



PAULA BELLINE

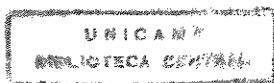
“ANÁLISE DOS PROTEOGLICANOS E PROTEÍNAS NÃO COLAGÊNICAS PRESENTES NAS CARTILAGENS DO TIBIOTARSO E TARSOMETATARSO DE FRANGO.”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Paula Belline e aprovada pela Comissão Julgadora.

22/4/96 Laurecir Gomes
Jaime B. Schuster
Assessor

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

Orientadora
Profa. Dra. Laurecir Gomes
Campinas
1996



96 01006

UNIDADE	8C
CHAMADA:	T/UNICAMP
	B417a
E.	
NO	01/27558
DOC.	667/96
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	01/05/96
CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

B417a Belline, Paula
Análise dos proteoglicanos e proteínas não colagênicas presentes nas cartilagens do tibiotarso e tarsometatarso de frango / Paula Beline. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Laurecir Gomes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

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

Local e Data: Campinas, 02/04/1996

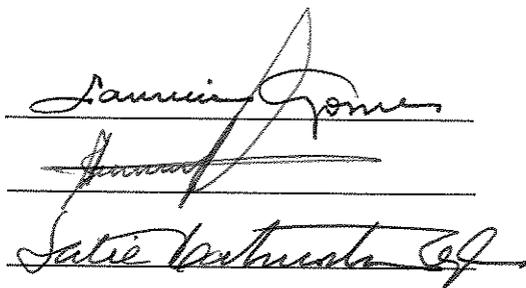
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof.Dr. LAURECIR GOMES (Orientador)

Prof.Dr. EDSON ROSA PIMENTEL

Prof.Dr. SATIE HATSUSHIKA OGO



Three handwritten signatures are written on horizontal lines. The first signature is 'Laurecir Gomes', the second is 'Edson Rosa Pimentel', and the third is 'Satie Hatsushika Ogo'.

SUPLENTE:

Profa.Dra. MARIA LÚCIA FURLAN WADA



A horizontal line is drawn below the name of the substitute, indicating the space for a signature.

APROVADA

*Dedico este trabalho
aos meus pais Idalina
e Antonio, com muito
carinho.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Laurecir Gomes, pela orientação, apoio e incentivo na realização deste trabalho, que me fez crescer muito como pessoa e como profissional, além da amizade e carinho sempre dispensados.

Ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel, pelas críticas e sugestões que aprimoraram ainda mais este trabalho, e pela atenção e carinho.

À Prof. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada pelas sugestões feitas na análise prévia deste trabalho.

À Profa. Dra. Satie H. Ogo, pelas discussões e sugestões feitas na análise prévia da tese.

Aos Professores do Departamento de Biologia Celular pelo imenso apoio e carinho.

À Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder pela revisão dos manuscritos em inglês.

À Profa. Dra. Urara Kawazoe pelo fornecimento das aves utilizadas para o estudo.

À Profa. Dra. Olga M. S. Toledo pelas sugestões e colaborações no trabalho.

Aos funcionários do Departamento, especialmente à Klélia pela ajuda na revelação e ampliação das fotos.

Aos secretários Cidinha, Lilian e Sidney pela paciência, atenção e amizade sempre dispensadas.

À amiga Selma pela amizade, ajuda e incentivo para a realização do curso.

Aos amigos do Departamento: Daniela, Estela, Luciana, Marcelo, Nazário, Silvy, Cris Begnami, Chris Bertachini, Sérgio, Flávia, Fernando, Márcio, Maurício, Guido, Patrícia, Arnaldo, Marco, Lucianne, Zé Ricardo, Odair, Luís Fernando, Jeannie e Alexandre.

Às amigas Lu, Sonia, Fer e Adrianinha, pela grande amizade, carinho e boas risadas.

À todos amigos do Centro Médico Especializado que de alguma maneira sempre me incentivaram.

À CAPES e ao FAEP pelo apoio financeiro.

ABREVIATURAS

AH	ácido hialurônico
AT	azul de toluidina
AU	ácido urônico
CETAVOLON	n, cetyl, n, n, n, trimetil amoniun bromide
CHASE	condroitinase
CMP	proteína de matriz de cartilagem
COMP	proteína oligomérica de matriz cartilaginosa
Col	colágeno
CS	condroitim sulfato
DEAE	dietilaminoetil
DMMB	1,9-dimethyl-methylene blue
DS	dermatam sulfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FM	fibromodulim
GAG	glicosaminoglicano
Gu-HCl	cloreto de guanidina
HS	heparam sulfato
kDa	kilodalton
mA	miliampère
2-Me	2- mercaptoetanol
MEC	matriz extracelular
Mr	massa molecular relativa
MW	peso molecular
PG	proteoglicano
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
QS	queratam sulfato
Rf	fator de regressão
RPM	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS- PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
TE	extrato total
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletlenodiamina
TMT	tarsometatarso
TT	tibiotarso
Vo	volume morto
Vt	volume total

SUMÁRIO

Introdução	1
Material e métodos	11
1. Reagentes	11
2. Obtenção da cartilagem articular	13
3. Extração dos componentes de matriz	14
4. Ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl)	14
5. Dosagens	15
5.1- Proteínas	15
5.2- GAGs	15
6. Digestão enzimática	15
6.1- Papaína	15
6.2- Condroitinase (Chase)	16
7. Cromatografias	16
7.1- Cromatografia de troca iônica	16
7.2- Cromatografia de exclusão em gel filtração	17
8. Eletroforeses	17
8.1- Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	17
8.2- Eletroforese em gel de agarose-poliacrilamida	19
8.3- Eletroforese em gel de agarose-propileno	19
9. Transferência eletroforética de proteínas para nitrocelulose (“immunoblotting”)	20
Resultados	21
1. Dosagem de proteína	21
2. Dosagem de ácido urônico	21
3. Análise da fração D4 das regiões tibiotarso e tarsometatarso após cromatografia e eletroforese	21

3.1- Região tibiotarso (TT)	21
3.2-Região tarsometatarso (TMT)	26
4. Identificação de FM na fração D4	29
5. Análise da fração D1 das regiões TT e TMT após cromatografia e eletroforese	29
5.1- Região tibiotarso (TT)	29
5.2- Região tarsometatarso (TMT)	34
6. Análise do digesto com papaína em gel de agarose-propileno	34
Discussão	38
Conclusão	45
Resumo	46
Abstract	48
Bibliografia	50

INTRODUÇÃO

A cartilagem é um tipo de tecido conjuntivo, composto predominantemente por uma matriz intercelular com poucas células, os condrócitos. A integridade dessa matriz é responsável pela manutenção da propriedade mecânica do tecido cartilaginoso (Lohmander, 1988). Os condrócitos são responsáveis pela síntese, manutenção e renovação gradual da matriz extracelular (MEC). A função fisiológica da cartilagem articular é resistir às forças de compressão e dissipar as forças de peso e movimento aplicadas à junta (Caterson, 1991). Em adultos, a cartilagem é avascular, aneural e alinfática (Buschamn et al., 1992). Sua composição molecular é complexa e suporta toda força de compressão que o tecido está sujeito (Heinegård & Paulsson, 1987). A MEC é composta por fibras de colágeno (50 - 60% do peso seco do tecido) contendo principalmente colágeno tipo II (Eyre, 1991) e pequenas quantidades de colágeno do tipo IX e XI, proteoglicanos (PGs) (30 - 35% do peso seco) e glicoproteínas (Heinegård & Oldberg, 1989; Buschamn et al., 1992).

O colágeno é um dos principais componentes da MEC. É uma molécula que proporciona suporte e força de tensão à vários tecidos dos vertebrados, como pele, osso, tendão e córnea (Linsenmayer, 1983). Já estão descritos 18 tipos de colágenos (Van Der Rest & Garrone, 1991; Mayne & Brewton, 1993). Todos eles possuem em comum uma região de tripla hélice. Esta região contém duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$, contendo aproximadamente 1000 aminoácidos, formando 95% da molécula. Estas cadeias são compostas por uma sequência de Gly-x-y, onde x é frequentemente prolina e y hidroxiprolina. Estas cadeias formam uma estrutura helicoidal que é estabilizada por pontes de hidrogênio intercadeia. A região terminal da molécula, que não apresenta conformação em tripla hélice, apresenta uma importante função, pois sítios que apresentam hidroxilisina

formam ligações cruzadas intra e intermoleculares, permitindo a formação de fibrilas (Linsenmayer, 1983). Devido à isso, as fibrilas colagênicas são altamente resistentes, proporcionando forma e força de tensão ao tecido, enquanto que os PGs hidratam o tecido para manter o volume e resistência às forças de compressão (Hascall, 1981). Com isso, as fibras colagênicas e sua organização na MEC participam da propriedade funcional do tecido (Hardingham et al., 1986; Heinegård & Oldberg, 1989).

A elasticidade e resistência da cartilagem é devido ao conteúdo elevado de PGs presentes no tecido (Franzén et al., 1981), onde contribuem na organização e nas propriedades físicas da MEC (Hascall, 1981). Os PGs da MEC têm a propriedade física de criar um compartimento hídrico, pois sua carga negativa atrai íons osmoticamente ativos (Hardingham & Fosang, 1992), e mantêm o volume e resistência às forças de compressão (Hascall, 1981). Esta turgescência é controlada por fibras colagênicas que evitam expansão excessiva do tecido.

Os PGs não estão presentes só na MEC mas também intracelularmente e em superfícies celulares (Lonhmander, 1988). Os PGs de cartilagem hialina são glicoproteínas com uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) ligadas covalentemente a um esqueleto protéico central. São conhecidos quatro grupos de GAGs: ácido hialurônico (AH); condroitim sulfato (CS)/dermatam sulfato (DS) ; heparam sulfato (HS)/heparina e queratam sulfato (QS) (Heinegård & Paulsson, 1984). Os GAGs são polissacarídeos carregados negativamente, isto é, apresentam grupos sulfato e carboxila, exceto o AH que não possui grupo sulfato.

Vários PGs que têm a capacidade de se ligar à uma molécula de AH formando um agregado de PGs, que é conhecido como agregam (Franzén et al., 1981). Este é o maior componente da cartilagem com Mr de $1-4 \times 10^6$ (Heinegård & Oldberg, 1989). O tamanho deste agregado é determinado pelo comprimento do AH e também pelo número de PGs

associados (Hascall & Sajdera, 1969; Hascall & Heinegård, 1974; Hardingham et al., 1986). A proporção PG/AH varia de 10 a 30 PGs associados à cadeia de AH (Hardingham & Muir, 1972). A principal função biológica do agregam é dar resistência à cartilagem (Upholt et al., 1993).

Os PGs isolados de cartilagens hialinas, têm uma estrutura assimétrica e contêm regiões com diferentes composições (Heinegård & Axelsson, 1977; Heinegård & Hascall, 1979). Uma das extremidades da molécula contém uma porção de aminoácidos (60 a 80 kDa) que interage especificamente com o AH, não contém cadeias polissacarídicas sendo essencial para a formação de agregados (Heinegård & Hascall, 1974; Heinegård, 1977; Hardingham et al., 1986). O sítio de ligação para interagir com o AH é específico, porém é estabilizado por proteínas de ligação (Hardingham et al., 1986). A proteína de ligação (44 - 48 kDa) é rica em aminoácidos aromáticos, tirosina e fenilalanina, os quais devem contribuir para a hidrofobicidade dos PGs (Caterson & Baker, 1979; Neame et al., 1985). A outra extremidade do esqueleto protéico é rica em cadeias de CS (100 kDa) ligados covalentemente. Esta região contém 90% do peso seco da molécula, sendo importante para a função dos PGs e para a manutenção das características físicas da cartilagem (Heinegård, 1977; Lohmander, 1988). As cadeias de CS de cartilagem de disco intervertebral e septo nasal podem variar tanto no seu comprimento como na posição de seus radicais sulfato (Robinson & Hopwood, 1973). Entre a região rica em CS e a região de ligação ao AH, encontra-se uma região rica em QS com 30 a 60 cadeias (20 a 25 kDa) e oligossacarídeos O-ligados (Heinegård, 1977; de Lucca et al., 1980; Hascall, 1981; Heinegård & Paulsson, 1984).

As diferenças no tamanho do esqueleto protéico, na quantidade de cadeias laterais de GAGs e no comprimento destas cadeias são responsáveis pela polidispersidade de uma população de PGs (Hascall & Sajdera, 1970 ; Hascall & Riolo, 1972; Heinegård, 1977;

Heinegård & Paulsson, 1984). A quantidade de GAGs varia entre as diferentes zonas de uma mesma cartilagem. Por exemplo, em cartilagem articular bovina, os PGs da superfície (200 µm de profundidade) diferem daqueles de camadas mais profundas (240 - 1040 µm). Nas camadas profundas próximas à junção cartilagem-osso, os PGs são de tamanho menor, a região rica em CS diminui e contém uma quantidade maior de PGs não agregantes. Nas camadas superficiais, a quantidade de CS é menor e quase todos os PGs interagem com o AH (Franzén et al., 1981).

Além dos PGs agregantes, a cartilagem contém ainda PGs de alto peso que não se ligam ao AH. Estes representam um grupo distinto com algumas semelhanças estruturais. Enquanto os PGs agregantes representam 50 - 85% dos PGs presentes em diferentes cartilagens, os não agregantes representam 10 - 40%. Estes últimos são encontrados em maior quantidade em disco intervertebral e cartilagem articular e menor quantidade na cartilagem nasal (Heinegård & Sommarin, 1987).

