

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Nazário de Souza Messias Júnior

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS DA MATRIZ
EXTRACELULAR DAS CARTILAGENS SEPTAL E ALARES
DO NARIZ SUÍNO.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (s) candidato (a)
Nazário de Souza Messias
Júnior
e aprovada pela Comissão Julgadora.
02/07/99 *Gomes*

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do título de
Doutor em Ciências na área de
Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Laurecir Gomes

20.000.14.26

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	TIUNICAMP
	M 563a
V.	Es.
TOMBO	80/40421
PREÇO	278,00
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	78\$ 11,00
DATA	28/04/00
N.º CPD	

CM-00131907-6

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

M563a **Messias Junior, Nazário de Souza**
Aspectos bioquímicos e morfológicos da matriz extracelular das cartilagens septal e alares do nariz suíno/Nazário de Souza
Messias Junior. -- Campinas, SP: [s.n.], 1999.
87f. ilus.

Orientadora: Laurecir Gomes
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

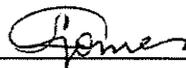
1.Suíno. 2.Matriz extracelular. 3.Cartilagem. 4.Histologia.
I.Gomes, Laurecir. II Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Local e Data: Campinas 02/07/99

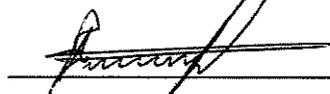
BANCA EXAMINADORA:

Titulares:

Profª. Dra. LAURECIR GOMES (Orientadora)



Prof. Dr. EDSON ROSA PIMENTEL



Prof. Dr. HERNANDES FAUSTINO DE CARVALHO



Prof. Dr. LUIZ ANTÔNIO VIOLIN DIAS PEREIRA



Profª. Dra. MARY ANNE HEIDI DOLDER



Suplentes:

Prof. Dr. PAULO PINTO JOAZEIRO

Profª. Dra. SATIE HATSUSHIKA OGO

Agradecimentos

À Profª. Dra. Laurecir Gomes pela orientação.

Ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel, pelas sugestões e auxílio nos experimentos.

Aos Srs (as). Professores (as) da Banca Examinadora.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Biologia Celular.

Aos Professores do Departamento de Fisiologia do CCB-UFGA.

À CAPES pela Bolsa de Estudos.

Agradeço especialmente:

Ao amigo Marcelo Esquisatto pelo apoio e ajuda em todos os momentos do trabalho, e pelas boas conversas e “bandejões” ao longo desses (longos) quatro anos.

Ao amigo Sérgio Felisbino pela excelente ajuda e ótimas sugestões na parte histológica e pela amizade.

Ao amigo Arnaldo e à Prof. Dra. Lúcia Wada, pela boa vontade e auxílio no uso do fotomicroscópio, graças a ajuda deles foi possível fazer as fotomicrografias apresentadas aqui.

Ao pessoal da Cirurgia Experimental da PUCC, especialmente a Ana e o Humberto que nada cobraram, nada questionaram e nada obstruíram “apenas” ajudaram., e graças a eles foi possível executar a parte de coleta de material para histologia.

A LÍlian (Secretaria do DBC), que me aturou e me ajudou nos momentos críticos de correria na confecção dos exemplares.

Ao grande número de amigos: Daniela, Patrícias, Estela, Lino, Bel & Edi, Guto (por onde anda?), Edinho, Gláucia, Lu, João, Cris (as duas), Marcos, Paula Belline (que me ajudou muito no início do trabalho), Luciano (cadê você cara?), Sebaka, Alexandre, Verinha, além dos já mencionados e dos que não mencionei (peço desculpas), uns ainda vejo, outros sumiram, todos foram legais e importantes em algum momento desse tempo todo. Eles de fato representam o que foi realmente importante nesses anos: a amizade.

Abreviaturas

A	Alar
AA	Azul de Alcian
AH	Ácido Hialurônico
Anova	Análise de Variância
AT	Azul de Toluidina
BG	Biglicam
CMP	Proteína de Matriz de Cartilagem
COMP	Proteína Oligomérica de Matriz da Cartilagem
CS	Condroitim Sulfato
CsCl	Cloreto de Césio
DEAE	Dietilaminoetil
DEC	Decorim
DMMB	Azul de Dimetilmetileno
DS	Dermatam Sulfato
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FM	Fibromodulim
GAGs	Glicosaminoglicanos
GNCs	Glicoproteínas não Colagênicas
HS	Heparam Sulfato
HSPG	Proteoglicano com Heparam Sulfato
Gu-HCl	Cloridrato de Guanidina
HE	Hematoxilina e Eosina
Kav	Coefficiente de Eluição
kDa	kiloDalton
mA	miliAmpère
MEC	Matriz Extracelular
Mr	Massa Molecular Aparente
2-Me	2-Mercaptoetanol
PARP	Proteína Catiônica de Baixo Peso Rica em Prolina e Arginina

PG	Proteoglicano
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PSH	Picrosirius-Hematoxilina
QS	Queratam Sulfato
Rf	Distância Relativa de Migração
S	Septal
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS
Vo	Volume Morto
Vt	Volume Total
XP	Xylidine Ponceau

Lista de Tabelas

Tabela	Página
Tabela 1 – Dosagens para os extratos totais	16
Tabela 2 – Dosagens para as frações	17

Lista de Figuras

Figura	Página
1- Gel Agarose-Propileno para Extratos Totais	18
2- Cromatogramas (troca iônica) e Géis SDS-Page para SD4 e AD4	20
3- Géis SDS-PAGE para proteína de 115 kDa	22
4- “Immunoblotting” para proteína de 62 kDa	24
5- Gel Agarose-Propileno para SD1 e SD2	25
6- Cromatogramas (gel filtração-G 75) e Géis PAGE-Barbital para SD1 e AD1	26
7- Cromatogramas (gel filtração-CL-6B) e Géis Agarose-PAGE para SD1 e AD1	29
8- Cromatogramas (troca iônica) e Géis SDS-PAGE e Agarose-PAGE para AD2	31
9- Cortes corados com HE e XP de Cartilagem Septal	34
10- Cortes corados com AT de Cartilagem Septal	36
11- Cortes corados com PSH de Cartilagem Septal	38
12- Cortes corados com HE e XP de Cartilagem Alar	41
13- Cortes corados com AT de Cartilagem Alar	43
14- Cortes corados com PSH de Cartilagem Alar	45

Sumário

Introdução	01
Material e Métodos	09
Bioquímica	09
1. Obtenção do Material	09
2. Processos Extrativos	09
3. Procedimentos de Ultracentrifugação	10
4. Métodos Analíticos	10
5. Digestão Enzimática	10
6. β -Eliminação	11
7. Cromatografias	11
7.1. Troca Iônica	11
7.2. Gel Filtração	11
7.3. Gel Filtração para os Grandes Proteoglicanos	11
8. Eletroforeses	12
8.1. SDS-PAGE	12
8.2. Gel de Agarose-Propileno	12
8.3. PAGE Tampão Barbital	12
8.4. Agarose Poliacrilamida	13
9. Transferência Elétrica (“Immunoblotting”)	13
10. Análise estatística	13

Histologia e Histoquímica	14
1. Coleta	14
2. Processamento	14
3. Colorações	14
3.1.Hematoxilina-Eosina	14
3.2.Xylidine-Ponceau	14
3.3.Picrosirius-Hematoxilina	15
3.4.Azul de Toluidina	15
Resultados	16
I. Análise Bioquímica	16
Dosagens	16
Análise dos Tipos de Glicosaminoglicanos	17
Fração D4	19
Cromatografia de Troca Iônica e SDS-PAGE	19
Análise Imunoquímica	23
Fração D1	23
Glicosaminoglicanos	23
Cadeias de Glicosaminoglicanos	23
Proteoglicanos	28
Fração D2	28
II. Análise Morfológica	33
Cartilagem Septal	33

Cartilagens Alares	40
Discussão	47
Análise Bioquímica	47
Análise Morfológica	52
Conclusões	55
Resumo	56
Abstract	57
Bibliografia	58

Introdução

As cartilagens compreendem um grupo de tecido conjuntivo diversificado com estruturas e funções diferentes. A origem pode ser mesodérmica (cartilagens articulares) ou neuroectodérmica (cartilagens traqueais, a laringeal e as da região nasal) (Heinegård & Paulsson, 1987). Uma cartilagem é formada basicamente por uma matriz extracelular (MEC) e por células chamadas condrócitos, sendo a MEC responsável pelas propriedades biomecânicas do tecido (Caplan, 1984; Lohmander, 1988).

Os condrócitos são responsáveis pela síntese e renovação da MEC, que é capaz de influenciar fisiologicamente a atividade celular (Boudreau et al, 1995). Tradicionalmente muitos autores consideram as cartilagens como tecidos alinfáticos, aneurais e avasculares (Caplan, 1984). Porém este último aspecto pode não ser correto, pois em alguns tecidos cartilagosos existem canais (canais da cartilagem) com vasos (mas não redes capilares), que podem contribuir significativamente para a nutrição dos tecidos (Haines, 1933; Skawina et al, 1994; Shapiro, 1998). Seja a partir dos vasos dos canais, ou a partir da difusão dos vasos do pericôndrio, o mecanismo fundamental para a nutrição dos condrócitos é a difusão pela MEC. O que faz da cartilagem um tecido altamente adaptado às condições de baixa tensão de oxigênio (Rajpurohit et al, 1996).

A MEC das cartilagens é formada por colágeno, principalmente do tipo II mas também pelos tipos IX e XI, pelos proteoglicanos (PGs) e glicoproteínas não colagênicas (GNCs) (Mendler et al, 1989; Heinegård & Oldberg, 1989; Buschaman et al, 1992). Nas cartilagens sujeitas a calcificação pode ser encontrado ainda o colágeno X, considerado um marcador específico do processo de calcificação endocondral (Eerola et al, 1998), embora sua presença parece não ser obrigatória (Sasano et al, 1998). Em discos intervertebrais além do colágeno II, foram identificados os tipos I, III, IV, VI e XI, e também o do tipo X, relacionado aos fenômenos de mineralização que ocorrem nessa estrutura (Lammi et al, 1998).

O colágeno é uma molécula que proporciona suporte e força de tensão a vários tipos de tecido além das cartilagens (Linsenmayer, 1991). Nas cartilagens é o elemento que estabelece a estrutura básica do tecido e contribui para a principal função das cartilagens

articulares que é a transmissão de pressões e dissipação de impactos (Kaab et al, 1998). Foram descritos aproximadamente 20 tipos moleculares de colágeno. Todos eles são formados por três cadeias polipeptídicas, que em grande parte dos tipos de colágeno, possuem 1000 aminoácidos cada. Essas moléculas apresentam pelo menos uma região em hélice tríplice, que nos tipos fibrilares pode representar até 95% da molécula. As cadeias polipeptídicas têm composição particular de aminoácidos, predominando uma sequência representada por: Gly-X-Y, onde frequentemente X é a prolina e Y a hidroxiprolina. A estabilidade da estrutura helicoidal é mantida por pontes de hidrogênio. As regiões N e C terminais da molécula de colágeno não formam estruturas helicoidais. São sítios importantes que apresentam hidroxilisinas, formando ligações covalentes entre si, permitindo o aparecimento de ligações intra e intermoleculares fundamentais para a formação de fibrilas (Linsenmayer, 1991; Kadler, 1994; Ayad et al, 1994). As fibrilas colagênicas formam uma trama altamente resistente que, junto com os PGs suportam tensões e compressões que são exercidas sobre as cartilagens (Hascall, 1981).

Além das funções mecânicas, o colágeno tem sido relacionado às funções de regulação em eventos morfogênicos da MEC (Fields, 1995; Reichenberg & Olsen, 1996; Brodsky & Ramshaw, 1997). Colágenos como o tipo XVIII são também PGs do tipo proteoglicano com heparam sulfato (HSPG) e está presente nas lâminas basais (Halfter et al, 1998), já o do tipo XIII é uma molécula de superfície celular (Hägg et al, 1998).

Os PGs das cartilagens são moléculas complexas formadas por uma proteína central na qual estão ligadas uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) (Carney & Muir, 1988). Os GAGs são: o ácido hialurônico (AH), o condroitim sulfato (CS), o dermatam sulfato (DS), o heparam sulfato/heparina (HS) e o queratam sulfato (QS) (Heinegård & Paulsson, 1984). Os GAGs são polissacarídeos carregados negativamente, apresentam grupos sulfato e carboxila, exceto o AH que não possui grupos sulfatos (Wight et al, 1991). Os PGs da MEC têm a propriedade de criar um ambiente hídrico, pois as suas cargas negativas atraem íons osmoticamente ativos (Hardingham & Fosang, 1992). A água de hidratação mantém o tecido túrgido. Essa turgescência é fundamental para manter o volume das peças cartilaginosas e para suportar as forças de compressão, o volume dos PGs não excede os limites fisiológicos devido a ação da trama de colágeno (Hascall, 1981).

Recentemente foi proposta uma classificação funcional, que divide os PGs em 3 grupos: os hialectans, os pequenos PGs ricos em leucina e o de PGs de membranas basais (Iozzo, 1998).

O grupo dos hialectans, compreende aqueles PGs que podem se ligar ao AH e lectinas. O agregam é considerado o mais importante das cartilagens, formando estruturas complexas (agregados) com longas cadeias de AH (Franzén et al, 1981, Hardingham et al, 1986). O agregam é o maior componente da cartilagem (Heinegård & Oldberg, 1989). O tamanho desse agregado é determinado pelo comprimento do AH e também pelo número de PGs associados (Hardingham et al, 1986).

A proteína central do agregam, isolada das cartilagens hialinas, tem estrutura assimétrica e contém regiões com diferentes composições, sendo na verdade uma proteína modular. Uma das extremidades, a N-terminal, contém dois domínios globulares (G1 e G2) que interagem com o AH, e não apresentam cadeias de polissacarídeos, sendo essencial para a formação de agregados (Caterson & Baker, 1979; Hardingham et al, 1986; Watanabe et al, 1997). O sítio de ligação para interagir com o AH não é específico, porém a ligação é estabilizada pela proteína de ligação (Hardingham et al, 1986). A proteína de ligação possui Mr em torno de 44 kDa e é rica em aminoácidos hidrofóbicos, principalmente fenilalanina e tirosina (Neame et al, 1985; Goetnik, 1993; Neame & Barry, 1993).

Grande parte da proteína central do agregam é rica em cadeias de CS (100 kDa) ligadas covalentemente. Esta região é importante para a função biomecânica dos PGs (Lohmander, 1988). As cadeias sulfatadas do agregam concentram cargas negativas estabelecendo alto grau de hidratação necessário para manter o volume característico das cartilagens (Vertel, 1995). A sulfatação das cadeias de GAGs nos PGs varia de acordo com o desenvolvimento e com o estado fisiológico da cartilagem (Plaas et al, 1998). As cadeias de CS das cartilagens dos discos intervertebrais e do septo nasal bovinos podem variar no comprimento e na posição dos radicais sulfato (Robinson & Hopwood, 1973). Entre a região rica em CS e a de ligação com o AH, há uma região rica em QS com 30 a 60 cadeias (20-25 kDa) e oligossacarídeos O-ligados (Heinegård & Paulsson, 1984).

Os PGs podem apresentar o fenômeno da polidispersidade, que é resultante da variação no número de cadeias de GAGs e no comprimento dessas cadeias (Hascall &

Sajdera, 1970; Hascall & Riolo, 1972; Heinegård, 1977; Heinegård & Paulsson, 1984; Heinegård et al, 1985). A quantidade de GAGs pode variar entre áreas diferentes de uma mesma cartilagem, especialmente naquelas que recobrem superfícies articulares (Franzén et al, 1981).

Os PGs classificados como pequenos PGs ricos em leucina, são moléculas menores em relação aos hialectans e estão em menor quantidade nas cartilagens. Desta classe, já foram estudados o decorim (DEC), o fibromodulim (FM) e o biglicam (BG) (Heinegård & Oldberg, 1989). O DEC (90-140 kDa) e o BG (150-240 kDa) são encontrados na pele, nos tendões e na esclera (Rosenberg et al, 1991). O DEC é encontrado associado às fibras de colágeno, e pode inibir a fibrilogênese dessa molécula (Scott & Orford, 1981). Considerando a proteína central o DEC e o BG são estruturalmente relacionados mas geneticamente distintos (Hedbom & Heinegård, 1993). O DEC contém uma cadeia de CS ou DS ligada a extremidade N-terminal da proteína (Mann et al, 1990). O BG contém duas cadeias de CS ou DS, sendo encontrado nas superfícies celulares e na região pericelular, estando envolvido na morfogênese e diferenciação (Hardingham & Fosang, 1992; Kresse et al, 1993). Estes pequenos PGs foram identificados primeiro na cartilagem nasal bovina (cadeias de CS), sendo encontrados também nas cartilagens articulares (cadeias de DS) (Heinegård & Sommarin, 1987). O FM apresenta 4 cadeias de QS ligados a um domínio central de sua proteína central que possui 42 kDa (Oldberg, 1993) e vários sítios de tirosina sulfatados na porção N-terminal (Oldberg et al, 1990). Nos tendões o FM e o DEC podem interagir com o colágeno interferindo na fibrilogênese (Heinegård & Sommarin, 1987; Scott, 1988; Hedlund et al, 1994). As interações entre esses PGs e o colágeno ocorre via proteína central. No DEC há indicações que um segmento rico em glutamato é de maior importância para a ligação, sendo esta então, de natureza eletrostática (Kresse et al, 1998). O FM está presente na cartilagem xifóide de frango onde aparece mais abundante na região carinada, o que pode estar relacionado às forças de compressão atuantes nessa região (Gomes & Pimentel, 1994), nas cartilagens articulares bovinas (Heinegård et al, 1986) parece estar agregado a outros componentes da MEC (Gomes et al, 1996). Além disso existem indicações que o FM apresente modificações ao longo do envelhecimento em

cartilagens articulares humanas, tais modificações estão relacionadas a perda progressiva das cadeias de GAGs (Roughley et al, 1996).

