

Marcelo Augusto Marretto Esquisatto



Estudo da Composição da Matriz Extracelular de cinco regiões da
Cartilagem Articular do Joelho Bovino

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) <i>Marcelo Augusto Marretto</i> <i>Esquisatto</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

16/12/96
16/12/96
Laurecir Gomes
Esquisatto

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas na Área de
Biologia Celular

Orientador: Profa. Dra. Laurecir Gomes
Campinas
1996



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Es69e Esquisatto, Marcelo Augusto Marretto
 " Estudo da composição da matriz extracelular da cartilagem articular de cinco regiões do joelho bovino" / Marcelo Augusto Marretto Esquisatto. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Laurecir Gomes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

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



Local e Data: Campinas, 16/02/1996

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Profa.Dra. LAURECIR GOMES (Orientador)

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Laurecir Gomes", is written over a horizontal line.

Prof.Dr. EDSON ROSA PIMENTEL

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Edson Rosa Pimentel", is written over a horizontal line.

Prof.Dr. ROBERTO VILARTA

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Roberto Vilarta", is written over a horizontal line.

SUPLENTE:

Prof.Dr. FRANCESCO LANGONE

A single horizontal line is provided for the signature of the substitute member, Prof. Dr. Francesco Langone.

APROVADA

Dedido este trabalho:
Aos meus pais Antonio Carlos e
Maria do Carmo,
A minha irmã Laura e
A minha primeira mestra Ir.
Emilia Bisi.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Laurecir Gomes, pela amizade, dedicação e apoio em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel, pela amizade e disposição constante em ajudar e sugerir novas idéias.

Ao Prof. Dr. Roberto Vilarta, pelas sugestões e auxílio na realização de parte desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Francesco Langone, pelas críticas e sugestões que colaboraram na confecção desse trabalho.

A todos os professores e técnicos do Departamento de Biologia Celular que contribuíram de alguma maneira para a elaboração deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria, Cidinha, Lilian e Sidnei, pelos incontáveis favores.

Aos colegas do curso de Mestrado: Paula, Silvia, Luciana, José Ricardo, Patricia, Flávia, Christiane, Fernando, Maurício, Christiana, Lucianne, Daniela, Guido, Estela, Arnaldo, Selma, Jeannie, Tatiana, Sérgio, Marcos, Márcio, Luis Fernando e Luciano pelo companherismo no dia-a-dia.

Ao Alexandre R. de Oliveira, em especial, pelas aulas de informática.

Ao CNPq, pela concessão da Bolsa de Estudos.

A FAPESP, pelo auxílio a pesquisa, que permitiu a realização deste trabalho.

ABREVIATURAS

AH	Ácido Hialurônico
ANOVA	Análise de variância
AT	Azul de Toluidina
BSA	Albumina Sérica Bovina
CEC	Concentração Crítica de Eletrólitos
Chase AC	Condroitinase AC
CMP	Proteína de Matriz de Cartilagem
Col	Colágeno
COMP	Proteína Oligomérica da Matriz
CS	Condroitim Sulfato
CsCl	Cloreto de Césio
DAB	Diaminobenzidina
DEAE-Sephacel	Dietilaminoetil-Sephacel
DMMB	Azul de Dimetilmetileno
DS	Dermatam Sulfato
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
F1	Região da crista articular do Fêmur
F2	Região da face patelar do Fêmur
F3	Região dos côndilos do Fêmur
FM	Fibromodulim
GAG	Glicosaminoglicano
Gu-HCl	Cloridrato de Guanidina
K _{av}	Coefficiente de eluição
kDa	kilodalton
mA	miliampère
MEC	Matriz Extracelular
MPa	megapascal
Mr	massa relativa
2-Me	2-Mercaptoetanol

MgCl_2	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
Na_2SO_3	Sulfito de Sódio
P	Patela
PG	Proteoglicano
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonato
QS	Queratam Sulfato
R_f	distância relativa de migração
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Gel de Poliacrilamida com SDS
T	Tíbia
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
TSP1	Trombospondim 1
V_0	Volume Morto
V_t	Volume Total

ÍNDICE

Introdução	01
Material e Métodos	11
1. Reagentes.....	11
2. Obtenção do Material.....	13
3. Análise das Fendas Artificiais.....	13
4. Extração dos Constituintes de Matriz.....	13
5. Ultracentrifugação em Cloreto de Césio (CsCl).....	14
6. Dosagem de Proteína.....	14
7. Dosagem de Ácido Urônico e Detecção dos GAGs sulfatados.....	14
8. Digestão enzimática.....	15
8.1. Tecido Total ou Resíduo de Extração.....	15
8.2. Amostras após Cromatografia.....	15
9. Eletroforeses.....	16
9.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE).....	16
9.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Barbitol.....	17
9.3. Eletroforese em Gel de Agarose-Poliacrilamida.....	17
10. Cromatografias.....	18
10.1. Cromatografia de Troca Iônica.....	18
10.2. Cromatografia de Gel Filtração.....	18
11. Transferência eletroforética de proteínas para nitrocelulose ("Immunoblotting").....	18
12. Análise Estatística.....	19
Resultados	20
1. Análise das fendas artificiais na superfície articular.....	20
2. Quantificação de ácido urônico, proteínas e GAGs totais.....	20
3. Relação entre os componentes colagênicos e não-colagênicos.....	20
4. Separação dos constituintes de matriz por ultracentrifugação em CsCl.....	26

5. Análise cromatográfica e eletroforética da fração D1.....	26
6. Análise cromatográfica e eletroforética da fração D4.....	43
Discussão.....	57
Conclusões.....	67
Resumo.....	68
Abstract.....	70
Bibliografia.....	72

INTRODUÇÃO

O mecanismo pelo qual os mamíferos se movimentam envolve sete classes de juntas sinoviais e seis classes de juntas fibrosas ou cartilaginosas (Gardner, 1994).

Uma junta sinovial compreende uma complexa unidade funcional de tecido conjuntivo. Este apresenta um amplo aspecto morfológico e bioquímico, cuja especialização anatômica é influenciada pela herança genética e atuação de forças biomecânicas (Frost, 1994). Basicamente, uma junta sinovial envolve a associação contínua de osso-cartilagem articular-líquido sinovial-cartilagem articular-osso, recobertas pela membrana sinovial e cápsula articular (Sledge, 1975).

Em juntas, como o joelho, onde a gravidade se soma a outras forças na composição do movimento, a cartilagem articular apresenta regiões onde podem ser observadas estruturas altamente especializadas. Estas regiões, como a superfície patelar do fêmur ou os côndilos medial e lateral da tíbia, apresentam visíveis diferenças na organização tridimensional. Dentro desse tipo de junta, podem ser vistas áreas com diferentes organizações conforme a intensidade e o tipo de força biomecânica atuante (Gardner, 1994). Dentre os tecidos envolvidos, a cartilagem articular se destaca por apresentar um importante comportamento físico-químico. Situada nas extremidades dos ossos, são as primeiras a receber as forças biomecânicas empreendidas durante o movimento (Sledge, 1975).

A manutenção da matriz cartilaginosa se dá por células mesenquimais altamente diferenciadas, os condrócitos. A matriz extracelular (MEC), por sua vez, é composta, principalmente, por fibras colagênicas (do tipo II), proteoglicanos (PGs) e proteínas não-colagênicas. Histologicamente, a MEC que envolve os condrócitos pode ser dividida em: matriz territorial e interterritorial. A matriz territorial, mais próxima dos condrócitos, é rica em PGs. Esta matriz é mais facilmente definida com o auxílio do microscópio eletrônico de transmissão, onde se observa a matriz pericelular. Esta matriz, sob condições fisiologicamente normais, está em contato direto com as células (Silberg, 1968; Mcachim & Stockwell, 1972).

As fibras colagênicas da cartilagem articular são as responsáveis pela resistência à tensão no tecido (Kempson, 1972). Sendo assim, seu arranjo espacial varia com a profundidade da cartilagem, tendo influência direta sobre a morfologia dos condrócitos. A cartilagem articular adulta humana pode ser dividida em quatro camadas (Barnet et al., 1961; Meachim & Stockwell, 1972): (a) a camada superficial, que contém condrócitos pequenos e achatados, juntamente com as fibras colagênicas orientadas tangencialmente à superfície, (b) a camada intermediária, que possui condrócitos de grande tamanho, isolados ou aos pares, apresentando fibras colagênicas orientadas ao acaso, (c) a camada profunda, que apresenta os condrócitos arranjados em colunas verticais ou enfileirados, possui um fino arranjo radial de fibras e (d) a camada de cartilagem mineralizada com condrócitos em vários estágios de degeneração.

Além do colágeno tipo II, a MEC da cartilagem articular apresenta pequenas quantidades dos colágenos tipo VI, IX, X e XI (Heinegård & Oldberg, 1989; Hardingham, 1990; Eyre et al., 1992). “In vivo”, pequenas quantidades dos colágenos II, IX e XI estão presentes em estruturas copolímeras sendo que os colágenos IX e XI e outros componentes, como dois pequenos PGs são de alguma maneira reguladores da formação das fibras do colágeno II (Heinegård & Oldberg, 1989; Eyre et al., 1991 e 1992). O colágeno tipo II contém três cadeias polipeptídicas $\alpha 1(\text{II})$ idênticas, arranjadas entre si de modo a formar uma tripla hélice. O colágeno tipo IX contém três cadeias α diferentes; $\alpha 1(\text{IX})$, $\alpha 2(\text{IX})$ e $\alpha 3(\text{IX})$ e possui uma característica que o diferencia das outras moléculas de colágeno. Ele possui uma cadeia de glicosaminoglicano (GAG) ligada covalentemente a cadeia $\alpha 2$ (Eyre et al., 1987; van der Rest & Mayne, 1988). Além disso, evidências bioquímicas demonstraram que o colágeno tipo IX está ligado covalentemente ao colágeno tipo II (van der Rest & Mayne, 1988). O colágeno tipo XI é uma molécula de baixo peso molecular, que apresenta três tipos de cadeias α distintas ($\alpha 1(\text{XI})$, $\alpha 2(\text{XI})$ e $\alpha 3(\text{XI})$) (Morris & Bachinger, 1987).

O colágeno tem um alto grau de organização estrutural. Suas triplas hélices são formadas em sentido anti-horário. Cada cadeia α é composta pelo triplete Gly-Pro-X, onde X pode ser outro aminoácido ou hidroxiprolina. As moléculas de colágeno são rígidas, semelhantes a um bastão, com aproximadamente 1,4 nm de diâmetro e 300 nm de comprimento. O fenômeno de auto agregação ocorre na MEC logo após a remoção dos

peptídios N e C terminal. O colágeno tipo II da cartilagem articular não forma grandes fibras (entre 20 a 200 nm). Este fenômeno está relacionado a presença de carboidratos de maneira mais ou menos intensa (Eyre et al., 1992). Outra característica que interfere nas propriedades físico-químicas do colágeno é a frequência na formação de ligações cruzadas covalentes entre as cadeias α e entre as moléculas de colágeno (Yamaguchi et al., 1988). Estas ligações cruzadas mantêm estável a rede de colágeno e promove a resistência à tensão no tecido (Schmidt & Linsenmayer, 1990).

Os monômeros de PGs de cartilagem são grandes moléculas constituídas por um esqueleto protéico central, ao qual estão ligadas covalentemente numerosas cadeias laterais de GAGs (Handley et al., 1985). Há dois tipos principais de cadeias de GAGs encontrados entre os PGs. O mais abundante é o condroitim sulfato (CS) e o outro é o queratam sulfato (QS). Outro GAG, não sulfatado, o ácido hialurônico (AH) se liga eletrostaticamente ao esqueleto protéico central de vários monômeros de PGs, formando verdadeiros agregados, de alto peso molecular (Hardingham & Muir, 1972, 1974). O esqueleto protéico dos PGs é uma estrutura com multidomínios, com três regiões globulares (G1, G2 e G3) e duas regiões não-globulares (E1 e E2). O domínio G1, N-terminal, contém um sítio para interação com AH (Hardingham et al., 1976). O domínio G1 liga-se a uma unidade decassacarídica e cada AH é capaz de interagir com 20 monômeros simultaneamente. A massa molecular do agregado chega a $5 \cdot 10^3$ kDa e mede cerca de $5 \mu\text{m}$ de comprimento (Hardingham, 1981). A análise do esqueleto protéico demonstrou que G2 possui sequências semelhantes a G1, mas estas não apresentam propriedades de ligação com AH ou participação direta na agregação dos PGs (Fosang & Hardingham, 1989). O significado e funcionalidade do domínio G2 não está claro. Contudo, experimentos envolvendo digestão controlada de PGs por enzimas proteolíticas, tal como estromelisina, têm mostrado que G2 é o sítio favorito para o ataque nos agregados, controlando, talvez, o “turnover” dos PGs na matriz (Sandy et al., 1987). O domínio G3, C-terminal, é a região mais conservada quando comparada com PGs de diferentes espécies (Dudhia et al., 1990). Apresenta similaridades com lectinas de membrana plasmática com afinidade por sialoproteínas. A sequência correspondente a esta região possui fraca interação com carboidratos. Contudo, ela apresenta homologia com componentes do sistema complemento (Patthy, 1987).

As cadeias de CS estão ligadas no extenso segmento não globular E2, entre G2 e G3. QS está também ligado nesta região, mais próximo ao domínio G2. Comparando a sequência de E2, em PGs de rato, boi e humano, foi observado que não é tão conservada como as outras regiões (Dudhia et al., 1990).

Na cartilagem, a interação dos PGs com a água é consequência da alta densidade de cargas negativas (Maroudas, 1975; Comper & Laurent, 1978; Ogston, 1983). O gel de PGs, devido a sua atividade osmótica, gera uma pressão de tumefação que é contida pela estrutura da rede de fibras colagênicas. Quando a cartilagem é comprimida, a água é deslocada para fora do sistema, o que resulta no aumento da concentração de PGs e consequentemente um aumento na sua atividade osmótica. Quando cessa a força, a água flui de volta ao gel (Handley et al., 1985). Segundo Maroudas (1976a), a estrutura dos PGs restringe a passagem de outras moléculas através da MEC, devido ao grande volume ocupado pelas cadeias de GAGs.

A alta concentração de PGs é essencial para a resistência da cartilagem articular às forças de compressão. Mas, se a concentração fosse uniforme, haveria uma pressão de tumefação na interface com o fluido sinovial, o que colocaria as fibras colagênicas sob grande tensão. Deste modo, o gradiente de concentração de PGs cria, diretamente, um gradiente de pressão, o que distribui o “stress” aplicado sob a superfície articular por toda a espessura da cartilagem (Maroudas, 1976b). A concentração de PGs aumenta gradualmente a partir da superfície articular até as zonas mais profundas (Stokwell & Scott, 1967; Maroudas et al., 1969). Além disso, a estrutura dos PGs pode também variar com a espessura do tecido. Sweet e colaboradores (1977) compararam o tamanho e a densidade dessas moléculas na superfície e nas camadas mais profundas da cartilagem articular de bovinos jovens. Ficou demonstrado uma diminuição no tamanho dos PGs nas camadas profundas em relação a superficial. Um decréscimo no comprimento das cadeias de CS, nas camadas profundas da cartilagem articular da epífise proximal do fêmur em humanos idosos, foi verificado por Jones & Lemperg (1978). Não só em diferentes camadas mas em diferentes idades também há variação no tamanho e na concentração dos PGs (Flannery et al., 1990).

Muito pouco se sabe da existência de variação na composição de açúcares ou concentração de PGs em diferentes regiões anatômicas submetidas à diferentes forças compressivas dentro de uma mesma articulação.

Heinegård & Oldberg (1989) e Heinegård & Pimentel (1992) descrevem as características estruturais e funcionais de diversas proteínas não-colagênicas, além de pequenos PGs, encontrados na matriz cartilaginosa. Os pequenos PGs representam uma família de moléculas estruturalmente relacionadas, mas geneticamente distintas, com ampla distribuição pelos tecidos de vertebrados (Fischer et al., 1987). Foram detectados em pele de porco (Fransson & Malmstrom, 1971), em tendão de ratos (Scott & Orford, 1981), esclera de boi (Coster & Fransson, 1981) além de cartilagem bovina (Rosenberg et al., 1985). O esqueleto proteico dessas moléculas tem, em média, um Mr de 40 kDa contendo dez sequências homólogas repetidas com cerca de 25 aminoácidos (Krusius & Ruoslahti, 1986). Vários resíduos de cisteína estão presentes em regiões homólogas entre as moléculas. Na região N-terminal, o biglicam apresenta dois conjuntos dipeptídico (ser-gly). A cada um estão ligados uma cadeia de CS ou DS, dependendo do tecido considerado (Neame et al., 1989). Já o decorim, contém apenas uma cadeia de GAG (Mann et al., 1990), que pode ser CS ou DS, dependendo do tecido (Heinegård et al., 1985). Outro aspecto interessante dessas moléculas é a capacidade diferenciada do biglicam e decorim se ligarem a diferentes isoformas do fator de crescimento TGF- β (Yamaguchi et al., 1990, Hildebrand et al., 1994). Essa interação deve ter importância na regulação do crescimento e diferenciação celular (Nathan & Sporn, 1991).

O fibromodulim (FM) é diferente em relação aos outros quanto a presença de cadeias de GAGs na porção N-terminal. No entanto, este domínio contém tirosinas sulfatadas (Oldberg et al., 1989), o que contribui para o caráter aniônico da molécula. O FM contém somente cadeias de QS ligadas via ligação N-glicosídica a partir de resíduos de asparagina no domínio central da molécula (Plaas et al., 1990). Este QS é semelhante ao da córnea (Heinegård & Pimentel, 1992). As funções precisas desses componentes na MEC são desconhecidas, embora se saiba que o decorim e o FM estão ligados a superfície das fibras de colágeno, podendo regular a sua fibrilogênese (Hedbom & Heinegård, 1989; Rosenberg, 1992).

Embora a maioria das proteínas não colagênicas presentes na MEC sejam glicosiladas, a presença de carboidrato ainda não pode ser generalizada para todas as moléculas, por isso ainda não denominamos aqui como glicoproteínas de modo geral.

Dentre as proteínas da MEC, a proteína de ligação é a melhor estudada. Esta proteína foi originalmente isolada a partir de cartilagem como um componente participante dos agregados de PGs (Keiser et al., 1972). Quando isolada apresentou duas isoformas principais em eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) (48 e 43 kDa) (Keiser et al., 1972). Ela é constituída por três regiões principais, que mostram extensa homologia com a região de ligação ao AH (G1) do monômero de PG (Neame et al., 1986). A proteína de ligação é encontrada na maioria dos tecidos conjuntivos (Keiser et al., 1972; Gardell et al., 1980) e forma em todos eles, juntamente com os PGs e AH, os típicos agregados. Sua função principal é estabilizar a interação entre os PGs e o AH, permitindo que a arquitetura dos agregados se mantenha funcional (Heinegård & Pimentel, 1992).

A proteína 36 kDa, é catiônica e apresentou "in vitro" afinidade pela superfície dos condrócitos (Sommarin et al., 1989). Comportamento semelhante foi encontrado para a proteína de 58 kDa que é levemente básica.

A CMP (proteína de matriz de cartilagem) de 148 kDa, consiste de três subunidades de 54 kDa ligadas por pontes dissulfeto. Esta proteína é levemente básica e parece interagir covalentemente com os PGs de alto peso (Heinegård & Paulsson, 1987).

A COMP (proteína oligomérica da matriz) foi recentemente isolada e caracterizada a partir de condrossarcoma de ratos (Morgelin et al., 1992). A COMP é um pentâmero de 524 kDa. Suas subunidades, de 110 kDa cada, são glicosiladas e unidas por ligações dissulfeto. A COMP foi detectada em cartilagem articular (Spitz-Fife & Brandt, 1984, Spitz-Fife, 1985) nasal e traqueal (Heinegård & Pimentel, 1992). Testes imunocitoquímicos revelaram uma localização preferencial da COMP na matriz territorial do condrócito (Hedbom et al., 1992). Em ratos foi detectada no estágio de ossificação endocondral após o aparecimento do colágeno tipo II (Franzen et al., 1987).

Outra glicoproteína não-colagênica, originalmente identificada como uma proteína do grânulo plaquetário por Baenziger e colaboradores (1971), foi a TSP1 (trombospondin 1). É um trímero com multidomínios contendo subunidades de 180 kDa. Alguns papéis

funcionais tem sido considerados para a TSP1 dentro da MEC, como mediação de adesão celular (Kosfeld et al., 1991), interação matriz-matriz (Lahav et al., 1984), migração celular (Roberts et al., 1987) e proliferação celular (Good et al., 1990).

A glicoproteína fibronectina está presente na cartilagem em quantidade muito pequena. Com 550 kDa parece promover a interação célula-matriz via sequência RGD e é capaz de interagir com GAGs e colágeno (Heinegård & Oldberg, 1989).

A ancorim é uma outra proteína que se liga especificamente ao colágeno II. Foi isolada a partir de condrócitos e sequenciada recentemente (Pfaffle et al., 1988). Com 34 kDa e localizada na superfície celular, acredita-se que essa molécula permite a interação do colágeno II à célula. Tanto a ancorim como a fibronectina são capazes de transmitir às células alterações de natureza físico-química que ocorram na MEC (Heinegård & Oldberg, 1989).

Uma proteína, CL21, com 21 kDa é sintetizada por condrócitos hipertróficos, e parece estar relacionada ao colágeno X, o qual foi identificado como marcador específico para estas células (Cancedda et al., 1988).

A matriz cartilaginosa também apresenta uma grande quantidade de oligômeros; que após redução migram em gel (SDS-PAGE) com um Mr de 35 kDa. Essa proteína é a condrocalcim e está presente em todos os tipos de cartilagem sendo proeminente em cartilagem articular e mineralizada. Foi inicialmente isolada a partir de cartilagem epifiseal. Interage com cristais de hidroxapatita e pode ter um papel no processo de mineralização do tecido (Hinek et al., 1987).

Além da cartilagem hialina, outros tecidos conjuntivos se adaptam a ação de forças biomecânicas. As células desses tecidos respondem aos estímulos tanto quantitativamente, quanto qualitativamente, em relação a organização molecular da matriz. Os tendões são um exemplo excelente para o estudo da adaptação funcional dos tecidos conjuntivos à forças biomecânicas. Estes apresentam uma MEC rica em fibras colagênicas. Elas é que determinam, devido ao grau de agregação e ordem molecular, as propriedades biológicas e mecanofisiológicas dos tendões (Vidal, 1986). As fibras colagênicas agem como transdutores, transformando energia mecânica em sinais que estimulam os fibroblastos a modularem o ambiente extracelular (Vidal, 1993).

A produção de sinais na MEC é dependente da organização macromolecular de seus componentes. A deslocação intermolecular induzida por “stress” (Mosler et al., 1985) e/ou potencial eletroquímico induzido sob força mecânica (Basset & Pawluk, 1972; Fukada, 1974), alinham as fibras na MEC de acordo com a origem das forças de tensão (Stopak & Harris, 1982).

