fiocruz Rio de Janeiro, 357-363.

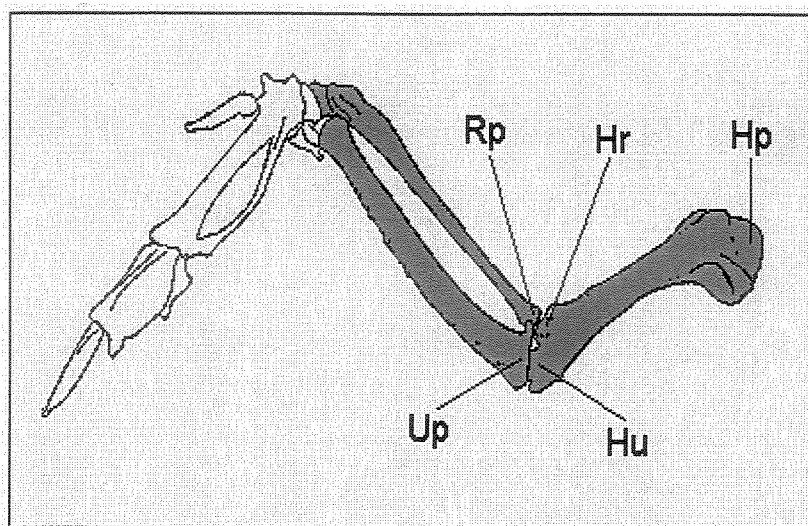


Figura 01. Desenho esquemático das regiões anatômicas da asa de frango. Estão indicadas nesta figura as regiões de cartilagem articular do úmero proximal (**Hp**), úmero distal em contato com o rádio (**Hr**), úmero distal em contato com a ulna (**Hu**), ulna proximal (**Up**) e rádio proximal (**Rp**) (Adaptado de PETTINGILL Jr., 1970).

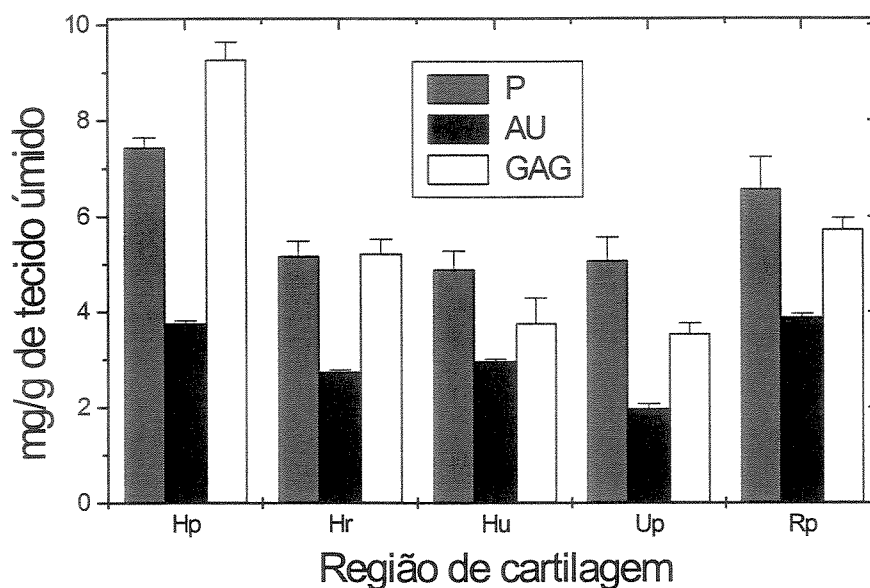


Figura 02. Dosagem de proteína (P), ácido urônico (AU) e glicosaminoglicanos (GAG) sulfatados dos extratos totais para cada região articular analisada. As médias estão apresentadas como mg/g de tecido. Diferenças significativas foram encontradas entre as médias quando avaliadas por análise de variância com distribuição de Fischer com 5% de significância. As amostras estão apresentadas como **Hp** - úmero proximal, **Hr** - úmero distal em contato com o rádio, **Hu** - úmero distal em contato com a ulna, **Up** - ulna proximal e **Rp** - rádio proximal.

