

Este exemplar corresponde a retificação final  
da tese defendida pela candidata Kátia  
Denise de Souza Arcanjo e aprovada  
pela comissão julgadora  
25/11/91



Kátia Denise de Souza Arcanjo

**EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS PROTEOGLICANOS E  
PROTEÍNAS NÃO COLAGÊNICAS DE CARTILAGEM  
XIFÓIDE DE FRANGO: INFLUÊNCIA DO SOLVENTE  
UTILIZADO.**

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Co-orientadora: Profa. Dra. Laurecir Gomes

Campinas - 1991

Ar14e

15252/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

69415850

UNEA 3C  
N. CHAMADA An 14 e  
EX  
COMBO B 152.52  
PROC. 308/91  
C ☐ D ☒  
PRECO Gr \$ 8.000,00  
DATA 19/12/91  
N CPD

CH-00018636-6

Dedico este trabalho :

Aos meus pais Theresa e José;

Ao meu marido Filipe;

Ao meu filho Jaime.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Édson Rosa Pimentel, pela orientação deste trabalho bem como pela amizade e carinho que me dedicou ao longo deste período.

À Prof. Dra. Laurecir Gomes, pela co-orientação deste trabalho, pela amizade e por estar sempre presente e disposta a ajudar.

Aos meus pais, pela lição de luta e união que trago comigo sempre.

Ao Filipe, pelo que representa para mim, um exemplo de incentivo, compreensão e muito carinho.

~~À Prof. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, pelas~~  
correções do manuscrito do resumo em inglês.

Aos membros da banca prévia, Prof. Dr. Sérgio Marangoni, Prof. Dr. Ângelo Luiz Cortelazzo e Prof. Dra. Olga Maria de Corrêa Toledo, pelas sugestões e críticas.

Aos Prof. Dr. Pedro Domingues Lanzieri, Prof. Fernando de Lima Abrantes e Prof. Rosa Maria Marcos Mendes, do Departamento de Histologia da Universidade Gama Filho, pelos ensinamentos, carinho e incentivo.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular que contribuíram de alguma forma para a elaboração deste trabalho.

Aos Laboratórios de Fisiologia Vegetal, Bioquímica e Imunologia, pelo empréstimo de material e equipamentos.

Ao Nazário de S. M. Júnior, pela amizade e confecção do esquema de proteoglicanos.

Ao Fernando Antônio Alcântara Cardoso pelo empréstimo do micro onde parte deste trabalho foi confeccionado.

Aos colegas do Curso de Mestrado, pelo dia-a-dia.

À Sílvia Regina Pérgamo de Miranda, pela confecção deste trabalho e pela amizade.

À Capes, pela concessão da Bolsa de estudos durante a realização deste trabalho.

## ABREVIATURAS

|       |                                  |
|-------|----------------------------------|
| A.H   | ácido hialurônico                |
| A.T.  | Azul de Toluidina                |
| AU    | ácido urônico                    |
| bis   | N,N'-metileno-bis-acrilamida     |
| BSA   | soro albumina bovino             |
| Chase | condroitinase                    |
| CMP   | proteína de matriz de cartilagem |
| Col   | colágeno                         |
| CS    | condroitim-sulfato               |
| DS    | dermatam-sulfato                 |
| EDTA  | ácido etilenodiaminotetracético  |
| GAG   | glicosaminoglicano               |
| GuCl  | cloreto de guanidina             |
| HS    | heparam-sulfato                  |
| KDa   | kilodalton                       |
| mA    | miliampère                       |
| 2-Me  | 2-mercaptoetanol                 |
| P     | precipitado                      |
| PAM   | persulfato de amônio             |
| PG    | proteoglicano                    |
| PL    | proteína de ligação              |
| PM    | peso molecular                   |
| p/p   | peso por peso                    |

|          |                                                  |
|----------|--------------------------------------------------|
| PMSF     | fluoreto de fenilmetilsulfonil                   |
| QS       | queratam sulfato                                 |
| SDS      | dodecil sulfato de sódio                         |
| SDS-PAGE | eletroforese em gel de poliacrilamida<br>com SDS |
| SN       | sobrenadante                                     |
| TEMED    | N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina               |

## ÍNDICE

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Introdução.....                                                                              | 1  |
| Material e Métodos.....                                                                      | 17 |
| 1.Reagentes.....                                                                             | 17 |
| 2.Obtenção da cartilagem.....                                                                | 19 |
| 3.Extração de proteoglicanos.....                                                            | 19 |
| 4.Dosagem de proteína.....                                                                   | 22 |
| 5.Dosagem de ácido urônico.....                                                              | 22 |
| 6.Digestão enzimática.....                                                                   | 22 |
| 6.1 Papaína.....                                                                             | 22 |
| 6.2 Condroitinase.....                                                                       | 23 |
| 7.Eletroforese.....                                                                          | 24 |
| 7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida<br>com SDS (SDS-PAGE).....                         | 24 |
| 7.2 Eletroforese em gel de agarose-poliacrilamida.....                                       | 25 |
| 8.Cromatografia de troca iônica.....                                                         | 26 |
| Resultados.....                                                                              | 27 |
| 1.Extração de proteoglicanos.....                                                            | 27 |
| 1.1 Extração utilizando $MgCl_2$ e $GuCl$ em<br>diferentes concentrações (1M a 5M).....      | 27 |
| 1.2 Extração utilizando $MgCl_2$ e $GuCl$ em<br>diferentes tempos (12h, 24h, 48h e 72h)..... | 30 |
| 2.Análise dos extratos em SDS-PAGE.....                                                      | 33 |



|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1 Extratos obtidos a partir de $MgCl_2$ e $GdCl$<br>em diferentes concentrações (1M a 5M).....      | 33 |
| 2.2 Extratos obtidos a partir de $MgCl_2$ e $GdCl$<br>em diferentes tempos (12h, 24h, 48h e 72h)..... | 33 |
| 2.3 Extratos obtidos a partir de $MgCl_2$ e $GdCl$<br>3M/48h com e sem 2-Me.....                      | 34 |
| 3. Análise dos extratos em agarose-poliacrilamida.....                                                | 41 |
| 3.1 Extratos obtidos a partir de $MgCl_2$ e $GdCl$<br>em diferentes concentrações (1M A 5M).....      | 41 |
| 3.2 Extratos obtidos a partir de $MgCl_2$ e $GdCl$<br>em diferentes tempos (12h, 24h, 48h e 72h)..... | 41 |
| 4. Digestão enzimática.....                                                                           | 46 |
| 4.1 Papaína.....                                                                                      | 46 |
| 5. Fracionamento de proteoglicanos utilizando<br>cromatografia de troca iônica.....                   | 50 |
| 6. Análise do material eluído.....                                                                    | 51 |
| 6.1 SDS-PAGE.....                                                                                     | 51 |
| 6.2 Agarose-poliacrilamida.....                                                                       | 56 |

|                                         |           |
|-----------------------------------------|-----------|
| <b>Discussão</b> .....                  | <b>59</b> |
| <b>Conclusões</b> .....                 | <b>69</b> |
| <b>Resumo</b> .....                     | <b>70</b> |
| <b>Summary</b> .....                    | <b>72</b> |
| <b>Referências Bibliográficas</b> ..... | <b>74</b> |

## INTRODUÇÃO

O tecido cartilaginoso desempenha a função de suporte e revestimento das superfícies articulares, facilitando desta forma os movimentos. A ausência de irrigação sanguínea própria bem como o abundante material intercelular, que constitui a matriz, fazem com que as propriedades coloidais da matriz cartilaginosa sejam importantes para a nutrição de suas células. Tais propriedades são também responsáveis em grande parte, por sua firmeza e elasticidade (BLOOM & FAWCETT, 1975).

Com relação a quantidade da porção coloidal na matriz, abundância e tipos de fibras presentes, a cartilagem pode ser classificada em: elástica (ouvido externo, epiglote), fibrosa (extremidades das costelas, menisco e disco intervetebral) e hialina (anéis traqueais, nariz e superfície das articulações ósseas) (HAM, 1977).

Além da presença de glicoproteínas não colagênicas como a fibronectina (PROCTOR, 1987) e condronectina (HEWITT et al, 1982), os principais componentes da matriz cartilaginosa são o colágeno do tipo II e os proteoglicanos (PG). Os colágenos do tipo IX, X e XI também estão presentes nesta matriz, embora em menor quantidade. Estudos recentes da estrutura do colágeno tipo IX revelaram que é uma molécula que não forma fibras e que contém uma cadeia lateral de glicosaminoglicano (GAG) sendo portanto

considerado um PG (van der REST & MAYNE, 1988). As moléculas de PG apresentam domínios com alta densidade de carga aniônica o que confere uma capacidade pronunciada em absorver grandes quantidades de água criando uma turgescência bastante alta no tecido (HEINEGÅRD & OLDBERG, 1989). A elevada densidade de cargas aniônicas presentes nos GAGs bem como as próprias ligações entre os açúcares fazem com que estas cadeias permaneçam estendidas lateralmente a partir do esqueleto protéico (HASCALL & SAJDERA, 1970; PASTERNAK et al., 1974; HASCALL, 1977). A turgescência do tecido é controlada pelas fibras colagênicas que ao formarem uma rede no tecido, previnem a sua expansão bem como contribuem para a distribuição de forças de tensão. Deste modo, as propriedades funcionais do tecido dependem dessas fibras e da sua organização na matriz (HEINEGÅRD & OLDBERG, 1989). Este processo é provavelmente regulado por outros constituintes como as proteínas não colagênicas da matriz (SAKLATVALA, 1982; HEINEGÅRD & OLDBERG, 1989). Os PGs de baixo peso molecular como fibromodulim (FM), decorim, biglicam e a glicoproteína ancorim têm sido identificadas e isoladas de cartilagem como importantes constituintes da matriz, embora o conhecimento de suas propriedades funcionais ainda seja bastante limitado. FM também conhecida como proteína de 59 KDa que corresponde de 0,1 a 0,3% do peso seco da cartilagem (OLDBERG et al., 1989, HEDBOM & HEINEGÅRD, 1989) e decorim que representa de 1 a 2% desse

peso, (HEINEGÅRD & OLDBERG, 1989) parecem estar envolvidas no processo de fibrilogênese das moléculas de colágeno. Já foi detectado, *in vitro*, a interação de FM com moléculas de colágeno (HEDBOM & HEINEGÅRD, 1989). Esses pequenos PGs contém cadeias laterais de GAGs, sendo que no caso da FM existem quatro cadeias de queratam-sulfato (QS), enquanto que a decorim possui apenas uma cadeia de condroitim-sulfato (CS) ou dermatam-sulfato (DS). Um outro pequeno PG com característica semelhante à decorim é o biglicam que possui duas cadeias de CS ou DS (CHOI et al., 1989). A proteína de 148 KDa, bastante abundante em cartilagem traqueal, consiste de três subunidades de 54 KDa unidas por pontes dissulfeto (HEINEGÅRD & PAULSSON, 1987) com indícios de presença de carboidratos. As suas propriedades funcionais na matriz cartilaginosa, ainda não foram estabelecidas. A proteína de 36 KDa, encontrada na matriz extracelular de cartilagem e osso, apresenta um alto conteúdo de ácido aspártico e leucina, totalizando 25% da molécula (HEINEGÅRD & OLDBERG, 1989). Uma característica desta proteína é sua capacidade de se ligar à superfície de condrócitos (SOMMARIN et al., 1989). Uma outra proteína, a ancorina, com 34 KDa, parece ligar as fibras de colágeno do tipo II, com a superfície dos condrócitos aonde é encontrada (FERNANDEZ et al., 1988; HEINEGÅRD & OLDBERG, 1989). Embora seja encontrada na superfície de condrócitos, há evidências de que seja sintetizada pelos fibroblastos (PFAFFLE et al., 1988).

Os proteoglicanos estão presentes em quantidades variadas em todos os tecidos conjuntivos (HEINEGÅRD & PAULSSON, 1984). São principalmente extracelulares embora estejam presentes em diversas membranas celulares como a dos hepatócitos (OLDBERG et al, 1979; KJELLÉN et al, 1981), melanoma humano (BUMOL & REISFELD, 1982; ROSS et al, 1983), células granulosas de ovário (YANAGISHITA & HASCALL, 1984), células epiteliais mamárias (RAPRAEGER et al, 1985; DAVID & van der BERGHE, 1985) e fibroblastos de pele (CÖSTER et al, 1983). Essas moléculas formam um complexo macromolecular contendo um esqueleto protéico central ao qual estão covalentemente ligadas cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs), formando unidades de alta carga aniônica (HASCALL & SAJDERA, 1969; ROBINSON & HOPWOOD, 1973). Os GAGs são polímeros lineares constituídos por unidades dissacarídicas repetitivas compostas por um resíduo de hexosamina e um açúcar não nitrogenado (HASCALL & KIMURA, 1982). As principais classes de GAGs são: os condroitim-sulfato (CS) (condroitim 4-sulfato, condroitim 6-sulfato e dermatam-sulfato), os queratam-sulfato (QS), os heparam-sulfato (HS), heparina e o ácido hialurônico único glicosaminoglicano que não contém grupos ésteres sulfatados.

Na cartilagem hialina, as cadeias dos glicosaminoglicanos são principalmente representadas pelos condroitim 4- e 6-sulfato e QS. O CS dos PGs, nesta cartilagem, pode alcançar a proporção de quase 100 cadeias

por monômero, tendo cada cadeia em torno de 20 KDa. Esses glicosaminoglicanos se concentram ao longo de 60% da cadeia polipeptídica, em uma região do esqueleto central, denominada "região rica em condroitim-sulfato" (HEINEGÅRD & AXELSSON, 1977). QS e oligossacarídeos O-ligados se localizam em outra região do esqueleto protéico, com 30 KDa, chamada de "região rica em queratam-sulfato" (HEINEGÅRD & AXELSSON, 1977; de LUCCA et al., 1980; HASCALL, 1981). O esqueleto protéico central representa de 5 a 15% do total da macromolécula podendo variar de 200 a 300 KDa (HASCALL & RIOLO, 1972; HASCALL & HEINEGÅRD, 1974a), sendo o restante constituído pelas cadeias laterais de GAGs e oligossacarídeos N- e O- ligados. Os monômeros intactos de PGs apresentam peso molecular em torno de  $2,5 \times 10^6$  (HASCALL & SAJDERA, 1970).

Heinegård e colaboradores (1985b) descreveram quatro diferentes populações de PGs isolados de septo nasal bovino, sendo três delas de alto PM e uma de baixo PM. Duas dessas populações, de alto peso molecular ( $3,5 \times 10^6$  e  $1,3 \times 10^6$ ), constituem os PGs agregantes que demonstraram diferenças com relação ao tamanho do esqueleto protéico central e quantidade de cadeias laterais de glicosaminoglicanos. Destas, a de menor peso ( $1,3 \times 10^6$ ) contém menos cadeias de CS, enquanto que o conteúdo de QS é relativamente alto. A terceira população, de alto PM, que varia de 10 a 40% do total de PGs não é capaz de formar

6

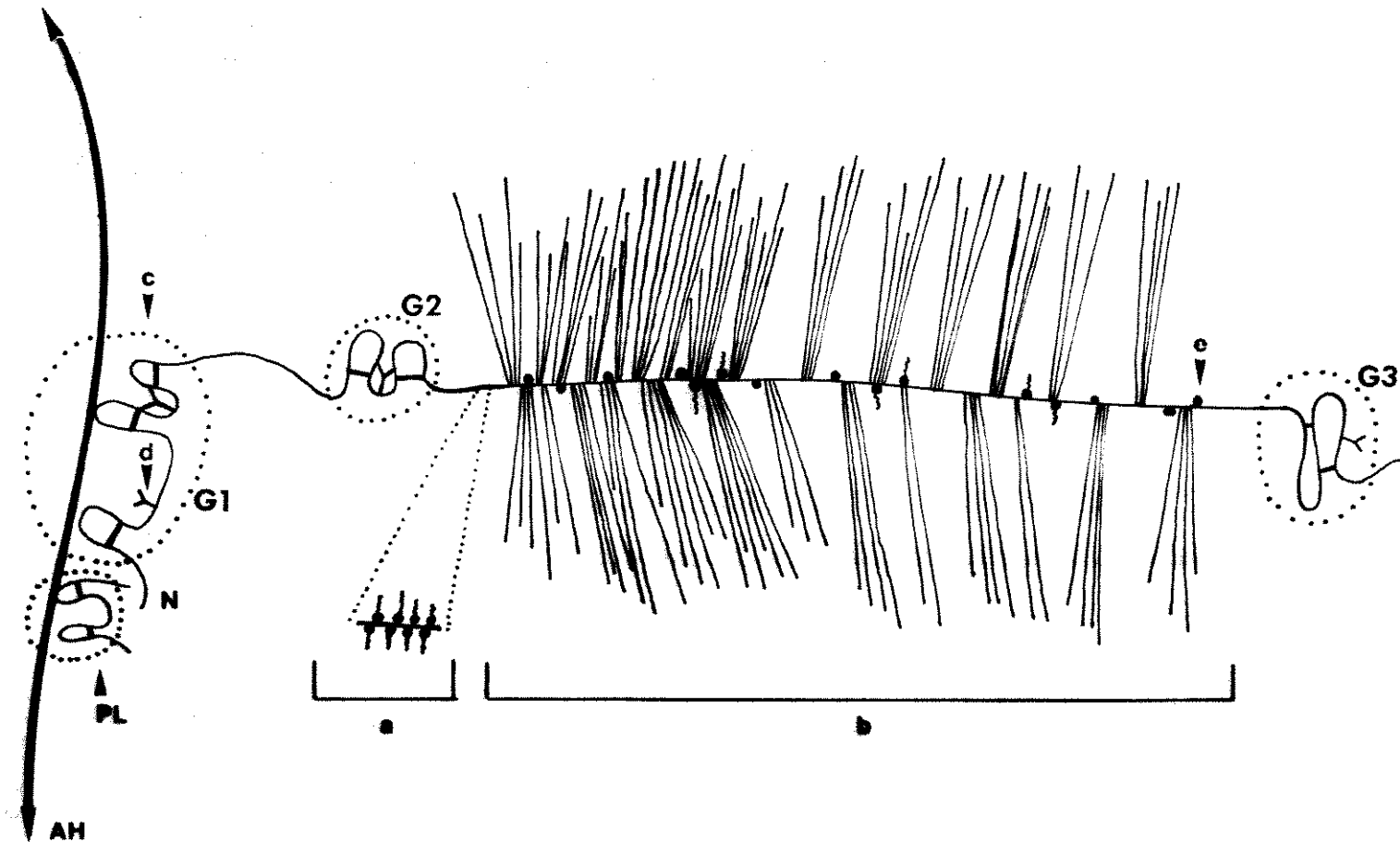
agregados. Esses PGs também isolados de septo nasal bovino representam uma família distinta com algumas similaridades estruturais com os agregantes de alto peso (HEINEGÅRD & HASCALL, 1979), os quais são encontrados em altas concentrações na cartilagem articular e disco intervertebral, estando em baixas concentrações na cartilagem nasal. Os pequenos PGs foram isolados pela primeira vez de cartilagem nasal bovina (HEINEGÅRD et al., 1981) e posteriormente de cartilagem articular (ROSENBERG et al., 1985) e pele bovina (CHOI et al., 1989). Constituem a quarta população representando de 2 a 3 % do total de PG, com menos de 100 KDa (HEINEGÅRD et al., 1981), contendo uma (decorim) ou duas (biglicam) cadeias de CS/DS além de alguns oligossacarídeos (OLDBERG et al., 1990).