Os tendões não se adaptam somente as forças de tensão. Em regiões, onde o tendão está sujeito às forças compressivas são encontradas estruturas típicas de cartilagem. Em tendões flexores digitais profundos de coelho (Merrilles & Flint, 1980), cachorro (Okuda et al., 1987) e bovinos (Evanko & Vogel, 1990) são encontradas regiões sujeitas a intensas forças compressivas, exibindo, nestas áreas, placas fibrocartilaginosas.

Estudos em áreas de compressão em dois tendões de rato demonstraram a existência de modificações fenotípicas de acordo com os graus de força compressiva a que estão submetidos (Ralphs et al., 1991; Ralphs et al., 1992 e Rufai et al., 1992). Sob compressão de baixa intensidade o tendão acumula CS na MEC e vimentina no citoplasma mas morfológicamente permanece inalterado (Rufai et al., 1992). Por outro lado, há zonas que apresentam uma morfologia típica de fibrocartilagem, com intensa deposição de PGs contra espessas fibras colagênicas e células que lembram condrócitos (Rufai et al., 1992). Já a fibrocartilagem propriamente dita, presente nos meniscos e discos intervertebrais, é um tecido de transição entre os tecidos fibrosos (tendões) e a cartilagem hialina.

Sete tipos diferentes de colágeno foram encontrados no “annulus fibrosus” do disco intervertebral (Eyre, 1988) e apenas quatro nos meniscos do joelho (Arnoczky et al., 1988). O colágeno tipo I é o mais abundante no menisco (90%) e “annulus fibrosus” (80%). Há um gradiente na distribuição dos colágenos I e II no disco intervertebral. O tipo II não está presente na periferia, mas representa 80% do conteúdo colagênico no núcleo pulposo. O tipo II representa 1-2% do total colagênico em menisco. A presença em abundância do tipo I (tensão) e a relativa exiguidade do colágeno tipo II (característico de tecido sujeito a compressão) é dado como característica chave na distinção entre fibrocartilagem e cartilagem hialina (Arnoczky et al., 1988). Outros colágenos estão presentes na fibrocartilagem em pequenas quantidades. Os tipos V e VI foram

encontrados tanto em meniscos quanto em discos intervertebrais, mas os tipos IX e XI foram encontrados somente nos discos (Eyre, 1988; Arnoczky et al., 1988).

Outro constituinte importante na MEC em fibrocartilagem são os PGs. Há menos PGs em fibrocartilagem que em cartilagem hialina, mas muito mais que em tecido fibroso (tendão) (Gillard et al., 1979; Koob & Vogel, 1987). Em meniscos há cerca de 10-12% do conteúdo de GAGs presente em cartilagem hialina (Arnoczky et al., 1988). Os PGs de fibrocartilagem diferem bioquimicamente dos de cartilagem (McNicol & Roughley, 1980; Roughley et al., 1981; Arnoczky et al., 1988; Eyre et al., 1987). Eles foram identificados histoquimicamente em meniscos, onde são mais abundantes na matriz territorial dos condrócitos (Fischer et al., 1985).

Pouco se sabe quanto às proteínas não-colagênicas em fibrocartilagem. Contudo, elas estão ligadas à estruturação do microambiente da cartilagem, sendo importante na relação célula-matriz (Melrose & Ghosh, 1988).

De uma maneira geral as propriedades mecânicas das fibrocartilagens estão em um estado intermediário entre o tendão e a cartilagem hialina. A força de tensão suportada pela fibrocartilagem (cerca de 10MPa) é menor que em tendão (55MPa), mas maior que a cartilagem hialina (4MPa) (Yamada, 1970). Por outro lado, a resistência da fibrocartilagem à compressão é semelhante à cartilagem hialina, sendo esta última mais rígida. O módulo elástico é cerca de metade da cartilagem articular (Procter et al., 1989).

De acordo com a literatura, pouco se sabe da organização desses componentes em regiões da articulação sujeitas a diferentes forças biomecânicas. Assim sendo levamos em consideração os dados apresentados no trabalho de Simon (1970), onde é feito um levantamento da presença de forças compressivas em diferentes regiões da articulação bovina. Também foram consideradas as regiões de contato entre fêmur, tíbia e patela. Utilizando como modelo experimental o joelho de bovinos os objetivos desse trabalho foram:

- a) quantificar os componentes da matriz extracelular;
- b) descrever as populações de proteínas não-colagênicas;
- c) caracterizar as populações de PGs e GAGs presentes nas diferentes regiões anatômicas e;

d) relacionar as características bioquímicas encontradas com os mecanismos de adaptação fisiológica do condrócito ao “stress” biomecânico diferenciado.

MATERIAL E MÉTODOS

1. REAGENTES

-Aldrich

Azul de dimetil-metileno (DMMB)

Soro de Porco Anti-Ig Total de Coelho

-BioRad

Agarose

-BHD

Azul de Alcian

-Carlo Erba

Tiosulfato de Sódio

-Chimie Test

Persulfato de Amônia

-Chemco

Cloreto de Sódio (NaCl)

Citrato de Sódio

Fosfato Monobásico de Potássio

Fosfato Bibásico de Potássio

-Ecibra Reagentes Analíticos

Glicina

Uréia

Ácido Acético

Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$)

Sulfito de Sódio (Na_2SO_3)

-Merck

Tris-hidroximetil aminometano (Tris)

Etanol

Metanol

Ácido Sulfúrico

Acetona

Nitrato de Prata

Azul de Toluidina (AT)

-Pharmacia

Padrão de Baixo Peso Molecular

Dietilaminoetil-Sephacel (DEAE-Sephacel)

Sepharose CL-4B

-Reagen Quimbás Indústrias Químicas

Acetato de Sódio

-Sigma Chemical CO

Acrilamida

Barbiturato de Sódio

Carbazol

Condroitinase AC (Chase AC)

Queratanase

Condroitim Sulfato (CS)

Diaminobenzidina (DAB)

Queratam Sulfato (QS)

N-N' Metileno-Bis-Acrilamida

Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA)

N,N,N,N-Tetrametilenodiamina (TEMED)

Fluoreto de Fenilmetilsulfonato (PMSF)

2-Mercaptoetanol (2-Me)

Glucuronolactona

Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

Papaína

Coomassie Blue G 250

Cloridrato de Guanidina (Gu-HCl)

Cloreto de Césio (CsCl)

Tween 20

- Vetec

Azul de bromofenol

2. OBTENÇÃO DO MATERIAL

A cartilagem articular do joelho de bovinos foi obtida de animais adultos logo após o abate. O tecido foi retirado de cinco regiões que receberam a seguinte denominação: F1- região da crista articular do fêmur na face patelar; F2- região da face patelar do fêmur; F3- região dos côndilos do fêmur; P- patela; T - tíbia. Após a remoção, a cartilagem foi fragmentada com o auxílio de lâmina de bisturi.

3. ANÁLISE DAS FENDAS ARTIFICIAIS

Dois joelhos de animais adultos foram utilizados para análise do padrão de alinhamento de fendas artificiais na superfície articular. As fendas artificiais foram produzidas inserindo-se pinos metálicos cilíndricos de 1,0 mm de diâmetro, com ponta em forma esférica, perpendicularmente à superfície articular. Antes de cada inserção carregava-se a ponta do pino com tinta Nankin com o objetivo de demarcar a fenda artificial (Meachim et al., 1974).

4. EXTRAÇÃO DOS CONSTITUINTES DE MATRIZ

As amostras já fragmentadas foram tratadas com 15 volumes do tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,8 contendo, Gu-HCl 4 M, EDTA 50 mM e PMSF 1 mM.

As extrações foram processadas sob agitação constante a 4°C durante 24 h. Após o período de extração as amostras foram centrifugadas a 18000 rpm durante 20 min. a 4°C em centrífuga BECKMAN J2-21 (ROTOR JA-20). Após centrifugação foram obtidas duas frações: sobrenadante e precipitado que foram estocadas a -20°C.

5. ULTRACENTRIFUGAÇÃO EM CLORETO DE CÉSIO (CsCl)

Ao extrato obtido de cada região foram adicionados 0,35 g de CsCl/g de extrato para que a densidade das amostras ficasse entre 1,34 - 1,35 g/ml (Heinegård & Sommarin, 1987). As soluções foram centrifugadas (ultracentrífuga BECKMAN, rotor 80 Ti) a 34000 rpm (r_{av} 62,5 mm, 80000 g) a 15°C durante 66 h. Após centrifugação o tubo foi dividido em quatro frações iguais, sendo denominadas de D1 (fundo do tubo), D2, D3 e D4 (topo do tubo). As frações foram estocadas a -20°C. Para cada fração foi determinado o conteúdo de proteínas, ácido urônico e a densidade.

6. DOSAGEM DE PROTEÍNA

A dosagem de proteína foi feita pelo método de Bradford (1976). A leitura foi realizada em 596 nm utilizando espectrofotômetro HP 8452A. Para curva padrão utilizou-se albumina sérica bovina (BSA) nas seguintes concentrações: 100, 200, 400, 800 e 1000 µg/ml.

7. DOSAGEM DE ÁCIDO URÔNICO E DETECÇÃO DOS GAGs SULFATADOS

O conteúdo de ácido urônico foi determinado segundo Dische (1947). Para a curva padrão foi utilizado glucuronolactona nas seguintes concentrações: 5, 10, 20 e 50 µg/ml. A detecção de GAGs sulfatados nas frações de cromatografia foi realizada segundo Farndale e colaboradores (1986) utilizando-se 100 µl de amostra para 2,5 ml de solução de DMMB. A leitura foi feita em espectrofotômetro SPEKTROMON 195-D em 530 nm e HP 8452A em 526 nm, respectivamente.

8. DIGESTÃO ENZIMÁTICA

8.1 - Tecido Total ou Resíduo de Extração

A remoção total dos GAGs foi feita a partir do tecido total ou do precipitado restante após extração com Gu-HCl. A degradação foi feita com papaína (40 mg/g de tecido) em tampão citrato de sódio 30 mM pH 3,5 contendo EDTA 40 mM e 2-Me 80 mM a 50°C por 24 h. O digesto foi centrifugado e ao sobrenadante foram adicionados dois volumes de etanol. Após 24 h à 4°C, o precipitado foi coletado por centrifugação, lavado com etanol 80% e acetona (Michelacci & Horton, 1989). O conteúdo final de GAGs foi determinado pelo peso seco.

8.2 - Amostras Após Cromatografia

De cada fração cromatográfica utilizou-se 100 µl de amostra, que após precipitação etanólica, foi incubada com 100 µl de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,5 contendo papaína (2,6 mg/ml), NaCl (5 mM), L-cisteína (0,6 mM) e EDTA (2 mM) durante 18 h a 37°C.

As amostras tratadas com papaína foram a seguir digeridas com Chase AC (0,01 U/10 µl). Para cada 10 µl de amostra acrescentou-se 10 µl de enzima em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 durante 24 h à 37°C.

Amostras digeridas com papaína e/ou Chase AC foram analisadas em gel de agarose-poliacrilamida (vide em Material e Métodos pág. 17, item 9.3).

Frações cromatográficas também foram analisadas após tratamento com queratanase (0,01 U/10 µl). Para cada 200 µl de amostra acrescentou-se 20 µl de enzima em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 5,8 durante 24 h à 37°C. Após a digestão as amostras foram analisadas em SDS-PAGE (vide em Material e Métodos pág. 16, item 9.1).

9. ELETROFORESES

9.1 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

Eletroforese em SDS-PAGE foram feitas segundo Zingales (1984) em gradiente de 4 a 16 % e/ou de 3,5 a 7,5 %. As amostras, após precipitação em tampão acetato de sódio 50 mM pH 7,4 (1x volume da amostra) e etanol (9x volume da amostra) foram ressuspensas em tampão Tris-HCl 62 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, EDTA 1 mM e azul de bromofenol 0,01% com ou sem 2-Me (0,2%). Foram fervidas durante 5 min. O tampão utilizado nas cubas de eletroforese foi Tris 25 mM, glicina 190 mM e SDS 0,1%. Para cada placa foram aplicados 25 mA durante 4 h. Padrões de peso molecular foram sempre analisados em paralelo e continham tireoglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalase (232 kDa), lactato-desidrogenase (140 kDa), fosforilase b (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa) e α -lactalbumina (14.4 kDa).

A coloração foi feita pela impregnação da prata segundo Blum e colaboradores (1987). O gel foi fixado em metanol 50%, ácido acético 12% e 0,05 ml de paraformaldeído a 37% durante 1 h. Após a fixação foi lavado em etanol 50% durante 20 min (3x). O gel foi então tratado durante 1 min, com tiosulfato de sódio (0,2 g/l). O excesso foi removido por lavagem do gel com água destilada (3 x 20 segundos). A impregnação foi realizada em solução de nitrato de prata (2 g/l) contendo 0,075 ml de paraformaldeído 37% durante 20 min. O excesso foi removido por lavagem do gel com água destilada (3 x 20 segundos). A redução da prata foi feita com uma solução de carbonato de sódio (60 g/l) contendo 0,05 ml de paraformaldeído 37% e tiosulfato de sódio (4 mg/l). A seguir a reação foi bloqueada pela imersão do gel durante 2 min em ácido acético 7%. A estocagem foi feita a 4°C em metanol 50% e glicerol 3%. Todas as etapas foram realizadas a temperatura ambiente com agitação constante. As massas moleculares aparentes foram inferidas por cálculo de R_f e regressão dos marcadores (Klaus & Osborn, 1969).

Além da impregnação por prata, utilizou-se a coloração por azul de alcian com concentração crítica de eletrólitos (CEC) (Gomes, et al., submetido para publicação). O gel foi fixado como descrito para impregnação pela prata (1 h) e lavado em água destilada (1 h) e todo o procedimento foi repetido mais uma vez na mesma ordem. O corante foi preparado na concentração de 0,05% em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,8 com $MgCl_2$ 0,5 M e 1,0 M. A seguir, o gel foi imerso na solução corante durante 16 - 18 h sob agitação constante à temperatura ambiente. Após a coloração, o gel foi estocado pelo método descrito acima.

9.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Barbital

Eletroforese em gel de poliacrilamida (6%) (p/v) foi feita em tampão barbiturato de sódio 20 mM pH 8,6 (Hilbon & Anastassiadis, 1969). As amostras, após tratamento com papaína (vide Material e Métodos pág 15, item 8.2), foram fervidas por 5 minutos no tampão acima acrescido de 40% glicerol. O tampão de corrida foi o mesmo descrito acima. Para cada placa aplicou-se 100 V durante 30 min. O padrão CS (40 kDa) foi analisado em paralelo. A coloração foi feita com AT 0,1% em ácido acético 1%.

9.3 Eletroforese em Gel de agarose-poliacrilamida

Eletroforese em gel de agarose-poliacrilamida (0,6% - 1,2%) (p/v) foi realizada segundo Heinegård & Sommarin (1987). As amostras analisadas foram preparadas em tampão Tris-acetato 40 mM pH 6,8, Na_2SO_3 1 mM e EDTA 1mM. Foi acrescentado ao tampão, igual volume de azul de bromofenol 0,05% e glicerol 40%. As amostras foram fervidas durante 10 min. O tampão utilizado nas cubas de eletroforese foi Tris-acetato 10 mM pH 6,8, Na_2SO_3 0,25 mM e EDTA 0,25 mM. Para cada placa foram aplicados 20 mA durante 1 h e 50 min. O padrão de CS foi analisado em paralelo. A coloração foi feita pelo corante AT 0,1% em ácido acético 1%.

10. CROMATOGRAFIA

10.1 Cromatografia de Troca Iônica

DEAE-Sephacel foi equilibrada em cinco volumes de tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contendo uréia 7 M. As frações D4 (de cada região), obtidas após ultracentrifugação, foram dialisadas, contra o tampão acima durante 24 h a 4°C e sob agitação constante (2x). Sobre a coluna de DEAE-Sephacel (4,0 x 0,5 cm) foi aplicada 1 mg de proteína/ml de resina. Após aplicação da amostra, a resina foi lavada (5 vezes o volume da coluna) com o tampão de equilíbrio. A eluição das frações foi feita utilizando gradiente de NaCl (0 - 1,5M). Frações de 2,5 ml foram coletadas, das quais, foram determinadas a absorbância em 280 nm (espectrofotômetro HP 8452A) e a condutividade elétrica (Conduktivímetro HI 8819N). A análise das proteínas foi em SDS-PAGE.

10.2 Cromatografia de Gel Filtração

Para essa cromatografia utilizou-se as frações D1. Um volume de 2 ml de cada fração ($\approx$ 3 mg de ácido urônico) das diferentes regiões foram submetidas a cromatografia de gel filtração em Sepharose CL-4B. O tampão de eluição foi Tris-HCl 50 mM pH 5,8 com EDTA 50 mM e GuH-Cl 4 M). O fluxo de eluição foi de 20 ml/h em uma coluna com 130 cm X 1,5 cm. As frações foram coletadas com volume de 2,5 ml.

11. TRANSFERÊNCIA ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS PARA NITROCELULOSE ("IMMUNOBLOTTING")

A transferência das proteínas do gel para membranas de nitrocelulose de 0,45 μ m (Schleicher & Schüll, Dassel, WG) foi segundo Towbin & Gordon (1979) utilizando tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM, 20% metanol, através de corrente constante de 10 volts por 16 h e 70 volts por 4 h, a 4°C. A membrana foi corada pelo método Ponceau S (0,5 % Ponceau S em ácido acético 1 %). A fita teve os sítios de

ligação livres bloqueados com Tris 10 mM, NaCl 0,15 M e Tween 20 (0,2 % v/v) pH 7,4. O primeiro anticorpo foi soro de coelho anti-FM de galinha, diluído 1:20 e o segundo, soro de porco anti-Ig total de coelho, diluído 1:500 marcado com peroxidase. Para revelação foi utilizada diaminobenzidina.

12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias das dosagens e quantificações foram comparadas pela análise de variância (ANOVA) com distribuição de Fischer. No caso de diferença significativa entre as mesmas utilizou-se o teste de Bonferroni para detectar quais foram as médias que sofreram desvio da média global. Todos os testes foram feitos ao nível de significância de 5% (Beiguelman, 1991).

RESULTADOS

1. ANÁLISE DAS FENDAS ARTIFICIAIS NA SUPERFÍCIE ARTICULAR

O alinhamento das fendas artificiais (Fig. 1) demonstrou que as regiões apresentaram um padrão de orientação relativamente uniforme. Os côndilos do fêmur (F3) (Fig. 1B) apresentam um plano de alinhamento látero-lateral, principalmente na porção central. A medida que se avança em direção proximal, F2 passa a apresentar disposição supero-inferior (Fig. 1A). Já em F1 e T (Fig. 1A e 1D), predomina o padrão látero-lateral. Em P (Fig. 1C) os padrões se misturam, onde, na região central predomina fendas oblíquas e supero-inferiores, nas regiões periféricas, látero-laterais.

2. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO URÔNICO, PROTEÍNAS E GAGs TOTAIS

As dosagens de ácido urônico e proteínas (Fig. 2A e 2B) dos extratos em Gu-HCl 4 M, das diferentes regiões, não apresentaram diferenças significativas quando analisadas.

A quantificação dos GAGs totais (mg/g de tecido) demonstrou valores significativamente diferentes entre as regiões analisadas (Fig. 2C). Da região F2 foi obtida maior quantidade de GAG total (371,6 mg/g), seguido de F3 (346,34 mg/g) e F1 (306,68 mg/g). Já P e T apresentaram valores significativamente inferiores aos três primeiros com 248,86 mg/g e 229,02 mg/g, respectivamente.

3. RELAÇÃO ENTRE OS COMPONENTES COLAGÊNICOS E NÃO-COLAGÊNICOS

Após obtenção do extrato total, com Gu-HCl 4M, das diferentes regiões, foi determinada a relação entre os componentes colagênicos e não-colagênicos. Na Fig. 3

Fig. 1 - Regiões anatômicas do joelho bovino onde foi analisada a disposição das fendas artificiais e obtidas amostras para análise bioquímica. Em A, a região da face patelar do fêmur (F2) e região da crista articular do fêmur (F1), em B a região dos côndilos do fêmur (F3), em C a patela (P) e em D a tíbia (T). A seta indica regiões impregnadas mais intensamente pela tinta Nankin.