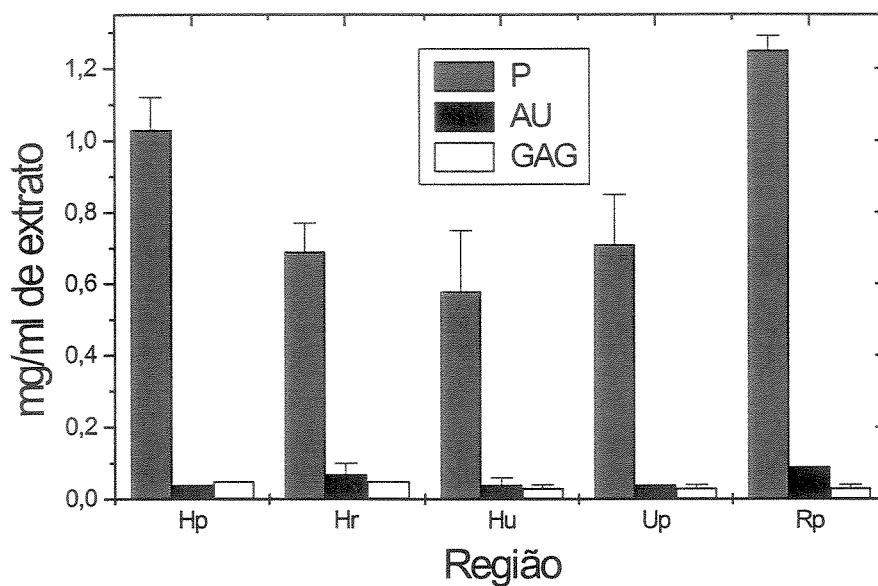


Figura 03. Dosagem de proteína (P), ácido urônico (AU) e glicosaminoglicanos (GAG) sulfatados das frações D4 obtidas após ultracentrifugação em cloreto de cério para cada região articular analisada. As médias estão apresentadas como mg/ml de amostra. Diferenças significativas foram encontradas entre as médias quando avaliadas por análise de variância com distribuição de Fischer com 5% de significância. As amostras estão apresentadas como **Hp** - úmero proximal, **Hr** - úmero distal em contato com o rádio, **Hu** - úmero distal em contato com a ulna, **Up** - ulna proximal e **Rp** - rádio proximal.

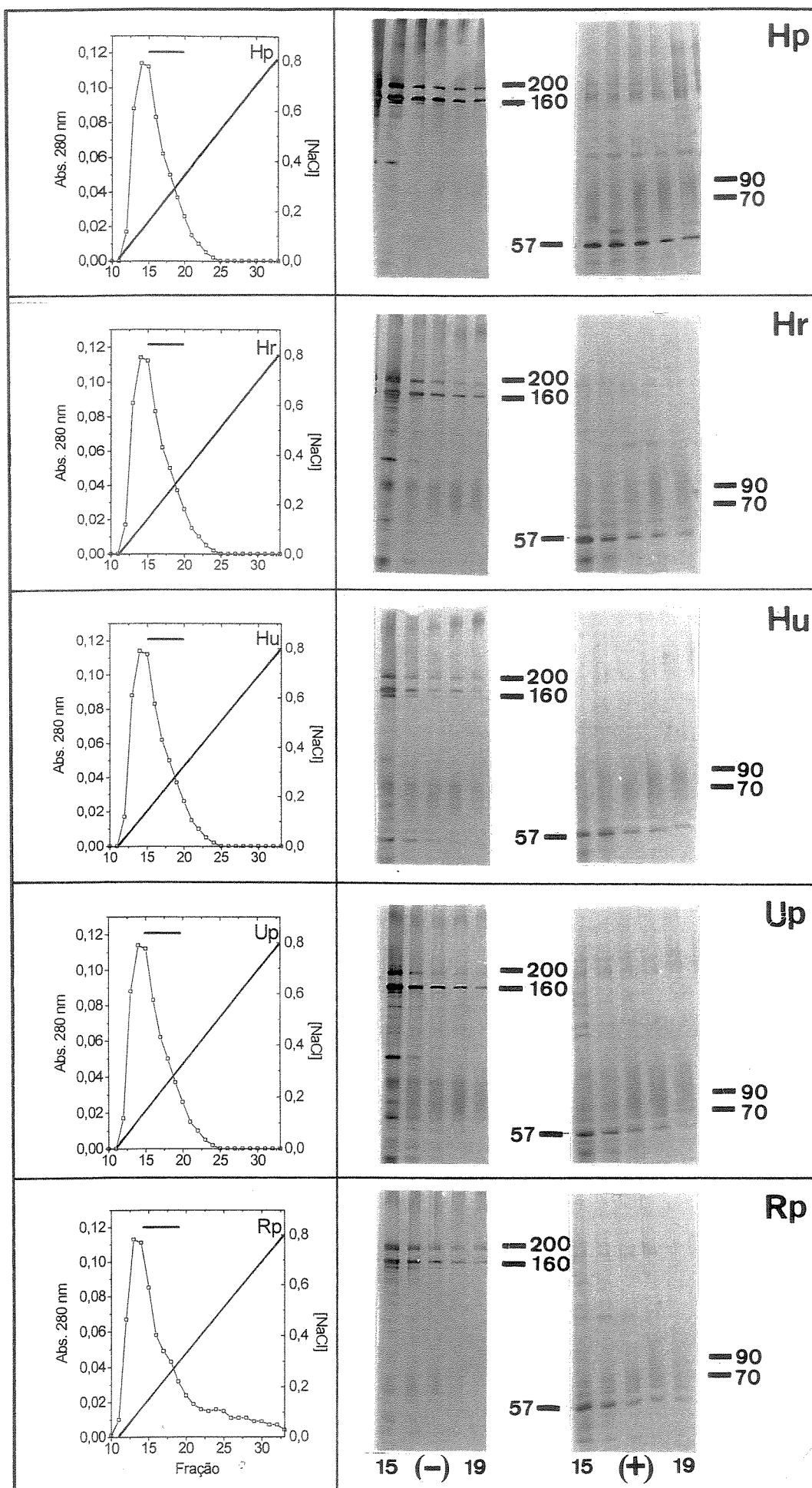


Figura 04. As frações D4 de cada região estudada foram cromatografadas em DEAE-Sephacel e eluídas com um gradiente de concentração de NaCl de 0 a 1,0 M. As frações 15 a 19 eluídas das cromatografias foram analisadas em SDS-PAGE. Bandas com 160 e 200 kDa e uma banda polidispersa com 70-90 kDa podem ser observadas em condições não redutoras (-). Uma banda com 57 kDa surge quando as amostras são tratadas com β -mercaptoetanol (+).