Um aspecto marcante nos PGs da matriz extracelular dos tecidos conjuntivos é a sua heterogeneidade. Em um único tipo de tecido pode-se encontrar frequentemente, diferentes populações de PGs. Cada população é polidispersa devido às variações no comprimento, número das cadeias laterais de GAGs e tamanho do esqueleto protéico central (THYBERG et al., 1975; HEINEGÅRD, 1977; HEINEGÅRD & PAULSSON, 1984). O alto grau de organização dessas macromoléculas provém da habilidade de algumas formarem agregados que excedem  $1 \times 10^7$  daltons (HASCALL & SAJDERA, 1969). Essa agregação ocorre através da interação do PG com o ácido hialurônico (AH) (HARDINGHAM & MUIR, 1972; HASCALL & HEINEGÅRD, 1974b;



HEINEGARD & HASCALL, 1974), e sua ocorrência tem sido descrita em diversos tipos de cartilagens (HASCALL & HEINEGÅRD, 1974a; FALTZ et al, 1979; CATERSON & BAKER, 1979). Cada agregado contém aproximadamente 50 monômeros de PG (HEINEGARD & PAULSSON, 1984).

O AH está presente em todos os tecidos conjuntivos. No cordão umbilical, humor vítreo e líquido sinovial é o principal componente (HEINEGÅRD & PAULSSON, 1984). Nas cartilagens, se encontra em baixa concentração correspondendo a 0,7% do total de ácido urônico (HARDINGHAM & MUIR, 1974). A técnica de sombreamento com metais pesados em microscopia eletrônica tem revelado detalhes do esqueleto protéico, mostrando a presença de dois domínios globulares (G1 e G2) na região N-terminal e um domínio globular (G3) na região C-terminal da molécula (Esquema 1) (PAULSSON et al., 1987; WEIDEMANN et al., 1984; HEINEGÅRD & OLDBERG, 1989). O domínio N-terminal contém um sítio de ligação que interage especificamente com o AH para formar os agregados de proteoglicanos (HARDINGHAM & MUIR, 1974; HASCALL & HEINEGÅRD, 1974b; HEINEGÅRD & HASCALL, 1974; HARDINGHAM et al, 1976). Para que ocorra estabilidade do agregado são necessárias três interações distintas; um sítio no PG que se liga ao AH, outro na proteína de ligação (PL) que se liga ao AH e um sítio no PG e outro na PL que interagem entre si (HASCALL, 1988). O sítio do PG que se liga ao AH se localiza no domínio globular N-terminal (G1) com 65 KDa. Esta região



**Esquema 1.** Representação esquemática de proteoglicano de cartilagem. PL - proteína de ligação, AH - ácido hialurônico, a - região rica em QS, b - região rica em CS, c - região de ligação da PG com o AH, d - (N-linked oligosaccharide), e - (O-linked oligosaccharide). G1, G2 e G3 representam os três domínios globulares da molécula (HEINEGÅRD & OLDBERG, 1989).

é denominada de "região de ligação do AH" ( HEINEGÅRD & HASCALL, 1974; PAULSSON et al., 1987). Ambos os sítios de ligação com o AH, tanto da PL quanto do PG, requerem cinco dissacarídeos consecutivos do AH (ác. glicurônico e n-acetilglucosamina) para que seja efetuada a ligação. A PL possui uma região de dupla alça que parece conter o sítio para a ligação com o AH promovendo estabilidade adicional ao agregado (HASCALL & SAJDERA, 1969; PÉRIN et al., 1987; KIMURA et al., 1979; FRANZÉN et al., 1981). Um fragmento, de 22 KDa desta região, é protegido quando digerido pela tripsina na presença de AH (PÉRIN et al., 1987). A porção N-terminal da PL, bem como a porção N-terminal do domínio G1 da PG, contêm sítios que interagem entre si (HEINEGÅRD & HASCALL, 1974; KIMURA et al., 1980; HARDINGHAM et al., 1986). Neame e colaboradores (1985) descreveram uma sequência homóloga de aminoácidos na região de ligação do PG e PL com o AH.

A região globular G3 tem forte homologia com a lectina hepática (KRUSIUS et al., 1987) e outras proteínas de vertebrados que se ligam a carboidratos. Deste modo, tal região pode possuir uma função organizacional que envolva a interação de ligantes de carboidratos com outras moléculas da matriz cartilaginosa. Muitos monômeros de PGs isolados de cartilagens maduras possuem esqueletos protéicos centrais menores sem a região G3 C-terminal (PAULSSON et al., 1987). Isto pode indicar que os monômeros de PGs nos agregados são

gradualmente degradados, provavelmente por quebras proteolíticas na matriz extracelular (HASCALL, 1988).

A função do agregado de alto PM no tecido cartilaginoso é bem conhecida na imobilização dos PGs na rede de colágeno, promovendo uma estrutura mais ordenada dentro da matriz. O tamanho desses agregados, sua concentração bem como a integridade estrutural destas estruturas e a alta carga dos PGs, são responsáveis, em parte, pelas propriedades biomecânicas das cartilagens (HASCALL, 1977; HARDINGHAM et al., 1986).

Um aspecto que precisa ser considerado é o fato de que grande parte das propriedades fisiológicas dos tecidos conjuntivos é resultante do arrançamento e distribuição ordenada dos seus componentes. Já há algum tempo foi demonstrado que moléculas de GAGAs juntamente com as moléculas de colágeno estão molecularmente orientadas em tendões ( VIDAL, 1963; VIDAL, 1964) e região de ossificação de cartilagem ( VIDAL, 1977). Mais tarde estudos baseados em análises de birrefringência indicaram que as moléculas de PG não se encontram distribuídas ao acaso, mas estão associadas às moléculas de colágeno. Em tendões, o esqueleto protéico central dos PGs está inclinado em relação ao maior eixo dos feixes de colágeno, enquanto que as cadeias laterais de GAGs estariam dispostas paralelamente ao referido eixo ( VIDAL, 1980; VIDAL & MELLO, 1984). Posteriormente, indicações semelhantes foram encontradas em cartilagem articular (VIDAL

& VILARTA, 1988) onde também se constatou uma maior concentração dos PGs, dispostos de forma orientada na zona mais profunda da cartilagem articular, onde há necessidade de uma maior distribuição de forças compressivas. A propósito da relação existente entre orientação do PG e força compressiva, cabe mencionar que estudos realizados em tecido ósseo mostraram que moléculas de PG apresentam um acentuado aumento na orientação de suas moléculas quando o tecido era submetido a forças intermitentes de compressão (SKERRY et al., 1990). Embora o mecanismo exato pelo qual a compressão afeta a orientação do PG seja desconhecido, o resultado é relevante sob o aspecto de que reforça a importância da orientação das moléculas do PG no controle da adaptação do tecido diante de forças compressivas.

A participação da matriz extracelular na fisiologia do tecido conjuntivo vem sendo gradativamente conhecida à medida que componentes da matriz vêm sendo isolados e caracterizados. As primeiras tentativas para se isolar estes componentes tiveram início com a simples homogeneização de fragmentos de cartilagem em água ou soluções de baixas concentrações de sais (PAL et al., 1966).

Homogeneização em altas velocidades, referido como um método de extração disruptiva, foi extensivamente usada para solubilizar PG até a introdução dos métodos dissociativos de extração. Extração de PG utilizando solventes de alta força iônica foi introduzida por Sajdera e

Hascall (1969). Agentes caotrópicos facilitam a dissociação dos agregados e dos PGs com outros componentes da matriz, além de agirem como inibidores proteolíticos (HASCALL & SAJDERA, 1969; SAJDERA & HASCALL, 1969). A diminuição da concentração desses sais através de diálise demonstra que ocorre reagregação de 85% dos PGs agregantes (HASCALL & HEINEGARD, 1974a; DEGEMA et al, 1975) o que não ocorre com os PGs que não interagem com AH (HARDINGHAM & MUIR, 1972; HASCALL & HEINEGÅRD, 1974a; HEINEGÅRD & HASCALL, 1979).

Os métodos mais convencionais de extração de PG utilizam cloreto de guanidina (GuCl) 4M (HASCALL & KIMURA, 1982) e GuCl 4M precedido de NaCl 0,1M (DAMLE et al, 1979; MICHELACCI et al., 1981), embora o cloreto de magnésio 3M em cartilagem nasal bovina (SAJDERA & HASCALL, 1969) e GuCl 3M em cartilagem de barbatana de tubarão (MICHELACCI & HORTON, 1989) já tenham sido utilizados, sendo que este último revelou-se muito mais seletivo para extração do PG do que o uso do GuCl 4M. Como se pode notar, as condições ideais de extração do PG parece ter uma correlação direta com a natureza do tecido em estudo. O emprego indiscriminado de GuCl 4M como método de eleição para extração do PG deve ser reexaminado para cada material biológico, especialmente se considerarmos que a estabilidade de diferentes proteínas pode não ser a mesma em condições caotrópicas semelhantes (DAMODARAN, 1989).

Diferentes procedimentos de fracionamento são

utilizados para separação dos PGs de outras macromoléculas do extrato. A purificação dos PGs em condições associativas através de ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio (CsCl), foi inicialmente utilizado por Franek e Dunstone (1966). Procedimento semelhante tem sido largamente empregado em condições dissociativas e associativas (HASCALL & SAJDERA, 1969; HEINEGÅRD, 1972; HEINEGÅRD & SOMMARIN, 1987). Um procedimento alternativo é a utilização de cromatografia de troca iônica na presença de uréia 7M (ANTONOPOULOS et al, 1974) onde a substituição do GuCl pela uréia, mantém as condições dissociativas prevenindo a formação de agregados.

O estudo das cadeias de GAGs tem sido possível após sua remoção através de tratamentos com álcalis (ANDERSON et al, 1965) ou papaína (ANTONOPOULOS et al., 1964; SHULMAN & MEYER, 1970; ANTONOPOULOS et al., 1974; MINNS & STEVEN, 1977), e subsequentes digestões enzimáticas utilizando hialuronidase testicular (MATUKAS et al, 1967; HASCALL & HEINEGÅRD, 1974a; FOLDES et al, 1980), hialuronidase estreptomices (OHYA & KANEKO, 1970), condroitinases e queratanases (OIKE et al, 1980).

O estudo de componentes da matriz extracelular tem sido bastante intenso em cartilagens bovina, como a articular (BJELLE et al., 1974; ROSENBERG et al., 1985; ROSENBERG et al., 1988) e nasal (ROUGHLEY & MASON, 1976; HEINEGÅRD et al., 1981; HEINEGÅRD et al., 1985a; PERIN et

al., 1987) e traquéia de porco (ANTONOPoulos et al., 1974). No entanto, são encontradas poucas informações com relação a componentes de matriz de cartilagens de aves.

Estudos realizados em cartilagem epifiseal de embrião de galinha mostraram que existem três espécies de PGs caracterizadas como PG-H, PG-Lb e PG-Lt (SHINOMURA et al., 1983). Análise estrutural do PG-H revelou se tratar de um PG contendo cadeias laterais de CS e QS além de oligossacarídeos sulfatados e não sulfatados e também possuir um esqueleto protéico com aproximadamente 340 KDa (OIKE et al., 1980). Com relação ao PG-Lb foi verificada a presença de um esqueleto central protéico com 43 KDa contendo de 4 a 9 cadeias de GAGs, sendo que 7% corresponde a DS (SHINOMURA et al., 1983). O PG-Lt contrariamente ao PG-Lb apresenta apenas duas cadeias de GAGs e uma composição de aminoácidos bastante diferente. Uma particularidade neste PG consiste na presença de três cadeias polipeptídicas, uma com 100 KDa e as outras duas com 120 KDa. A primeira contém duas cadeias de DS. Uma outra característica é a sua composição de aminoácidos, que é muito semelhante ao colágeno no que diz respeito à quantidade de glicina e grau de hidroxilação de lisina e prolina. Apesar de todas estas semelhanças, imunoenaios revelaram que PG-Lt é diferente dos colágenos I, II e IV (NORO et al., 1983).

Paralelamente a estas observações feitas em cartilagem epifiseal de embrião de galinha, foram realizados



estudos com proteoglicanos extraídos de cartilagem xifóide de frango. Nesse trabalho, testes imunoquímicos realizados nas frações A1D1 (contém monômeros de PG) e A1D5 (contém PG de baixa densidade e proteína de ligação), mostraram que os PGs de baixa densidade continham alguns dos determinantes antigênicos encontrados em monômeros de PG (McKEDOWN-LONGO et al., 1981).

Shulman e Meyer (1970) demonstraram diferenças na natureza da matriz produzida por condrócitos de cartilagem embrionária em cultura, quando comparada com a cartilagem xifóide adulta e embrionária de galinha. A cartilagem adulta revelou como principal componente o condroitim 4-sulfato, além de algumas cadeias de condroitim 6-sulfato e QS. Além de não apresentar cadeias de QS, a cartilagem embrionária mostrou conter, principalmente, condroitim 4-sulfato. PGs produzidos pela cultura de condrócitos se assemelham àqueles isolados de cartilagem adulta.

Dentro do quadro acima apresentado, onde são mencionados os trabalhos mais significativos em cartilagem de aves, pode ser notada a necessidade de uma maior investigação no estudo dos componentes da matriz extracelular, bem como dos métodos empregados para extração de PGs e também estudar as interações entre estes componentes. O estudo das interações entre macromoléculas da matriz é de grande importância na análise das propriedades mecânicas dos tecidos. A identificação de proteínas não

colagênicas presentes na matriz de cartilagem xifóide de frango abre caminho para investigações neste sentido, pois embora sendo aparentemente semelhantes, as cartilagens hialinas mostram diferenças substanciais no seu padrão de proteínas de matriz (HEINEGÅRD & PIMENTEL, 1991, submetido a publicação)

Sobre as proteínas não colagênicas não há referências de qualquer estudo em cartilagem xifóide de aves.

Desta forma os objetivos do presente trabalho foram:

1. Identificar os proteoglicanos e proteínas não colagênicas de cartilagem xifóide de frango
2. Avaliar o comportamento destas moléculas frente aos diferentes métodos extrativos

Para alcançar os objetivos propostos as metodologias empregadas foram:

1. Extração com  $\text{GuCl}$  e  $\text{MgCl}_2$  em diferentes tempos e concentrações.
2. Eletroforese em gel de poliacrilamida e agarose poliacrilamida dos diferentes extratos.
3. Cromatografia de troca iônica.
4. Digestões enzimáticas utilizando condroitinase e papaína.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Reagentes

- Carlo Erba

tiocianato de potássio

tiosulfato de sódio

- Chimie Test

persulfato de amônio

- Ecibra reagentes analíticos

glicina

uréia

- Merck

agarose

benzamidina

AT

tris (hidroximetil aminometano)

etanol

metanol

ácido sulfúrico

acetona

nitrato de prata

- Reagen - Quinbás Indústrias Químicas S.A.  
acetato de sódio

- Sigma Chemical CO  
acrilamida  
carbazol  
N-N' metileno-bis-acrilamida  
EDTA  
TEMED  
PMSF  
2-Me  
CS  
HS  
SDS  
DEAE-celulose  
papaína  
condroitinase  
padrão de PM

- Vetec  
Azul de Bromofenol

## 2. Obtenção de cartilagem

A cartilagem xifóide fresca foi obtida de frangos com aproximadamente 60 dias de idade. Após congelamento e remoção do pericôndrio a cartilagem foi picada em finas fatias com o auxílio de lâmina.