A biossíntese e a organização espacial das fibrilas de colágeno e das moléculas de PGs são sensíveis aos tipos de pressões impostas às superfícies articulares. Este aspecto pode ter grande significância na compreensão dos mecanismos envolvidos nas doenças degenerativas de cartilagens (Király et al, 1998).

A MEC contém GNCs, tais como: proteína de 18 kDa encontrada em cartilagem nasal bovina (Neame et al, 1990), proteínas de 52 e 92 kDa encontradas em cartilagem xifóide de frango (Anagnostides et al, 1990), proteína de 58 kDa ou proteína de matriz de cartilagem (CMP), proteína oligomérica de matriz cartilaginosa (COMP) (Smith et al, 1997), proteína de 21 kDa, proteína de 36 kDa, ancorina, condrocalcina, tenascina, trombospondina e proteína catiônica de baixo peso rica em prolina e arginina (PARP) (Heinegård & Pimentel, 1992).

Ainda que para muitas dessas GNCs encontradas em cartilagens, falte um modelo explicativo para suas possíveis funções, para outras há maiores informações como é o caso da COMP. Essa molécula é encontrada na matriz territorial dos condrócitos. Mutações em seu gene foram relacionadas à uma pseudocondrodisplasia (Hecht et al, 1995; Hecht et al, 1998).

Esses componentes da MEC estão organizados em um todo coerente capaz de desempenhar funções biomecânicas essenciais, seja nas superfícies articulares seja na forma de suporte para estruturas como a traquéia, a orelha e o nariz.

Sob aspecto histológico, nos mamíferos, são encontrados três tipos básicos de cartilagem: a hialina, a elástica e a fibrosa ou fibrocartilagem.

A cartilagem elástica está presente na orelha e na epiglote. Ela contém fibras do sistema elástico além dos componentes presentes na MEC da cartilagem hialina (Egerbacher et al, 1995; Carvalho et al, 1996). Porém é importante assinalar que a presença das fibras do sistema elástico não é restrita às cartilagens tipicamente consideradas “elásticas”. As cartilagens hialinas da traquéia também podem apresentar fibras elásticas, bem como as fibrocartilagens do disco intervertebral de ratos (Cotta-Pereira et al, 1984). Carvalho e colaboradores (1994) descrevem a presença de fibras elásticas nas

fibrocartilagens de tendões de cães e coelhos, naquelas regiões sujeitas às forças de compressão. As fibras elásticas podem ainda ser encontradas no pericôndrio da cartilagem xifóide de *Gallus gallus domesticus* (Felisbino et al, 1994 a,b). A presença desses elementos do sistema elástico em cartilagens não consideradas caracteristicamente elásticas é pouco compreendida fisiologicamente.

A fibrocartilagem está comumente presente em regiões de transição como por exemplo nas junções tendão-osso, nos meniscos e discos intervertebrais (Heinegård & Paulsson, 1987). As células das fibrocartilagens estão dispostas entre os feixes de colágeno, podendo ser encontrados tanto condrócitos quanto fibroblastos, sendo que os condrócitos estão frequentemente rodeados por uma matriz territorial basófila (Benjamin & Evans, 1990). Nessa cartilagem convivem o colágeno do tipo I e do tipo II, este encontrado principalmente na matriz territorial (Benjamin & Evans, 1990).

As cartilagens hialinas formam nos mamíferos o primeiro esqueleto, que é parcialmente substituído por osso antes do nascimento. No animal adulto essas cartilagens são encontradas nas bordas ventrais das costelas, nos anéis traqueais e na laringe, além disso formam as importantes zonas de crescimento dos ossos longos e persistem nas superfícies articulares de amplo movimento (diartroses) (Junqueira & Carneiro, 1999).

A unidade funcional das cartilagens é o condrom, que é uma estrutura formada pela célula cartilaginosa, o condrócito, mais a matriz associada a ele, a matriz territorial (Poole, 1997). É frequente nas cartilagens que não articulam total ou parcialmente com os ossos, a presença de uma espessa cápsula fibrosa delimitando a peça cartilaginosa, é o pericôndrio ou albugínea da cartilagem (Egerbacher et al, 1995).

Associado ao pericôndrio, pode ser encontrado uma região de cartilagem onde ocorre o crescimento aposicional da mesma, via células jovens que se multiplicam e secretam nova matriz. Para alguns autores essas células podem ser chamadas de condroblastos (Junqueira & Carneiro, 1999).

Na profundidade das cartilagens, os condrócitos ficam separados entre si pela própria matriz secretada, mas é normal e frequente, especialmente nas cartilagens hialinas, a identificação de grupos de condrócitos justapostos (frequentemente quatro células),

formando os grupos isógenos, uma vez que todos são oriundos da divisão de uma única célula (Bloom & Fawcett, 1986).

A matriz das cartilagens quando coradas com corantes apropriados pode apresentar o fenômeno da metacromasia, decorrente da justaposição de grupos aniônicos presentes nos GAGs (Bloom & Fawcett, 1986).

Nos suínos, assim como em outros mamíferos, a região do nariz ou focinho é rica em estruturas cartilaginosas. Estruturas que podem dar lugar ao osso precocemente como é o caso das cartilagens dos cornetos que formam o esboço dos ossos turbinados (Martineau-Doizé & Martineau, 1986). Na extremidade do nariz encontramos as cartilagens alares direita e esquerda, que formam o suporte para as cavidades mais externas do nariz (Hare, 1981).

A cartilagem septal suína é uma estrutura que está fixa dorsalmente pelos ossos nasais e ventralmente pelo vômer. Nas superfícies voltadas para as cavidade nasais a cartilagem está recoberta por um mucopericôndrio (mucosa + pericôndrio) vascular. A mucosa é rica em glândulas. Dorsalmente e lateralmente, são projetados da cartilagem septal dois prolongamentos cartilaginosos que anatomicamente são conhecidos como cartilagens laterais dorsais (Hare, 1981). O septo nasal em mamíferos, inclusive nos suínos, pode calcificar com o envelhecimento do animal. A calcificação das cartilagens está relacionada ainda que não obrigatoriamente à presença do colágeno tipo X e do propeptídio do colágeno II, a condrocalcina. Esse componente tem sido considerado um marcador dos fenômenos de mineralização de cartilagens (Poole et al, 1989).

As estruturas cartilaginosas e ósseas dos suínos são o sítio preferencial para o estabelecimento de uma rinite atrófica, causada por *Pasteurella multocida* (Trépanier et al, 1988). As cartilagens septal e alares não são intensamente atingidas pela doença, mas podem sofrer os efeitos degenerativos secundários nos estados mais avançados da doença.

Na literatura consultada são muito escassos os trabalhos que procuram caracterizar os componentes da MEC das cartilagens nasais suínas, assim como as descrições histológicas.

Neste trabalho levamos em consideração a importância dessas estruturas cartilaginosas como sítio de afecção da rinite atrófica. Consideramos também as estruturas

como modelos importantes para o estudo de MEC de cartilagens que não são submetidas a pressões resultantes de articulações ósseas móveis. Além disso as estruturas ósseo-cartilaginosas da região crânio-facial são vitais no desenvolvimento da cabeça, sendo também sítios de malformações congênitas de grande importância em humanos (Scott, 1953).

Objetivo do trabalho

Descrever aspectos da composição e as características morfológicas básicas das cartilagens alares e septal suínas.

Material e Métodos

Bioquímica

1. Obtenção do material biológico

As cartilagens foram obtidas de suínos de dois meses e meio, da linhagem *large white*. Os animais que foram abatidos durante procedimentos de cirurgia experimental, no Núcleo de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Unicamp, estavam anestesiados e não foram submetidos a estresse ou sofrimento. Além disso não foi feito nenhum procedimento experimental atingindo diretamente a região nasal antes do sacrifício.

As cartilagens alares (A) foram obtidas após um processo de dissecação consistindo da remoção da pele e dos tecidos conjuntivos aderentes. As peças foram segmentadas e todo o material aderido foi retirado.

A cartilagem septal (S) só era alcançada após secção de peças ósseas, e retirada sem os tecidos aderentes. Todos esses procedimentos foram realizados em placa refrigerada e o material obtido foi conservado a -20°C .

No total foram utilizados 10 animais para os procedimentos bioquímicos.

2. Processos extrativos

As cartilagens foram fragmentadas com bisturi em superfície com gelo, e homogeneizadas em PBS (tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7 contendo NaCl 0,15M) (homogenizador Politron pt 1200, Brinkman). Esse material foi centrifugado a 10000 rpm (centrífuga Beckman, J2-21, rotor JA-20) durante 10 minutos a 4°C . O precipitado obtido foi submetido a extração com cloreto de guanidina (Gu-HCl) 4 M em tampão acetato de sódio 0,02 M, pH 5,8 contendo os inibidores enzimáticos EDTA 10 mM e fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM, a 4°C durante 24 horas sob agitação. Para cada grama de

cartilagem foram utilizados 15 ml de solução de extração. Após este período o material foi centrifugado a 18000 rpm (centrífuga Beckman, J2-21, rotor JA-20) por 25 minutos a 4°C. O sobrenadante e o precipitado foram estocados a -20°C.

3. Procedimentos de ultracentrifugação

Com o objetivo de obter-se frações enriquecidas de proteínas ou GAGs os extratos totais de S e A foram submetidos a ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl) segundo Hascall & Sajdera (1969). Para isto, foram adicionados 0,35 g de CsCl por grama de extrato, de modo que a densidade obtida ficasse 1,35 g/ml. A centrifugação foi a 34000 rpm (rav 62,5 mm, 80000 g) durante aproximadamente 62 horas, a 15°C (centrífuga Beckman L8-80 M, rotor 80 Ti). Após este período foram obtidas as frações D1 (fundo do tubo), D2, D3 e D4 (topo do tubo) de S e A (D =dissociativa, Heinegård & Sommarin, 1987). As amostras foram estocadas a -20°C.

4. Métodos analíticos

Foram determinados tanto para os extratos totais quanto para as frações de ultracentrifugação, os conteúdos de proteínas (Bradford, 1976), GAGs sulfatados/DMMB (Farndale et al, 1986) e ácido urônico (Brown, 1946).

5. Digestão enzimática

Com o objetivo de investigar o tipo de GAGs presentes amostras de extratos totais foram precipitadas em etanol e posteriormente incubadas em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,5 contendo papaína 2,6 mg/ml, NaCl 9 mg/ml, L-cisteína 0,8 mg/ml e EDTA 9 mg/ml, durante 24 horas a 37 °C (Heinegård & Sommarin, 1987). Após a digestão, as amostras foram analisadas em gel de agarose-propileno.

6. β -eliminação

Para a separação das cadeias de GAGs da proteína central dos PGs alíquotas de 200 μ l das frações D1 foram incubadas durante 18 horas com NaOH 0,5 M a 4 °C e a seguir precipitadas com álcool etílico. As cadeias de GAGs obtidas foram analisadas em gel de agarose-propileno e/ou fracionadas em cromatografia de gel filtração em Sephadex G-75.

7. Cromatografias

7.1 Cromatografia de troca iônica – Para a análise eletroforética dos pequenos PGs e das proteínas não colagênicas presentes nas frações D4 e D2 de S e A, o material foi submetido a cromatografia de troca iônica. Amostras contendo 3 mg/ml de proteína, foram dialisadas contra tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contendo uréia 7 M e submetidos à cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepacel. A resina foi equilibrada com 10 volumes de tampão Tris-HCl 200 mM, pH 7,4 e a seguir com 20 volumes de tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contendo uréia 7 M. Para a eluição das amostras foi utilizado um gradiente de NaCl (0-1,5 M) no mesmo tampão. As frações foram analisada quanto à condutividade (condutivímetro Hanna HI-8819N), absorbâncias em 230 e 280 nm (espectrofotômetro HP-8452-A) e submetidas a SDS-PAGE.

7.2 Cromatografia em gel filtração – Para análise eletroforética das cadeias de GAGs alíquotas da fração D1 de S e A, após β -eliminação foram submetidas a filtração em Sephadex G-75 em solução salina (NaCl 0,15M). Amostras de 1 ml foram coletadas e o conteúdo de GAGs foi determinado pelo Azul de Dimetilmetileno (DMMB). As amostras foram analisadas em PAGE-Tampão Barbitol.

7.3 Cromatografia em gel filtração para os grandes proteoglicanos – Para análise eletroforética dos grandes PGs alíquotas de SD1 e de AD1 (com aproximadamente 4 mg de GAGs) foram precipitadas com etanol, centrifugadas, secas e ressuspensas em Gu-HCl 4M. Essas amostras foram aplicadas em coluna de gel filtração em Sepharose CL-

6B. A absorbância foi determinada pelo método do DMMB (525 nm) e as amostras correspondentes ao pico foram analisadas em gel de agarose-poliacrilamida.

8. Eletroforeses

8.1 SDS-PAGE - Após a cromatografia de troca iônica as amostras obtidas foram analisadas em SDS-PAGE (gradiente 4-16% segundo Zingales, 1984), para a avaliação dos pesos moleculares relativos. As amostras (100 μ l) foram precipitadas em etanol e tampão acetato de sódio 0,05 M em pH 7,4 e ressuspendidas em tampão de amostra (Tris 62,5 mM, pH 6,8, EDTA 1 mM, SDS 2,5%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,1%) com ou sem mercaptoetanol. As eletroforeses foram realizadas durante 4 horas com uma intensidade de 30 mA. O tampão das cubas foi Tris 25mM, glicina 19 mM e SDS 0,1%. Padrões peso molecular foram analisados em paralelo e continham: fosforilase β (94000), albumina sérica bovina (67000), ovoalbumina (43000), anidrase carbônica (30000), inibidor de tripsina (20100) e α -lactoalbumina (14000). Os géis foram impregnados pela prata (Blum et al, 1987). A massa molecular aparente (M_r) foi inferida (com o gel úmido) por cálculo de R_f e regressão dos marcadores (Klaus & Osborn, 1969).

8.2 Gel de agarose-propileno - Os GAGs obtidos após digestão enzimática do extrato total e β -eliminação das frações D1 foram analisadas em gel de agarose segundo Dietrich & Dietrich (1976), para a análise das diferentes populações. O tampão utilizado na cuba foi o propileno diamino 0,05 M, pH 9,0. As condições de corrida foram 30 mA, 120V durante 2 horas. Os géis foram fixados com cetavlon (N-cetil, N, N, N, trimetil brometo de amônio) e corados com Azul de Toluidina (AT) 0,1%.

8.3 PAGE-Tampão Barbital - Para análise do tamanho relativo das cadeias de GAGs presentes em D1 obtidas em coluna de gel filtração, as amostras foram precipitadas em etanol, e ressuspendidas em tampão de amostra (barbiturato de sódio 20 mM, pH 8,6 com 40 % de glicerol). A análise foi feita em gel PAGE-Tampão Barbital (6%) (Hibom & Anastasiadis, 1969). Para a cuba foi utilizado o mesmo tampão descrito acima sem o

glicerol. A corrente aplicada foi de 100 V durante 30 minutos. O padrão de CS (40 kDa) foi analisado em paralelo. A coloração foi em AT 0,1% em ácido acético 1 %.

8.4 Agarose-poliacrilamida - Para análise das populações de PGs fracionadas em coluna de Sepharose CL-6B (D1) e da coluna DEAE-Sephacel (D2), as alíquotas correspondentes ao pico de cada cromatografia, foram precipitadas com etanol, e o precipitado foi dissolvido em tampão Tris 40 mM pH 6,8 contendo Na_2SO_3 1 mM e glicerol 40 % e fervido durante 5 minutos (Heinegård & Sommarin 1987). O tampão Tris 10 mM pH 6,8 contendo Na_2SO_3 0,25 mM e EDTA 0,25 mM, foi utilizado na cuba, durante 16 horas a 20 volts. O padrão de CS foi analisado em paralelo. Os géis foram corados pelo AT 0,1% em ácido acético 1%.