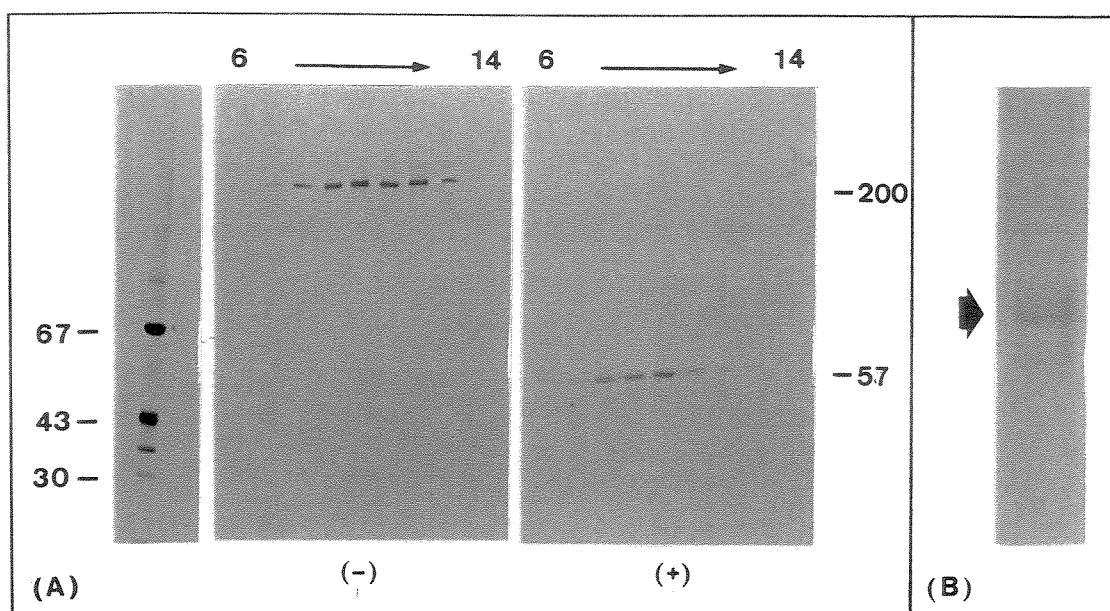


Figura 05. SDS-PAGE do material fracionado em cromatografia de interação hidrofóbica (octyl-sheparose) e *immunoblotting* para caracterização de pequeno proteoglicano da matriz extracelular da cartilagem da asa de frango, região Hu/D4. (A) SDS-PAGE das frações ricas em pequeno proteoglicano de 57 kDa, na ausência (-) e presença (+) de β -mercaptoetanol. (B) O *immunoblotting* do material fracionado em condições redutoras indica que esse pequeno proteoglicano de 57 kDa é o fibromodulim, através da reação positiva com o anticorpo anti-fibromodulim.

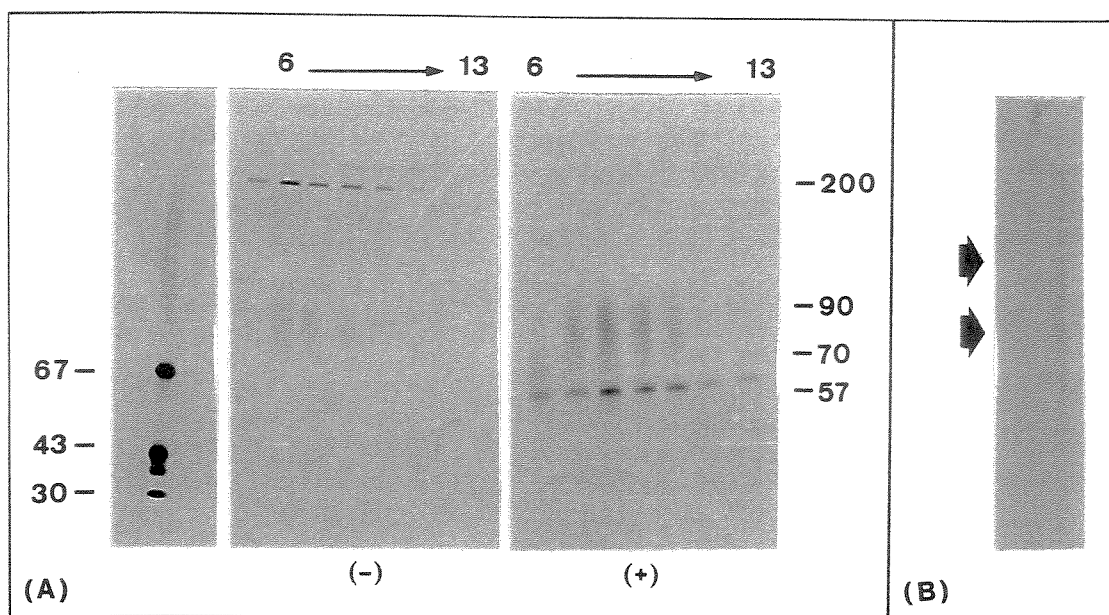


Figura 06. SDS-PAGE do material fracionado em cromatografia de interação hidrofóbica (octyl-sheparose) e *immunoblotting* para caracterização de pequeno proteoglicano da matriz extracelular da cartilagem da asa de frango, região Hu/D4. (A) SDS-PAGE das frações ricas em pequeno proteoglicano de 70 a 90 kDa, na ausência (-) e presença (+) de β -mercaptoetanol. (B) O *immunoblotting* do material fracionado em condições redutoras indica que esse pequeno proteoglicano de 70 a 90 kDa é o decorim, através da reação positiva com o anticorpo anti-decorim.