Outra população de PGs são os de baixo peso, representando 10% do conteúdo de PGs da cartilagem. Não interagem com o AH e a composição de aminoácidos é diferente dos grandes PGs (Heinegård et al., 1981). Os PGs de baixo peso são decorim (PG-S2, PG II, PG 40), biglicam (PG-S1, PG I) e fibromodulim (FM) ou proteína de 59 kDa (Heinegård & Oldberg, 1989). Decorim e biglicam são encontrados principalmente em pele, tendão, esclera e cartilagem (Rosenberg et al., 1991; Choi et al., 1989). O decorim tem sido encontrado associado às fibrilas de colágeno (Scott & Orford, 1981), e há indícios de que é capaz de inibir sua fibrilogênese. Ambos ligam-se também à fibronectina e inibem sua adesão ao fibroblasto (Choi et al., 1989). A proteína central possui Mr de 40.000 daltons, são estruturalmente relacionadas e geneticamente distintas (Heinegård et al., 1985; Hedbom & Heinegård, 1993). O decorim contém uma sequência repetitiva de 25 aminoácidos e uma cadeia simples de CS ou DS ligada à extremidade N-terminal da proteína (Mann et al.,

1990). Biglicam contém duas cadeias de CS ou DS localizadas na mesma extremidade da molécula. Identificado em superfícies celulares e na região pericelular, estando envolvido na morfogênese e diferenciação (Hardingham & Fosang, 1992; Kresse et al., 1993). Estes pequenos PGs foram primeiramente isolados da cartilagem nasal (cadeias de CS), sendo encontrados também em cartilagem articular (cadeias de DS) (Heinegård & Sommarin, 1987). O FM apresenta 4 cadeias de QS em um domínio central e vários resíduos de tirosina sulfatados na porção N-terminal (Oldberg et al., 1989). Em tendão, o FM e o decorim parecem interagir com o colágeno e interferir em sua fibrilogênese (Heinegård & Sommarin, 1987; Hedlund et al., 1994). Assim podem alterar a interação fibrila-fibrila e fibrila-constituintes da matriz (Oldberg et al., 1990). Devido à este efeito inibitório na formação das fibrilas de colágeno, recebeu o nome de FM (Kresse et al., 1993). Em cartilagem xifóide de frango, FM foi encontrado principalmente na região central (carina), podendo estar relacionado com a maior presença de força de compressão que ocorre nesta região (Gomes & Pimentel, 1994). O FM também já foi encontrado em cartilagem articular bovina (Heinegård et al., 1986). Eletroforese da cromatografia da fração D4 da tíbia e região da crista da face patelar do fêmur, indicam que este PG se apresenta na forma de um agregado sob condições não redutoras (Esquisatto, manuscrito em preparação).

A MEC contém ainda uma série de proteínas não colagênicas, tais como: proteína de 58 kDa, fibronectina, proteína de 148 kDa ou proteína da matriz da cartilagem (CMP), proteína oligomérica de matriz cartilaginosa com alto peso molecular (COMP), proteína de 21 kDa (Ch 21), proteína de 36 kDa, ancorim, condrocalcim, tenascina, trombospondim, proteína catiônica de baixo peso (PARP) (Heinegård & Pimentel, 1992). Anagnostides e colaboradores (1990) isolaram da cartilagem esternal de frango outras duas glicoproteínas com Mr de 92 e 56 kDa. Estas glicoproteínas apresentam uma composição diferente de aminoácidos e carboidratos, e por imuniquímica, comprovaram que não fazem parte de

moléculas maiores, nem apresentaram uma estrutura parecida com outras proteínas já conhecidas. Embora tenham sido descritas, ainda não se sabe o papel da maioria dessas glicoproteínas na matriz. A tenascina-C, uma grande glicoproteína da MEC, está associada à cartilagem articular e ao desenvolvimento do tecido das articulações. Esta proteína também interage com as células através de receptores como sindecans e integrinas. Koyama e colaboradores (1995), em estudo com embrião de frango mostraram que sindecam-3 e tenascina-C estão presentes em cartilagens como da traquéia e estão envolvidos no desenvolvimento do esqueleto, pois são encontrados em cartilagens de embriões e recém-nascidos.

Hoje acredita-se que as moléculas de colágeno, PGs e proteínas não colagênicas, juntas, são responsáveis pela organização estrutural e funcional dos tecidos conjuntivos em geral.

Estão sendo estudadas as propriedades mecânicas dos tecidos conjuntivos especialmente cartilagens, e tudo indica que estas propriedades estão relacionadas à organização molecular, principalmente de colágeno e PGs (Vidal & Vilarta, 1988; Skerry et al., 1990). Reconhecimento e adesão são essenciais para a célula detectar a concentração, os tipos de macromoléculas da MEC, como também a variação bioquímica que ocorre de acordo com a função do tecido conjuntivo (Vidal, 1993). Os PGs contribuem para a organização molecular do tecido graças à sua própria estrutura e a capacidade de interação com outros componentes da MEC (Vidal & Mello, 1984; Vidal, 1993).

Doenças como artrite reumatóide, osteoartrite e outras, podem afetar a integridade normal da cartilagem. Como consequência há uma grande perda de PGs e outras glicoproteínas de cartilagem. A perda de interação entre as macromoléculas da MEC leva à uma destruição mecânica do tecido e à remoção completa da cartilagem da superfície da junta. A cartilagem articular de frango tem sido usada como modelo experimental para a

indução de artrose (Graf et al., 1993), porém a ultraestrutura desta cartilagem é pouco conhecida. Graf e colaboradores (1993) realizaram estudos de microscopia de luz e eletrônica dessa cartilagem e compararam com a cartilagem articular de mamíferos. O arranjo das fibras colagênicas, as características da superfície articular, o número e as características dos condrócitos, foram diferenças encontradas entre as cartilagens articulares humana e de frango. Sendo assim, concluíram que modelos utilizando frangos não são adequados, em nível de comparação, para estudos de degeneração da articulação humana. Itay e colaboradores (1987), fizeram uma breve descrição histológica da cartilagem articular de frangos. O côndilo tibial é recoberto por uma cartilagem com $0,35 \pm 0,1$ mm de espessura, dividido em 3 zonas. A camada superficial com pequenos condrócitos embebidos em uma MEC, a zona intermediária com 5 a 7 camadas de células em uma matriz hialina, e a zona profunda com 8 a 11 camadas celulares onde os condrócitos se arranjam em grupos isogênicos.

Em bípedes, para estabilizar a junta é necessário um forte ligamento colateral, um processo extensor anterior na tibia e o ligamento intra-articular (Van Sickle & Kincaid, 1978). A leveza e a resistência são os principais aspectos exibidos pela maior parte do esqueleto das aves. A resistência e a rigidez são atingidas pela fusão dos ossos. Os társicos e metatársicos da perna exibem a fusão e a supressão associadas. Deste modo, pode-se falar de tibiotarso (TT) seguido por um tarsometatarso (TMT) (Fig. 1).

O TT é o maior dos ossos da perna. Ele é caracterizado por côndilos para a articulação com o fêmur na região proximal. A parte lateral do eixo superior apresenta uma crista para inserção da fíbula. A extremidade distal do TT, apresenta côndilos proeminentes para a articulação com o TMT.

O TMT adulto é caracterizado, na região proximal pela presença de cotilas interna e externa para a articulação com o TT (Feduccia, 1981).

As aves apresentam um menisco medial em forma de C e um lateral menor, intacto e elíptico. O menisco lateral não está ligado posteriormente ao fêmur ou à tíbia apresentando maior mobilidade que o medial que está preso anteriormente e posteriormente (Barnett, 1954; Van Sickle & Kincaid, 1978). O menisco é formado por uma fibrocartilagem onde a força de tensão é menor que no tendão, porém maior que na cartilagem hialina. Quanto a força de compressão é semelhante à cartilagem hialina, porém menos intensa (Benjamin & Evans, 1990).

Apesar de conhecido o aspecto anatômico desta região articular das aves, pouco se sabe sob o aspecto bioquímico. Devido à isso, procuramos iniciar um estudo bioquímico da MEC que compõe esta cartilagem articular.

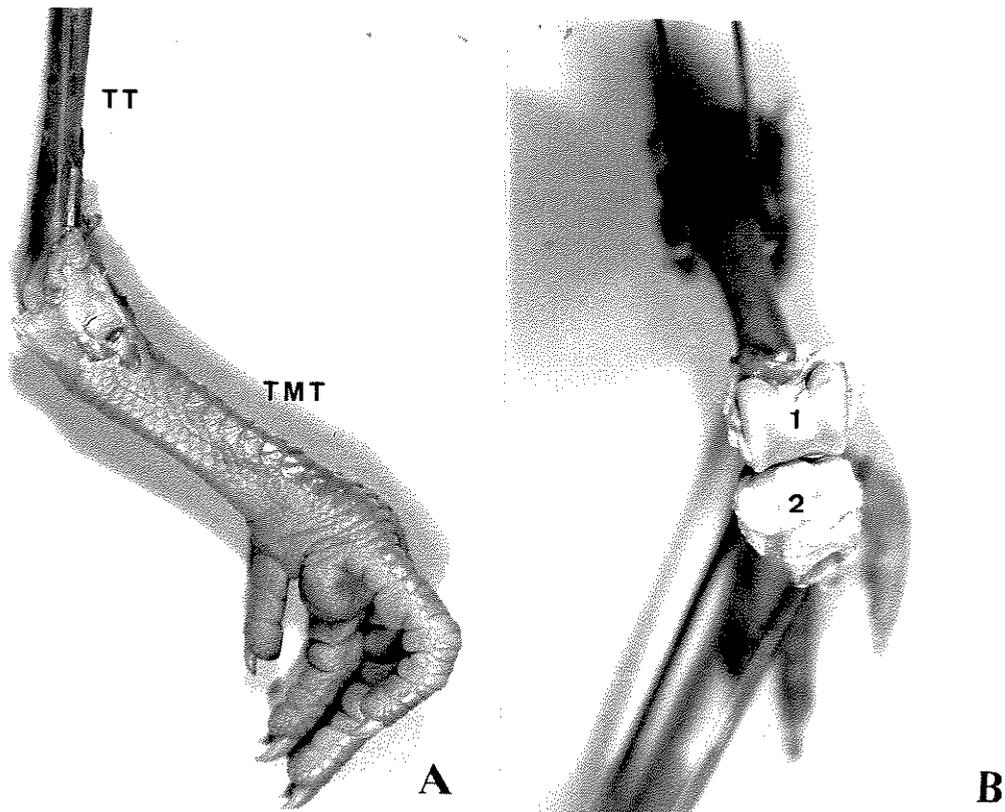


Fig. 1: Aspectos anatômicos do tornozelo de frango. Em A pode ser visto o tibiotarso (TT) e tarsometatarso (TMT). Em B1 a cartilagem que recobre a porção distal do TT e em B2 a porção proximal do TMT.

Objetivos:

Nosso trabalho teve como finalidade:

- 1- Determinar o conteúdo de proteína e ácido urônico presente na MEC de cartilagens articulares da região distal do TT e região proximal do TMT.
- 2- Detectar as proteínas não colagênicas e pequenos PGs da MEC de cada região.
- 3- Identificar os tipos de GAGs presentes em cada região.
- 4- Caracterizar os PGs das duas regiões.
- 5- Estabelecer a relação entre a composição da MEC da cartilagem articular da região distal de TT e da região proximal de TMT, com a força de compressão presente na articulação estudada.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Reagentes

- Aldrich Chemical Company: Propileno-diamino

Azul de dimetilmetileno (DMMB)

- Bio-Rad: Agarose

- Carlo Erba: Tiosulfato de sódio

Fosfato de sódio monobásico e bibásico

Fosfato de potássio monobásico e bibásico

Sulfito de sódio

- Chemco: Glicerina

Ácido acético glacial

- Chimie Test: Persulfato de amônio

- Ecibra Reagentes Analíticos: Glicina

Uréia

Citrato de sódio

- Gurr: Azul de alcian

- Merck: Agarose

Tris-hidroximetil aminometano

Etanol

Metanol

Ácido sulfúrico

Acetona

Nitrato de prata

Azul de toluidina

N-Cetyl, N, N, N, trimetil amoniun bromide (Cetavlon)

Éter de petróleo

- Pharmacia: Padrão de peso molecular (MW)

Dietilaminoetil-Sephacel (DEAE-Sephacel)

Sepharose CL-6B

- Reagen Quinbás Indústrias Químicas S/A: Acetato de sódio

- Sigma Chemical CO: Acrilamida

Carbazol

N-N'- metileno-bis-acrilamida

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

N,N,N',N'- tetrametilenodiamina (TEMED)

Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF)

2-Mercaptoetanol (2-Me)

Cloreto de guanidina (Gu-HCl)

Cloreto de césio (CsCl)
Condroitinase AC (Chase AC)
Condroitinase ABC (Chase ABC)
Tween 20
Glucuronolactona

- Synth: Ácido fosfórico

- Vetec: Azul de Bromofenol

Carbonato de sódio

Cloreto de sódio

Formaldeído

2. Obtenção da Cartilagem Articular

A cartilagem articular fresca foi obtida de frangos com aproximadamente 45 dias de idade, linhagem Hy-line. As cartilagens retiradas das regiões distal do TT e proximal do TMT foram picadas e homogeneizadas com solução de PBS (NaCl 0,15M, tampão fosfato de sódio 5mM pH 7,4). A homogeneização foi realizada em banho de gelo, durante 1 minuto por 3 vezes, com 30 segundos de intervalo. Após centrifugação o precipitado foi utilizado para extração.

3. Extração dos Componentes de Matriz

A extração foi com Gu-HCl 4M em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,8 contendo inibidores proteolíticos: PMSF 1mM e EDTA 10mM. A proporção empregada foi de 15ml de solução de Gu-HCl para cada grama de cartilagem. As extrações foram realizadas a 4°C durante 24 horas sob agitação constante. Após este tempo, o material foi centrifugado à 20.000 RPM durante 30 minutos a 4°C (Rotor JA - 20 , Beckman). O sobrenadante, contendo o material extraído, e o precipitado foram estocados separadamente a -20°C.

4. Ultracentrifugação em Gradiente de Cloreto de Césio (CsCl)

A centrifugação em CsCl foi feita segundo Hascall & Sajdera (1969). Após obtenção do extrato com Gu-HCl 4M foi adicionado 0,35g de CsCl/g de extrato, de modo que a densidade ficou em torno de 1,35g/ml. A centrifugação foi a 34.000 RPM (r_{av} 62,5mm, 80.000g) a 15°C durante 62 horas (Rotor 80 Ti , Beckman). Após centrifugação cada tubo foi dividido em quatro partes iguais e as frações denominadas D1 (fundo do tubo), D2, D3 e D4 (topo do tubo) (Heinegård & Sommarin, 1987). As frações foram estocadas a -20°C.