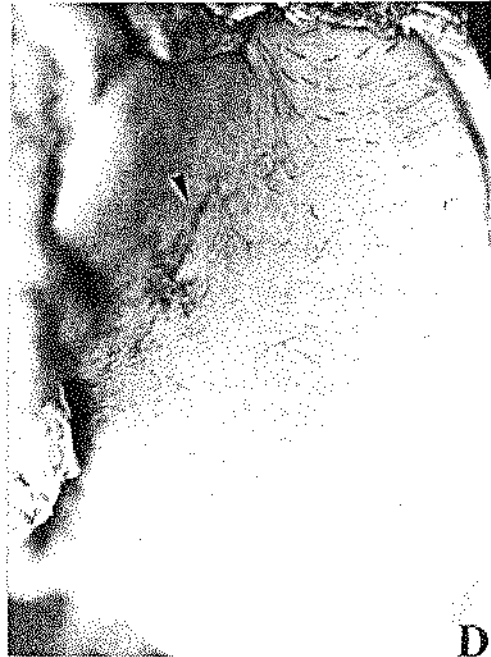
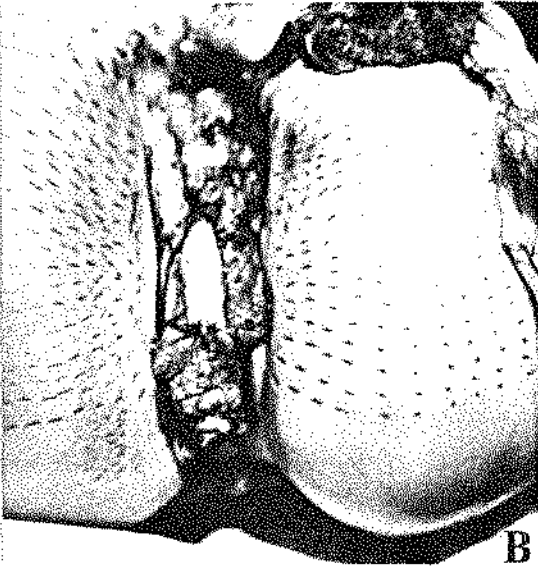
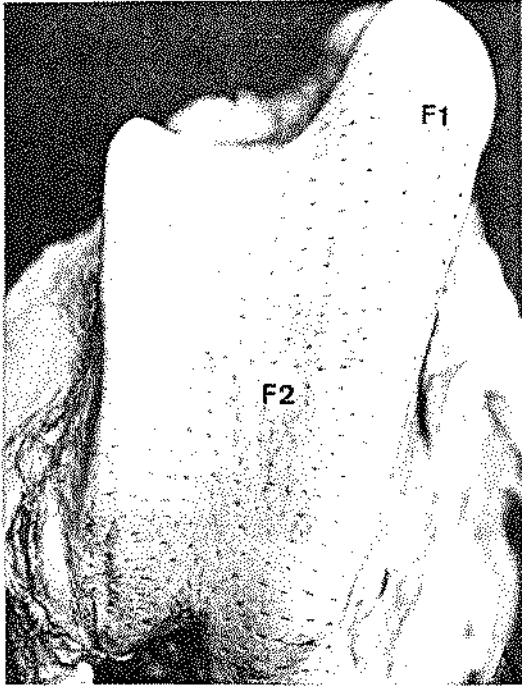
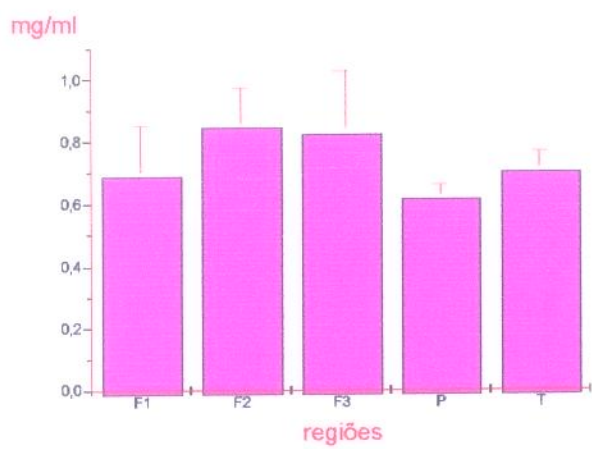
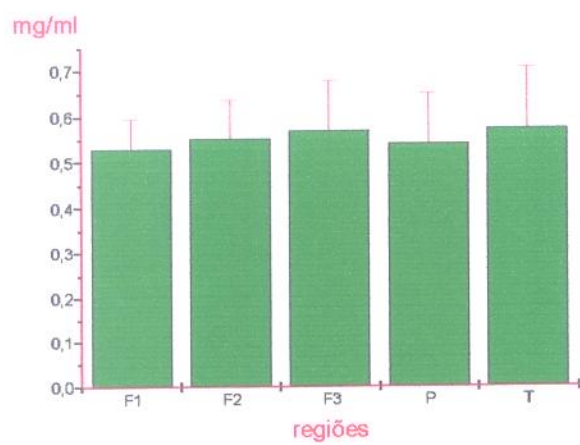


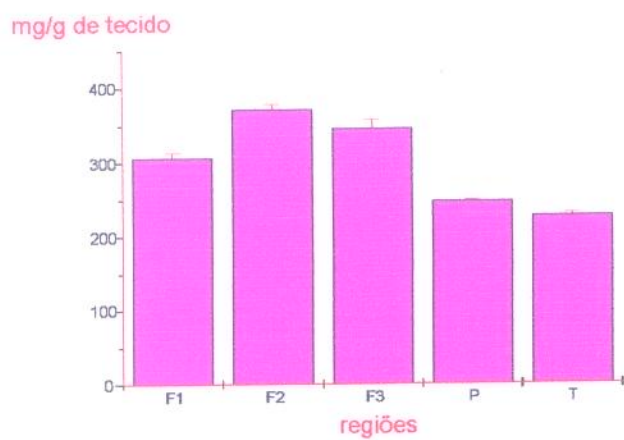
Fig. 2 - Dosagem de ácido urônico (A) e de proteínas (B) dos extratos totais, obtidos de cada região, após o tratamento com Gu-HCl 4 M. O conteúdo total (C) de GAGs/g de tecido das diferentes regiões, foi determinado pelo peso seco. Somente em C foi observada diferença significativa entre as regiões. ANOVA com distribuição de Fischer ao nível de 5% de significância.



A



B



C

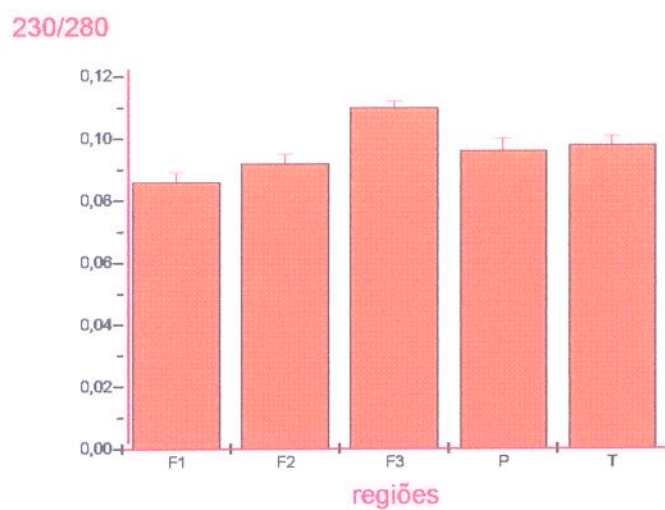


Fig.3 - Representação gráfica do conteúdo de colágeno obtido pela razão entre as absorvâncias 230 / 280 nm em extratos totais de Gu-HCl 4 M.
ANOVA com distribuição de Fischer ao nível de 5% de significância.

está a representação gráfica da razão entre a absorbância em 230 nm e 280 nm. Pode ser visto que a região F3 apresentou essa relação igual a 0,11. No entanto o quociente entre 230/280 não apresentou diferença significativa nas regiões analisadas.

4. SEPARAÇÃO DOS CONSTITUINTES DE MATRIZ POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO EM CsCl

Após a ultracentrifugação, dos extratos das diferentes regiões, as densidades foram determinadas e ficaram entre 1,41 - 1,42 g/ml para D1 (fundo do tubo) e 1,28 - 1,29 g/ml para D4 (topo do tubo). De todas as frações (D1 e D4) foi determinado o conteúdo de proteínas e ácido urônico.

As dosagens de ácido urônico (Fig. 4A) das frações D1 e D4, das cinco regiões, não apresentaram diferenças significativas, embora D1F2 tenha apresentado o maior conteúdo (2,42 mg/ml).

Na Fig. 4B está representada a quantificação de proteínas. Observou-se uma diferença significativa entre as regiões analisadas. Em D1, F3 apresentou 0,237 mg/ml, seguido de T (0,218 mg/ml), P (0,2 mg/ml) e F2 (0,197 mg/ml). F1 foi a região com o menor conteúdo de proteínas (0,185 mg/ml). Em D4, F3 apresentou o maior valor (1,639 mg/ml), seguido de P (1,472 mg/ml), F1 (1,378 mg/ml), F2 (1,308 mg/ml) e T (1,208 mg/ml).

5. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E ELETROFORÉTICA DA FRAÇÃO D1

Os perfis dos cromatogramas das diferentes regiões, quando analisadas em Sepharose CL-4B, apresentaram pequenas variações. F1 (Fig. 5A), F2 (Fig. 6A), F3 (Fig. 7A) e P (Fig. 8A) apresentaram perfis semelhantes. A eluição do material foi com K_{av} em torno de 0,23. No entanto para T (Fig. 9A) o K_{av} foi de 0,13.

As frações obtidas com maior absorbância em 526 nm foram analisadas em eletroforese.

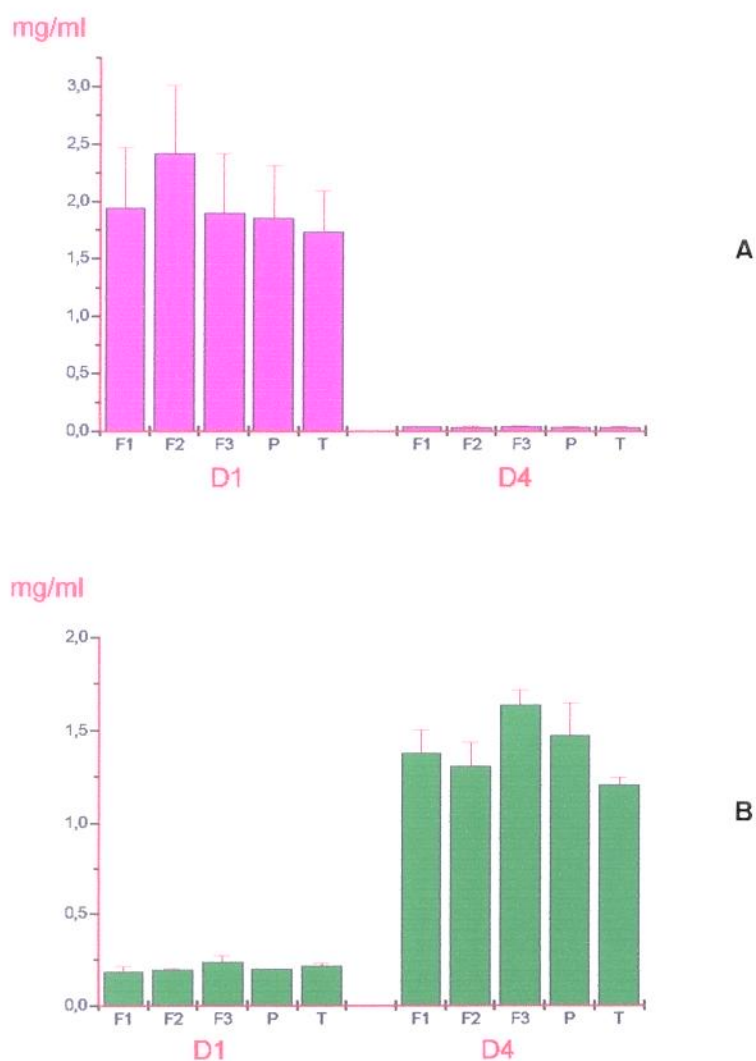


Fig. 4 - Dosagem de ácido urônico (A) e proteínas (B) das frações D1 e D4 obtidas após ultracentrifugação em CsCl. Somente em B houve diferença significativa entre as frações.

ANOVA com distribuição de Fischer ao nível de 5% de significância.

A migração dos PGs foi analisada utilizando a eletroforese em agarose-poliacrilamida. As regiões F2 (Fig. 6B) e F3 (Fig. 7B) não apresentaram diferenças com relação a migração dos PGs presentes nas frações. Em P (Fig. 8A) a migração desses componentes foi mais lenta quando comparada com os PGs da região T (Fig. 9A). Os componentes dessa região possuem um padrão de migração mais rápido e um aspecto mais polidisperso quando comparado com as outras regiões. Os componentes da região F1 (Fig. 5A) apresentaram uma migração intermediária entre os PGs das regiões P e T.

Para analisar a dimensão das cadeias de GAGs, as amostras eluídas das colunas de gel filtração foram digeridas pela papaína e submetidas a gel de poliacrilamida em tampão barbital. Todas as regiões apresentaram um padrão eletroforético semelhante (Fig. 5C; 6C; 7C; 8C e 9C). As cadeias de GAGs presentes nas regiões possuem em torno de 40 kDa quando comparadas ao padrão CS. Pode ser visto também cadeias de GAGs que não entraram no gel, com Mr superior a 150 kDa. Para esses GAGs acima de 150 kDa, F2 (Fig. 6C), P (Fig. 8C) e T (Fig. 9C) foram os que apresentaram maior quantidade.

Uma fração de cada região foi analisada em gel de agarose-poliacrilamida após digestão com papaína (Fig. 10A) e Chase AC (Fig. 10B). O desaparecimento do material após tratamento com Chase AC demonstrou que o GAG predominante em todas as amostras é o CS.

A análise em SDS-PAGE de frações com K_{av} em torno de 0,61, permitiu detectar duas populações de pequenos PGs (Fig. 11A), uma migrando acima, e outra abaixo da posição correspondente ao padrão de colágeno. A visualização do perfil eletroforético dessas frações mostrou a presença mais intensa dessas populações em P e em menor quantidade em T. Já F1, parece apresentar apenas a população de maior peso. A coloração do gel por azul de alcian confirma a presença de GAGs sulfatados nas moléculas (Fig. 11B).

Fig. 5 - Cromatograma (A) da fração D1 da região F1 em Sepharose CL -4B. Absorbâncias em 526 nm determinadas pelo método do DMMB. Vo-volume morto, Vt- volume total.

Eletroforese em agarose-poliacrilamida (B) e em poliacrilamida-barbital, após digestão com papaína, (C) das frações com maior densidade óptica. Condições: corrente de 15mA durante 1 h e 50 min e 30 min., respectivamente Coloração: Azul de Toluidina. Padrão: Condroitim-sulfato (CS).

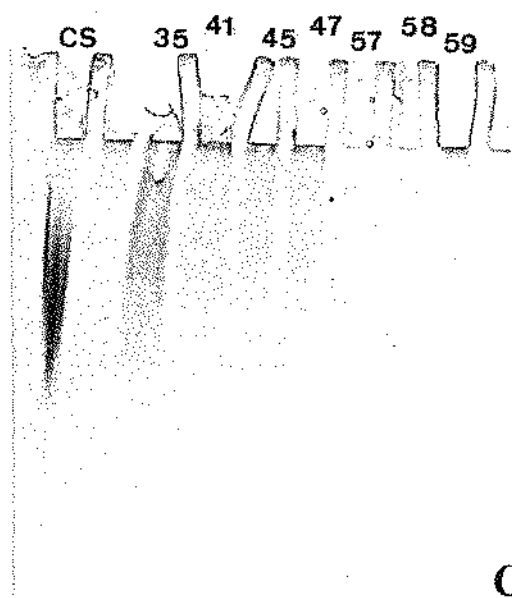
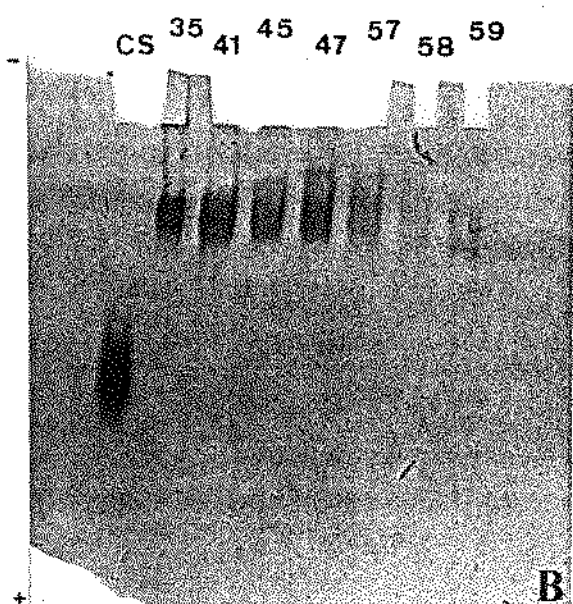
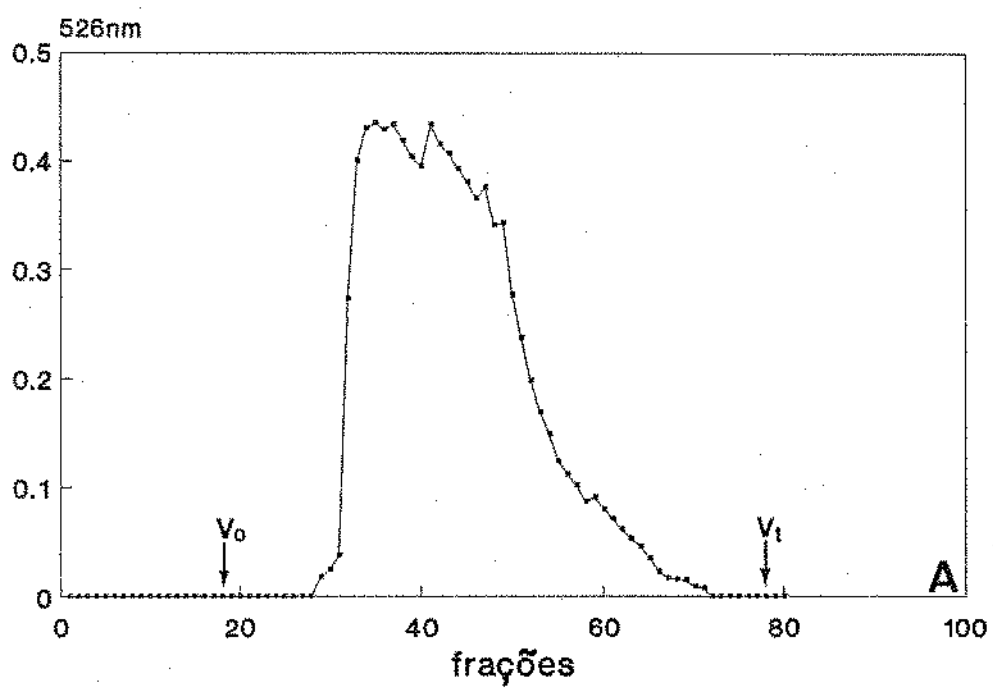


Fig. 6 - Cromatograma (A) da fração D1 da região F2 em Sepharose CL -4B. Absorbâncias em 526 nm determinadas pelo método do DMMB. Vo-volume morto, Vt- volume total.

Eletroforese em agarose-poliacrilamida (B) e em poliacrilamida-barbital, após digestão com papaína, (C) das frações com maior densidade óptica. Condições: corrente de 15mA durante 1 h e 50 min e 30 min., respectivamente Coloração: Azul de Toluidina. Padrão: Condroitín-sulfato (CS).

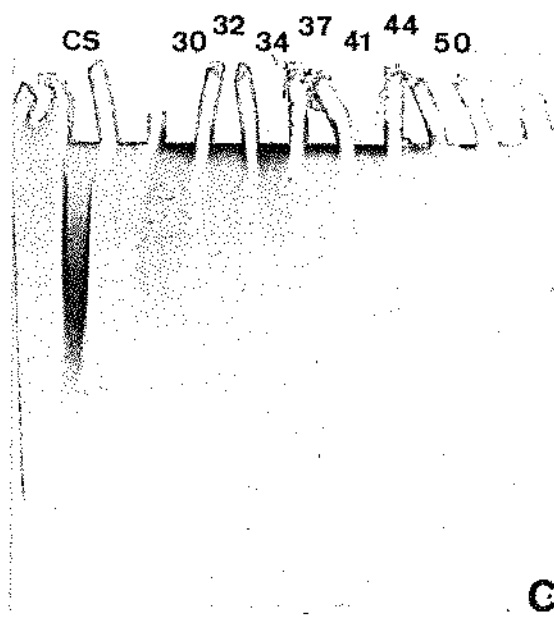
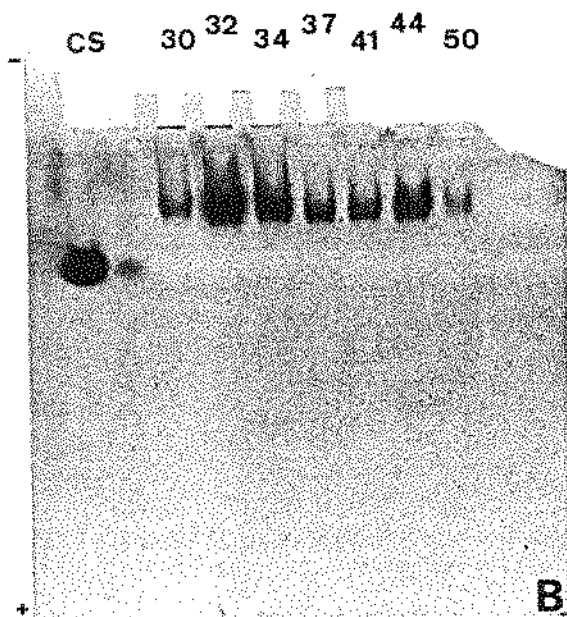
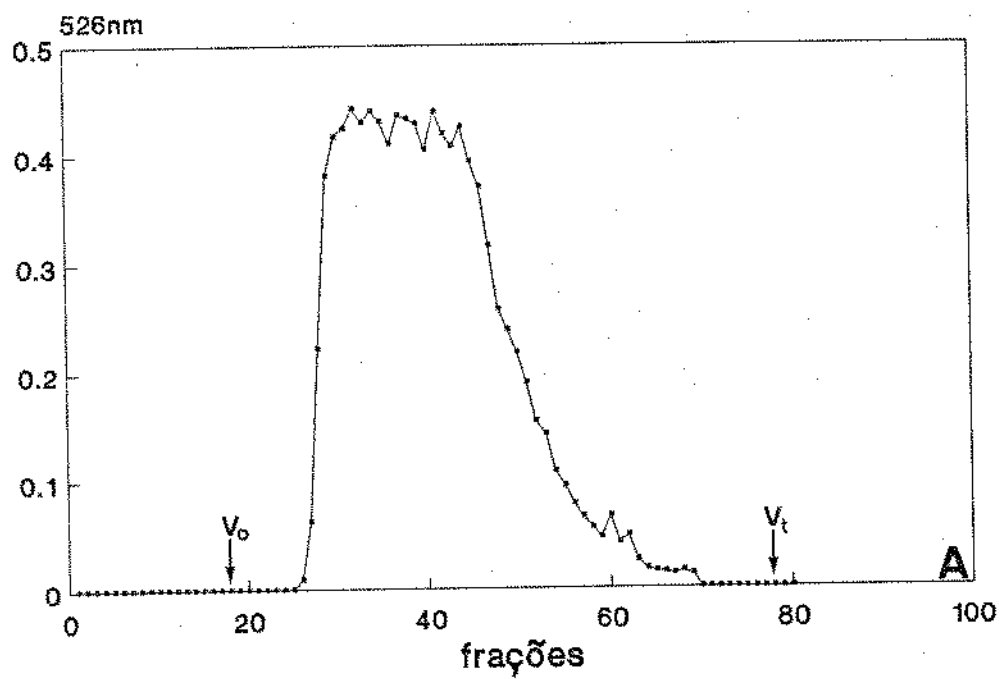


Fig. 7 - Cromatograma (A) da fração D1 da região F3 em Sepharose CL -4B. Absorbâncias em 526 nm determinadas pelo método do DMMB. Vo-volume morto, Vt- volume total.

Eletoforese em agarose-poliacrilamida (B) e em poliacrilamida-barbital, após digestão com papaína, (C) das frações com maior densidade óptica. Condições: corrente de 15mA durante 1 h e 50 min e 30 min., respectivamente Coloração: Azul de Toluidina. Padrão: Condroitim-sulfato (CS).