CONCLUSÕES

- Condroitim sulfato é o principal glicosaminoglicano presente na cartilagem articular das aves empregadas neste estudo. A mobilidade eletroforética retardada pode indicar um padrão de sulfatação diferente do condroitim sulfato extraído de mamíferos.
- O tratamento com as condroitinases e HPLC mostraram a predominância do dissacarídeo α -L-glicurônico-1 \rightarrow 3-N-acetil- β -galactosamina 4-O-sulfatado, oriundo da digestão do condroitim sulfato.
- Dissacarídeos obtidos de condroitim 6-sulfato e condroitim não-sulfatado estão em menor proporção e somente traços de dissacarídeos bi- e tri-sulfatados são encontrados. Dermatom sulfato está presente em pequena concentração.
- A região Rp mostrou o menor valor para a razão Δ Di-4S/ Δ Di-6S (2,51) enquanto as outras regiões apresentaram uma razão em torno de 3,00.
- Foram observadas variações significativas nas dosagens de proteína, ácido urônico e glicosaminoglicano sulfatados do tecido seco, úmido e das frações D4 para as regiões de cartilagem estudadas, especialmente Rp.
- Fibromodulim e decorim estão presentes nas cartilagens estudadas.
- Fibromodulim isolado da cartilagem articular de frango apresenta um estado de agregação dependente de ponte dissulfídica que foi revelado pelo uso de agente redutor.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON-MACKENZIE, J.M., HULMES, D.J., AND THORP, B.H. (1998) Effects of body mass and genotype on avian degenerative joint disease pathology and articular cartilage proteoglycan distribution *Clin. Exp. Rheumatol.* **16**(4):403-8.
- BIANCO P., FISCHER L.W., YOUNG M.F., TERMINE J.D., AND ROBEY P.G. (1990) Expression and localization of the two small proteoglycan biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissue. *J. Histochem Cytochem.* **38**: 1549-63.
- BIDANSET, D.J., GUIDRY, C., ROSEMBERG, L.C., CHOI, H.U., TIMPL, R., AND HOOK, M. (1992) Binding of the proteoglycan decorin to collagen type II. *J. Biol. Chem.* **267**: 5250-5256.
- BJELLE A., GARDELL S., AND HEINEGÅRD D. (1974) Proteoglycans of articular cartilage from bovine lower femoral epiphysis. Extraction and characterization of proteoglycans from two sites within the same joint. *Conn. Tiss. Res.* **2**:111-116.
- BLASCHKE, U.K., HEDBOM, E., AND BRUCKNER, P. (1996) Distinct isoforms of chicken decorin contain either one or two dermatan sulfate chains *J. Biol. Chem.* **271**(48):30347-53.
- BOLTON, M.C., DUDHIA, J., AND BAYLISS, M.T. (1999) Age-related changes in the synthesis of link protein and aggrecan in human articular cartilage: implications for aggregate stability *Biochem. J.* **337**:77-82.
- BROOM, N.D., AND SILYN-ROBERTS, H. (1990) Collagen-collagen versus collagen-proteoglycans interactions in the determination of cartilage strength *Arthr. Rheumat.* **33**(10):1512-17.
- BUCKWALTER, J.A., AND MANKIN, H.J. (1997) Articular cartilage *J. Bone and Joint Surgery* **79-A**(4):600-11.
- BUCKWALTER, J.A., PITA, J.C., MULLER, F.J., AND NESSLER, J. (1994) Structural differences between two populations of articular cartilage proteoglycan aggregates *J. Orthopaedic Res.* **12**:144-48.

- BUSCHMANN, M.D., KIM, Y., WONG, M., FRANK, E., HUNZIKER, E.B., AND GRODZINSKY, A.J. (1999) Stimulation of aggrecan synthesis in cartilage explants by cyclic loading is localized to region of high interstitial fluid flow *Arch. Biochem. Biophys.* **366**(1):1-7.
- CARVALHO, H.F., FELISBINO, S.L., COVIZI, D.Z., DELLA COLLETA, H.H.M., AND GOMES, L. (2000) Structure and proteoglycan composition of specialized regions of the elastic tendon of the chicken wing *Cell and Tissue Res.* **300**:435-446.
- CHAI, W., LAWSON, A.M., GRADWELL, M.J., AND KOGELBERG, H. (1998) Structural characterization of two hexasaccharides and na octasaccharide from chondroitin sulphate C containing the unusual sequence (4-sulpho)-N-acetylgalactosamine- β 1-4-(2-sulpho)-glucuronic acid- β 1-3-(6-sulpho)-N-acetylgalactosamine *Eur. J. Biochem.* **251**, 114-21.
- CHANDRASEKHAR, S., LAURIE, G.W., CANNON, F.B., MARTIN, G.R., AND KLEINMAN, H.K. (1986) *In vitro* regulation of cartilage matrix assembly by a Mr 54,000 collagen-binding protein *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:5126-30.
- CHIQUET, M., MATHISSON, M., KOCK, M., TANHEIMMER, M., AND CHIQUET-EHRISMANN, R. (1996) Regulation of extracellular matrix synthesis by mechanical stress *Biochem. Cell Biol.* **74**:737-44.
- CHOI H.U., JOHNSON T.L., PAL S., TANG L.H., ROSENBERG L., AND NEAME J.P. (1989) Characterization of the dermatan sulfate proteoglycans, DS-PG I and DS-PG II, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-sepharose chromatografy. *J. Biol. Chem.* **264**(5):2876-2884.
- COLEMAN, P., KAVANAGH, E., MASON, R.M., LEVICK, J.R., AND ASHHURST, D.E. (1998) The proteoglycans and glycosaminoglycan chains of rabbit synovium *Histochem. J.* **30**:519-24.
- CS-SZABÓ, G., ROUGHLEY, P.J., PLAAS, A.H.K., AND GLANT, T.T. (1995) Large and small proteoglycans of osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage *Arthr. and Rheumat.* **4**(5):660-8.
- DANIELSON K.G., BARIBAULT H., HOLMES D.F., GRAHAN H., KADLER K.E., AND IOZZO R.V. (1997) Targeted disruption of decorin leads to abnormal