5. Dosagens

5.1 - Proteínas

A dosagem de proteína do extrato total e das frações D1,D2,D3 e D4 foi feita pelo método de Bradford (1976), utilizando o espectrofotômetro HP - 8452A. A leitura foi feita em 595nm. Uma curva padrão foi utilizada com BSA nas seguintes concentrações: 100, 200, 400, 800 e 1.000 µg/ml.

5.2 - GAGs

O conteúdo de ácido urônico (AU) do extrato total e das frações obtidas após o gradiente de CsCl foi determinado pelo método de carbazol segundo Dische (1947). Uma curva padrão foi utilizada com glucuronolactona nas seguintes concentrações: 5, 10, 40 e 100 µg/ml. A leitura foi feita em espectrofotômetro Spektromon 195 D em 530nm.

A quantidade de GAGs sulfatados presentes nas frações após cromatografia de gel filtração foi determinada pelo método do DMMB segundo Farndale et al., (1986). A leitura foi feita em 525nm, utilizando o espectrofotômetro HP - 8452A.

6. Digestão Enzimática

6.1 - Papaína

A extração total dos GAGs foi feita a partir de 1g de cartilagem para 15ml de solução. A degradação da parte protéica foi feita com papaína (40mg/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 a 20.000 RPM (Rotor JA - 20 , Beckman) por 30 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 2 volumes de etanol. Após 24 horas a 4°C, o precipitado foi coletado por centrifugação, a 18.000 RPM (Rotor JA - 20 , Beckman) por 10 minutos, e lavado com 15ml de acetona. O precipitado foi recuperado por centrifugação, secado em estufa a 37°C (Michelacci & Horton, 1989).

Amostras do extrato total e da fração D1 após cromatografia de exclusão foram incubadas com 100µl de tampão fosfato de potássio 100mM pH 6,5 contendo papaína (2,6 mg/ml), NaCl (9 mg/ml), L-cisteína (0,8 mg/ml) e EDTA (9 mg/ml) durante 24 horas a 37°C (Heinegård & Sommarin, 1987). Após a digestão as amostras foram analisadas em gel de agarose-propileno (vide em material e métodos ítem 8.3, pág. 19).

6.2 - Condroitinase (Chase)

Amostras da fração D1 após cromatografia em gel filtração foram incubadas com 0.02U de Chase ABC durante 24 horas a 37°C. Após digestão as amostras foram analisadas em gel de agarose-propileno (vide material e métodos ítem 8.3, pág. 19).

7. Cromatografias

7.1 - Cromatografia de Troca Iônica

A fração D4 foi cromatografada em coluna com DEAE - Sephacel. Essa resina foi equilibrada com 10 volumes de tampão Tris-HCl 200mM pH 7,5 e a seguir com 20 volumes de tampão Tris-HCl 20mM pH 7,2 contendo uréia 7M. As amostras foram dialisadas com o

tampão contendo uréia, durante 48 horas a 4°C e sob agitação constante. A eluição do material foi feita utilizando gradiente de NaCl 0-1,5M. A absorbância em 280nm (espectrofotômetro HP-8452A) e a condutividade (condutivímetro HI-8819N) foi determinada para cada fração coletada.

7.2 - Cromatografia de Exclusão em Gel Filtração

A fração D1 de cada região foi submetida à filtração em gel de Sepharose CL-6B equilibrada com Gu-HCl 4M. As dimensões da coluna foram 0,9 x 120 cm, com fluxo de 60 ml/hora, sendo a eluição efetuada com o tampão descrito acima. Alíquotas de 1 ml foram coletadas e o conteúdo de GAGs sulfatados foi determinado pelo método do DMMB segundo Farndale et al. (1986).

8. Eletroforeses

8.1 - Eletroforese em gel de Poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS foi feita segundo Zingales (1984). As amostras obtidas, após cromatografia de troca iônica da fração D4, foram analisadas em gradiente de 4 a 16%, e da fração D1 em gradiente de 3 a 7,5%. As amostras foram anteriormente precipitadas em solução de acetato de sódio 1M pH 5,8 e etanol. O precipitado obtido foi dissolvido em tampão Tris-HCl 62mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, EDTA 1 mM e azul de bromofenol 0,01% na ausência ou presença de 2-Me (0,2%) e fervidas durante 5 minutos. O tampão utilizado nas cubas de eletroforese foi Tris 25mM,

glicina 190mM e SDS 0,1%. A corrente aplicada foi de 25mA durante 3 horas. Padrões de peso molecular foram sempre analisados em paralelo e continham: catalase (232.000), lactase desidrogenase (140.000), fosforilase b (94.000), albumina sérica bovina (67.000), ovoalbumina (43.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor tripsina (20.100) e α -lactalbumina (14.400).

A coloração do gel de 4 a 16% foi feita pelo método da prata segundo Blum et al., (1987). O gel foi fixado em uma solução contendo metanol 50%, ácido acético 12% e 0,05ml 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 (0,02%). O excesso foi removido por lavagem do gel com água destilada (3x - 20 segundos). A impregnação foi realizada em solução de nitrato de prata (0,2%) contendo 0,075ml de paraformaldeído 37% durante 20 minutos. O excesso foi removido por lavagem do gel com água destilada (3x - 20 segundos). A redução da prata foi feita com uma solução de carbonato de sódio (6%) contendo 0,05ml de paraformaldeído 37% e tiosulfato de sódio (4mg/l). Após lavagem com água destilada 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 à temperatura ambiente com agitação constante. As massas moleculares foram inferidas por cálculo de Rf e regressão dos marcadores (Klaus & Osborn, 1969).

Além da impregnação por prata, foi utilizada a coloração por azul de alcian com concentração crítica de eletrólitos (CEC) (Gomes et al., submetido para publicação). O gel foi fixado como descrito para impregnação pela prata (1 hora), lavado em água destilada (1 hora) e repetindo todo o procedimento mais uma vez na mesma ordem. O corante foi preparado em concentração de 0,05% em tampão acetato de sódio 0,2M pH 5,8 com MgCl₂ 1,0M. A seguir o gel foi imerso em solução corante durante 16-18 horas sob agitação

constante à temperatura ambiente. Após a coloração, o gel foi estocado pelo método descrito acima.

Para o gel de 3 a 7,5% foi feita coloração com azul de alcian segundo Møller et al., 1993.

8.2 - Eletroforese em Gel de Agarose-Poliacrilamida

Eletroforese em gel de agarose-poliacrilamida (0,6:1,2%) (p/p) foi realizada segundo Heinegård & Sommarin (1987).

Amostras obtidas da fração D1, após cromatografia de exclusão em gel filtração, foram precipitadas em solução de acetato de sódio 1M pH 5,8 e etanol. O precipitado obtido foi dissolvido em tampão Tris 40mM pH 6,8, Na₂SO₃ 1mM contendo glicerol 40%. As amostras foram fervidas durante 10 minutos. O tampão utilizado nas cubas de eletroforese foi Tris 10mM pH 6,8, Na₂SO₃ 0,25mM e EDTA 0,25mM. Para cada gel foram aplicados 20 mA durante 1 hora e 50 minutos. A coloração foi feita com azul de toluidina (A.T.) 0,02%.

8.3 - Eletroforese em Gel de Agarose-Propileno

Os GAGs obtidos da digestão com papaína foram analisados em gel de agarose segundo Dietrich & Dietrich (1976). Foram aplicados no gel 5µl da solução contendo GAGs do extrato total de cada região e das amostras obtidas da fração D1 após cromatografia de exclusão em gel filtração. O tampão utilizado na cuba de eletroforese foi propileno diamino 0,05M pH 9,0. As condições de corrida foram: 30mA, 120V, durante 2 horas. Os géis foram

fixados com Cetavlon (N-Cetyl,N,N,N,Trimetil Amonium Bromide) 0,1% e corados com A.T. 0,1% em etanol 50% e ácido acético 1%.

9. Transferência Eletroforética de Proteínas para Nitrocelulose ("Immunoblotting")

Após eletroforese em gel SDS-PAGE 7,5%, as proteínas foram eletricamente transferidas para o papel de nitrocelulose de 0,45 μ m (Schleicher & Schüll, Dassel, WG), segundo Towbin & Gordon (1979) usando tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192mM e metanol 20%) através de corrente constante de 10 volts por 16 horas e 70 volts por 4 horas, a 4°C. Para verificar se houve a transferência, a membrana foi corada pelo método de Ponceau S (0,5% Ponceau S em ácido acético 1%). O papel foi embebido e deixado em solução TST (Tris 10mM, NaCl 0,15M, Tween 0,2%) durante 18 horas a temperatura ambiente. A seguir, a fita de nitrocelulose foi incubada com soro de coelho anti-FM de galinha (1:20) durante 18 horas, a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado soro de porco anti-Ig total de coelho marcado com peroxidase (1:500) durante 2 horas a temperatura ambiente. A atividade enzimática foi detectada com solução DAB (50mg de diaminobenzidina em 100ml de tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,4) seguida de adição de H₂O₂ 0,001% final.

RESULTADOS

1 - Dosagem de Proteína

A dosagem de proteína do extrato total da cartilagem articular de frango tratada com Gu-HCl 4M foi 0,49 mg/ml para TT e 0,81 mg/ml para TMT (Fig. 2).

Análise das frações de ultracentrifugação mostrou que a concentração de proteínas foi maior na fração D4TMT com 2,64 mg/ml enquanto que D4TT apresentou 1,60 mg/ml.

As frações que apresentaram a menor concentração de proteínas foram D1TT (0,09 mg/ml) e D1TMT (0,14 mg/ml).

2 - Dosagem de Ácido Urônico

A dosagem de ácido urônico do extrato total das regiões TT e TMT foi de 0,14 mg/ml e 0,23 mg/ml, respectivamente (Fig. 3).

As frações de ultracentrifugação que apresentaram maior concentração de ácido urônico foram D1TT (0,80 mg/ml) e D1TMT (1,51 mg/ml).

As frações D4TT e D4TMT apresentaram a menor concentração de ácido urônico sendo 0,06 mg/ml e 0,03 mg/ml respectivamente.

3 - Análise da Fração D4 das Regiões Tibiotarso e Tarsometatarso Após Cromatografia e Eletroforese

3.1 - Região Tibiotarso (TT)

O perfil cromatográfico da região TT em cromatografia de troca iônica (Fig. 4A) mostrou dois picos antes do gradiente relativos às proteínas não ligadas ao DEAE. Após a aplicação de um gradiente linear, um único pico foi eluído.

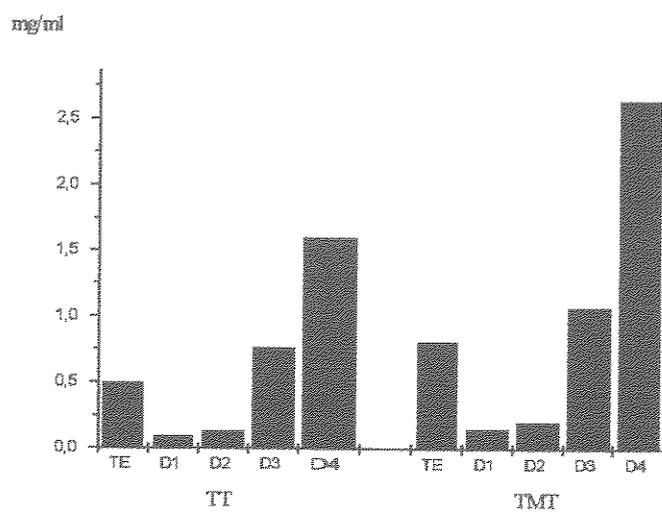


Fig. 2: Dosagem de proteína do extrato total (TE) e das frações (D1,D2,D3 e D4) após o gradiente de CsCl, das regiões TT e TMT.

