

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**Tatiana Carla Tomiosso**

## **Cartilagem articular de avestruz: um estudo estrutural e bioquímico**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
TATIANA CARLA TOMIOSO  
[Assinatura]  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para a obtenção do  
Titulo de Mestre em Biologia  
Celular e Estrutural na área de  
Biologia Celular.

**Orientador: Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel**

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

NIDADE	BC
º CHAMADA	T/Unicamp
	T595c
	EX
DMBO BC	61209
ROC.	16-117-04
	C <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	18-12-04
º CPD	

Bib Id 335725

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

**T595c**

**Tomiosso, Tatiana Carla**

Cartilagem articular de avestruz: um estudo estrutural e bioquímico / Tatiana Carla Tomiosso. --  
Campinas, SP:[s.n.], 2004.

Orientador: Edson Rosa Pimentel

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. Matriz extracelular. 2. Proteoglicanos. 3. Colágeno I. Pimentel, Edson Rosa.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.



\* Você sabe por quê o mar é tão grande

Tão imenso

Tão poderoso?

É porque teve a humildade de colocar-se a alguns centímetros abaixo de  
todos os rios.

Sabendo receber, tornou-se grande.

Se quisesse ser o primeiro; centímetros acima de todos os rios,  
não seria mar, mas sim uma ilha.

Toda sua água iria para os outros e estaria isolado.

A perda faz parte. A queda faz parte. A morte faz parte.

É impossível vivermos satisfatoriamente.

Precisamos aprender a perder, a cair, a errar e a morrer.

Impossível ganhar sem saber perder.

Impossível andar sem saber cair.

Impossível acertar sem saber errar.

Impossível viver sem saber viver.

Se aprenderes a perder, a cair, a errar, ninguém mais o controlará.

Porque o máximo que poderá acontecer a você é cair, errar e perder.

E isto você já sabe.

Bem aventurado aquele que já consegue receber com a mesma  
naturalidade

o ganho e a perda...

o acerto e o erro...

o triunfo e a queda...

a vida e a morte.....\*

## ***A DEUS***

'O Senhor é meu pastor: nada me falta.  
Em verdes pastagens me faz repousar,  
conduz-me até às fontes tranqüilas  
e reanima minha vida,  
guia-me pelas sendas da justiça  
por causa de seu nome.

Ainda que eu ande por um vale tenebroso,  
não temo mal algum, porque tu estás comigo;  
teu bordão e teu cajado me confortam.

Diante de mim preparas a mesa,  
bem à vista dos meus inimigos;  
tu me unges com óleo a cabeça,  
e minha taça transborda.

Sim, prosperidade e graça me seguem,  
todos os dias de minha vida;  
habitarei na casa do Senhor ,  
por longos dias.'

(Salmo 23)

'Que nos deu o dom da vida, nos presenteou com a liberdade, nos abençoou com a inteligência, nos deu a graça de lutarmos para a conquista de nossas realizações. A Ele cabe o louvor e a glória. A nós só cabe agradecer.'

(Rui Barbosa)

Obrigada Senhor, por tudo.

## ... pai

Só Deus sabe o quanto não queria estar escrevendo esta página. Não consigo acreditar, nem ao menos me conformar, que você partiu. Ainda tínhamos tanto a fazer. Sei que todos, um dia, irão embora, mas no nosso caso "foi só o tempo que errou, vai ser difícil sem você, porque você está comigo o tempo todo...".

"Chora de manso e no íntimo... Procura"  
Curtir sem queixa o mal que te crucia:  
O mundo é sem piedade e até riria  
Da tua inconsolável amargura.

Só a dor enobrece e é grande e é pura.  
Aprende a amá-la que a amarás um dia.  
Então ela será tua alegria,  
E será, ela só, tua ventura...

A vida é vã como a sombra que passa...  
Sofre sereno e de alma sobranceira,  
Sem um grito sequer, tua desgraça.

Encerra em ti tua tristeza inteira.  
E pede humildemente a Deus que a faça  
Tua doce e constante companheira..." (Manuel Bandeira)

**Dizer mais o que, se nada aplaca essa dor. Se a dor ainda  
é tamanha...**

## ***Dedicatória***

Mãe, Juninho, Ray, vó, alguns tios e primos (minha família), obrigada pelo amor incondicional, por todo o apoio sempre, sem esperar nada em troca. Muito da minha força vem de vocês. Palavras não bastam para expressar toda minha gratidão. Todos são exemplos, principalmente você, Mãe.

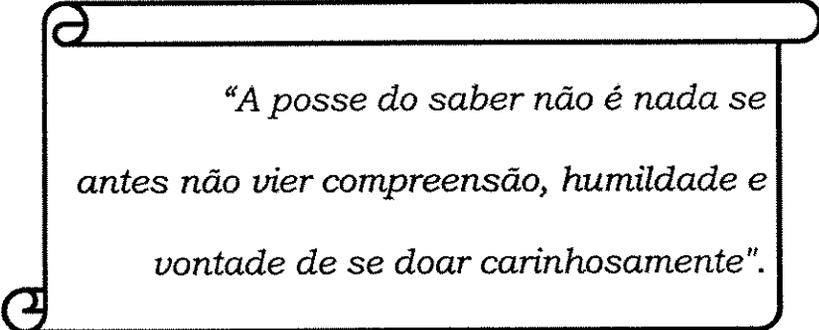
## ***In memorium***

Pai e Nega (tia Fátima), sem a presença física vocês estão para sempre no meu coração. Sinto que de alguma forma sabem das nossas vidas. Ficou tão mais difícil sem vocês aqui por perto. Jamais poderei esquecer tudo o que representam...

**Meu amor e minha gratidão; também saudades...**

## *Agradecimento Especial*

Ao Professor Edson Rosa Pimentel pela orientação, ensinamentos, amizade, compreensão, paciência, confiança, respeito, carinho e principalmente pelo apoio na confecção desta tese, mesmo quando eu, secretamente, achava que não conseguiria terminar essa tese em tão pouco tempo, depois da tristeza pela qual passei e ainda passo. Nós vencemos essa primeira batalha. A vitória é sua e minha.



*“A posse do saber não é nada se antes não vier compreensão, humildade e vontade de se doar carinhosamente”.*

## Agradecimentos

À Professora Dra. Laurecir Gomes pelos ensinamentos, pelas críticas e sugestões durante a execução deste trabalho, pela leitura cuidadosa da tese, também pelo incentivo, preocupação e carinho.

Ao Professor Dr. Benedicto de Campos Vidal pela análise prévia da tese, pela importante colaboração na morfologia, por permitir o uso do seu laboratório e pela disponibilidade em participar da banca examinadora.

À Professora Dra. Stela M. Mattiello G. Rosa pela análise prévia da tese, pelas sugestões e disponibilidade em participar da banca examinadora.

Ao técnico Francisco Ângelo Mallatesta, pela amizade, apoio e fundamental ajuda na realização dos experimentos.

Aos Professores que compuseram a banca dos exames de qualificação e proficiência, pelas palavras incentivadoras, críticas e sugestões.

A todos os docentes, técnicos e colegas do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, pelo incentivo.

Aos secretários Lillian Panagio e Sidney Simões pela amizade e por todo o auxílio, principalmente nas horas de mais correria.

Aos queridos Professores Dra. Rejane M. Góes e Dr. Sebastião R. Taboga, pelo impulso inicial nessa carreira, pela agradável convivência e exemplo profissional. Aos demais Professores da Graduação em Rio Preto, que de alguma forma contribuíram na aquisição de conhecimentos.

À amiga Analice, por toda a ajuda, pelas orações, por estar presente na vida de minha família, pelo carinho. Nunca vou esquecer que você disse que nós não o perdemos, porque ninguém perde para Deus...

Aos amigos de longa data, André e Mariângela. Nem sempre parece, mas vocês me são caros.

Aos amigos da Pós Graduação Alberto, André, Antonella, Alexandre (Xarope), Daniele, Fernanda, Flávia, Gisele, Josete, Juliano (e família), Lúcia, Luís Justulim, Marcela, pelo apoio.

Aos mais que amigos da Pós Graduação, amigos de alegrias, almoços e jantares, cinemas, clube, bar da coxinha e outros, bate papo, viagens, também desabafos, desânimos, tristezas: Flávia, Fernanda, Daniele, Gisele, Alberto, Juliano, pelo carinho, "mas o bom desta vida é estar vivo, ter amor, ter amigos...".

Às queridas Lúcia e Josete, pela oportunidade que tive de trabalhar com vocês, por tornar o ambiente de trabalho extremamente agradável, por todos os momentos bons e perrengues que passamos juntas. Pelo apoio, torcida e amizade.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica de MEC, Paulo, Gustavo, Wilson e Alexandre, pelo incentivo.

Às sempre amigas e amadas Dani, Kells, Aline e Tati, por tudo que vivemos e ainda viveremos, mesmo à distância, “quem tem sensibilidade e quem chora de emoção é sincero na amizade que guarda no coração”. Aos demais amigos da graduação no IBILCE, à Rep. Casa da Creusa, por todos os momentos e boas lembranças. Saudades.

À Edna, Telma e Patrícia pela convivência pacífica na Rep. em Campinas. Principalmente à Paty pelas boas conversas e agradável companhia.

A todos que contribuíram, ou não, para realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

A mim, pela vontade de continuar. Continuo, sempre, por aqueles que amo.

“As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias que precisam e, quando não as encontram, as criam”.

(Sir Winston S. Churchill)

**ÍNDICE**

<b>RESUMO</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>17</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>24</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>38</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>49</b>

## Resumo

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo hialino que apresenta células e abundante matriz extracelular, sendo essa composta de colágenos, glicoproteínas não colagênicas e proteoglicanos. Este trabalho teve como objetivo descrever a composição e organização da matriz extracelular de cartilagem articular de avestruz. Esta ave de grande porte e de interesse comercial, quando mantida em cativeiro, tem sido acometida por artrose nas articulações do tarsometatarso com sério comprometimento para a saúde do animal e consequências econômicas. Para tanto consideramos as cartilagens articulares das superfícies proximal e distal do tarsometatarso. A cartilagem proximal foi dividida em porção lateral e intermediária-medial, enquanto que da cartilagem da superfície distal foi analisada só a porção central. As análises estruturais das regiões da cartilagem, coradas com azul de toluidina, mostraram porções metacromáticas e fibrilares. As fibrilas, intensamente birrefringentes ao exame pela microscopia de polarização, mostraram-se dispostas em várias direções, especialmente na região distal. A extração dos componentes da matriz foi feita com cloreto de guanidina 4M, a seguir fracionados em coluna de DEAE-Sephacel e analisados em SDS-PAGE. A quantificação de proteínas e glicosaminoglicanos dos extratos totais foi determinada por métodos colorimétricos, os quais revelaram que a região distal, sujeita a maior compressão, contém mais proteínas e glicosaminoglicanos que região proximal. A análise em SDS-PAGE das frações de cromatografias das 3 regiões mostrou a presença de proteínas com Mr de 17 a 121 kDa, além de componentes polidispersos com Mr em torno de 67, 80-100 e 250-300 kDa, que provavelmente correspondam aos pequenos proteoglicanos fibromodulim, decorim e biglicam, respectivamente. A análise de glicosaminoglicanos em gel de agarose-propilenodiamino mostrou como principal componente o condroitim sulfato. O componente polidisperso com 80-100 kDa, provavelmente decorim, possui condroitim sulfato. Com base nos resultados, conclui-se que devido a maior carga compressiva na região distal, ela apresenta maiores quantidades de glicosaminoglicanos, proteínas e estruturalmente as fibrilas dispostas em várias direções.

## Abstract

The articular cartilage is a hyaline connective tissue that contains cells and a great amount of extracellular matrix, which is composed of collagen, non-collagenous glycoproteins, and proteoglycans. This work aimed to describe the composition and organization of the extracellular matrix from articular cartilage of ostrich, which is a big bird with commercial importance and that commonly suffers of arthritis at the tarsometatarsal articulations when living in captivity conditions, leading to serious commitments to the animal's health, beyond the economical consequences. For this purpose, we have considered the articular cartilages of the proximal and distal surfaces of the tarsometatarsus. The proximal cartilage was divided into lateral, and intermediary-medial portions. From the distal surface only the central portion was analyzed. Structural analyses after toluidine blue staining showed presence of metachromatic and fibrillar components. The fibrils, intensely birefringent at polarization microscopy, were arranged in many directions, especially in distal cartilage. To extract the extracellular matrix components 4 M guanidinium chloride was utilized. The components were fractionated in DEAE-Sephacel and analyzed by SDS-PAGE. Quantitation of proteins and glycosaminoglycans was done utilizing colorimetric methods. The quantitative analysis revealed that the distal region, which is subjected to higher compressive forces, contains more proteins and glycosaminoglycans than the proximal region. The SDS-PAGE analysis of the fractions eluted from the DEAE-Sepachel showed the presence of proteins with Mr from 17 to 121 kDa. In all regions, polydisperse components with Mr around 67, 80-100, and 250-300 kDa, were found. These components probably correspond to the small proteoglycans fibromodulin, decorin and biglycan. Glycosaminoglycans analysis in agarose-propylene diamine gel showed only the presence of chondroitin-sulfate. The possible decorin found is a proteoglycan of chondroitin-sufate, and not dermatan-sulfate, as observed in other cartilages. Structurally the distal region exhibited fibrils arranged in several directions, probably because of a highest compressive strenght.

## Introdução

Os tecidos conjuntivos são cruciais para os organismos multicelulares, onde têm papel estrutural e conferem resistência e elasticidade às estruturas corporais (SVENSSON *et al.*, 2001). Esses tecidos consistem de uma população esparsa de células e principalmente de matriz extracelular (MEC), constituída primariamente por fibras. A estrutura das fibras varia dependendo da demanda que o tecido necessita, entretanto, a forma, a organização e suas propriedades mecânicas também dependem da presença de outras glicoproteínas e proteoglicanos (PGs) da MEC (SCOTT, 2001; SVENSSON *et al.*, 2001). A MEC pode influenciar na diferenciação celular, proliferação, adesão e migração (ADAMS and WATT, 1993; BATEMAM, 2001), além disso, a própria atuação de forças biomecânicas pode orientar o arranjo das fibras e distribuição de PGs (VIDAL, 1989). As propriedades dos componentes da MEC são essenciais para o funcionamento normal de tecidos conjuntivos como a cartilagem, pele, tendões, ossos, discos intervertebrais e lâmina basal. A composição da MEC depende do tipo celular, do grau de diferenciação e estado metabólico (ADAMS and WATT, 1993).