## 3. Extração de Proteoglicanos

Amostras da cartilagem (1g) foram tratadas com 15 ml das seguintes soluções de extração:

Solução de Extração 1:                       $\text{GuCl}$

$\text{GuCl}$ .....(\*)

EDTA.....10mM

PMSF.....1mM

Benzamidina.....1mM

Em tampão acetato de sódio 50mM pH 5.8

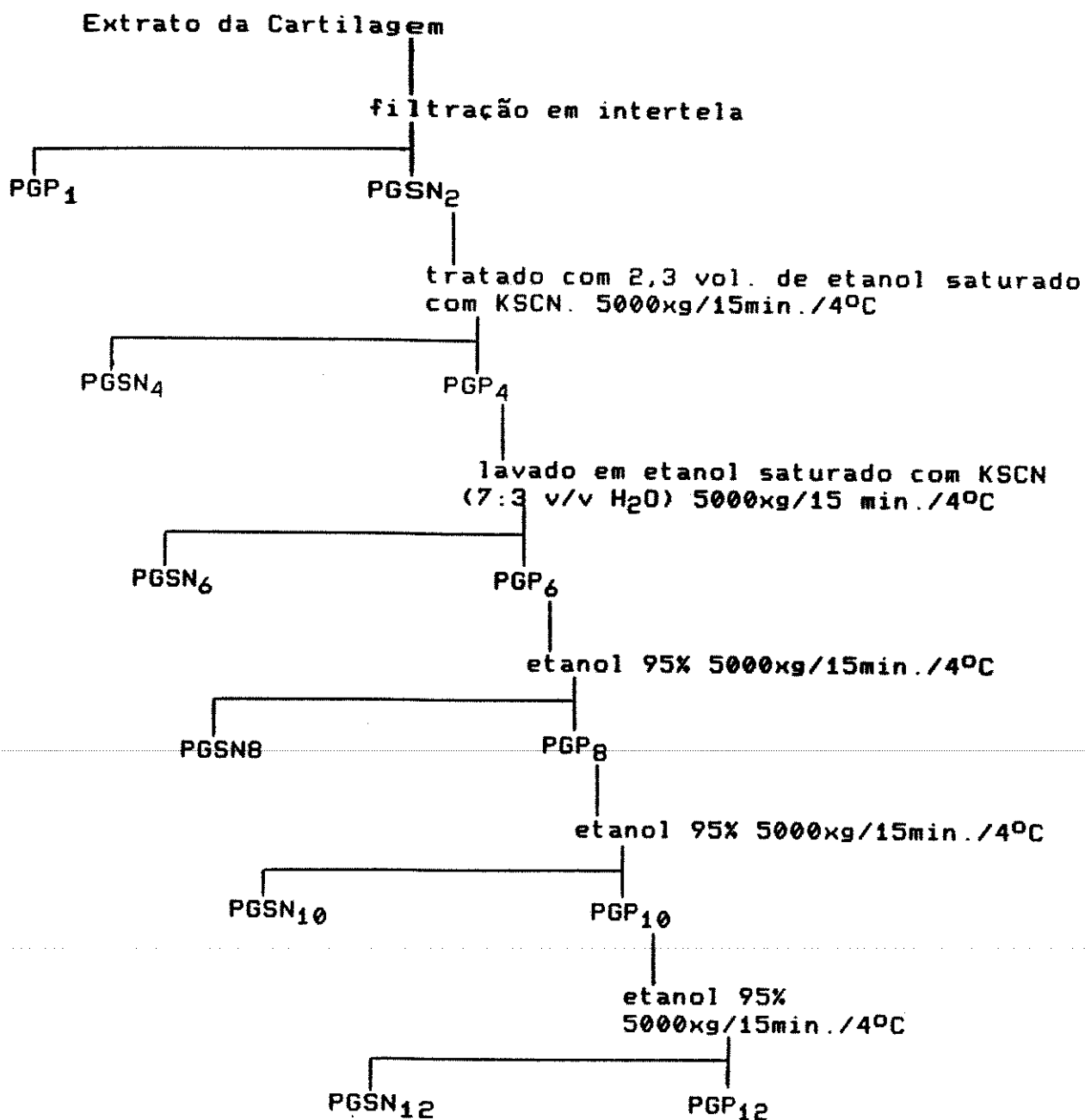
Solução de Extração 2:                       $\text{MgCl}_2$

$\text{MgCl}_2$  (\*) não tamponado

(\*) Foram realizadas extrações, com os sais mencionados, em concentrações que variaram de 1 a 5M e nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas. As extrações foram feitas a 4°C sob agitação constante.

Os extratos foram separados dos resíduos de cartilagem por filtração em intertela. Os PGs extraídos do tecido foram precipitados com etanol saturado em KSCN e lavados com etanol 95% (3x). As frações obtidas de ambas as extrações foram ressuspensas em água destilada. Os extratos obtidos com  $\text{GuCl}$  foram dialisados em tampão acetato de sódio 50mM pH 7.0 enquanto que os obtidos com  $\text{MgCl}_2$  foram dialisados contra água destilada como ilustra o esquema a seguir:

## Esquema de Extração de Proteoglicanos com $\text{GuCl}$ e $\text{MgCl}_2$



#### **4. Dosagem de Proteína**

A dosagem de proteína foi feita pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972) e em 280nm utilizando espectrofotômetro Beckman-Acta CIII.

#### **5. Dosagem de Ácido Urônico**

O conteúdo de ácido urônico foi determinado das amostras, aproximadamente 30  $\mu$ l, acrescidas de água até um volume final de 500  $\mu$ l. O mesmo foi feito com o padrão CS a partir de uma solução com 2 mg/ml. Após adicionar 3 ml de ácido sulfúrico as amostras foram fervidas durante 20 minutos; os tubos foram resfriados, sendo adicionado 100  $\mu$ l de carbazol 0,1%. Após 2 horas a leitura foi feita em espectrofotômetro Beckman-Acta CIII a 530 nm (DISHE, 1947).

#### **6. Digestão Enzimática**

##### **6.1. Papaína**

Amostras de 50  $\mu$ l dos extratos brutos obtidos (aproximadamente 0,4 mg de ácido urônico/0,15 mg de proteína) foram incubadas com 50  $\mu$ l de tampão fosfato de potássio 100mM



pH 6,5 contendo papaína (2,6 mg/ml), NaCl (5mM), L-cisteína (0,6 mM) e EDTA (2 mM) durante 18 horas a 37°C (HASCALL & HEINEGARD, 1974a). Após a digestão as amostras foram analisadas em gel de agarose-poliacrilamida.

A remoção total dos GAGs foi feita a partir de 1g de cartilagem. A degradação foi feita com papaína (40 mg/g de tecido) em tampão citrato de sódio 30mM pH 3,5 contendo EDTA 40mM e 2-Me 80mM a 50°C por 24 horas. O digesto foi centrifugado e, dois volumes de etanol foram adicionados ao sobrenadante. Após 24hs à 4°C, o precipitado foi coletado por centrifugação, lavado com etanol 80% e acetona (MICHELACCI & HORTON, 1989). Depois de ressuspendido em água, foi determinado seu conteúdo de ácido urônico.

## 6.2. Condroitinase

Amostras de 10 µl do extrato bruto dos PGs extraídos por MgCl<sub>2</sub> e GuCl 3M (aproximadamente 85µg de ácido urônico) foram incubadas com 20 µl de Chase ABC (0,02 unidades) durante 4 horas a 37°C. Após digestão as amostras foram analisadas em gel de agarose-poliacrilamida e SDS-PAGE.

## 7. Eletroforese

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

Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (10% de acrilamida) foi feita segundo Zingales (1984). As amostras analisadas (2,5 µg de proteína) foram preparadas em tampão redutor (tampão Tris-HCl 62 mM, pH 6,8; SDS 2%; glicerol 10%; EDTA 1 mM; 2-Me 0,2%; e Azul de Bromofenol 0,01%) e fervidas durante 3 minutos. O tampão utilizado nas cubas de eletroforese foi Tris 25 mM, glicina 190 mM e SDS 0,1%. Para cada placa foram aplicados 25 mA durante 3 horas. Padrões de peso molecular foram sempre analisados em paralelo e continham  $\beta$ -galactosidase (116.000), fosforilase (97.400), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000) e anidrase carbônica (29.000).

A coloração foi feita pelo método da prata segundo Blum e colaboradores (1987). O gel foi fixado em metanol 50%, ácido acético 12% e 0,5 ml de paraformaldeído a 37% durante 1 hora. Após a fixação, foi lavado em etanol 50% durante 20 minutos (3x). O gel foi então tratado, durante 1 minuto, com tiosulfato de sódio (0,2 g/l). O excesso foi removido por lavagem do gel com água destilada (3x - 20 segundos). A impregnação foi realizada em solução de nitrato de prata (2g/l) contendo 0,75 ml de paraformaldeído 37%, durante 20 minutos. O excesso foi removido por lavagem do gel com água destilada (2x - 20 segundos). A prata foi reduzida com uma solução de carbonato de sódio (60g/l).

contendo 0,5 ml de paraformaldeído 37% e tiosulfato de sódio (4 mg/l). Após lavagens com água destilada (2x - 2 minutos) o gel foi imerso, durante 2 minutos, em uma solução de metanol 50% e ácido acético 12%. A estocagem foi feita a 4°C em metanol 50%. Todas as etapas foram realizadas a temperatura ambiente com agitação constante.

As massas moleculares foram inferidas por cálculo de Rf e regressão dos marcadores (KLAUS & OSBORN, 1969)

## 7.2. Eletroforese em gel de agarose-poliacrilamida

Eletroforese em gel de agarose-poliacrilamida (1%:1,2%-p/p) foi realizada segundo Heinegård e colaboradores (1985a). As amostras analisadas (10 g de ácido urônico) foram preparadas em tampão Tris-acetato 40 mM pH 6,8, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 1 mM, contendo SDS 0,25% e incubadas por 2 horas a 37°C. Foi acrescentado no tampão, igual volume de Azul de Bromofenol 0,05% e sacarose 80%. As amostras foram fervidas durante 3 minutos. O tampão utilizado nas cubas de eletroforese foi Tris-acetato 10 mM pH 6,8, 1 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> e EDTA 1mM. Para cada placa foram aplicados 20 mA durante 1 hora e 30 minutos. Os padrões de CS e HS foram analisados em paralelo. A coloração foi feita pelo corante Azul de Toluidina (AT) 0,1% em ácido acético 1%.

## 8. Cromatografia de Troca Iônica

DEAE-celulose ativada segundo Fahey e Terry (1982) foi equilibrada em tampão Tris-HCl 15 mM pH 8.3 contendo uréia 5,4M. As frações PGP<sub>12</sub>, extraídas com  $\text{GuCl}$  3M-48h e  $\text{MgCl}_2$  3M-48h, contendo 21,21mg de ácido urônico, foram dialisadas contra o tampão acima durante 24 horas, a 4°C e sob constante agitação. Após aplicação da amostra em coluna de DEAE-celulose (3,5 x 2,0 cm), a resina foi lavada (5 vezes o volume da coluna) com o tampão de equilíbrio. A eluição das frações foi feita utilizando gradiente de NaCl (0 - 1M). Foram coletadas frações de 5,0 ml das quais foram determinadas: proteína total (absorbância em 280 nm) e glicosaminoglicanos (ácido urônico pela reação do carbazol). Para análise em eletroforese (descrição no item 7.1 de Material e Métodos) as frações foram precipitadas em solução de acetato de sódio 0,5M e etanol.

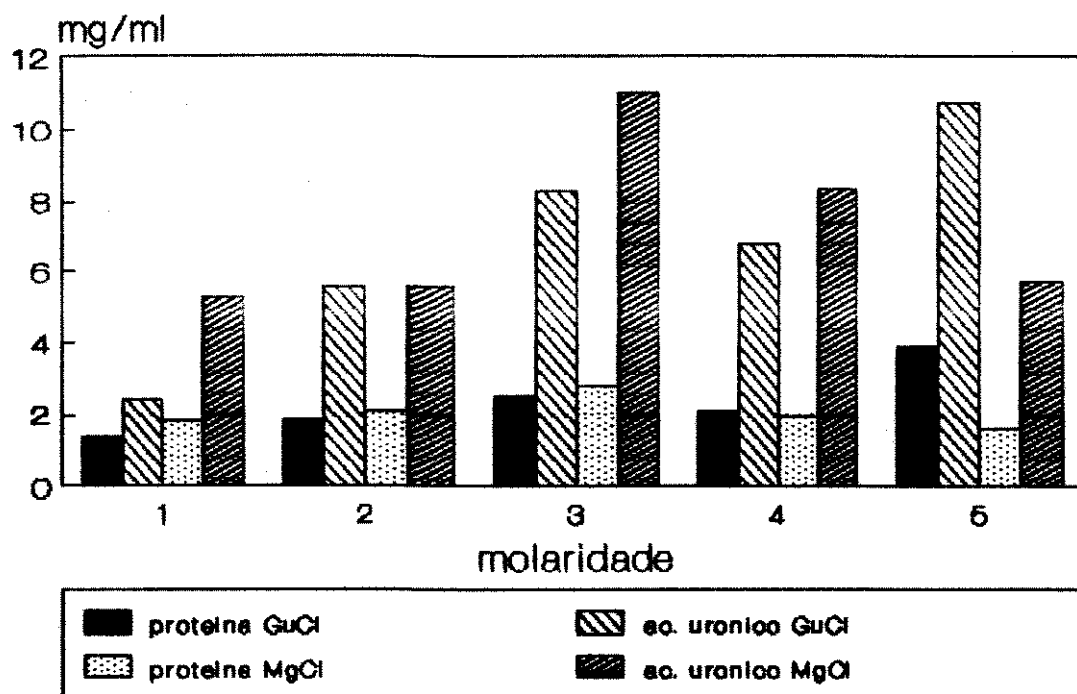
## RESULTADOS

### 1. Extração de Proteoglicanos

#### 1.1. Extração utilizando $MgCl_2$ e $GuCl$ em diferentes concentrações (1M a 5M)

As dosagens de ácido urônico e proteínas em extratos da cartilagem xifóide tratada com diferentes concentrações de  $GuCl$  e  $MgCl_2$  (1M a 5M) mostraram resultado bastante heterogêneo (Fig. 1). As dosagens de proteínas, quando se usou  $GuCl$  ou  $MgCl_2$ , foram crescentes de 1 até 3M, sendo que no caso da extração por  $GuCl$  diminuiu em 4M e aumentou em 5M. Quando se fez uso de  $MgCl_2$ , a concentração máxima de proteína foi observada em 3M. As dosagens de ácido urônico por sua vez, revelaram valores mais altos quando se usou 5M para  $GuCl$  e 3M para  $MgCl_2$ .

A extração de cartilagem xifóide de frango com  $MgCl_2$  4M removeu somente 55,3% do total de ácido urônico presente no tecido. No entanto, a extração com  $MgCl_2$  3M aumentou significativamente este rendimento o qual passou para 73,3% do total de ácido urônico (Tabela 1). Este rendimento foi maior do que o obtido quando usado  $GuCl$  3M (55,3%) e 4M (44,7%). Um rendimento crescente de ácido urônico foi obtido quando empregou-se  $GuCl$  de 1M a 3M. Este rendimento atingiu seu máximo de 71,3% em 5M.



**Figura 1** - Dosagens de proteínas e ácido urônico obtidas da extração de PGs com MgCl<sub>2</sub> e GuCl em concentrações de 1M a 5M, a 40°C/48h.

**Tabela 1** - Conteúdo de PGs extraídos e retidos na cartilagem xifóide de frango após tratamento com  $MgCl_2$  e  $GuCl$  em diferentes concentrações.

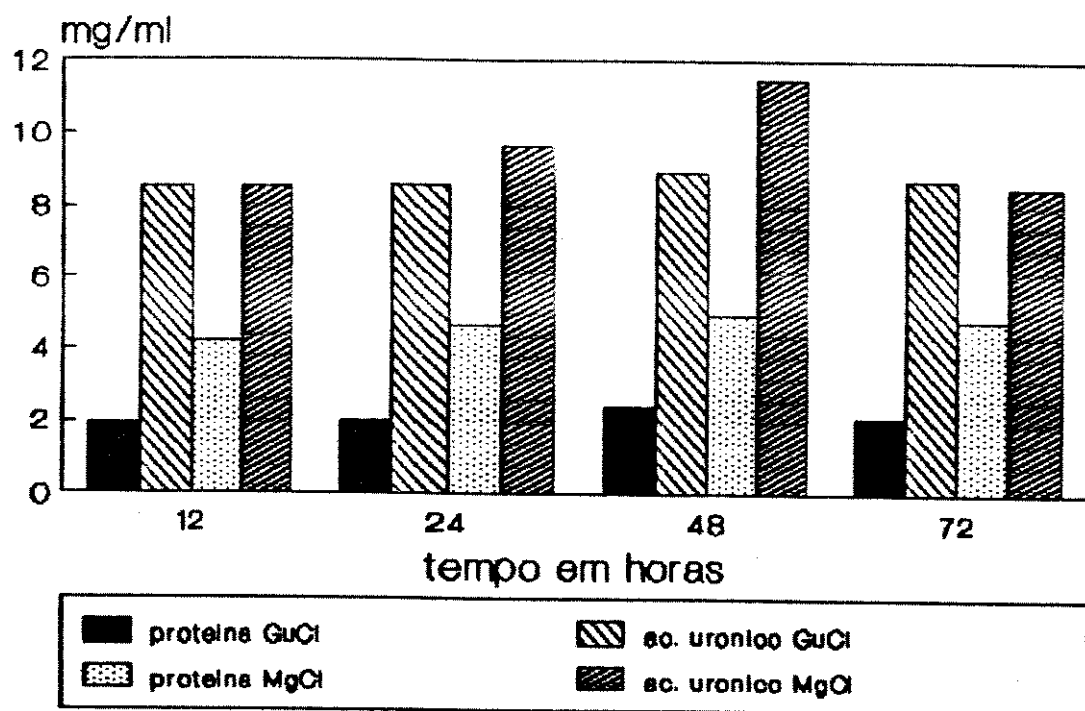
| -----                    |               |               |
|--------------------------|---------------|---------------|
| X total de ácido urônico |               |               |
| -----                    |               |               |
| $MgCl_2$                 | PGs Extraídos | PGs Residuais |
| -----                    |               |               |
| 1M                       | 35.3          | 64.7          |
| 2M                       | 37.3          | 62.7          |
| 3M                       | 73.3          | 26.7          |
| 4M                       | 55.3          | 44.7          |
| 5M                       | 38.1          | 61.9          |
|                          |               |               |
| $GuCl$                   |               |               |
| 1M                       | 16.0          | 84.0          |
| 2M                       | 37.3          | 62.7          |
| 3M                       | 55.3          | 44.7          |
| 4M                       | 44.7          | 55.3          |
| 5M                       | 71.3          | 28.7          |
| -----                    |               |               |

### 1.2. Extração utilizando $MgCl_2$ e $GuCl$ em diferentes tempos (12h, 24h, 48h e 72h)

Dosagens de proteínas e ácido urônico foram avaliadas quando se empregaram diferentes tempos de extração (Fig. 2) em  $MgCl_2$  3M e  $GuCl$  3M. Observou-se um crescente aumento nas concentrações de proteína e ácido urônico, de 12 horas até 48 horas de extração dos PGs da cartilagem para ambos os sais. Uma queda no conteúdo de ácido urônico foi observada quando realizada a extração em 72 horas.

A extração de ácido urônico com  $MgCl_2$  teve seu máximo de rendimento quando realizada durante 48h (66,7%). Este rendimento caiu para 43,4% após 72h de extração. A utilização de  $GuCl$  3M durante 12h removeu apenas 56,6% do total de ácido urônico presente no tecido. Um aumento pouco significativo foi observado para o tempo de extração de 24h (57,3%). Um máximo de rendimento foi obtido quando utilizado  $GuCl$  3M durante 48h (59,3%) (Tabela 2).