- collagen fibrill morphology and skin fragility. *J. Cell Biol.* **136**: 729-43.
- DEL SANTO JR, M., MARCHES, F., NG, M., AND HINTON, R.J. (2000) Age-associated changes in decorin in rat mandibular condylar cartilage *Arch. Oral Biol.* **45**:485-93.
- DEUTSCH, A.J., MIDURA, R.J., AND PLAAS, A.H.K. (1995) Structure of chondroitin sulfate on aggrecan isolated from bovine tibial and costochondral growth plates *J. Orthop. Res.* **13**:230-39.
- ESQUISATTO M.A.M. (1996) Estudo da composição da Matriz extracelular de cinco regiões da cartilagem articular do joelho bovino. Tese, UNICAMP, Campinas, BR.
- EZURA, Y., CHAKRAVARTI, S., OLDBERG, A., CHERNONEVA, I., AND BIRK, D.E. (2000) Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons *J. Cell Biol.* **151**(4):779-87.
- FISCHER, L.W.; HAWKINS, G.R.; TUROSS, N. AND TERNINE, J.D. (1987) Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral component of developing human bone. *J. Biol. Chem.* **262**: 702-708.
- FLEISCHMAJER, R., FISHER, L.W., MACDONALD, E.D. (1991) Decorin interacts with fibrillar collagen of embryonic and adult human skin *J. Struct. Biol.* **106**(1):82-90.
- FONT, B., EICHENBERGER, D., GOLDSCHIMIDT, D., BOUTILLON, M.M., AND HULMES, D.J.S. (1998) Structural requirements for fibromodulin binding to collagen and the control of type I collagen fibrillogenesis *Eur. J. Biochem.* **254**:580-87.
- FRANZÉN A., BJORNSSON S., AND HEINEGÅRD D. (1981a) Cartilage proteoglycan aggregate formation. Role of link protein. *Biochem. J.* **197**(3):669-674.
- FRANZÉN A., INEROT, S., HYDERUP, S.O., AND HEINEGARD, D. (1981b) Variations in the composition of bovine hip articular cartilage with distance from the articular surface *Biochem. J* **195**: 535-43.

- GOMES, L. AND PIMENTEL, E.R. (1994) Detection of a small proteoglycan present in xiphoid cartilage regions submitted to different biochemical forces. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**: 2117-2124.
- GOMES, L.; ESQUISATTO, M.A.M.; BELLINE, P. AND PIMENTEL, E.R. (1996) Is there a relationship between the state of aggregation of small proteoglycans and the biomechanical properties of tissues? *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**:1243-1246.
- GRODZINSKY, A.J., FRANK, E.H., KIM, Y.J., BUSCHMANN, M.D. (1996) The role of specific macromolecules in cell-matrix interactions and in matrix function: Physiochemical and mechanical mediators of chondrocytes biosynthesis in *Extracellular Matrix: Molecular components and interactions* (Comper, W.D., ed.) pp. 310-34 Harwood Acad. Publ., Amsterdam.
- HAGG R., BRUCKNER P., AND HEDBOM E. (1998) Cartilage fibrils of mammals are biochemically heterogeneous: differential distribution of decorrin and collagen IX. *The J. Cell Biol.* **142**(1):285-94.
- HÄKKINEN, L., WESTERMARCK, J., KÄHÄRI, V.-M., AND LARJAVA, H. (1996) Human granulation-tissue fibroblasts show enhanced proteoglycan gene expression and altered response to TGF- β 1 *J. Dent. Res.* **75**(10):1767-78.
- HANDLEY, C.J.; LOWTHER, D.A., AND McQUILLAN, D.J. (1985) The structure and synthesis of proteoglycans of articular cartilage. *Cell Biol. Int. Rep.* **9**: 753-782.
- HARAB, R.C. AND MOURÃO, P.A.S. (1989) Increase of chondroitin 4-sulfate concentration in the endochondral ossification cartilage of normal dogs. *BBA*, **992**:237-240.
- HARDINGHAM, T. E., AND FOSANG, A.J. (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. *Faseb J.* **6** (3): 861-870.
- HARDINGHAM, T. E., AND MUIR, H. (1972) The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. *Biochem. Biophys.* **279**: 401-405.
- HARDINGHAM, T. E., AND MUIR, H. (1974) Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation. *Biochem. J.* **139**: 565-581.
- HASCALL, V.C. (1981) Proteoglycans: Structure and function in *Biology of*