## **1. Cartilagem articular**

A superfície articular é um tipo de tecido hialino e apresenta funções para facilitar os deslizamentos entre as superfícies articulares e absorver choques mecânicos (JUNQUEIRA and CARNEIRO, 1999). Como os demais conjuntivos, esse tecido apresenta células (condrócitos) e abundante material extracelular (MOW *et al.*, 1984). Os condrócitos ocupam de 5-10% do volume tecidual (ARCHER and FRANCIS-WEST, 2003), encontram-se separados por uma abundante MEC, e emitem projeções que se estendem, mas não chegam a tocar outros condrócitos (KNUDSON and KNUDSON, 2001). Esse tipo celular é responsável pela síntese e manutenção dos componentes da matriz (VANWANSEELE *et al.*, 2002), além disso, também regula a remodelação da matriz da cartilagem pela capacidade de sintetizar uma variedade de enzimas proteolíticas, como as metaloproteases (BLUTEAU *et al.*, 2001).

## **2. Bioquímica da matriz extracelular de cartilagem articular**

A MEC representa cerca de 90% do peso do tecido cartilaginoso (HARDINGHAM and FOSANG, 1992), sendo constituída por componentes inorgânicos, como água e eletrólitos (TORZILLI, 1985; MYERS *et al.*, 1988) e orgânicos como colágeno (VAN DER REST and GARONE, 1991; KIELTY *et al.*, 1993; EYRE, 2002), PGs (HEINEGÅRD and OLDBERG, 1989; BIANCO *et al.*, 1990; HARDINGHAM and FOSANG, 1992; IOZZO *et al.*, 1994) e glicoproteínas

não colagênicas (HARDINGHAM, 1979; HEDBOM *et al.*, 1992; NEAME *et al.*, 1999).

## 2.1. Colágenos

O colágeno constitui a maior classe de proteínas fibrosas da MEC de tecidos conjuntivos. Atualmente são conhecidos mais de vinte tipos de colágeno geneticamente distintos. Sua estrutura em bastonete é formada por três cadeias polipeptídicas (VAN DER REST and GARRONE, 1991) denominadas cadeias- $\alpha$ , ricas em prolina e glicina, que formam uma tripla fita helicoidal (LINSENMAYER, 1985). Cada cadeia helicoidal é composta por uma tripla seqüência repetitiva de Gly - X- Y, onde X ou Y podem ser qualquer aminoácido (LINSENMAYER, 1985), mas freqüentemente X é prolina e Y é hidroxiprolina (VAN DER REST and GARRONE, 1991). As moléculas de colágeno são glicosiladas, e a glicosilação ocorre nos resíduos de hidroxilisina (LINSENMAYER, 1991). Os colágenos fibrilares dos tipos I, II, III, V e XI ocorrem na maioria dos tecidos conjuntivos de vertebrados e se agregam em fibrilas apresentando estriações periódicas em torno de 67nm, quando observados em microscópio eletrônico. Além desses tipos, há os não fibrilares, que estão presentes nos tecidos em menores quantidades, desempenhando função de conexão entre os elementos do tecido conjuntivo. Estes colágenos fazem parte da família FACIT (*Fibril-associated collagens with interrupted triple helices*) e compreendem os colágenos dos tipos IV, VI até o X e XII até o XIX (SVENSSON *et al.*, 2001). Nas cartilagens em geral são encontrados

colágenos tipos I, II, V, VI, IX e XI (VAN DER REST and GARONE, 1991; THOMAS *et al.*, 1994; VANWANSEELE *et al.*, 2002). O colágeno tipo II (EYRE, 2002) é predominante na cartilagem articular, e forma as estruturas fibrilares básicas da MEC (CHAPMAN, 1989; REICHENBERGER and OLSEN, 1996). Colágenos tipos IX (MULLER-GLAUSER *et al.*, 1986; REICHENBERGER and OLSEN, 1996) e XI (PETIT *et al.*, 1993; SANDBERG *et al.*, 1993) são encontrados junto ao colágeno tipo II (EYRE *et al.*, 1987; VAN DER REST and MAYNE, 1988; WU *et al.*, 1992; EYRE, 2002). O colágeno tem alto grau de organização estrutural e seu papel primário na cartilagem é proporcionar a este tecido resistência à tensão (WOO *et al.*, 1987; SCHIMIDT *et al.*, 1990). O colágeno tipo II representa 80-90% do conteúdo de colágeno da cartilagem (KNUDSON and KNUDSON, 2001), já o colágeno tipo IX contribui com apenas 1% do total de colágeno na cartilagem articular madura, embora esteja presente em altas concentrações no tecido fetal (OLSEN, 1997; KNUDSON and KNUDSON, 2001). Grande parte das moléculas de colágeno tipo IX, encontradas na matriz da cartilagem articular, liga-se covalentemente à superfície das fibrilas colágenas de maneira antiparalela (VAN DER REST and MAYNE, 1988; WU *et al.*, 1992). Esse tipo de colágeno aparentemente tem um importante papel na estabilização da malha tridimensional de colágeno, e contribui para a função mecânica de oferecer resistência às forças de tensão (EYRE *et al.*, 1987; EYRE 2002). Perda ou redução dessa função do colágeno tipo IX têm potencial contribuição na degeneração da cartilagem articular (FASSLER *et al.*, 1994; REICHENBERGER and OLSEN, 1996).

## 2.2. Proteoglicanos

Os PGs constituem a segunda maior porção dos componentes da MEC de cartilagem articular (HARDINGHAM and FOSANG, 1992). São moléculas compostas por uma proteína central ligada covalentemente a uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) (KIMURA *et al.*, 1987; CALABRO *et al.*, 2001). O GAG predominantemente encontrado em PGs da cartilagem articular é o condroitim sulfato (CS) (KNUDSON and KNUDSON, 2001). O maior PG de CS da cartilagem articular é o agregam (HERING-THOMAS, 1999; KNUDSON and KNUDSON, 2001; KIANI *et al.*, 2002), que apresenta Mr de 1-4 MDa e consiste de uma extensa proteína central com 220-250 kDa ao qual estão covalentemente ligadas cadeias de queratam sulfato (QS) e CS (VALHMU *et al.*, 1995; KIANI *et al.*, 2002). Essa proteína central apresenta um segmento ou domínio, G1, capaz de se ligar ao ácido hialurônico (AH) (ROUGHLEY, 2001), sendo essa ligação estabilizada pela proteína de ligação (*link protein*) (HARDINGHAM, 1979). Essa habilidade do agregam representa um mecanismo de fixação na MEC (KNUDSON and KNUDSON, 2001) por formar um agregado macromolecular, contribuindo para as propriedades mecânicas e físico-químicas da cartilagem articular (MOW *et al.*, 1984; RATCLIFFE and MOW, 1996). Estes agregados de agregam retêm grande quantidade de água devido à alta densidade de cargas negativas das cadeias de GAGs, sendo responsáveis pela manutenção do alto teor hídrico da matriz, gerando dessa forma uma pressão osmótica e um intumescimento que resulta numa espécie de um gel hidratado (SVENSSON *et al.*, 2001; KIANI *et al.*, 2002).

Este intumescimento é contido pelas fibrilas de colágeno, possibilitando ao tecido suportar forças compressivas com um mínimo de deformidade (RATCLIFFE and MOW, 1996; BATEMAN, 2001). Embora originalmente conhecido como um PG específico da cartilagem articular, o agregam foi encontrado em outros tecidos (KNUDSON and KNUDSON, 2001), contudo sua deposição é considerada uma característica da atividade dos condrócitos (KNUDSON and KNUDSON, 2001). Um outro grande PG agregante semelhante ao agregam, o versicam (RATCLIFFE and MOW, 1996), é expresso em menor quantidade (GROVER and ROUGHLEY, 1993). Esses dois grandes PGs contribuem com cerca de 50 a 85% dos PGs em relação aos não agregantes, que contribuem com cerca de 10 a 40% (KNUDSON and KNUDSON, 2001).

Outros PGs encontrados em cartilagem articular são os pequenos PGs decorim (DANIELSON *et al.*, 1993; KNUDSON and KNUDSON, 2001), biglicam (SAMPAIO *et al.*, 1988; FISHER *et al.*, 1991) e fibromodulim (ANTONSSON *et al.*, 1993). Esses pequenos PGs são caracterizados por um domínio central composto de uma série de repetições adjacentes ricas em leucina e por isso pertencem à família das SLRPs (*Small Leucine Rich Proteoglycans*) (HOCKING *et al.*, 1998; SVENSSON *et al.*, 2001). Esta família pode ser dividida em duas sub-famílias dependendo da presença de cadeias de CS/DS (dermatam sulfato) ou QS (ROUGLHEY, 2001). Decorim acha-se associado às fibrilas colágenas (KNUDSON and KNUDSON, 2001), possui uma proteína central de 40 kDa e porta uma cadeia lateral de CS (osso) ou DS (tendão, pele, esclera e cartilagem)

dependendo do tipo de tecido considerado (FOSANG and HARDINGHAM, 1996; IOZZO, 1997). É o pequeno PG mais abundante da matriz de cartilagem articular e sua expressão é aumentada com o aumento da idade em articulações humanas (KNUDSON and KNUDSON, 2001). O decorim "in vitro" regula a fibrilogênese do colágeno (HEDBON and HEINEGÅRD, 1993; FONT *et al.*, 1996) sugerindo que ele desempenhe importante função na organização das fibras de colágeno e na manutenção da integridade do tecido (KUC and SCOTT, 1997; HOCKING *et al.*, 1998). "In vivo", esse pequeno PG, não está somente envolvido com a fibrilogênese do colágeno (BIRK *et al.*, 1995), mas também modula a atividade do fator de crescimento TGF- $\beta$  participando dessa forma da proliferação celular (SINI *et al.*, 1997; SCHONHERR *et al.*, 1998). A localização tecidual e potencial interação com outros componentes da matriz de cartilagem têm sido menos claramente definida para o biglicam (BIANCO *et al.*, 1990), que também apresenta uma proteína central de 40 kDa e contém 2 cadeias laterais de CS ou DS (FOSANG and HARDINGHAM, 1996). Fibromodulim é um PG composto por uma proteína central de aproximadamente 48 kDa e quatro cadeias laterais de QS (PLAAS *et al.*, 1990); apresenta a capacidade de se ligar às fibrilas colágenas e pode ter um papel complementar ao decorim na organização matricial (HEDBOM and HEINEGÅRD, 1989 and 1993). A associação entre os PGs e colágeno ocorre de forma ordenada, de modo que os GAGs se dispõem paralelamente em relação ao eixo maior dos feixes de colágeno (VIDAL and VILARTA, 1988; MELLO and VIDAL, 2003), promovendo dessa forma a integridade e manutenção das

propriedades biomecânicas de diferentes estruturas (SCOTT, 1988). O perlecam, embora seja um pequeno PG de membrana basal, também é encontrado na cartilagem articular (SUNDARRAJ *et al.*, 1995; KNUDSON and KNUDSON, 2001). É um PG de heparam sulfato (HS) (SUNDARRAJ *et al.*, 1995) e pode interagir com glicoproteínas adesivas. A importância do perlecam para a manutenção da cartilagem é demonstrada pelo fenótipo condrodisplásico apresentado pelo camundongo deficiente em perlecam, além disso, esse fenótipo é agravado com defeitos no desenvolvimento do coração e cérebro (COSTELL *et al.*, 1999). Em humanos, mutações no gene do perlecam têm sido associadas à síndrome de Schwartz-Jampel (miotonia condrodistrófica) (NICOLE *et al.*, 2000), entretanto, até o presente momento, a real função do perlecam na cartilagem articular é desconhecida (ROUGHLEY, 2001).

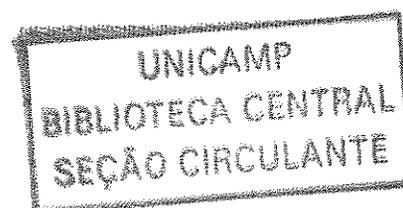
### **2.3. Proteínas não colagênicas**

Além de colágeno e PGs a MEC de cartilagem articular contém numerosas proteínas denominadas de proteínas não colagênicas que podem apresentar papel estrutural na matriz (NEAME *et al.*, 1999). A fibronectina é uma das proteínas mais conhecidas e está presente em muitos tecidos (HEINEGÅRD and OLDEBERG, 1989). Essa proteína pode aparecer em múltiplas isoformas devido a “splicing” alternativo do seu gene (BURTON-WUSRTER *et al.*, 1998). A quantidade de fibronectina aumenta cerca de dez vezes em cartilagem osteoartrítica, embora não se saiba o significado funcional disso (ROUGHLEY,

2001). Outra proteína encontrada principalmente em cartilagem é a de 58 kDa, uma proteína básica, isolada inicialmente de cartilagem articular bovina (HEINEGÅRD and OLDEBERG, 1989). Um outro componente, a proteína oligomérica de matriz de cartilagem (COMP) de alto peso molecular foi inicialmente encontrada em cartilagem articular (HEDBOM *et al.*, 1992). Apresenta Mr de aproximadamente 500 kDa e é composta de 5 subunidades (ROUGHLEY, 2001). COMP é um marcador muito utilizado para caracterizar desordens erosivas de cartilagem articular, visto que fragmentos dessa proteína podem ser encontrados no fluido sinovial de pacientes com lesão na cartilagem (SAXNE *et al.*, 1993). Aumento nos níveis de COMP estão associados a progressão de osteoartrite (SHARIF *et al.*, 1995). Outra proteína encontrada em cartilagem articular e tecido ósseo, é a de 36 kDa, que apresenta uma composição rica em resíduos de asparagina, ácido aspártico e leucina, sendo que esses aminoácidos representam 25% do total da proteína (SOMMARIN *et al.*, 1989). Também são descritas na cartilagem a ancorina, condrocalcim e uma proteína de baixo peso molecular, Ch 21 kDa (HEINEGÅRD and OLDEBERG, 1989; NEAME *et al.*, 1999). A maioria das proteínas não colagênicas são multifuncionais, devido à presença de domínios estruturais dentro da mesma molécula. Essas proteínas estão envolvidas em fenômenos que contribuem para a interação célula-matriz permitindo uma sinalização bidirecional (JOHANSSON, 1996).

### 3. Aspectos morfológicos de cartilagem articular

A estrutura, composição e propriedades mecânicas da cartilagem articular variam com a profundidade do tecido a partir da superfície articular (AKIZUKI *et al.*, 1986; CLARK, 1991). Estruturalmente a cartilagem articular é dividida em 4 zonas - superficial, central, profunda e zona de calcificação, sendo que esta representa uma transição entre a cartilagem articular e o osso. Com a profundidade, os condrócitos variam na aparência e na atividade sintética, (RATCLIFFE and MOW, 1996). As fibrilas colágenas, na zona superficial, apresentam um pequeno diâmetro, são arranjadas paralelamente à superfície articular, e em diferentes direções. Na zona central, as fibrilas apresentam um diâmetro maior e estão também arranjadas ao acaso. Já na zona profunda, o diâmetro das fibrilas é bem maior e são organizadas perpendicularmente à superfície articular (GUILAK *et al.*, 1994; SETTON *et al.*, 1994; VANWANSEELE *et al.*, 2002). Há um decréscimo na quantidade de colágeno a partir da superfície (LIPSHITZ *et al.*, 1975), enquanto que, a distribuição dos PGs é menor na zona superficial, e aumenta a caminho da região mais profunda (BROCKLEHURST *et al.*, 1984). Na região superficial há predominância de pequenos PGs como o decorim (POOLE *et al.*, 1986) e, nas demais zonas, há predomínio de grandes PGs como o agrecam (MULLER *et al.*, 1989). O conteúdo de água é alto na zona superficial (cerca de 80%) e decresce a aproximadamente 65% nas demais regiões (LIPSHITZ *et al.*, 1975; TORZILLI *et al.*, 1982).