**Figura 2** - Dosagens de proteína e ácido urônico obtidas da extração de PGs com  $\text{MgCl}_2$  3M e GuCl 3M em diferentes tempos a  $4^\circ\text{C}$ .

**Tabela 2 - Conteúdo de PGs extraídos e retidos na cartilagem xifóide de frango após tratamento com  $MgCl_2$  3M e  $GuCl$  3M em diferentes tempos.**

| -----                    |               |               |
|--------------------------|---------------|---------------|
| X total de ácido urônico |               |               |
| -----                    |               |               |
| $MgCl_2$                 | PGs Extraídos | PGs Residuais |
| -----                    |               |               |
| 12h                      | 56.6          | 43.4          |
| 24h                      | 57.3          | 42.7          |
| 48h                      | 66.7          | 33.3          |
| 72h                      | 43.4          | 56.6          |
| $GuCl$                   |               |               |
| 12h                      | 56.6          | 43.4          |
| 24h                      | 57.3          | 42.7          |
| 48h                      | 59.3          | 40.7          |
| 72h                      | 58.0          | 42.0          |
| -----                    |               |               |

## 2. Análise dos extratos em SDS-PAGE

### 2.1. Extratos obtidos a partir de $MgCl_2$ e $GuCl$ em diferentes concentrações (1M a 5M)

Alíquotas desses extratos foram analisadas em SDS-PAGE (10% de concentração de acrilamida). O perfil eletroforético dos extratos obtidos a partir de  $GuCl$  (Fig 3) e  $MgCl_2$  (Fig 4) é bastante semelhante, porém foi observado na região entre 50 KDa e 200 KDa um maior número de bandas quando utilizado  $MgCl_2$ . Uma proteína com 58 KDa foi melhor extraída com  $MgCl_2$  3, 4 e 5M sendo máximo nesta última concentração (Fig 4). Não se notou diferença para o polipeptídeo de 54 KDa nos diferentes extratos com  $MgCl_2$ . Uma proteína de 49 KDa foi igualmente bem extraída por  $MgCl_2$  nas concentrações de 3, 4 e 5M.

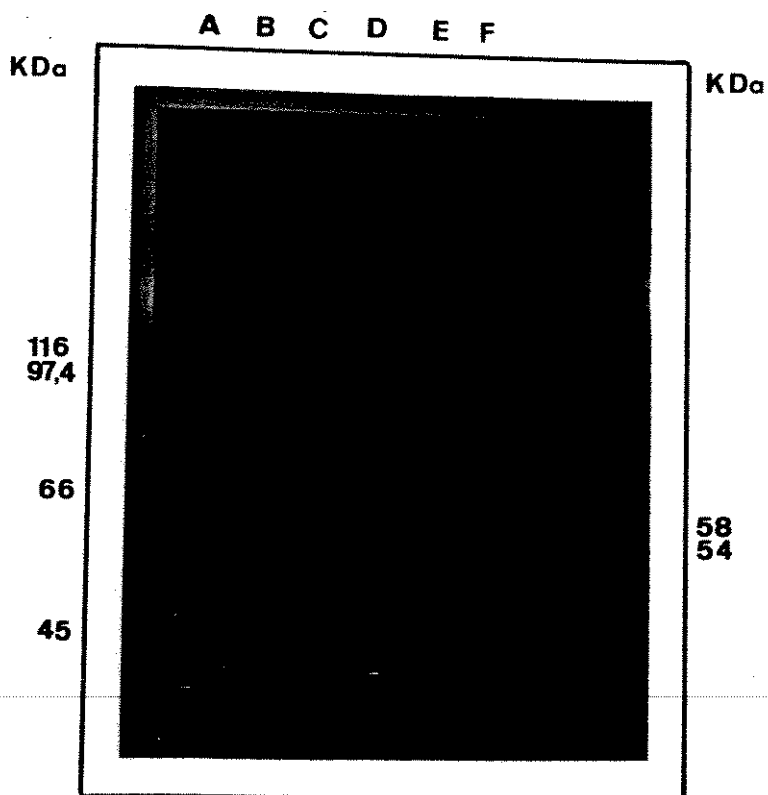
### 2.2. Extratos obtidos a partir de $MgCl_2$ e $GuCl$ em diferentes tempos (12h, 24h, 48h e 72h)

Alíquotas desses extratos foram analisadas em SDS-PAGE (10% de concentração de acrilamida) (Figs. 5 e 6). Quando comparada a extração com  $GuCl/3M$  nos tempos de 24, 48 e 72 horas (Fig. 5) a extração das proteínas com 50 KDa e 47 KDa foi sensivelmente maior do que a observada quando a extração se deu em 12h. No caso de  $MgCl_2$  (Fig 6) não foram

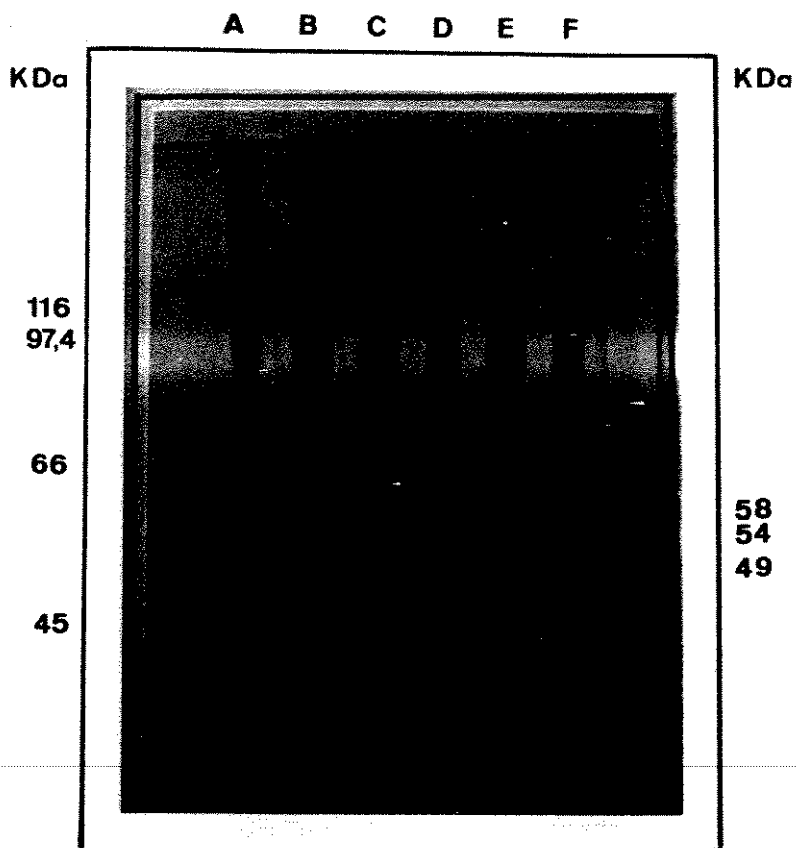
detectadas diferenças nos diversos tempos de extração.

### 2.3. Extratos obtidos a partir de $MgCl_2$ e $GuCl$ 3M/48h com e sem 2-Me

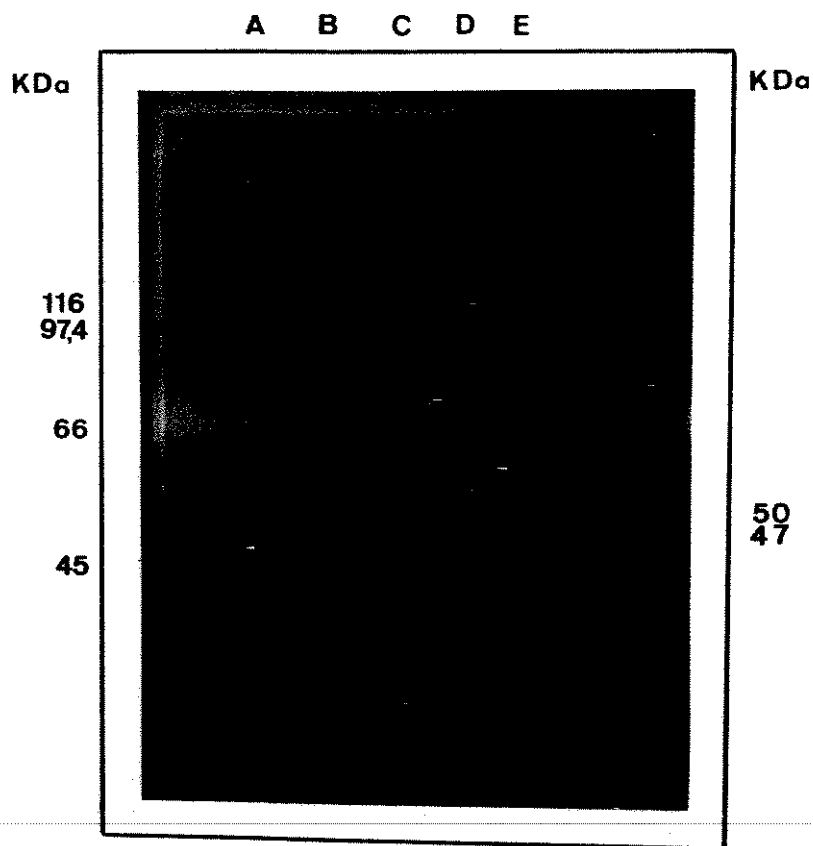
Eletroforese do extrato obtido por  $GuCl$  sem 2-Me evidenciou poucas bandas se comparado com o extrato tratado com 2-Me (Fig 7). A banda correspondente a 120 KDa permaneceu sem alterações em condições redutoras e não redutoras. Muito material não reduzido pelo 2-Me ficou retido no topo do gel. Resultado semelhante foi encontrado para o extrato obtido a partir de  $MgCl_2$  (Fig 8), sendo as bandas muito menos pronunciadas do que as encontradas nos extratos obtidos por  $GuCl$ . Com exceção da banda correspondente a 120 KDa nenhuma outra banda foi claramente detectada no material sem tratamento com 2-Me.



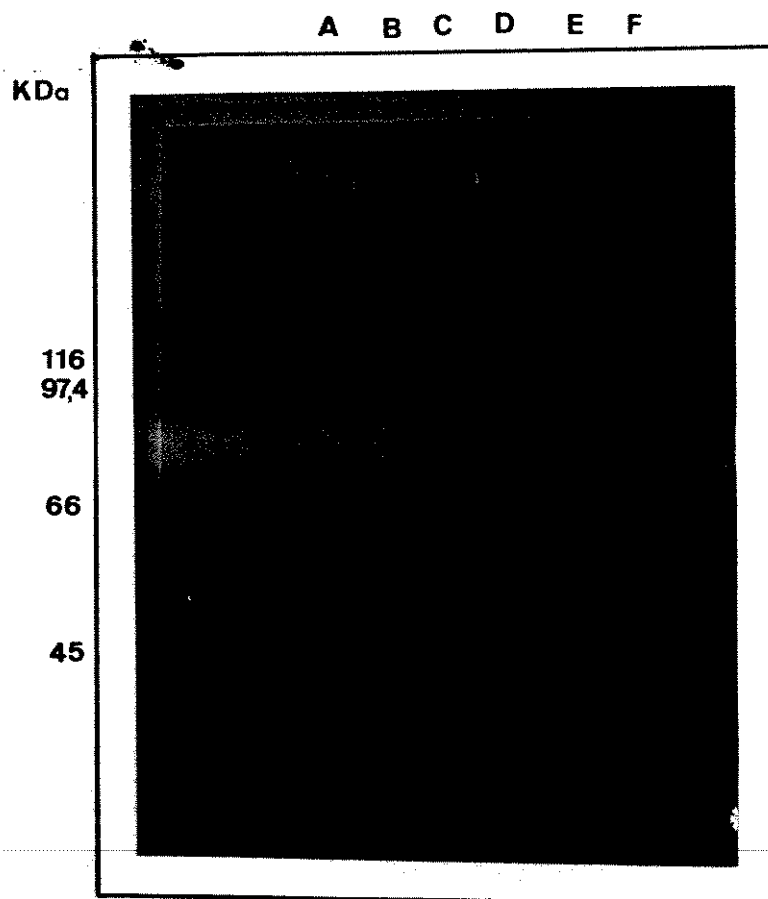
**Figura 3 - SDS-PAGE (10% de acrilamida) dos extratos brutos obtidos a partir de  $\text{GuCl}$  1M (E), 2M (D), 3M (C), 4M (B), 5M (A). Padrão de PM (F). Condições: corrente de 25mA durante 3h, temperatura ambiente, coloração pelo método da prata.**



**Figura 4** - SDS-PAGE (10% acrilamida) dos extratos brutos obtidos a partir de MgCl<sub>2</sub> 1M (F), 2M (E), 3M (D), 4M (C), 5M (B). Padrão de PM (A). Condições: corrente de 25mA durante 3h, temperatura ambiente, coloração pelo método da prata.

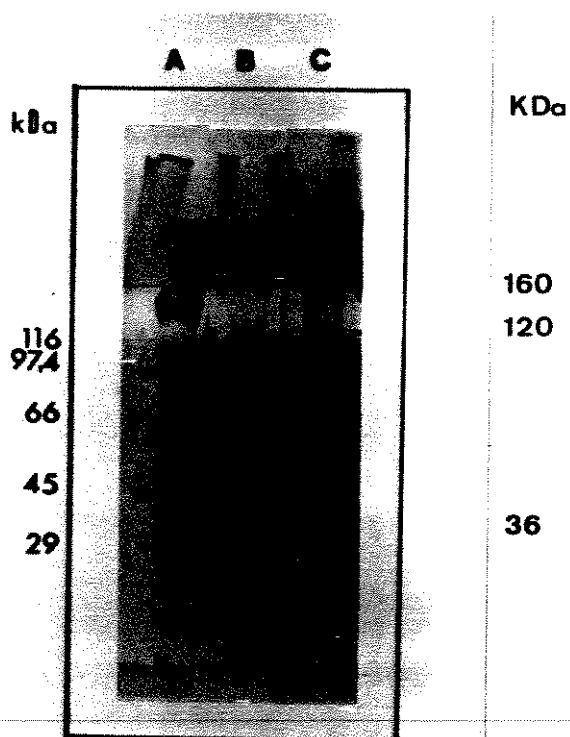


**Figura 5** - SDS-PAGE (10% acrilamida) dos extratos brutos obtidos a partir de  $\text{GuCl}$  3M durante 12h (D), 24h (C), 48h (B), 72h (A). Padrão de PM (E). Condições: corrente de 25mA durante 3h, temperatura ambiente coloração pelo método da prata.

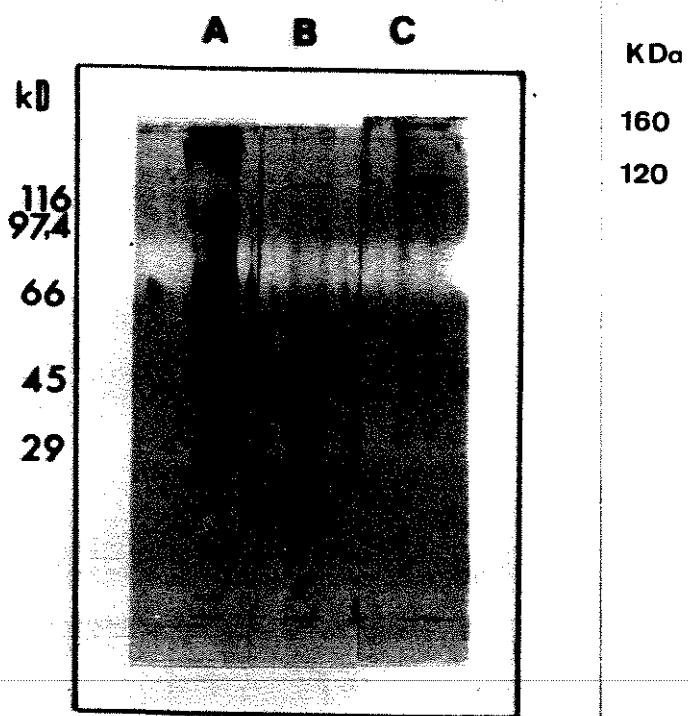


**Figura 6** - SDS-PAGE (10% acrilamida) dos extratos brutos obtidos a partir de  $MgCl_2$  3M durante 12h (E), 24h (D), 48h (C), 72h (B). BSA (A) e padrão de PM (F). Condições: corrente de 25mA durante 3h, temperatura ambiente, coloração pelo método da prata.





**Figura 7** - SDS-PAGE (10% acrilamida) do extrato obtido a partir de GuCl 3M/48hs com 2-Me (B) e sem 2-Me (C). PM (A). Condições: corrente de 25mA durante 3h, temperatura ambiente, coloração pelo método da prata.