9. Transferência eletroforética de proteínas para membrana de nitrocelulose (“immunoblotting”)

As amostras de SDS-PAGE que continham o FM foram submetidas a SDS-PAGE (7,5 % de acrilamida). A seguir as proteínas foram transferidas para papel de nitrocelulose, usando tampão de transferência Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%, através de corrente constante de 70 volts por 3 horas a 4°C. Após a transferência, a fita foi incubada com soro de coelho anti-fibromodulim de galinha (1:10). Como segundo anticorpo foi utilizado soro de porco anti-Ig total de coelho conjugado com peroxidase (HRP), diluído a 1:500. A atividade enzimática foi demonstrada com solução de DAB (50 mg de diaminobenzidina em 100 ml de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4), contendo peróxido de hidrogênio 0,001% final.

10. Análise estatística

As médias das dosagens foram comparadas pela análise de variância (ANOVA) com distribuição de Fischer. Os testes foram feitos em nível de significância de 5% (Beiguelman, 1991).

Histologia e Histoquímica

1. Coleta

Os animais utilizados foram abatidos imediatamente após procedimentos cirúrgico-experimentais, realizados no Laboratório de Técnicas Operatórias e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da PUC-Campinas. As cartilagens foram removidas e segmentadas sem remoção dos tecidos aderentes, preservando assim as relações teciduais adjacentes às cartilagens.

A fixação foi feita em formalina tamponada, 10% (tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4). As peças ficaram imersas no fixador por 24 horas.

2. Processamento das Amostras

Após a fixação, o material foi lavado rapidamente em água corrente e desidratado em série alcóolica crescente. A seguir foi submetido a clarificação em álcool/xilol e xilol até obter boa transparência.

O material foi embebido em Paraplast e emblocado. Para os segmentos de septo as peças foram orientadas para que os cortes pudessem ser feitos no sentido transversal ou longitudinal. Os cortes foram feitos com 7 μm .

3. Colorações

3.1 Hematoxilina de Erlich e Eosina-floxina (HE) - Para as descrições histológicas básicas das cartilagens.

3. 2 Xylidine-Ponceau 3RS (XP) Foi utilizado para radicais catiônicos, 0,1 % em solução aquosa de ácido acético 2% pH 2,5 - Os cortes foram corados por 30 minutos, lavados em água destilada por 5 minutos e secos ao ar, clarificados em xilol e montados em Entelan (Mello & Vidal, 1980).

3. 3 Picrosírius-Hematoxilina (PSH) Foi utilizado para a identificação de colágenos - Os cortes foram corados com Sirius Red 0,1% em solução aquosa saturada de ácido pícrico por 60 minutos e lavados por 5 minutos em água destilada. A seguir foram contra-corados com Hematoxilina, lavados por 10 minutos em água corrente, desidratados em série etanólica crescente, clarificados em xilol e montados em Entelan (Junqueira et al, 1979).

3. 4 Azul de Toluidina (AT) 0,025% em tampão citrato McIlvaine pH 4,0 utilizado para radicais aniônicos - Os cortes foram corados por 15 minutos, lavados em três banhos de água destilada, secos ao ar, clarificados em xilol e montados em Entelan (Mello & Vidal, 1980).

Resultados

I – Análise Bioquímica

Dosagens

Na tabela 1 estão representados valores médios encontrados para as dosagens dos extratos totais (mg/ml). Em S pode ser observado que os valores para ácido urônico e GAGs sulfatados é maior do que A, porém a situação se inverte com relação ao conteúdo protéico.

Tabela 1 –Estão representados os valores médios para as dosagens de proteínas, GAGs sulfatados e ácido urônico, para os extratos totais de cartilagem Septal e Alar. ANOVA com distribuição de Fischer em nível de 5% de significância.

Cartilagem	Proteínas	GAGs Sulfatados	Ácido urônico
S	0,59±0,06	1,76±0,56	0,49±0,03
A	0,71±0,06	0,88±0,29	0,32±0,03

Após ultracentrifugação o conteúdo de proteínas, GAGs sulfatados e ácido urônico foi determinado para cada fração obtida dos dois tipos de cartilagens considerados. Na tabela 2 em A (S) e B (A) estão reunidos os valores médios das dosagens, expressos em mg/ml. Os resultados confirmam a eficiência da ultracentrifugação, com as proteínas concentradas na fração D4 e os GAGs concentrados na fração D1.

Tabela 2 – Dosagens das frações obtidas após ultracentrifugação. Foi determinado o conteúdo de proteínas, GAGs sulfatados e ácido urônico. Em A estão representados os valores para cartilagem Septal e em B para cartilagem Alar.

A

Frações	Proteínas	GAGs sulfatados	Ácido urônico
SD1	0,23±0,01	2,6±0,11	1,5±0,31
SD2	0,19±0,01	0,1±0,01	0,33±0,12
SD3	0,42±0,00	0,1±0,02	0,086±0,02
SD4	1,5±0,18	0,068±0,00	0,076±0,072

B

Frações	Proteínas	GAGs sulfatados	Ácido urônico
AD1	0,08±0,012	3,0±0,5	1,08±0,06
AD2	0,11±0,023	0,31±0,05	0,18±0,01
AD3	0,36±0,15	0,1±0,00	0,04±0,01
AD4	1,18±0,1	0,07±0,00	0,08±0,00

Análise dos tipos de glicosaminoglicanos

A análise dos GAGs obtidos após digestão dos extratos totais com papaína (figura 1), em agarose-propileno indicou que o GAG predominante em S e A é o CS.

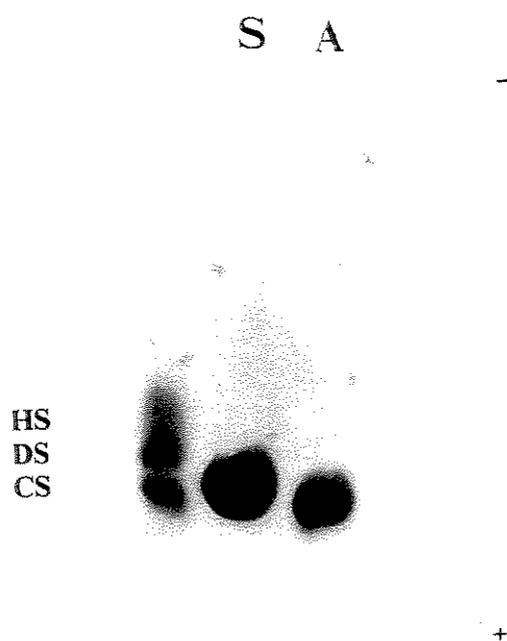


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose-propileno dos extratos totais de S e A após digestão com papaína. Coloração com AT. Padrões foram analisados em paralelo: CS, DS e HS.

Fração D4

Cromatografia de troca iônica e SDS-PAGE

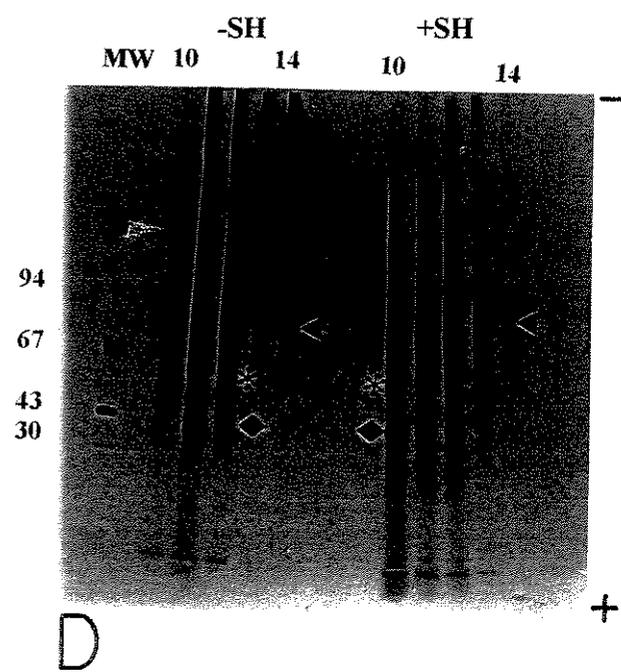
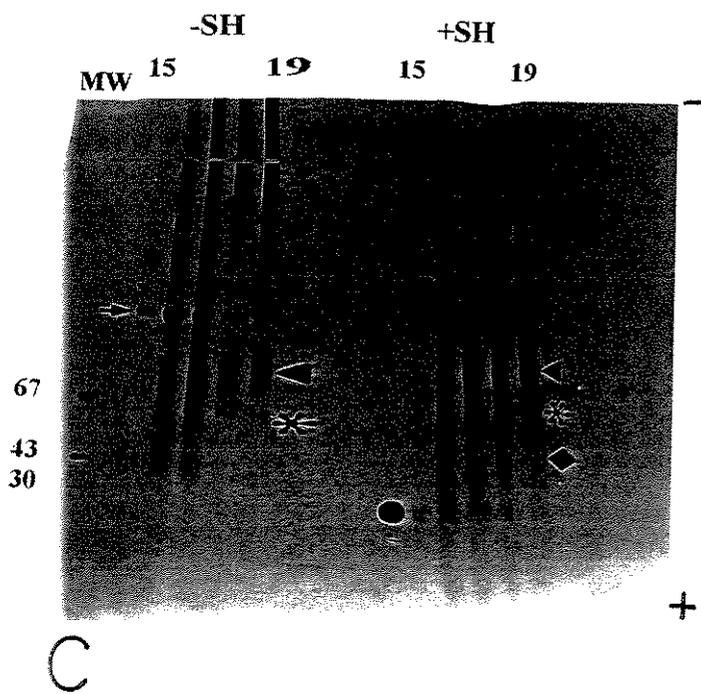
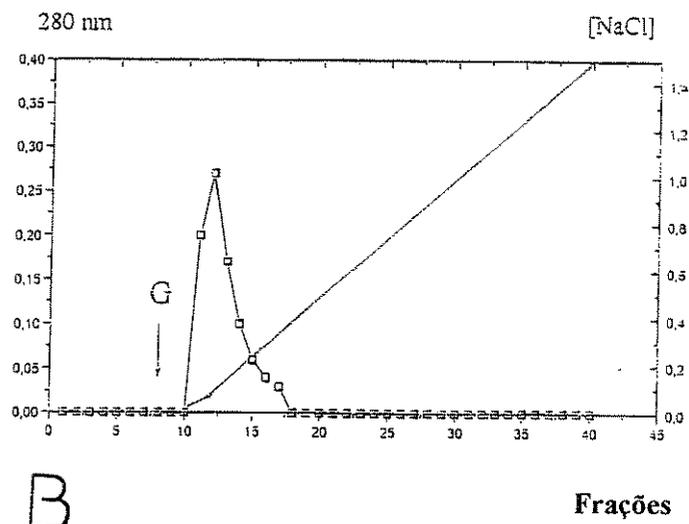
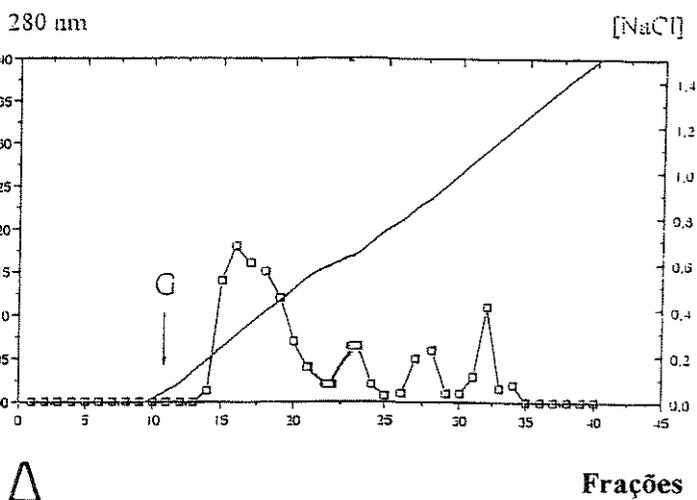
Os cromatogramas apresentam após o início do gradiente (G), em SD4 (figura 2A) um grande pico com absorvância de 0,15 e outros picos menores, enquanto que AD4 (figura 2B) apresenta apenas um único pico. As frações obtidas foram analisadas em SDS-PAGE. Pode ser observado na cartilagem S (figura 2C) uma banda proeminente em condições não redutoras, de 115 kDa, assim como a banda polidispersa de 70 kDa e outras de 62 kDa e 43 kDa. Em condições redutoras o padrão de bandas modifica acentuadamente. A banda de 115 kDa praticamente desaparece, enquanto que a de 70 kDa fica muito evidente com a polidispersidade acentuada. Somente em condições redutoras foram observadas bandas em torno de 30 kDa.

Para a cartilagem alar (figura 2D) o padrão de bandas é bastante distinto. Na ausência de agente redutor podem ser observadas bandas em 70 e 62 kDa e pelo menos duas bandas muito proeminentes em 43 kDa. As bandas em 70 kDa são muito polidispersas. Em condições redutoras o padrão de bandas não se modifica, podendo ser observado que as bandas em 70 kDa são mais delimitadas sem perder o caráter polidisperso, já as bandas em 62 e 43 kDa estão mais nítidas. Não são observadas as bandas em 115 e em 30 kDa.

A figura 3 mostra a análise de frações de três diferentes cromatografias onde foram usadas apenas as alíquotas ricas na proteína de 115 kDa. Após o tratamento com +SH essa proteína desaparece, surgindo bandas na região de 30 kDa.

Figura 2 - Cromatografia das frações SD4 (A) e AD4 (B) em DEAE-Sephacel. G- Início do gradiente de NaCl (0-1,5M). Absorbância em 280 nm.

Eletroforese em gel de SDS-PAGE (gradiente de 4-16%) das frações de SD4 (C) e AD4 (D). Impregnação pela prata. Em paralelo foram utilizados padrões de proteínas com Mr conhecidos: 94 kDa-fosforilase B, 67 kDa-albumina sérica bovina, 43 kDa-ovalbumina e 30 kDa-anidrase carbônica. Estão indicadas as bandas 115 kDa (➔), 70 kDa (◄), 62 kDa (*), 44 kDa (◆) e 30 kDa (●).



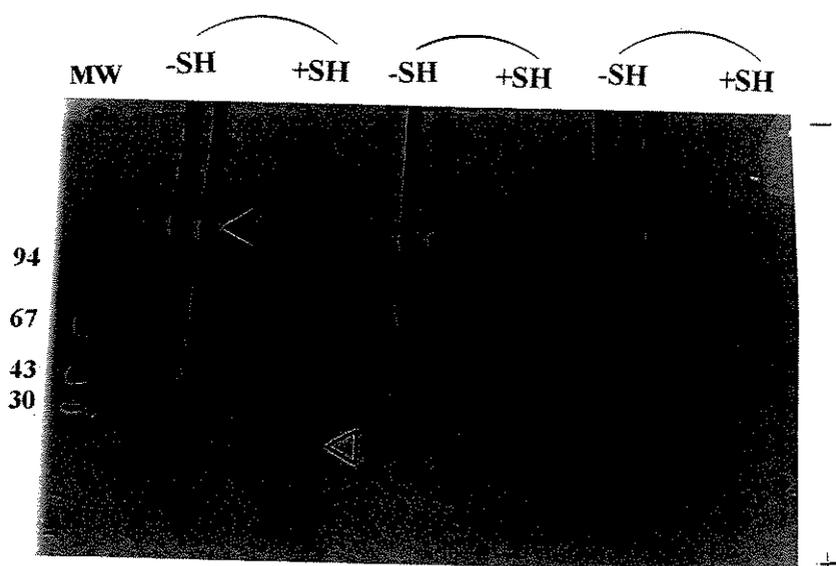


Figura 3 - Eletroforese em SDS-PAGE das frações SD4 após 3 cromatografias em DEAE-Sephacel. As frações ricas na proteína de 115 kDa foram analisadas com e sem β -Me. Impregnação pela prata. Em paralelo foram utilizados padrões de proteínas com Mr conhecidos: 94 kDa-fosforilase β ; 67 kDa-albumina sérica bovina; 43 kDa-ovalbumina e 30 kDa-anidrase carbônica. Estão indicadas as bandas de 115 kDa (\blacktriangleleft) e 30 kDa (\blacktriangleleft).

Análise imunológica para fibromodulim na fração D4

O *immunoblotting* (figura 4) mostra que o FM está presente nas cartilagens S e A como duas bandas em torno de 62 kDa, e ainda com fraca marcação em torno de 90 kDa.

Fração D1

Glicosaminoglicanos na fração D1

Amostras da fração D1 submetidas à β -eliminação, foram analisados em gel de agarose-propileno (Figura 5). Nas frações D1 o GAG principal é o CS para as duas cartilagens.

Análise das cadeias de glicosaminoglicanos

Os cromatogramas obtidos pelo uso de coluna de Sephadex G-75 (figura 6 A) indicam que as cadeias presentes em SD1 e AD1 foram eluídas com K_{av} 0,06 e 0,08 respectivamente. Para as duas cartilagens há um único pico, mas a absorvância em 525 nm/DMMB para S é quase o dobro de AD1. A análise das frações obtidas em PAGE-Tampão Barbital (figura 6 B, C) revela que existe uma população de cadeias de GAGs nas cartilagens analisadas. Estas populações de GAGs apresentam caráter fortemente polidisperso.