#### 4. Cartilagem articular em aves

A maioria das aves, como os demais vertebrados, também expressa os colágenos tipos II, IX e XI, específicos de cartilagem articular, com variações na deposição na matriz (GREGORY *et al.*, 1999). Também o agregam apresenta seus domínios estruturais conservados nos mais diferentes vertebrados (LEE *et al.*, 2002). Isso é facilmente comprovado pela observação da mutação letal nanomelia (FOSANG and HARDINGHAM, 1996). Em galinhas essa mutação acarreta deficiência no agregam resultando em defeitos esqueléticos; um fenótipo semelhante é visto na mutação cmd (*cartilage matrix deficiency*) em camundongos, onde a expressão do colágeno tipo II é normal mas há falhas na expressão do agregam (KIMATA *et al.*, 1981). As mutações nanomelia e cmd indicam que o agregam tem um papel crucial na manutenção da matriz e desenvolvimento da cartilagem articular (FOSANG and HARDINGHAM, 1996). Ainda em aves, é encontrado um grande PG denominado PG-M (FOSANG and HARDINGHAM, 1996), que é homólogo ao versicam de mamíferos. Com relação aos pequenos PGs, decorim (BLASCHKE *et al.*, 1996) e fibromodulim também são semelhantes aos encontrados nos demais vertebrados, e a expressão de fibromodulim em cartilagem xifóide de galinha é mais proeminente nas regiões onde há presença de forças biomecânicas (GOMES *et al.*, 1994); já biglicam não é encontrado em aves, mas há um outro pequeno PG que porta 2 cadeias de DS, sendo estruturalmente similar ao biglicam de mamífero (BLASCHKE *et al.*, 1996).

A composição da MEC pode afetar a regulação de síntese e catabolismo em condrócitos, portanto é necessário um balanço entre os mais diversos componentes da matriz para que seja mantida a função normal da cartilagem articular (HERING-THOMAS, 1999). Qualquer desequilíbrio entre os componentes moleculares da matriz de cartilagem articular pode levar ao desenvolvimento de lesões osteoartriticas (BUCKWALTER *et al.*, 1992 e 1994). Também é preciso considerar que alterações de natureza mecânica no meio extracelular podem ser transmitidas às células, e estas podem responder sintetizando componentes da MEC, capazes de manter a homeostasia do tecido (VIDAL, 1966).

Frangos, galinhas e aves usadas como estoque para reprodução podem ser afetadas por diferentes desordens degenerativas das articulações e ossos, relacionadas com problemas no desenvolvimento normal do sistema esquelético. O peso do corpo e o genótipo da ave têm influência na patologia destas doenças e na distribuição de PGs na cartilagem articular (ANDERSON-MACKENZIE *et al.*, 1998). A degeneração progressiva de cartilagem articular resulta em artrite, dor e conseqüente diminuição na capacidade reprodutiva. A prevenção e o controle dessas desordens na criação de aves depende do avanço no conhecimento sobre os mecanismos fisiológicos que governam o crescimento esquelético normal e manutenção da cartilagem articular saudável (THORP, 1994).

Embora se saiba que a MEC das mais diferentes espécies de animais vertebrados apresenta uma composição básica semelhante, alguns organismos exibem MEC que pode variar tanto na sua composição como na sua organização,

dependendo da estrutura corporal, como peso, postura e atividade física. O avestruz (*Struthio camelus*), originário da África, é um desses animais que tem características peculiares tanto anatômicas como funcionais. É uma ave corredora de grande porte e está incluída no grupo das "Ratitas", devido o esterno destas aves ser plano e desprovido de carena, ao contrário das aves voadoras. A carena nas aves voadoras é sede de inserção dos potentes músculos peitorais. O avestruz não é uma ave voadora, logo, não tem músculos peitorais desenvolvidos como um pato ou galinha. Deste fato decorre uma importante peculiaridade produtiva do avestruz: a maior quantidade de carne produzida não está no peito, mas nas coxas e dorso, já que trata-se de animal corredor. Essa ave de grande porte atinge quando adulta de 2,0 a 2,5 m de altura e de 100 a 150 kg de peso, o que implica em uma significativa carga compressiva sobre a cartilagem articular, principalmente nas articulações do tarsometatarso. Existiam 5 diferentes sub-espécies (raças) distribuídas por todos os continentes. Algumas já se extinguíram, outras correm grande risco e são tuteladas em parques em alguns países. Comercialmente se definem 3 raças de avestruz: *black neck* (ou pescoço preto), *red neck* (ou pescoço vermelho) e *blue neck* (ou pescoço azul). O avestruz *black neck* - também conhecido como *African black* - é um animal domesticado (*Struthio camelus domesticus*), fruto de seleção empírica feita pelos sul-africanos ao longo dos últimos 150 anos. Os animais foram selecionados devido a certas características produtivas como maior fertilidade e precocidade, docilidade e alta

densidade de plumas. As raças *red* e *blue neck* são de maior porte, mas iniciam a postura mais tarde e são mais agressivas.

Apesar de ser uma ave bem conhecida, não existem estudos sobre a MEC de sua cartilagem articular. Com esse trabalho pretendemos conhecer as características da MEC de cartilagem articular dessa ave de grande porte, identificando seus principais componentes e como se organizam para resistir às forças de compressão e tensão que ocorrem nas articulações. Este estudo dará o conhecimento básico para estudos posteriores no sentido de se reduzir o índice de lesões osteoartriticas que vêm acometendo essas aves criadas em cativeiro, com sério prejuízo econômico.

## **Objetivos**

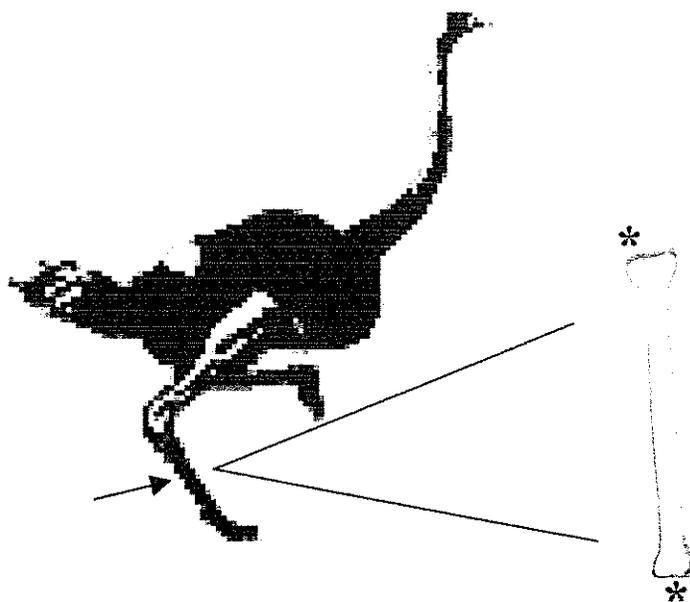
1. Analisar a organização estrutural da MEC das zonas superficiais das cartilagens articulares do tarsometatarso.
2. Avaliar a quantidade de proteínas não colagênicas, GAGs, e hidroxiprolina das cartilagens articulares do tarsometatarso.
3. Analisar as proteínas não colagênicas e pequenos PGs das cartilagens articulares do tarsometatarso.

## Material e Métodos

### Morfologia

#### 1. Material Biológico

Foram utilizados cinco avestruzes da linhagem African black, com 24 meses de idade, provenientes do Abatedouro Marchiori da cidade de Amparo-SP. Após o sacrifício da ave foram retiradas as porções lateral (PL) e intermediária-medial (PIM) da cartilagem articular proximal e a porção central (DC) da cartilagem articular distal do tarsometatarso (fig. 1). Os fragmentos foram retirados imediatamente após o abate, lavados em solução fisiológica a temperatura de 4°C e colocados em solução fixadora



**Figura 1.** Desenho esquemático de um avestruz. A seta indica o tarsometatarso; \* localização das cartilagens articulares nas extremidades proximal e distal do tarsometatarso, respectivamente.

## **2. Fixação da Cartilagem**

Os fragmentos de cartilagem foram fixados em solução de paraformaldeído 4% em tampão Millonig, pH 7,4 por 24 horas. Após a fixação, os fragmentos foram processados para inclusão rotineira em parafina Histosec/Paraplast Plus (Merck) e seccionados com 7 $\mu$ m de espessura em micrótomo rotativo (MICROM/HM-315). Foram realizados cortes longitudinais, tangenciais à superfície articular.

## **3. Colorações**

### **Azul de Toluidina (AT)**

Os cortes histológicos foram corados em solução de azul de toluidina 0.025% em tampão McIlvaine 0,1M pH 4,0 por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em tampão McIlvaine 0,1 M pH 4,0, secas ao ar, mergulhadas rapidamente em xilol e montadas em bálsamo do Canadá (MELLO and VIDAL, 1980).

## **4. Microscopia de Polarização**

A detecção da organização dos feixes colagênicos foi obtida em cortes corados com AT e analisados em microscópio Zeiss Axioplan 2, equipado com objetivas Neofluar 2,5X, 10X, 20X e 40X, optovar fator 2,5 e condensador 1,4, adaptado para análises qualitativas de anisotropias óticas. Acoplado ao microscópio, o dispositivo Axiophot 2 (Zeiss), suprido com filme Kodak Gold ISSO 100. Para análise de birrefringência os polarizadores foram posicionados

ortogonalmente e o material observado posicionado a 45° em relação a um dos polarizadores. Em alguns casos um dos polarizadores foi ligeiramente girado para coincidir com a direção de vibração dos elétrons ressonantes das moléculas do corante.

## **Bioquímica**

### **1. Extração**

Fatias de cada região foram retiradas, lavadas em solução de NaCl 0,15 M em aproximadamente 4°C, fragmentadas em pequenos pedaços e homogeneizadas em PBS (NaCl 0,15 M, 5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7,4), com homogeneizador Brinkman PT 1200C por quatro vezes consecutivas em intensidade seis por 30 segundos com intervalos de 15 segundos.

Após o processo de homogeneização, o material foi submetido à centrifugação em 18.000 rpm (centrífuga Beckman J2-21 – rotor JA-20) durante 50 minutos. O sobrenadante foi armazenado em temperatura de -20° C e ao precipitado foram acrescentados 15 volumes de cloreto de guanidina (GuHCl) 4 M, contendo inibidores de proteases como o fluoreto de fenilmetil sulfonil (PMSF) 1mM, etilenodiaminotetracético (EDTA) 20 mM, em tampão acetato sódio 50 mM, pH 5,8 (HEINERGÅRD and SOMMARIN, 1987). Para uma extração mais eficiente o material ficou 24 horas sob constante agitação e em banho de gelo. Após esse tempo, o material foi submetido à centrifugação em 18.000 rpm em um rotor JA-20

da Beckman por 50 minutos. O sobrenadante contendo o material extraído em GuHCl foi utilizado para as análises bioquímicas. Todos os reagentes empregados nesse trabalho foram de grau PA.

## 2. Análise Quantitativa

As dosagens de proteínas dos extratos em GuHCl foram realizadas usando Coomassie Brilliant Blue G-250 (BRADFORD, 1976), com absorvância em 596 nm em espectrofotômetro HP8452A. Como padrão foi utilizado albumina de soro bovino (BSA). Para a quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados foi utilizado o azul de dimetilmetileno blue (DMMB) (FARNDALÉ *et al*, 1986). Para a curva padrão foi utilizado o CS, a leitura efetuada em 526 nm em espectrofotômetro HP 8452A. Para quantificação de hidroxiprolina fragmentos das 3 regiões da cartilagem articular foram hidrolisados em HCl 6 N (1 ml/10mg de tecido) por 4h a 130° C. A seguir foi acrescentado 1,41 g de cloramina-T, 10 mL de água, 10 mL de n-propanol e 80 mL de tampão (50 g de ácido cítrico, 12 mL de ácido acético, 120 g de acetato de sódio e 34 g de hidróxido de sódio, pH 6,0) e após 20 minutos foi adicionado 1 mL de solução de ácido perclórico/aldeído (15 g de p-dimetilamino benzaldeído, 60 mL de n-propanol, 26 mL de ácido perclórico a 60% e n-propanol para completar 100 mL). O material foi incubado por 15 minutos em 60° C, resfriado e a absorvância lida em espectrofotômetro em 550 nm (STEGEMANN and STALDER, 1967).

### 3. Cromatografia

Os extratos foram dialisados contra 20 volumes de uréia 7 M em tampão Tris-acetato 50 mM pH 8,0 (4 trocas). Os componentes da MEC extraídos foram fracionados em coluna (1,5x 2,7 cm) de troca iônica com DEAE-Sephacel, previamente equilibrada com o tampão acima. As frações foram eluídas utilizando gradiente de NaCl 0,1-1 M, no mesmo tampão com uréia. Frações de 2,8 mL foram coletadas e monitoradas por absorbância em 280 nm em espectrofotômetro (Hewlett Packard 8452A).

### 4. Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida

A eletroforese foi realizada conforme ZINGALES (1984). As amostras obtidas após cromatografia de troca iônica foram analisadas em gradiente de 4 - 16% de acrilamida em presença de SDS, usando o sistema de tampão de acordo com LAEMMLI (1970). Amostras de frações de cromatografia foram precipitadas em etanol-acetato (HEINEGÅRD and SOMMARIN, 1987), num total de 5 vezes com trocas a cada 12 horas e então centrifugadas em Microcentrífuga Fisher Scientific Model 235 Va 8000, a 8.000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e o último precipitado levado à estufa a 37° C para secagem e suspenso em tampão de amostra contendo Tris-HCl 6,5 mM, SDS 2%, glicerol 10%, EDTA 1 mM em pH 6,8 e azul de bromofenol 0,01% na ausência ou presença de 2% de  $\beta$ -Mercaptoetanol ( $\beta$ -Me). A coloração foi feita pelo Coomassie Brilliant Blue R- 250. As massas moleculares aparentes foram inferidas por cálculo

de Rf e curva de regressão dos marcadores de peso molecular (WEBER and OSBORN, 1969).