**Figura 8 - SDS-PAGE (10% acrilamida) do extrato obtido a partir de  $MgCl_2$  3M/48hs com 2-Me (B) e sem 2-Me (C). PM (A). Condições: corrente de 25mA durante 3h, temperatura ambiente, coloração pelo método da prata.**

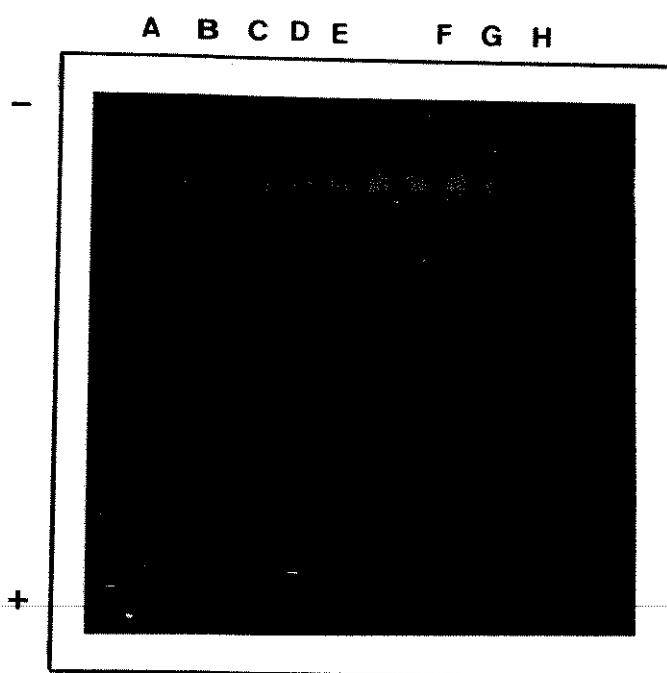
### 3. Análise dos extratos em agarose-poliacrilamida

#### 3.1. Extratos obtidos a partir de $MgCl_2$ e $GuCl$ em diferentes concentrações (1M a 5M)

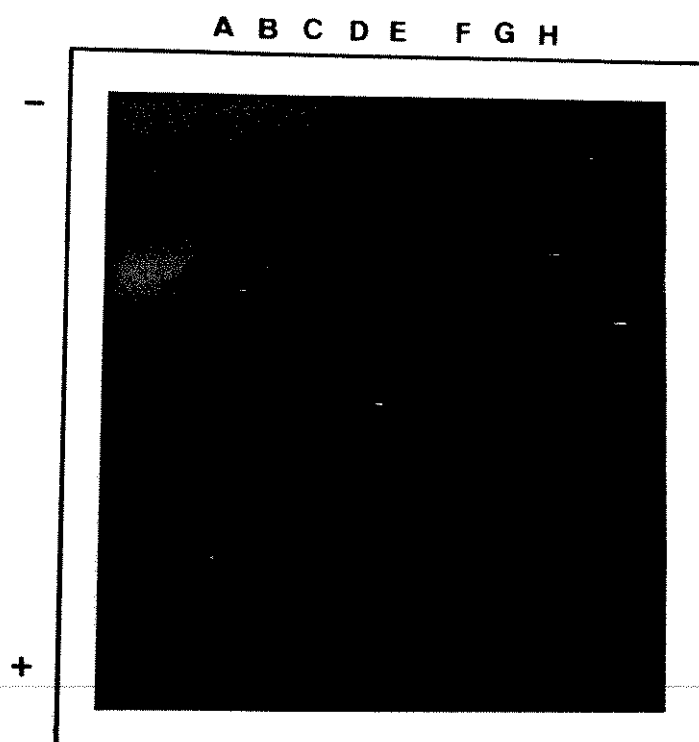
As amostras obtidas das extrações com concentrações crescentes de  $GuCl$  (Fig 9) e  $MgCl_2$  (Fig 10) foram analisadas em gel de agarose-poliacrilamida após tratamento com SDS. Uma banda metacromática e difusa se revelou presente em todas as concentrações nas duas extrações. A intensa metacromasia indica a presença de glicosaminoglicanos sulfatados.

#### 3.2. Extratos obtidos a partir de $MgCl_2$ e $GuCl$ em diferentes tempos (12h, 24h, 48h e 72h)

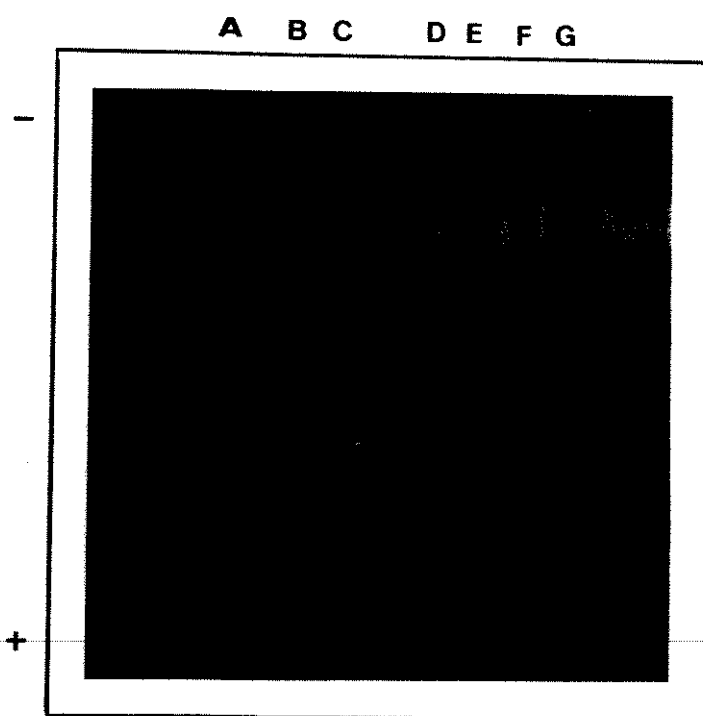
Extrações com  $GuCl$  3M (Fig 11) e  $MgCl_2$  3M (Fig 12) em 12, 24, 48 e 72 horas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose poliacrilamida. O caráter polidisperso e metacromático dos PGs pode ser observado nas duas extrações e nos diferentes tempos empregados.



**Figura 9** - Gel de agarose-poliacrilamida dos extratos brutos obtidos a partir da extração da cartilagem xifóide com  $\text{GuCl}$  1M (B), 2M (C), 3M (D), 4M (E), 5M (F), CS (G), HS (H), SDS (A). Foram aplicados  $10 \mu\text{g}$  de ácido urônico.



**Figura 10-** Gel de agarose-poliacrilamida dos extratos brutos obtidos a partir da extração da cartilagem xifóide com  $\text{MgCl}_2$  1M (A), 2M (B), 3M (C), 4M (D), 5M (E), SDS (F), CS (G), HS (H). Foram aplicados  $10\mu\text{g}$  de ácido urônico



**Figura 11** - Gel de agarose-poliacrilamida dos extratos brutos obtidos a partir da extração da cartilagem xifóide com  $\text{GuCl}$  3M, 12h (D), 24h (E), 48h (F), 72h (G), SDS (A), HS (B), CS (C). Foram aplicados  $10\mu\text{g}$  de ácido urônico.

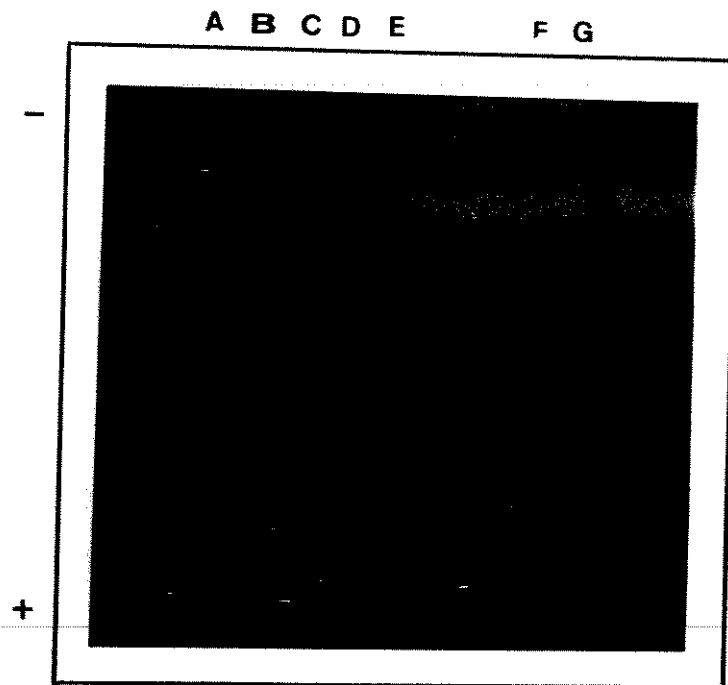


Figura 12 - Gel de agarose-poliacrilamida dos extratos brutos obtidos a partir da extração da cartilagem xifóide com  $MgCl_2$  3M 12h (B), 24h (C), 48h (D), 72h (E), HS (F), CS (G), SDS (A). Foram aplicados  $10\mu g$  de ácido urônico.

## 4. Digestão Enzimática

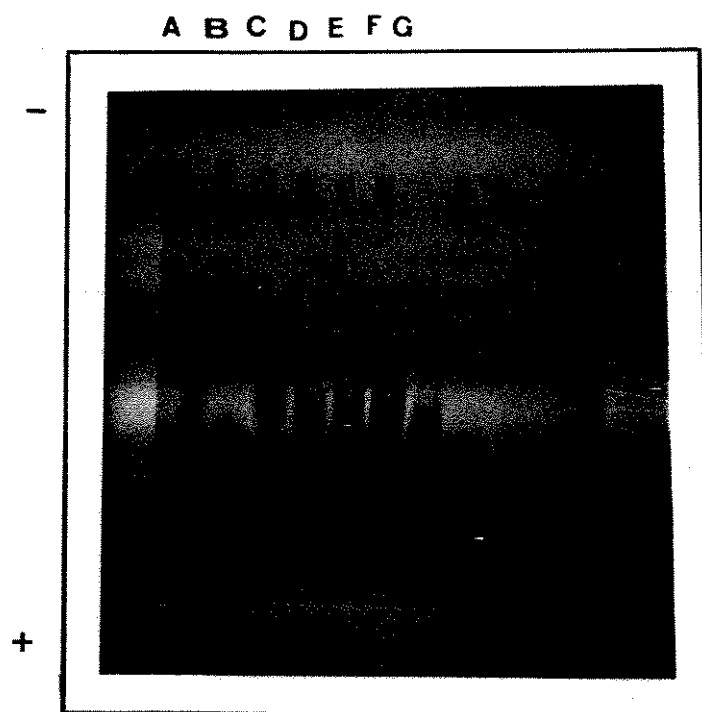
### 4.1. Papaína

As digestões com papaína foram efetuadas em extratos com diferentes concentrações de  $\text{GuCl}$  (Fig. 13) e  $\text{MgCl}_2$  (Fig. 14) e também em extratos em que se utilizaram diferentes tempos de extração para a concentração 3M dos dois sais (Fig. 15). Após digestão com papaína podemos observar uma banda com mobilidade eletroforética semelhante ao CS padrão.

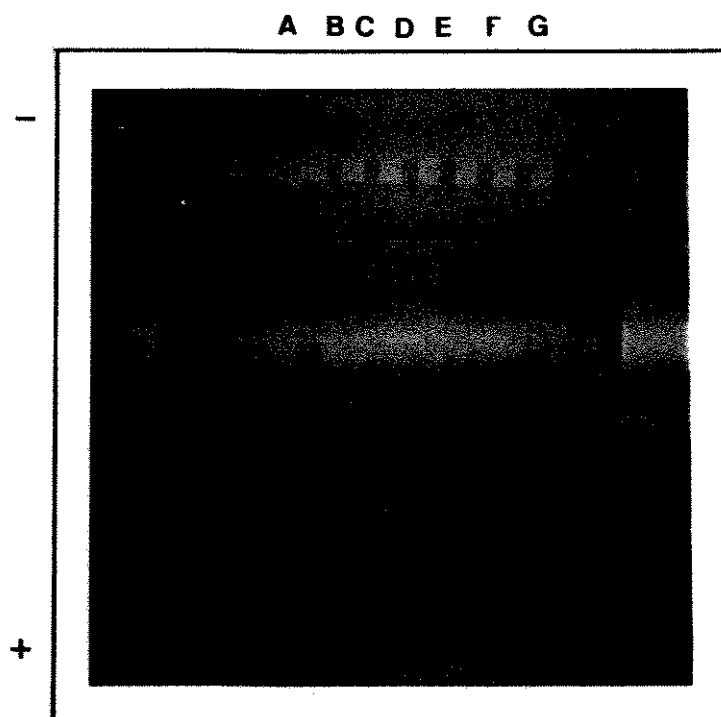
Nos extratos com  $\text{GuCl}$ , as bandas foram similares para todas as concentrações de  $\text{GuCl}$  utilizadas. Entretanto para as concentrações 3M e 4M as bandas foram mais proeminentes (Fig. 13). No caso de  $\text{MgCl}_2$  (Fig 14) o material extraído com 3M exibiu uma coloração mais intensa após digestão com papaína.

A análise do material obtido nos diferentes períodos de extração mostrou que em  $\text{GuCl}$  (Fig 15) o digesto de papaína com banda mais intensa foi observado para os extratos obtidos após 24 e 48 horas de extração, e uma banda menos intensa para os extratos obtidos após 72h. Não houve diferença para os extratos obtidos com  $\text{MgCl}_2$  nos diversos períodos de tempo analisados (Fig. 15).

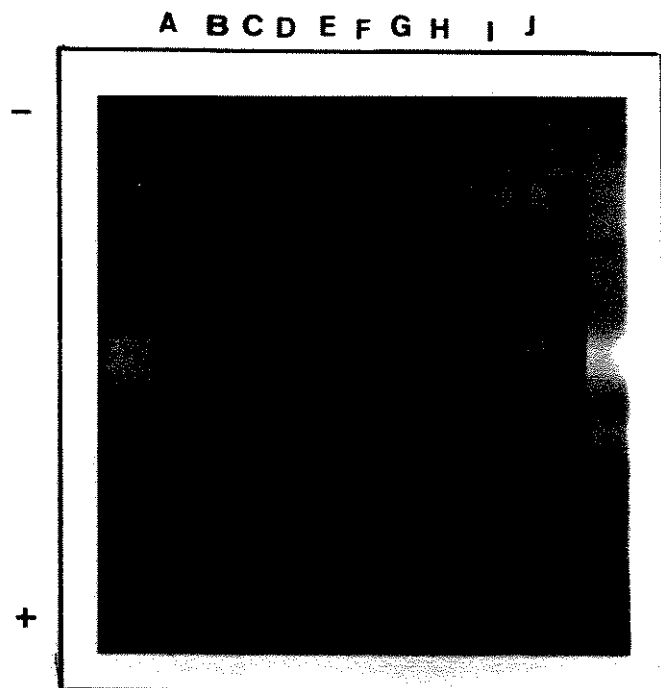




**Figura 13** - Gel de agarose-poliacrilamida dos extratos obtidos a partir da extração da cartilagem xifóide com GuCl após digestão com papaína, 1M (C), 2M (D), 3M (E), 4M (F), 5M (G), CS (A), HS (B). Foram aplicados 10 $\mu$ g de ácido urônico.



**Figura 14** - Gel de agarose-poliacrilamida dos extratos obtidos a partir da extração da cartilagem xifóide com  $\text{MgCl}_2$  após digestão com papaína, 1M (C), 2M (D), 3M (E), 4M (F), 5M (G), CS (A), HS (B). Foram aplicados  $10\mu\text{g}$  de ácido urônico.



**Figura 15** - Gel de agarose-poliacrilamida dos extratos brutos obtidos a partir da extração da cartilagem xifóide com  $\text{GuCl}$  12h (C), 24h (D), 48h (E), 72h (F) e  $\text{MgCl}_2$  12h (G), 24h (H), 48h (I), 72h (J), após digestão com papaína. CS (A), HS (B). Foram aplicados  $10 \mu\text{g}$  de ácido urônico.

## 5. Fracionamento de proteoglicanos utilizando cromatografia de troca iônica

Na Figura 16 pode ser analisado o perfil cromatográfico do extrato total obtido a partir de  $\text{MgCl}_2$  3M/48h em DEAE-celulose.

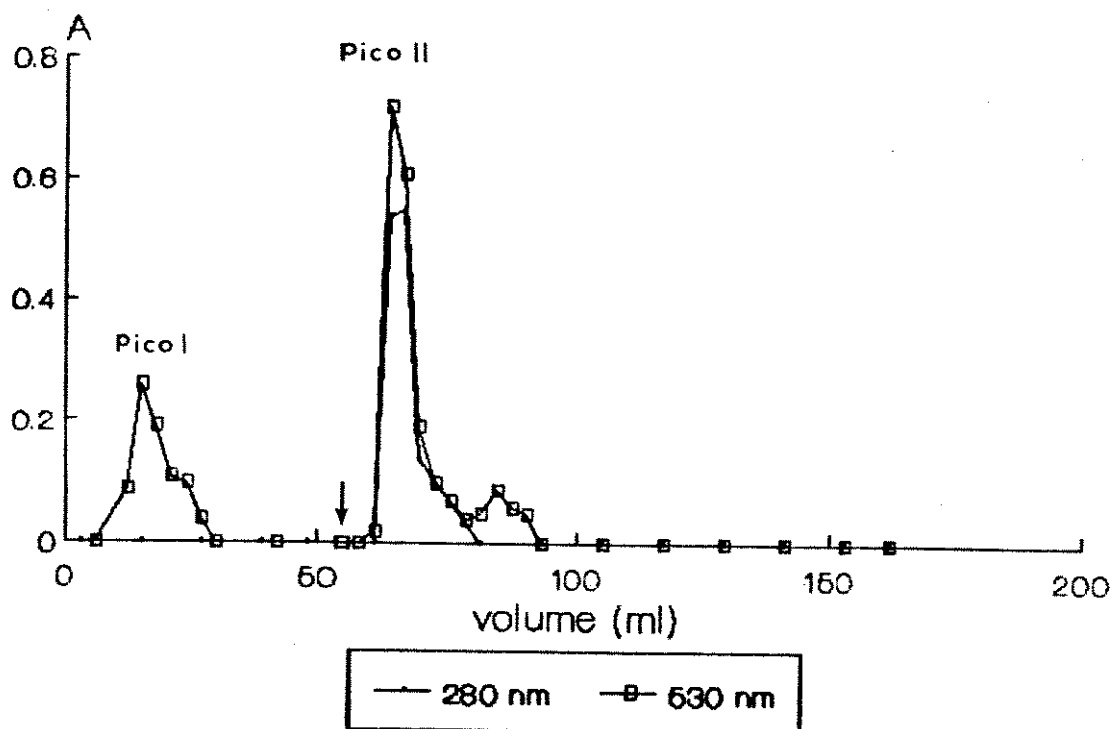
Após a aplicação do gradiente foi obtido um pico (pico II), exibindo absorbância em 280 nm e 530 nm (AU). Este pico foi eluído com NaCl 0,15M. Uma solução de NaCl 2M foi aplicada na coluna após o término do gradiente. Nesta concentração de NaCl nenhuma absorbância foi detectada no material eluído.

O extrato obtido a partir de  $\text{GuCl}$  3M/48h foi cromatografado nas mesmas condições descritas acima (Fig. 17). Durante a lavagem da coluna com o tampão de equilíbrio a absorbância foi zero em 280 nm. O mesmo não ocorreu quando foi feita a dosagem de ácido urônico (530 nm). Após a aplicação do gradiente pôde ser observada a presença de um pico de proteína (pico II) e um de ácido urônico (pico III), o qual se apresentou deslocado em relação ao pico protéico. Estes picos foram eluídos com NaCl 0,25M.