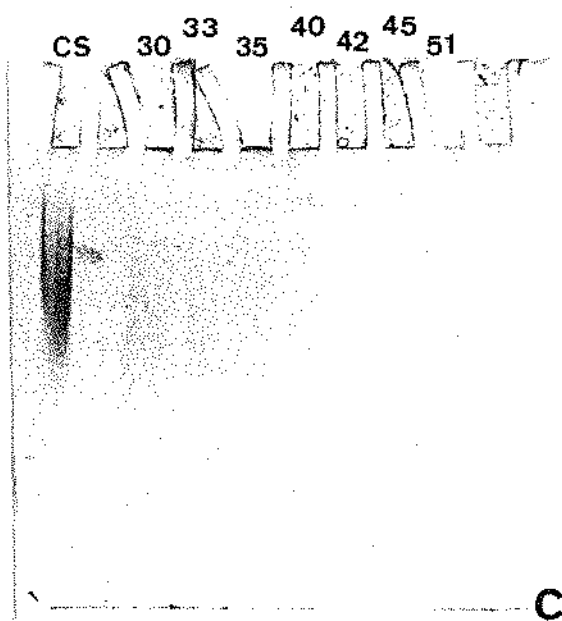
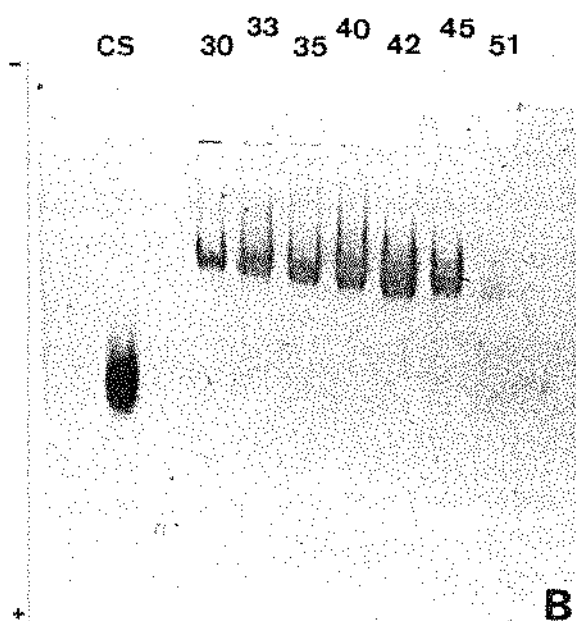
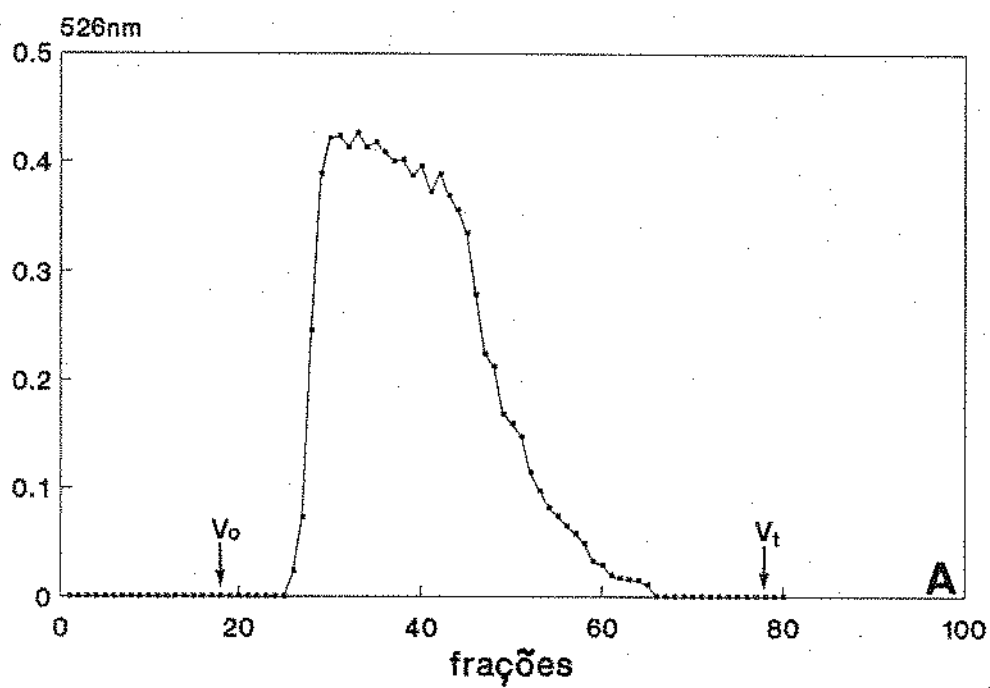


Fig. 8 - Cromatograma (A) da fração D1 da região P em Sepharose CL -4B. Absorbâncias em 526 nm determinadas pelo método do DMMB. Vo-volume morto, Vt- volume total.

Eletroforese em agarose-poliacrilamida (B) e em poliacrilamida-barbital, após digestão com papaína, (C) das frações com maior densidade óptica. Condições: corrente de 15mA durante 1 h e 50 min e 30 min., respectivamente Coloração: Azul de Toluidina. Padrão: Condroitín-sulfato (CS).

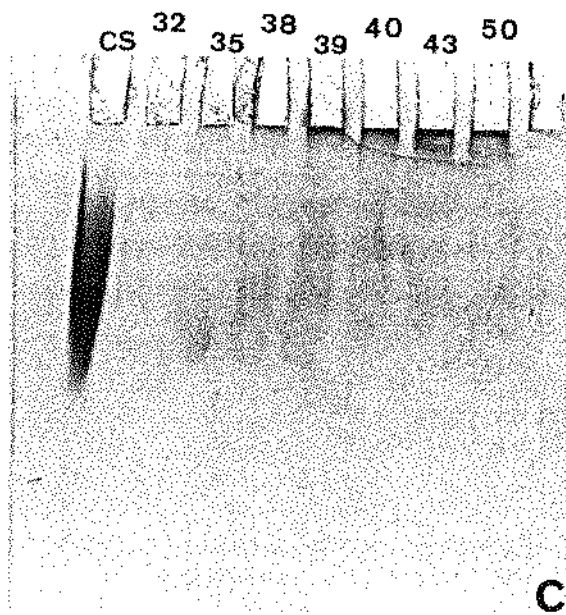
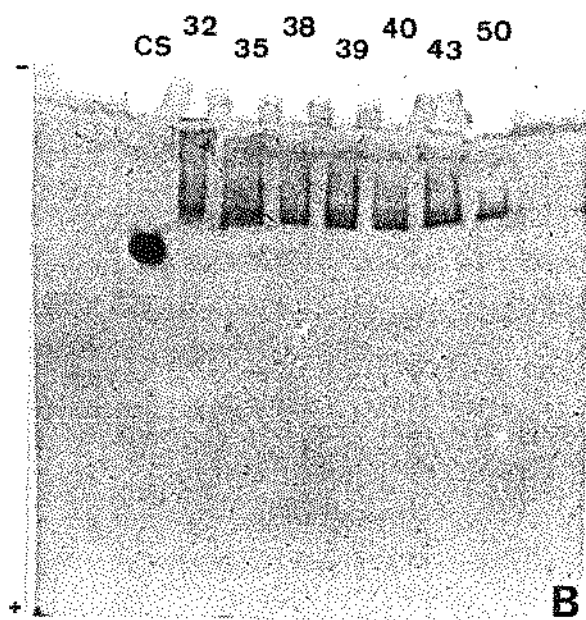
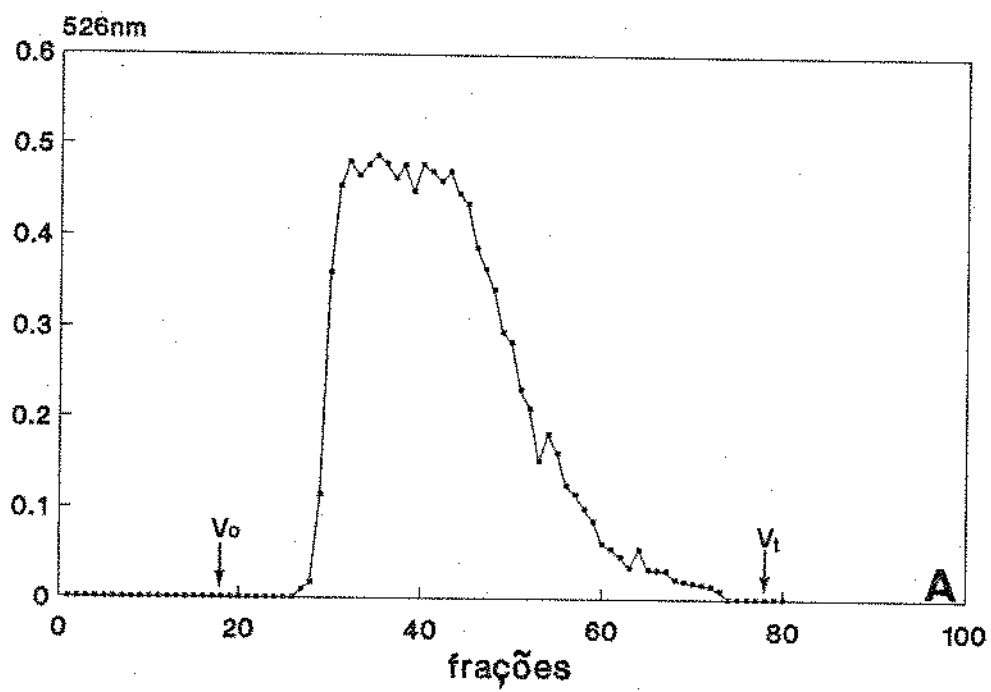


Fig. 9 - Cromatograma (A) da fração D1 da região T em Sepharose CL -4B. Absorbâncias em 526 nm determinadas pelo método do DMMB. Vo-volume morto, Vt- volume total.

Eletroforese em agarose-poliacrilamida (B) e em poliacrilamida-barbital, após digestão com papaína, (C) das frações com maior densidade óptica. Condições: corrente de 15mA durante 1 h e 50 min e 30 min., respectivamente Coloração: Azul de Toluidina. Padrão: Condroitim-sulfato (CS).

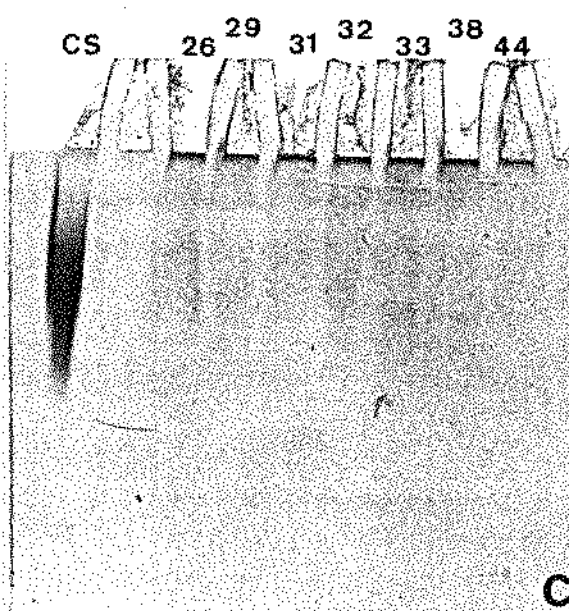
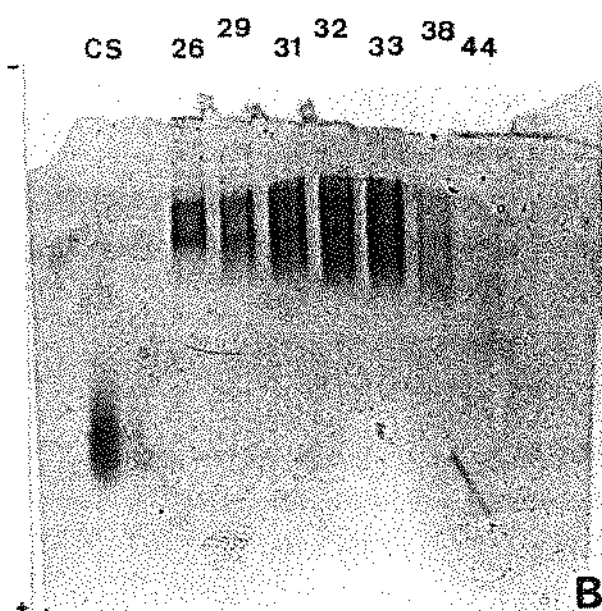
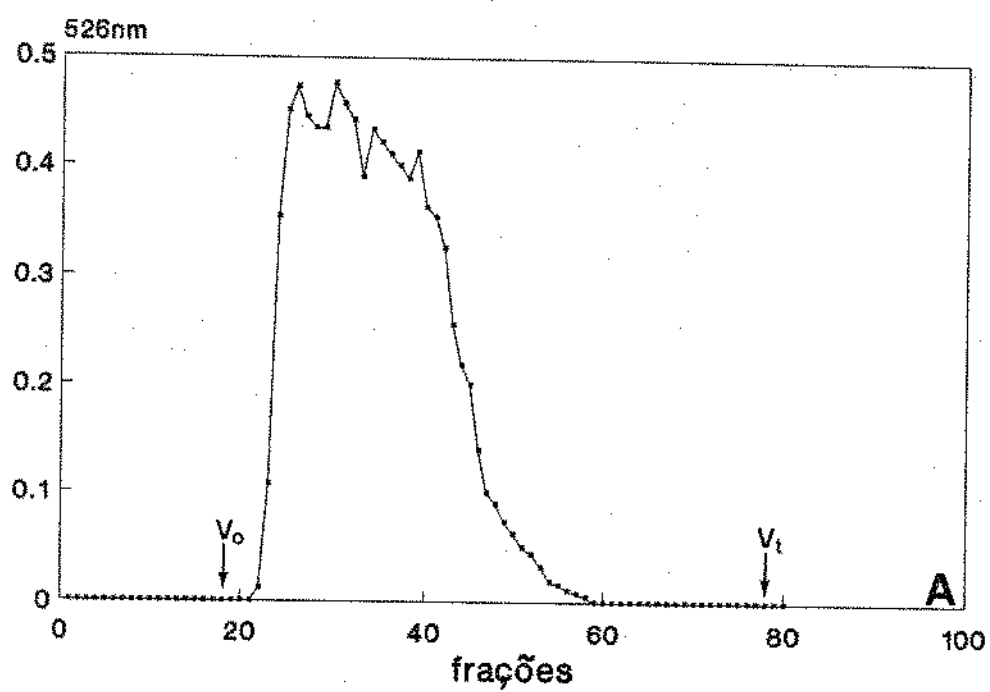


Fig. 10 - Eletroforese em agarose-poliacrilamida das frações eluídas da cromatografia após digestão pela papaina (A) e pela papaina e Chase AC (B). Padrão: CS - Condroitin-sulfato. Coloração: Azul de Toluidina.

CS F1 F2 F3 P T



A +



B

Fig. 11 - SDS-PAGE (gradiente 3,5 - 7,5%) das frações da cromatografia de gel filtração, próximas ao V_t . Em A impregnação pelo nitrato de prata e em B coloração pelo CEC-azul de alcian. Padrão: QS- Queratan-sulfato.

kDa

F1

F2

F3

P

T

94

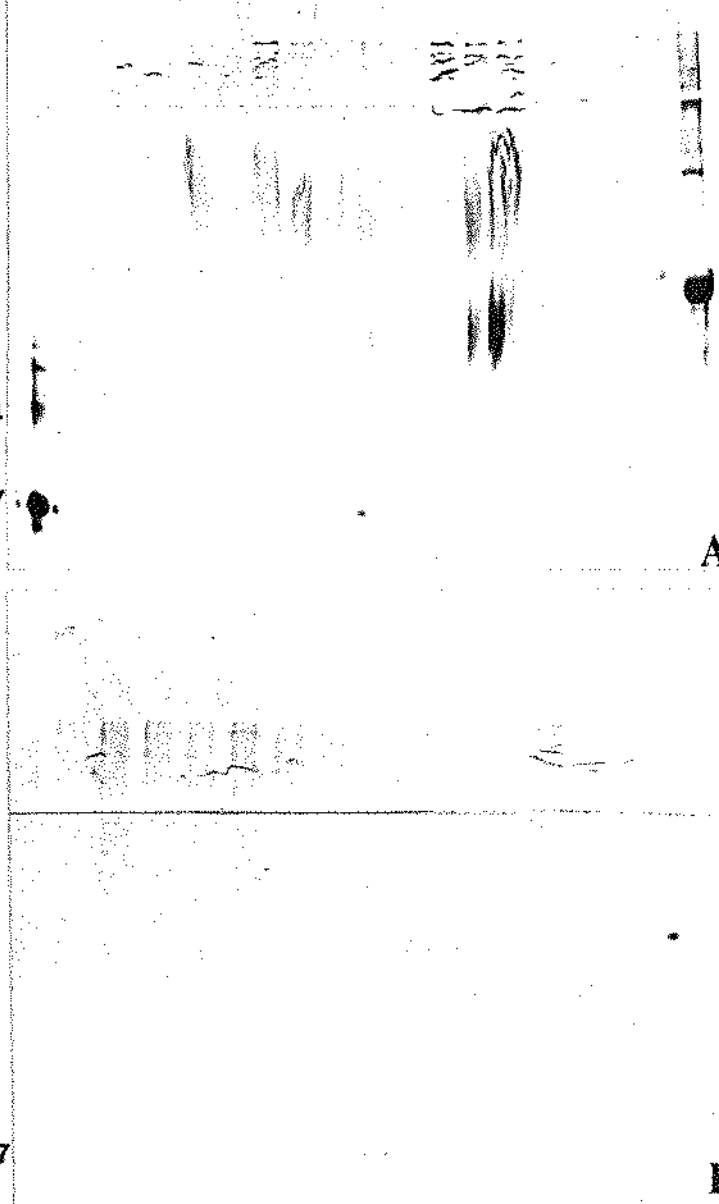
67

COL

A

67

B +



6. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E ELETROFORÉTICA DA FRAÇÃO D4

Os cromatogramas de todas as regiões analisadas em DEAE-Sephacel apresentaram um perfil semelhante, com um pico após a aplicação do gradiente de NaCl (Fig. 12A; 13A; 14A e 16A). Com a região P (Fig. 15A), após o gradiente, foram obtidos dois picos, sendo o primeiro semelhante às outras regiões e um segundo pico com absorbâncias pequenas. A concentração de NaCl para eluição de cada pico foi de 0 - 0,5 M em F1, F2 e T, para F3 entre 0 - 0,45 M e de 0 - 0,6 M para P. O segundo pico em P foi eluído com 0,9 M. Aparentemente não houve material catiônico.

Todas as frações obtidas das cromatografias foram analisadas em SDS-PAGE na presença e ausência de 2-Me.

Nas regiões F1, F2, F3 e P, pode ser identificado a presença de proteínas nas posições de 70 e 60 kDa, com comportamento eletroforético semelhante aos pequenos PG decorim e FM. Da mesma forma colágeno também pode ser visto nestas regiões. A presença de proteínas com Mr entre 120 e 150 kDa, representando provavelmente as cadeias α do colágeno II, são mais evidentes em F1 (Fig. 12B e C) e T (Fig. 16B e C).

Em F1, na ausência de 2-Me o colágeno aparece mais intensamente corado. Outras proteínas são observadas com Mr que varia de 90 a 19 kDa.

A análise de F2 em SDS-PAGE (Fig. 13), na presença de 2-Me (Fig. 13B), evidência a presença de proteínas com Mr acima de 94 kDa (130, 150 e 190 kDa). Na ausência de 2-Me (Fig. 13C), as proteínas com Mr de 140, 100, 56 kDa e, principalmente a 70 kDa, são visíveis. Proteínas com Mr entre 43 e 30 kDa podem ser observadas na presença e ausência de 2-Me.

As frações de F3 possuem uma proteína correspondendo a 150 kDa, que só é detectada na presença de 2-Me (Fig. 14B). As proteínas de 70 kDa e de 60 kDa, estão presentes na presença e ausência de 2-Me. Porém a de 70 kDa é mais evidente na ausência de 2-Me.

As Fig. 15A e B mostram o SDS-PAGE das frações da região P onde destacam-se as proteínas com Mr de 33, 60 e 70 kDa na presença ou ausência de 2-Me.

Na análise da região T (Fig 16B e C) observa-se com destaque uma proteína com 33 kDa. Em amostras não tratadas com 2-Me estão presentes proteínas com

Fig. 12 - Cromatograma (A) da fração D4 da região F1 em DEAE- Sephacel. Absorbâncias em 280 nm (-•-•-) e condutividade (-+-+-). A seta indica o gradiente (G) com NaCl 0 - 1,5 M.

SDS-PAGE (gradiente 4 - 16%) das frações com 2-Me (B) e sem 2-Me (C). Condições: corrente de 25 mA durante 3 h. Coloração: Impregnação pela prata.

Padrão de peso molecular: fosforilase β (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), subunidade da catalase (36 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

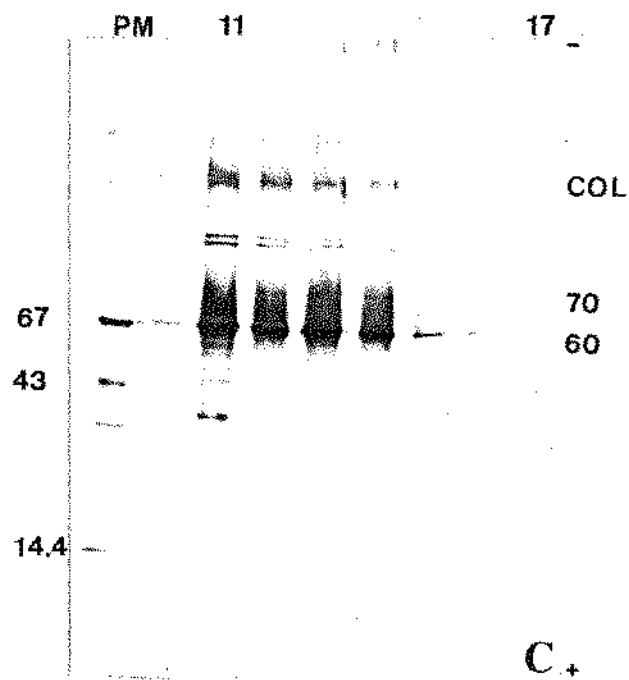
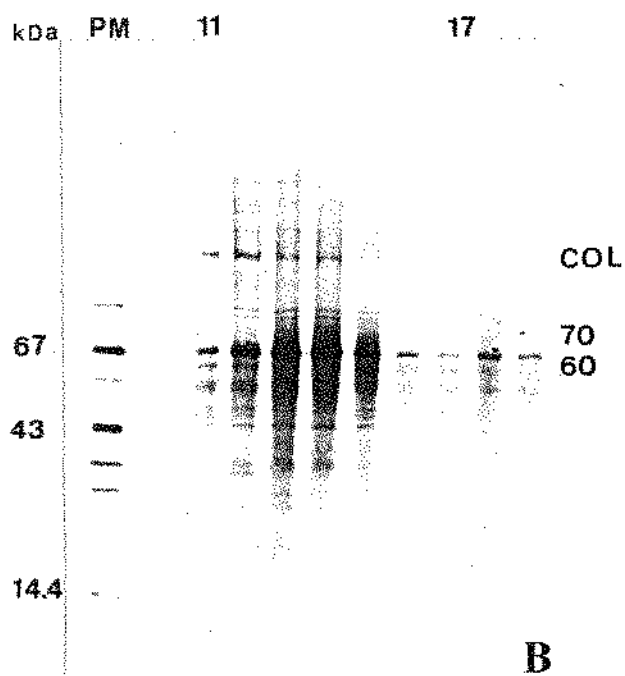
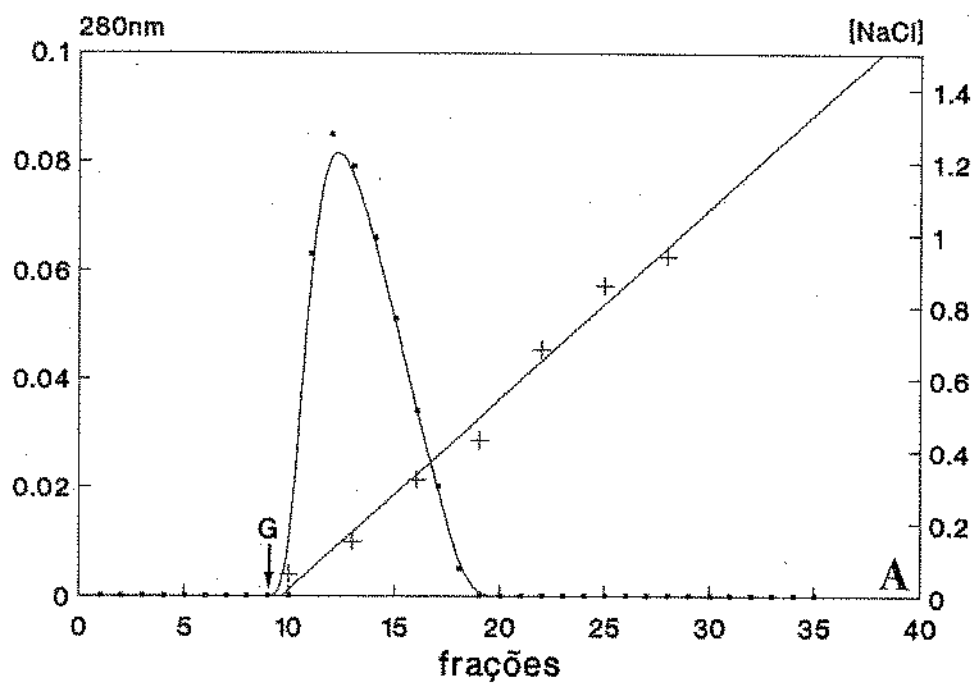


Fig. 13 - Cromatograma (A) da fração D4 da região F2 em DEAE- Sephacel. Absorbâncias em 280 nm (-.-.-) e condutividade (-+--+). A seta indica o gradiente (G) com NaCl 0 - 1,5 M.