### **5. Eletroforese em gel de Agarose-propileno diamino (PDA)**

Para análise dos GAGs, fragmentos das cartilagens foram deixados em acetona "overnight" a 4° C, e em seguida 24 horas de estufa a 37° C. Depois de seco e picado, foi acrescentada papaína na proporção de 40 mg/g de tecido, em tampão citrato de sódio 0,03 M pH 3,6 contendo EDTA 0,04 M e  $\beta$ -Me 0,08 M (80  $\mu$ l/1 mL) (MICHELACCI *et al.*, 1989). O preparado foi incubado em banho-maria a 50°C 24 horas. Ao sobrenadante, após centrifugação em microcentrífuga Fisher a 8.000 rpm por 4 minutos, foram adicionados dois volumes de etanol e deixado por 24 horas a 4°C. Após centrifugação nas mesmas condições acima, o precipitado final foi lavado com etanol 80%, acetona e secado na estufa a 37° C. Os GAGs obtidos após digestão com papaína foram suspensos em água e analisados em gel de agarose. Para o gel de agarose foi utilizado o tampão propileno diamino 50 mM, pH 9,0. Padrões conhecidos de GAGs contendo CS, DS e HS foram aplicados paralelamente.. As condições de corrida foram 0,1 A e 100 V. A seguir os géis foram fixados em brometo de cetiltrimetilamonio (Cetavlon) 0,1% e corados com AT 0,1% em etanol 50% e ácido acético 1% (DIETRICH and DIETRICH, 1976).

## **6. $\beta$ -eliminação**

Para liberação das cadeias de GAGs da proteína central, dos PGs eluídos da cromatografia de troca iônica das regiões DC, PL e PIM, amostras ricas em decorim foram precipitadas em acetato-etanol, como mostrado acima, incubadas durante 19 horas com 0,5 mL de NaOH 0,5 M à 4°C e em seguida precipitadas com álcool etílico absoluto, lavadas em etanol 80% e a seguir em acetona. As cadeias de GAGs obtidas foram analisadas em gel de agarose-propilenodiamino.

## **7. Digestão com Condroitinases ABC/AC**

Após  $\beta$ -eliminação, o material foi suspenso em 10  $\mu$ L de tampão acetato de sódio, Tris 50 mM e EDTA 10 mM, pH 8,0 para Chase ABC e pH 6,0 para Chase AC (BELLEY, 1985). Foram adicionados 7  $\mu$ L das enzimas. A digestão foi à 37° C durante 20 horas. Em seguida foi feita a precipitação em etanol, e o precipitado suspenso em 5  $\mu$ L de água para análise em gel de agarose-propilenodiamino.

## **9. Análise estatística**

As médias das dosagens foram comparadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via de dados não atrelados. Todos os testes foram feitos com 5% de significância (BEILGUELMAN, 1991).

## Resultados

### Morfologia

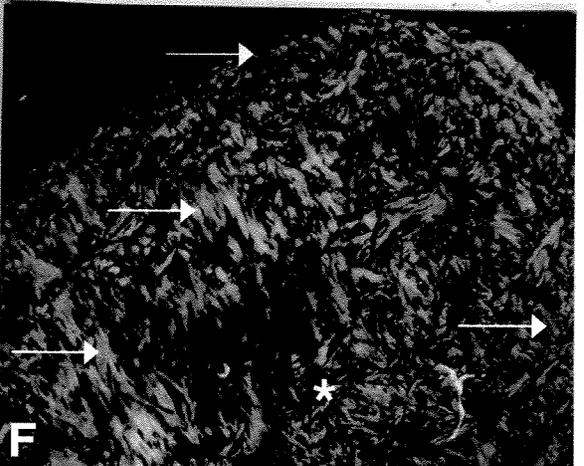
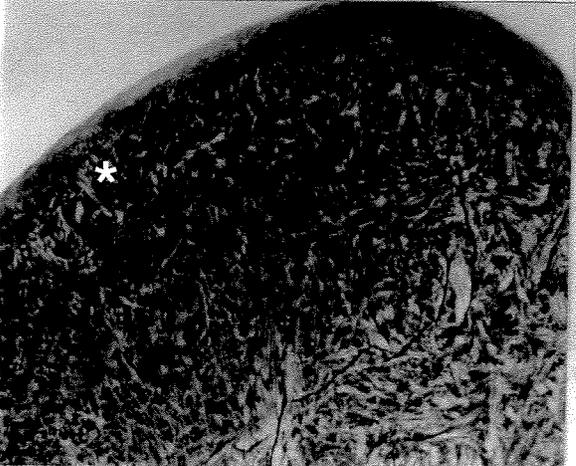
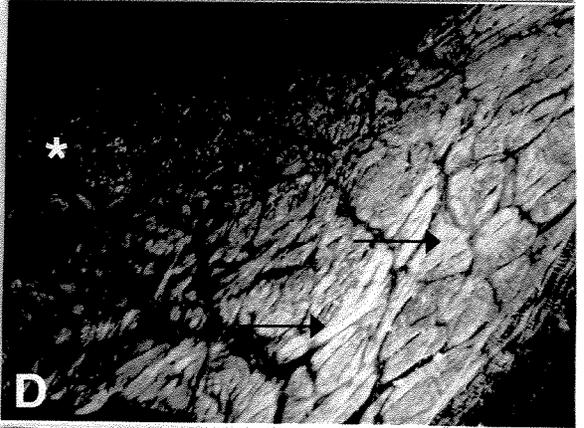
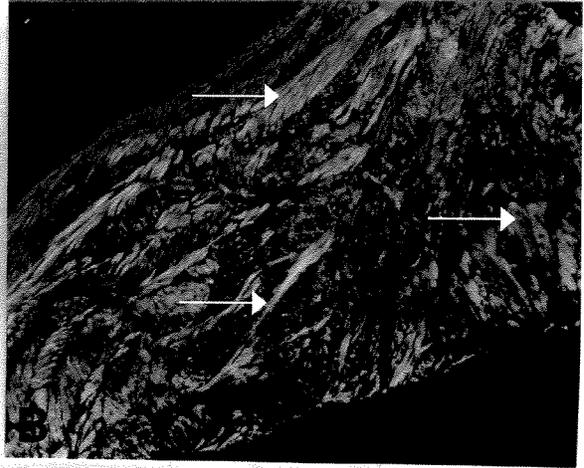
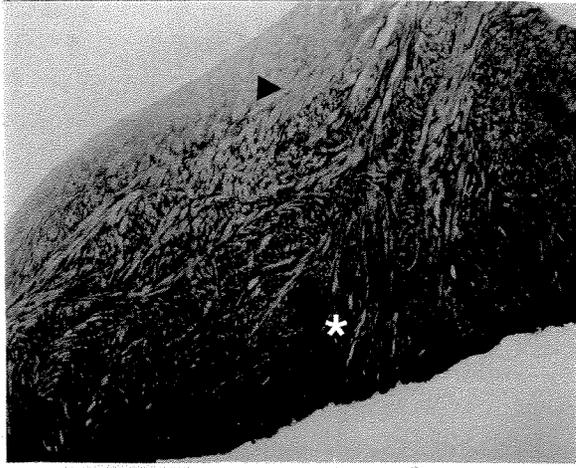
Os cortes histológicos longitudinais no sentido antero-posterior da zona superficial de cartilagem articular, foram corados com AT e analisados em microscópio de luz comum e com luz polarizada. As regiões PL (figs. 2 A, B), PIM (figs. 2 C, D) e DC (figs. 2 E, F), foram destacadas.

Observações dessas regiões em microscópio de luz comum (figs. 2 A, C, E) mostraram estruturas coradas, com componentes fibrosos e material metacromático acompanhando esses componentes, mas também disperso de maneira não uniforme. A região DC exibe intensa metacromasia devido à ligação das moléculas de AT com estruturas aniônicas associadas ao longo dos feixes de colágeno (fig. 2 E). As regiões PL (fig. 2 A) e principalmente PIM (fig. 2 C) exibem regiões metacromáticas distribuídas de maneira não uniforme no tecido, caracterizando uma MEC heterogênea do ponto de vista da distribuição de componentes aniônicos, representados aqui pelos GAGs. Análise desses mesmos cortes em microscopia de polarização (figs. 2 B, D, F) mostrou fibras intensamente birrefringentes e densamente agregadas, sugerindo uma organização fibrilar altamente organizada e orientada preferencialmente paralela à superfície articular. Além disso, associado a este arranjo paralelo, observou-se uma população de fibrilas dispostas obliquamente à rede fibrilar principal, especialmente na região DC (fig. 2 F), sujeita a maior carga compressiva. As cores da birrefringência também se devem à presença de PGs nessas regiões, corados com AT.

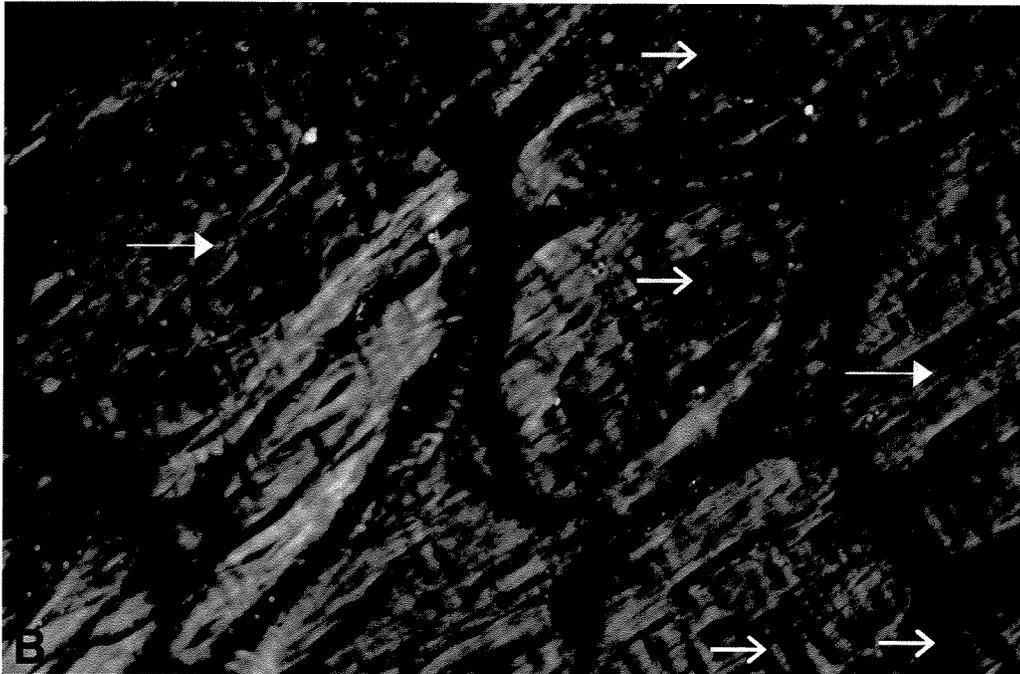
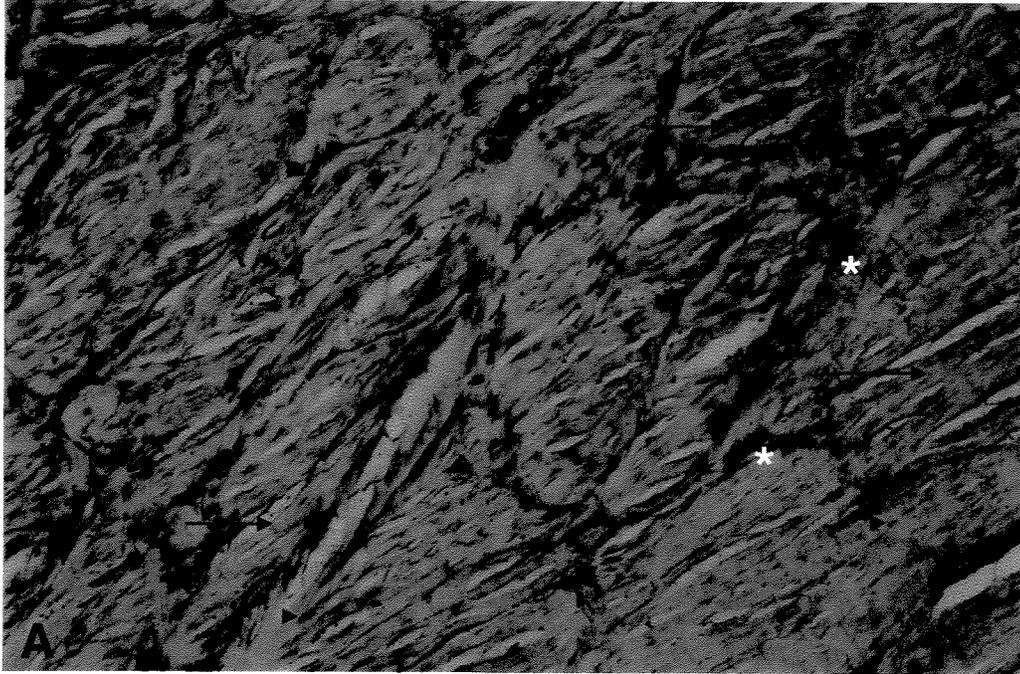
A análise em microscopia comum e microscopia de polarização da região PIM (fig. 2 C), mostraram que essa região exibe uma porção intensamente fibrilar (fig. 3) e uma menos fibrilar e mais marcadamente metacromática (fig. 4). A porção fibrilar, apresenta células alongadas e pouca metacromasia dispersa no tecido, visualizada principalmente associada às várias fibrilas, quando corada com AT (fig. 3 A). Na microscopia de polarização (fig. 3 B) foi observado o brilho intenso exibido pelas fibrilas posicionadas a  $45^\circ$  do plano da luz polarizada, evidenciando a natureza colagênica dessas fibrilas. O aspecto ondulado caracterizando o "crimp", alternando segmentos brilhantes e escuros, pode ser observado, bem como a distribuição das fibras de colágeno predominantemente em uma direção.

Na porção menos fibrilar (fig. 4), foi possível observar condrócitos espalhados em meio a uma abundante MEC fortemente corada pelo AT. Também foi possível visualizar uma matriz territorial metacromática rodeando os condrócitos (fig. 4 A). Sob microscopia de polarização (fig. 4 B), com analisador formando um ângulo menor que  $45^\circ$  em relação ao polarizador, observou-se uma coloração rósea, devido a distribuição ordenada das moléculas de AT ligadas aos PGs os quais estão associados aos feixes de colágeno, e que as fibras colágenas estão arranjadas em diferentes direções. Esta distribuição diversificada dos feixes de colágeno, bem como o alto grau de compactação desses feixes pôde melhor ser notado quando os polarizadores estavam cruzados ortogonalmente (fig. 4 C).