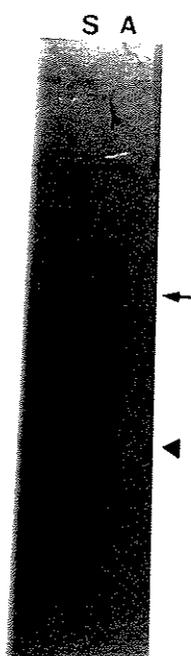


Figura 4 - Reação de “Immunoblotting” das frações ricas no componente de 62 kDa. A reação é positiva (↕) para as duas cartilagens (S e A) em 62 kDa. Há fraca reação positiva em 90 kDa para as duas cartilagens (↙).

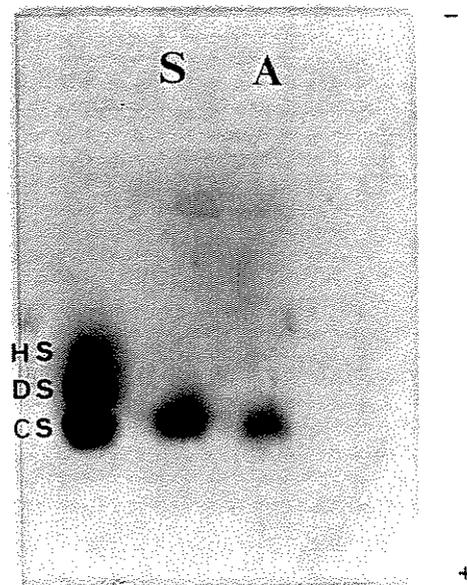
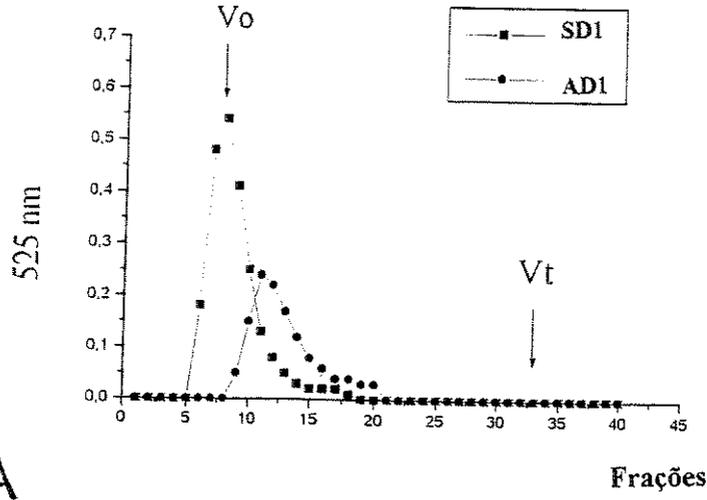
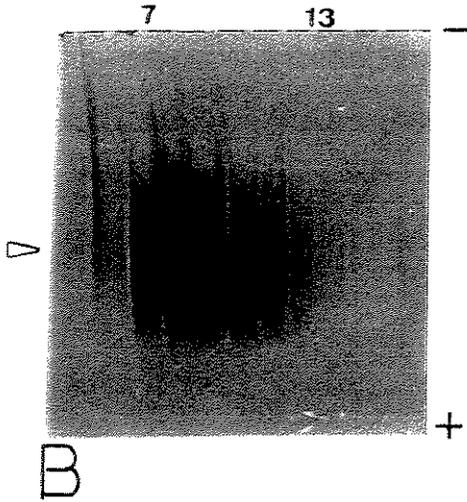


Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose-propileno das frações SD1 e AD1 após β -eliminação. Coloração com AT. Padrões de GAGs conhecidos foram analisados em paralelo: CS, DS e HS.

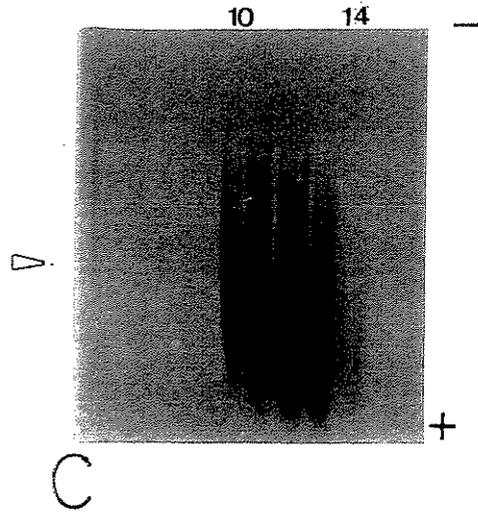
Figura 6 - Perfil cromatográfico das cadeias de GAGs de SD1 e AD1 (A) em Sephadex G-75. Absorbâncias em 525 nm pelo método do DMMB. Em B e C análise em PAGE-Tampão Barbital das cadeias de GAGs de S e A respectivamente. Em paralelo foi analisado o padrão de CS (seta). Coloração com AT. V_0 = volume morto, V_T = volume total.



A



B



C

Os proteoglicanos de S e de A

Nos cromatogramas (figura 7A) pode ser visto que os PGs foram eluídos com K_{av} 0,09, para as duas cartilagens. A análise dos PGs nos géis de agarose-poliacrilamida, indica que as duas cartilagens apresentam uma única população de PGs fortemente polidispersos. Em SD1 (figura 7B) esta população apresenta menor polidispersidade que AD1 (figura 7C).

Fração D2

Na figura 8A está representado o cromatograma da fração AD2 após cromatografia de troca iônica. Após gradiente com NaCl pode ser visto um pico para absorvância de 280 nm e outro em 525 nm. A análise das frações referentes a absorvância em 280 nm, em SDS-PAGE na ausência de agente redutor, (figura 8B), mostrou a presença de duas bandas proeminentes em 140 e 70 kDa com aspecto polidisperso. Com o agente redutor houve o aparecimento de bandas em 43 kDa. Das frações com leitura em 525 nm (figura 8C), analisados em gel de agarose-poliacrilamida, pode ser observada a presença de material de alto peso molecular, que migra muito pouco no gel.

Figura 7 - Cromatografia em Sepharose CL-6B (A) das frações SD1 e AD1. Absorbância em 525 nm pelo método do DMMB. Análise das frações SD1 (B) e AD1 (C) em gel de agarose-poliacrilamida. Coloração com AT. Em paralelo foi analisado o padrão de CS (seta).

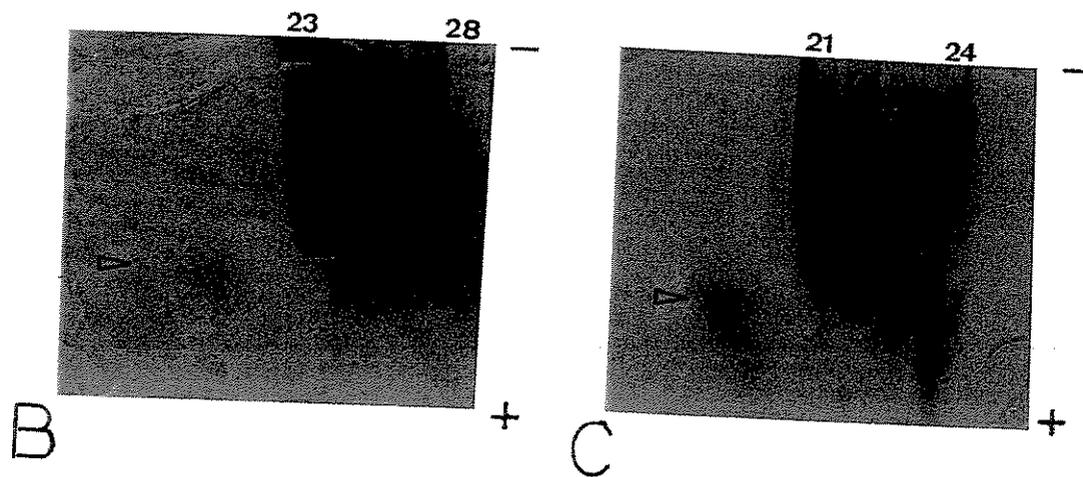
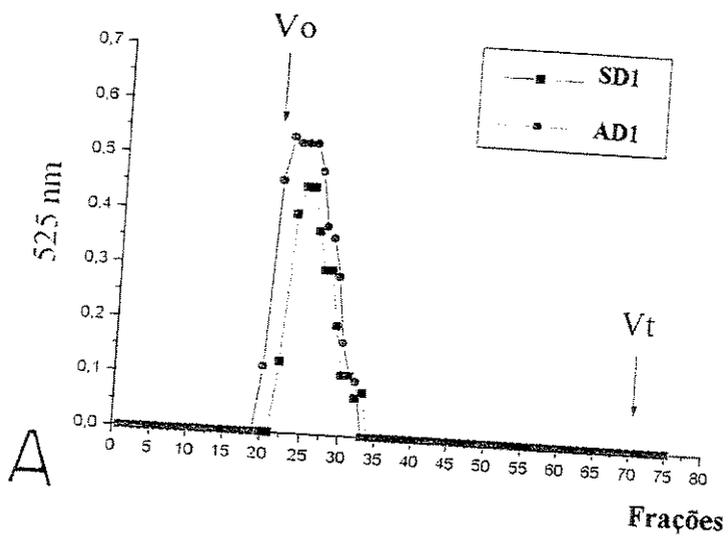
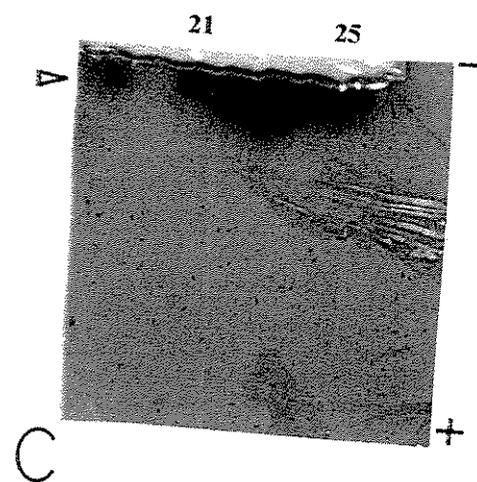
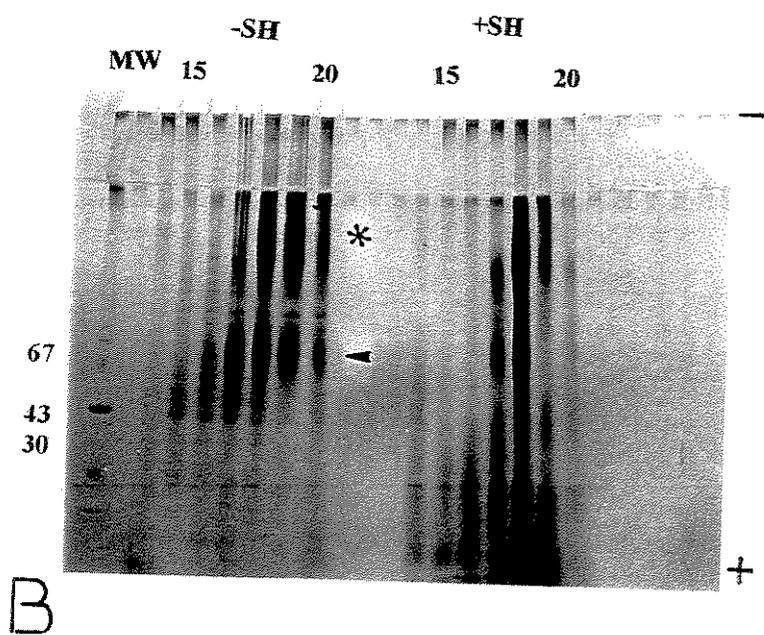
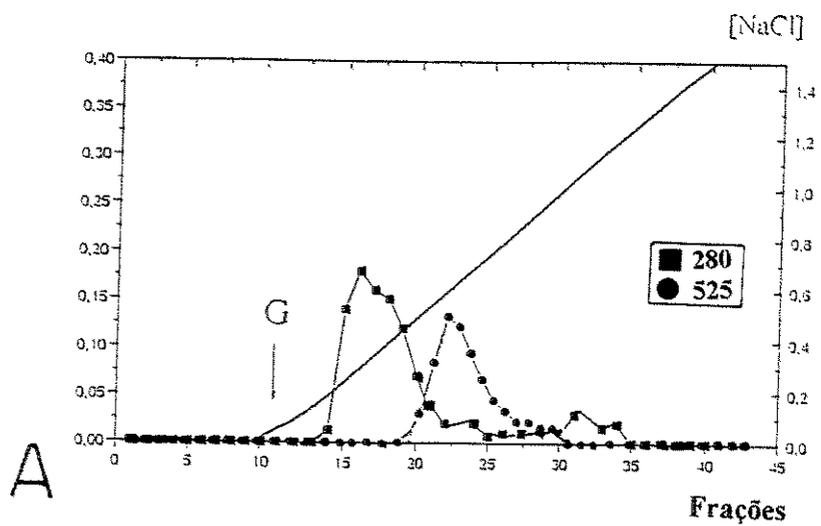


Figura 8 - Cromatograma da fração AD2 em DEAE-Sephacel (A). G indica o gradiente com NaCl (0-1,5M). Leituras em 280 e 525 nm foram feitas para as frações obtidas. SDS-PAGE (gradiente de 4-16%) (B) das frações lidas em 280 nm, na presença e na ausência de β -Me. Padrões de proteínas com Mr conhecidos foram analisados em paralelo: 94 kDa- fosforilase β ; 67 kDa- albumina sérica bovina; 43 kDa- ovalbumina e 30 kDa- anidrase carbônica, estão indicadas as bandas de 90 kDa (*) e de 70 kDa (\blacktriangle). Gel de agarose-poliacrilamida (C) das frações com absorvância em 525 nm. Padrão de CS (seta) foi analisado em paralelo.



II – Análise Morfológica

Cartilagem septal.

A cartilagem do septo é uma grande estrutura contínua de cartilagem hialina, delimitada por um espesso pericôndrio (figura 9 a, b, c). Sobre o pericôndrio, nas áreas voltadas para as cavidades nasais, pode ser encontrada uma mucosa cujo epitélio é caracteristicamente pavimentoso estratificado (figura 9 c). Na submucosa são encontradas glândulas dos tipos seromucoso (figura 9 c). A partir do pericôndrio podem ser observados vasos (canais da cartilagem) que aparentemente cruzam a espessura da cartilagem (figura 19 b).

Nos cortes longitudinais (figura 9 d) é possível observar que os condrócitos estão grosseiramente enfileirados acompanhando o eixo longitudinal do septo

Com o corante XP (figura 9 e) a coloração é fraca na matriz territorial e mais intensa na matriz interterritorial

A matriz se apresenta metacromática na presença de AT pH 4,0 (figura 10 a, b). Há material fracamente corado, não metacromático, entre as fibras do conjuntivo e no conjuntivo dos canais da cartilagem (figura 10 c). A coloração é mais intensa nas áreas correspondentes à matriz territorial (figura 10 a, b e c). Em regiões de contato com os ossos podem ser encontradas áreas semelhantes à fibrocartilagem. Os feixes de colágeno foram evidenciados com PSH, e entre esses feixes são encontrados condrócitos (figura 11 a e b).

O uso de PSH junto com a análise em microscopia de polarização, revela que as fibrilas de colágeno na matriz cartilaginosa, em cortes longitudinais, estão dispostas paralelas ao eixo longitudinal do septo (figura 11 c).