SDS-PAGE (gradiente 4 - 16%) das frações com 2-Me (B) e sem 2-Me (C). Condições: corrente de 25 mA durante 3 h. Coloração: Impregnação pela prata.

Padrão de peso molecular: fosforilase β (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), subunidade da catalase (36 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

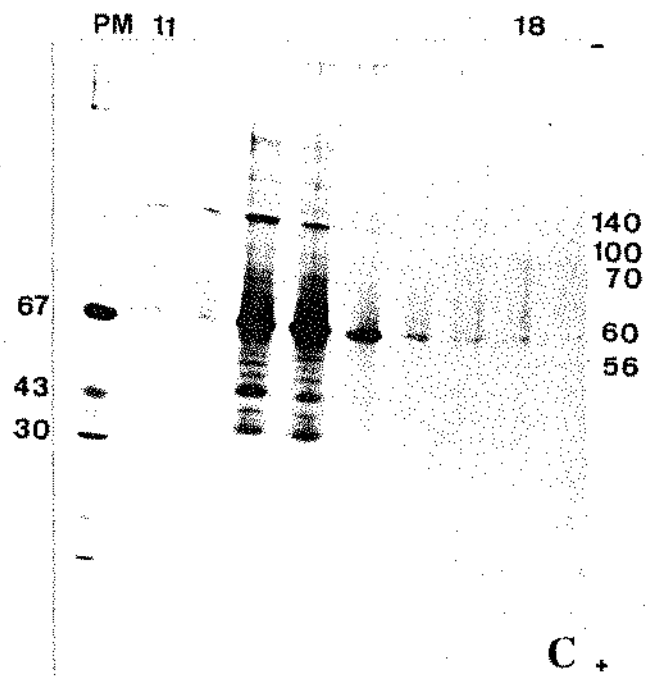
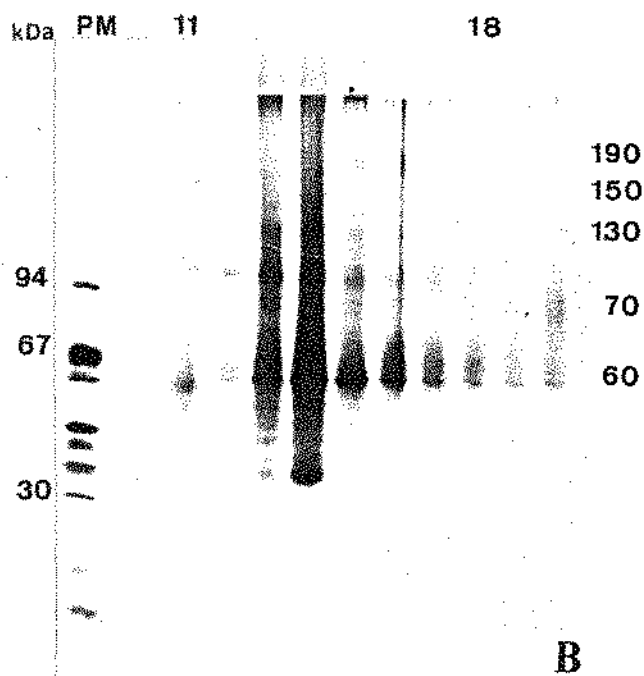
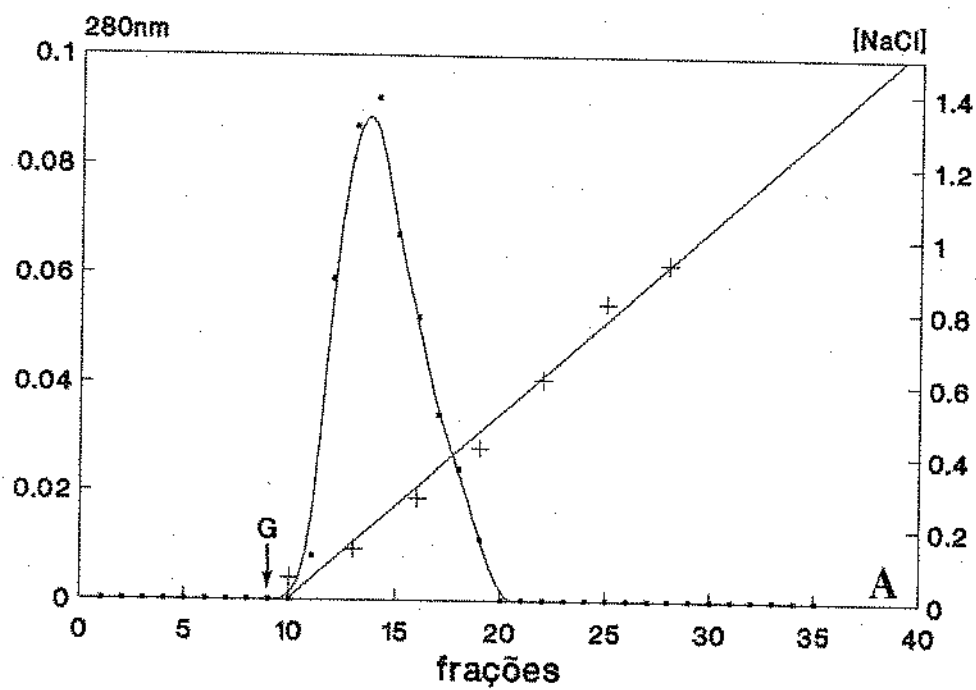


Fig. 14 - Cromatograma (A) da fração D4 da região F3 em DEAE- Sephacel. Absorbâncias em 280 nm (-.-.-) e condutividade (-+--+). A seta indica o gradiente (G) com NaCl 0 - 1,5 M.

SDS-PAGE (gradiente 4 - 16%) das frações com 2-Me (B) e sem 2-Me (C). Condições: corrente de 25 mA durante 3 h. Coloração: Impregnação pela prata.

Padrão de peso molecular: fosforilase β (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), subunidade da catalase (36 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

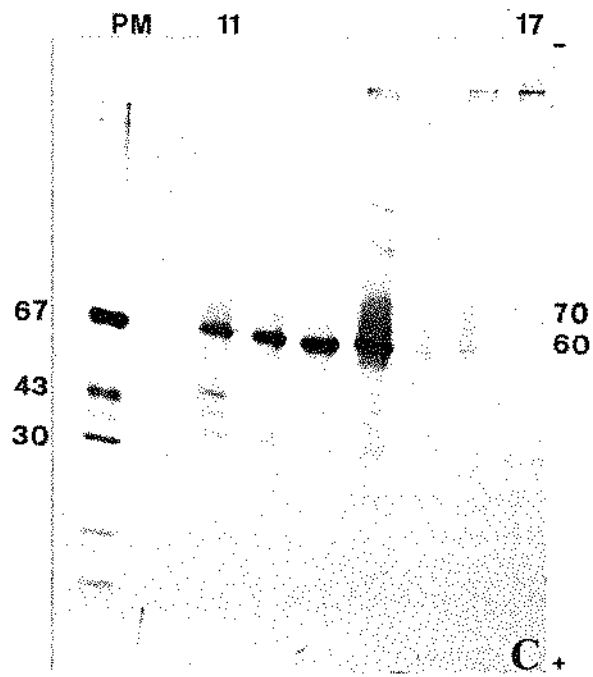
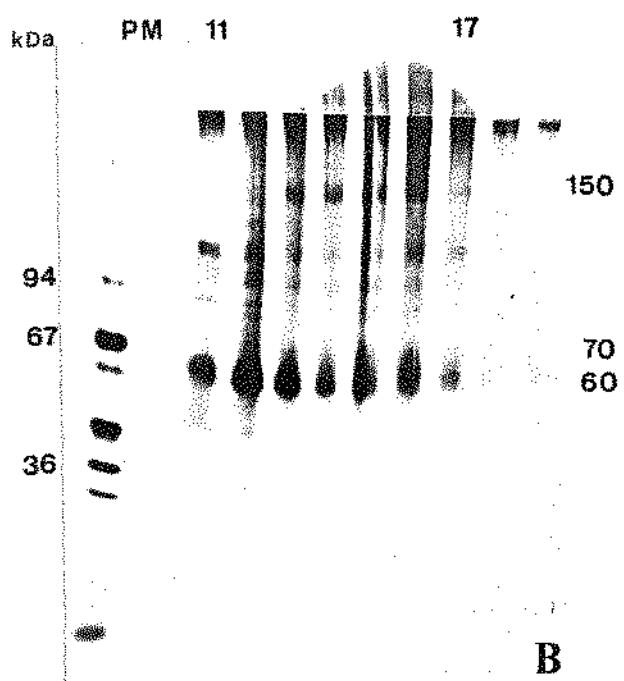
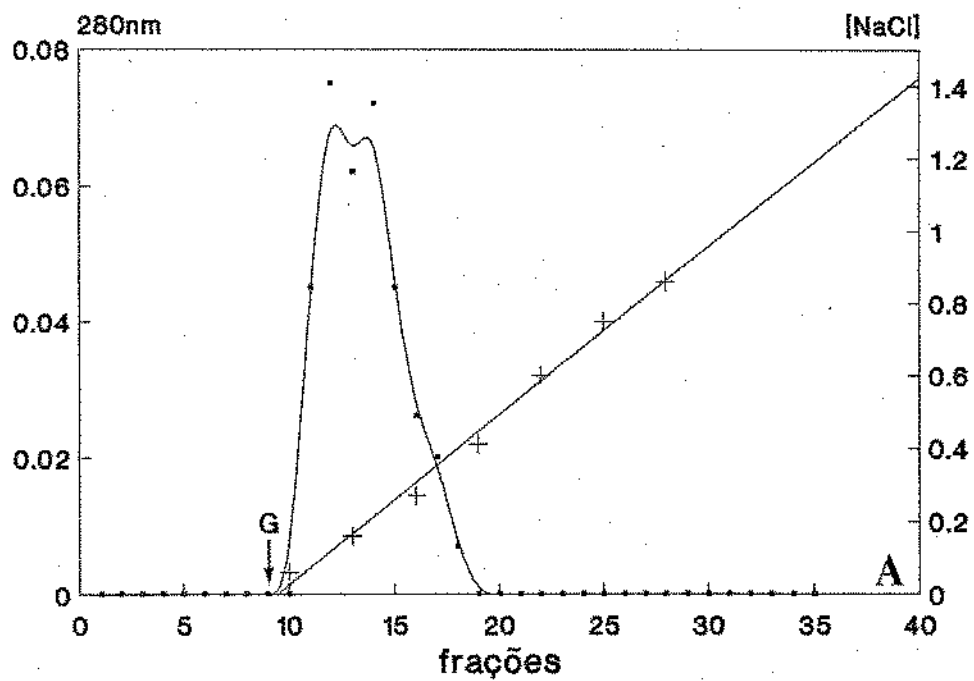


Fig. 15 - Cromatograma (A) da fração D4 da região P em DEAE- Sephacel. Absorbâncias em 280 nm (-*-*) e condutividade (-+--+). A seta indica o gradiente (G) com NaCl 0 - 1,5 M.

SDS-PAGE (gradiente 4 - 16%) das frações com 2-Me (B) e sem 2-Me (C). Condições: corrente de 25 mA durante 3 h. Coloração: Impregnação pela prata.

Padrão de peso molecular: fosforilase β (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), subunidade da catalase (36 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

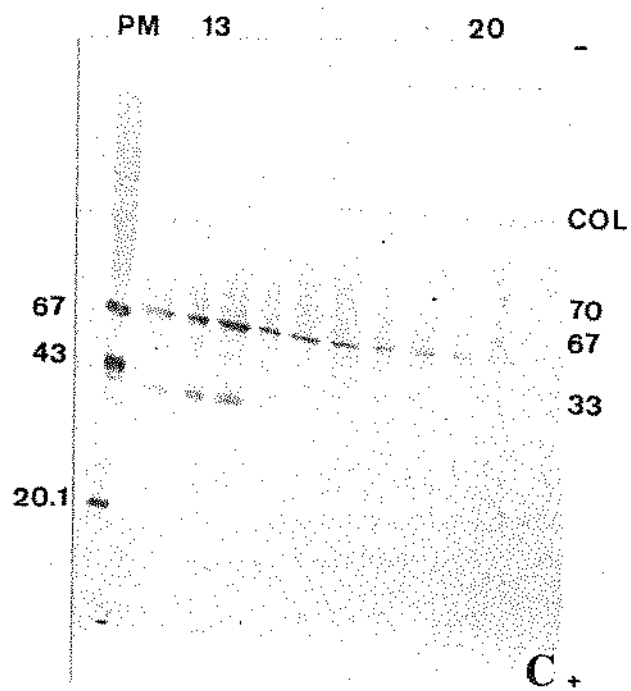
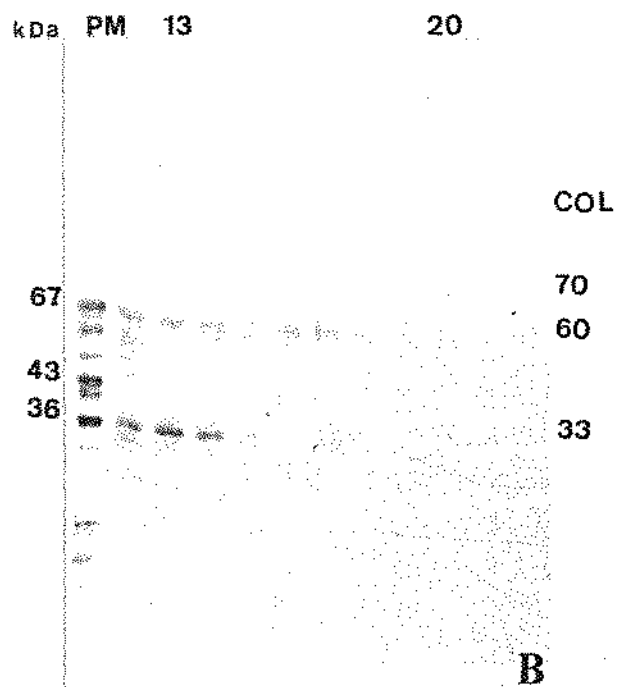
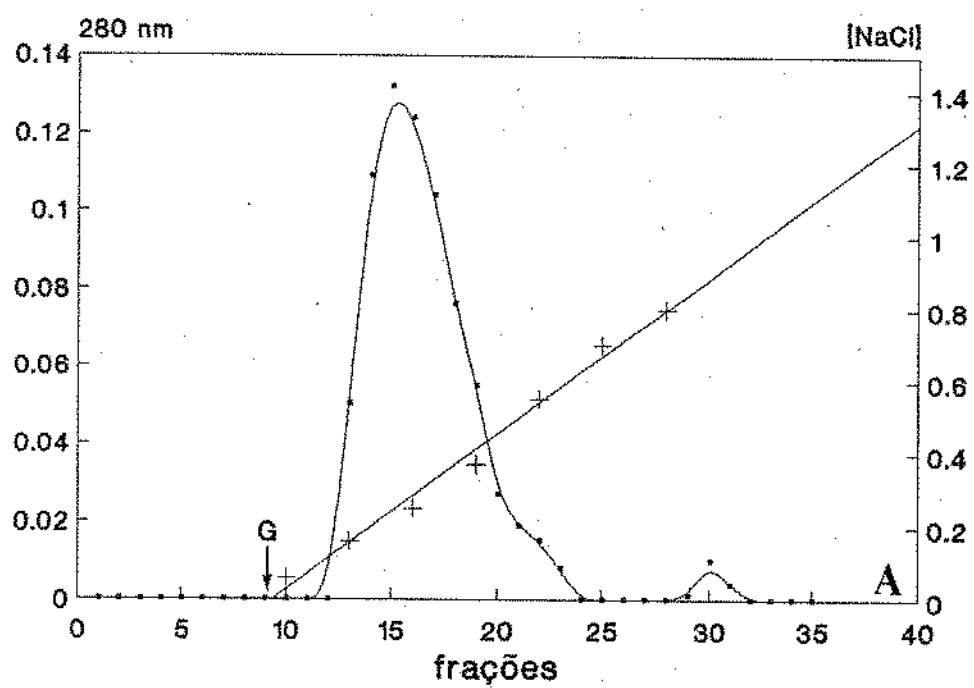
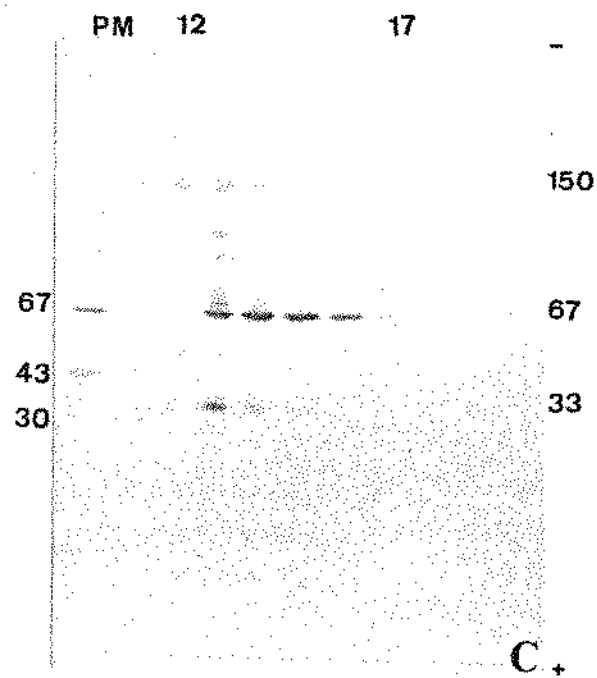
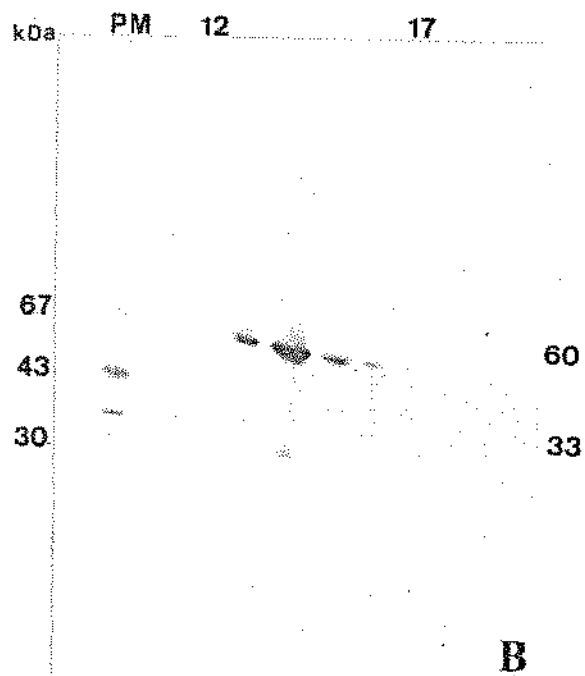
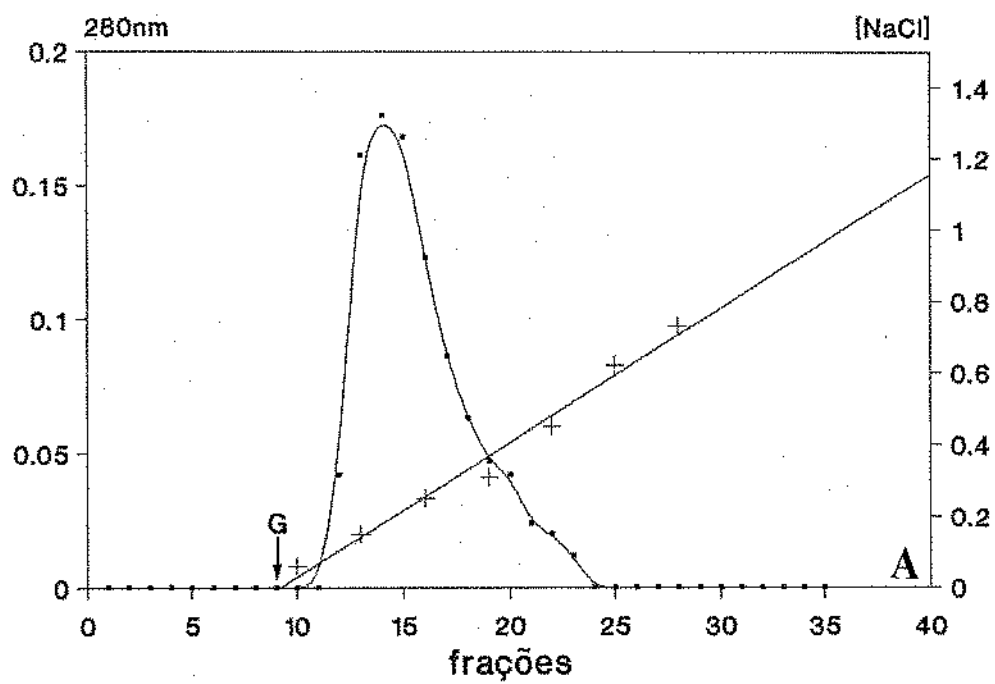


Fig. 16 - Cromatograma (A) da fração D4 da região T em DEAE- Sephacel. Absorbâncias em 280 nm (-*-*) e condutividade (-+--+). A seta indica o gradiente (G) com NaCl 0 - 1,5 M.