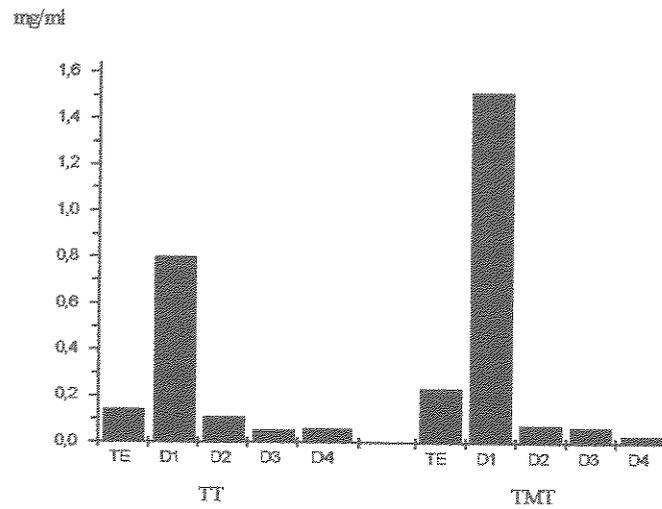
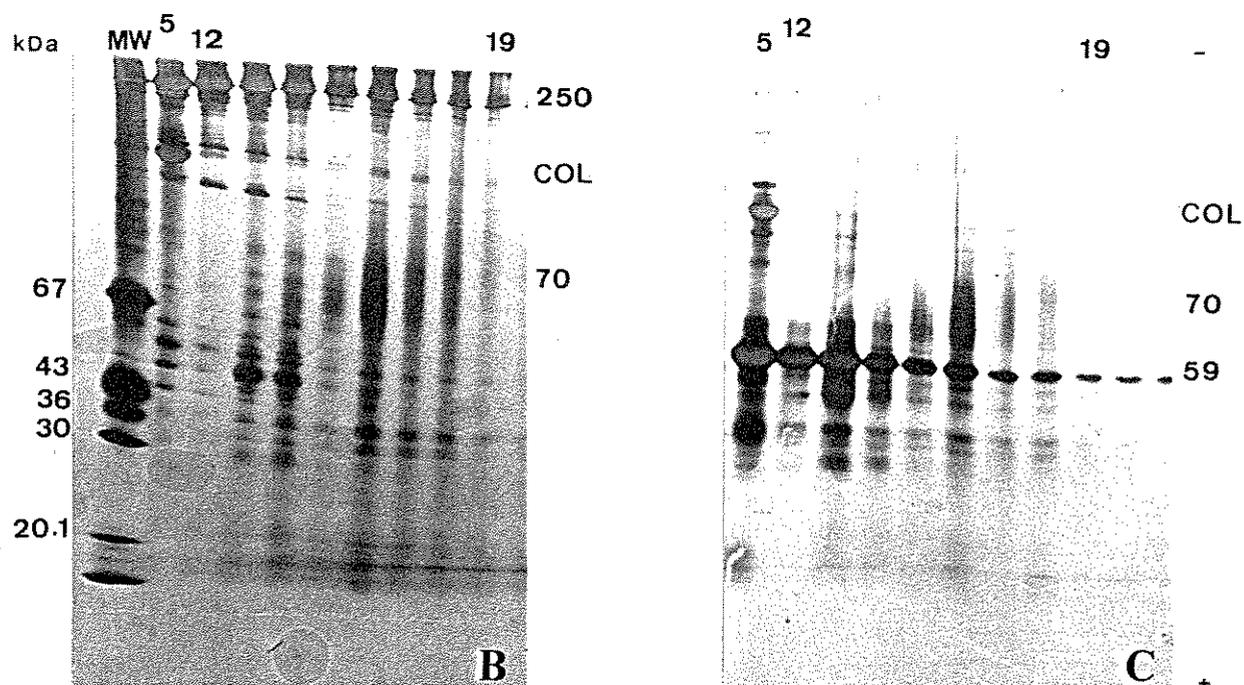
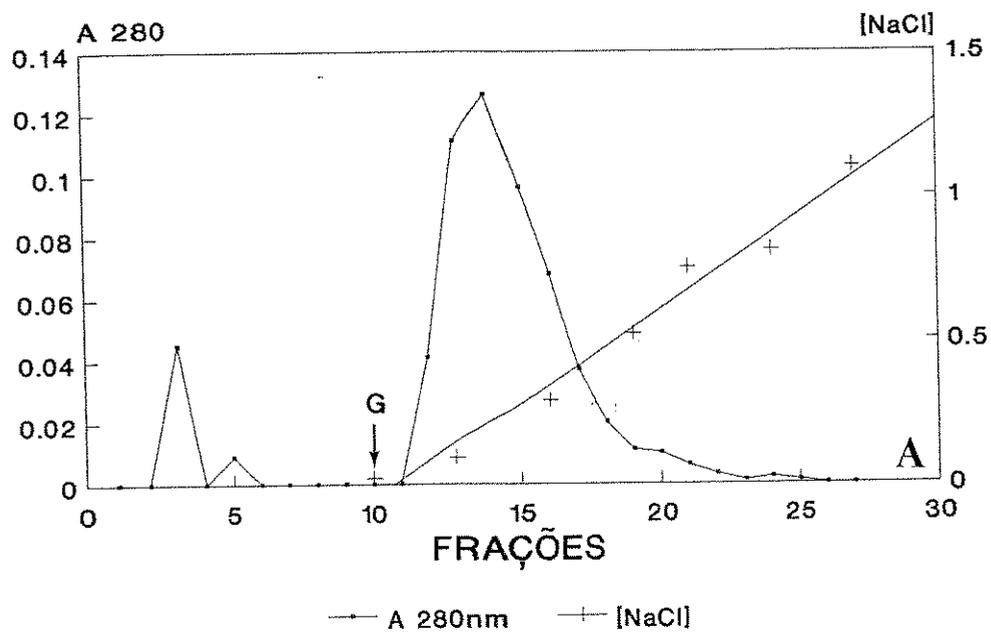


Fig. 3: Dosagem de AU do extrato total (TE) e das frações (D1, D2, D3 e D4) após o gradiente CsCl, das regiões TT e TMT.



As frações obtidas após cromatografia foram analisadas em SDS-PAGE na presença e ausência de 2-Me. Em SDS-PAGE pode ser visto que o material que não se ligou ao DEAE (“slot” 5) predomina colágeno na ausência (Fig. 4B) ou presença (Fig. 4C) de 2-Me. Após o gradiente essa molécula continuou sendo eluída. Um componente de 250 kDa (Fig. 4B) é evidente na ausência de 2-Me, no entanto na presença de 2-Me parece migrar na posição de 59 kDa (Fig. 4C). Esta proteína está presente em todas as frações eluídas da coluna.

Proteínas com Mr abaixo de 50 kDa estão presentes em condições não redutoras, porém com maior intensidade na presença de 2-Me. A proteína com 46 kDa se apresentou mais evidente nas frações 13 e 14 (Fig. 4B). Um único componente polidisperso migrou em torno de 70 kDa, com ou sem 2-Me. Este componente estava presente nas frações eluídas da coluna com concentração de NaCl entre 0,2 e 0,4M.

3.2 - Região Tarsometatarso (TMT)

O cromatograma da região TMT (Fig. 5A) apresentou um pico após aplicação do gradiente. As frações obtidas após cromatografia foram analisadas em SDS-PAGE (Figs. 5B e 5C).

Uma proteína com Mr de 94 kDa pode ser vista na ausência de 2-Me (Fig. 5B) e desaparece em condições redutoras (Fig. 5C). A eluição dessa proteína ficou na faixa entre 0,11 a 0,16M de NaCl. Proteínas com Mr de 160, 150 e 69 kDa estão presentes na análise com e sem 2-Me.

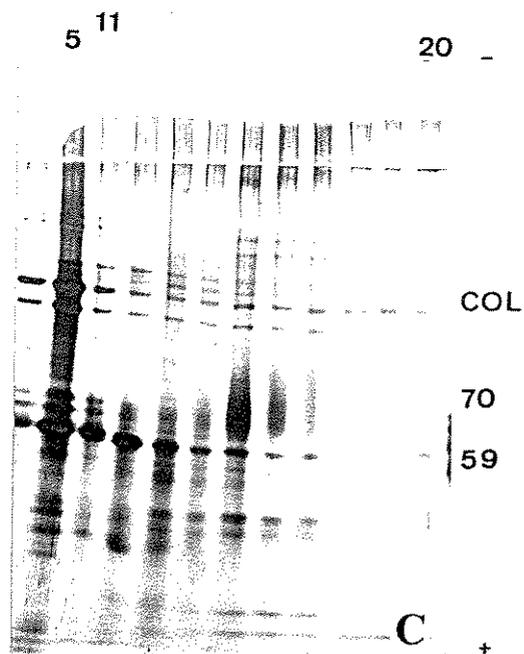
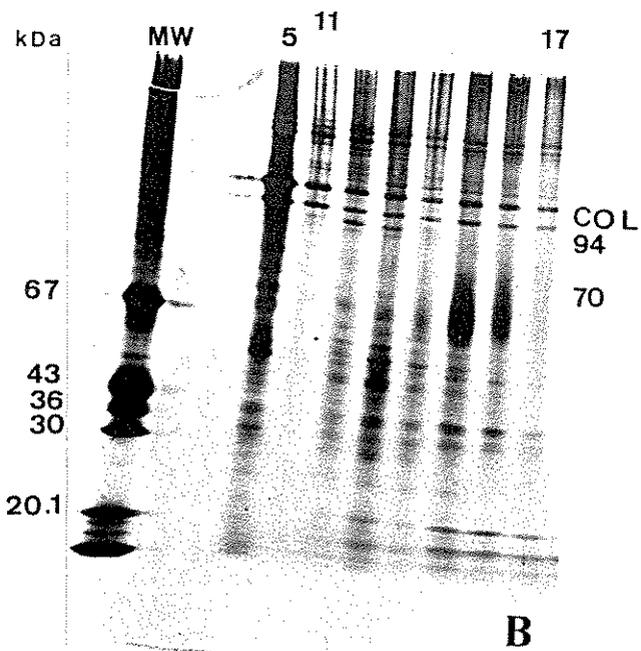
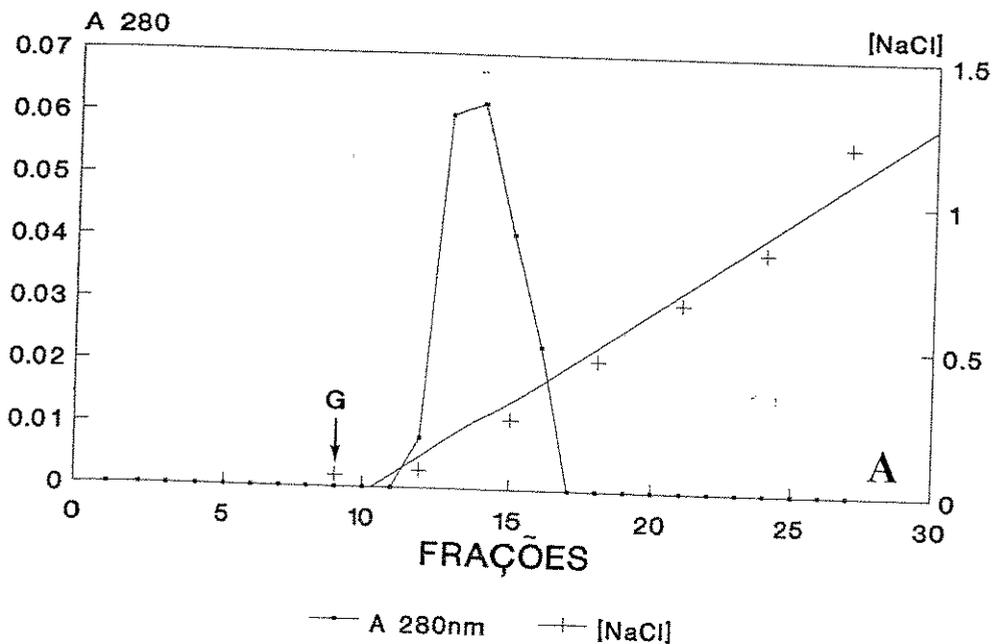
Uma proteína proeminente na posição de 59 kDa foi encontrada somente em condições redutoras.

O único componente polidisperso observado apresentou Mr em torno de 70 kDa na ausência ou presença de 2-Me. Este componente foi eluído entre 0,16 a 0,36M de NaCl .

Para as duas regiões analisadas em SDS-PAGE pode ser visto que:

-algumas proteínas com Mr de 46, 36 e 30 kDa foram encontradas em ambas regiões,

-o colágeno foi eluído antes e depois do gradiente tanto em TT como em TMT,



-em condições redutoras predominou o componente de 59-60 kDa.

4 - Identificação de FM na fração D4

No teste de "immunoblotting" (Fig. 6A) o anticorpo anti-FM reconheceu o componente com 59 kDa na presença de 2-Me para ambas regiões. O componente com 250 kDa foi reconhecido somente na região TT na ausência de Me.

Resultado semelhante foi obtido pelo método do CEC/azul de alcian (Fig. 6B), mostrando a presença de FM nas regiões TT e TMT.

5 - Análise da Fração D1 das Regiões TT e TMT Após Cromatografia e Eletroforese

5.1 - Região Tibiotarso (TT)

Na figura 7A está representado o cromatograma da fração D1TT em Sepharose CL-6B. Essa fração após análise apresentou um pico de eluição logo após o volume morto (V_0) com K_{av} de 0,08. O material eluído dessa cromatografia foi analisado em SDS-PAGE (gradiente de 3 - 7,5%) (Fig. 7B). Nas frações 16,18, 21 e 25 pode ser visto o material retido no gel de empacotamento indicando presença de grandes PGs. Nas frações 21, 25, 31 e 34 pode ser observado componentes que entraram no gel de corrida correspondendo aos componentes de menor peso pois foram eluídos próximo ao volume total (V_t) com K_{av} de 0,91.

Os resultados foram os mesmos para amostras na presença ou ausência de 2-Me.

A análise dos PGs (Fig. 7C) foi feita em gel de agarose-poliacrilamida. O material eluído em um pico apresenta somente uma população de grandes PGs. Esses componentes se apresentaram intensamente metacromático, porém do mesmo tamanho.

Fig. 6: Em A "immunoblotting" das frações eluídas da cromatografia de troca iônica e tratadas com soro de coelho anti-FM. Pode ser vista reação positiva em TT e TMT.

Em B as mesmas amostras se apresentam coradas por Coomassie blue e pelo método CEC/azul de alcian com 1M de $MgCl_2$.