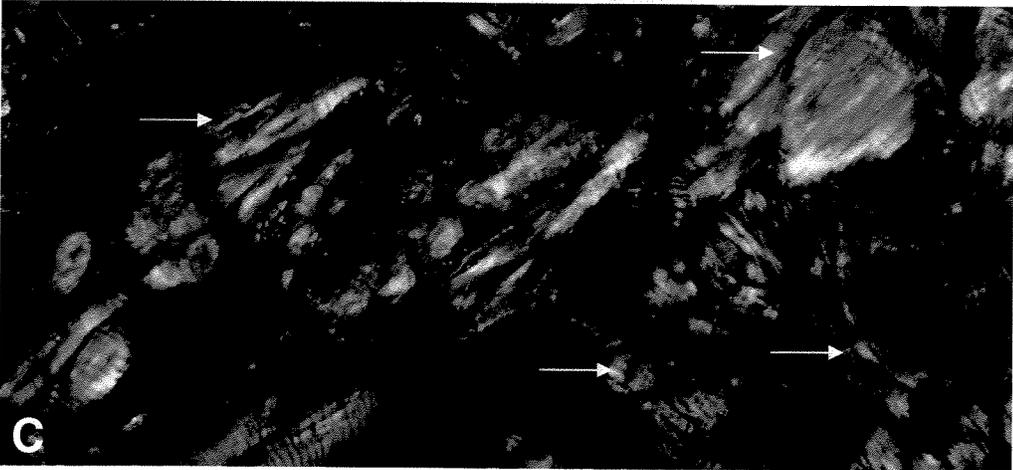
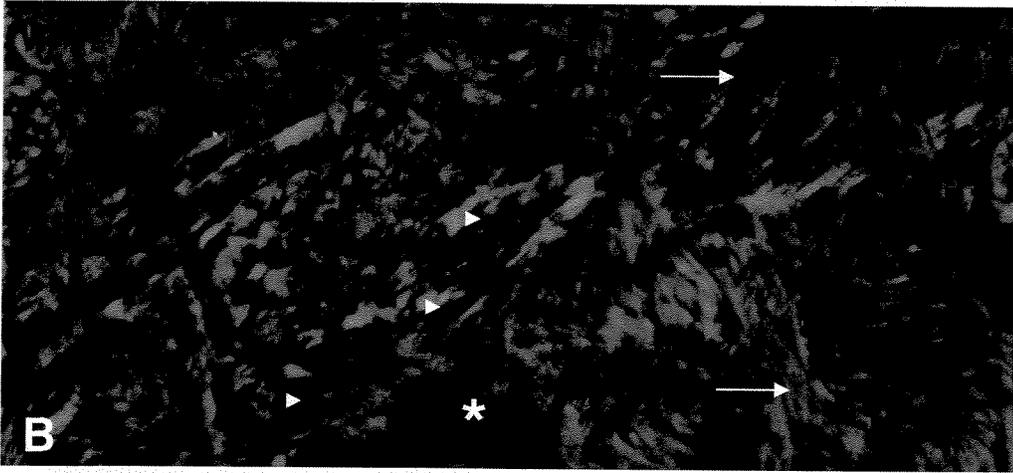
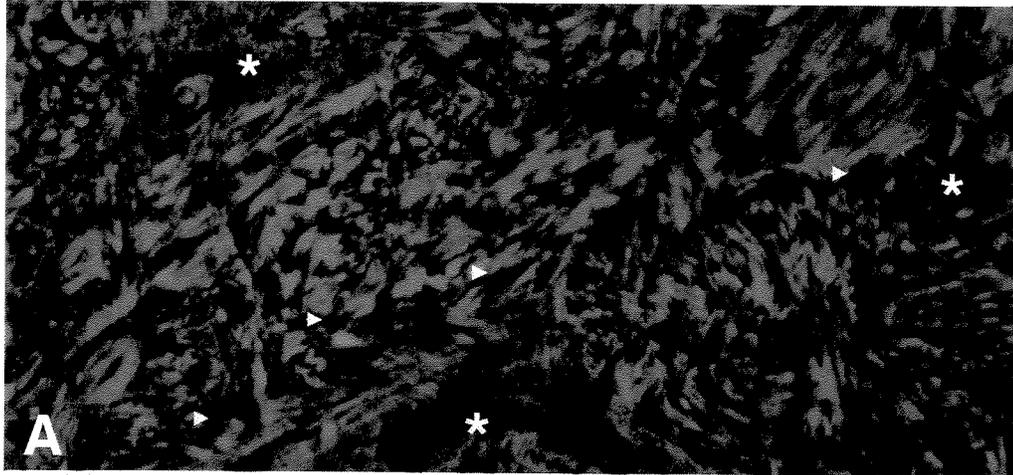
**Figura 02.** Cortes da zona superficial da cartilagem articular das regiões PL (A, B), PIM (C, D) e DC (E, F), corados com AT e observados em microscopia ótica comum e polarização. Na região DC (E) pode ser observada intensa metacromasia (\*). Nas regiões PL (A) e PIM (C) foram vistas porções metacromáticas (\*) e fibrilares (▶). Em microscopia de polarização (B, D, F), com o objeto posicionado a 45° em relação aos polarizadores, observou-se fibrilas intensamente birrefringentes e agregadas. Nas 3 regiões, especialmente em DC (F), as setas indicam fibrilas colágenas em várias direções. Aumento: 38,5x



**Figura 03.** Detalhe da porção fibrilar de PIM. Em (A) podem ser observadas células alongadas (▶) e pouco material metacromático (\*) que se situa entre os feixes de colágeno (→▶), delimitando-os, bem como as suas mudanças de direção. Em microscopia de polarização (B), com o objeto posicionado a 45° em relação aos polarizadores observou-se as fibrilas (→▶) orientadas preferencialmente em uma direção e também a presença do "crimp" (→▶). Aumento: 137,5x



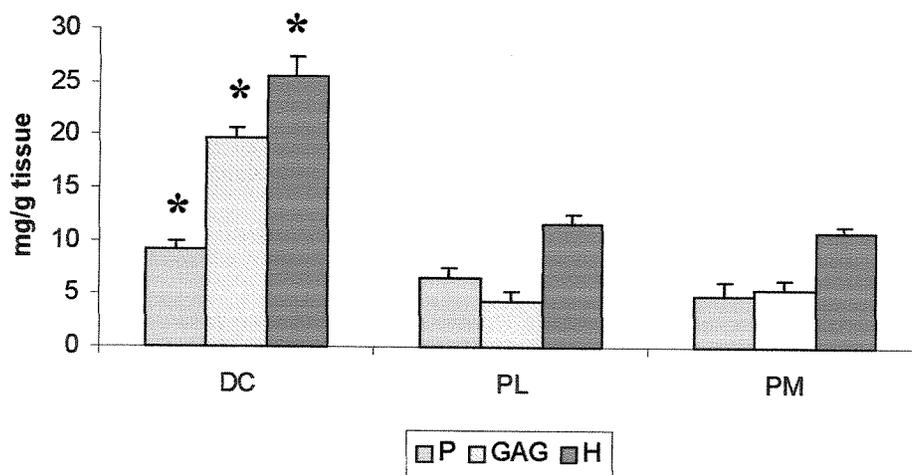
**Figura 04.** Detalhe da porção menos fibrilar de PIM. Em (A) essa porção exibe áreas mais marcadamente metacromáticas (\*). Também podem ser observados condrócitos e uma matriz territorial intensamente corada pelo AT (►). Em luz polarizada (B) e um dos polarizadores girado, notou-se a existência de material em cor rosa nas regiões com feixes de colágeno altamente compactados, como mostrado em (C), onde os polarizadores estão cruzados em posição ortogonal. Tanto em (B) como em (C) o material estava posicionado a 45° de um dos polarizadores. Aumento: 137,5x



## Bioquímica

### Dosagem de proteínas, GAGs sulfatados e hidroxiprolina

Os valores obtidos nas dosagens de proteínas e GAGs sulfatados, obtidos dos extratos totais e de hidroxiprolina a partir de tecido, das 3 regiões, estão apresentados na figura 5. Diferenças significativas foram encontradas entre as amostras, sendo que uma maior quantidade de proteínas, hidroxiprolina e GAGs foi encontrada na porção DC, em relação a PL e PIM.

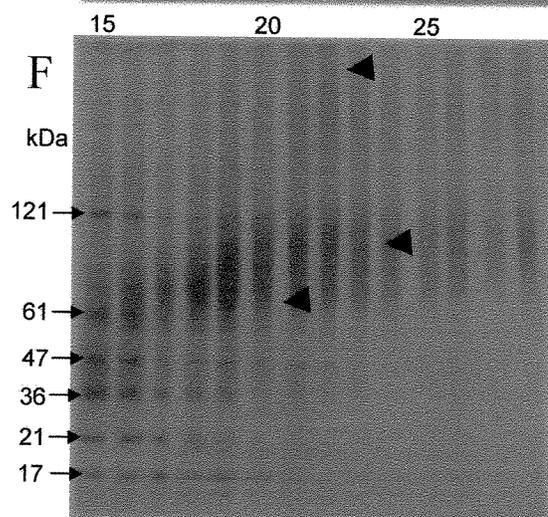
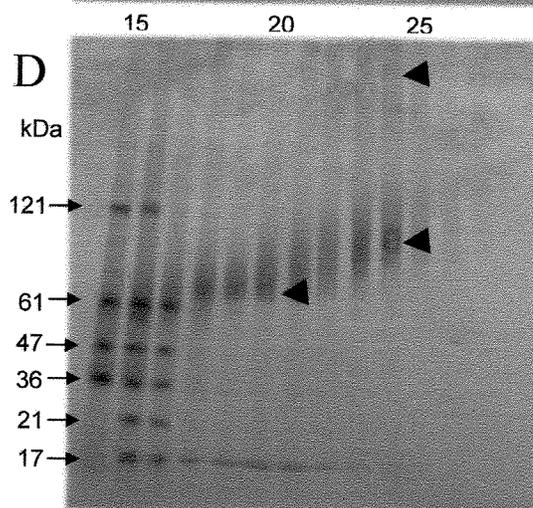
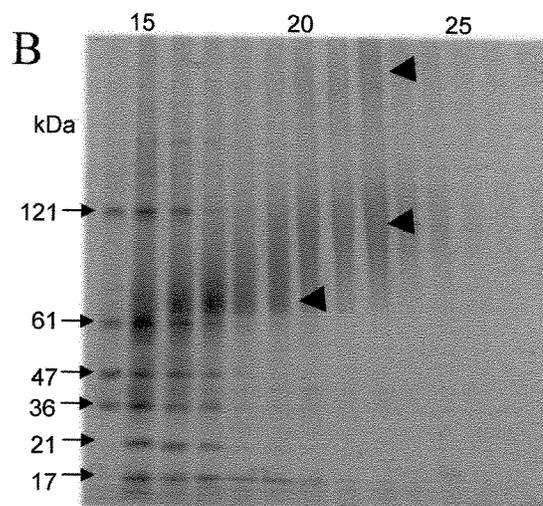
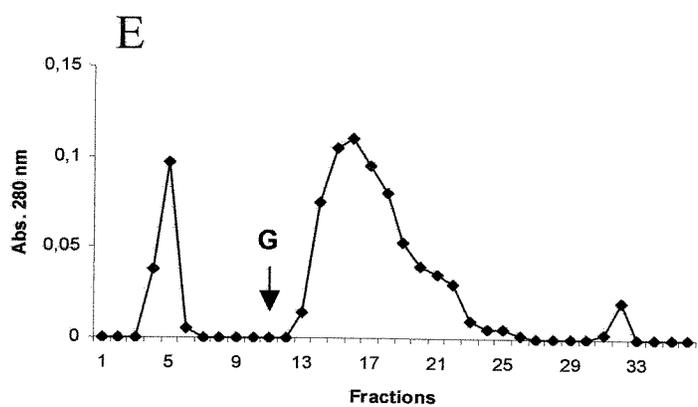
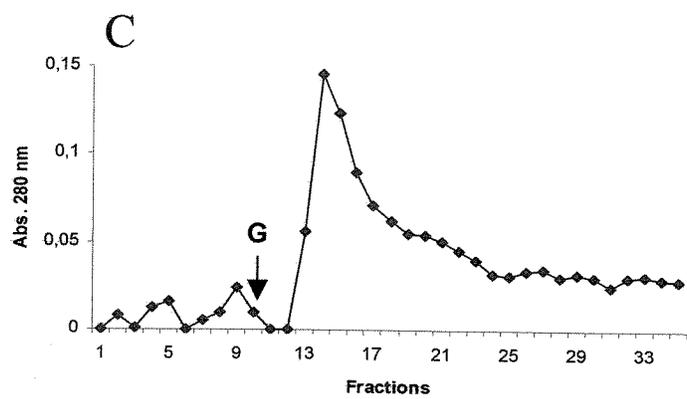
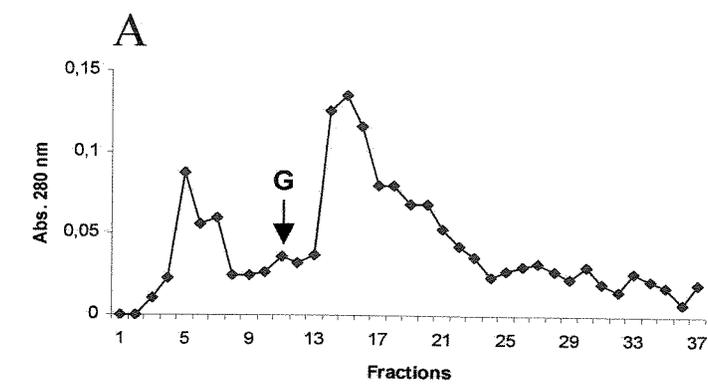


**Figura 05.** Dosagem de proteínas (P), glicosaminoglicanos (GAG) e hidroxiprolina (H) das regiões DC, PL e PIM. \* diferença significativa entre os grupos.

## **Cromatografia de Troca Iônica e SDS-PAGE**

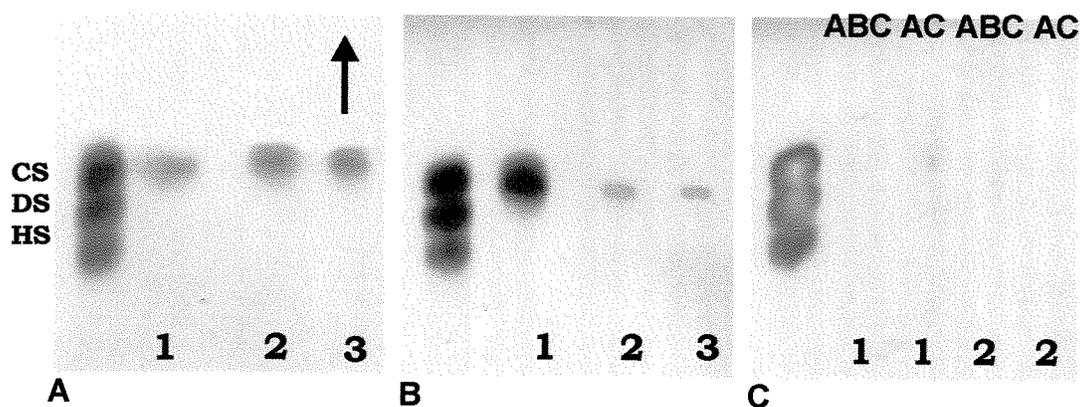
A análise dos componentes da MEC das três regiões extraídos em GuHCl, após cromatografia em DEAE-Sephacel (figs. 6 A, C, E), mostrou presença de componentes catiônicos (antes do gradiente) e aniônicos (depois do gradiente). Os componentes ligados ao DEAE e eluídos com um gradiente de NaCl (0,1 - 1M) foram analisados em gel de SDS-poliacrilamida. A partir dos padrões de pesos moleculares e valores de Rf das bandas visualizadas nos géis, foram identificadas em todas as regiões (DC, PL e PIM), proteínas com os seguintes valores de massa molecular aparente: 121, 61, 47, 36, 21 e 17 kDa (figs. 6 B, D, F). Bandas polidispersas em torno de 67 kDa, outra na faixa de 80 a 100 kDa e a última na faixa de 250 a 300 kDa foram encontradas, em todas as regiões, e possivelmente sejam os pequenos proteoglicanos fibromodulim, decorim e biglicam, respectivamente.