Figura 9 - Cortes de cartilagem septal corados com HE e XP. Em a, b, c, e d coloração com HE, e com XP. Cortes transversais da extremidade do segmento latero-dorsal (a) e do septo (b), mostrando mucosa (★), pericôndrio (▲), cartilagem (✱) e canal da cartilagem (←). Aumentos de 200X. Ainda em corte transversal (c) com aumento de 500X pode ser observado o epitélio (●), a lâmina própria (◆) e as glândulas da submucosa (▶). O corte longitudinal do septo (d) com aumento de 1000 X mostra a disposição dos condrócitos em fileiras. Em e, um corte transversal próximo a região de fibrocartilagem (▶), pode ser observada a matriz interterritorial (★) mais corada que a matriz territorial (→▶). Aumento 1000 X

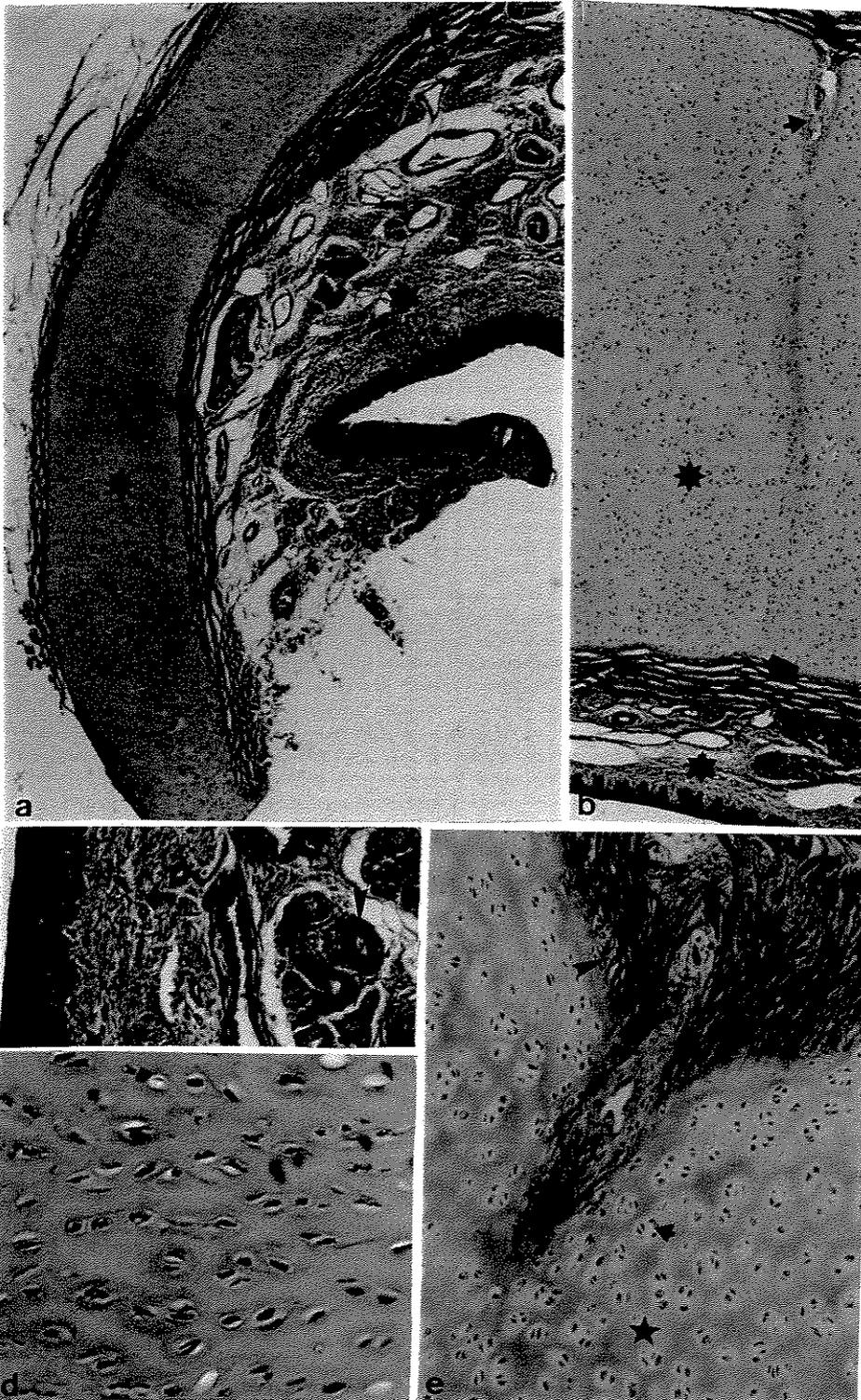


Figura 10 – Cortes transversais de cartilagem septal corados com com AT. Em a corte em região próxima ao pericôndrio (★), observando coloração mais acentuada na matriz territorial dos condrócitos (←). Aumento de 1000 X. Corte em região periférica (b) com metacromasia na matriz, foram coradas outras estruturas da mucosa (★) e pericôndrio (★). Observar o epitélio (←), glândulas (←), material interfibrilar no pericôndrio (◀) e no canal da cartilagem (◀). Aumento 500X. Um detalhe da figura b pode ser visto em c onde podem ser observados os grupos isógenos e sua matriz territorial mais intensamente corada (←), no pericôndrio e no canal da cartilagem há material fracamente corado e não metacromático (◀). Aumento 1000 X.

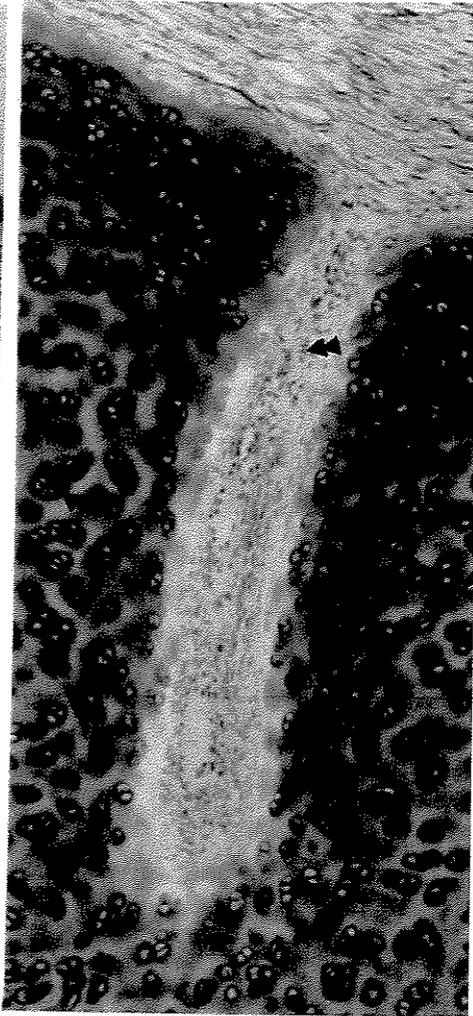
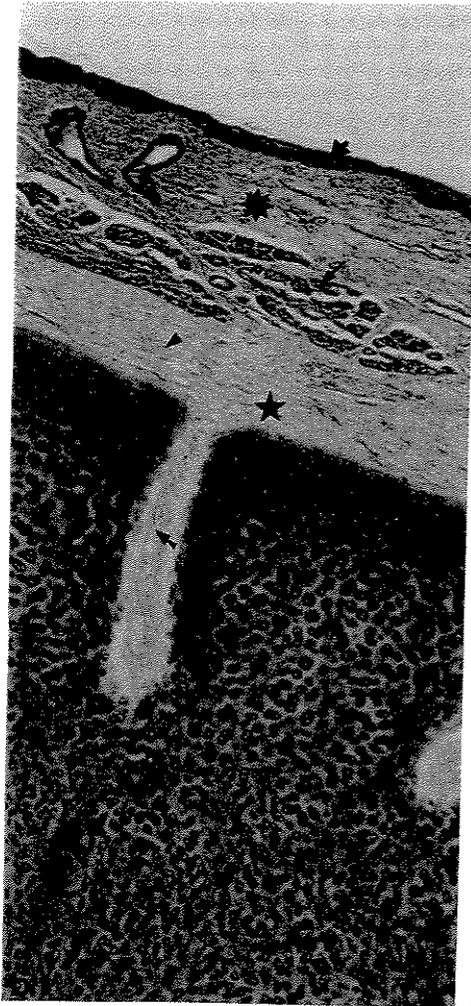
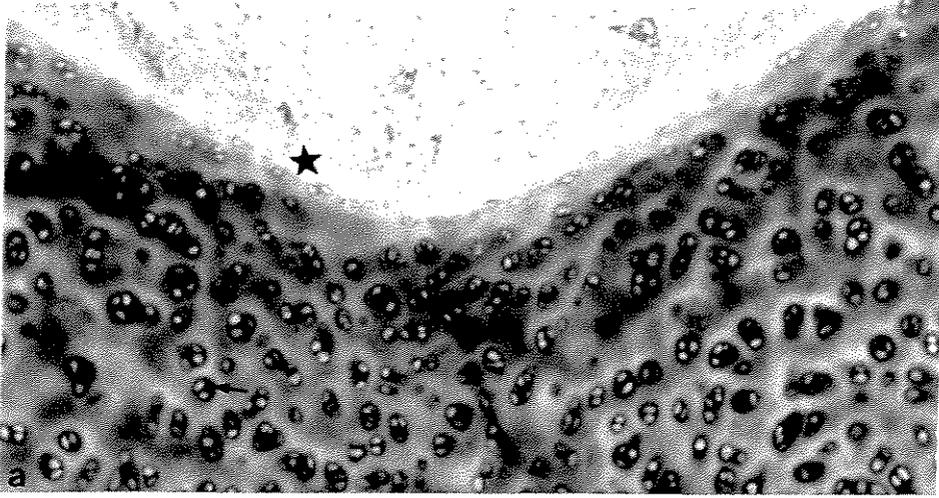
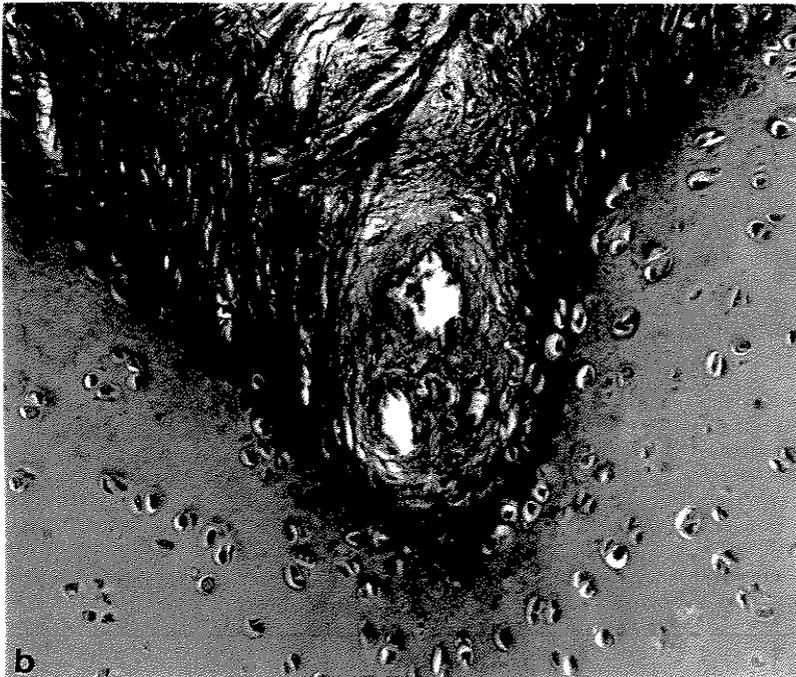
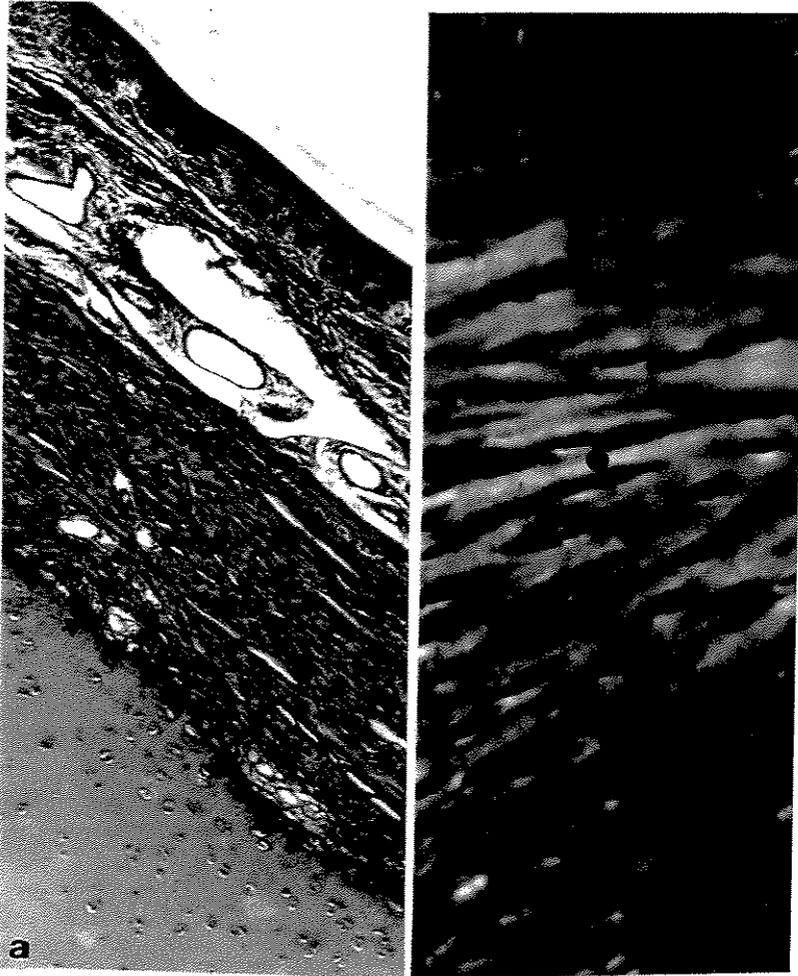


Figura 11 – Cortes de cartilagem septal corados com PSH. Em (a) pode ser observado o espesso pericôndrio (★) e uma região de transição pericôndrio-cartilagem (➔). Aumento 500X. Nas regiões próximas aos ossos (b), podem ser observados os grupos de condrócitos (→) intercalados com feixes de colágeno (✱), sugerindo uma área de fibrocartilagem. Aumento 1000 X. No corte longitudinal do septo (c), com coloração de PSH mais polarização pode ser observada a disposição das fibrilas de colágeno grosseiramente paralelas ao eixo longitudinal do septo (●). Aumento de 1250 X.



Cartilagem alar

A cartilagem alar é uma cartilagem hialina típica (figura 12 a e c), com a presença de grupos isógenos distribuídos ao longo da estrutura cartilaginosa. Um pericôndrio espesso envolve essa cartilagem. Nas áreas voltadas para as cavidades nasais é possível observar uma mucosa cujo epitélio é do tipo plano estratificado por vezes apresentando queratinizações (figura 12 a e b). A coloração com XP revela uma matriz interterritorial fracamente mais corada quando comparada com a matriz territorial (figura 12 d).

Na coloração com AT a matriz da cartilagem alar é fortemente metacromática (figura 13 a). Em aumentos maiores pode ser observado que a coloração na matriz territorial é ainda mais intensa (figura 13 b e c).

Nas regiões de transição entre o espesso pericôndrio e a matriz, a coloração com PSH permite observar regiões semelhantes a fibrocartilagem (figura 14 a, b e c). Nestas áreas também é possível observar canais que podem corresponder a vasos linfáticos (figura 14 c).

Figura 12 – Cortes não orientados da cartilagem alar corados com HE e XP. Em **a**, **b** e **c** coloração com HE. Em **a** observar a cartilagem (★), o pericôndrio espesso (●), a mucosa com epitélio estratificado (✱). Em **c** uma área de cartilagem próxima ao pericôndrio (●), observar os grupos isógenos (→). Aumento 500X. Com aumento de 1000X (**b**) é possível observar o epitélio plano estratificado (✱) com queratinização (▲). Na coloração com XP (**d**) pode ser observado o pericôndrio (●), a matriz interterritorial fracamente corada (*). Aumento 1000X.