SDS-PAGE (gradiente 4 - 16%) das frações com 2-Me (B) e sem 2-Me (C). Condições: corrente de 25 mA durante 3 h. Coloração: Impregnação pela prata.

Padrão de peso molecular: fosforilase β (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), subunidade da catalase (36 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

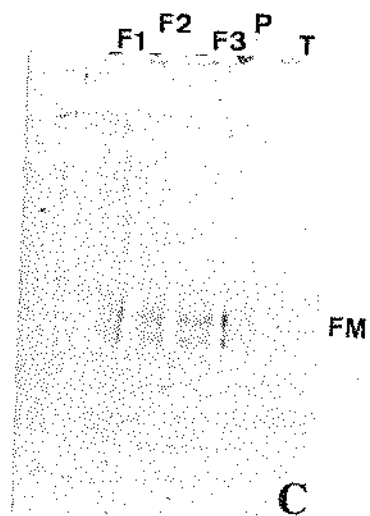
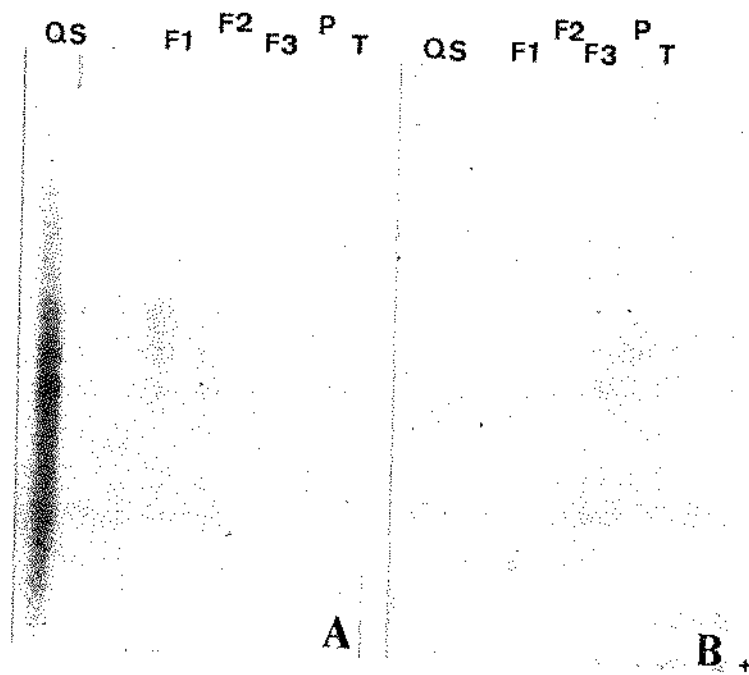


67 e 150 kDa. Essa proteína de 150 kDa diminui fortemente na presença de 2-Me (Fig. 16B) enquanto que uma de 60kDa se torna muito intensa. Talvez essa última seja a mesma de 67kDa nas amostras sem 2-Me, mas que na presença do agente redutor exiba outro padrão de migração.

A presença do pequeno PG, FM, em todas as regiões, é mostrada pelo método do CEC/azul de alcian (Fig. 17A). A coloração é praticamente abolida quando se trata previamente as amostras com queratanase (Fig. 17B).

O “immunoblotting” do material de cada região, utilizando anti-FM, mostra reação positiva para a banda na posição em torno de 60 kDa. A presença de duas bandas coradas, tem sido detectada em testes anteriores.

Fig. 17 - SDS-PAGE (gradiente 4 - 16 %) das frações eluídas da cromatografia de troca iônica das diferentes regiões. Em A as frações tratadas pelo método CEC-azul de alcian e em B as mesmas amostras tratadas pelo método de CEC-azul de alcian após digestão pela queratanase. Em C “immunoblotting” para FM.



DISCUSSÃO

A junta sinovial permite a transmissão de forças entre estruturas ósseas, favorecendo o seu movimento. Dentro desse contexto, a função da cartilagem articular é de reduzir o “stress” quando forças são aplicadas às articulações, proteger os ossos do atrito e fragmentação, bem como reduzir a fricção na junta (Freeman et al., 1975). A habilidade da cartilagem em resistir às forças de compressão, tensão e atrito depende da composição e integridade estrutural dos elementos da MEC (Kempson, 1979).

A regulação pelos condrócitos da síntese e degradação da matriz cartilaginosa é influenciada por fatores mecânicos e biológicos (Kim et al., 1994). Estudos “in vivo” demonstraram que a compressão estática (Palmoski & Brandt, 1984; Gray et al., 1989; Sah et al., 1989) ou compressão reduzida em juntas, promovem a perda do conteúdo de GAGs e o decréscimo na síntese de PGs e proteínas (Palmoski & Brandt, 1984; Kiviranta et al., 1987; Sah et al., 1989). Por outro lado, a aplicação dinâmica de forças compressivas estimulam a síntese e o conteúdo de PGs no tecido (Caterson & Lowther, 1978; Salter et al., 1980; Kiviranta et al., 1988). Os resultados variavam de acordo com a intensidade da força e a geometria em que a mesma é aplicada (Palmoski & Brandt, 1984; Sah et al., 1989).

Os estudos em cultura demonstraram alguma relação qualitativa entre a distribuição de forças nas juntas e o metabolismo da cartilagem articular, embora não foi possível quantificar os elementos de matriz em relação às regiões anatômicas. Isto ocorre devido às complexas relações geométricas dentro das juntas, bem como os modelos de distribuição de forças (Sah et al., 1989).

Na tentativa de suplantar as dificuldades de se trabalhar com modelos “in vivo”, tem sido realizadas adaptações para estudos “in vitro”, visando relacionar as características encontradas com aspectos biomecânicos e bioquímicos “in vivo”. Com esses resultados ficou demonstrada a necessidade de se analisar sob aspectos bioquímicos os modelos experimentais “in vivo”, pois as características bioquímicas da cartilagem de diferentes regiões anatômicas reflete a adaptação fisiológica do tecido à intensidade e à geometria em que a força biomecânica é aplicada.

Simon (1970) foi um dos pioneiros a analisar a atuação de forças biomecânicas na resposta fisiológica do tecido cartilaginoso. Nesses primeiros estudos, o autor relacionou áreas de contato e espessura da cartilagem com a presença de forças compressivas. Ficou demonstrado que o “stress” estático nas juntas não está relacionado a espessura do tecido. Em joelhos bovinos, por exemplo, a atuação de forças compressivas é maior na patela do que no contato femoro-tibial.

A cartilagem não é homogênea e sua espessura não corresponde às suas propriedades biomecânicas. Variações na orientação das fibras colagênicas, bem como no conteúdo de GAGs e água influenciam na resposta do tecido às forças biomecânicas (Simon, 1970, 1971). A geometria da junta é outro fator fisiológico importante na transmissão de forças na cartilagem articular. Mockenhanot (1990) demonstrou que juntas congruentes não distribuem equitativamente as forças compressivas por todas as regiões anatômicas. Refior & Hackenbroch (1978) observaram que a cartilagem articular no joelho humano reage de maneira fisiologicamente semelhante a diferentes tipos de “stress” mecânicos. A força transmitida para a cartilagem do joelho é suportada por uma rede tridimensional de fibras colagênicas, preenchida com moléculas hidratadas de PGs (Broom, 1982 e 1984). Broom & Marra (1986) demonstraram a importância da interação entre as fibrilas, bem como seu arranjo, na manutenção da integridade tecidual. A resistência da cartilagem a pressão, é diretamente relacionada ao conteúdo de PGs na matriz. O alto conteúdo de PGs em determinadas regiões está diretamente relacionado à pouca deformidade do tecido (Cotta & Puhl, 1978).

A matriz da cartilagem articular apresenta diversas propriedades físicas quando examinada em diferentes planos. A presença de fendas artificiais, em várias direções, sugere diferentes arranjos dos feixes de colágeno na subcamada imediatamente inferior a superfície articular (Jeffery et al., 1991). Na zona superficial em côndilo femoral lateral de cães a maioria das fibrilas estão dispostas paralelamente à superfície articular no sentido latero-lateral (Vilarta, 1990). O alinhamento dessas fibras estão direcionadas para melhor resistir a aplicação de forças (Roth et al., 1979).

Em trabalhos, onde foram investigados a influência dos componentes da matriz na biomecânica do tecido cartilaginoso, mostrou-se que o colágeno tem um papel secundário no turgor do tecido. O colágeno, colaboraria na retenção dos PGs no estroma

e na regulação indireta da permeabilidade do gel (PG) a solutos e água (Hedbys & Mishima, 1962).

Os dados apresentados neste trabalho com as fendas artificiais revela claramente a heterogeneidade da distribuição de forças nas diferentes regiões do joelho bovino. A quantificação relativa de colágeno mostra que a sua solubilização, e supostamente sua concentração, permanecem constantes em todas as regiões. Esses dados sugerem que não somente a concentração dos componentes da matriz mas sua distribuição espacial, e arranjo molecular contribuem para a homeostase tecidual. Entre F1, F2 e F3 os padrões na distribuição de fibras colagênicas modificam-se ao longo de regiões mais proximais até os côndilos (F3) onde as fendas se apresentaram com disposição no sentido supero-inferiores para latero-laterais. Em P, os padrões das fendas artificiais sugerem uma distribuição radial de forças na periferia da estrutura e latero-lateral na porção central. Em T, as fibras estão distribuídas no sentido latero-lateral na superfície da cartilagem articular. Desse modo, a cartilagem articular das diferentes regiões do joelho bovino, suportam a aplicação diferenciada de forças compressivas em vários sentidos. Essas forças compressivas são geradas durante o próprio movimento da junta. Portanto a resistência a forças compressivas dentro do joelho bovino não envolve quantidades significativamente diferentes de colágeno mas sim, alterações no arranjo do mesmo na camada superficial da cartilagem. Bullogh e colaboradores (1985) detectaram mudanças na hidratação da matriz e alterações na orientação de fibras colagênicas em regiões da epífise proximal da tibia não recobertos pelos meniscos. Os GAGs destas regiões apresentaram, além do típico gradiente progressivo entre a superfície articular e as camadas mais profundas, um modelo de distribuição diferencial em seu conteúdo entre as regiões anatômicas da mesma articulação.

A cartilagem articular sendo heterogênea, permite observar variantes morfológicas e bioquímicas dentro de diferentes regiões que suportam diferentes forças biomecânicas (Kincaid & Van Sickle, 1981; Bullough et al., 1985). Essas variações podem estar relacionadas ao grau de entumescimento (Kempson et al., 1971) ou conteúdo de GAGs (Maroudas et al., 1973; Bjelle, 1975).

Nas regiões analisadas do joelho bovino, neste trabalho, foram determinados a quantidade de GAGs solubilizados pelo tratamento com Gu-HCl 4 M e/ou

pela digestão enzimática total. Os GAGs solúveis ao tratamento com Gu-HCl 4 M não apresentaram diferenças significativas, já a quantificação total dos GAGs mostra conteúdos significativamente diferentes. Estes dados sugerem que nas regiões F2 e F3, a interação entre os diferentes componentes é mais intensa, em especial com relação aos PGs. O simples tratamento com GuHCl não foi suficiente para extração completa dos PGs, conforme já verificado anteriormente (Arcanjo et al., 1994). Após digestão com papaína, a quantificação de GAGs mostrou valores significativamente mais altos pois, a estrutura protéica da matriz estaria retendo uma parte dos PGs.

Os relatos quanto a distribuição de GAGs em diferentes regiões de uma mesma articulação tem sido amplamente investigados. Estudos bioquímicos, em diferentes regiões do joelho de coelho demonstraram que o conteúdo de GAGs é homogêneo nas diferentes regiões analisadas apesar das diferentes forças compressivas (Heise & Toledo, 1993). Por microespectrofotometria, Kiviranta e colaboradores (1987) demonstraram que a cartilagem tibial em cães apresenta uma concentração maior de GAGs que os côndilos do fêmur. Esses dados, aparentemente conflitantes, estão relacionados à aspectos mecânicos próprios de cada junta. A distribuição topográfica dos GAGs na cartilagem deve ser considerada não somente com relação as forças biomecânicas e a espessura do tecido (Venn, 1979), mas com a estrutura anatômica e a fisiologia do movimento da espécie analisada (Kiviranta et al., 1992). Em joelhos humanos, os meniscos suportam forças compressivas superiores ao platô da tibia (Maquet et al., 1975). Os meniscos são capazes de reduzir significativamente a pressão na superfície tibial, uma vez que são capazes de distribuir a pressão por toda a superfície articular (Ahmed & Burke, 1983). Portanto, os meniscos podem ser também responsáveis pelas diferenças encontradas, uma vez que a área ocupada por eles na superfície articular e sua espessura estejam diretamente relacionados às adaptações de cada espécie. A todas essas diferenças pode-se sugerir ainda o fato da utilização de animais com movimentos, postura e hábitos diferentes. Consequentemente, não somente forças biomecânicas, mas também outros fatores, incluindo influências genéticas e características intrínsecas devem regular a espessura e as propriedades fisiológicas do tecido (Aydellote et al., 1992).

Para melhor compreender as relações entre a composição da MEC e a presença de estímulos sejam mecânicos ou químicos, é preciso ter em mente que os

condrócitos são células muito sensíveis aqueles estímulos e que podem apresentar um comportamento metabólico heterogêneo que varia de região para região de onde a cartilagem foi removida (Aydellote et al., 1992). A heterogeneidade de síntese dos condrócitos tem reflexo na estrutura dos monômeros de PGs agregantes e não agregantes. Talvez o estímulo biomecânico não seja um dos fatores desencadeantes desse fenótipo, mas com certeza um dos principais mantenedores (Buschmann et al., 1992).

A caracterização dos PGs entre diferentes regiões anatômicas foi realizado primeiramente por Bjelle e colaboradores (1974), os quais não detectaram diferenças entre os PGs nas duas regiões da epífise distal do fêmur de bovinos. Em articulação metacarpo-falangiana de bovinos, Swann e colaboradores (1979) descrevem PGs isolados em frações de alta densidade e baixa densidade. Os mesmos resultados foram encontrados em cartilagem da porção proximal do úmero de bovinos (Rosemberg et al., 1976) e em cartilagem de joelhos de cães e coelhos (Manicourt et al., 1986).

No caso de articulação de joelho bovino, a utilização de procedimentos já padronizados para análise de PGs para as cinco regiões, permitiu o isolamento e identificação de três populações de PGs. Os padrões de migração, mais rápido e polidisperso em T, mais lento em P e intermediários em F1, F2 e F3, caracterizam moléculas com diferentes Mr. Além disso, a carga oriunda das cadeias de GAGs também são diferentes, uma vez que a migração em gel de agarose-poliacrilamida depende da carga total da molécula. Os resultados encontrados para as cinco regiões revelaram moléculas sintetizadas mediante ação adaptativa do tecido à dinâmica da junta. Os resultados obtidos, a partir de SDS-PAGE de algumas frações de gel filtração, deixaram evidentes que em P, onde as forças compressivas são mais intensas, ocorre a presença mais proeminente de pequenos PGs, quando comparado com F2, F3 e T. Já em F1, que suporta forças compressivas diferentes da encontrada em P, observamos com maior destaque o biglicam em relação ao decorim. O efeito observado entre as populações de pequenos PGs parece também estar relacionado à distribuição de forças dentro da junta. Essa distribuição de forças, proposta por Simon (1970), leva em consideração o "stress" estático no joelho, mas deve-se somar a isso as condições de movimento dinâmico da junta do animal, bem como, a ação amortecedora dos meniscos.

Recentemente, Lammi e colaboradores (1994) demonstraram que a expressão de PGs na matriz cartilaginosa em cultura varia tanto quantitativamente quanto qualitativamente dependendo da continuidade da aplicação da força compressiva. Estes autores mostraram que as propriedades de agregação dos PGs, comprimento das cadeias laterais de GAGs e a relação CS-6 e CS-4 sulfato apresentam diferenças quando o tecido é submetido a compressão contínua; já no caso de experimentos com compressão dinâmica, não encontraram diferenças nos parâmetros acima mencionados.

A presença de CS como único GAG encontrado em todas as regiões está de acordo com os dados já revisados por Mourão (1991), mostrando ser o único GAG encontrado em cartilagem articular de mamífero adulto jovem. Com relação ao tamanho das cadeias de GAGs, não foi encontrado diferenças entre F1, F2, F3, P e T. No entanto é preciso chamar atenção para a presença de uma maior concentração de cadeias com Mr acima de 150 kDa, nas regiões P e F2, onde o “stress” contínuo é mais acentuado (Simon, 1970).

Os dados relatados por Lammi e colaboradores (1994) vem corroborar com os resultados por nós obtidos. Esses autores tem relacionado compressão contínua com a presença de GAG de Mr elevado e consequente retardo na migração de PGs em gel de agarose-poliacrilamida. Resultados semelhantes obtivemos nas regiões F2 e P.

A expressão diferenciada de PGs pode estar relacionado a uma possível lentidão no tráfico intracelular e secreção do esqueleto proteico, através de um mecanismo desconhecido (Lammi et al., 1994). Mitchell & Hardingham (1981) observaram que a repressão da síntese de proteínas em células de condrossarcoma está relacionado com aumento do comprimento das cadeias de GAGs e do tamanho dos PGs simultaneamente. Outras evidências demonstram que a secreção de macromoléculas é facilitada pela ação do citoesqueleto, o qual sofre múltiplos efeitos da alta compressão estática (Begg et al., 1983). Alterações nos elementos do citoesqueleto podem explicar a redução na incorporação do sulfato em cultura de condrócitos sob alta compressão (Lammi et al., 1994). Contudo, sabe-se que o citoesqueleto associa-se à histonas (Zambetti et al., 1985) e a polissomos (Bagchi et al., 1987), e o desarranjo dessa associação indicaria uma desestabilização da síntese de PGs. Essa desestabilização parece prejudicar principalmente os PGs agregantes, uma vez que Lammi e colaboradores (1994) observaram um aumento

significativo na transcrição de RNAm dos pequenos PGs, biglicam e decorim, enquanto que a concentração de RNAm dos agregantes é sensivelmente menor. Já Visser e colaboradores (1994) demonstraram, em cartilagem bovina sob compressão dinâmica, que a tradução de decorim é favorecida em relação ao biglicam.

Os pequenos PGs, biglicam e decorim, parecem estar envolvidos no efeito biomecânico sofrido pelas cartilagens. Esses PGs de pequeno peso foram isoladas em cartilagem articular bovina por Rosenberg e colaboradores (1985) e Choi e colaboradores (1989). Estes autores comprovaram imunologicamente a individualidade de cada uma delas, bem como a presença de DS ligado covalentemente ao esqueleto proteico. Em joelho humano, Roughley & White (1989) isolaram e caracterizaram DS-PG em epífise proximal da tíbia e distal do fêmur. Esses PGs de baixo peso detectados nesses trabalhos são o decorim e o biglicam. Normalmente estes PGs são encontrados em D4, no entanto estão presentes também na fração D1 (alta densidade), o que sugere algum tipo de interação entre esses pequenos PGs e os monômeros de PG agregantes. Recentemente, Bidanset e colaboradores (1992) demonstraram que decorim, biglicam e FM podem se ligar ao colágeno tipo VI via esqueleto proteico, especialmente na sequência rica em leucina. Talvez uma interação de um tipo semelhante esteja acontecendo entre esses pequenos PGs e os PGs agregantes, uma vez que Roughley & White (1989) demonstraram que só há migração independente entre os DS-PG e os agregantes na presença de SDS e 2-Me. Em nossos resultados a região P apresentou na fração D1, após cromatografia em Sepharose CL 4B, as duas populações migrando em SDS-PAGE, na presença de 2-Me, com Mr em torno de 100 e 200 kDa.

Tudo isso indica, mais uma vez, o efeito de forças biomecânicas na fisiologia do condrócito, tanto no conteúdo de elementos de matriz quanto na expressão diferenciada desses elementos.

Além dos grandes PGs e colágeno, as proteínas não colagênicas representam cerca de 5% do conteúdo em massa na MEC de cartilagem (Kuttner et al., 1991). As proteínas não colagênicas são um grupo de moléculas que estão parcialmente caracterizadas e apresentam funções biológicas importantes (Heinegård & Oldberg, 1989). Através da interação com outros constituintes, elas influenciam a associação supramolecular da matriz de cartilagem, afetando as propriedades físicas do tecido

(Heinegård & Pimentel, 1992). A interação direta das proteínas não-colagênicas com condrócitos e células vizinhas pode funcionar como mediador biológico para as funções celulares (Sommarin et al., 1989). Raríssimos são os relatos de quantificação total de proteínas em relação a diferentes regiões anatómicas. Strider e colaboradores (1975) relatam um conteúdo duas vezes superior de proteínas não colagênicas na porção distal do úmero em relação a porção proximal da ulna em bovinos. Esses autores sugerem este comportamento para juntas uniaxiais, onde o “stress” biomecânico ocorre somente em uma direção. No joelho bovino, a concentração de proteínas é maior em F3 e menor em T. Quanto a essa observação os nossos dados parecem concordar com o autor citado.

Chaminade e colaboradores (1979 e 1982) identificaram o mesmo padrão de proteínas não colagênicas em epífise proximal de tibia e fêmur de humanos e babuínos com Mr que variavam entre 87 kDa a 27 kDa. Em cartilagens do fêmur de babuínos identificaram duas populações de proteínas de ligação com 41 e 46 kDa. Os resultados obtidos com as dosagens de proteínas mesmo não sendo significativamente diferentes na maioria das regiões, nos levou a analisar esses constituintes em cromatografia de troca iônica para verificar diferenças qualitativas.

Neste trabalho, o padrão eletroforético apresentou características típicas para cada região, tanto na presença quanto na ausência do agente redutor. Utilizando a coloração CEC/azul de alcian e “immunoblotting” ficou demonstrada a presença do pequeno PG FM (60-70kDa) em todas as regiões. Este parece sofrer um processo de auto-agregação, mais evidente em F1 e T, conforme pudemos deduzir da análise de SDS-PAGE, onde ocorre bandas em posição de aproximadamente 150 kDa. A auto-agregação de pequenos PGs também foi relatada por Liu e colaboradores (1994) para biglicam via esqueleto protéico, em condições fisiológicas. Em FM parece ocorrer o mesmo fenômeno de autoagregação. Belline e colaboradores (manuscrito em preparação) detectaram em cartilagem articular de frango, um complexo de 250 kDa positivo para anti-FM em “immunoblotting” e coloração pelo CEC/azul de alcian com 1M de $MgCl_2$. Esse fenômeno deve acontecer também com o decorim já que existe grande semelhança entre os esqueletos protéicos destes dois PG. Não há, até o momento, relatos mostrando qualquer relação entre estímulos biomecânicos e auto-agregação. Mas sabe-se que a expressão de FM é mais acentuada em regiões onde forças biomecânicas são mais atuantes, como

demonstrado por Gomes & Pimentel (1994) na região central da cartilagem xifóide de frango.