**Figura 06.** Cromatografia em DEAE-Sephacel (A, C, E) e eletroforese em SDS-PAGE (B, D, F) de PL, PIM e DC. Proteínas foram eluídas após aplicação de um gradiente de NaCl (0,1-1M). **G-** início do gradiente. Observar as proteínas com 121, 61, 47, 36, 21 e 17. Bandas polidispersas com 67 kDa, 80-100 kDa e 250-300 kDa podem ser vistas (cabeça de seta).



### **Gel de Agarose-Propileno diamino**

A análise de GAGs em gel de agarose propileno diamino após digestão do tecido com papaína revelou somente a presença de CS em todas as três regiões (fig. 7 A). Amostras das frações, eluídas de DEAE-Sephacel, ricas no componente polidisperso de 80-100 kDa, que exibe um comportamento em gel semelhante ao decorim, foram submetidas à  $\beta$ -eliminação e analisadas por eletroforese em gel de agarose propileno diamino. Em todas as amostras somente CS foi encontrado (fig. 7 B). Essas mesmas frações  $\beta$ -eliminadas foram submetidas a tratamento com Chase ABC/AC, resultando na digestão completa do GAG, comprovando tratar-se de CS (fig. 7 C).



**Figura 07.** Gel de agarose-propileno diamino de GAGs. **A:** GAGs liberados do tecido após tratamento com papaína. 1, 2 e 3 correspondem às regiões DC, PL e PIM. Apenas CS foi encontrado. À esquerda estão os padrões de GAGs. A seta indica a direção da corrida. **B:** GAG obtido após  $\beta$ -eliminação de amostra da fração rica no componente de 80-100 kDa. Uma banda mais próxima de CS pode ser vista. **C:** Resultado do tratamento do GAG com Chase ABC e AC, mostrando que o GAG foi completamente digerido pelas duas enzimas.

## Discussão

A cartilagem articular de avestruz das regiões PL, PIM e DC do tarsometatarso quando observadas macroscopicamente mostraram-se como peças brancas, cristalinas e lisas, o que caracteriza uma cartilagem adulta normal e saudável (JUNQUEIRA and CARNEIRO, 1999). Em patologias, como a osteoartrite por exemplo, e dependendo do tempo da doença, o tecido perde essa aparência tornando-se escuro (coloração amarelada), áspero e fibrilado (RATCLIFFE and MOW, 1996).

No presente trabalho, somente observamos a organização estrutural da zona superficial da cartilagem articular das regiões já citadas. A cartilagem articular pode ser dividida em quatro zonas (superficial, central, profunda e de calcificação). É na zona superficial que mudanças na composição bioquímica são mais pronunciadas, refletindo uma provável fragilidade estrutural frente a carga imposta nos ciclos compressivos (OLOYEDE and BROOM, 1996), isso porque, essa zona apresenta fibrilas colágenas finas e uma razão colágeno/Pg menor, se comparada às demais regiões (RATCLIFFE and MOW, 1996). Essas diferenças bioquímicas podem facilitar o desgaste mecânico e iniciar um processo degradativo na cartilagem articular (OLOYEDE and BROOM, 1996).

Colágenos e PGs são os componentes estruturais da cartilagem hialina que suportam a tensão e compressão que resultam das cargas aplicadas à cartilagem articular (VANWANSEELE *et al.*, 2002). Especialmente nessa estrutura cartilaginosa observa-se a disposição dos componentes fibrilares em feixes

direcionados (KAAB *et al.*, 1998), e como já dito, essa organização é importante para a função de dissipação das forças compressivas e de cisalhamento exercidas na cartilagem (BOWKER *et al.*, 1998). Esse aspecto organizado das fibras é melhor percebido quando se analisa em microscopia de polarização, devido às propriedades birrefringentes dos feixes de colágeno, trazendo informações micromorfológicas desses feixes. A birrefringência é detectada nos preparados e causada pela birrefringência intrínseca e de forma. A primeira corresponde às médias de todas as transições de elétrons nas ligações peptídicas, estabelecendo informações sobre a direção de vibração e ressonância dos elétrons da região das ligações peptídicas da molécula de colágeno ao longo da fibra. A birrefringência de forma depende da geometria das moléculas, das concentrações dos componentes dos feixes de colágeno e das diferenças entre seus índices de refração (VIDAL, 1987).

A análise dos cortes das regiões PL, PIM e DC, em microscopia de polarização, mostrou que as fibras colágenas exibem imagens de birrefringência devido ao grau de compactação e arranjo altamente ordenado dessas fibras. Na região PIM especialmente, um aspecto ondulado foi observado, que equivale ao "crimp", estrutura morfofuncional já descrita em tendões (GATHERCOLE and KELLER, 1991; VIDAL, 1995; FEITOSA *et al.*, 2002). Tem sido descrito que o "crimp" reflete uma orientação em zig-zag das fibras de colágeno no plano do corte histológico (GATHERCOLE and KELLER, 1991). A microscopia de polarização é geralmente recomendada por ser o método mais apropriado para detectar,

descrever e interpretar essas ondulações (VIDAL, 2003). Porém, outras metodologias também podem ser empregadas para tal investigação. A predominância dessa superestrutura helical, especialmente vista na região PIM, possivelmente ocorra devido à direção antero-posterior do movimento do tibiotarso sobre o tarsometatarso. Apesar do estado altamente hidratado em que certas cartilagens se encontram, o deslizamento de uma superfície sobre a outra, requer a presença de feixes de colágeno arranjados paralelamente à direção do movimento do animal.

Além disso, associado a esse arranjo primário, observamos em todas as regiões da cartilagem articular de avestruz, uma segunda população de fibras dispostas obliquamente ao eixo ântero-posterior. Distribuição semelhante foi encontrado em cães por SPEER and DAHNERS (1979), que através de microscopia de polarização e microscopia eletrônica de varredura, mostraram que há uma população secundária de fibras, oblíquas ao arranjo principal, na zona superficial e também nas demais zonas da cartilagem articular, estabelecendo uma continuidade estrutural entre as zonas. VIDAL and VILARTA (1988), pela aplicação da técnica de compensação da birrefringência de fibras na MEC da cartilagem articular, demonstraram em ratos, fibras paralelas à superfície na camada superficial e uma segunda população fibrilar perpendicular à primeira, estando nossos dados de acordo com esses autores. Estudos ultra-estruturais de variadas associações interfibrilares na cartilagem mostraram inter-relações entre um arranjo fibrilar secundário, de orientação oblíqua e uma rede de fibras

organizadas em arranjo paralelo ou radial, criando uma rede tridimensional dentro da qual um gel hidratado estaria comprimido, proporcionando um sistema mecânico de absorção da compressão (BROOM and MARRA 1986). Nossos resultados também sugerem que há interações entre as duas populações de fibras, formando uma malha que garanta a distribuição adequada de forças, compatíveis à viscoelasticidade da estrutura, garantindo dessa forma a característica de mola biomecânica da cartilagem articular.

Os PGs, presentes na matriz de cartilagem articular, foram evidenciados pela metacromasia quando corados com AT. Este corante é catiônico, com estrutura molecular planar, e liga-se a substratos aniônicos (VIDAL, 1980). Em pH 4,0, o AT liga-se preferencialmente aos grupamentos fosfatos dos ácidos nucleicos e aos radicais carboxila e sulfato das cadeias de GAGs na MEC, sendo que tais cadeias estão dispostas helicilmente ao longo do eixo principal das fibrilas de colágeno (VIDAL and VILARTA, 1988; MELLO and VIDAL, 2003). As fibras de colágeno aparentemente coradas pelo AT, indicam que as cadeias glicânicas dos PGs estão arranjadas paralelamente às fibrilas de colágeno de modo a otimizar as interações eletrostáticas entre as cargas positivas do colágeno e negativas dos GAGs (VIDAL, 1964; MELLO and VIDAL, 1973). A forte metacromasia devido ao empilhamento das moléculas do AT, mais concentradas na região DC e em certas porções das regiões PL e PIM, indica que nestas áreas existe uma maior concentração de PGs, possivelmente como consequência da presença mais intensa de forças compressivas. Nas regiões PL e PIM, observamos diferenças

regionais na ocorrência de metacromasia que resulta da presença mais significativa de PGs nestas áreas, provavelmente devido a ação de forças compressivas que ocorrem de maneira não uniforme nessas regiões. Também nessas duas regiões foram notadas porções mais fibrilares, como demonstrado pelas imagens de birrefringência. Essa concentração de componentes fibrilares em determinadas regiões da cartilagem possivelmente está relacionada a uma maior necessidade de reforço biomecânico nessas regiões. De acordo com os achados de HUKINS and ASPDEN (1985), os elementos fibrilares têm a função mecânica de reforçar um tecido se estiverem alinhados ao longo das trajetórias das forças de tração, portanto, a variação na organização estrutural observada principalmente em PL e PIM, pode refletir uma provável heterogeneidade de distribuição de forças mecânicas incidentes sobre os componentes da MEC nesta cartilagem.

Ainda em cortes da região PIM foi possível notar que o AT cora mais intensamente a matriz territorial, o que pode ser compatível com uma maior quantidade de GAGs próximas aos condrócitos. A matriz associada ao condrócito faz parte do complexo chamado condron. Estudos imunohistoquímicos confirmaram a presença de agregam e uma grande concentração de PGs sulfatados nessa matriz (POOLE, 1997). A presença de grandes concentrações de AH e proteínas de ligação (RATCLIFFE and MOW, 1996) sugere um confinamento pericelular inicial dessas moléculas podendo ser importante para a montagem dos complexos AH/agregam/proteína de ligação (POOLE, 1997). Dentre os pequenos

PGs, o decorim e o biglicam têm sido detectados pericelularmente e podem estar desempenhando funções regulatórias, especialmente as associadas à fibrillogênese do colágeno (MIOSGE *et al.*, 1994). A presença desses componentes com muitos grupos aniônicos certamente contribuem para a coloração e a metacromasia evidentes da matriz territorial.

Para extrair e analisar os componentes da MEC utilizamos o método mais amplamente empregado que se utiliza do agente caotrópico GuHCl 4M, visto que a extração em PBS não tem a mesma eficiência, embora a análise do extrato em PBS possa revelar quais componentes estão fracamente ligados na MEC, como já demonstrou VIEIRA and PIMENTEL (2003). A análise das dosagens dos extratos totais das três regiões revelou diferenças nas quantidades de hidroxiprolina, proteínas e GAGs sulfatados. A região distal, que recebe mais intensidade de forças compressivas do que a cartilagem da extremidade proximal, apresentou maiores quantidades de proteínas e GAGs sulfatados corroborando a hipótese de que regiões sujeitas a grandes forças compressivas apresentam uma maior quantidade de PGs (RATCLIFFE and MOW, 1996). Entre as regiões PL e PIM, que fazem parte da mesma região proximal, não foram encontradas diferenças significativas entre as dosagens de proteínas, GAGs e hidroxiprolina, provavelmente porque há um menisco localizado sobre a região PL. Os meniscos são capazes de reduzir significativamente a pressão na superfície onde se encontram, pois possibilitam que essa pressão incidente seja distribuída por toda a superfície articular (AHMED and BURKE, 1983).

As diferenças quantitativas e até mesmo com relação aos tipos de GAGs encontrados nos tecidos se devem à influência de diferentes fatores. Em cartilagem articular bovina foi observado que os PGs da superfície (até 200  $\mu$ m de profundidade) diferem daqueles de camadas mais profundas (FRANZEN *et al.*, 1981). Em cães, a cartilagem tibial apresenta uma maior concentração de PGs do que os côndilos do fêmur (KIVIRANTA *et al.*, 1987). Esses dados estão relacionados aos aspectos mecânicos, anatômicos e fisiológicos particulares de cada articulação. Assim fica evidente que variações podem ocorrer na constituição bioquímica deste tecido, nas diferentes regiões.

Com relação às proteínas não colagênicas e aos pequenos PGs, eluídos da coluna de DEAE-Sephacel, nenhuma diferença foi observada a despeito da provável maior intensidade de carga compressiva na cartilagem distal do que na proximal. Se esses componentes fazem parte da população de proteínas estruturais ou de proteínas com papel regulador do metabolismo da MEC desta cartilagem, ainda não está esclarecido. A maior quantidade de GAG sulfatado encontrado na cartilagem distal, provavelmente se deve aos PGs de alto peso molecular.

Os componentes detectados, em SDS-PAGE, nas frações de DEAE-Sephacel, antes da aplicação do gradiente, podem corresponder às proteínas catiônicas inclusive colágeno tipo II, mais abundante em cartilagem articular, embora outros colágenos também possam estar presentes, mas em quantidades

muito pequenas como os do tipo I, V, VI, IX e XI (VAN DER REST and GARONE, 1991; REICHENBERGER and OLSEN, 1996; EYRE, 2002).

O componente polidisperso com 67 kDa pode corresponder ao pequeno PG fibromodulim, que foi descrito com Mr de 59 kDa (HEINEGÅRD and OLDBERG, 1989). O fibromodulim é um componente muito frequente nas cartilagens, atuando em papel complementar ao decorim como um elemento de modulação da fibrilogênese do colágeno (HEDBOM and HEINEGÅRD, 1993). É possível que este componente de 67 kDa tenha as cadeias de QS mais longas do que o fibromodulim estudado de outras cartilagens.

O componente de 80-100 kDa apresenta um comportamento eletroforético muito semelhante ao pequeno PG decorim encontrado em vários tecidos (COSTER and FRANSSON, 1981; SCOTT *et al.*, 1981; KUC and SCOTT, 1997). Embora é sabido que decorim de tecidos moles possui DS e não CS, característico de decorim de osso (BIANCO *et al.*, 1990), é provável que o decorim de cartilagem articular de avestruz apresente CS, pois não foi encontrado nem mesmo traço de DS na análise dos GAGs obtidos após digestão do tecido com papaína. A  $\beta$ -eliminação das frações das 3 regiões ricas no componente polidisperso de 80-100 kDa, apresentou GAGs sulfatados migrando na posição do padrão CS. A comprovação de que era realmente CS, foi com o resultado do tratamento do componente polidisperso com a condroitinase ABC/AC, que mostrou ausência de GAG em gel de agarose propileno diamino. A presença de CS como o GAG principal em cartilagem é esperada, pois nas cartilagens

articulares já estudadas o CS pode chegar a 10% do peso seco dos tecidos (KNUDSON and KNUDSON, 2001), e apesar da pouca quantidade de DS em relação a CS, se existisse nessa cartilagem, aquele GAG teria sido detectado. Ainda que não se tenha certeza que o componente polidisperso descrito acima seja o decorim, a presença deste pequeno PG é certa em cartilagem articular, onde ele acha-se associado às fibrilas colágenas providenciando um mecanismo de manutenção da organização das fibrilas (HOCKING *et al.*, 1998; KNUDSON and KNUDSON, 2001).