- Carbohydrates* (Ginsburg, V., and Robins, P., eds.) 1 pp. 1-49, Willey, New York.
- HEDBOM, E., AND HEINEGÅRD, D. (1989) Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix proteins with collagen type I and II *J. Biol. Chem.* **264**: 6898-905.
- HEDBOM, E., AND HEINEGÅRD, D. (1993) Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens *J. Biol. Chem.* **268**: 27307-12.
- HEDLUND, H., MENGARELLI-WIDHOLM, S., HEINEGÅRD, D., REINHOLT, F.P., AND SVENSSON, O. (1994) Fibromodulin distribution and association with collagen *Matrix Biology* **14**:227-32.
- HEINEGÅRD, D., AND SOMMARIN, Y. (1987a) Isolation and characterization of proteoglycan *Methods in Enzymology* **144**:319-72.
- HEINEGÅRD, D., AND SOMMARIN, Y. (1987b) Proteoglycans: an overview *Methods in Enzymology* **144**:305-19.
- HEINEGÅRD, D., BJÖRNE-PERSSON, A., COSTER, L., FRANZÉN, A., GARDELL, S., MALMSTRÖN, A., PAULSSON, N., SANDFALK, R., AND VOGEL, K. (1985) The core protein of large and small proteoglycan from various connective tissues from distinct subgroups *Biochem. J.* **230**:181-94.
- HEISE N., AND TOLEDO O.M.S. (1993) Age-related changes in glycosaminoglycans distribution in different anatomical sites on the surface of knee-joint articular cartilage in young rabbits. *Ann. Anat.* **175**:35-40.
- HILDEBRAND, A., ROMARIS, M., RASMUSSEN, L.M., HEINEGÅRD, D., TWARDZIK, D.R., BORDER, W.A., AND RUOSLATTI, E. (1994) Interaction of the small interstitial proteoglycan biglycan, decorin, and fibromodulin with transforming growth factor β *Biochem. J.* **302**:527-34.
- HOCKING A.M., SHINOMURA T., AND MCQUILLAN D.J. (1998) Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biology* **17**:1-19.
- HUTTENLOCHER, A., WERB, Z., TREMBLE, P., HUHTALA, P., ROSEMBERG, L., AND DANSKY, C.H. (1996) Decorin regulates collagenase gene expression in fibroblasts adhering to vitronectin *Matrix Biology* **15**:239-50.
- IOZZO R.V. (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:609-52.

- IOZZO R.V., AND MURDOCK A.D. (1996) Proteoglycans of the extracellular environment clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.* **10**:598-614.
- ITAY, S.; ABRAMOVICI, A., AND NEVO, Z. (1987) Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage. *Clin. Orthop. Rel. Res.* **220**: 284-303.
- JUNGHANS U., KOOPS A., WESTMEYER A., KAPLLER J., MEYER H.E., AND MULLER H.W. (1995) Purification of a meningeal cell-derived chondroitin sulfate proteoglycan with neurotrophic activity for brain neurons and its identification as biglycan. *Eur. J. Neurosci.* **7**: 2341-50.
- KIKUCHI A., IWAKAMI N., TAKAHASHI K., SUZUKI J., KONDO J., YAMADA E., NONAKA I., AND KAMO I. (1995) Immunological and biochemical characterization of biglycan-like haemopoietic factor. *Immunology* **85**:131-39.
- KIVIRANTA I., JURVELIN J., TAMMI M., SAAMANEM AM., AND HELMINEN HI. (1987) Weight bearing controls glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young beagle dogs. *Arthritis Rheum.* **30**(7): 801-809.
- KIVIRANTA I., SAAMANEM AM., JURVELIN JS., AROKOSKI J., OETTMEIER R., ABENDROTH K., ROTH AJ., AND TAMMI MI. (1992) Effect of motion and load on articular cartilage in animal models in *Articular cartilage and osteoarthritis* (Kuettnner, K., Schleyerbach R., Peyron J.G., and Hascall V.C., eds.) pp. 501-510, Raven Press, New York.
- KOCK, T. (1973) Locomotion system in *Anatomy of the chicken and domestic birds* (Skold, B.H., and DeVries, L., eds.) pp. 6-65 The Iowa State Univ. Press, Iowa.
- KOOPS A., KAPPLER J., JUNGHANS U., KUHN G., KRESSE H., AND MÜLLER H.W. (1996) Cultured astrocytes express biglycan, a chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan supporting the survival of neocortical neurons. *Mol. Brain Res.* **41**:65-73.
- LAUDER, R.M., HUCKERBY, T.N., AND NIEDUSZINSKY, I.A. (1994) Structure of keratan sulfate chains attached to fibromodulin isolated from bovine tracheal cartilage *Biochem. J.* **264**(12):6898-905.