+SH: com 2-Me ; -SH: sem 2-Me

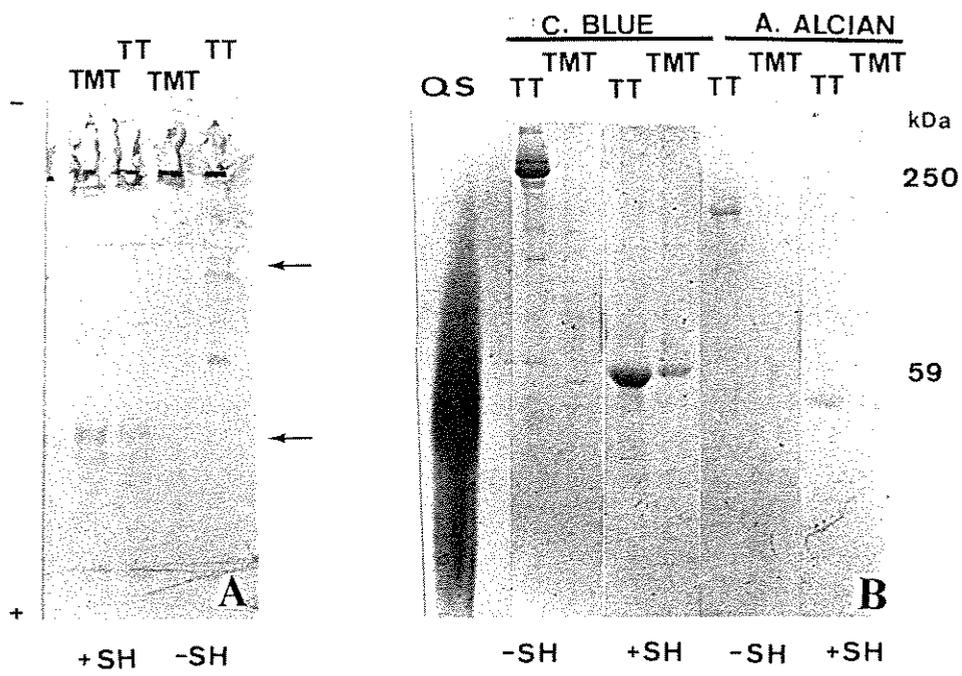
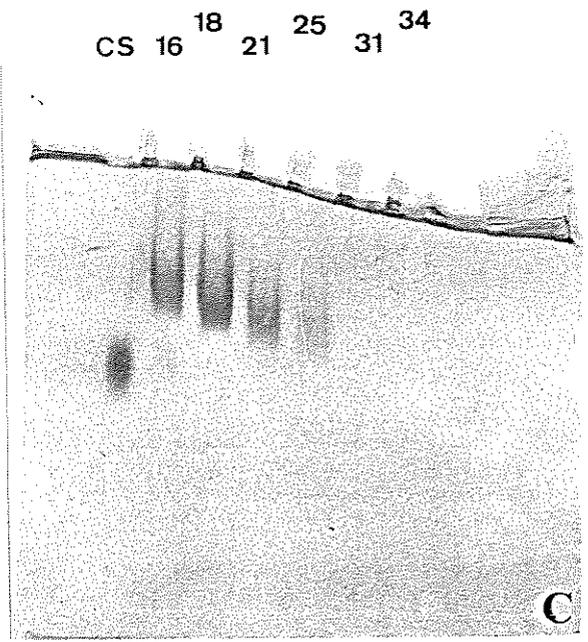
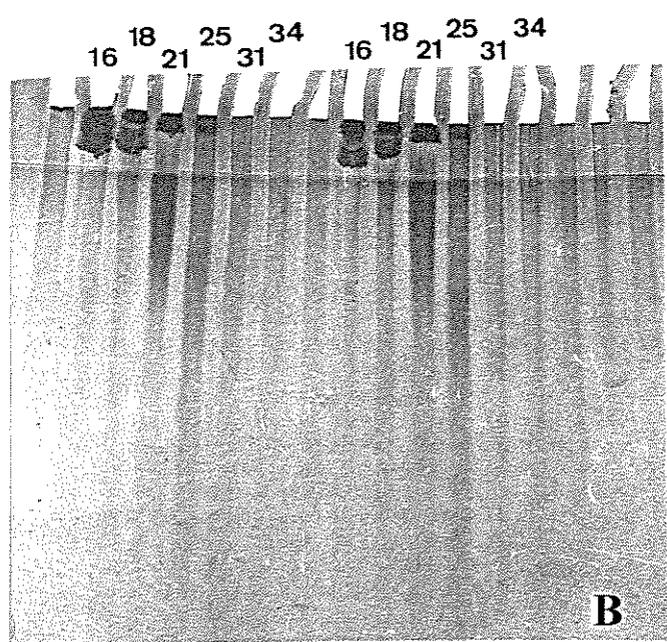
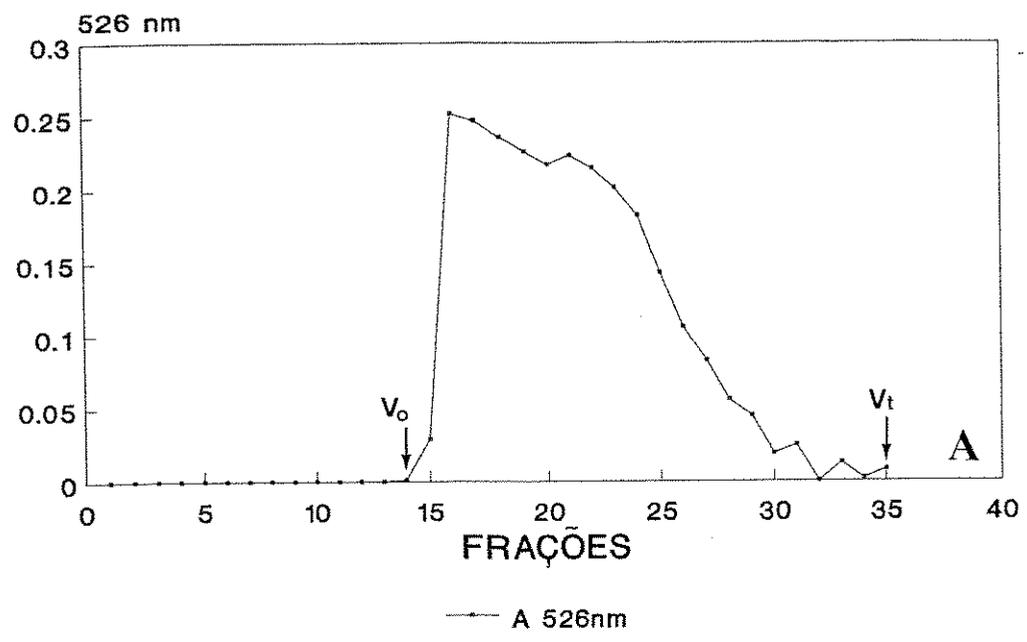


Fig. 7: A - Cromatograma da fração D1TT após cromatografia em CL-6B. Absorbância em 526nm.

B - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS em gradiente (3-7,5%) das frações do cromatograma com e sem 2-Me. Condições: corrente 25 mA durante 3 horas. Coloração por azul de alcian.

C - Eletroforese em gel de agarose-poliacrilamida das frações do cromatograma. Condições: corrente 20 mA durante 1 hora e 50 minutos. Coloração com AT.



5.2 - Região Tarsometatarso

O cromatograma da fração D1TMT em Sepharose CL-6B está representado na figura 8A. Após V_0 , com K_{av} de 0,08, um único pico foi eluído. Em SDS-PAGE (Fig.8B) foi possível verificar nas frações 16, 18 e 20 PGs de alto peso que permaneceram no gel de empacotamento. Nas frações próximo ao V_t , com K_{av} de 0,91, existe uma população de PGs que entrou no gel de separação. Na eletroforese, em gel de agarose-poliacrilamida (Fig. 8C), uma única banda metacromática e polidispersa foi observada para as frações 16 a 24.

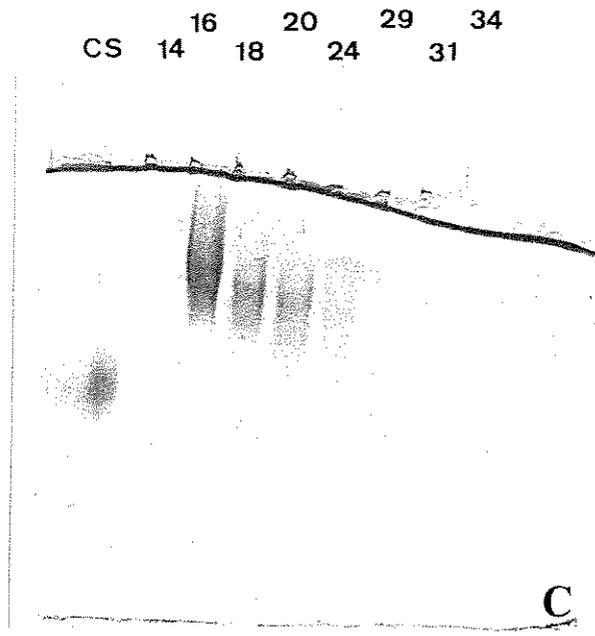
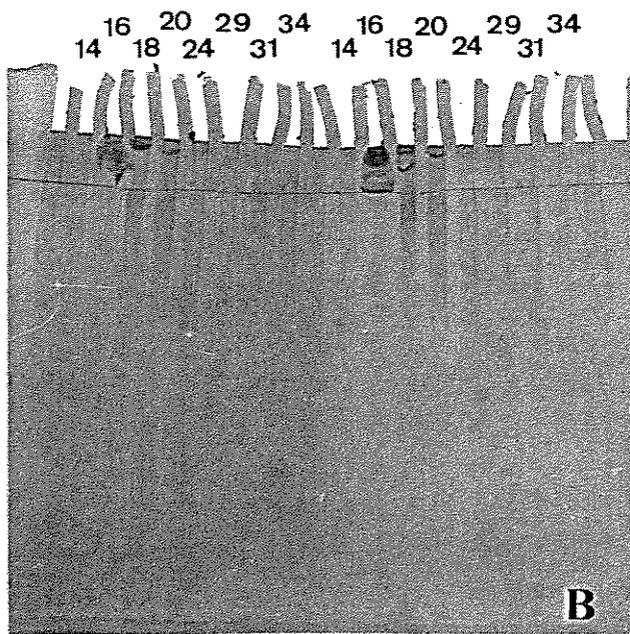
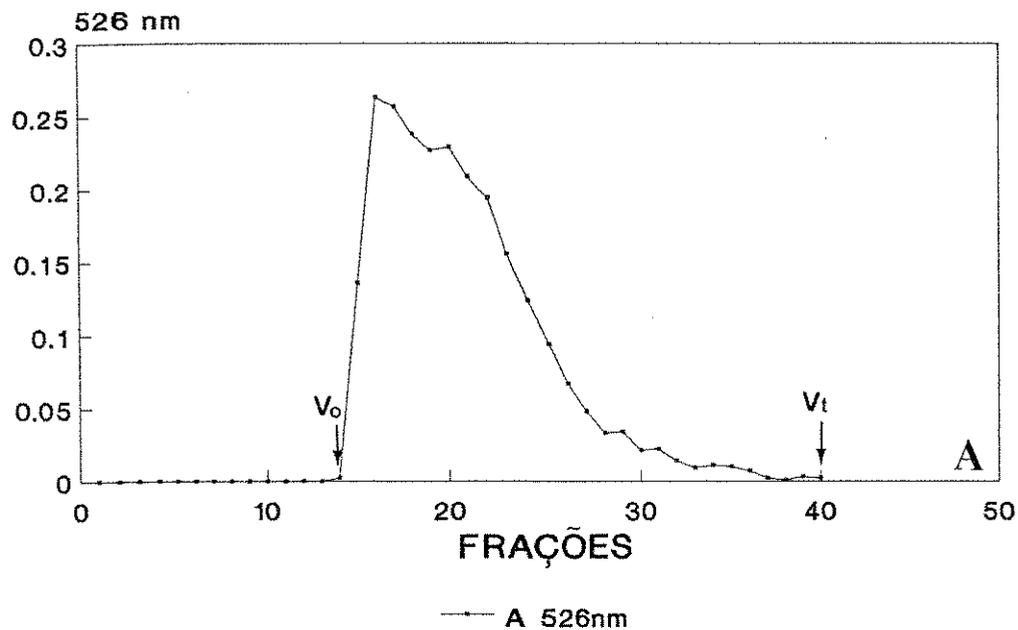
6 - Análise do Digesto com Papaína em Gel de Agarose-Propileno

Na figura 9 está representada a análise dos GAGs presentes nas regiões TT e TMT. O GAG presente no extrato total tanto de TT como TMT (Fig. 9A) é o CS. Após cromatografia em Sepharose CL-6B nas frações analisadas, 17,19 e 22 para TT e 17, 20 e 24 para TMT (Fig. 9B e C respectivamente) aparece uma banda com migração entre os padrões CS e DS. Essas frações foram incubadas com chase ABC (Fig. 9D) ficando demonstrado que o GAG presente é CS.

Fig- 8: A - Cromatograma da fração D1TMT após cromatografia em CL-6B. Absorbância em 526nm.

B- Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS em gradiente (3-7,5%) das frações do cromatograma com e sem 2-Me. Condições: corrente 25 mA durante 3 horas. Coloração por azul de alcian.

C - Eletroforese em gel de agarose-poliacrilamida das frações do cromatograma. Condições: corrente 20 mA durante 1 hora e 50 minutos. Coloração com AT.



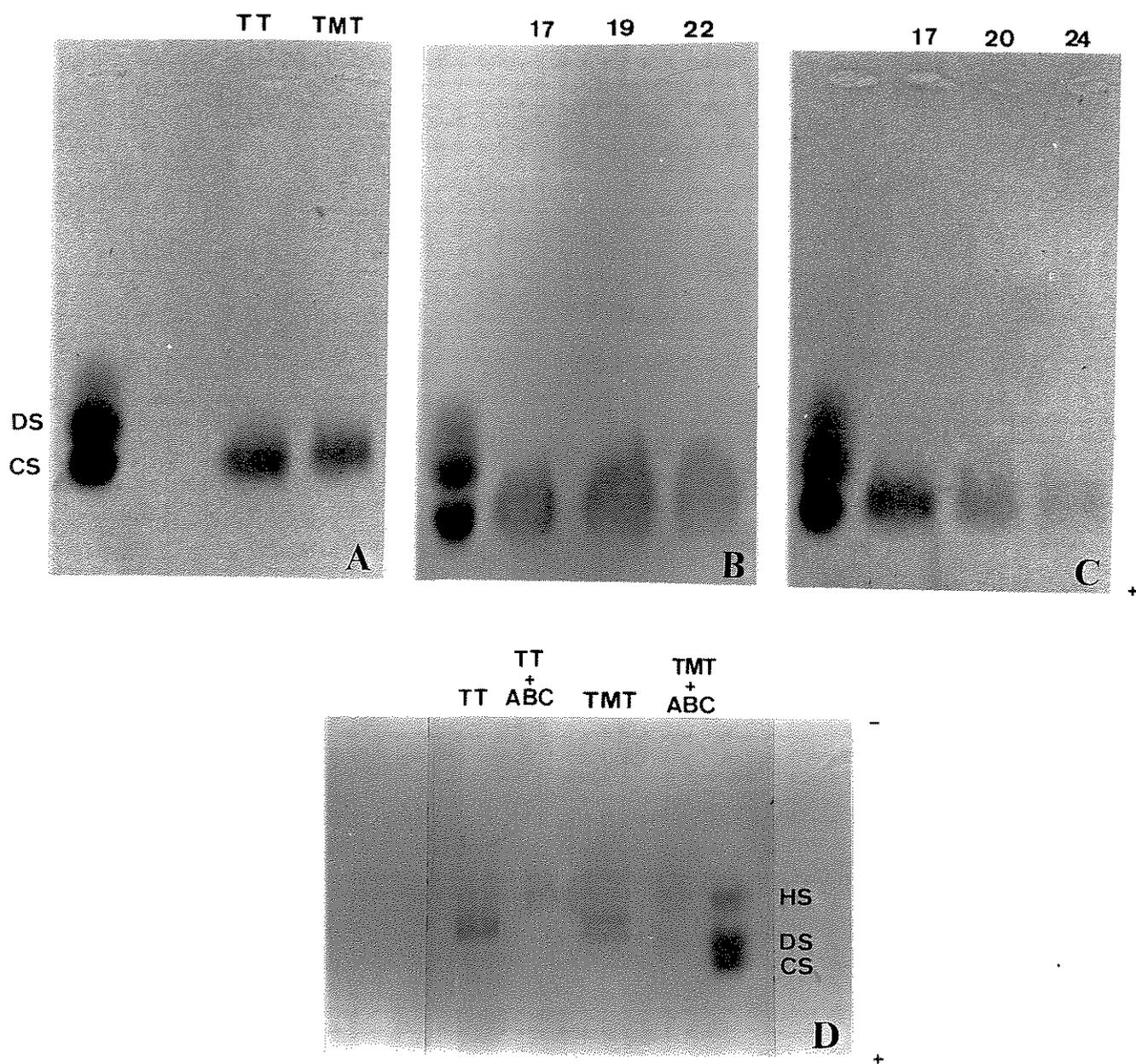


Fig. 9: Eletroforese em gel de agarose-propileno do extrato total (TE) de TT e TMT (A); das frações após cromatografia em CL-6B da região TT (B); das frações após cromatografia em CL-6B da região TMT (C); das frações D1TT e D1TMT com chase ABC (D). Condições: corrente de 30 mA durante 2 horas. Coloração com AT.