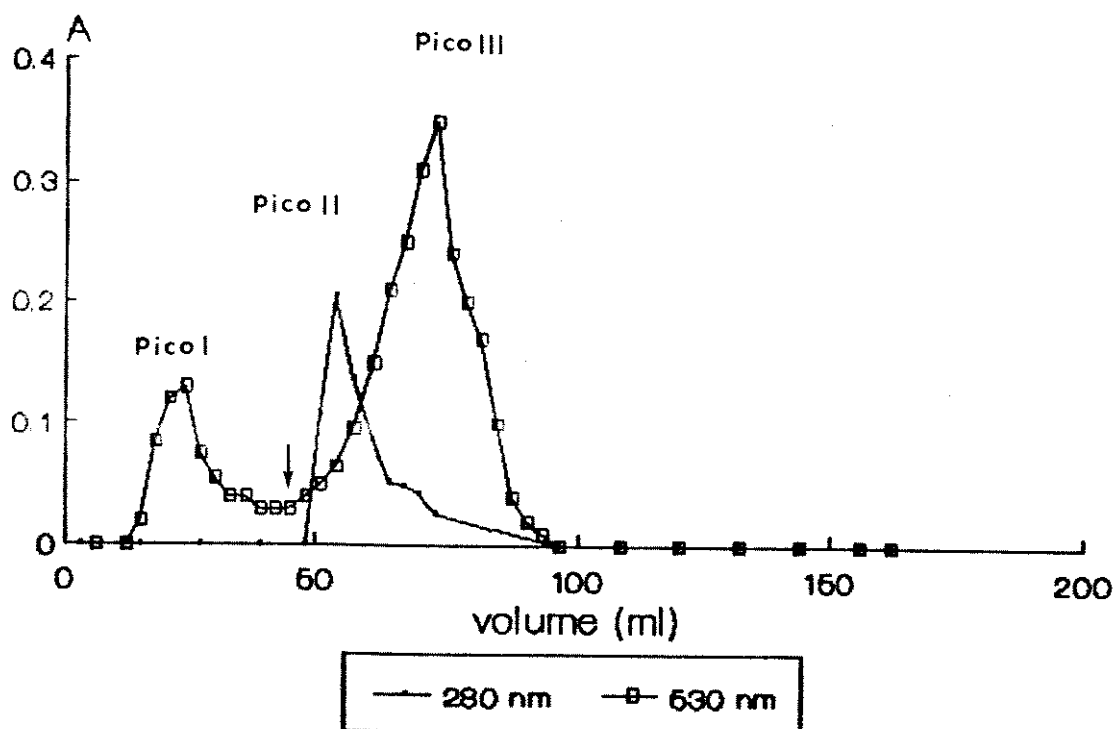
## 6. Análise do material eluído

### 6.1. SDS-PAGE

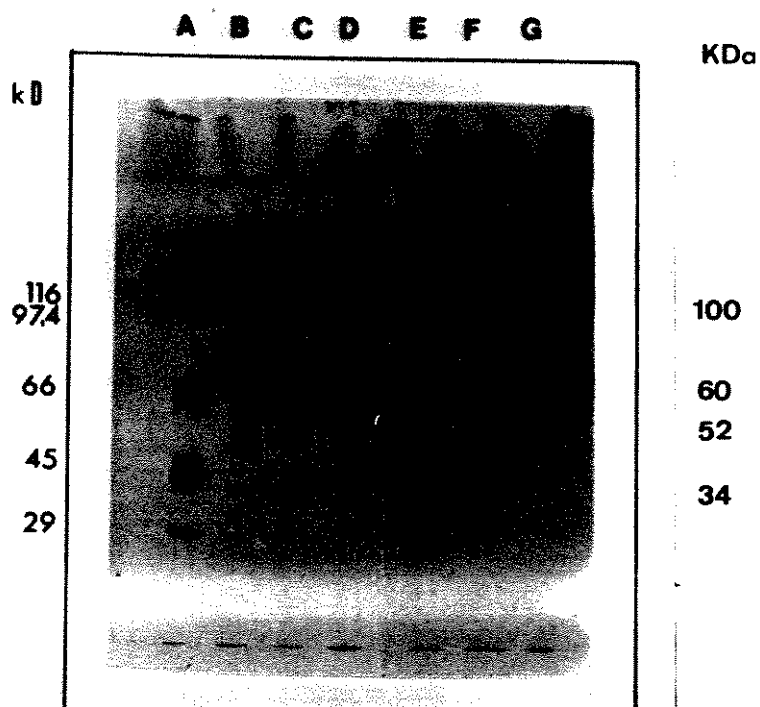
Observação em SDS-PAGE do material obtido com  $MgCl_2$  3M/48h (Fig 18) e aplicado em coluna de DEAE, revelou que proteínas acima de 116 KDa foram eluídas principalmente no pico I (Fig 18-C). Uma banda difusa entre 52 KDa e 60 KDa correspondeu a parte do material eluído no pico II (Fig 18-D). No mesmo gel ainda, pode-se observar o mesmo material após digestão com Chase (Fig 18-E-F-G). Nota-se a ausência de banda difusa entre 52 KDa e 60 KDa. Por outro lado, bandas em torno de 100 KDa e 34 KDa aparecem no material eluído no pico I (Fig 18-F) sendo que a primeira é também visualizada no material eluído no pico II (Fig 18-G). A presença de bandas fortemente coradas no topo do gel indica que grande parte dos componentes da matriz extracelular não penetrou no gel. Observação em SDS-PAGE do material obtido com  $GuCl$  3M/48h (Fig 19) e aplicado em coluna de DEAE revelou um maior número de bandas quando comparado com o material obtido com  $MgCl_2$ . Após tratamento com a enzima foi observada uma maior quantidade de proteínas acima de 116 KDa.



**Figura 16 - Cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose do extrato obtido a partir de  $MgCl_2$  3M/48h. Volume da coluna: 9,0ml; fluxo: 0,8 ml/min.; volume da amostra que foi aplicada na coluna: 1,33ml (21,21mg de ácido urônico); tampão: Tris-HCl 15 mM pH 8.3, contendo uréia 5,4M. O pico I representa o material eluído antes da aplicação do gradiente. Gradiente: 0-1M NaCl; a seta indica o início do gradiente.**

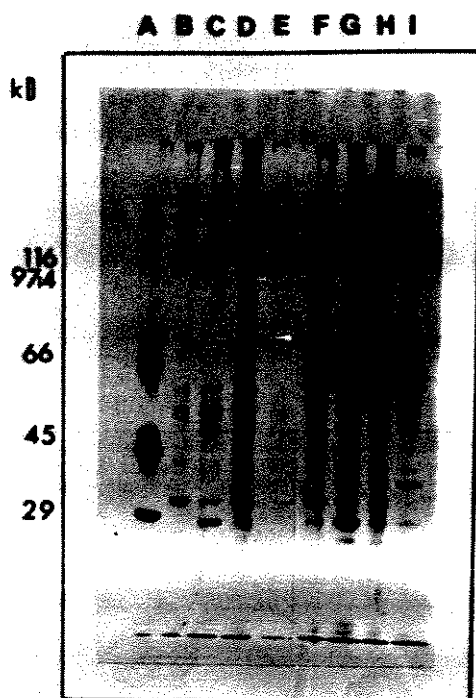


**Figura 17 - Cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose do extrato obtido a partir de GuCl 3M/48h.** Volume da coluna: 9,0ml; fluxo: 0,8 ml/min.; volume da amostra que foi aplicada na coluna: 1,46ml (21,21mg de ácido urônico); tampão: Tris-HCl 15 mM pH 8.3, contendo uréia 5,4M. O pico I representa o material eluído antes da aplicação do gradiente. Gradiente: 0-1M NaCl; a seta indica o início do gradiente.



**Figura 18 - SDS-PAGE (10% acrilamida) do material extraído por  $MgCl_2$ , submetido a cromatografia de troca iônica, antes e após tratamento com Chase. Extrato bruto (B), pico I (C) e pico II (D), antes do tratamento com a Chase. Extrato bruto (E), pico I (F) e pico II (G), após tratamento com Chase. Padrão de PM (A). A banda fortemente corada no material tratado com Chase (E,F,G) corresponde a presença da enzima ( $\approx 60$  KDa). Condições: corrente de 25mA durante 3h, temperatura ambiente, coloração pelo método da prata.**



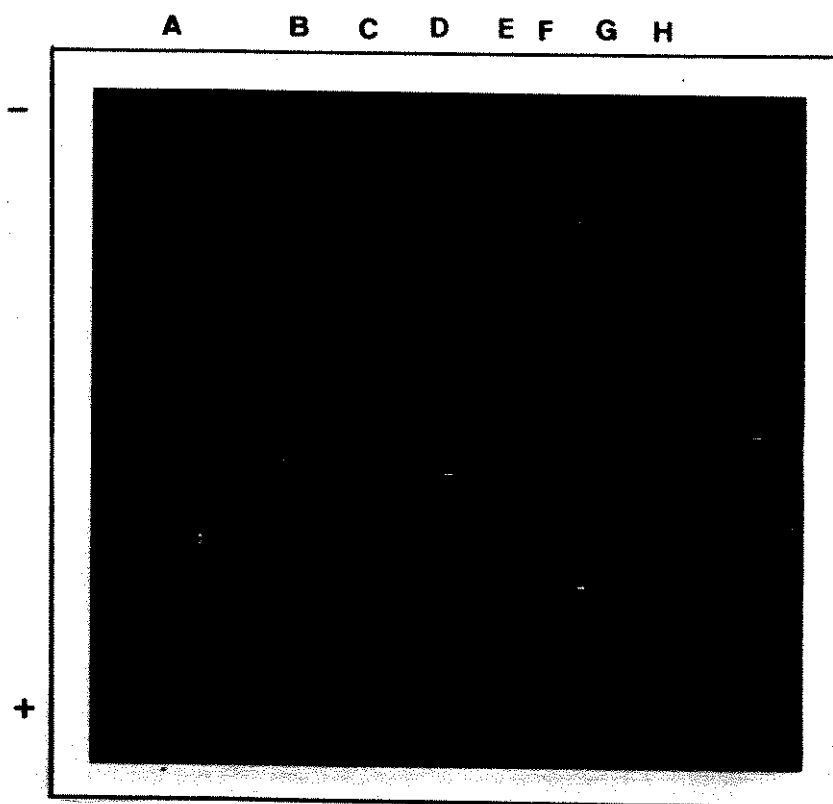


**Figura 19 - SDS-PAGE (10% acrilamida) do material extraído por  $\text{GuCl}$ , submetido a cromatografia de troca iônica antes e após tratamento com Chase. Extrato bruto (B), pico I (C), pico II (D) e pico III (E) antes do tratamento com a enzima. Extrato bruto (F), pico I (G), pico II (H) e pico III (I) após tratamento com Chase. Padrão de PM (A). A banda fortemente corada no material tratado com Chase (F,G,H,I) corresponde a presença da enzima ( $\approx 60$  KDa). Condições: corrente de 25mA durante 3h, temperatura ambiente, coloração pelo método da prata.**

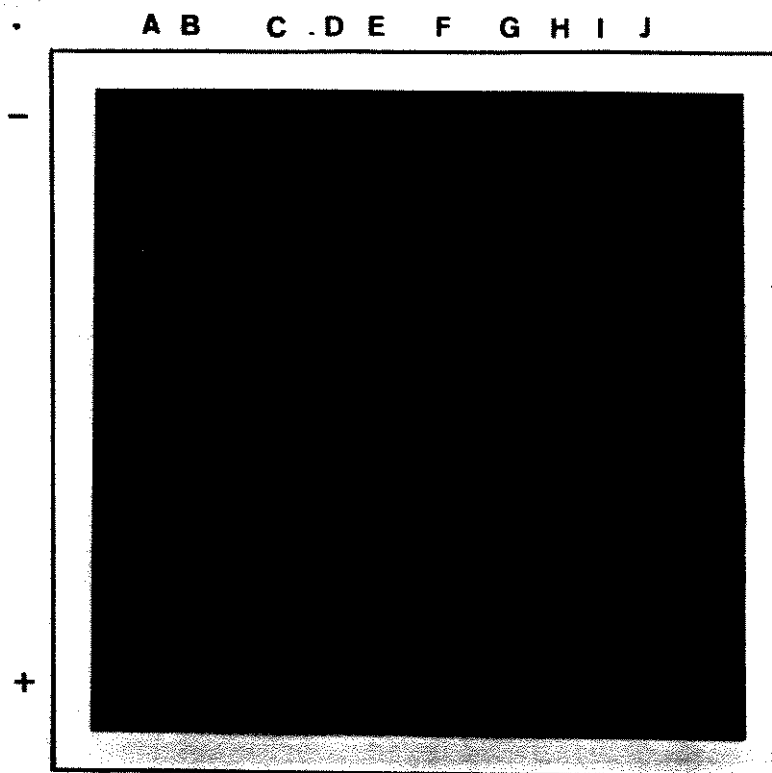
## 6.2. Agarose-poliacrilamida

As frações eluídas em cromatografia de troca iônica do extrato obtido com  $MgCl_2$  3M/48h (Fig 20) foram analisadas em gel de agarose-poliacrilamida antes e após o tratamento com Chase. Observou-se uma banda metacromática correspondente ao extrato bruto e pico II. O material eluído da coluna durante a lavagem (pico I) que apresenta baixa quantidade de AU também exibiu metacromasia. Com exceção do pico II, após tratamento com Chase não mais se observam bandas metacromáticas.

Do extrato obtido com  $GuCl$  3M/48h (Fig 21) foram eluídos três picos. O extrato bruto e o pico III apresentaram bandas metacromáticas (Fig 21 - C,F). Após tratamento com a enzima as bandas correspondentes aos picos I,II,III e o extrato bruto não foram evidenciadas.



**Figura 20** - Gel de agarose-poliacrilamida da cromatografia de troca iônica de material extraído com  $MgCl_2$ , com e sem tratamento pela Chase. Extrato bruto (B), pico I (C) e pico II (D) sem o tratamento com Chase. Extrato bruto (E), pico I (F) e pico II (G) após tratamento com a Chase. CS (A), HS (H). Condições: corrente de 20mA durante 1h e 30min., temperatura ambiente, coloração pelo A.T.



**Figura 21** - Gel de agarose-poliacrilamida da cromatografia de troca iônica de material extraído com  $\text{GuCl}$ , com e sem tratamento pela Chase. Extrato bruto(C), pico I (D), pico II (E), pico III (F) sem o tratamento com Chase. Extrato bruto (G), pico I (H), pico II (I), pico III (J) após tratamento com a Chase. CS (A), HS (B). Condições: corrente de 20mA durante 1h e 30min.; temperatura ambiente, coloração pelo A.T.

## DISCUSSÃO

Para o estudo de populações de PGs bem como de proteínas presentes em vários tipos de cartilagens, diferentes métodos extrativos têm sido utilizados (SHULMAN & MEYER, 1970; ROUGHLEY & MASON, 1976; DAMLE et al., 1979; MICHELACCI & HORTON, 1989), sendo que alguns sais exibem ótima extração mesmo em concentrações reduzidas (SAJDERA & HASCALL, 1969). No entanto, o método aceito como mais eficaz e amplamente utilizado na extração de PGs de cartilagens e outros tecidos tem sido aquele descrito por Sajdera e Hascall (1969). Este método consiste na extração dos PGs com agentes caotrópicos como o  $\text{GuCl}$  4M. Mesmo sendo este procedimento considerado ótimo para a remoção de grandes proporções de ácido urônico, sua aplicação para cartilagem xifóide de frango foi inferior à obtida com  $\text{GuCl}$  3M. Assim sendo, não se deve eleger o  $\text{GuCl}$  4M como método de extração mais eficaz, sem considerar a natureza do tecido em questão. Além disso, existem dados que apontam o emprego do  $\text{GuCl}$  3M como mais eficiente para extração de PG, como ocorre em barbatana de tubarão (MICHELACCI & HORTON, 1989).

Com a finalidade de se avaliar a extratibilidade dos PGs e proteínas não colagênicas de cartilagem de frango, foram utilizados agentes caotrópicos como o  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{GuCl}$  em diferentes concentrações (1M a 5M) e diferentes tempos de

extração (12h, 24h, 48h e 72h). Os resultados indicaram que a utilização de  $MgCl_2$  promove um rendimento crescente de ácido urônico quando são empregadas concentrações de 1M a 3M. O rendimento máximo foi obtido com  $MgCl_2$  3M (73,3%). Resultado semelhante foi obtido por Sajdera e Hascall (1969) com cartilagem nasal bovina, onde uma extração ótima de ácido urônico (85%) foi observada quando empregado o  $MgCl_2$  3M. O emprego de  $MgCl_2$  para cartilagem xifóide de frango, em concentrações mais elevadas como 4M e 5M, implicam numa queda significativa de ácido urônico removido do tecido (55,3% e 38,1%, respectivamente). Esse decréscimo na eficiência de extração, em presença de altas concentrações de sais, pode ser resultado da redução da quantidade de água disponível na camada de solvatação das macromoléculas (SAJDERA & HASCALL, 1969). Altas concentrações de sais utilizadas nas soluções de extração, podem interferir no comportamento físico-químico das macromoléculas, alterando sua solubilidade e estabilidade estrutural. Vale a pena mencionar que, estudos feitos com BSA e  $\beta$ -lactoglobulina mostraram que essas proteínas, estruturalmente diferentes, exibiram comportamentos opostos em condições caotrópicas moderadas (DAMODARAM, 1989). Isto indica que a predisposição conformacional de uma proteína pode sofrer influência de um agente caotrópico, estabilizando ou desestabilizando sua estrutura.

O rendimento aqui encontrado para  $\text{GuCl}$  3M se mostrou bastante inferior quando comparado com o  $\text{MgCl}_2$  3M, indicando que a natureza do solvente empregado precisa ser considerada na eficiência da extração de componentes da matriz extracelular. Estudos realizados com cartilagem articular humana e cartilagem traqueal bovina demonstram que a utilização de  $\text{GuCl}$  4M promove um rendimento máximo de ácido urônico que está em torno de 70%. No entanto, o mesmo sal na mesma molaridade extrai apenas 36% do total de ácido urônico presente em cartilagem de barbatana de tubarão, que tem seu máximo de extratibilidade (84%) observado com o emprego de  $\text{GuCl}$  3M (MICHELACCI & HORTON, 1989). Análises realizadas em cartilagens traqueal, nasal e de laringe de babuínos, revelam que  $\text{GuCl}$  4M remove aproximadamente 85% do total de ácido urônico desses tecidos. Quando a cartilagem articular é tratada nessas mesmas condições este rendimento cai para 62% (STANESCU et al., 1980). Com base nos dados deste trabalho e naqueles apresentados na literatura, foi concluído que a distribuição e organização das moléculas presentes na matriz de diferentes cartilagens pode influenciar diretamente a eficiência da extração.