- LIU, S.H., YANG, R.S., AL-SHAikh, R., AND LANE, J.M. (1995) Collagen in tendon, ligament and bone healing *Clin. Orthop. Res.* **318**:265-78.
- LOHMANDER, L.S., AND KIMURA, J.H.(1986) Biosynthesis of cartilage proteoglycan in *Articular Cartilage Biochemistry* (Kettner, K., ed.) pp. 93-111 Raven Press, New York.
- LOTZ, J.C., COLLIU, O.K., CHIN, J.R., DUNCAN, N.A., LIEBENBERG, E. (1998) Compression-induced degeneration of the intervertebral disc: an in vivo mouse model and finite-element study *Spine* **23**(23):2493-506.
- MANKIN H.J., AND LIPPIELO L. (1971) The glycosaminoglycans of normal and arthritic cartilage. *The J. Clin. Investigation* **50**:1712-1719.
- MAYNE, R., AND BREWTON, R.G. (1993) New members of the collagen superfamily. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**: 883-890.
- MCMASTER, J.H., AND WEINERT JR, C.R. (1970) Effects of mechanical forces on growing cartilage *Clin. Orthopaedics Rel. Res.* **72**:308-14.
- MENDLER M., EICH-BENDER S.G., VAUGHAN L, WINTERHALTER K.H., AND BRUCKNER P. (1989) Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J. Cell Biol.* **108**:191-197.
- MICHELACCI, Y.M., AND HORTON, D.S.P.O. (1989) Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. *Comp. Biochem. Physiol.* **92 B** (4): 651-658.
- MICHELACCI, Y.M., MOURÃO, P.A.S., LAREDO, J., AND DIETRICH, C.P. (1979) Chondroitin sulfates and proteoglycans from normal and arthrosic human cartilage *Connect. Tissue Res.* **7**, 29-36.
- MÖRGELIN, M., HEINEGÅRD, D., ENGEL, J., AND PAULSSON, M. (1994) The cartilage proteoglycan aggregate: assembly through combined protein-carbohydrate and protein-protein interactions *Biophysical Chemistry* **50**:113-28.
- MOURÃO, P.A.S. (1988) Distribution of chondroitin 4-sulfate and chondroitin 6-sulfate in human articular and growth cartilage *Arthritis Rheum.* **31**, 1028-1033.
- MOURÃO, P.A.S., ROZENFELD, S., LAREDO, J., AND DIETRICH, C.P. (1976) The distribution of chondroitin sulfates in articular and growth cartilages of

- human bones. *Biochim. Biophys. Acta*, **428**, 19-26.
- MOW V.C., RATCLIFFE A., AND POOLE A.R. (1992) Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* **13**(2):67-97.
- MURPHY, J.M., HEINEGÅRD, D., MCINTOSH, A., STERCHI, D., AND BARRY, F.P. (1999) Distribution of cartilage molecules in the developing mouse joint *Matrix Biology* **18**:487-97.
- NORO, A., KIMATA, K., OIKE, Y., SHINOMURA, T., MAEDA, N., YANO, S., TAKAHASHI, N., AND SUZUKI, S. (1983) Isolation and characterization of a third proteoglycan (PG-Lt) from chick embryo cartilage which contains disulfide-bonded collagenous polypeptide *J. Biol. Chem.* **258**(15):9323-31.
- NOYORI, K., AND JASIN, H.E. (1994) Inhibition of human fibroblast adhesion by cartilage surface proteoglycans *Arthr. Rheumat.* **37**(11):1656-63.
- OLDBERG A., ANTONSSON P., LINDBLOM K., AND HEINEGARD D. (1989) A collagen-binding 59-kD protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *EMBO J.* **8**(9):2601-2604.
- OLSEN E.B., TRIER K., AND MOLLER H. (1989) Glycosaminoglycan in patellar cartilage. *Acta Orthop. Scand.* **60**(1):23-25.
- OSTENDORF, R.H., DE KONING, M.H.M.T., VAN DE STADT, R.J., AND JOS VAN KAMPEN, G.P. (1995) Irreversible changes in glycosaminoglycan composition of anatomically intact bovine articular cartilage induced by intermittent loading *Conn. Tissue Res.* **31**(3):245-51.
- QUINN, T.M., GRODZINSKY, A.J., HUNZIKER, E.B., AND SANDY, J.D. (1998) Effects of injurious compression on matrix turnover around individual cells in calf articular cartilage explants *J. Orthopaed. Res.* **16**:490-99.
- RATCLIFFE, A., AND MOW, V.C. (1996) Articular cartilage in *Extracellular matrix* (Comper, W.D., ed.) 1 pp. 234-302 Harwood Academic Publs., Amsterdam.
- RATH, N.C., BALOG, J.M., HUFF, G.R., KULKARNI, G.B., AND TIERCE, J.F. (1999) Comparative differences in the composition and biochemical properties of tibiae of seven- and seventy-two-week-old male and female broiler breeder chickens *Poult. Sci.* **78**(8): 1232-1239.

- ROSEMBERG, L.C., CHOI, H.U., TANG, L.H., PAL, S., JOHNSON, T.L., LYONS, D.A., AND LANE, T.M. (1991) Proteoglycans of bovine articular cartilage *J. Biol. Chem.* **266**(11): 7016-24.
- ROTH, S., MÜLLER, K., FISCHER, D.-C., AND DANNHAUER, K.-H. (1997) Specific properties of the extracellular chondroitin sulphate proteoglycans in the mandibular condylar growth center in pigs *Archs. Oral Biol.* **42**(1):63-76.
- ROUGHLEY, P.J., AND WHITE, R.J. (1989) Dermatan sulphate proteoglycans of human articular cartilage. The properties of dermatan sulphate proteoglycan I and II. *Biochem. J.* **262**: 823-827.
- ROUGHLEY, P.J., WHITE, R.J., CS-SZABÓ, G., AND MORT, J.S. (1996) Changes with age in the structure of fibromodulin in human articular cartilage *Osteoarthritis and Cartilage* **4**:153-61.
- SCHIMIDT, G., ROBENEK, H., HARRACH, B., GLÖSSL, J., NOLTE, V., HÖRMANN, H., RICHTER, H., AND KRESSE, H. (1987) Interaction of small dermatan sulfate proteoglycan from fibroblasts with fibronectin *J. Cell Biology* **104**:1683-91.
- SCHIMIDT, M.B., MOW, V.C., CHUN, L.E., AND EYRE, D.R. (1990) Effects of proteoglycan extraction on the tensile behavior of articular cartilage *J. Orthop. Res.* **8**:353-63.
- SCHIMIDT, T.M., AND LINSENMAYER, T.F. (1990) Immunoelectron microscopy of type X collagen: supramolecular forms within embryonic chick cartilage *Dev. Biol.* **138**: 53-62.
- SCHOLZEN T., SOLURCH M., SUZUKI S., REITER R., MORGAN J.L., BUCHBERG A.M., SIRACUSA L.D., AND IOZZO R.V. (1994) The murine decorin. *J. Biol. Chem.* **269**:28270-81.
- SCOTT J.E. (1992) Supramolecular organization of ECM glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *FASEB J.* **6**:2639-2645.
- SCOTT J.E. (1995) Extracellular matrix, supramolecular organization and shape. *J. Anat.* **187**:259-269.
- SCOTT J.E., DYNE K.M., THOMLINSON A.M., RITCHIE M., BATEMAN J., CETTA G., AND VALLI M. (1998) Human cells unable to express decoron