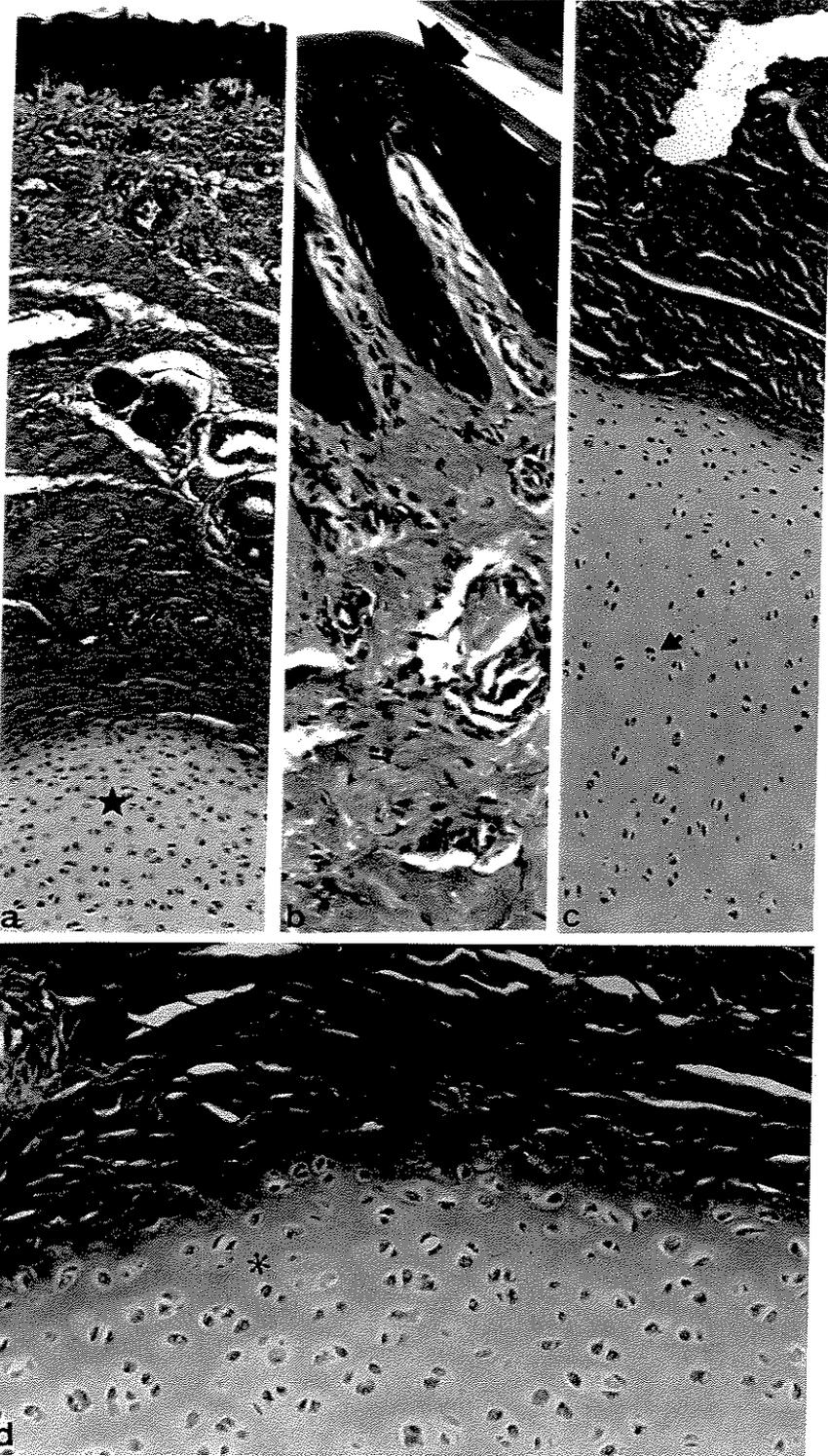
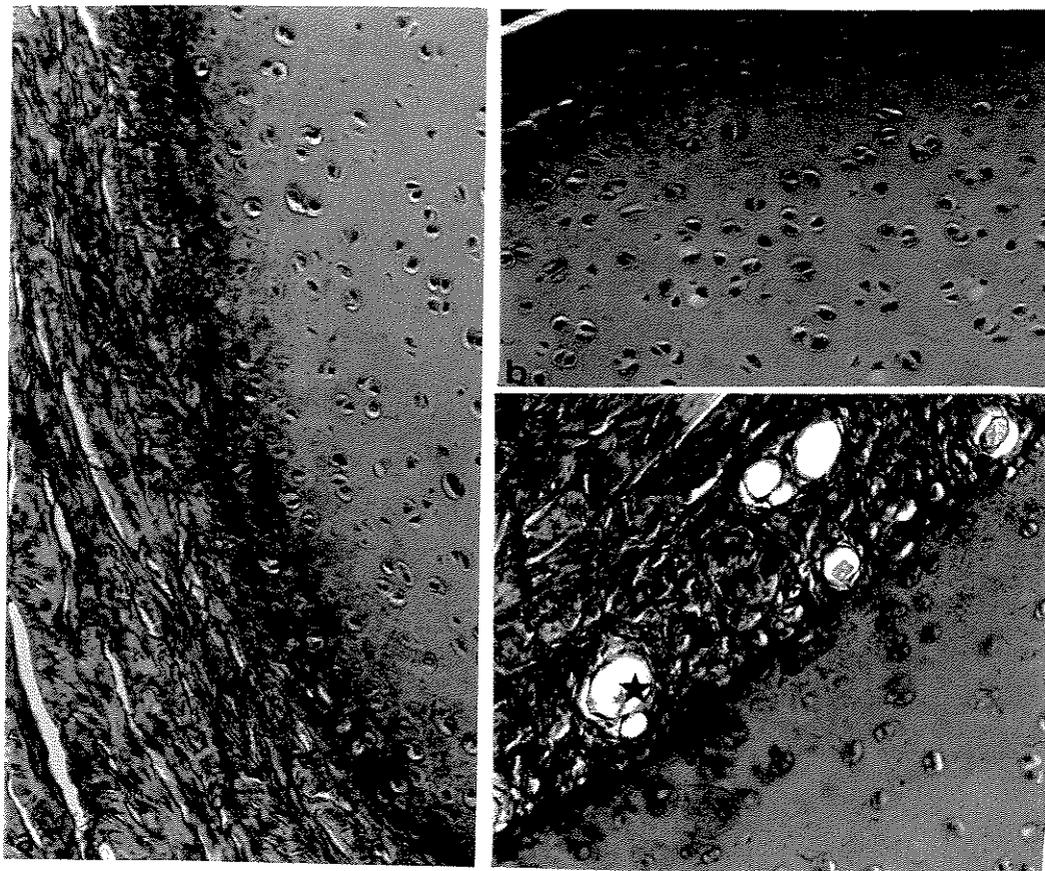


Figura 13 – Cortes da cartilagem alar corados com AT. Em (a) pode ser observada a metacromasia da matriz cartilaginosa (*) assim como a coloração da mucosa (*). Aumento 200X. Em b observar os grupos isógenos (◀). Aumento 500X. Com aumento de 1000X (c) observar que a matriz territorial é ainda mais intensamente corada (◀).

Figura 14 – Cortes da cartilagem alar corados com PSH mostram uma região de transição (**a**) entre o material fibroso do pericôndrio e a cartilagem (★). Aumento 1000X. Em **b** um detalhe da região de contato entre a cartilagem e o pericôndrio, onde pode ser observado alguns condrócitos separados por colágeno (←) caracterizando região de fibrocartilagem. Aumento 1000X. Áreas semelhantes a fibrocartilagem (●) assim como a presença de canais que podem corresponder a vasos linfáticos (★) podem ser vistas em **c**. Aumento 1000X.



Discussão

Análise Bioquímica

As cartilagens alares e a do septo nasal são do tipo hialino. As alares formam uma estrutura ao mesmo tempo forte e maleável para manter as narinas abertas e permitir alguns movimentos.

A cartilagem do septo nasal é de grande importância no desenvolvimento das estruturas craniais durante a fase embrionária e de crescimento de muitos mamíferos (Scott, 1953), sendo muito tardiamente substituída por osso. Ela por si só, forma uma lâmina resistente que ajuda a separar as cavidades nasais.

As propriedades biomecânicas das cartilagens são dependentes dos tipos de moléculas presentes na matriz e da maneira como essas moléculas estão espacialmente organizadas.

Para a extração dos componentes da matriz das cartilagens consideradas foi utilizado o método aceito como eficaz e amplamente empregado, que utiliza o agente caotrópico GuHCl a 4M (Hascall e Sajdera, 1969). A análise das dosagens dos extratos totais de S e A revela diferenças nas quantidades de proteína (maior em A) e ácido urônico e GAGs sulfatados (maiores em S). Entretanto avaliadas com 5 % de significância essas diferenças mostraram-se não significativas. Já a quantificação das frações revela dados esperados para o tipo de procedimento, a concentração de proteínas em D4 e de GAGs em D1 revela a eficiência do procedimento.

O CS é o GAG principal dos extratos totais destas cartilagens. Nas cartilagens articulares já estudadas o CS pode chegar a 10% do peso seco dos tecidos (Heinegård & Paulsson, 1984).

A fração D4 apresentou bandas comuns e bandas distintas entre as cartilagens. A banda de 70 kDa é comum em ambas. É um componente polidisperso que baseado no seu peso molecular relativo pode corresponder ao pequeno PG DEC, onde a polidispersidade é devida às cadeias de GAGs (Heinegård & Paulsson, 1984). Essas bandas são muito evidenciadas em condições redutoras o que pode estar em concordância com os dados que

indicam o fenômeno de auto-agregação e associação com os outros elementos da matriz (Gomes et al, 1996). O DEC interage com as moléculas de colágeno dos tipos I e II (Hedbon & Heinegård, 1993), nas áreas de “gap” do colágeno (Fleischmajer et al, 1991). A ligação é dependente da interação da proteína central e não das cadeias de GAGs embora essas possam desempenhar algum papel nessas interações (Hedbon & Heinegård, 1993). Estas ligações ou interações são importantes para a organização espacial da MEC (Sini et al, 1997). Nos tecidos fibrosos o DEC desempenha papel fundamental na fibrilogênese do colágeno (Hocking et al, 1998). O papel exato do DEC na MEC tem sido avaliado basicamente com estudos *in vitro*. Foi descrito que essa molécula retarda a fibrilogênese do colágeno, resultando ainda em fibras mais finas. Nos tendões de aves a maturação do tecido parece ser dependente da diminuição das associações entre DEC e colágeno (Iozzo, 1998). Porém Kuc e Scott (1997) reportaram resultados importantes (*in vitro*), onde na presença de moléculas de colágeno o DEC retarda a fibrilogênese, porém na presença de fibrilas já formadas e de moléculas de colágeno, o DEC provocaria um aumento da espessura dessas fibrilas.

A análise imunoquímica (dados não apresentados) não esclareceu a presença do DEC. Não podemos afirmar, apesar da forte possibilidade, que este componente de 70 kDa é o DEC, e qual papel que essa molécula estaria desempenhando nesse tecido, sendo um ponto que necessita de mais investigação.

A banda de 62 kDa que está presente em ambas cartilagens, pode corresponder baseado em seu peso molecular relativo ao pequeno PG FM, aspecto este confirmado pela análise imunoquímica. O FM como o DEC, é um componente muito frequente nas cartilagens, sendo um importante elemento de modulação da fibrilogênese do colágeno, *in vitro* (Kresse et al; 1993; Hedlund, 1994; Hocking et al, 1998). Essa molécula está associada tanto ao colágeno tipo I quanto ao tipo II, típico das cartilagens (Roughley et al, 1996)

No material analisado, especialmente em S, as bandas são mais evidentes após tratamento com agente redutor, o que pode indicar associação deste componente com os outros elementos da MEC (Gomes et al, 1996). Tanto o DEC quanto o FM apresentam a

propriedade de interação com o colágeno, porém esta interação se dá em sítios diferentes para cada molécula (Hedbon & Heinegård, 1993).

Mais recentemente o FM e o DEC foram agrupados em uma classe de PGs denominada de pequenos PGs ricos em leucina, que remete a esse aspecto estrutural comum. Observações ultraestruturais tem apresentado que essas moléculas podem se apresentar como estruturas em arco ou “ferradura”, cuja concavidade facilitaria a interação com o colágeno (Iozzo, 1998).

Os resultados da análise imunoquímica, indicam que o FM está representado por duas bandas em torno de 62 kDa. Covizzi (1995) relata achado semelhante em tendões e sugere a presença de isoformas, mas este é um aspecto de difícil definição uma vez que a presença de isoformas para o FM não tem sido referida na literatura mais recente (Iozzo, 1998). A possibilidade de alguma degradação durante os processos extrativos é uma possibilidade a ser considerada. A fraca reação apresentada em torno de 90 kDa pode indicar ainda um grau de associação com elementos de mais alto peso molecular.

As bandas de 44 kDa são especialmente evidentes na cartilagem alar em condições redutoras. Essas bandas podem corresponder baseado em seus pesos moleculares relativos, às proteínas de ligação. Essas proteínas podem aparecer como um grupo de isoformas e estão sujeitas a associação com outros elementos da matriz, particularmente nas ligações dos PGs agregantes com o AH (Neame et al, 1985; Goetnik, 1993). O balanço correto da expressão das proteínas de ligação e do próprio AH são essenciais para a fisiologia das cartilagens (Yang et al, 1998). Em cartilagem Septal existem aparentemente como uma banda única, ao passo que em alar notamos uma banda muito evidente e outra mais fraca, podendo indicar a presença de diferentes populações.

O componente de 115 kDa em D4, é aparentemente o elemento diferenciador entre A e S. A característica mais marcante desse componente é a presença em condições não redutoras e a sua quase eliminação na posição 115 kDa em condições redutoras. A melhor correspondência para esse componente em condições redutoras foi com duas bandas de 30 kDa que evidentemente não corresponderiam, pela soma do Mr ao componente de 115 kDa. Este componente poderia corresponder ao colágeno tipo X, tradicionalmente associado a cartilagens que sofrem mineralização (Poole et al., 1989). Essa idéia foi desafiada por

Sasano et al, (1998) que evidenciaram que em cartilagens traqueais mineralizadas de ratos essa molécula não está presente. Além disso no septo suíno a mineralização da cartilagem não seria esperada nas idades utilizadas nesse trabalho. Uma outra possibilidade foi a condrocalcina, molécula também requerida para os fenômenos de mineralização (Hinek et al, 1987). Entretanto essa molécula é um trímero cujas subunidades tem Mr de 35 kDa (Poole et al, 1984) para corresponder ao componente de 115 kDa seriam necessárias 3 subunidades no mínimo.

Além de colágeno tipo X, que apresenta ainda o problema de não desaparecer em condições redutoras, e a condrocalcina poderíamos considerar outros tipos de colágeno. Eyre & Muir, (1975) caracterizaram como colágeno predominante em septo cartilaginoso suíno o do tipo II, hoje sabe-se que as fibrilas cartilaginosas são heterotípicas onde o tipo II está associado também aos tipos IX e XI (Reichenberger & Olsen, 1996) sendo este último presente também na forma de PG em quantidades mínimas (Diab et al, 1996). Consideramos que o componente de 115 kDa deverá receber análise mais profunda para esclarecer sua associação com alguma proteína já descrita ou para caracterizá-lo como elemento distintivo da cartilagem do septo nasal suíno.

Nas frações D1 o CS é o GAG principal. Em cartilagens nasais bovinas os PGs apresentam 87% de CS (Hascall & Sajdera, 1970). O CS é um componente essencial em macromoléculas como o agregam, onde desempenha funções fundamentais conferindo alto grau de hidratação a esses tecidos (Lohmander, 1988). A hidratação e a turgescência são fundamentais na manutenção da forma das peças cartilaginosas e para suportar pressões internas e externas.

Nas duas cartilagens quando são analisadas as populações de GAGs obtidas após β -eliminação e fracionamento em Sephadex G-75, foi observado para ambas uma única população que chama a atenção pelo forte grau de polidispersidade. Essa polidispersidade pode ser resultado de tamanhos variáveis de cadeias dentro dos limites de uma única população, porém não podemos descartar o número de radicais sulfato (Hascall & Sajdera, 1970; Hascall & Riollo, 1972; Heinegård, 1977; Heinegård & Paulsson, 1984). A elevada absorvância observada em S em relação a A sugere um maior número de radicais aniônicos disponíveis para a complexação com o DMMB. Quando analisamos o Kav podemos inferir

que S possui uma população de maior M_r que A, portanto a população de GAGs em S é maior e possivelmente mais sulfatada que A.

Nas duas cartilagens são observadas uma população de PGs fortemente polidispersos. Esse aspecto polidisperso é dado pela variação no tamanho e composição do esqueleto protéico e principalmente das cadeias de GAGs. Em cartilagem articular humana de adulto, existe uma heterogeneidade na população de monômeros (Hardingham & Bayliss, 1990), enquanto que em cartilagens nasais bovinas foram relatadas mais de uma população (Robinson & Hopwood, 1973)

A presença de diferentes populações de PGs com variações no tamanho e polidispersidade pode estar correlacionada às diferenças nas forças biomecânicas aplicadas ao tecido (Inerot & Heinegård, 1983). Diferentes frações foram detectadas em articulações metacarpo-falangianas de bovinos (Swann et al, 1979). Os mesmos resultados foram encontrados em úmero de bovinos (Rosemberg et al, 1976) e em joelhos de coelhos e cães (Manicourt et al, 1986).

Segundo Esquisatto e colaboradores (1997), as diferentes populações encontradas na articulação de joelho bovino revelam moléculas sintetizadas mediante ação adaptativa do tecido à dinâmica da junta.

No caso das cartilagens estudadas a presença de uma população de PGs fortemente polidispersa pode revelar uma certa homogeneidade na fisiologia das cartilagens que são basicamente imóveis e pouco sujeitas a pressões externas.

A fração D2 de A apresentou resultados semelhantes aos descritos para as cartilagens do tibiotarso e tarsometatarso de frango, onde após cromatografia de troca iônica foram detectados pequenos PGs e PGs de alto peso (Gomes, L. comunicação pessoal). Na fração D2 de diferentes regiões de joelho bovino também foram encontradas duas populações com M_r de 70 e 200 kDa, exibindo características de DEC e BG respectivamente e a presença de DEC foi confirmada por "immunoblotting" (Gomes L. comunicação pessoal). As bandas polidispersas reveladas em SDS-PAGE podem corresponder aos pequenos PGs DEC e BG. O BG, outro componente presente em várias matrizes, podendo estar implicado a fenômenos de regulação (Heinegård & Sommarin, 1987; Fischer, 1993). Esses componentes são normalmente detectados em D4 mas podem

ser também encontrados em D1, tem sido sugerido um fenômeno de agregação entre essas moléculas e os monômeros de PG agregantes (Roughley & White, 1989; Choi et al, 1989). Nos géis de agarose-PAGE, foi detectada a presença de PGs de alto peso em AD2, porém em SD2 não foi possível detectar pequenos PGs nem grandes PGs, sugerindo uma distinção entre as duas cartilagens. O significado da presença desses componentes em AD2, porém, ainda está por ser esclarecida.

Análise Morfológica

As cartilagens estudadas quando observadas macroscopicamente são peças claras, e dependendo da espessura da área, são translúcidas, o que permite a classificação como do tipo hialino (Junqueira & Carneiro, 1999). Microscopicamente ambas são delimitadas por um espesso pericôndrio, sobre o qual, nas áreas voltadas para as cavidades nasais, repousa uma mucosa que possui um epitélio pavimentoso estratificado e uma lâmina própria com glândulas mucosas e serosas.