Um outro aspecto importante a ser considerado, quando se analisa o comportamento diferenciado de moléculas frente a diferentes processos extrativos, é que, mudanças conformacionais nas moléculas não ocorrem exclusivamente por ação direta do sal empregado. Deve se levar em conta que o

mecanismo pelo qual os sais afetam a estabilidade das macromoléculas, se deva, em parte, à modificação na estrutura da própria molécula de água (DAMODARAN, 1989). Contudo não se deve esquecer que a ação de agentes caotrópicos interfere na extração dos componentes da matriz cartilaginosa, anulando principalmente interações hidrofóbicas e iônicas que estariam participando em fenômenos interativos.

Em cartilagem xifóide de frango, o tempo de extração considerado ótimo tanto para  $MgCl_2$  3M, como para  $GuCl$  3M foi o de 48 horas. A exposição do tecido ao  $GuCl$  3M com 48 e 72 horas de extração não mostrou mudança no rendimento de ácido urônico. Por outro lado foi observado na extração com o  $MgCl_2$  que a concentração de ácido urônico do material extraído foi menor após 48 horas. Neste caso é preciso considerar que as condições desnaturantes foram mantidas durante a extração por 72 horas. No entanto, proteínas e GAGs estão constantemente assumindo conformações diferentes, o que pode permitir interações e agregações. A flexibilidade conformacional de alguns GAGs pode ser a razão para interações entre GAGs e proteínas, como trombina, lipoproteínas, glicoproteínas ricas em histidina e fibronectina (CASU et al., 1988). Embora seja esta flexibilidade conformacional muito mais acentuada em GAGs contendo ácido idurônico, ela também ocorre em cadeias contendo ácido glucurônico, o que pode levar a interações



com proteínas não colagênicas, glicoproteínas e mesmo com o esqueleto protéico de outros PGs, podendo contribuir para uma redução no rendimento extrativo.

A análise em SDS-PAGE do extrato bruto obtido com  $\text{GuCl}$  e  $\text{MgCl}_2$  em diferentes concentrações mostrou que muitos componentes dos extratos são removidos igualmente pelos dois solventes, demonstrando ser a extração pelo  $\text{MgCl}_2$  um procedimento alternativo ao emprego de  $\text{GuCl}$ . Duas proteínas com PM de 58 KDa e 49 KDa são mais evidentes quando a concentração do sal é maior, indicando serem as concentrações de 5M no caso de  $\text{MgCl}_2$  e 4M no caso de  $\text{GuCl}$ , ideais para sua extração. O emprego de  $\text{GuCl}$  e  $\text{MgCl}_2$  separadamente mostrou que proteínas com pesos moleculares em torno de 118 KDa e 49 KDa são igualmente bem extraídas com ambos os solventes. No entanto, existe uma proteína com PM de 47 KDa que é muito menos extraída com  $\text{MgCl}_2$  o que poderia indicar que esta proteína estaria neste caso, interagindo de forma mais intensa com outro componente da matriz extracelular.

Extrações em diferentes tempos com  $\text{GuCl}$  e  $\text{MgCl}_2$  3M, indicaram através da análise em SDS-PAGE que para  $\text{MgCl}_2$  não houve alteração nos padrões de banda para os tempos de 12 a 72 horas. Já no caso da extração com  $\text{GuCl}$ , foi observado que proteínas com PM em torno de 52 KDa foram muito menos extraídas com 12 horas quando se compara com 24, 48 e 72 horas. A comparação dos géis com material de

extração a partir de  $\text{GuCl}$  e  $\text{MgCl}_2$  3M/48h, com e sem 2-Me, revelou que grande parte dos componentes da matriz extracelular são constituídos por componentes oligoméricos com o envolvimento de pontes dissulfeto. Também ficou evidente que  $\text{GuCl}$  tem um efeito muito mais dissociativo do que o  $\text{MgCl}_2$ , especialmente para as proteínas não colagênicas.

Sem o propósito de fazer afirmações definitivas sobre a identificação das proteínas não colagênicas, algumas considerações são cabíveis, pelo menos com o intuito de aprofundar discussões. A presença de uma banda em torno de 54 KDa encontrada para amostras tratadas com 2-Me, pode representar a subunidade da proteína de matriz de cartilagem (CMP), identificada inicialmente em matriz de cartilagem de traquéia (PAULSSON & HEINEGÅRD, 1981). A forma oligomérica desta proteína pode estar presente na banda correspondente a posição de 160 KDa nas condições sem 2-Me. Embora o PM da forma oligomérica dessa proteína seja 148 KDa, a sua determinação foi feita através de equilíbrio de sedimentação por centrifugação e não por SDS-PAGE. Cabe citar que esta proteína tem um comportamento anômalo em SDS-PAGE (PAULSSON & HEINEGÅRD, 1979) provavelmente devido a presença de oligossacarídeos. Por isso não se deve esperar que a CMP em gel de SDS-PAGE migre na posição de 148 KDa. Vale mencionar que esta mesma proteína quando inicialmente extraída migrava em posição próximo a 200 KDa (PAULSSON & HEINEGÅRD, 1979).

Ainda considerando semelhanças no comportamento eletroforético das proteínas não colagênicas de cartilagem xifóide com a de outras origens, cabe considerar a presença de uma banda com 36 KDa na amostra extraída com GuCl como é encontrada em cartilagem traqueal (LARSSON et al, submetido a publicação). Esta proteína migra da mesma forma tanto em condições reduzidas como não reduzidas, embora ocasionalmente em cartilagem articular coexistem as formas diméricas e monoméricas para esta proteína (LARSSON et al, submetido a publicação). A banda correspondente a proteína de 120 KDa que aparece tanto em condições reduzidas como não reduzidas, muito provavelmente corresponde à presença de colágeno II (Col).

Os resultados encontrados para eletroforese em gel de agarose-poliacrilamida indicam a presença de um único componente polidisperso. A análise das extrações obtidas com o  $MgCl_2$  revelou uma coloração mais intensa se comparado com os demais extratos após o emprego de AT, corante que forma com os PGs, complexos metacromáticos insolúveis em água. A utilização de SDS na incubação das amostras antes da eletroforese, facilitou a entrada das mesmas no gel pois o SDS dificulta a interação dos PGs com as demais proteínas de matriz (OEGEMA et al, 1979). Em todas as amostras analisadas não se observou uma migração equivalente aos padrões CS e HS, devido ao fato dos GAGs estarem ligados ao esqueleto protéico.

Uma análise das cadeias de GAGs dos PGs pode ser obtida através do emprego de enzimas como a papaína (ANTONOPOULOS et al., 1964), tripsina e quimotripsina (HEINEGÅRD & HASCALL, 1974b). O tratamento com enzimas libera cadeias glicosaminoglicânicas após digestão do esqueleto protéico, podendo ser analisadas em gel de agarose-poliacrilamida. A mobilidade dos extratos obtidos com  $\text{GuCl}$  e  $\text{MgCl}_2$  em diferentes concentrações, após tratamento com papaína (HASCALL & HEINEGÅRD, 1974a) foi a mesma do CS padrão. O mesmo ocorreu quando os extratos foram tratados em variados tempos. A princípio, as amostras tratadas com SDS, após digestão com papaína, apresentaram a mesma mobilidade do SDS (dados não apresentados) o que levou neste caso, à supressão do uso de SDS já que suas moléculas formam micelas que migram da mesma forma que os GAGs. Os resultados da digestão com papaína além de confirmarem o caráter polidisperso esperado para os GAGs, sugerem que os PGs extraídos de cartilagem xifóide de frango com dois meses de idade, apresentam CS como principal GAG ligado ao esqueleto protéico. A presença predominante de CS foi confirmada após serem os extratos obtidos com  $\text{MgCl}_2$  3M/48 h e  $\text{GuCl}$  3M/48 h, submetidos a digestão com Chase ABC, e analisados em gel de agarose-poliacrilamida. Em ambos os casos foi observada uma digestão total do extrato bruto, com ausência de banda metacromática, sugerindo ser o CS o principal GAG existente em cartilagem xifóide de frango. As

proporções de subpopulações de PGs podem variar com a idade (INEROT & HEINEGÅRD, 1983). Sabendo-se que cartilagens jovens parecem conter principalmente PGs ricos em CS, enquanto que cartilagens mais velhas possuem principalmente PGs ricos em QS (HEINEGÅRD & PAULSSON, 1984), o resultado obtido para cartilagem de frango com dois meses de idade está de acordo com estes dados.

O emprego de cromatografia em DEAE-celulose que pode ser utilizado como método alternativo ao uso de ultracentrifugação em gradiente de CsCl, mostrou resultados diferentes para os extratos de MgCl<sub>2</sub> e GuCl. A sobreposição de picos de ácido urônico e proteínas encontrada no material extraído com MgCl<sub>2</sub>, indicou a presença de PGs onde a absorbância em 530 nm corresponde aos GAGs e a absorbância em 280 nm corresponde às proteínas do esqueleto protéico e às proteínas não colagênicas, já que nenhum outro pico foi observado com absorbância em 280 nm. A observação do perfil cromatográfico do material extraído com GuCl e aplicado em DEAE, mostrou que a existência de um pico em 280 nm que não coincide com o de 530 nm, próprio para ácidos urônicos, pode representar a existência de produtos de degradação de PGs. No entanto, ao se comparar o perfil de eluição do DEAE do material extraído com MgCl<sub>2</sub> não se notou a presença desse pico deslocado, especialmente considerando que no caso da extração com o MgCl<sub>2</sub> não foram utilizados inibidores proteolíticos e nem estava presente o GuCl, um agente

fortemente caotrópico, que provavelmente inativa grande parte das enzimas proteolíticas. Levando-se em conta tais observações, não se pode descartar a possibilidade de que aquele pico com absorvância em 280 nm, que aparece deslocado em relação ao de 530 nm, possa representar a presença de proteínas não colagênicas. Os resultados destas cromatografias são uma clara indicação da ação diferente dos dois sais empregados nos métodos extrativos. Embora eficiente na extração de PGs e proteínas não colagênicas, o efeito dissociativo do  $MgCl_2$  não se equivale ao do  $GdCl_3$ , uma vez que, após diálise em uréia, grande parte dos componentes da matriz se mantém associados, dificultando mesmo sua entrada no gel de poliacrilamida.

A presença de CS como único componente polidisperso em cartilagem xifóide de frango com 2 meses de idade já evidenciada após digestão com papaína, pode ser confirmada com o resultado obtido com a digestão pela Chase. Neste caso, nenhuma banda foi detectada após eletroforese do material digerido em gel de agarose-poliacrilamida.

## CONCLUSÕES

1. O rendimento máximo de ácido urônico para extração de PGs foi obtido com o emprego de  $\text{MgCl}_2$  3M.
2. Concentrações elevadas de  $\text{MgCl}_2$  (acima de 3M) podem interferir no comportamento físico-químico das macromoléculas, diminuindo sua solubilidade.
3. O melhor tempo de extração tanto para  $\text{GuCl}$  3M como para  $\text{MgCl}_2$  3M foi o tempo de 48 horas.
4. O comportamento eletroforético dos PGs em gel de agarose-poliacrilamida indica a presença de CS como único glicosaminoglicano obtido.
5. O  $\text{GuCl}$  exibe efeito dissociativo mais pronunciado do que o  $\text{MgCl}_2$ .

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a identificação de PGs e proteínas não colagênicas de cartilagem xifóide de frango. Extrações com  $MgCl_2$  e  $GuCl$  em diferentes concentrações e tempos, eletroforese em gel de poliacrilamida e agarose, cromatografia de troca iônica e digestões enzimáticas, constituíram a metodologia utilizada.

As extrações realizadas com  $MgCl_2$  e  $GuCl$  em concentrações que variaram de 1M a 5M apontaram um rendimento máximo de ácido urônico quando empregado o  $MgCl_2$  3M, indicando que estas condições são mais propícias para a remoção dos proteoglicanos. O melhor tempo de extração observado tanto para  $GuCl$  3M quanto para  $MgCl_2$  3M foi o de 48 horas.

As análises dos extratos feitas após eletroforese em gel de poliacrilamida, indicaram ser a extração pelo  $MgCl_2$  um procedimento alternativo ao uso de  $GuCl$ , na extração de proteoglicanos e proteínas não colagênicas da matriz extracelular.

O emprego de cromatografia de troca iônica indicou que embora eficiente na extração de PGs e proteínas não colagênicas, o  $MgCl_2$  exibe um menor efeito dissociativo quando comparado ao  $GuCl$ .

Uma maior remoção de PGs observada após análise dos extratos obtidos por  $MgCl_2$  em gel de agarose, reforça os



resultados obtidos nas dosagens de ácido urônico. Após digestão com papaína, todos os extratos apresentaram mobilidade similar ao CS padrão. O emprego de condroitinase ABC e posterior análise em gel de agarose, indicou a presença de CS como único glicosaminoglicano obtido em cartilagem xifóide de frango com dois meses de idade.

## SUMMARY

This research was undertaken to identify proteoglycans (PGs) and noncollagenous proteins of chicken xiphoid cartilage as well as the behaviour of these components in different extraction procedures. Extractions with  $\text{MgCl}_2$  and  $\text{GuCl}$  in different concentrations and periods of time, electrophoresis in polyacrilamde and agarose gels, ion exchange chromatography and enzymatic digestions were the methods employed to evaluate of phisico-chemical phenomena in matrix compounds.

The use of extractions with  $\text{MgCl}_2$  and  $\text{GuCl}$  at concentrations of 1-5M showed a very high yield of uronic acid when 3M  $\text{MgCl}_2$  was used.  $\text{MgCl}_2$  was found to be the most effective extractant at this ion strength, suggesting that the chemical nature of the solvent, plays an important role in the extractability of the PGs an noncollagenous proteins of chicken xiphoid cartilage. Extraction of cartilage PGs whith  $\text{MgCl}_2$  and  $\text{GuCl}$  exhibited an optimal efficiency when performed for 48 hours.

Analyses of the extracts by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pointed out that the extraction with  $\text{MgCl}_2$  is an alternative assay to remove noncollagenous proteins of extracellular matrix.

Ion-exchange chromatography suggests that  $\text{MgCl}_2$  can be used as an efficient solvent to remove PGs and

noncollagenous proteins. However, its application demonstrates a poor dissociation capacity when compared to  $\text{GuCl}$ .

Agarose gel electrophoresis analysis showed a higher extraction of PGs with  $\text{MgCl}_2$ , which reinforces results obtained with the uronic acid reaction. All extracts showed similar chondroitin-sulfate (CS) mobility after papain proteolysis. Analysis of the GAGs released from Chase ABC by agarose polyacrylamide gel electrophoresis, indicated CS as the only polydispersed component extracted in the chicken xiphoid cartilage with two months old.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, B.; HOFFMAN, P. & MEYER, K. The o-serine linkage in peptides of chondroitin 4 or 6-sulfate. *J. Biol. Chem.* 240(1): 156-67, 1965.
- ANTONOPoulos, C.A.; GARDELL, S.; SZIRMAI, A.J. & TYSSONSK, E.R. Determination of glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) from tissues on the microgram scale. *Biochem. Biophys. Acta* 83: 1-19, 1964.
- ANTONOPoulos, C.A.; AXELSSON, I; HEINEGÅRD, D. & GARDELL, S. Extraction and purification of proteoglycans from various types of connective tissue. *Biochem. Biophys. Acta* 338: 108-19, 1974.
- BJELLE, A.; GARDELL, S. & HEINEGÅRD, D. Proteoglycans of articular cartilage from bovine lower femoral epiphysis. Extraction and chareacterization of proteoglycans from two sites within the same joint. *Conn. Tiss. Res.* 2: 111-6, 1974.
- BLOOM, W. & FAWCETT, D.W. Cartilagem. In: BLOOM, W. & FAWCETT. *Tratado de Histologia*. 1ª ed., W.B. Saunders Company, 1975. Cap. 9 ,p. 213-223.

- BLUM, B.; BETER, H. & GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99, 1987.
- BUMOL, T.F. & REISFELD, R.A. Unique glycoprotein-proteoglycan complex defined by monoclonal antibody of human melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 1245-49, 1982.
- CASU, B.; PETITOU, M.; PROVASOLI, M. & SINAY, P. Conformational flexibility: A new concept for explaining binding and biological properties of iduronic acid-containing glycosaminoglycans. *TIBS* 13: 221-5, 1988.
- CATERSON, B. & BAKER, J. The link proteins as specific components of cartilage proteoglycan aggregates in vivo. *J.Biol.Chem.* 254(7): 2394-99, 1979.
- CHOI, H.U.; JOHNSON, T.L.; PAL, S.; TANG, L.H.; ROSEMBERG, L. & NEAME, J.P. Characterization of the dermatan sulfate proteoglycans, DS-PG I and DS-PG II, from bovine articular cartilage and skin isolated by Octyl-sepharose chromatography. *J.Biol. Chem* 264(5): 2876-84, 1989.

CÖSTER, L.; MALSTROM, A.; CARLSTEDT, I. & FRANSSON, L.

The core protein of fibroblast proteoglycan sulfate consists of disulphide-bounded subunit. *Biochem.J.* 215: 417-9, 1983.

DAMLE, P.S.; KIERAS, F.J.; TZENG, W. & GREGORY, J.D.

Isolation and characterization of proteoglycan sulfate from pig skin. *J.Biol.Chem.* 254(5): 1614-19, 1979.

DAMODARAN, S. Influence of protein conformation on its

adaptability under chaotropic conditions. *Int.J. Biol.Macromol.* 11: 2-8, 1989.

DAVID, G. & van der BERGHE, H. Heparan sulfate-

chondroitin sulfate hybrid proteoglycan of the cell surface and basement membrane of mouse mammary epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 260(20): 11067-74, 1985.

DISCHE, Z. A new specific color reaction of hexuronic

acids. *J.Biol.Chem.* 167: 189-99, 1947.

FAHEY, J.L. & TERRY, E.W. Ion exchange chromatography and gel filtration. In: Handbook of experimental immunology. 3ª edição, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1982, vol 1, cap. 8.