- produced disorganized extracellular matrix lacking "shape modules" (interfibrillar proteoglycan bridges). *Exp. Cell Res.* **243**:59-66.
- SHINOMURA, T., KIMATA, K., OIKE, Y., NORO, A., HIROSE, N., TANABE, K., AND SUZUKI, S. (1983) The occurrence of three different proteoglycan species in chick embryo cartilage *J. Biol. Chem.* **258**(15):9314-22.
- SILBERT, J.E. (1996) Organization of glycosaminoglycan sulfation in the biosynthesis of proteochondroitin sulfate and proteodermatan sulfate. *Glycoconjugate J.* **13**: 907-912.
- SIMON, M.R. (1977) The role of compressive forces in the normal maturation of the condylar cartilage in rats *Acta Anat.* **97**:351-60.
- SKERRY, T.M.; SUSWILLO, R.; EL HAJ, A.J.; ALI, N.N.; DODDS, R.A., AND LANYON, L.E. (1990) Load-induced proteoglycan orientation in bone tissue in vivo and in vitro. *Calcif. Tissue Int.* **46**: 318-326.
- SPENCE, A.P. (1991) Articulações in *Anatomia Humana Básica* (Spence, A.P., ed.) pp. 157-183 Ed. Manole LTDA São Paulo.
- SVENSSON, L., ASZÓDI, A., REINHOLT, F.P., FÄSSLER, R., HEINEGÅRD, D., AND OLDBERG, A. (1999) Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendons *J. Biol. Chem.* **274**(14):9636-47.
- SVENSSON, L., NÄRLID, I., AND OLDBERG, A. (2000) Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils *FEBS Letters* **470**:178-82.
- SWANN D.A., POWELL S., AND SOTMAN S. (1979) The heterogeneity of cartilage proteoglycans. Isolation of different types of proteoglycans from bovine articular cartilage. *J. Biol. Chem.* **254**:945-954.
- SZTROLOVICS, R., ALINI, M., MORT, J.S., AND ROUGHLEY, P.J. (1999) Age-related changes in fibromodulin and lumican in human intervertebral disc *Spine* **24**(17):1765-71.
- THORP, B.H. (1994) Skeletal disorders in the fowl: a review. *Avian Pathology* **23**, 203-236.
- VAN DER REST, M., AND GARRONE, R. (1991) Collagen family of proteins. *Faseb J.* **5**: 2814-2822.

- VELLEMAN, S.G., YEAGER, J.D., KRIDER, H., CARRINO, D.A., ZIMMERMAN, S.D., AND MCCORMICK, R.J. (1996) The avian low score normal muscle weakness alters decorin expression and collagen cross linking *Conn. Tissue Res.* **34**(1):33-39.
- VIDAL, B.C., AND VILARTA, R. (1988) Articular cartilage: collagen II-proteoglycans interactions. Availability of reactive groups. Variation in birefringence and differences as compared to collagen I. *Acta Histochem.* **83**: 189-205.
- VOGEL, K.G., AND KOOB, T.J. (1989) Structural specializations in tendons under compression. *Int. Rev. Cytol.* **115**:267-93.
- VOGEL, K.G., PAULSSON, M., AND HEINEGÅRD, D. (1984) Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon *Biochemistry J.* **223**: 587-97.
- WATANABE, H., YAMADA, Y., AND KIMATA, K. (1998) Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J.Biochem.* **124**, 687-693.
- WATANABE, T., AND KUBOTA, T. (1998) Characterization of fibromodulin isolated from bovine periodontal ligament *J. Periodontal Res.* **33**:1-7.
- WEBER I.T., HARRISON R.W., AND IOZZO R.V. (1996) Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis *J. Biol. Chem.* **271**:31767-70.
- WONG, M., SIEGRIST, M., AND CAO, X. (1999) Cyclic compression of articular cartilage explants is associated with progressive consolidation and altered expression pattern of extracellular matrix proteins *Matrix Biology* **18**:391-99.
- YAMAGUCHI N., MANN D.M., AND RUOSLAHTI E. (1990) Negative regulation of transforming growth factor beta by the proteoglycan decorin. *Nature* **336**:281-284.
- YAMAGUCHI, N., BENYA, P., VAN DER REST, M., AND NINAMYA, Y. (1988) Cartilage type IX collagen is cross-linked by hydroxypyridinium residues *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **123**: 103-39.