A organização histológica da cartilagem A é muito semelhante ao que é descrito classicamente para as cartilagens do tipo hialino, onde podem ser observado os agrupamentos de condrócitos formando os grupos isógenos característicos (Junqueira & Carneiro, 1999). Nos aspectos gerais essa cartilagem pode ser comparada aos anéis cartilaginosos traqueais.

A cartilagem S apresenta características mais distintas. Nos cortes transversais é possível identificar alguns grupos isógenos principalmente na periferia da cartilagem, e nos cortes longitudinais estão orientados em fileiras grosseiramente paralelas ou ligeiramente entrecruzadas. A matriz interterritorial também aparenta estar ordenada em lâminas paralelas. Este aspecto é melhor percebido quando se aplica a análise em microscopia de polarização com PSH (Junqueira et al, 1979). Este método permite a análise do direcionamento das fibrilas colágenas (Kaab et al, 1998). A disposição dos componentes fibrilares em feixes direcionados é observada especialmente nas cartilagens hialinas que recobrem as superfícies articulares (Kaab et al, 1998). Essa organização é importante para a função de dissipação de forças exercida nas cartilagens (Bowker et al, 1998). Porém o septo

nasal suíno aparentemente exerce uma função estática, não estando sujeito a forças compressivas. É possível que esta disposição das fibrilas reflita o sentido de crescimento dessa cartilagem, ou ainda ofereça uma compactação forte o suficiente para a função esquelética da peça.

Outro aspecto importante observado mais frequentemente em S, é a presença de tecido cujas características são compatíveis com fibrocartilagem. Esse tecido está presente nas áreas periféricas, junto ao tecido fibroso das regiões dorsais e ventrais, exatamente nas áreas de contato com osso. As fibrocartilagens são tecidos de transição, com propriedades intermediárias entre o tecido conjuntivo denso e a cartilagem hialina. Muito frequentemente os condrócitos formam fileiras alongadas. A matriz pode conter grande quantidade de colágeno, o tipo I sendo o mais abundante, mas o do tipo II também é encontrado, principalmente na matriz territorial (Benjamin & Evans, 1990). As fibrocartilagens são muito frequentes em zonas de contato ou ancoragem tendão-osso, e nos tendões sujeitos às forças de compressão (Carvalho et al, 1994). Nas cartilagens S, considerando a região onde é encontrada, é possível que esse tecido transicional ajude na função de ligação entre a superfície cartilaginosa e o osso. A cartilagem A também possui áreas semelhantes à fibrocartilagem próximas ao pericôndrio, mas são menos pronunciadas que aquelas de S. Nesse caso, é possível que a presença desse tecido reflita uma área puramente transicional entre o espesso pericôndrio e a cartilagem propriamente dita.

A cartilagem septal possui caracteristicamente vasos que aparentemente cruzam a espessura das peças, que são conhecidos como canais da cartilagem (Haines, 1933). Esses canais são importantes para a nutrição do tecido, especialmente quando as peças cartilaginosas são muito espessas (Skawinna, 1994). É interessante observar que alguns autores insistem em classificar as cartilagens como tecidos avasculares. A menos que esses autores estejam se referindo a ausência de redes capilares, não será correto afirmar que não há nutrição via vasos para as cartilagens.

O uso dos corantes XP e AT revela a presença de proteínas totais e GAGs totais respectivamente (Mello & Vidal, 1980). Nas cartilagens estudadas podemos observar as imagens obtidas com esses dois corantes parecem invertidas ou em negativo, pois enquanto o XP cora mais intensamente a matriz interterritorial o AT cora mais intensamente a matriz

territorial, o que pode ser compatível com uma maior quantidade de GAGs próximas aos condrócitos. A matriz associada ao condrócito faz parte do complexo chamado condron (Poole, 1997). Estudos imunohistoquímicos confirmaram a presença de monômeros de agrecom e uma grande concentração de PGs sulfatados (Poole, 1997). A presença de grandes concentrações de AH e proteínas de ligação (Ratcliffe & Mow, 1996) sugere um confinamento pericelular inicial dessas moléculas podendo ser importante para a montagem dos complexos AH/agrecom/proteínas de ligação (Poole, 1997).

Dentre os pequenos PGs, o DEC e o BG têm sido detectados pericelularmente e podem estar desempenhando funções regulatórias, especialmente as associadas a fibrilogênese do colágeno (Miosge et al, 1994).

A presença desses componentes com muitos grupos aniônicos certamente contribuem para coloração e a metacromasia evidentes da matriz territorial.

Na matriz interterritorial das cartilagens hialinas o colágeno tipo II forma estruturas fibrilares (Eyre et al, 1992). A presença desse material pode justificar a coloração com o XP mais evidente nessa área.

A princípio, com base no que foi discutido e de acordo com os resultados, podemos sugerir que na matriz interterritorial das cartilagens estudadas especialmente em S há mais material protéico fibrilar (colágeno) que PGs. Este aspecto seria menos intenso em A onde podemos observar forte coloração e metacromasia com AT também na matriz interterritorial.

Conclusões

1. O tipo de GAG predominante nas duas cartilagens é o CS.
2. O pequeno PG FM mostrou em teste imunoeletróforético duas bandas em torno de 62 kDa o que pode indicar a presença de isoformas além disso apresentou fraca reação em 90 kDa o que pode indicar associação com outros componentes.
3. Em AD2, mas não em SD2, foram encontrados pequenos PG do tipo DEC e BG possivelmente associados a PG de alto peso não agregantes.
4. A cartilagem S apresentou a proteína de 115 kDa, que não foi detectada em A, podendo ser um componente tecido-específico.
5. As frações SD1 e AD1 apresentaram uma população de PGs fortemente polidispersa, porém menos uniforme em SD1.
6. Sob aspecto estrutural as duas cartilagens são hialinas, porém em S os condrócitos estão ordenados ao longo do eixo maior da peça cartilaginosa. Em S a presença de canais de cartilagem é proeminente, refletindo provavelmente a necessidade de irrigação maior para essa peça.
7. Em S o colágeno apresentou-se ordenado acompanhando o maior eixo da peça, refletindo possivelmente a disposição dos condrócitos.
8. A coloração com AT nas duas cartilagens foi maior na matriz territorial ao passo que com XP a coloração foi mais intensa na matriz interterritorial. Isso pode reletir a presença ou disponibilidade de grupos de GAGs mais próximos aos condrócitos.

Resumo

Este trabalho teve por objetivo caracterizar alguns aspectos dos componentes da matriz extracelular de duas cartilagens do nariz suíno, as alares e a septal, além disso caracterizar a organização histológica e alguns aspectos histoquímicos. Para extração de componentes da matriz foi utilizado o agente caotrópico Gu-HCl. O glicosaminoglicano predominante para as duas cartilagens é o condroitim sulfato. Após ultracentrifugação dos extratos a fração D4 das duas cartilagens foi fracionada em DEAE-Sephacel usando gradiente de NaCl. A análise em SDS-PAGE, para as duas cartilagens mostrou semelhanças com a presença de fibromodulim, decorim e proteínas de ligação. Somente a cartilagem septal apresentou o componente de 115 kDa que possivelmente aparece como subunidades de 30 kDa após a ação de agente redutor. Para a determinação das populações de glicosaminoglicanos foi utilizado fracionamento com Sephadex G-75, seguida de análise em PAGE-Barbital. As duas cartilagens apresentaram uma população fortemente polidispersa. As populações de proteoglicanos foram analisadas após fracionamento em Sepharose CL-6B seguida de análise das amostras em gel agarose-poliacrilamida. As duas cartilagens apresentam uma população fortemente polidispersa, sendo que a septal é menos uniformemente polidispersa que a alar. O fracionamento de AD2 em DEAE-Sephacel, e a análise em SDS-PAGE e agarose-poliacrilamida, mostraram a presença dos pequenos proteoglicanos biglicam e decorim provavelmente associados aos grandes proteoglicanos.

A cartilagem septal apresenta os condrócitos grosseiramente enfileirados acompanhando o eixo maior da cartilagem, enquanto em alar os condrocitos estão dispostos caracteristicamente em grupos isógenos. Para a histoquímica utilizou-se Xylidine Ponceau para proteínas totais, Picrosirius-Hematoxilina para colágeno, Azul de Toluidina para glicosaminoglicanos totais e Azul de Alcian em pH 2,5 e 1,0 para glicosaminoglicanos sulfatados e carboxilados. Os glicosaminoglicanos totais estão mais evidenciados na matriz territorial ao passo que as proteínas totais são mais evidenciadas na matriz interterritorial. O colágeno em cartilagem septal está grosseiramente organizado acompanhando o eixo longitudinal da peça entre as fileiras de condrócitos.

Abstract

The objective of the present study was to characterize some aspects of the extracellular matrix components of the alar and septal cartilage of the nose of swine and to examine the histological and histochemical aspects of the two types of cartilage. The kaotropic agent Gu-HCl was used to extract the matrix components. The predominant glycosaminoglycan in the two cartilages was chondroitin sulfate. After ultracentrifugation, the D4 fraction of the septal and alar cartilages was fractionated on DEAE-Sephacel using a NaCl gradient. SDS-PAGE analysis showed similarities between the two cartilages, with the presence of fibromodulin, decorin and binding proteins. Only the septal cartilage presented the 115 kDa component, which possibly appears as 30 kDa subunits after the action of the reducing agent. The glycosaminoglycan populations were determined by fractionation on Sepharose CL-6B followed by analysis of the samples on the agarose-polyacrilamide gel. The two cartilages presented a strongly polydispersed population, which was less uniformly polydispersed in the septal than in the alar cartilage. AD2 fractionation on DEAE-Sephacel and sample analysis by SDS-PAGE and agarose-polyacrilamide electrophoresis showed the presence of the small proteoglycans biglycan and decorin, possibly associated with the large proteoglycans.

The septal cartilage presents chondrocytes roughly arranged in rows accompanying the widest axis of the cartilage, whereas the alar cartilage presents chondrocytes characteristically arranged in isogenic groups. Histochemistry was performed using Xylidine Ponceau for total proteins, Picrosirius-Hematoxylin for collagen, Toluidine Blue for total glycosaminoglycans. And alcian blues, pH 2.5 and pH 1.0, for sulfated and carboxylated glycosaminoglycans. Total glycosaminoglycans are more clearly visible in the territorial matrix, whereas total proteins are more clearly visible in the interterritorial matrix. The collagen of the septal cartilage is roughly organized along the longitudinal axis of the specimens between the chondrocytes rows.

Bibliografia

- ANAGNOSTIDES, S. J.; ALETRAS, A. J.; LYMBERY, P. & TISIGANOS, C. P. Isolation and characterization of two glycoproteins hyaline from cartilage. **Eur. J. Biochem.** 193: 905-912, 1990.
- AYAD, S.; BOOT-HARFORD, R. P.; HUMPHRIES, M. J.; KADLER, K. E. & SHUTTLEWORTH, C. A. Extracellular matrices. In: Ayad, S.; Boot-Harford, R. P.; Humphries, M.; Kadler, K. & Shuttleworth, C. *The extracellular matrix facts book*. 1ª ed. London: Ac. Press, 1994. Pp 8-16.
- BAYLISS, M. & ROUGHLEY, P. The properties of proteoglycan prepared from human articular cartilage by using associative caesium chloride gradients of high and low starting densities. **Biochem. J.** 232: 11-117, 1985.
- BEIGUELMAN, B. *Curso prático de bioestatística*. 2ª ed. Sociedade Brasileira de genética., 1991. 231 p.
- BENJAMIN, M. & EVANS, E. Fibrocartilage. **J. Anat.** 171: 1-15, 1990.
- BLOOM, W. & FAWCETT, D. Cartilage. In: Bloom, W & Fawcett, D. *A Textbook of histology*. 11ª ed. Philadelphia. Saunders, 1986. Pp 188-198.
- BLUM, B.; BETER, H. & GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**. 8: 93-99, 1987.
- BOUDREAU, N.; MYERS, C. & BISSEL, M. J. From laminin to lamin: regulation of tissue specific gene expression by ECM. **Trends in Cell Biol.**, 5: 1-4, 1995.
- BOWKER, R.; WULFEN, K.; SPRINGER, S. & LINDER, K. Functional anatomy of the cartilage of the distal phalanx and digital cushion in the equine foot and a hemodynamic flow hypothesis of energy dissipation. **Am J. Vet. Res.** 59: 961-968, 1998.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254, 1976.
- BRODSKY, B. & RAMSHAW, J. A M. The collagen triple helix structure. **Matrix Biol.** 15: 545-554, 1997.
- BROWN, A. Determination of pentose in presence of large quantities of glucose. **Arch. Biochem.** 11: 269-278, 1946.

- BUSCHAMANN, M.; GLUZBAND, Y.; GRODZINSKY, A.; KIMURA, J. & HUNZIKER, E. Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. **J. Orthop. Res.** 10: 745-758, 1992.
- CAPLAN, A J. Cartilage. **Sc. American.** 251(4): 89-94, 1984.
- CARNEY, S. L. & MUIR, H. The structure and function of cartilage proteoglycans. **Physiol. Rev.** 68(3): 858-910, 1988.
- CARVALHO, H. F.; TABOGA, S. R. & LINO-NETO, J. Microfibrils: neglected components of pressure bearing tendons. **Ann. Anat.** 176: 155-159, 1994.
- CATERSON, B. & BAKER, J. The link proteins as specific components of cartilage proteoglycans aggregates in vivo. **J. Biol. Chem.** 259 (7): 2394-2399, 1979.
- CHOI, H. U.; JOHNSON, T. L.; PAL, S.; TANG, L. H.; ROSENBERG, L. C. & NEAME, P. J. Characterization of dermatan-sulphate proteoglycans, Ds-PGI and DS-PGII, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-sepharose chromatography. **J. Biol. Chem.** 264: 2876-2884, 1989.
- COTTA-PEREIRA G.; DEL-CARO, M. & MONTES, G. Distribution of elastic system fibers in hyaline and fibrous cartilages of the rat. **Acta Anat.** 119: 80-85, 1984.
- COVIZI, D. Estudo sobre a matriz extracelular de diferentes regiões de três tendões de ratos. Campinas, 1995. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- DIAB, M.; WU, J. & EYRE, D. Collagen type IX from human cartilage: a structural profile of intermolecular cross-linking sites. **Biochem. J.** 314: 327-332, 1996.
- DIETRICH, C. P. & DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal. Biochem.** 70: 645-647, 1976.
- EEROLA, I.; UUSITALO, H.; ARO, H. & VUARIO, E. Production of cartilage collagens during metaphyseal bone healing in the mouse. **Matrix Biol.** 17: 371-320, 1998.
- EGERBACHER, M.; KRESTAN, R. & BOCK, P. Morphology, histochemistry and differentiation of the cat's epiglottic cartilage: a supporting organ composed of elastic cartilage, fibrous cartilage, myxoid tissue, and fat tissue. **Anat. Rec.** 242: 471-482, 1995.
- ESQUISATTO, M. A. M.; PIMENTEL, E. R. & GOMES, L. Extracellular matrix composition of different regions of the knee joint cartilage in cattle. **Ann. Anat.** 179: 433-437, 1997

- EYRE, D. & MUIR, H. The distribution of different molecular species of collagen in fibrous, elastic and hyaline cartilages of pig. **Biochem. J.** 151: 595-602, 1975.
- EYRE, D.; WU, J. & WOODS, P. Cartilage specific collagens: structural studies. In: Kuettner, Schleyerbach, Peyron & Hascall. *Articular cartilage and osteoarthritis*. NY: Raven., 1992. Pp 119-131.
- FARNDALE, R. W.; BUTTLE, P. J. & BARRET, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **BBA.** 883: 123-177, 1986.
- FELISBINO, S.; BORGES, L.; TABOGA, S. Developmental changes on the distribution of elastic system fibers in the xiphoid cartilage of *Gallus gallus domesticus*. **Annals of 3th Brazilian Symposium on Extracellular Matrix**, Angra dos Reis-RJ, 1995 (a), p. 38.
- FELISBINO, S.; TABOGA, S. & ANDRÉ, J. Microtendon structure and elastic system microfibrils in pectoral muscle inserction. **Acta Microsc.** 4: 178, 1995 (b).
- FIELDS, G. B. The collagen triple helix: correlation of conformation with biological activities. **Connective Tissue Res.** 31 (3): 235-243, 1995.
- FISCHER, L. W. Biglycan (BGN). In. **Guidebook of extracellular matrix and adhesion proteins** (Kreiss, T. & Vale, R. ed.) pp: 48-49. Oxford press, Oxford, 1993.
- FLEISCHMAJER, R.; FISHER, L. W.; MCDONALD, E. D.; JACOBS JR., L.; PERLISH, J. S. & TERMINE, J. D. Decorin interacts with fibrillar collagen of embrionic and adult human skin. **J. Struct. Biol.** 106: 82-90, 1991.
- FRANZÉN, A.; INEROT, S.; HYDEMPS, S-O & HEINEGÅRD, D. Variations in the composition of bovine hip articular with distance from articular surface. **Biochem. J.** 195: 535-543, 1981.
- GOETNIK, P. F. Link proteins. In: Kreiss, T. & Vale, R. **Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins**. Oxford: Oxford press. 1993. pp: 70-72.
- GOMES, L. & PIMENTEL, E. R. Detection of small proteoglycan present in xiphoid cartilage regions submitted to different biomechanical forces. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 27 (9): 2177-2124, 1994.
- GOMES, L.; ESQUISATTO, M. A M.; BELLINE, P. & PIMENTEL, E. R. 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, 1996.