Entre os pequenos PGs, o que se observa na maioria dos casos são isoformas com diferentes níveis de glicosilação ou diferenças no tipo de GAGs ligados ao esqueleto proteico (Heinegård & Oldberg, 1989; Johnstone et al., 1993; Roughley et al., 1993). Em cartilagem articular humana, tanto decorim quanto biglicam existem em formas não glicosiladas e ambos aumentam com a idade, (Roughley et al., 1993) enquanto que em patela de humanos adultos essas formas são abundantes (Witsch et al., 1992).

Em cartilagem as proteínas não-colagênicas com 58 kDa, 38 kDa (condroaderina) e 36 kDa são as moléculas mais catiônicas, identificadas na matriz. Como são consideradas proteínas de adesão são importantes na interação do condrócito com a matriz (Heinegård et al., 1986; Sommarin et al., 1989; Neame et al., 1994). Após cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel não foi obtida nenhuma fração com absorbância antes do início do gradiente de NaCl (0 - 1,5 M). As mesmas frações analisadas em DEAE-celulose, que é uma resina com capacidade de ligação menor, mostrou os mesmos resultados (dados não apresentados). Esse fato pode ter ocorrido ou pela ausência dessas proteínas ou pela sua baixa concentração, que não permitiu a sua detecção.

As frações eluídas da coluna de DEAE-Sephacel com o emprego de gradiente de sal mostraram algumas proteínas com maior destaque. Proteínas com 70-75 kDa (eluídas com 0,25 M) estão presentes em F2 e P em condições redutoras e em P e F3 em não redutoras. Sua migração eletroforética e aspecto polidisperso sugerem tratar-se do pequeno PG decorim. Proteínas com Mr entre 43-30 kDa (eluídas com 0,15 M) presentes em todas as regiões com ou sem 2-Me podem representar diferentes populações de proteínas de ligação (Treadwell et al., 1980; Flannery et al., 1990) ou a ancorim (34 kDa) (Pfaffle et al., 1988). Em condições redutoras, foi observada com maior clareza nas regiões F2 e F3, proteínas com 150 e 105 kDa (eluídas com 0,1 e 0,3 M, respectivamente) com características polidispersas, podendo sugerir a presença de subunidades da COMP. A proteína com Mr ao redor de 55 kDa (eluída com 0,2 M) podem representar subunidades da CMP.

A proteína de ligação (Flannery et al., 1990), COMP (Hedbom et al., 1992), TSP I (DiCesare et al., 1994), CMP (Hauser & Paulsson, 1994), 18 kDa (Neame et al., 1990), 55 kDa (Melching & Roughley, 1990), 56 kDa e 92 kDa (Anagnostides et al., 1990) são alguns exemplos de moléculas já caracterizadas que apresentam modificações pós-traducionais e diferentes níveis de glicosilação dependendo da idade, sítio anatômico analisado, espécie animal e mesmo o próprio “turnover” do tecido. As proteínas não colagênicas apresentam isoformas que podem variar de um tecido para outro ou ser expresso em várias isoformas dentro de um mesmo tecido, ou ainda em regiões anatômicas diferentes.

Neste contexto, este trabalho vem contribuir para o esclarecimento da fisiologia dos condrócitos, à medida que as forças biomecânicas são capazes de sensibilizar essas células estimulando diretamente o “turnover” de PGs e colágeno e menos intensamente a síntese das proteínas não-colagênicas.

CONCLUSÕES

- As fendas artificiais demonstraram um arranjo diferenciado das fibras colagênicas da camada superficial da cartilagem articular dentro das diferentes regiões anatômicas do joelho bovino.
- O conteúdo total de proteínas, ácido urônico e o conteúdo relativo de colágeno, solubilizados pelo tratamento com Gu-HCl 4M não, apresentam diferenças significativas sob ação de forças biomecânicas. Nas frações purificadas, o conteúdo de proteínas não colagênicas torna-se significativamente diferente na fração D4.
- O conteúdo total de GAGs é mais abundante, em qualquer região do fêmur (F2, F3 e F1) do que em P e em T.
- Os PGs das diferentes regiões apresentaram características de migração em gel de agarose-poliacrilamida que permitem concluir que se tratam de moléculas estruturalmente diferentes.
- A região P parece apresentar os PGs de maior peso molecular.
- O fibromodulim da cartilagem articular do joelho bovino parece sofrer um processo de autoagregação.
- A presença de duas populações de pequenos PGs, provavelmente decorim e biglicam, em frações ricas em PGs agregantes, indica alguma interação entre esses componentes
- O único GAG detectado no tecido foi o CS e este apresentou-se como cadeias heteropolissacarídicas de $\approx$ 40 kDa e superior a 150 kDa.
- As forças biomecânicas exercem uma influência decisiva na fisiologia dos condrócitos, alterando o conteúdo total e a estrutura molecular dos componentes da MEC.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo analisar os componentes da MEC da cartilagem articular bovina de diferentes regiões do joelho (F1, F2, F3, P e T) que suportam forças biomecânicas de diferentes intensidades.

A análise das fendas artificiais demonstrou que as regiões apresentaram diferentes padrões para o direcionamento das fibras colagênicas na camada superficial da cartilagem. Apesar disso o conteúdo relativo de colágeno não apresentou diferença significativa.

As extrações realizadas com Gu-HCl 4M solubilizaram conteúdos de proteínas e ácido urônico semelhantes em todas as regiões. A quantificação total de GAGs apresentou valores significativamente diferentes. F2, F3 e F1 apresentaram os maiores valores e P e T os menores.

Os extratos foram submetidos a ultracentrifugação com CsCl e obtidas quatro frações (D1, D2, D3 e D4). A quantificação de proteínas, mais abundante em D4, mostrou diferença significativa entre as regiões. F3, P e F1 apresentaram os maiores valores e F2 e T, os menores. A quantificação de ácido urônico, mais abundante em D1, não apresentou diferença significativa.

Para análise qualitativa dos PGs na fração D1 utilizou-se cromatografia de gel filtração. Três populações de PGs foram isoladas. Os padrões de migração para moléculas de alto peso foram avaliados em gel de agarose-poliacrilamida e as de menor peso em SDS-PAGE. Entre os PGs detectados em SDS-PAGE, P foi a região com maior conteúdo e F1 apresentou, somente a população de maior peso. T e F3 apresentaram o padrão de migração mais rápido e polidisperso e P, F2 e F1 apresentaram padrões mais lentos. A dimensão dos GAGs dos PGs foram avaliados, em gel de poliacrilamida com tampão barbital, após digestão com papaína. Duas populações de cadeias de GAGs foram encontradas ($\approx$ 40 kDa e acima de 150 kDa). O emprego de Chase AC e posterior análise em gel de agarose-poliacrilamida indicou a presença de CS como único GAG.

Para análise qualitativa das populações de proteínas não-colagênicas, em D4, utilizou-se cromatografia de troca iônica com gradiente de NaCl (0 - 1,5 M). Em todas as regiões não foi observado material catiônico. O material foi eluído com a concentração de NaCl entre 0 - 0,6 M e as proteínas analisadas em SDS-PAGE. O Mr das moléculas

observadas variou de 190 a 19 kDa e foi detectado fibromodulim em todas as regiões através da coloração CEC-azul de alcian e “immunoblotting”. O fibromodulim (60 - 67 kDa) apresentou um comportamento de autoagregação, mais evidente em T e FI.

ABSTRACT

The purpose of this work was to analyse cartilage ECM components of five different regions of knee joint (F1, F2, F3, P and T). These regions withstand different intensities of biomechanical forces.

The analyses of artificial slits showed different standards of collagen fibers directions on cartilage superficial layer. Despite this, the relative content of collagen did not show significant difference.

The content of proteins and uronic acid were similar for each region. The total content of GAG showed significant different values. F2, F3 and F1 showed higher and P and T lower values.

The extracts were submitted to ultracentrifugation in CsCl gradient, resulting in D1, D2, D3 and D4 fractions. Proteins were concentrated in D4 fractions. Considering the different regions, more proteins were detected in D4 fractions of F3, P and F1 regions, and less in F2 and T. Uronic acid values did not prove significant difference.

D1 was fractioned through gel filtration chromatography. The analyses of fractions was by agarose-polyacrylamide gel electrophoresis and SDS-PAGE, showing the presence of three populations of PGs. In SDS-PAGE, two polydisperse bands were detected, probably related to the small proteoglycans decorin and biglycan. These molecules were prominent in P region. In F1 region only that one with higher Mr was observed. In agarose-polyacrylamide, T and F3 showed faster and more polydisperse bands, than P, F2 and F1 regions. Considering these last regions, P exhibited a slower band, F2 a intermediate and F1 a faster one. The Mr of GAGs were estimated in PAGE with barbital buffer after papain digestion. Two populations of GAGs were found ($\approx$ 40 kDa and another one larger than 150 kDa). Digestion with chondroitinase AC and analyses by agarose-polyacrilamide gel electrophoresis indicated that CS was the only GAG component present.

Non-collagenous proteins present in D4 fraction were analysed in ion exchange chromatography with NaCl gradient (0 - 1.5 M) and SDS-PAGE. For all regions, no material was eluted before the beginning of the gradient. The material was eluted with NaCl concentration between 0 - 0.6 M. The Mr of molecules observed in SDS-PAGE

was among 190 - 19 kDa. A polydisperse band (60 - 67 kDa) was detected in all regions. Analyses with CEC-alcian blue and immunoblotting methods, indicated that protein as being fibromodulin. This small proteoglycan showed self-aggregation behaviour, specially in samples from T and F1 regions.

BIBLIOGRAFIA

- AHMED, A.M. & BURKE, D.L. (1983) In vitro measurement of static pressure distribution in synovial joints. I-Tibial surface of the knee. **J. Biom. Eng.** 105, 216-225.
- ANAGNOSTIDES, S.T.; ALETRAS, A.J.; LYMBERI, P. & TSIGANOS, C.P. (1990) Isolation and characterization of two glycoproteins from hyaline cartilage. **Eur. J. Biochem.** 193, 905-912.
- ARCANJO, K.D.S.; GOMES, L. & PIMENTEL, E.R. (1994) Effect of magnesium chloride and guanidinium chloride on the extraction of components of extracellular matrix from chicken cartilage. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J.** 89, 93 -97.
- ARNOCZKY, S.; ADAMS, M.; DeHAVEN, K.; EYRE, D. & MOW, V. (1988) Meniscus In: **Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues** (ed. Wog, S.L.Y. & Buckwalter, W. L.) pp 487-537 Amer.Acad. of Orthopedic Surgeons.
- AYDELOTE, M.B.; SCHUMACHER, B.L.; KUTTNER, H.E. (1992) Heterogeneity of articular chondrocytes In: **Articular Cartilage and Osteoarthritis** (ed. Kuettner, K.E.; Schleyerbach, R.; Peyron, J.G.; Hascall, V.C.) pp 237-250 Raven Press New York.
- BAGCHI, T.; LARSON, D.E. & SELLS, B.H. (1987) Cytoskeletal association of muscle-specific mRNAs in differentiating L6 rat myoblasts. **Exp. Cell Res.** 168, 160-172.
- BAENZIGER, N.L.; BRODIE, G.N. & MAJEPUS, P.W. (1971) A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 68, 240-243.
- BARNET, C.H.; DAVIES, D.V. & MacCONILL, M.A. (1961) **Synovial Joints: Their structure and mechanics** Thomas Springfield Illinois.
- BASSET, C.A.L. & PAWLUK, R.J. (1972) Electrical behavior of cartilage during loading. **Science** 178, 982-983.
- BEGG, D.A.; SALMON, E.D. & HYATT, H.A. (1983) Changes in the structural organization of actin in the sea urchin egg cortex in response to hydrostatic pressure. **J. Cell Biol.** 97, 1795-1805.
- BEIGUELMAN, B.(1991) **Curso prático de bioestatística.** 2ª ed. Sociedade Brasileira de Genética 231p.
- BIDANSET, D.J.; GUIDRY, C.; ROSEMBERG, L.C.; CHOI, H.U.; TIMPL, R. & HOOK, M. (1992) Binding of the proteoglycan decorin to collagen type II. **J. Biol. Chem.** 267, 5250-5256.

- BJELLE, A.; GARDELL, S. & HEINEGÅRD, D. (1974) Proteoglycans of articular cartilage from bovine lower femoral epiphysis. Extraction and characterization of proteoglycans from two sites within the same joint. **Connect. Tissue Res.** 2, 111-116.
- BJELLE, A. (1975) Content and composition of glycosaminoglycans in human knee joint cartilage. Variation with site and age in adults. **Connect. Tissue Res.** 3, 141-147.
- BLUM, B.; BEIER, H. & GROSS, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** 8, 93-99.
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248-254.
- BROOM, N.D. (1982) Abnormal softening of articular cartilage. Its relationship to the collagen framework. **Arthritis Rheum.** 25, 1209-1216.
- BROOM, N.D. (1984) Further insights into the structural principles governing the function of articular cartilage. **J. Anat.** 139, 275-294.
- BROOM, N.D. & MARRA, D.L. (1986) Ultrastructural evidence for fibril to fibril association in articular cartilage and their functional implication. **J. Anat.** 146, 185-200.
- BULLOUGH, P.G.; YAWITZ, P.S.; TAFRA, L. & BOSKEY, A.L. (1985) Topographical variation in the morphology and biochemistry of adult canine tibial plateau articular cartilage. **J. Orthop. Res.** 3, 1-16.
- BUSCHMANN, M.D.; GLUZBAND, Y.A.; GRODZINSKY, A.J.; KIMURA, J.H. & HUNZIKER, E.B. (1992) Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. **J. Orthop. Res.** 10, 745-758.
- CANCEDDA, F.D.; MANDUCA, P.; TACCHETTI, C.; FOSSA, P.; QUARTO, R. & CANCEDDA, R. (1988) Developmentally regulated synthesis of a low molecular weight protein (Ch 21) by differentiating chondrocytes. **J. Cell Biol.** 107, 2455-2463.
- CATERSON, B. & LOWTHER, D.A. (1978) Changes in the metabolism of the proteoglycans from sheep articular cartilage in response to mechanical stress. **Biochim. Biophys. Acta** 540, 412-422.
- CHAMINADE, F.; STANESCU, V.; STANESCU, R. & MAROTEAUX, P. (1979) Link-protein and noncollagenous proteins from normal and chondrodysplastic cartilages. **Eur. J. Pediatr.** 131, 237-245.
- CHAMINADE, F.; STANESCU, V.; STANESCU, R.; MAROTEAUX, P. & PEYRON, J.G. (1982) Noncollagenous proteins in cartilage of normal subjects and patients with

degenerative joint disease. A gel electrophoretic study. **Arthritis Rheum.** 25(9), 1078-1083.

CHOI, H.U.; JOHNSON, T.L.; PAL, S.; TANG, L.H.; ROSENBERG, L.C. & NEAME, P.J. (1989) Characterization of dermatan-sulfate proteoglycans, DS-PGI and DS-PGII, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-sepharose chromatography. **J. Biol. Chem.** 264, 2876-2884.

COMPER, W.D. & LAURENT, T.C. (1978) Physiological function of connective tissue polysaccharides. **Physiol. Rev.** 5, 255-315.

COSTER, L. & FRANSSON, L.A. (1981) Isolation and characterization of dermatan sulphate proteoglycans from bovine sclera. **Biochem. J.** 193, 143-153.

COTTA, H. & PUHL, W. (1978) The pathophysiology of damage to articular cartilage In: **The Knee** (ed. Hastings, D.E.) pp 15-31 Springer Berlin.

DICESARE, P.E.; MORGELIN, M.; MANN, K. & PAULSSON, M. (1994) Cartilage oligomeric matrix protein and thrombospondin 1. Purification from articular cartilage electron microscopic structure, and chondrocyte binding. **Eur. J. Biochem.** 223, 927-937.

DISCHE, Z. (1947) A new specific color reaction of hexuronic acids. **J. Biol. Chem.** 167, 189-199.

DUDHIA J.; HARDINGHAM, T.E. & FOSANG, A.J. (1990) Domain structure in aggregating proteoglycans from cartilage. **Biochem. Soc. Trans.** 18, 794-796.

EVANKO, S.P. & VOGEL, K.G. (1990) Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous regions of bovine tendon. **Matrix** 10, 420-436.

EYRE, D.; WES, J.J. & APONE, S. (1987) A growing family of collagens in articular cartilage. Identification of five genetically distinct types. **J. Rheumatol.** 140, 25-27.

EYRE, D.R. (1988) Collagens of the disc In: **The Biology of the Intervertebral disc** vol I (ed. Ghosh, P.) pp. 171-188 Boca Raton CRC Press.

EYRE, D.R.; WU, J.J.; WOODS, P.E. & WIES, M.A. (1991) The cartilage collagens and joint degeneration. **Br. J. Rheumatol.** 30 (Supl.1), 10-15.

EYRE, D.R.; WU, J.J. & WOODS, P.E. (1992) Cartilage-specific collagens: structural studies. In **Articular Cartilage and Osteoarthritis** (ed. Kuettner, K.E.; Schleyerbach, R.; Peyron, J.G. & Hascall, V.C.) pp 119-131 New York Raven Press.

- FARNDALE, R.W.; BUTTLE, D.J. & BARRET, A.J. (1986) Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochim. Biophys. Acta** 883, 173-177.
- FISCHER, D.M.; ELLIOTT, S.; COOLE, T.D.V. & FORREST, W.J. (1985) Descriptive anatomy of fibrocartilaginous menisci in the finger joints of the hand. **J. Orthop. Res.** 3, 484-491.
- FISCHER, L.W.; HAWKINS G.R., TUROSS, N. & TERNINE, J.D. (1987) Purification and partial characterization of small proteoglycan I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral component of developing human bone. **J. Biol. Chem.** 262, 702-708.
- FLANNERY, C.R.; URBANEK, P.J. & SANDY, J.D. (1990) The effect of maturation and aging on the structure and content of link proteins in rabbit articular cartilage. **J. Orthop. Res.** 8, 78-85.
- FOSANG, A.J. & HARDINGHAM, T.E. (1989) Isolation of the N-terminal globular domains from cartilage proteoglycans. **Biochem. J.** 261, 801-809.
- FRANSSON, L.A. & MALMSTROM, A. (1971) Structure of pig skin dermatan-sulfate. I. Distribution of D-glucuronic acid residues. **Eur. J. Biochem.** 18, 422-430.
- FRANZEN, A.; HEINEGARD, D. & SOLURCH, M. (1987) Evidence for sequential appearance of cartilage matrix proteins in developing mouse limbs and in cultures of mouse mesenchymal cells. **Differentiation** 36, 199-210.
- FREEMAN, M.A.R.; SWANSON, S.H.V. & MANLEY, P.T. (1975) Stress-lowering function of articular cartilage. **Med. Biol. Eng.** 7, 245-251.
- FROST, H.M. (1994) Perspectives: A vital biomechanical model of synovial joint design. **Anat. Rec.** 240, 1-18.
- FUKADA, E. (1974) Piezoelectric properties of organic polymers. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 238, 7-25.
- GARDELL, S.; BAKER, J.; CATERSON, B.; HEINEGÅRD, D. & RODEN, L. (1980) Link protein and a hyaluronic acid binding region as components of aorta proteoglycan. **Biochim. Biophys. Res. Commun.** 95, 1823-1831.
- GARDNER, D.L. (1994) Problems and paradigms in joint pathology. **J. Anat.** 184, 465-476.
- GILLARD, G.C.; REILLY, H.C.; BELL-BOOTH, P.G. & FLINT, M.H. (1979) The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycan content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. **Connect. Tissue Res.** 7, 37-46.

- GOMES, L. & PIMENTEL, E.R. (1994) Detection of a small proteoglycan present in xiphoid cartilage regions submitted to different biomechanical forces. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 27, 2117-2124.
- GOMES, L., PIMENTEL, E.R. & ESQUISATTO, M.A.M. Combination of Alcian Blue and "Critical Electrolyte Concentration" for identification of glycosaminoglycan in polyacrylamide gel electrophoresis (submetido para publicação).
- GOOD, D.L.; POLVERINI, P.J.; RASTENEJAD, F.; LEBEAU, M.M.; LEMMONS, R.S.; FRAZIER, N.A. & BOUCK, N.P. (1990) A tumor suppressor-depend inhibitor of angiogenesis in immunologically and functionally indistinguishable from a fragmente of thrombospondin. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 87, 6624-6628.
- GRAY, M.L.; PIZZANELLI, A.M.; LEE, R.C.; GRODZINSKY, A.J. & SWANN, D.A. (1989) Kinetics of the chondrocyte biosynthetic response to compressive load and release. **Biochim. Biophys. Acta** 991, 415 - 425.
- HANDLEY, C.J.; LOWTHER, D.A. & McQUILLAN, D.J. (1985) The structure and synthesis of proteoglycans of articular cartilage. **Cell Biol. Int. Rep.** 9, 753-782.
- HARDINGHAM, T.E. & MUIR, H. (1972) The specific interactions hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. **Biochim. Biophys. Acta** 279, 401-405.
- HARDINGHAM, T.E. & MUIR, H. (1974) Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation. **Biochem. J.** 139, 565-581.
- HARDINGHAM, T.E.; EWINS, R.J. & MUIR, H. (1976) Cartilage proteoglycans. Structure and heterogeneity of the protein core and the effects of specific protein modification on the binding to hyaluronate. **Biochem. J.** 157, 127-143.
- HARDINGHAM, T.E. (1981) Proteoglycans: their structure, interactions and molecular organization in cartilage. **Biochem. Soc. Trans.** 9, 489-497.
- HARDINGHAM, T. (1990) Degenerative joint disease In: **The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease** (ed. Cohen, R.D.; Alberti, K.G.; Lewis, B. & Demman, A.M.) London Baillière Tindall pp 67-86.
- HAUSER, N. & PAULSSON, M. (1994) Native cartilage matrix protein (CMP). A compact trimer of subunits assembled via a coiled-coil alfa helix. **J. Biol. Chem.** 269, 25747-25753.
- HEDBOM, E.; ANTONSSON, P.; HJERPE, A.; AESCHLIMANN, D.; PAULSSON, M.; PIMENTEL, E.R.; SOMMARIN, Y.; WENDEL, M.; OLDBERG, A. & HEINEGÅRD, D. (1992) Cartilage matrix protein. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. **J. Biol. Chem.** 267, 6132-6136.