DISCUSSÃO

A cartilagem articular é classificada como cartilagem do tipo hialina. Esta cartilagem recobre a extremidade dos ossos longos, promove a lubrificação da superfície da junta e absorve o impacto que existe normalmente nesta superfície (Fung, 1981). A propriedade química e estrutural das moléculas que compõem a cartilagem é produzir elasticidade (capacidade de reassumir a forma e textura original após a deformação) e resistência às forças de tensão (capacidade de distribuir a força e resistir ao rompimento). Esta resistência à força de tensão é promovida pelo colágeno, enquanto a elasticidade pelos PGs (Caplan, 1984). Este pode ser um modelo usual para se entender as propriedades mecânicas do tecido, embora seja uma descrição simplificada da composição e organização da MEC.

As diferenças na MEC tem sido descritas entre diferentes zonas de uma mesma cartilagem, onde na superfície a quantidade de PGs é menor do que nas zonas mais profundas (Guilak et al., 1994). A organização da matriz também varia com a força biomecânica existente nas articulações (Müller et al., 1989) e com a idade (Axelsson & Bjelle, 1979; Inerot & Heinegård, 1983), tendo influência na função normal da cartilagem. A cartilagem articular está frequentemente envolvida em processos inflamatórios que resultam na destruição do tecido com degradação de macromoléculas da MEC (Heinegård & Saxne, 1991), como ocorre na osteoartrite (Guilak, 1994), na discondroplasia tibial (Lowther et al., 1974; Thorp et al., 1995) e distrofia da cartilagem (Lowther et al., 1974). Análise bioquímica da cartilagem articular de cães com osteoartrite, demonstrou uma diminuição de 37% do conteúdo de PG e 36% do conteúdo de colágeno (Guilak et al., 1994). A diminuição no conteúdo de PGs está presente em cartilagens que apresentam distrofia (Lowther et al., 1974) ou discondroplasia (Thorp et al., 1995). Axelsson & Bjelle (1979) analisando cartilagem da epífise femoral bovina demonstraram que o conteúdo de AU é maior em animais mais velhos do que em recém-nascidos ou adultos jovens. Resultados semelhantes foram encontrados por Inerot & Heinegård (1983) em cartilagem traqueal bovina fetal, jovem e de adulto.

A falta de soluções terapêuticas definitivas para doenças que afetam a cartilagem articular, se deve em grande parte à falta de mais conhecimento sobre os componentes da MEC e as interações destes componentes entre si e com as células presentes no tecido. Também faltam informações sobre o papel destes componentes, principalmente, pequenos PGs e proteínas não colagênicas na MEC. Utilizando cartilagem articular de frango, pretendemos além de conhecer os componentes da MEC desta cartilagem, estabelecer uma relação entre estes componentes e a presença de força biomecânica.

Para quantificar os constituintes da MEC, obtidos em extratos com Gu-HCl das duas regiões analisadas TT e TMT, foram utilizados métodos de dosagem de proteínas e AU. A dosagem de proteínas demonstrou que, na cartilagem articular de frango, a região TMT possui uma concentração de proteínas maior do que a região TT para o extrato total. Do mesmo modo, TMT apresentou um conteúdo maior de AU do que TT. Essas diferenças observadas na quantidade de proteínas e AU representam uma diferença de composição entre as duas regiões analisadas. O conteúdo da MEC pode variar dependendo da força biomecânica existente na articulação, pois essa força tem influência na cartilagem normal.

A ultracentrifugação em CsCl nos permitiu uma separação das proteínas não colagênicas dos PGs. Experimentos desenvolvidos por Hascall & Sajdera (1969) apresentaram resultados que estão de acordo com os resultados encontrados. Com relação a dosagem de AU, a fração D1 possui um conteúdo maior, onde estão concentrados os PGs agregantes e de alto peso. A região D1 TMT apresentou 1,52 mg/ml enquanto D1TT 0,80 mg/ml. Na fração D4 estão concentradas as proteínas não colagênicas; a região TMT apresentou um conteúdo protéico de 2,64 mg/ml enquanto TT apresentou 1,60 mg/ml. Este resultado pode ter ocorrido devido a força de compressão que TMT recebe suportando todo o peso do animal.

As proteínas não colagênicas que representam 5% das proteínas da MEC (Kuettner et al., 1991) estão parcialmente caracterizadas e apresentam diferentes funções biológicas (Heinegård & Oldberg, 1989). O conteúdo protéico da fração D4 das regiões TT e TMT foi analisado através do fracionamento em cromatografia de troca iônica. Nas frações que eluíram antes do gradiente, para ambas regiões, foi possível verificar a presença predominante de colágeno, que não se liga ao DEAE. Porém, parte da população de

colágeno aparece eluído em todas as frações da cromatografia após o gradiente. Esse fato ocorre provavelmente pela capacidade do colágeno se ligar a outros componentes da MEC, inclusive aos pequenos PGs, como decorim e FM (Eyre, 1991). A interação de PG com colágeno, implicaria em um aumento de cargas negativas, tanto pelo bloqueio de cargas positivas de colágeno, que estariam envolvidas pela ligação ao FM ou decorim, como pelas próprias cargas do pequeno PG. Embora a presença de colágeno II seja predominante em cartilagem (Miller & Matukas, 1969; Van der Rest & Garrone, 1991), é preciso mencionar que há evidências de que outros colágenos, como o tipo IX e XI estão presentes em cartilagem articular e contribuem para organização e estabilidade mecânica da rede fibrilar do colágeno II (Eyre, 1991; Eyre et al., 1991). Em cartilagem articular de frango, estudos anteriores mostraram grande quantidade de colágeno I na superfície articular (Eyre et al., 1978). Foi relatado também que, durante o crescimento e maturação da cartilagem articular, o colágeno tipo II é gradualmente substituído pelo tipo I. Em 20 semanas o colágeno I é essencialmente o único tipo de colágeno presente na superfície articular. Já o colágeno II é predominante nas camadas internas da cartilagem articular, provavelmente incluindo a zona basal calcificada (Eyre et al., 1978).

A presença de proteínas antes do gradiente, com o mesmo Mr das que se ligaram no DEAE, significa que a quantidade em mg de proteína/ml de resina ultrapassou a capacidade de ligação da resina. Este foi um procedimento necessário para que se pudesse visualizar algumas das proteínas presentes em pequena quantidade.

Nas frações que eluíram após o gradiente de NaCl, foi observada a presença de um componente de 250 kDa presente apenas em TT na ausência de 2-Me. Em condições redutoras esta proteína de 250 kDa migrou como um componente de 59 kDa que corresponde ao pequeno PG FM. Em TMT, apenas o componente de 59 kDa aparece, independente da presença ou não de 2-Me. Através de "immunoblotting" ficou demonstrado que tanto a proteína de 250 kDa como a de 59 kDa foram reconhecidas pelo anticorpo anti-fibromodulim. Em outro experimento em que se empregou a técnica do CEC/azul de alcian, usando $MgCl_2$ 1M, ficou demonstrado a presença de QS tanto no componente de 250 kDa e 59 kDa presentes em TT, como no componente de 59 kDa presente em TMT.

Estes dois experimentos, o do “immunoblotting” e o do CEC, foram de fundamental importância para afirmarmos que temos FM tanto no componente de 250 kDa como no de 59 kDa. Um outro aspecto altamente interessante, já que não foi detectado em outros modelos experimentais, é o fato de que em TT, o FM está participando de um processo de agregação que depende da conformação do PG, pois quando as duas pontes S-S intracadeia são rompidas pelo tratamento com 2-Me, este estado agregado praticamente desaparece, e a proteína volta a migrar como 59 kDa. A capacidade de auto-agregação já foi citada para biglicam. Liu e colaboradores (1994) em estudos de cartilagem articular bovina, mostraram que o biglicam em solventes fisiológicos se encontra em estado oligomérico. Na presença de EDTA formam dímeros e na presença de Zn^{2+} hexâmeros. Com isto demonstraram que o biglicam é uma metaloproteína que se liga ao Zn^{2+} formando diferentes oligômeros com propriedades distintas na presença ou ausência de Zn^{2+} . Como a auto-agregação ocorre somente em solventes fisiológicos, onde a proteína central permanece intacta, é provável que esta ligação seja mediada pela proteína central e não pela cadeia do GAG. Com relação ao FM alguns autores demonstraram a associação do FM ao colágeno (Lauder et al., 1994). Essa associação seria importante para influenciar e regular a fibrilogênese do colágeno (Hedlund et al., 1994). Esse pequeno PG está presente em regiões onde ocorrem maior força de tensão. Em tibia e região da crista articular do fêmur bovino, esse pequeno PG parece sofrer auto-agregação, pois na ausência de 2-Me se apresentam com 150 e 140 kDa respectivamente, indicando também que a integridade das pontes S-S é importante na auto-agregação de FM (Esquisatto et al., manuscrito em preparação). É curioso que cartilagens de uma mesma articulação possam mostrar diferenças entre seus componentes. No caso do frango, a presença de agregado de FM em TT e não em TMT pode estar relacionada com o fato de que neste último a presença de meniscos poderia redistribuir as forças de compressão, e mesmo amenizar esta força que o TT exerce sobre o TMT. A resposta para isto poderia vir dos condrócitos que sensíveis às alterações na MEC, poderiam produzir FM com pequenas mudanças estruturais.

Uma proteína com Mr em torno de 70 kDa, de natureza polidispersa, foi detectada em TT e TMT. Provavelmente se trata do pequeno PG, decorim. Esta polidispersidade é devido às cadeias de GAGs ligadas ao esqueleto protéico (Heinegård, 1977; Heinegård &

Paulsson, 1984). O colágeno pode interagir também com este pequeno PG. Fleischmajer e colaboradores (1991), demonstraram a localização ultraestrutural do decorim em relação à fibrila colagênica. Este estudo demonstrou que, a maior parte dos sítios de ligação do decorim aparecem nas bandas d e e na área "gap" do colágeno. Esta interação deve interferir na adição lateral de moléculas de colágeno regulando o diâmetro final da fibrila. A ligação do decorim ao colágeno VI ocorre através de um sítio na proteína central e não na cadeia de GAG. Esta ligação deve regular a organização estrutural da MEC (Bindanset et al., 1992). Hedbom & Heinegård (1993) demonstraram que os pequenos PGs, FM e decorim, se ligam a sítios distintos da tripla hélice. A diferença estrutural entre estes PGs determina a especificidade da ligação e provavelmente a função da molécula.

Algumas proteínas presentes em D4 foram eluídas após o gradiente com NaCl. Tanto em TT como em TMT na presença ou ausência de 2-Me podem ser vistas proteínas com Mr entre 43-30 kDa, representando as diferentes populações de proteínas de ligação (Treadwell et al., 1980). Uma proteína com 34 kDa pode representar a ancorim (Pfaffle et al., 1988). Não detectamos as proteínas já bem conhecidas, COMP e CMP. No entanto, na região TMT uma proteína com Mr de 94 kDa está presente somente em condições não redutoras.

Além do colágeno e das proteínas não colagênicas a MEC possui uma alta concentração de PGs, os quais estão imobilizados pela malha de colágeno. As propriedades físicas e mecânicas da cartilagem articular dependem da integridade da malha do colágeno e da síntese e retenção dentro dessa malha dos PGs em alta concentração (Hardingham & Bayliss, 1990).

Bayliss & Roughley (1985) realizaram um estudo de PGs da cartilagem articular humana através de um gradiente de CsCl, separando os PGs de baixa e alta densidade. Com relação às proteínas, eles observaram que na porção de baixa densidade estas encontravam-se no topo do gradiente, enquanto que na fração de alta densidade a maioria das proteínas apresentaram-se associadas aos grandes PGs. Em cartilagem articular bovina foram extraídos diferentes tipos de PGs. PGs de alta densidade com Mr $1,28 \times 10^6$ e Mr $1,31 \times 10^6$ foram extraídos de cartilagens metacarpofalangeanas e côndilo femoral respectivamente. Os de baixa densidade possuem Mr $0,24 \times 10^6$ e corresponderam a 11% do total de PGs extraídos da cartilagem metacarpofalangeana e 2% em côndilo femoral. Estes dois tipos de

PGs são diferentes não apenas na composição peptídica, como também na estrutura das cadeias de GAGs (Swann et al., 1979).

Para analisarmos os grandes PGs presentes em nosso material, a fração de D1 foi fracionada em Sepharose CL-6B. Ambas regiões apresentaram uma única população de grandes PGs, pois apenas um pico eluiu após o V_0 , com K_{av} de 0,08. Em cartilagem articular bovina adulta os PGs apresentam M_r $1,0-1,8 \times 10^6$ contendo aproximadamente 80 cadeias de CS, sendo principalmente 6-sulfatados (Swann et al., 1979). No caso de cartilagem nasal bovina estes PGs apresentam M_r $2,5 \times 10^6$ contendo 110 cadeias de CS sendo 4-sulfatados (Hascall & Sadjera, 1970; Hascall & Riolo, 1972).