- HAGG, P.; REHN, M.; HUHTALA, P.; VAISANEN, T.; TANMINEN, M. & PIHLAJANIEMI, T. Type XII collagen is identified as a plasma membrane protein. **J. Biol. Chem.** 273 (25): 15590-15597, 1998.
- HAINES, R. Cartilage canals. **J. Anat.** 68: 45-64, 1933.
- HALFTER, W.; DONG, S.; SCHURER, B. & COLE, G. Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. **J. Biol. Chem.** 272 (39): 25404-25412, 1998.
- HARDINGHAM, T. E.; BERDMORE-GRAY, M.; DUCHAM, D. G. & RATCLIFE, A. Cartilage proteoglycans. In: Evered, D. & Whelan, J. **Functions of proteoglycans.** CIBA Foundation Symposium. London, 1986. pp 30-46.
- HARDINGHAM, T. E. & BAYLISS, M. Proteoglycans of articular cartilage: changes in aging and in joint disease. **Seminars in Arthritis and Rheumatism** 20(3): 12-33, 1990.
- HARDINGHAM, T. E. & FOSANG, A. J. Proteoglycans: many forms and many functions. **FASEB J.** 6(3): 861-970, 1992.
- HARE, W. Sistema respiratório do suíno. In: Sisson & Grossman. *Anatomia dos Animais Domésticos*. 1ª ed. Brasileira. RJ: Interamericana, 1981. Cap 41, 1203-1205.
- HASCALL, V. C. & SAJDERA, S. W. Protein polysaccharide complex from bovine nasal cartilage: the function of glycoprotein in the formation of aggregates. **J. Biol. Chem.** 244: 2384-2396, 1969.
- HASCALL, V. C. & SAJDERA, S. W. Physical properties and polydispersity of proteoglycans from bovine nasal cartilage. **J. Biol. Chem.** 245: 4920-4930, 1970.
- HASCALL, V. C. & RIOLO, K. L. Characteristics of the protein keratan sulfate core and keratan sulphate prepared from bovine nasal cartilage proteoglycan. **J. Biol. Chem.** 247(14): 4529-4538, 1972.
- HASCALL, V. Proteoglycans: structure and function. In: Ginsburg & Robins. *Biology of Carbohydrates*. NY: Wiley, 1981. Vol 1, pp: 1-49.
- HECHT, J. T.; NELSON, L. D.; CROWDER, E.; WANG, Y.; ELDER, F. F. B.; HARRISON, W. R.; FRANCOMANO, C. A.; PRANGE, C. K.; LENNON, G. G.; DEERE, M. & LAWLER, J. Mutations in exon 170 of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) cause pseudoachondroplasia. **Nat. Genet.** 10: 325-329, 1995.
- HECHT, J.; DEERE, M.; PUTNAN, E.; COLE, W.; VERTEL, B.; CHEN, H. & LAWLER, J. Characterization of cartilage oligomeric protein (COMP) in human

- normal and pseudoachondroplasia musculoskeletal tissue. **Matrix Biol.** 17: 269-278, 1998.
- HEDBON, E. & HEINEGÅRD, D. Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. **J. Biol. Chem.** 268 (36): 27307-27312, 1993.
- HEDLUND, H.; MENGARELLI-WIDHOLM, S.; HEINEGÅRD, D.; REINHOLT, F. D. & SWENSSON, O. Fibromodulin distribution and association with collagen. **Matrix Biol.** 14: 227-233, 1994.
- HEINEGÅRD, D. Polydispersity of cartilage proteoglycans. Structural variations with size and buoyant density of the molecules. **J. Biol. Chem.** 256(6): 1980-1986, 1977.
- HEINEGÅRD, D. & PAULSSON, M. Structure and metabolism of proteoglycans. In: Piez, K. A. Reddi, A. H. *Extracellular matrix biochemistry*. NY: Elsevier ed, 1984, Cap. 8. Pp: 277-328.
- HEINEGÅRD, D.; WIESLANDER, J.; SHEEDAM, J. PAULSSON, M. & SOMMARIN, Y. Separation and characterization of two populations of aggregating proteoglycan from cartilage. **Biochem. J.** 225: 95-106, 1985.
- HEINEGÅRD, D.; LARSON, T.; SOMMARIN, Y.; FRANZÉN, A.; PAULSSON, M. & HEDBON, E. Two novel matrix proteins isolated from articular cartilage show wide distribution among connective tissues. **J. Biol. Chem.** 261: 13866-13972, 1986.
- HEINEGÅRD, D. & SOMMARIN, Y. Proteoglycans: an overview. **Meth Enzymol.** 144: 305-372, 1987.
- HEINEGÅRD, D. & PAULSSON, M. Cartilage. **Meth. Enzymol.** 145: 336-363, 1987.
- HEINEGÅRD, D. & OLDBERG, A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. **FASEB. J.** 3(9): 2042-2051, 1989.
- HEINEGÅRD, D. & PIMENTEL, E. R. Cartilage matrix proteins. In: Knetner. *Cartilage and Osteoarthritis*. NY: Raven press, 1992. pp: 95-111.
- HIBON, J. C. & ANASTASIADIS, P. A. Acrylamide gel electrophoresis of acidic mucopolysaccharides. **Anal. Biochem.** 31: 51-52, 1969.
- HINEK, A.; REINER, A. & POOLE, A. R. The calcification of cartilage matrix in chondrocyte culture: studies of the c-propeptide of type II collagen (chondrocalcin). **J. Cell. Biol.** 104: 1435-1441, 1987.

- HOCKING, A.; SHINOMURA, T. & MCQUILLAN, D. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. **Matrix Biol.** 17: 1-19, 1998.
- INEROT, S. & HEINEGÅRD, D. Bovine tracheal cartilage proteoglycans. Variations in structure and composition with age. **Collagen Relat. Res.** 3: 245-262, 1983.
- IOZZO, R. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. **Ann. Rev. Biochem.** 67: 609-652, 1998.
- JUNQUEIRA, L.; BIGNOLA, G. & BRENTANI, R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J.** 11: 447-455, 1979.
- JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J.. Tecido cartilaginoso. In: Junqueira, L. & Carneiro, J *Histologia básica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara ed., 1999, cap. 7 pp 104-110.
- KAAB, M.; GWYNN, I. & NOTZLI, P. Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. **J. Anat.** 193: 23-34, 1998.
- KADLER, K. Extracellular matrix 1: fibril-forming collagens. **Protein Profile** (5): 518-575, 1994.
- KIRÁLY, K.; HYTTINEN, M.; PANKKIMEN, J.; AROKOSKI, J. LAPVETELEINEN, T.; TORRONEN, K.; KIVIRANTA, I. & HELMINEN, H. J. Articular cartilage collagen birefringence is altered concurrent with changes in proteoglycan synthesis during dynamic in vitro loading. **Anat. Rec.** 251: 28-36, 1998.
- KLAUS, W. & OSBORN, M. The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Biol. Chem.** 244: 4406-4412, 1969.
- KRESSE, H.; HAUSER, H. & SCHÖNHEN, E. Small proteoglycans. **Experientia.** 49(5): 403-416, 1993.
- KRESSE, H.; LISZRO, C.; SCHONHEN, E. & FISHER, L. Critical role of glutamate in a central leucine-rich repeat of decorin for interaction with type I collagen. **J. Biol. Chem.** 272 (29) 18404-18410, 1997.
- KUC, I. & SCOTT, P. Increased diameters of collagen fibrils precipitated in vitro in the presence of decorin from various connective tissues, **Connective Tiss. Res.** 36 (4): 287-296, 1997.

- LAMMI, P.; INKINEN, R.; MARK, K.; PUUSTJARVI, K.; AROKOSKI, J.; HYTTNEN, M. & LAMMI, M. Localization of type X collagen in the intervertebral disc of mature beagle dogs. **Matrix Biol.** 17: 449-453, 1998.
- LEV, R. & SPICER, S. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. **J. Histochem. Cytochem.** 12: 309, 1964.
- LINSENMAYER, T. F. in: Hay, E. D. *Cell biology of extracellular matrix*. 2^a ed. NY: Plenum Press, 1991. Pp. 7-44,.
- LOHMANDER, S. Proteoglycans of joint cartilages-structure, function, turnover and role as markers of joint disease. **Barllièrè's clinical reumatology**. 2(1): 37-62, 1988.
- MANICOURT, D.; PITA, J.; PEZON, C. & HOWELL, D. Characterization of the proteoglycans recovered under nondissociative conditions from normal articular cartilage of rabbits and dogs. **J. Biol. Chem.** 261: 5426-5433, 1986.
- MANN, D. M.; YAMAGUCHI, Y.; BOURDON, M. A. & RUOSLAHTI, E. Analysis of glycosaminoglycans substitution in decorin by site directed mutagenesis. **J. Biol. Chem.** 265: 5313-5323, 1990.
- MARTINEAU-DOIZÉ, B. & MARTINEAU, D. Topography and differential growth of the nasal ventral concha (os conchae nasalis ventralis) of the pig from birth to six weeks of age. **Am. J. Vet. Res.** 47 (2): 416-421, 1986.
- MELLO, M. & VIDAL, B. *Práticas de Biologia Celular*. São Paulo. Edgar Blucher ed. 1980. P57.
- MENDLER, M.; EICH-BENDER, S. G.; VAUGHAN, L.; WINTERHALTER, K. H. & BRUCKNER, P. Cartilage contains mixed fibrils of collagens types II, IX and XI. **J. Cell. Biol.** 108: 191-197, 1989.
- MIOSGE, N.; FLACHSBART, K.; GOETZ, W.; SCHULTZ, W.; KRESSE, H. & HERKEN, R. Light and electron microscopical immunohistochemical localisation of the small proteoglycan core proteins decorin and biglycan in human knee joint cartilage. **Histochem. J.** 26: 939-945, 1994.
- NEAME, P. J. & BARRY, F. P. The link proteins. **Experientia**. 49(5): 393-402, 1993.
- NEAME, P. J.; PÉRIN, J.; BONNET, F.; CHRISTNER, J. E.; JOLLÉS, P. & BAKER, J. R. An amino acid sequence common to both cartilage proteoglycan and link protein. **J. Biol. Chem.** 260(23): 12402-12404, 1985.
- NEAME, P. J.; TREEP, J. T. & YOUNG, C. N. An 18 kDa glycoprotein from bovine nasal cartilage. **J. Biol. Chem.** 265(17): 9628-9633, 1990.

- OLDBERG, A.; ANTHONSON, P.; HEDBON, E. & HEINEGÅRD, D. Structure and function of extracellular matrix proteoglycans. **Biochem. Soc Trans.** 18: 784-793, 1990.
- OLDBERG, A. Fibromodulin. In: Kreiss, T. & Vale, R. *Guidebook of the extracellular matrix and adhesion proteins*. Oxford: Oxford press. 1993. pp: 55-56.
- PLAAS, A.; WEST, L.; WONG-PALMS, S. & NELSON, F. Glycosaminoglycan sulfation in human osteoarthritis. **J. Biol. Chem.** 273(20): 12642-12649, 1998.
- POOLE, A.; PIDOUX, I.; REINER, A.; CHOI, H. & ROSENBERG, L. Association of an extracellular protein (chondrocalcin) with the calcification of cartilage in endochondral bone formation. **J. Cell Biol.** 98: 54-65, 1984.
- POOLE, A R.; MATSUI, Y.; HINEK, A & LEE, E. R. Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage matrix. **Anat. Rec.** 224: 167-179, 1989.
- POOLE, C. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. **J. Anat.** 191: 1-13, 1997.
- RAJPUROHT, R.; KOCH, C. J.; TAO, Z.; TEIXEIRA, C. & SHAPIRO, J. M. Adaptation of chondrocytes to low oxygen tendon: relationship between hypoxia and cellular metabolism. **J. Cell. Physiol.** 168: 424-432, 1996.
- RATCLIFFE, A. & MOW, V. Articular cartilage. In: Comper. *Extracellular matrix*. The Netherlands: Harwood academic pub Vol 1. Tissue function, 1996. Pp 24-302.
- REICHENBERGER, E. & OLSEN, B. R. Collagens as organizers of extracellular matrix during morphogenesis. **Seminars in Cell & Develop. Biol.** 7: 631-638, 1996.
- ROBINSON, H. C. & HOPWOOD, J. J. The alkaline cleavage and borohydride reduction of cartilage proteoglycan. **Biochem. J.** 133: 457-470, 1973.
- ROSENBERG, L. C.; TODEL, C. W.; MARGOLIS, R.; PAL, S. & STRIDER, W. Proteoglycans from bovine proximal humeral articular cartilage. Structural basis for the polydispersity of proteoglycan subunit. **J. Biol. Chem.** 251: 6439-6444, 1976.
- ROSENBERG, L.; CHOI, H. U.; TANG, L. H.; PAL, S.; JOHNSON, T.; LYONS, D. A & LOWE, T. M. Proteoglycans of bovine articular cartilage. **J. Biol. Chem.** 266 (11): 7016-7024, 1991.
- ROUGHLEY, P. J. & WHITE, R. J. Dermatan sulphate proteoglycans of human articular cartilage. The properties of dermatan sulphate proteoglycan I and II. **Biochem. J.** 295: 823-827, 1989.

- ROUGHLEY, P. J.; WHITE, R. J.; CS-CZABOR, G. & MONT, J. S. Changes with age in the structure of fibromodulin in human articular cartilage. **Osteoarth and Cartilage**. 4: 153-161, 1996.
- SASANO, Y.; TAKAHASHI, I.; MIZOGUCHI, I.; KAGAYAMA, M.; TAKITA, H. & KUBOKI, Y. Type X collagen is not localized in hypertrophic or calcified cartilage in the developing rat trachea. **Anat. Embryol**. 399-403, 1998.
- SCOTT, J. E. & ORFORD, C. R. Dermatan-sulphate rich proteoglycan associates with rat tail tendon collagen at the d band in the gap region. **Biochem. J**. 195: 213-216, 1981.
- SCOTT, J. E. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. **Biochem. J**. 252: 313-323, 1988.
- SCOTT, J. The cartilage of the nasal septum. **Brit. Dent**. 21: 37-43, 1953
- SHAPIRO, F. Epiphyseal and physeal cartilage vascularization: a light microscopic and tritiated thymidine autoradiographic study of cartilage canals in newborn and young postnatal rabbit bone. **Anat. Rec**. 252: 140-148, 1998.
- SINI, P.; DENTI, A.; TIRA, M. E. & BALDUINI, C. Role of decorin on in vitro fibrillogenesis of type I collagen. **Glycoconj. J**. 14: 871-874, 1997.
- SKAWINA, A.; LITWIN, J.; GORCZY, C. & MIODONSKI, A. Blood vessels in epiphyseal cartilage of human fetal femoral bone: a scanning electron microscopy study of corrosion casts. **Anat. Embryol**. 189: 457-462, 1994.
- SMITH, R. K. W.; ZUMINO, L.; WEBBON, P. M. & HEINEGÅRD, D. The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendons and its variations with tendon site, age and load. **Matrix biol**. 16: 265-271, 1997.
- SWANN, D.; POWELL, S. & SOTMAN, S. The heterogeneity of cartilage proteoglycans. Isolation of different types of proteoglycans from bovine articular cartilage. **J. Biol. Chem**. 254: 945-954, 1979.
- TRÉPANIÉ, H.; MARTINEAU, G-P & MARTINEAU-DOIZÉ, B. Distribution of the mineralized tissues in the nasal ventral conchae (os conchae nasalis ventralis) of piglets after birth: relationship with atrophic rhinitis. **Anat. Rec**. 222: 237-244, 1988.
- VERTEL, B. M. The ins and outs of aggrecan. **Trends Cell Biol**. 5: 458-464, 1995.
- WATANABE, H.; CHEUNG, S.; ITANO, N.; KIMATO, K. & YAMADA, Y. Identification of hyaluronan-binding domains of aggrecan. **J. Biol. Chem**. 272 (44): 28057-28065, 1997.

- WIGHT, T. N.; HEINEGÅRD, D. & HASCALL, V. C. Proteoglycans, structure and function. In: Hay, E. D. *Cell biology of extracellular matrix*. 2^a ed., NY: Plenum press, 1991, cap. 2. pp: 45-72.
- YANG, B.; ZHANG, Y.; CAO, L. & YANG, B. Aggrecan and link protein affect cell adhesion to culture plates and to type II collagen. *Matrix Biol.* 16: 541-561, 1997/98.
- ZINGALES, B. Analysis of protein sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Genes and antigens of parasites*. Morel, C. M. Rio de Janeiro, Fiocruz, 357-363, 1984.