Um outro componente polidisperso, com massa molecular aparente em torno de 250-300 kDa, mas com uma presença menos marcante que os já referidos, também foi detectado e pode tratar-se do pequeno PG biglicam. Apesar da potencial interação com outros componentes da matriz de cartilagem articular ter sido menos claramente definida pelo biglicam (BIANCO *et al.*, 1990), principalmente porque ele não se encontra associado às fibrilas colágenas, sua presença já foi verificada em cartilagem articular de bovinos (HEINEGÅRD and OLDEBERG, 1989) e humanos (ROUGHLEY and WHITE, 1989). Estudos realizados com cartilagem bovina mostraram que esse PG é aparentemente mais abundante em tecidos que suportam grandes cargas compressivas (HEINEGÅRD and OLDEBERG, 1989). Nossos resultados, contudo, não confirmaram esta observação, considerando a discreta presença deste PG na cartilagem articular dessa ave de aproximadamente 150 kg.

Nosso trabalho mostrou que a intensidade de forças compressivas não resultou em alterações na composição de proteínas não colagênicas e pequenos PGs, mas como era de se esperar, a cartilagem que recebe mais compressão, como é o caso da distal do tarsometatarso, contém uma maior quantidade de GAGs sulfatados, provavelmente devido aos grandes PGs, já que nenhuma diferença foi observada com relação aos pequenos PGs detectados nos géis de frações das cromatografias. Nossos dados além de trazer conhecimento sobre cartilagem articular de uma ave de grande porte, ainda não estudada, poderá auxiliar no estudo da cartilagem articular de avestruz afetada por diferentes desordens degenerativas. O estudo da formação e composição das cartilagens é importante para elucidação dos mecanismos de desenvolvimento esquelético e das doenças relacionadas às articulações (NAKANO and SIM, 1995). A prevenção e o controle dessas desordens na criação de aves depende do avanço no conhecimento da biologia das desordens esqueléticas e dos mecanismos fisiológicos que governam a manutenção da cartilagem normal e crescimento esquelético saudável (THORP, 1994).

## Conclusões

- A cartilagem articular da extremidade distal do tarsometatarso apresenta uma maior quantidade de GAGs e proteínas por g/tecido, do que a cartilagem da extremidade proximal.
- As fibrilas e fibras de colágeno se dispõem em várias direções na cartilagem distal, enquanto na proximal, embora exista feixes de colágeno em várias direções, muitos feixes estão arranjados paralelamente na direção do eixo antero-posterior, que corresponde à direção do movimento principal da articulação desta ave.
- A distribuição de PGs na cartilagem articular do avestruz não é uniforme, mas aparece acumulada em diferentes áreas, provavelmente devido a uma distribuição não uniforme de peso corporal sobre a cartilagem. Em algumas porções os PGs aparecem fortemente associados aos feixes de colágeno.
- Embora existam diferenças organizacionais entre a cartilagem proximal e distal do tarsometatarso, não foram encontradas diferenças significativas na composição bioquímica da MEC destas cartilagens.
- Todas as regiões apresentaram três populações de componentes polidispersos, provavelmente tratando-se dos pequenos PGs fibromodulim, decorim e biglicam.
- A população de PGs com 80-100 kDa, provavelmente decorim, é composta de CS e não DS, como ocorre em outras cartilagens.

## Referências Bibliográficas

- ADAMS, J.C. AND WATT, F.M. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* v.117,p.1183-1198. 1993.
- AHMED, A.M. AND BURKE, D.L. In vitro measurement of static pressure distribution in synovial joints. I-Tibial surface of the knee. *J. Biomech. Eng.* v.105,p.216-225. 1983.
- ANDERSON-MACKENZIE, J.M.; HULMES, D.J. AND THORP, B.H. Effects of body mass and genotype on avian degenerative joint disease pathology and articular cartilage proteoglycan distribution. *Clin. Exp. Rheumatol.* v.16(4),p.403-408. 1998.
- ARCHER, C.W. AND FRANCIS-WEST, P. The chondrocyte. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* v.35,p.401-404. 2003.
- AKIZUKI, S.; MOW, V.C.; MULLER, F.; PITTA, J.C.; HOWELL, D.S. AND MANICOURT, D.H. Tensile properties of knee joint cartilage: I. Influence of ionic conditions, weight bearing, and fibrillation on the tensile modulus. *J. Orthop. Res.* v.4,p.379-392. 1986.
- ANTONSSON, P.; HEINEGÅRD, D. AND OLDBERG, A. Structure and deduced amino acid sequence of the human fibromodulin gene. *Biochim. Biophys. Acta.* v.1174,p.204-206. 1993.
- BATEMAN, J.F. The molecular genetics of inherited cartilage disease. *Osteoarthr Cartilage* v.9A, p.S141-S149. 2001.
- BEELEY, J.G. Glycoprotein and proteoglycan techniques. *Elsevier.* New York. v.16,p.268-270. 1985.
- BEILGUELMAN, B. *Curso prático de bioestatística.* Sociedade Brasileira de Genética, 2ª ed. São Paulo.1991.
- BIANCO, P.; FISHER, L.W.; YOUNG, M.F.; TERMINE, J.D. AND ROBEY, P.G. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* v.38,p.1549-1563. 1990.
- BIRK, D. E.; NURMINSKAYA, M.V. AND ZYCBAND, E.I. Collagen fibrillogenesis in situ: fibrils segments undergo post-depositional modifications resulting in linear and lateral growth during matrix development. *Dev. Dyn.* v.202,p.229-243. 1995.

BLASCHKE, U.K.; HEDBOM, E.; AND BRUCKNER, P. Distinct isoforms of chicken decorin contain either one or two dermatan sulfate chains. *J. Biol. Chem.* v.271(48),p.30347-30353. 1996.

BLUTEAU, G.; CONROZIER, T.; MATHIEU, P.; VIGNON, E.; HERBAGE, D. AND MALLEIN-GERIN, F. Matrix metalloproteinase- 1, -3, -13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis. *Biochim. Biophys. Acta* v.1526,p.147-158. 2001.

BOWKER, R.; WULFEN, K.; SPRINGER, S. AND LINDER, K. Functional anatomy of the cartilage of the distal phalanx and digital cushion in the equine foot and a hemodynamic flow hypothesis of energy dissipation. *Am J. Vet. Res.* v.59,p.961-968. 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein. Dye binding *Anal. Biochem.* v.72,p.248-254. 1976.

BROCKLEHURST, R.; BAYLISS, M.T.; MAROUDAS, A.; COYSHK, H.J.; FREEMAN, M.A.R.; REVEL, P.A. AND ALI, S.Y. The composition of normal and osteoarthritic articular cartilage from human knee joints. *J. Bone and Joint Surg. Am.* v.66A,p.95-106. 1984.

BROOM, N.D. AND MARRA, D.L. Ultrastructural evidence for fibril-to-fibril associations in articular cartilage and their functional implication. *J. Anat.* v.146,p.185-200. 1986.

BUCKWALTER, J.A. AND MOW, V.C. Cartilage repair in osteoarthritis. In *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical Management*, Moskowitz, R.W.; Howell, D.S.; Goldberg, V.M. AND Mankin, H.J. (eds), 2nd edn, 71-107. Philadelphia, Pa: W.B. Saunders Company. 1992.

BUCKWALTER, J.A.; MOW, V.C. AND RATCLIFFE, R. Restoration of injured or degenerated articular cartilage. *J. Am. Acad. Orthrop. Surg.* v.2,p.192-201. 1994.

BURTON-WURSTER, N.; BORDEN, C.; LUST, G. AND MACLEOD, J.N. Expression of the (V+C) fibronectin isoform is tightly linked to the presence of a cartilaginous matrix. *Matrix Biol.* v.17,p.193-2003. 1998.

CALABRO, A.; MIDURA, R.; WANG, A.; WEST, L.; PLAAS, A. AND HASCALL, V.C. Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of glycosaminoglycans. *Osteoarth Cartilage* v.9A,p.S16-S22. 2001.

CHAPMAN, J.A. The regulation of size and form in the assembly of collagen fibrils *in vivo*. *Biopolymers*. v.28,p.1367-1382. 1989.

CLARK, J.M. Variation of collagen fiber alignment in a joint surface: a scanning electron microscope study of the tibial plateau in dog, rabbit and man. *J. Orthop Res*. v.9,p.246-257. 1991.

COSTELL, M.; GUSTAFSSON, E.; ASZODI, A.; MORGELIN, M.; BLOCH, W.; HUNZIKER, E.; ADDICKS, K.; TIMPL, R. AND FASSLER, R. Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J. Cell Biol* v.147,p.1109-1122. 1999.

COSTER, L. AND FRANSSON, L.A. Isolation and characterization of dermatan sulfate proteoglycans from bovine sclera. *Biochem J*. v.193,p.143-153. 1981.

DANIELSON, K.G.; FAZZIO, A.; COHEN, I.; CANNIZZARO, L.A.; EICHSTETTER, I. AND IOZZO, R.V. The human decorin gene: intron-exon organization, discovery of two alternatively spliced exons in the 5' untranslated region, and mapping of the gene to chromosome 12q23. *Genomics*. v.15,p.146-160. 1993.

DIETRICH, C.P. AND DIETRICH, S.M.C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem*. v.70,p.645-647. 1976.

EYRE, D.R. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res*. v.4,p.30-35. 2002.

EYRE, D.R.; APONE, S.; WU, J.J.; ERICSSON, L.H. AND WALSH, K.A. Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage. *FEBS Lett*. v.220, p.337-341. 1987.

FARNDAL, R.W.; BUTTLE, D.J. AND BARRET, A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim. Biophys. Acta*. v.883,p.173-177. 1986.

FASSLER, R.; SCHNEGELSBERG, P.N.; DAUSMAN, J.; SHINYA, T.; MURAGAKI, Y.; MCCARTHY, M.T.; OLSEN, B.R. AND JAENISCH, R. Mice lacking alpha 1(IX) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.91,p.5070-5074. 1994.

FEITOSA, V.L.C.; VIDAL, B.C. AND PIMENTEL, E.R. Optical anisotropy of a pig tendon under compression. *J. Anat*. v.200,p.105-111. 2002.

FISHER, L.W.; HEEGARARD, A.M.; VETTER, U.; VOGEL, W.; JUST, W.; TERMINE, J.D. AND YOUNG, M.F. Human biglycan gene; putative promoter,

intron-exon junctions, and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* v.266,p.14371-14377. 1991.

FONT, B.; EICHENBERGER, D.; ROSENBERG, L.M. AND VAN DER REST, M. Characterization of the interactions of type XII collagen with two small proteoglycans from fetal bovine tendon decorin and fibromodulin. *Matrix Biol.* v.15,p.341-348. 1996.

FOSANG, A. AND HARDINGHAM, T.E. Matrix proteoglycans In *Extracellular Matrix*. Comper, W.D.(ed), v.2 Molecular Components and Interactions,p.200-229, Australia:Harwood Academic Publishers. 1996.

FRANZÉN, A.; INEROT, S.; HYDERUP, S.O. AND HEINEGÅRD, D. Variations in the composition of bovine hip articular cartilage with distance from the articular surface. *Biochem. J.* v.195,p.535-543. 1981.

GATHERCOLE, L. J. AND KELLER, A. Crimp morphology in the fibre forming collagens. *Matrix* v.11,p.214-234. 1991.

GOMES, L. AND PIMENTEL, E.R. Detection of a small proteoglycan present in xiphoid cartilage regions submitted to different biomechanical forces. *Braz J. Med. Biol Res.* v.27,p.2117-2124. 1994.

GREGORY, K.E.; MARDEN, M.E.; ANDERSON-MACKENZIE, J.; BARD-JONATHAN, B.L.; BRUCKNER, P.; FARJANEL, J.; ROBINS-SIMON, P.; AND HULMES-DAVID, J.S. Abnormal collagen assembly, though normal phenotype, in alginate bead cultures of chick embryo chondrocytes. *Exp. Cell Res.* v.246(1),p.98-107. 1999.

GROVER, J. AND ROUGHLEY, P.G. Versican gene expression in human articular cartilage and comparison of mRNA splicing variation. *Biochem. J.* v.291,p.361-367. 1993.

GUILAK, F.; RATCLIFFE, A.; LANE, N.; ROSENWASSER, M.P. AND MOW, V.C. Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. *J. Orthop Res.* v.12,p.474-484. 1994.

HARDINGHAM, T.E. The role of link protein in the structure of cartilage proteoglycan aggregates. *Biochem. J.* v.177,p.237-247. 1979.

HARDINGHAM, T.E. AND FOSANG, A. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* v.6,p.861-870. 1992.

- HEDBOM, E AND HEINEGÅRD, D. Interaction of a 59 kDa connective tissue matrix protein with collagen I and II. *J. Biol. Chem.* v.264,p.6869-6905. 1989.
- HEDBOM, E AND HEINEGÅRD, D. Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *J. Biol. Chem.* v.268,p.27307-27312. 1993.
- HEDBOM, E.; ANTONSSOM,P.; HJERPE, A.; AESCHLIMANN, D.; PAULSSON, M.; ROSA-PIMENTEL, E.; SOMMARIN, Y.; WENDEL, M.; OLDBERG, A. AND HEINEGÅRD, D. Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J. Biol. Chem.* v.267,p.6132-6136. 1992.
- HEINEGÅRD, D. AND OLDBERG, A. Structure and biology of cartilage and bone noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* v.3,p.2042-2051. 1989.
- HEINEGÅRD, D. AND SOMMARIN, Y. Proteoglycans: an overview. *Methods Enzymol.* v.144,p.319-373. 1987.
- HERING-THOMAS, M. Regulation of chondrocyte gene expression. *Front Biosci.* v.15,p.743-761. 1999.
- HOCKING, A.M.; SHINOMURA, T. AND MCQUILLAN, D.J. Leucine-Rich Repeat Glycoproteins of the Extracellular Matrix. *Matrix Biol.* v.17,p.1-19. 1998.
- HUKINS, D.W.L. AND ASPDEN, R.M. Composition and properties of connective tissues. *Trends Biochem. Sci.* v.10,p.260-264. 1985.
- IOZZO, R.V. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit. Rev. in Biochem. and Mol. Biol.* v.32(2),p.141-174. 1997.
- IOZZO, R.V.; COHEN, I.R.; GRASSEL,S. AND MURDOCH, A.D. The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulfate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem. J.* v.302,p.625-639. 1994.
- JOHANSSON, S. 1996. Non-collagenous proteins matrix. In *Extracellular Matrix*. Comper, W.D.(ed), v.2 Molecular Components and Interactions,p.68-77, Australia:Harwood Academic Publishers.1996.
- JUNQUEIRA, L.C. AND CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Ed. Guanabara Koogan, 9<sup>a</sup> ed. 1999.
- KAAB, M.; GWYNN, I. AND NOTZLI, P. Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. *J. Anat.* v.193,p.23-34. 1998.