Em SDS-PAGE (gradiente de 3-7,5%) ficou demonstrada a presença de grandes PGs no gel de empacotamento e no gel separador. Não houve diferença nas amostras com ou sem 2-Me. Esse resultado foi o mesmo para as duas regiões. Os PGs do gel separador correspondem a moléculas menores ou a PGs degradados. Com o tempo os PGs da MEC podem ser degradados por ação de proteases que produzem os fragmentos (Heinegård & Sommarim, 1987). Vilim & Fosang (1994) extraíram de cartilagem articular humana duas populações de grandes PGs, uma população de fragmentos N-terminais de agregam, como também, os pequenos PGs. Eles observaram que em cartilagens jovens e adultas não há diferenças marcantes no conteúdo de PGs. Em tecido adulto há uma proporção maior de fragmentos de agregam e uma diminuição do conteúdo de decorim e biglicam. Bayliss & Ali (1978) que mostraram que com o avanço da idade aumenta a proporção de PGs menores ricos em QS e proteínas, comprovando que os PGs sofrem degradação enzimática ou até mesmo física. Alterações da composição bioquímica da cartilagem articular bovina (Brand et al., 1991) e traqueal (Inerot & Heinegård, 1983) estão relacionadas à idade, havendo um aumento de QS em relação a CS e de CS 6 em relação ao CS 4-sulfatado.

Uma característica dos PGs é a polidispersidade. Esse aspecto polidisperso é dado pela variação no tamanho e composição do esqueleto protéico e principalmente das cadeias de GAGs. Em cartilagem articular humana de adulto, existe uma heterogeneidade na população de monômeros (Hardingham & Bayliss, 1990). Essa variação nos monômeros só pode ser visualizada em gel de agarose-poliacrilamida no qual é possível separar PGs de origem fetal e de recém-nascido e os PGs de cartilagem imatura das adultas (Bayliss &

Venn, 1980; Roughley & White, 1980; Bayliss et al., 1983; Bayliss & Roughley, 1985; Carney et al., 1986). Em cartilagem de frango foi demonstrado, usando gel em agarose-poliacrilamida, uma banda polidispersa devido às variações no tamanho da proteína central e/ou das cadeias de GAGs. Ocorreu também uma diferença de mobilidade nos PGs. Os PGs menores que foram eluídos com K_{av} de 0,99 apresentaram uma mobilidade maior no gel. Essa variação na heterogeneidade nos PGs pode ser devido a: variação na expressão gênica da proteína central (Doege et al., 1987), variação na glicosilação e/ou sulfatação após sua transcrição e modificação da proteína central por enzimas (Azzo & Wassner, 1986; Bayliss, 1990). Não se pode descartar contudo, a possibilidade destes PGs menores serem resultado de degradação de PGs maiores.

Após digestão com papaína do extrato total e das frações D1 de TT e TMT os GAGs foram isolados e analisados em gel de agarose-propileno. Os resultados demonstraram que o GAG predominante em TT e TMT é CS, o que foi confirmado após digestão com chase ABC. Este resultado era esperado, pois os PGs de alto peso possuem como GAG principal CS. Além disso, a cartilagem articular é um tecido com maior conteúdo de CS, correspondendo a 10% do peso seco do material (Heinegård & Paulsson, 1984). Porém, no extrato total de TMT ele migrou entre o padrão de CS e DS, provavelmente por se apresentar menos carregado. As frações de D1TT também migraram de uma maneira diferente em gel de agarose-propileno quando comparada ao padrão, apresentando uma banda polidispersa. Isto pode ocorrer pela variação no tamanho das cadeias de GAGs. Pode também estar relacionada com o grau de sulfatação. Alguns estudos com cartilagem de embrião de frango também mostraram CS como o principal GAG presente nos grandes PGs (Kitamura & Yamagata; 1976). O comportamento aqui apresentado para CS de TT e TMT, é mais um indício de que alterações em mudanças físico-químicas na MEC, refletem diretamente sobre a fisiologia celular. No caso da cartilagem de frango, condrócitos da cartilagem do TT podem ter produzido cadeias de CS um pouco mais longas do que as produzidas na cartilagem do TMT.

Também foi constatado que o CS apresenta diferentes sulfatações em cartilagens de embrião e frango adulto. Neste último aparece mais condroitim 4-sulfato do que condroitim 6-sulfato (Shulman & Meyer, 1970).

CONCLUSÕES

1- A concentração de proteínas e ácido urônico foi maior em TMT do que em TT para o extrato total e para as frações obtidas após ultracentrifugação.

2- O pequeno PG FM foi encontrado em TT e TMT.

3- Somente a região TT apresentou um componente de 250 kDa que em condições redutoras migrou na posição de 59 kDa. Após teste de “immunoblotting” e coloração por CEC/azul de alcian ficou comprovado tratar-se do pequeno PG FM.

4- O componente polidisperso, provavelmente decorim, com Mr em torno de 70 kDa, foi encontrado em TT e TMT.

5- Algumas proteínas não colagênicas foram encontradas em ambas regiões apresentando: 46, 36 e 30 kDa.

6- O colágeno apresentou o mesmo comportamento em TT e TMT eluindo antes e depois do gradiente.

7- Ambas regiões apresentaram uma única população de grandes PG que eluíram após o volume morto, com Kav de 0,08.

8- O GAG predominante em ambas regiões foi CS, embora tenha se apresentado com características diferentes em TT e TMT.

RESUMO

Já foram descritos os componentes da matriz extracelular de diferentes cartilagens de mamíferos, mas sobre aves são encontradas poucas informações. Nosso trabalho, teve como objetivo extrair e identificar componentes da matriz extracelular de duas cartilagens articulares de frango (tibiatarso e tarsometatarso). As cartilagens articulares foram homogeneizadas e os componentes extraídos com Gu-HCl 4M. Após obtenção do extrato total foi realizada uma ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο, onde foram obtidas as frações D1, D2, D3 e D4. O conteúdo protéico foi maior na fração D4, onde em tarsometatarso a extração foi mais eficiente (2,64 mg/ml) do que em tibiatarso (1,6 mg/ml). Com relação à dosagem de ácido urônico, a concentração maior foi encontrada na fração D1-tarsometatarso (1,52 mg/ml) em relação à D1-tibiatarso (0,80 mg/ml).

A fração D4 foi aplicada em DEAE-Sephacel em tampão Tris-HCl 20mM pH 7,2 com uréia 7M. O material que se ligou ao DEAE foi eluído com um gradiente de 0 a 1,5M de NaCl no mesmo tampão. A análise destas frações em SDS-PAGE mostraram que somente em tibiatarso há um componente com 250 kDa, que na presença de 2-Me migra com 59 kDa. Após o teste de "immunoblotting" e CEC/azul de alcian foi possível mostrar que se trata do pequeno proteoglicano fibromodulim, em condições redutoras e não redutoras. Em tarsometatarso a proteína com 59 kDa se apresentou proeminente em condições redutoras. Uma proteína, apresentou uma banda polidispersa em torno de 70 kDa e foi encontrada em ambas as regiões. Provavelmente, se trata do pequeno proteoglicano decorim. Proteínas não colagênicas com Mr de 46, 36 e 30 kDa foram observadas em ambas regiões.

A fração D1 foi analisada em Sepharose CL-6B. O perfil cromatográfico de tibiatarso e tarsometatarso foi muito semelhante. Ambas regiões apresentaram um único pico que eluiu logo após o volume morto, com Kav de 0,08. Pela análise em agarose-poliacrilamida nas duas regiões analisadas, pode ser visto uma única população de grandes proteoglicanos. O tipo de glicosaminoglicano presente em cada região foi analisado através

de gel de agarose-propileno. O glicosaminoglicano predominante para as duas regiões foi condroitim-sulfato, embora tenha apresentado características diferentes para cada cartilagem. Este resultado foi confirmado após incubação com condroitinase ABC.

ABSTRACT

The extracellular matrix (ECM) components of different cartilages of mammals is already known, but little information is found for ECM of avian cartilage. The purpose of this work was to identify the components of the ECM of tibiotarsal and tarsometatarsal cartilage of chicken. The cartilage was homogenized in PBS and the fragments extracted with 4M Gu-HCl. The extract was submitted to ultracentrifugation in CsCl gradient, resulting in D1, D2, D3 e D4 fractions. The protein contents was greater in the D4 fraction and in tarsometatarsal extract the concentration of proteins (2,64 mg/ml) was larger than in tibiotarsal extract (1,6 mg/ml). With respect to uronic acid, we found more in D1-tarsometatarsal (1,51 mg/ml) than in D1-tibiotarsal (0,80 mg/ml).

D4 fraction was dialysed, applied on DEAE-Sephacel and eluted with 7M urea in 20mM Tris-HCl pH 7,2. Bound material was eluted with a gradient ranging from 0 to 1,5M NaCl in the same buffer. SDS-PAGE of DEAE fractions of tibiotarsal cartilage, showed a component with 250 kDa, which in presence of 2-Me appears to migrate as a 59 kDa protein. After immunoblotting and CEC/alcian blue, it was demonstrated to be the small proteoglycan fibromodulin in reducing and non-reducing conditions. In tarsometatarsal fractions this protein, migrating as 59 kDa, was detected only in reducing conditions. Another protein migrating as a polydisperse band around 70 kDa was detected in both cartilages. Probably it is the small proteoglycan decorin. Non-collagenous proteins with 46,36 e 30 kDa were detected in both cartilages.

D1 fraction was analysed in Sepharose CL-6B. The chromatography profiles were similar for tibiotarsal and tarsometatarsal cartilages. Both regions showed only one peak that eluted with $K_{av}=0,08$. Analysis of fractions in SDS-PAGE and agarose-polyacrilamide gel electrophoresis showed the presence of large proteoglycans in tibiotarsal and tarsometatarsal material. The glycosaminoglycans were analysed in agarose gel electrophoresis for each region. The predominant glycosaminoglycan was chondroitin sulfate in both cartilages, but its

migration in agarose gel was different for tibiotarsal and tarsometatarsal samples. This result was confirmed using chase ABC digestion.

BIBLIOGRAFIA

Anagnostides, S.T.; Aletras, A.J.; Lymbery, P. & Tsiganos, C.P. Isolation and characterization of two glycoproteins from hyaline cartilage. Euro. J. Biochem. 193: 905-912, 1990.

Axelsson, I. & Bjelle, A. Proteoglycan structure of bovine articular cartilage. Scand J. Rheum. 8: 217-221, 1979.

Azzo, W. & Woessner, F.J. Purification and characterization of an acid metalloproteinase from human articular cartilage. J. Biol. Chem. 261 (12): 5434-5441, 1986.

Barnett, C.B. A comparison of the human knee and avian ankle. J. Anat. 88: 59-70, 1954.

Bayliss, M.T. & Ali, Y. Isolation of proteoglycans from human articular cartilage. Biochem. J. 169: 123-132, 1978.

Bayliss, M.T. & Venn, M.F. Chemistry of human articular cartilage. In: Studies in joint disease. (Eds. Maroudas, A. & Holborow, E.J.), vol. 1, 2-58, 1980.

Bayliss, M.T.; Venn, M.F. & Maroudas, A. Composition and structure of proteoglycans in different layers of human articular cartilage. Biochem. J. 209: 387-400, 1983.

Bayliss, M.T. & Roughley, P.J. The properties of proteoglycan prepared from human articular cartilage by using associative caesium chloride gradients of high and low starting densities. Biochem. J. 232: 111-117, 1985.

Bayliss, M.T. Proteoglycan structure and metabolism during maturation and ageing of human articular cartilage. Biochem. Transaction 18: 799-802, 1990.

- Benjamin, M. & Evans, E.J. Fibrocartilage. J. Anat. 171: 1-15, 1990.
- Bidanset, D.J.; Guidry, C.; Rosenberg, L.C.; Choi, H.U.; Timpl R. & Hook, M. Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. J. Biol. Chem. 267 (8): 5250-5256, 1992.
- Blum, B; Beter, H. & Gross, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamida gels. Electrophoresis 8: 93-99, 1987.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254, 1976.
- Brand, H.S.; Koning, M.H.M.T., Kampen, G.P.J. & Korst, J.K. Age related changes in the turnover of proteoglycans from explants of bovine articular cartilage. J. Rheum. 18 (4): 599-605, 1991.
- Buschamn, M.D.; Gluzband, Y.A.; Grodzinsky, A.J.; Kimura, J.H. & Hunziker, E.B. Chondrocytes in agarose cultured synthesised a mechanically functional extracellular matrix. J. Orth. Res. 10: 745-758, 1992.
- Caplan, A.I. Cartilage. Scientific American 251 (4): 84-94, 1984.
- Carney, S.L.; Bayliss, M.T. & Collier, J.M. Electrophoresis of ³⁵S-labelled proteoglycans on polyacrylamide-agarose composite gels and their visualisation by fluorography. Analyt. Biochem. 156: 38-44, 1986.
- Caterson, B. & Baker, J. The link proteins as specific components of cartilage proteoglycan aggregates in vivo. J. Biol. Chem. 254 (7): 2394-2399, 1979.
- Caterson, B. Immunological aspects of markers of joint disease. J. Rheum. 18 (27): 19-23, 1991.