- HEDBOM, E. & HEINEGÅRD, D. (1989) Interaction of a 59kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. **J.Biol.Chem.** 264 (12) 6898-6905.
- HEDBYS, B. & MISSHIMA, S. (1962) Flow of water in the corneal stroma. **Exp. Eye Res.** 1, 262
- HEINEGÅRD, D. BJORNE, A.P., COSTER, L.; FRANZEN, A.; GARDELL, S.; MALMSTROM, A.; PAULSSON, M.; SANDEFALK, R. & VOGEL, K. (1985) The core protein of large and small interstitial proteoglycan from various connective tissues form distinct subgroups. **Biochem. J.** 230, 181-194.
- HEINEGÅRD, D.; LARSSON, T.; SOMMARIN, Y.; FRANZEN A.; PAULSSON, M. & HEDBOM, E. (1986) Two novel matrix proteins isolated from articular cartilage show wide distributions among connective tissues. **J. Biol. Chem.** 261, 13866-13872.
- HEINEGÅRD, D. & SOMMARIN, Y. (1987) Proteoglycans: an overview **Methods Enzymol.** 144, 309-372.
- HEINEGÅRD, D. & PAULSSON, M. (1987) Cartilage. **Methods Enzymol.** 145, 336-363.
- HEINEGÅRD, D. & OLDBERG, A. (1989) Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. **FASEB J.** 3, 2042-2051.
- HEINEGÅRD, D. & PIMENTEL, E.R. (1992) Cartilage matrix proteins. In: **Articular Cartilage and Osteoarthritis** (ed. Kuettener, K.E.; Schleyerbach, R.; Peyron, J.G. & Hascall, V.C.) pp. 95-111 New York Raven Press.
- HEISE, N. & TOLEDO, O.M.S. (1993) Age-related changes in glycosaminoglycan distribution in different anatomical sites on the surface of knee-joint articular cartilage in young rabbits. **Ann. Anat.** 175, 35-40.
- HILBOM, J.C. & ANASTASSIADIS, P.A. (1969) Acrylamide gel electrophoresis of acidic mucopolysaccharides. **Anal. Biochem.** 31, 51-55.
- HILDEBRAND, A.; ROMARIS, M.; RASMISSEN, L.M.; HEINEGÅRD, D.; TWARDZIK, D.R.; BORDER, W.A. & RUOSLAHTI, E. (1994) Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor β . **Biochem. J.** 302, 527-534.
- HINEK, A.; REINER, A. & POOLE, A.R. (1987) The calcification of cartilage matrix in chondrocyte culture: studies of the C-propeptide of type II collagen (chondrocalcin). **J. Cell Biol.** 263, 5921-5925.

- JEFFERY, A.K.; BLUNN, G.W.; ARCHER, C.W. & BENTLEY, G. (1991) Three-dimensional collagen architecture in bovine articular cartilage **J. Bone Jt. Surg. Br.** Vol. 73, 795-801.
- JOHNSTONE, B.; MARKOPOULOS, M.; NEAME, P. & CATERSON, B. (1993) Identification and characterization of glycanated and non-glycanated forms of biglycan and decorin in the human intervertebral disc. **Biochem. J.** 292, 661-666.
- JONES, I.L. & LEMPERG, R. (1978) The glycosaminoglycans of human articular cartilage. **Clin. Orthop. Relat. Res.** 134, 364-370.
- KEISER, H.F.; SCHULMAN, H.J. & SANDSON, J.L. (1972) Immunocytochemistry of cartilage proteoglycan. Immunodiffusion and gel-electrophoretic studies. **Biochem. J.** 126, 163-169.
- KEMPSON, G.E.; MUIR, H.; SWANSON, S.A.V. & FREEMAN, M.A.R. (1971) Patterns of cartilage stiffness on normal and degenerate human femoral heads. **J. Biomech.** 4, 597-609.
- KEMPSON, G.E. (1972) The tensile properties of articular cartilage and their relevance to the development of osteoarthritis. **Orthop. Surg. Traumatol.** 1, 44-58.
- KEMPSON, G. (1979) The mechanical properties of articular cartilage. In: **The Joints and Synovial Fluid** vol II pp 179-238 (ed. Sokoloff, L.) Academic Press New York
- KIM, Y.J.; SAH, R.L.Y.; GRODZINSKY, A.J.; PLAAS, A.H.K. & SANDY, J.D. (1994) Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: physical stimuli. **Arch. Biochem. Biophys.** 311, 1-12.
- KINKAID, S.A. & VAN SICKLE, D.C. (1981) Regional histochemical and thickness variation of adult canine articular cartilage. **Am. J. Vet. Res.** 42, 428-432.
- KIVIRANTA, I.; JURVELIN, J.; TAMMI, M.; SAAMANEN, A.M. & HELMINEN, H.I. (1987) Weight bearing controls glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young beagle dogs. **Arthritis Rheum.** 30 (7), 801-809.
- KIVIRANTA, I.; TAMMI, M.; JURVELIN, J.; SAAMANEN, A.M. & HELMINEN, H.I. (1988) Moderate running exercise augments glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the knee joint of young beagle dogs. **J. Orthop. Res.** 6, 188-195.
- KIVIRANTA, I.; SAAMANEN, A.M.; JURVELIN, J.S.; AROKOSKI, J.; OETTMEIER, R.; ABENDROTH, K.; ROTH, A.J. & TAMMI, M.I. (1992) Effect of motion and load on articular cartilage in animal models. In: **Articular cartilage and Osteoarthritis** (ed. Kuettner, K.; Schleyerbach, R.; Peyron, J. G. & Hascall, V.C.) pp 501-510 Raven Press New York.

- KLAUS, W. & OSBORN, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Biol. Chem.** 244, 4406-4412.
- KOOB, T.J. & VOGEL, K.G. (1987) Site related variation in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor tendon. **J. Orthop. Res.** 5, 414-424.
- KOSFELD, M.D.; PAVLOPOULOS, T.V. & FRAZIER, N.A. (1991) Cell attachment activity of the carboxyl-terminal domain of human thrombospondin expressed in *E.coli*. **J. Biol. Chem.** 266, 24257-24259.
- KRUSIUS, T. & RUOSLAHTI, E. (1986) Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 83(7), 683-687.
- KUETTNER, K.E.; AYDELOTTE, M.B. & THONAR, E.J.M.A. (1991) Articular cartilage matrix and structure: a minireview. **J. Rheumatol.** 18 (Supl 27), 46-48.
- LAHAV, J.; LAWLER, J. & GIMBRONE, M.A. (1984) Thrombospondin interactions with fibronectin and fibrinogen. Mutual inhibition in binding. **Eur. J. Biochem.** 145, 151-156.
- LAMMI, M.J.; INKINEN, R.; PARKKINEN, J.J.; HAKKINEN, T.; JORTIKKA, M.; NELIMARKKA, L.O.; JARVELAINEN, H.T. & TAMMI, M.I. (1994) Expression of reduced amounts of structurally altered aggrecan in articular cartilage chondrocytes exposed to high hydrostatic pressure. **Biochem. J.** 304, 723-730.
- LIU, J.; LAUE, T.M.; CHOI, H.U.; TANG, L.H. & ROSENBERG, L. (1994) The self-association of biglycan from bovine articular cartilage. **J. Biol. Chem.** 269: 28366-28373.
- MANICOURT, D.H.; PITA, J.C.; PEZON, C. & HOWELL, D.S. (1986) Characterization of the proteoglycans recovered under nondissociative conditions from normal articular cartilage of rabbits and dogs. **J. Biol. Chem.** 261, 5426-5433.
- MANN, D.M.; YAMAGUCHI, Y., BOURDON, M.A. & RUOSLAHTI, E. (1990) Analysis of glycosaminoglycan substitution in decorin by site directed mutagenesis. **J. Biol. Chem.** 265, 5317-5323.
- MAQUET, P.G.; VAN DER BERG, A.J. & SIMONET, J.C. (1975) Femorotibial weight bearing areas. **J. Bone Jt. Surg. Am. Vol.** 57, 766-771.
- MAROUDAS, A.; MUIR, H. & WINGHAM, J. (1969) The correlation of fixed negative charge with glycosaminoglycan content of human articular cartilage. **Biochim. Biophys. Acta** 177, 492-500.

- MAROUDAS, A.; EVANS, H. & ALMEIDA, L. (1973) Cartilage of the hip joint. Topographical variation of glycosaminoglycan content in normal and fibrillated tissue. **Ann. Rheum. Dis.** 32, 1-9.
- MAROUDAS, A. (1975) Biophysical chemistry of cartilaginous tissue with special reference to solute and fluid transport. **Biorheology** 12, 233-238.
- MAROUDAS, A. (1976a) Transport of solutes through cartilage: permeability to large molecules. **J. Anat.** 122, 335-347.
- MAROUDAS, A. (1976b) Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage. **Nature** 260, 808-809.
- McNICOL, D. & ROUGHLEY, P.J. (1980) Extraction and characterization of proteoglycan from human meniscus. **Biochem. J.** 185, 705-713.
- MEACHIM, G. & STOCKWELL, R.A. (1972) The matrix. In: **Adult Articular Cartilage** (ed. Grune, K. G. & Stratton, A.) pp.1-50 Academic Press New York.
- MEACHIM, G.; DENHAM, D.; EMERY, I. H. & WILKINSON, P.H. (1974) Collagen alignments and articular splits at the surface of human articular cartilage. **J. Anat.** 118, 101-108.
- MELCHING, L.I. & ROUGHLEY, P.J. (1990) A matrix protein of Mr 55000 that accumulates in human articular cartilage with age. **Biochim. Biophys. Acta** 1036, 213-220.
- MELROSE, J. & GHOSH P. (1988) The non-collagenous proteins of the intervertebral disc. In: **The Biology of the Intervertebral Disc** vol I (ed. Ghosh, P.) pp189-237 Boca Raton CRC Press
- MERRILES, M.J. & FLINT, M.H. (1980) Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. **Am. J. Anat.** 157, 87-106.
- MICHELACCI, Y.M. & HORTON, D.S.P.O. (1989) Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. **Comp. Biochem. Physiol.** 96B, 651-658.
- MITCHELL, D. & HARDINGHAM, T. (1981) The effects of cycloheximide on the biosynthesis and secretional proteoglycans by chondrocytes in cultures. **Biochem. J.** 196, 521 - 529.
- MOCKENHAUPT, J. (1990) Pressure distribution in partly contracting joints a computerized simulation model. **Anat. Anz.** 171, 313-321.
- MORGELIN M.; HEINEGÅRD, D.; ENGEL, J. & PAULSSON, M. (1992) Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure. **J. Biol. Chem.** 267, 6137-6141.

- MORRIS, N.P. & BACHINGER H.P. (1987) Type XI collagen is a heterotrimer with a composition (1α , 2α e 3α) retaining non-triple helical domain. **J. Biol. Chem.** 262, 11345-11350.
- MOSLER, E., FOLKHARD, W.; KNORZER E.; NEMETSCHKE, H.G.; NEMETSCHKE, T.H. & KOCH, M.H.J. (1985) Stress-induced molecular rearrangement in tendon collagen. **J. Mol. Biol.** 182, 589-596.
- MOURÃO, P.A.S. (1991) Proteoglycans, glycosaminoglycans and sulfated polysaccharides from connective tissues. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J.** 86, 13-22.
- NATHAN, C. & SPORN, M. (1991) Cytokines in context. **J. Cell Biol.** 113, 981-986.
- NEAME, P.J.; CHRISTNER, J.E. & BAKER, J. R. (1986) The primary structure of link protein from rat chondrosarcoma proteoglycan aggregate. **J. Biol. Chem.** 261, 3519 - 3535.
- NEAME, P.J.; CHOI, H.U. & ROSEMBERG, L.C. (1989) The primary structure of the core protein of the small leucine-rich proteoglycan (PGI) from bovine articular cartilage. **J. Biol. Chem.** 264, 653-661.
- NEAME, P.J.; TREMP, J.T. & YOUNG, C.N. (1990) An 18 kDa glycoprotein from bovine nasal cartilage. Isolation and primary structure of small, cartilage-derived glycoprotein. **J. Biol. Chem.** 265, 9628-9630.
- NEAME, P.J.; SOMMARIN, Y.; BOYTON, R.E. & HEINEGÄRD, D. (1994) The structure of a 38 kDa leucine-rich protein (chondroadherin) isolated from bovine cartilage. **J. Biol. Chem.** 269, 21547-21554.
- OGSTON, A.G. (1983) Excluded-volume interactions of neutral polymers in solution. In: **Chemistry and Technology of water-soluble polymers** (ed Finch, C.A.) pp 45-54 Plenum Press New York.
- OKUDA Y.; GORSKI, J.P.; AN, K.N. & AMADIO, P.C. (1987) Biochemical, histological and biomechanical analyses of canine tendon. **J. Orthop. Res.** 5, 60-68.
- OLDBERG, A; ANTONSON, P. LINDBLOM, K. & HEINEGÄRD, D. (1989) A collagen binding 59 kDa protein fibromodulin is structurally related the small interstitial proteoglycans PGS1 and PGS2 (decorin). **EMBO J.** 8, 2601-2604.
- PALMOSKI, M.J. & BRANDT, K.D. (1984) Effects of static and cyclic compressive forces on articular cartilage plugs in vitro. **Arthritis Rheum.** 27, 675-681.
- PATTHY, L. (1987) Detecting homology of distantly related proteins with common sequences. **J. Mol. Biol.** 198, 567-577.

- PFAFFLE, M.; RUGGIERO, F.; HOFMANN, H.; FERNANDEZ, M.P.; SELMIN, O.; YAMADA, Y. & GARRONE, R. (1988) Biosynthesis, secretion and extracellular localization of anchorin CII, a collagen-binding protein of the capactin family. **EMBO J.** 7, 2335-2342.
- PLAAS, A.H.K.; NEAME, P.J.; NIVON, C.M. & REISS, L. (1990) Identification of the keratan sulphate attachment sites on bovine fibromodulin. **J. Biol. Chem.** 265, 20634-20640.
- PROCTER, C.S.; SCHMIDT, M.B.; WHIPPLE, R.R.; KELLY, M.A. & MOW, V.C. (1989) Material properties of the normal medial bovine meniscus. **J. Orthop. Res.** 7, 771-782.
- RALPHS, J.R.; BENJAMIN, M. & THORNETT, A. (1991) Cell and matrix biology of the suprapatella in the rat: a structure and immunocytochemical study of fibrocartilage in a tendon subjected to compression. **Anat. Rec.** 231, 167-177.
- RALPHS J.R.; TYERS, R.N.S. & BENJAMIN M. (1992) Development of functionally distinct fibrocartilages at two sites in the quadriceps tendon of the rat. The suprapatella and the attachment at the patella. **Anat. Embryol.** 185, 181-187.
- REFIOR, H.J. & HACKENBROCH, M.H. (1978) The reaction of articular cartilage to pressure, immobilization and distraction. In: **The Knee** (ed. Hastings, D.E.) pp 33-44 Springer Berlin.
- ROBERTS, D.D.; HAVERSTICK, D.M.; DIXIT, U.M.; FRAZIER, W.A.; SANTORO, S.A. & GINSBURG, V. (1987) Platelet thrombospondin mediates attachment and spreading of human melanoma cells. **J. Cell Biol.** 104, 131-139.
- ROSENBERG, L.C.; TODEL, C.W.; MARGOLIS, R.; PAL, S. & STRIDER, W. (1976) Proteoglycans from bovine proximal humeral articular cartilage. Structural basis for the polydispersity of proteoglycan subunit. **J. Biol. Chem.** 251, 6439-6444.
- ROSENBERG, L.C.; CHOI, H.V.; TANG, L.H.; JOHNSON, T.L. & PAL, S. (1985) Isolation of dermatan sulphate proteoglycans from mature bovine articular cartilage. **J. Biol. Chem.** 260, 6304-6313.
- ROSENBERG, L.C. (1992) Structural and function of dermatan sulfate proteoglycans in articular cartilage. In: **Articular Cartilage and Osteoarthritis** (ed. Kuettner, K.E.; Schleyerbach, R.; Peyron, J.G. & Hascall, V.C.) pp.45-63 New York Raven Press.
- ROUGHLEY, P.J.; McNICOL, D.; SANTER, V. & BUCKWALTER, J. (1981) The presence of a cartilage-like proteoglycan in the adult human meniscus. **Biochem. J.** 197, 77-83.

- ROUGHLEY, P.J. & WHITE, R.J. (1989) Dermatan sulphate proteoglycans of human articular cartilage. The properties of dermatan sulphate proteoglycan I and II. **Biochem. J.** 262, 823-827.
- ROUGHLEY, P.J. WHITE, R.J.; MAGNY, M.C.; LIU, J. PEARCE, R.H. & MORT, J.S. (1993) Non-proteoglycan forms of biglycan increase with age in human articular cartilage. **Biochem. J.** 295, 421-426.
- ROTH, V.; MOW, V.C. & GRODZINSKY, A.J. (1979) Biophysical and electromechanical properties of articular cartilage. In: **Skeletal Research** (ed. Simmons, D.J.) pp 301-311 Academic Press New York.
- RUFAL, A.; BENJAMIN, M. & RALPHS, J.R. (1992) Developmental and ageing of phenotypically distinct fibrocartilages associated with the rat Achilles tendon. **Anat. Embryol.** 186, 611-618.
- SAH, R.L.Y.; KIM, Y.J.; DOONG, J.Y.H., GRODZINSKY, A.J.; PLAAS, A.H.K. & SANDY, J.D. (1989) Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression. **J. Orthop. Res.** 7, 619-636.
- SALTER, R.R.; SIMMONDS, D.F.; MALCOLM, B.W.; RUMBLE, E.J., MACMICHAEL, D. & CLEMENTS, N.D. (1980) The biological effects of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. **J. Bone Jt. Surg. Am.** Vol. 62, 1232-1251.
- SANDY, J.D.; FLANNERY, C.R. & PLAAS, A.H.K. (1987) Structural studies on proteoglycan catabolism in rabbit articular cartilage explant cultures. **Biochim. Biophys. Acta** 931, 255-261.
- SCHIMIDT, T.M. & LINSENMMAYER, T.F. (1990) Immunoelectron microscopy of type X collagen: supramolecular forms within embryonic chick cartilage. **Dev. Biol.** 138, 53-62.
- SCOTT, J.E. & ORFORD, C. R. (1981) Dermatan-sulphate rich proteoglycan associates with rat tail tendon collagen at the d band in the gap region. **Biochem. J.** 195, 213-216.
- SILBERG, R. (1968) Ultrastructure of articular cartilage in health and disease. **Clin. Orthop. relat. res.** 57, 233-257.
- SIMON, W.H. (1970) Scale effects in animal joints. I. Articular cartilage thickness and compressive stress. **Arthritis Rheum.** 13, 244-255.
- SIMON, W.H. (1971) Scale effects in animal joints. II. Thickness and elasticity in the deformability of articular cartilage. **Arthritis Rheum.** 14, 493-502.

- SLEDGE, C.B. (1975) Structure, development and function of joints. **Orthop. Clin. North Am.** 6, 619-628.
- SOMMARIN, Y.; LARSSON, T. & HEINEGÅRD, D. (1989) Chondrocyte-matrix interactions. Attachment to proteins isolated from cartilage. **Exp. Cell Res.** 184, 181-192.
- SPITZ-FIFE, R. & BRANDT, K.D. (1984) Identification of a high molecular weight (400000) protein in hyaline cartilage. **Biochim. Biophys. Acta** 802, 506-514.
- SPITZ-FIFE, R. (1985) Identification of link proteins and a 116.000 dalton matrix protein in canine meniscus. **Arch. Biochem. Biophys.** 240, 682-688.
- STOCKWELL, R.A. & SCOTT, J.E. (1967) Distribution of acid glycosaminoglycans in human articular cartilage. **Nature** 215, 1376-1378.
- STOPAK, D. & HARRIS, A.K. (1982) Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. I. Tissue culture observations. **Dev. Biol.** 90, 383-390.
- STRIDER, W.; PAL, S. & ROSENBERG, L. (1975) Comparison of proteoglycan from bovine articular cartilage. **Biochim. Biophys. Acta** 379, 271-281.
- SWANN, D.A.; POWELL, S. & SOTMAN, S. (1979) The heterogeneity of cartilage proteoglycans. Isolation of different types of proteoglycans from bovine articular cartilage. **J. Biol. Chem.** 254, 945-954.
- SWEET, M.B.E.; THONAR, E.J.M.A.; IMMELMAN, A.R. & SOLOMON, L. (1977) Biomechanical changes in progressive osteoarthritis. **Ann. Rheum. Dis.** 36, 387-398.
- TOWBIN, T. & GORDON, S. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 76, 4350 - 4354.
- TREADWELL, B.V.; SHADER, L.; TOWLE, C.A.; MANKIN, D.P. & MANKIN, H.J. (1980) Purification of the "link proteins" from bovine articular cartilage and comparison with "link proteins" from nasal septum. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 94, 159-166.
- VAN DER REST, M. & MAYNE, R. (1988) Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross linked to type II collagen. **J. Biol. Chem.** 263, 1615-1618.
- VENN, M.F. (1979) Chemical composition of human femoral head cartilage. Influence of topographical position and fibrillation. **Ann. Rheum. Dis.** 38, 57-62.

- VIDAL, B.C. (1986) Evaluation of the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles. Microphotometric measurements of textural birefringence. **Cell Mol. Biol.** 32, 527-535.
- VIDAL, B.C. (1993) Cell and Extracellular matrix interaction: a feedback theory based on molecular order recognition-adhesion events. **Rev. Med. Unicamp** 4, 1-6.
- VILARTA, R. (1990) **Organização estrutural da matriz extracelular em cartilagem hialina articular** (Tese de Doutorado) ICB-USP São Paulo 55p.
- VISSER, N.A.; VANKAMPEN, G.P.; DEKONING, M.H. & VANDERKORST, J.K. (1994) The effects of loading on the synthesis of biglycan and decorin in intact mature articular cartilage in vitro. **Connect. Tissue Res.** 30, 241 - 250.
- YAMADA, H. (1970) **Strength of biological materials** Willians & Wilkins Baltimore USA.
- YAMAGUCHI, N.; BENYA P.; VAN DER REST, M. & NINAMYA, Y (1988) Cartilage type IX collagen is cross-linked by hidroxypyridinum residues. **Biochem. Biophys Res. Commun.** 123, 1033-1039
- YAMAGUCHI, Y.; MANN, D.M. & RUOSLAHTI, E. (1990) Negative regulation of transforming growth factor beta by the proteoglycan decorin. **Nature** 336, 281-284.
- WITSCH, P.P.; MIEHLKE, R. & KRESSE, H. (1992) Non-proteoglycan forms of biglycan and decorin in human patella. **Arthritis Rheum.** 35, 1042-11052.
- ZAMBETTI, G.; SCHMIDT, W.; STEN, G. & STEIN, J. (1985) Subcellular localization of histone messenger RNAs on cytoskeleton-associated free polyssomes in Hela S3 cells. **J. Cell Physiol.** 125, 345-353.
- ZINGALES, B. (1984) Analysis of protein by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: **Genes and Antigens of Parasites** (ed. Morel, C.M.) Fiocruz Rio de Janeiro.