KIANI, C.; CHEN, L.; WU, Y.J.; YEE, A.J. AND YANG, B.B. Structure and function of aggrecan. *Cell Res.* v.12(1),p.19-32.2002.

KIELTY, C.M.; HOPKINSON, I. AND GRANT, M.E. Collagen. The collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix. *In Connective Tissue and its Heritable Disorders. Molecular, Genetic and Medical Aspects*, Royce, P.M. AND Steinmann, B. (eds.)p.103-147. New York: Wiley-Liss, Inc. 1993.

KIERNAN, J.A. *Histological and Histochemical Methods*, p.166. Oxford: Pergamon Press. 1981.

KIMATA, K.; BARRACH, H-J.; BROWN, K.S. AND PENNYPACKER, J.P. Absence of proteoglycan core protein in cartilage from the cmd/cmd (cartilage matrix deficiency) mouse. *J. Biol. Chem.* v.256,p.6961-6968. 1981.

KIMURA, J.H.; SHIMONURA, T. AND THONAR, E.J-M. Biosynthesis of cartilage proteoglycan and link protein. *Methods Enzymol.* v.144,p.372-393. 1987.

KIVIRANTA, I.; JURVELIN, J.; TAMMI, M.; SAAMANEM, A.M. AND HELMINEN H.I. Weight bearing control glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young beagle dogs. *Arthritis Rheum.* v.30(7),p.801-809. 1987.

KNUDSON, C.B. AND KNUDSON, W. Cartilage proteoglycans. *Sem Cell & Develop Biol.* v.12,p.69-78. 2001.

KUC, I.M. AND SCOTT, P.G. Increased diameters of collagen fibrils precipitated in vitro in the presence of decorin from various connective tissues. *Connective Tissue Res.* v.36,p.287-296. 1997

LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage Ty. *Nature.* v.227,p.680-685. 1970.

LEE, V.; CHEN, L.; PAIWAND, F.; CAO, L.; WU, Y.; INMAN, R.; ADAMS, M.E.; YANG, B.B. Cleavage of the carboxyl tail from the G3 domain of aggrecan but not versican and identification of the amino acids involved in the degradation. *J. Biol. Chem.* v.277,p.22279-22288. 2002.

LINSENMAYER, T. F. Collagen In *Cell biology of extracellular matrix*. Hay, E. D. (ed), p.5-37. New York: Plenum Press. 1985.

LINSENMAYER, T. F. Collagen In *Cell biology of extracellular matrix*. Hay, E. D. (ed), p.7-44. New York: Plenum Press. 1991.

LIPSHITZ, H.; ETHEREDGE, R. AND GLIMCHER, M.J. In vitro wear of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.* v.57A,p.527-534. 1975.

MELLO, M.L.S. AND VIDAL, B.C. Anisotropic properties of toluidine blue-stained collagen. *Ann. Histochem.* v.18,p.103-122. 1973.

MELLO, M.L.S. AND VIDAL, B.C. *Práticas de Biologia Celular.* São Paulo; Edgar Blücher, Campinas, SP; Funcamp. p.71. 1980.

MELLO, M.L.S. AND VIDAL, B.C. Experimental tendon repair: glycosaminoglycan arrangement in newly synthesized collagen fibers. *Cell Molec. Biol.* v.49(4),p.579-585. 2003.

MICHELACCI, Y.M.; HORTON, D.S.P.Q. Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. *Comp. Biochem. Physiol.* v.92B,p. 651-658. 1989.

MIOSGE, N.; FLACHSBART, K.; GOETZ, W.; SCHULTZ, W.; KRESSE, H. AND HERKEN, R. Light and electron microscopical immunohistochemical localization of the small proteoglycan core proteins decorin and biglycan in human knee joint cartilage. *Histochem J.* v.26,p.939-945. 1994.

MOW, V.C.; HOLMES, M.H. AND LAI, W.M. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage. *J. Biomech.* v.17,p.377-394. 1984.

MULLER, F.J.; PITTA, J.C.; MANICOURT, D.H.; MALININ, T.L.; SCHOONBECK, J.M. AND MOW, V.C. Centrifugal characterization of proteoglycans from various depth layers and weight-bearing areas of normal and abnormal human articular cartilage. *J. Orthop Res.* v.7,p.326-334. 1989.

MULLER-GLAUSER, W.; HUMBEL, B.; GLATT, M.; STRAULI, P.; WINTERHALTER, K.H. AND BRUCKNER, P. On the role of type IX collagen in the extracellular matrix of cartilage: type IX collagen is localized to intersections of collagen fibrils. *J. Cell Biol.* v.102(5),p.1931-1939. 1986.

MYERS, E.R.; ZHU, W.B. AND MOW, V.C. Viscoelastic properties of articular cartilage and meniscus. In *Collagen: Chemistry, Biology and Biotechnology*, Nimni, M.E. (ed.), v.II,p.268-288. Boca Raton, Fla: CRC Press. 1988.

NAKANO, T. AND SIM, J.S. A study of the chemical composition of the proximal tibial articular cartilage and growth plate of broiler chickens. *Poult. Sci.* v.74(3),p.538-550. 1995.

NEAME, P.J.; TAPP, H. AND AZIZAN, A. Noncollagenous, nonproteoglycan macromolecules of cartilage. *Cell. Mol. Life Sci.* v.55,p.1327-1340. 1999.

NICOLE, S.; DAVOINE, C.S.; TOPALOGLU, H.; CATTOLICO, L.; BARRAL, D.; BEIGHTON, P.; HAMIDA, C.; HAMMOUDA, H.; CRUAUD, C.; WHITE, P.S.; SAMSON, D.; URTIZBEREA, J.A.; LEHMANN-HORN, F.; WEISSENBACH, J.; HENTATI, F. AND FONTAINE, B. Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia). *Nat Genet.* v.26,p.480-483. 2000.

OLOYEDE, A. AND BROOM, N. The biomechanics of cartilage load-carriage. *Connective Tissue Res.* v.34,p.119-143. 1996.

OLSEN, B.R. Collagen IX. *Int J. Biochem Cell Biol.* v.29,p.555-558. 1997.

PETIT, B.; RONZIÉRE, M.C.; HARTMANN, D.J. AND HERBAGE, D. Ultrastructural organization of type XI collagen in bovine epiphyseal cartilage. *Histochem. J.* v.100,p.231-239. 1993.

PLAAS, A.H.K.; NEAME, P.J.; NIVENS, C.M. AND REISS, L. Identification of the keratan sulphate attachment sites on bovine fibromodulin. *J. Biol. Chem.* v.265,p.20634-20640. 1990.

POOLE, A.R.; WEBBER, C.; PIDOUS, I.; CHOI, H. AND ROSENBERG, L.C. Localization of a dermatan sulfate proteoglycan (DS-PGII) in cartilage and the presence of an immunologically related species in other tissues. *J. Histochem. Cytochem.* v.34,p.619-625. 1986.

POOLE, C. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J. Anat.* v.191,p.1-13. 1997.

RATCLIFFE, A. AND MOW, V.C. Articular cartilage In *Extracellular Matrix*. Comper, W.D.(ed), v.1 Tissue Function,p.234-302, Australia:Harwood Academic Publishers. 1996.

REICHENBERGER, E. AND OLSEN, B.R. Collagen as organizers of extracellular matrix during morphogenesis. *Sem Cell & Develop Biol.* v.7,p.631-638.1996.

ROUGHLEY, P.J. AND WHITE, R.J. Dermatan sulphate proteoglycans of human articular cartilage. *Biochem. J.* v.262,p.823-827. 1989.

ROUGHLEY, P.J. Articular cartilage and changes in arthritis: noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Res.* v.3(6),p.342-347. 2001.

SAMPAIO, L.DE O.; BAYLISS, M.T.; HARDINGHAM, T.E. AND MUIR, H. Dermatan sulfate proteoglycan from human articular cartilage. Variation in its content with age and its structural comparison with a small chondroitin sulfate proteoglycan from pig laryngeal cartilage. *Biochem J.* v.254,p.757-764. 1988.

SANDBERG, M.M.; HIRVONEN, H.E.; ELIMA, K.J.M. AND VUORIO, E.I. Co-expression of collagens II and XI and alternative splicing of exon 2 of collagen II in several developing human tissues. *Biochem J.* v.294,p.595-602. 1993.

SAXNE, T.; GLENNAS, A.; KVIEN, T.K.; MELBY, K. AND HEINEGÅRD, D. Release of cartilage macromolecules into the synovial fluid in patients with acute and prolonged phases of reactive arthritis. *Arthr. Rheum.* v.36,p.20-25. 1993.

SCHIMIDT, M.B.; MOW, V.C.; CHUN, L.E. AND EYRE, D.R. Effects of proteoglycan extraction on the tensile behavior of articular cartilage. *J. Orthop Res.* v.8,p.353-363. 1990.

SCHONHERR, E.; BROZNAT, M.; BRANDAN, E.; BRUCKNER, P. AND KRESSE, H. Decorin core protein fragment leu 155-val 260 interacts with TGF- $\beta$  but does not compete for decorin binding to type I collagen. *Arch. Biochem. Biophys.* v.355,p.241-248. 1998.

SCOTT, J.E. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J.* v.252,p.313-323. 1988.

SCOTT, J.E. Structure and function in extracellular matrices depend on interactions between anionic glycosaminoglycans. *Pathol. Biol.* v.49,p.284-289. 2001.

SCOTT, J.E.; ORFORD, C.R. AND HUGHES, E.W. Proteoglycan-collagen relationships in developing chick and bovine tendons. Influence of the physiological environment. *Connective Tissue Res.* v.14,p.267-378. 1981.

SETTON, L.A.; MOW, V.C.; MULLER, F.J.; PITA, J.C. AND HOWELL, D.S. Mechanical properties of canine articular cartilage are significantly altered following transection of the cruciate ligament. *J. Orthop Res.* v.12,p.451-463. 1994.

SHARIF M.; SAXNE, T.; SHEPSTONE, L.; KIRWAN, J.R.; ELSON, C.J. AND HEINEGÅRD, D. Relationship between serum cartilage oligomeric matrix protein levels and disease progression in osteoarthritis of the knee joint. *Br. J. Rheumatol.* v.34,p.306-310. 1995.

SINI, P.; DENTI, A.; TIRA, M. AND BALDUINI, C. EGCI role of decorin on in vitro fibrillogenesis of type I collagen. *Glycoconj. J.* v.14,p.871-874. 1997.

SOMMARIN, Y.; LARSSON, T. AND HEINEGÅRD, D. Chondrocyte-matrix interaction. Attachment protein isolated from cartilage. *Exp Cell Res.* v.184,p.181-192. 1989.

SPEER, D.P. AND DAHNERS, L. The collagenous architecture of articular cartilage. Correlation of scanning electron microscopy and polarized light microscopy observations. *Clin. Orthop. Relat. Res.* v.139,p.267-275. 1979.

STEGEMAN, H. AND STALDER, K. Determination of hydroxyproline. *Clin. Chim. Acta* v.18,p.267-273. 1967.

SVENSSON, L.; OLDEBERG, A. AND HEINEGARD, D. Collagen binding proteins. *Osteoarthr Cartilage* v.9(A),p.S23-S28. 2001.

SUNDARRAJ, N.; FITE, D.; LEDBETTER, S.; CHAKRAVARTI, S. AND HASSELL, J.R. Perlecan is a component of cartilage matrix and promotes chondrocyte attachment. *J Cell Sci* v.108,p.2663-2672. 1995.

THOMAS, J.T.; AYAD, S. AND GRANT, M.E. Cartilage collagens; strategies for the study of their organization and expression in the extracellular matrix. *Ann Rheu Dis.* v.53,p.488-496. 1994.

THORP, B.H. Skeletal disorders in the fowl: a review. *Avian Pathol.* v.23,p.203-236. 1994.

TORZILLI, P.A. Influence of cartilage conformation on its equilibrium water partition. *J. Orthop Res.* v.3,p.473-483. 1985.

TORZILLI, P.A.; ROSE, D.E. AND DETHMERS, D.A. Equilibrium water partition in articular cartilage. *Biorheology.* v.19,p.519-537. 1982.

VALHMU, W.B.; PALMER, G.D.; RIVERS, P.A.; EBARA, S.; CHENG, J.F.; FISCHER, S. AND RATCLIFFE, A. Structure of the human aggrecan gene:exon-intron organization and association with the protein domains. *Biochem J.* v.309,p.535-542. 1995.

VAN DER REST, M. AND GARONE, R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* v.5,p2814-2823. 1991.

VAN DER REST, M. AND MAYNE, R. Type IX collagen from cartilage is covalently crosslinked to type II collagen. *J. Biol. Chem.* v.263,p.1615-1618. 1988.

VANWANSEELE, B.; LUCCHINETTI, E. AND STÜSSI, E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. *Osteoarthr Cartilage* v.10,p.408-419. 2002.

VIDAL, B.C. The part played by the mucopolysaccharides in the from birefringence of the collagen. *Protoplasma* v.59,p.472- 479. 1964.

VIDAL, B.C. Macromolecular desorientation in detached tendons. *Protoplasma* v.62,p.122-132. 1966.

VIDAL, B.C. The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cell. Molec. Biol.* v.26,p.415-421. 1980.

VIDAL, B.C. Métodos em Biologia Celular. *Vidal & Mello Biologia Celular*. Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, p.17-25. 1987.

VIDAL, B.C. Interações Células - Matriz Extracelular: uma unidade Estrutural e Sistemática. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp* v.1(1),p.33-40. 1989.

VIDAL, B.C. Crimp as part of a helical structure. C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie. *Life Sciences* v.318,p.173-178. 1995.

VIDAL, B.C. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron* v.34,p. 423-432. 2003.

VIDAL, B. C. AND VILARTA, R. Articular cartilage: collagen II-proteoglycan interactions. Availability of reactive groups. Variation in birefringence and differences as compared to collagen I. *Acta Histochem.* v.83,p.189-205. 1988.

VIEIRA, J. B. G., PIMENTEL E. R., Impress. A Biochemical and histochemical analysis of the efficiency of a low ionic strength solution in extracting cartilage extracellular matrix components. *Braz. J. Morphol. Sc.*

WEBER, K. AND OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* v.44,p.4406-4412. 1969.

WOO, S.L-Y.; MOW, V.C. AND LAI, W.M. Biomechanical properties of articular cartilage. In *Handbook of Bioengineering* Skalak, R. and Chien, S (eds.),p.4.1-4.44. New York, NY: McGraw-Hill. 1987.

WU, J-J.; WOODS, P.E. AND EYRE, D.R. Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *J. Biol Chem.* v.267,p.23007-23014. 1992.

ZINGALES, B. Analysis of protein by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Genes and Antigens of Parasites*. Ed. Morel, CM, Fiocruz, Rio de Janeiro. 1984.