FALTZ, L.L.; REDDI, A.H.; HASCALL, G.K.; MARTIN, D.; PITA, J.C. & HASCALL, V.C. Characteristics of proteoglycans extracted from the swarm rat chondrosarcoma with associate solvents. *J.Biol.Chem.* 254(4): 1375-80, 1979.

FERNANDEZ, M.P.; SELMIN, O.; MARTIN, G.R.; YAMADA, Y.; PFAFFLE, M.; DEUTZMANN, R.; MOLLENHAUER, J. & von der MARK, K. The structure of anchorin C11, a collagen binding protein isolated from chondrocyte membrane. *J.Biol.Chem.* 263(12): 5921-5, 1988.

FOLDES, I.; MÓDIS, L.; ANTALFFY, J. & ADAM, I. Ultrastructure of extracellular matrix of embrionic chick limb bud cartilage. *Acta.Biol.Acad.Sci.Hung.* 31(1-3): 81, 1980.

FRANEK, M.D. & DUNSTONE, J.R. Density-gradient centrifugation in the isolation of polysaccharide-protein complexes from aortic tissue. *Biochem.Biophys.Acta.* 127: 223-31, 1966.

FRANZÉN, A.; BJORNSSON, S. & HEINEGÅRD, D. Cartilage proteoglycan aggregate formation. Role of link protein. *Biochem.J.* 197(3): 669-74, 1981.

HAM, A.W. Tecido conjuntivo denso e cartilagem. In: *Histologia*. Ed. Guanabara Koogan, 1977, p. 310-317.

HARDINGHAM, T.E. & MUIR, H. The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. *Biochem.Biophys.Acta* 279: 401-405, 1972.

HARDINGHAM, T. & MUIR, H. Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation. *Biochem.J.* 138: 565-81, 1974.

HARDINGHAM, T.E.; EWINS, R.J.F. & MUIR, H. Cartilage proteoglycans. Structure and heterogeneity of the protein core and the effects of specific protein modifications on the binding to hyaluronate. *Biochem.J.* 157: 127-43, 1976.

HARDINGHAM, T.E.; BEARDMORE-GRAY, M.; DUNHAM, D.G. & RATCLIFE, A. Cartilage proteoglycans. In: CIBA, Foundation Symposium. *Functions of the Proteoglycans*. ed. David Evered and Julie Whelan. London, vol 124, 30-46, 1986.



HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal.Biochem.* 48: 422-27, 1972.

HASCALL, V.C. Interaction of cartilage proteoglycans with hyaluronic acid. *J.Supramol.Struct.* 7: 101-20, 1977.

HASCALL, V.C. *Biology of Carbohydrates*, NY Willey, ed. Ginsburg, P. Robbins, 1981 vol 1 p.:1-49,

HASCALL, V.C. Proteoglycans: The chondroitin sulfate/keratan sulfate proteoglycan of cartilage. *Atlas of Science: Biochemistry i*: 189-98, 1988.

HASCALL, V.C. & SAJDERA, S.W. Proteinpolysaccharide complex from bovine nasal cartilage. *J.Biol.Chem.* 244(9): 2384-96, 1969.

HASCALL, V.C. & SAJDERA, W. Physical properties and polydispersity of proteoglycan from bovine nasal cartilage. *J.Biol.Chem.* 245(19): 4920-30, 1970.

HASCALL, V.C. & RIOLO, K.L. Characteristics of the protein--keratan sulfate core and of keratan sulfate prepared from bovine nasal cartilage proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 247(14): 4529-38, 1972.

HASCALL, V.C. & HEINEGÅRD, D. Aggregation of cartilage proteoglycans I. The role of hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* 249(13): 4232-41, 1974a.

HASCALL, V.C. & HEINEGÅRD, D. Aggregation of cartilage proteoglycans II - oligosaccharide competitors of the proteoglycan-hyaluronic acid interaction. *J. Biol. Chem.* 249(13): 4242-49, 1974b.

HASCALL, V. & KIMURA, J. Proteoglycans isolation and characterization. *Methods in Enzymology* 82(A): 769-800, 1982.

HEDBOM, E. & HEINEGÅRD, D. Interaction of a 59 kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. *J. Biol. Chem.* 264(12): 6898-905, 1989.

HEINEGÅRD, D. Extration, Fractionation and Characterization of proteoglycans from bovine tracheal cartilage. *Biochim.Biophys.Acta.* 285: 181-92, 1972.

HEINEGÅRD, D. Polydispersity of cartilage proteoglycans. Structural variations with size and buoyant density of the molecules. *J.Biol.Chem.* 252(6): 1980-89, 1977.

HEINEGÅRD, D. & HASCALL, V. Aggregation of cartilage proteoglycans III. Characteristics of the proteins isolated from trypsin digests of aggregates. *J. Biol.Chem.* 249(13): 4250-56, 1974.

HEINEGÅRD, D. & AXELSSON, I. Distribution of keratan sulfate in cartilage proteoglycans. *J.Biol.Chem.* 252(6): 1971-79, 1977.

HEINEGÅRD, D. & HASCALL, C.V. Characteristics of the nonaggregating proteoglycans isolated from bovine nasal cartilage. *J.Biol.Chem.* 254(3): 927-34, 1979.

HEINEGÅRD, D. & PAULSSON, M. Structure and metabolism of proteoglycans. In: PIEZ, K.A. & REDDI, A.H.. *Extracellular Matrix Biochemistry*, 1 ed., New York, Elsevier Science Publishing CO, 1984, cap. 8, p. 277-328.

HEINEGÅRD, D. & PAULSSON, M. Structural and contractile proteins. *Methods in Enzymology* 145: 336-63, Part D, 1987.

HEINEGÅRD, D. & SOMMARIN, Y. Proteoglycans: An Overview. *Methods in Enzymology* 144: 305-72, 1987.

HEINEGÅRD, D. & OLDBERG, A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *Faseb J.* 3(9): 2042-51, 1989.

HEINEGÅRD, D.; PAULSSON, M.; INEROT, S. & CARLSTROM, C. A novel low-molecular-weight chondroitin sulfate proteoglycan isolated from cartilage. *Biochem.J.* 197(2): 355-66, 1981.

HEINEGÅRD, D.; SOMMARIN, Y.; HEDBOM, E.; WIESLANDER, J. & LARSSON, B. Assay of proteoglycan populations using agarose-polyacrilamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 151: 41-8, 1985a.

HEINEGÅRD, D.; WIESLANDER, J.; SHEEHAN, J.; PAULSSON, M. & SOMMARIN, Y. Separation and characterization of two populations of aggregating proteoglycans from cartilage. *Biochem.J.* 255: 95-106, 1985b.

HEWITT, A.T.; VARNER, H.H.; SILVER, M.H.; DESSAU, W.; WILKES, C.M. & MARTIN, G.R. The isolation and partial characterization of chondronectin, an attachment factor for chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 257(5): 2330-34, 1982.

INEROT, S. & HEINEGÅRD, D. Bovine traqueal cartilage proteoglycans. Variations in structure and composition with age. *Collagen Rel. Res.* 3: 245-62, 1983.

KIMURA, J.H.; HARDINGHAM, T.E.; HASCALL, V.C. & SOLURSH, M. Biosynthesis of proteoglycans and their assembly into aggregates in cultures of chondrocytes from the swarm rat chondrosarcoma. *J. Biol. Chem.* 254(8): 2600-09, 1979.

KIMURA, J.; HARDINGHAM, T. & HASCALL, V.C. Assembly of newly synthesized proteoglycan and link protein into aggregates in cultures of chondrosarcoma chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 255(15): 7134-43, 1980.

KLAUS, W. & OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244(16): 4406-12, 1969.

KJELLÉN, L.; PETTERSSON, I. & HOOK, M. Cell-surface heparan sulfate: an intercalated membrane proteoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78(9): 5371-75, 1981.

KRUSIUS, T.; GEHLSSEN, K.R. & RUOSLAHTI, E. A fibroblast chondroitin sulfate proteoglycan core protein contains lectin-like and growth factor-like sequences. *J. Biol. Chem.* 262(27): 13120-5, 1987.

de LUCCA, S.; LOHMANDER, L.S.; NILSSON, B.; HASCALL, V.C. & CAPLAN, A.J. Proteoglycans from chick lumb bud chondrocyte cultures: keratan sulfate and oligosaccharides with contain mannose and sialic acid. *J. Biol. Chem.* 255(13): 6077-83, 1980.

MATUKAS, V.J.; PANNER, B.J. & ORBISON, J. Studies on ultrastructural identification and distribution of protein-polysaccharide in cartilage matrix. *J. Cell. Biol.* 32: 365-77, 1967.

McKEOWN-LONGO, P.J.; SPARKS, K.J. & GOETINCK, P.F.  
Physical and immunochemical properties of low-  
buoyant-density proteoglycans from avian cartilage.  
*Arch.Biochem.Biophys.* 212(1): 216-28, 1981.

MICHELACCI, Y.M. & HORTON, D.S.P.Q. Proteoglycans from  
the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna*  
*lewini*. *Comp. Biochem.Physiol.* 92 B(4): 651-58,  
1989.

MICHELACCI, Y.M.; LAREDO, J. & DIETRICH, C.P.  
Proteoglycans and chondroitin sulfates from human  
multiple chondroma (enchondromatosis). *J.Med.Biol.*  
*Res.* 14: 161-72, 1981.

MINNS, R.J. & STEVEN, F.S. The collagen fibril  
organization in human articular cartilage. *J.Anat.*  
123(2): 437-57, 1977.

NEAME, P.J.; PÉRIN, J.; BONNET, F.; CHRISTNER, J.E.;  
JOLLÈS, P. & BAKER, J.R. An amino acid sequence  
common to both cartilage proteoglycan and link  
protein. *J.Biol.Chem.* 260(23): 12402-04, 1985.

NORO, A.; KIMATA, K.; DIKE, Y.; SHINOMURA, T.; MAEDA, N.; YANO, S.; TAKAHASHI, N. & SUZUKI, S. Isolation and characterization of a third proteoglycan (PG-LZ) from chick embryo cartilage which contains disulfide-bonded collagenous polypeptide. *J. Biol. Chem.* 258(15): 9323-31, 1983.

DEGEMA, T.R.; HASCALL, V. & DZIEWIATKOWSKI, D. Isolation and characterization of proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. *J. Biol. Chem.* 250(15): 6151-59, 1975.

DEGEMA, T.R.; HASCALL, V. & EISENSTEIN, R. Characterization of bovine aorta proteoglycan extracted with guanidine hydrochloride in the presence of protease inhibitors. *J. Biol. Chem.* 254(4): 1312-18, 1979.

OHYA, T. & KANEKO, Y. Novel hyaluronidase from *Streptomyces*. *Biochem. Biophys. Acta.* 198: 607-9, 1970.



OIKE, Y.; KIMATA, K.; SHINOMURA, T. NAKAZAWA, K. & SUZUKI, S. Structural analysis of chick-embryo cartilage proteoglycan by selective degradation with chondroitin lyases (chondroitinases) and endo- $\beta$ -D-galactosidase (keratanase). *Biochem.J.* 191: 193-207, 1980.

OLDBERG, A.; KJELLÉN, L. & HOOK, M. Cell-surface heparan sulfate. Isolation and characterization of a proteoglycan from rat liver membranes. *J.Biol.Chem.* 254(17): 8505-10, 1979.

OLDBERG, A.; ANTONSSON, P.; LINDBLOM, K. & HEINEGARD, D. A collagen-binding 59-kD protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *EMBO J.* 8(9): 2601-4, 1989.

OLDBERG, A.; ANTONSSON, P.; HEDBOM, E. & HEINEGARD, D. Structure and function of extracellular matrix proteoglycans. *Biochem.Soc.Trans.* 18: 789-92, 1990.

PAL, S.; DOGANGES, P.T. & SCHUBERT, M. The separation of new forms of the protein polysaccharides of bovine nasal cartilage. *J.Biol.Chem.* 241(18): 4261-66, 1966.

PASTERNAK, S.G.; VEIS, A. & BREEN, M. Solvent-dependent changes in proteoglycan subunit conformation in aqueous guanidine hydrochloride solutions. *J. Biol. Chem.* 249(7): 2206-11, 1974.

PAULSSON, M. & HEINEGÅRD, D. Matrix proteins bound to associatively prepared proteoglycans from bovine cartilage. *Biochem. J.* 183: 539-45, 1979.

PAULSSON, M. & HEINEGÅRD, D. Purification and structure characterization of a cartilage matrix protein. *Biochem. J.* 197: 367-75, 1981.

PAULSSON, M.; MORGELIN, M. & WEIDEMANN, H. Extended and globular protein domains in cartilage proteoglycans. *Biochem. J.* 245: 763-72, 1987.

PERIN, J.; BONNET, F.; THURIEAU, C. & JOLLES, P. Link protein interactions with hyaluronate and proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 262(27): 13296-72, 1987

PFAFFLE, M.; RUGGIERO, F.; HOFMANN, H.; FERNÁNDEZ, M. D.; SELMIN, D.; YAMADA, Y.; GARRONE, R. & von der MARK, K. Biosynthesis, secretion and extracellular localization of anchorin C11, a collagen-binding protein of the calpactin family. *EMBO J.* 7: 2335-42, 1988.

PROCTOR, A.R. Fibronectin: A brief overview of its structure, function and physiology. *Rev. Inf. Dis.* 9 suppl. 4: 317-21, 1987.

RAPRAEGER, A.; JALKANEN, M.; ENDO, E.; KODA, J. & BERNFIELD, M. The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. *J. Biol.Chem.* 260(20): 11046-52, 1985.

ROBINSON, H.C. & HOPWOOD, J.J. The alkaline cleavage and borohydride reduction of cartilage proteoglycan. *Biochem.J.* 133: 457-70, 1973.

ROSENBERG, L.C.; CHOI, H.U.; TANG, L.; JOHNSON, T.L.; PAL, S.; WEBBER, C.; REINER, A. & POOLE, R. Isolation of dermatan sulfate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. *J. Biol. Chem.* 260(10): 6304-13, 1985.

ROSENBERG, L.; TANG, L.; PAL, S.; JOHNSON, T.L. & CHOI, H.U. Proteoglycans of bovine articular cartilage. Studies of the direct interaction of link with hialuronate in the absence of proteoglycan monomer. *J.Biol.Chem.* 263(34): 18071-7, 1988.

ROSS, A.H.; COSSU, G.; HERLYN, M.; BELL, J.R.; STEPLEWSKI, Z. & KOPROWSKI, H. Isolation and chemical characterization of a melanoma-associated proteoglycan antigen. *Arch.Biochem.Biophys.* 225(1): 370-83, 1983.

ROUGHLEY, J.P. & MASON, M.R. The electrophoretic heterogeneity of bovine nasal cartilage proteoglycans. *Biochem.J.* 157: 357-67, 1976.

SAKLATVALA, J. The noncollagenous matrix of cartilage. Structure physiology and changes with age and disease. In: *Scientific basis of Rheumatology*, Ed. G.S. Panayi, cap. 10, p. 159-78, 1982.

SAJDERA, W.S. & HASCALL, C.V. Protein polysaccharide complex from bovine nasal cartilage. *J.Biol.Chem.* 244(1): 77-87, 1969.

SHINOMURA, T.; KIMATA, K.; OIKE, Y.; NORO, A.; HIROSE, N.; TANABE, K. & SUZUKI, S. The occurrence of three different proteoglycan species in chick embryo cartilage. Isolation and characterization of a second proteoglycan (PG-Lb) and its precursor form. *J.Biol.Chem.* 258(15): 9314-22, 1983.

SHULMAN, H.J. & MEYER, K. Protein-polysaccharide of chicken cartilage and chondrocyte cell cultures. *Biochem.J.* 120: 689-97, 1970.

SKERRY, T.M.; SUSWILLO, R.; EL HAJ, A.J.; ALI, N.N.; DODDS, R.A. & LANYON, L.E. Load-induced proteoglycan orientation in bone tissue in vivo and in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 46: 318-26, 1990.

SOMMARIN, Y.; LARSSON, T.; HEINEGÅRD, D. Chondrocyte-matrix interactions. Attachment to proteins isolated from cartilage. *Exp.Cell.Res.* 184(1): 181-92, 1989.

STANESCU, V.; MAROTEAUX, P. & SOBCZAK, E. Proteoglycan populations of baboon (*papio papio*) cartilages from different anatomical sites. Gel eletrophoretic analysis of dissociated proteoglycans and of fractions obtained by density gradient centrifugation. *Biochem Biophys. Acta.* 629: 371-81, 1980.

THYBERG, J.; LOHMANDER, S. & HEINEGÅRD, D. Proteoglycans of hialine cartilage. Electron-microscopic studies on isolated molecules. *Biochem. J.* 151: 157-66, 1975.

van der REST, M. & MAYNE, R. Type IX collagen proteoglycan cartilage is covalently cross-linked to type II collagen. *J. Biol. Chem.* 263(4): 1615-8, 1988.

VIDAL, B.C. Pleochroism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides. *Protoplasma*: 529-36, 1963.

VIDAL, B. C. The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of the collagen. *Protoplasma*: 472-9, 1964.

VIDAL, B. C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell. Mol. Biol.* 22: 45-64, 1977.

VIDAL, B.C. The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cell. Mol. Biol.* 26: 415-21, 1980.

VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. *Cell.Mol.Biol.* 30(3): 195-204, 1984

VIDAL, B.C. & VILARTA, R. Articular cartilage: Collagen II - Proteoglycans interactions. Availability of reative groups. Variation in birrefringence and differences as compared to Collagen I. *Acta.Histochem.* 83: 189-205, 1988.

WEIDEMANN, H.; PAULSSON, M.; TIMPL, R.; ENGEL, J.; HEINEGÅRD, D. Domain structure of cartilage proteoglycans revealed by rotary shadowing of intact and fragmented molecules. *Biochem. J.* 224: 331-3, 1984.

YANAGISHITA, M. & HASCALL, V.C. Proteoglycans synthesized by rat ovarian granulosa cells in culture. Isolation, fractionation and characterization of proteoglycans associated with the cell layer. *J.Biol.Chem.* 259(16): 10260-60, 1984.

ZINGALES, B. Analysis of protein by sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel eletrophoresis. In: MOREL, C.M. Genes and antigens of parasites. Rio de Janeiro, Fiocruz, 1984. 357-63.