- Choi, H.U.; Jonhson, T.L.; Pal, S.; Tang, L.H.; Rosenberg, L. & Neame, P.J. Characterization of the dermatan sulfate proteoglycans, DS-PGI and DS-PGII, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-Sepharose chromatography. J. Biol. Chem. 264 (5): 2876-2884, 1989.
- Dietrich, C.P. & Dietrich, S.M.C. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. Anal. Biochem. 70: 645-647, 1976.
- Dische, Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. J. Biol. Chem. 167: 189-198, 1947.
- Doerge, K.; Sasaki, M. & Horigan, E. Complete primary structure of the rat cartilage proteoglycan core protein deduced from cDNA clones. J. Biol. Chem. 262: 17757-17767, 1987.
- Eyre, D.R.; Brickley-Parsons, D.M. & Glimcher, M.J. Predominance of type I collagen at the surface of avian articular cartilage. Febs letters 85 (2): 259-263, 1978.
- Eyre, D.R. The collagens of articular cartilage. Seminars in Arthritis and Rheumatism 21 (3): 2-11, 1991.
- Eyre, D.R.; Wu, J.J. & Woods, P.E. The cartilage collagens: structural and metabolic studies. J. Rheum. 18: 49-51, 1991.
- Farndale, R.W.; Buttle, P.J. & Barret, A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. BBA 883: 173-177, 1986.
- Feduccia, A. Osteologia das aves. In: Anatomia dos animais domésticos. (Ed. By Sisson, S. & Grossman, J.D.), vol. 2, 5^a ed., Guanabara, 1981.

- Fleischmajer, R.; Fisher, L.W.; MacDonald, E.D.; Jacobs, L.; Perlsh, J. & Termine, J.D. Decorin interacts with fibrillar collagen of embryonic and adult human skin. J. Struct. Biol. **106**: 82-90, 1991.
- Franzén, A.; Inerot, S.; Hyderup, S-O. & Heinegård, D. Variations in the composition of bovine hip articular cartilage with distance from the articular surface. Biochem. J. **195**: 535-543, 1981.
- Fung, Y.C. Bone and cartilage. In: Biomechanics - Mechanical properties of living tissues, Springer-Verlag, New York, 1981.
- Gomes, L. & Pimentel, E.R. Detection of a small proteoglycan present in xiphoid cartilage regions submitted to different biomechanical forces. Brazilian J. Med. Biol. Res. **27** (9): 2117-2124, 1994.
- Gomes, L., Pimentel, E.R. & Esquisatto, M.A.M. Combination of alcian blue and “critical electrolyte concentration” for identification of glycosaminoglycan in polyacrilamide gel electrophoresis (submetido para publicação).
- Graf, J.; Stofft, E.; Freese, U. & Niethard, F.U. The ultrastructure of articular cartilage of the chicken's knee joint. Int. Orth. **17**: 113-119, 1993.
- Guilak, F.; Ratcliffe, A., Lane, N., Rosenwasser, M.P. & Mow, V.C. Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. J. Orthop. Res. **12** (4): 474-484, 1994.
- Hardingham, T.E. & Muir, H. The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. Biochem. Biophys. **279**: 401-405, 1972.

- Hardingham, T.E.; Beardmore-Gray, M.; Duham, D.G. & Ratcliffe, A. Cartilage proteoglycans. In: CIBA Foundation Symposium. Functions of the proteoglycans., (ed. David Evered & Julie Whelan), London, vol. 124, 30-46, 1986.
- Hardingham, T.E. & Bayliss, M. Proteoglycans of articular cartilage: changes in aging and in joint disease. Seminars in Arthritis and Rheumatism 20 (3): 12-33, 1990.
- Hardingham, T.E. & Fosang, A.J. Proteoglycans: many forms and many functions. Faseb J. 6 (3): 861-870, 1992.
- Hascall, V.C. & Sajdera, S.W. Protein - polysaccharide complex from bovine nasal cartilage: the function of glycoprotein in the formation of aggregates. J. Biol. Chem. 244: 2384-2396, 1969.
- Hascall, V.C. & Sajdera, S.W. Physical properties and polydispersity of proteoglycans from bovine nasal cartilage. J. Biol. Chem. 245: 4920-4930, 1970.
- Hascall, V.C. & Riolo, K.L. Characteristics of the protein-keratan sulfate core and of keratan sulfate prepared from bovine nasal cartilage proteoglycan. J. Biol. Chem. 247 (14): 4529-4538, 1972.
- Hascall, V.C. Proteoglycans: Structure and function. In Biology of Carbohydrates, (Ginsburg, V. & Robins, P. eds.), vol. 1. New York: Wiley. 1-49, 1981.
- Hedbom, E. & Heinegård, D. Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. J. Biol. Chem. 268 (36): 27307-27312, 1993.
- Hedlund, H.; Mengarelli - Widholm, S.; Heinegård, D.; Reinholt, F.P. & Suenson, O. Fibromodulin distribution and association with collagen. Matrix Biology 14: 227-232, 1994.

- Heinegård, D. & Hascall, V. Aggregation of cartilage proteoglycans III. Characteristics the proteins isolated from trypsin digests of aggregates. J. Biol. Chem. 249 (13):4250-4256, 1974.
- Heinegård, D. Polydispersity of cartilage proteoglycans. Structural variations with size and buoyant density of the molecules. J. Biol. Chem. 252 (6): 1980-1989, 1977.
- Heinegård, D. & Axelsson, I. Distribution of keratan sulfate in cartilage proteoglycans. J. Biol. Chem. 252 (6): 1971-1979, 1977.
- Heinegård, D. & Hascall, C. V. Characteristics of the nonaggregating proteoglycans isolated from bovine nasal cartilage. J. Biol. Chem. 254 (3): 927-934, 1979.
- Heinegård, D.; Paulsson, M.; Inerot, S. & Carlstrom, C. A novel low-molecular-weight chondroitin sulfate proteoglycan isolated from cartilage. Biochem. J. 197 (2):355-366, 1981.
- Heinegård, D. & Paulsson, M. Structure and metabolism of proteoglycans. In: Extracellular Matrix Biochemistry, (Piez, K.A. & Reddi, A. H), 1^a ed., New York, Elsevier Science Publishing CO, Cap.8, 277-328, 1984.
- Heinegård, D.; Wieslander, J.; Sheehan, J.; Paulsson, M. & Sommarin, Y. Separation and characterization of two population of aggregating proteoglycan from cartilage. Biochem. J. 225: 95-106, 1985.
- Heinegård, D.; Larsson, T.; Sommarin, Y.; Franzén, A.; Paulsson, M. & Hedbom, E. Two novel matrix proteins isolated from articular cartilage show wide distributions among connective tissues. J. Biol. Chem. 261: 13866-13872, 1986.
- Heinegård, D. & Paulsson, M. Cartilage. In: Methods in Enzymology, vol. 145, part E. Structural and contractile proteins. Cap. 18, 336-363, 1987.

- Heinegård, D. & Sommarin, Y. Proteoglycans: an overview. In: Methods in Enzymology, vol. 144, part D. Structural and contractile proteins. Cap. 16 , 305-319, 1987.
- Heinegård, D. & Oldberg, A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. Faseb J. 3 (9): 2042-2051, 1989.
- Heinegård, D. & Saxne, T. Macromolecular markers in joint disease. J. Rheum. 18: 27-29, 1991.
- Heinegård, D. & Pimentel, E.R. Cartilage matrix proteins. In: Articular Cartilage and Osteoarthritis (Edited by Knetner et al) Raven Press Ltd, New York, 1992.
- Inerot,S. & Heinegård, D. Bovine tracheal cartilage proteoglycans. Variations in structure and composition with age. Collagen Rel. Res. 3: 245-262, 1983.
- Itay, S.; Abramovici, A. & Nevo, Z. Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage. Clin. Orthop. Rel. Res. 220: 284-303, 1987.
- Kitamura, K. & Yamagata, T. The occurrence of a new type of proteochondroitin sulfate in the developing chick embryo. Febs Let. 71 (2), 337-340, 1976.
- Klaus, W. & Osborn, M. The reability of molecular weigth determinations by dodecil sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244: 4406-4412, 1969.
- Koyama, E.; Leatherman, J.L., Shimazu, A.; Nah, H.D. & Pacifici, M. Syndecan-3, tenascin-C, and the development of cartilaginous skeletal elements and joints in chick limbs. Develop. Dynam. 203: 152-162, 1995.
- Kresse, H., Hausser, H. & Schönherr, E. Small proteoglycans. Experientia 49(5): 403-416, 1993.

- Kuettner, K.E.; Aydelotte, M.B. & Thonar, E.J.M.A. Articular cartilage matrix and structure: a minireview. J. Rheum. **18** (supl. 27): 46-48, 1991.
- Lauder, R.M.; Huckerby, T.N. & Nieduszyński, A. Structure of the keratan sulphate chains attached to fibromodulin isolated from bovine tracheal cartilage. Biochem. J. **302**: 417-423, 1994.
- Linsenmayer, T.F. Collagen. In: Cell biology of extracellular matrix, (ed. Hay, E.D.), Plenum Press, New York, 1983.
- Liu, J. Laue, T.M., Choi, H.U.; Tang, L.H. & Rosenberg, L. The self-association of biglycan from bovine articular cartilage. J. Biol. Chem. **269**(45): 28366-28373, 1994.
- Lohmander, S. Proteoglycans of joint cartilage-structure, function, turnover and role as markers of joint disease. Baillière's Clinical Rheumatology **2** (1): 37-62, 1988.
- Lowther, D.A.; Robinson, H.C.; Dolman, J.W. & Thomas, K.W. Cartilage matrix components in chickens with tibial dyschondroplasia. J. Nutr. **104**: 922-929, 1974.
- de Lucca, S.; Lohmander, L.S.; Nilsson, B.; Hascal, 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):6077-6083, 1980.
- Mann, D. M.; Yamaguchi, Y. Bourdon, M.A. & Ruoslahti, E. Analysis of glycosaminoglycans substitution in decorin by site-directed mutagenesis. J. Biol. Chem. **265**: 5317-5323, 1990.
- Mayne, R. & Brewton, R.G. New members of the collagen superfamily. Curr. Opin. Cell Biol. **5**: 883-890, 1993.

- Michelacci, Y.M. & Horton, D.S.P.Q. Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. Comp. Biochem. Physiol. **92 B** (4):651-658, 1989.
- Miller, E.J. & Matukas, V.J. Chick cartilage collagen: a new type of $\alpha 1$ chain not present in bone or skin of the species. Proc. Natl. Sci. USA Acad. **64**: 1264-1268, 1969.
- Møller, H.J.; Heinegård, D. & Poulsen, J.H. Combined alcian blue and silver staining of subnanogram quantities of proteoglycans and sulfate-polyacrylamide gels. Anal. Biochem. **209**: 169-175, 1993.
- Müller, F.J.; Pita, J.C.; Manicourt, D. H.; Malinin, T.I.; Shoonbeck, J.M. & Mow, V.C. Centrifugal characterization of proteoglycans from various depth layers and weight-bearing areas of normal and abnormal human articular cartilage. J. Orthop. Res. **7**: 326-334, 1989.
- Neame, P.J.; Périn, J.; Bonnet, F.; Christner, J.E.; Jollés, P. & Baker, J.R. An amino acid sequence common to both cartilage proteoglycan and link protein. J. Biol. Chem. **260** (23): 12402-12404, 1985.
- Oldberg, A.; Antonsson, P.; Lindblom, K. & Heinegård, 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): 2601-2604, 1989.
- Oldberg, A.; Antonsson, P.; Hedbom, E. & Heinegård, D. Structure and function of extracellular matrix proteoglycans. Biochemical Society Transactions **18**: 789-792, 1990.
- Pfäffle, M.; Ruggiero, F.; Hofmann, H.; Fernandez, M.P.; Selmin, O.; Yamada, Y. & Garrone, R. Biosynthesis, secretion and extracellular localization of anchorin CII, a collagen-binding protein of the capactin family. EMBO J. **7**: 2335-2342, 1988.

- Robinson, H.C. & Hopwood, J.J. The alkaline cleavage and borohydride reduction of cartilage of proteoglycan. Biochem. J. 133: 457-470, 1973.
- Rosenberg, L.; Choi, H.U.; Tang, L.H.; Pal, S.; Johnson, T.; Lyons, D.A. & Laue, T.M. Proteoglycans of bovine articular cartilage. J. Biol. Chem. 266 (11): 7016-7024, 1991.
- Roughley, P.J. & White, R.J. Age-related changes in the structure of the proteoglycan subunits from human articular cartilage. J. Biol. Chem. 255: 217-224, 1980.
- Scott, J.E. & Orford, C.R. Dermatan-sulphate rich proteoglycan associates with rat tail tendon collagen at the d band in the gap region. Biochem. J. 195: 213-216, 1981.
- 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: 318-326, 1990.
- Swann, D.A.; Powell, S. & Sotman, S. The heterogeneity of cartilage proteoglycans. J. Biol. Chem. 254 (3): 945-954, 1979.
- Shulman, H.J. & Meyer, K. Protein-polysaccharide of chicken cartilage and chondrocyte cell cultures. Biochem. J. 120: 689-697, 1970.
- Thorp, B.H.; Jakowlew, S.B. & Goddard, C. Avian dyschondroplasia: local deficiencies in growth factors are integral to the aetiopathogenesis. Avian Pathol. 24: 135-148, 1995.
- Towbin, T. & Gordon, S. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and same applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354, 1979.
- Treadwell, B.V.; Shader, L.; Towle, C.A.; Mankin, D.P. & Mankin, H.J. Purification of the "link proteins" from nasal septum. Bioch. Biophys. Res. Comm. 94: 159-166, 1980.

- Upholt, W.B.; Chandrasekaran, L. & Tanser, M.L. Molecular cloning and analysis of the protein modules of aggrecans. Experientia 49 (5): 384-392, 1993.
- Van Der Rest, M. & Garrone, R. Collagen family of proteins. Faseb J. 5: 2814-2822, 1991.
- Van Sickle, D.C. & Kincaid, S.A. Comparative arthrology. In: The joints and synovial fluid, vol.1, ed. Leon Sokoloff, M.D., Academic Press, New York, 1978.
- 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 reactive groups. Variation in birefringence and differences as compared to collagen I. Acta Histochem. 83: 189-205, 1988.
- Vidal, B.C. Cell and extracellular matrix interaction: a feed-back theory based on molecular order and recognition-adhesion events. Revista Unicamp 4 (1): 11-14, 1993.
- Vilim, V. & Fosang, A.J. Proteoglycans isolated from dissociative extracts of differently aged human articular cartilage: characterization of naturally occurring hyaluronan-binding fragments of aggrecan. Biochem. J. 304: 887-894, 1994.
- Zingales, B. Analysis of protein sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: Genes and antigens of parasites. Morel, C.M. Rio de Janeiro, Fiocruz, 357-363, 1984.