

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GLICOPROTEÍNAS ESTRUTURAS ASSOCIADAS AOS FEIXES DE COLÁGENO

ÁUREO TATSUMI YAMADA

ORIENTADOR: PROF. DR. BENEDICTO DE CAMPOS VIDAL

1983

CAMPINAS

A todos que lutam por um
ideal e trabalham pelo
progresso da humanidade

AGRADECIMENTOS

- . Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, manifesto aqui o meu respeito e gratidão não só pela orientação, apoio e dedicação em cada momento deste trabalho, mas sobretudo pela amizade e confiança que tanto me alentou nesta minha iniciação científica.
- . Aos Professores, Dr. Sérgio Catanzarro Guimarães, Dra. Nilce C. Meirelles, Dra. Maria Luiza Silveira Mello e Dr. Luciano Queiroz pela leitura acurada do manuscrito desta tese, bem como pelas sugestões apresentadas.
- . Ao Departamento de Biologia Celular e ao seu Curso de Pós - Graduação. Sem os préstimos e o apoio que obtive dos mesmos não seria possível a realização deste trabalho.
- . Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia UNICAMP, na pessoa do seu Coordenador, Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, onde foi realizado parte deste trabalho.
- . Ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia - UNICAMP, na pessoa do Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, por ter permitido o uso da ultra-centrífuga.
- . Aos funcionários e colegas do Departamento de Biologia Celular que voluntariamente auxiliaram durante o desenvolvimento deste trabalho.
- . Ao casal Shirlei e Édson R. Pimentel, que muito me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho e pelas constantes manifestações de amizade e coleguismo.

- . À técnica Maria Tereza de Paula, não só pelo esmerado serviço de ampliação fotográfica deste trabalho, mas sobretudo pela amizade demonstrada desde o início.
- . À secretária Maria de Lourdes Ferreira, pelos pacientes serviços de datilografia deste trabalho.
- . À família Nishino, cujo lar compartilho.
- . Aos meus pais Oscar e Missaki, por terem me criado ensinando o sentido e o âmago da vida. Sem isto eu nada valeria.
- . À Eunice, companheira constante de todos os momentos.
- . É impossível enumerar a todos, mas expresso aqui a minha solene gratidão a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

- . O presente trabalho pode ser realizado graças a doação de equipamentos pela FAPESP, CNPq e Fundação Alexander von Humboldt ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia - UNICAMP na pessoa dos Professores, Dr. Benedicto de Campos Vidal e Dra. Maria Luiza Silveira Mello.

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	11
MATERIAIS E MÉTODOS	12
1. Extração e Isolamento das Glicoproteínas Estruturais	12
1.1. Extração pela solução de NaCl 0,14M pH 7,0 -7,5	13
1.2. Extração pela solução de CaCl ₂ 0,1M pH 8,0 -8,5	13
1.3. Extração pela solução de TCA 3% aquecido .	15
1.3.1. Extração pela colagenase	15
1.4. Extração pela uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1%	16
1.5. Isolamento e purificação	16
2. Extração das glicoproteínas estruturais de osso	17
3. Preparo de colágeno I de tendões de rato e de boi	18
4. Caracterização físico-química das GPEs.	18
4.1. Solubilidade	18
4.2. Eletroforeses (em disco) em Gel de poliacrilamida - SDS	19
4.2.1. Técnica de SEGREST & JACKSON modificada	19
4.2.2. Técnica de WEBER, PRINGLE & OSBORN modificada	21
4.2.3. Outras técnicas de observação da migração eletroforética	24

4.3.	Fracionamento das GPEs	24
4.4.	Teste da interação de GPEs - colágeno ...	25
5.	Capacidade de interação com corantes	25
5.1.	"Naphthol-Yellow-S"	25
5.1.1.	Interação com as GPEs.	26
5.1.2.	Interação com o colágeno	26
5.1.3.	Relação entre GPEs e colágenos quanto à capacidade de interação com corantes (N.Y.-S)	27
6.	Análise ultraestrutural	27
6.1.	Extrato insolúvel em T.C.A. 3% aquecido .	27
6.1.1.	Microscopia de polarização	27
6.1.2.	Microscopia Eletrônica	28
6.2.	Extrato de uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1%	29
6.2.1.	Microscopia de polarização	29
6.2.2.	Microscopia eletrônica	30
6.3.	Produto de interação GPEs - colágeno	31
6.3.1.	Microscopia de polarização	31
6.3.2.	Microscopia eletrônica	31
RESULTADOS	32
1.	Extração das glicoproteínas estruturais	32
1.1.	Extração pela solução de NaCl 0,14M pH 7,0-7,5	32
1.2.	Extração pela solução de CaCl ₂ 0,1M pH 8,0-8,5	32
1.3.	Extração pela solução de TCA 3% aquecido .	34
1.4.	Extração pela solução uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1%	35
1.5.	Purificação do extrato solúvel em uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1%	35

2.	Extração das GPEs da matrix desmineralizada de osso	37
3.	Isolamento do colágeno I de tendão	37
3.1.	Tendão da cauda de rato	37
3.2.	Tendão calcâneo bovino	38
4.	Caracterização físico-química das GPEs	38
4.1.	Solubilidade	38
4.2.	Eletroforeses em géis de poliacrilamida -SDS	40
4.2.1.	Padrão comparativo entre GPEs de tendão e de osso	41
4.2.2.	Padrão de comportamento dos colágenos I de rato e de boi	43
4.3.	Fracionamento das GPEs	43
4.4.	Interação GPEs - colágeno	45
5.	Capacidade de interação com corantes	45
5.1.	"Naphthol Yellow - S"	45
5.1.1.	Interação com as GPEs	46
5.1.2.	Interação com o colágeno	46
5.1.2.	Padrão comparativo da capacidade de captação	47
6.	Análise ultraestrutural	54
6.1.	Microscopia de polarização	54
6.1.1.	Extrato insolúvel em TCA 3% aquecido	54
6.1.2.	Extrato de uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1%	57
6.1.3.	Produto de interação GPEs - colágeno	57
6.2.	Microscopia eletrônica	59
6.2.1.	Extrato insolúvel em TCA 3% aquecido	59
6.2.2.	Extrato de uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1%	62
6.2.3.	Produto de interação GPEs - colágeno	66

DISCUSSÃO	72
CONCLUSÃO	88
RESUMO	90
ABSTRACT	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

INTRODUÇÃO

As glicoproteínas estão amplamente distribuídas entre os seres vivos, encontrando-se não apenas em animais vertebrados e invertebrados como também em plantas e organismos unicelulares (SPIRO, 1973). O interesse crescente em pesquisas dedicadas às mesmas, deve-se a sua universalidade de distribuição, e às múltiplas funções biológicas desempenhadas por elas nas mais variadas estruturas. Assim, modalidades que compreendem desde componentes de membranas biológicas, mediadores químicos da fisiologia celular, mediadores bioquímicos das interações celulares e até como componentes da matriz extracelular, fazem-nas assumir uma importância cada vez maior dentre os objetivos de pesquisas básicas e aplicadas.

A complexa constituição da matriz extracelular animal envolve fundamentalmente a participação de quatro componentes (ROBERT, 1980). São estes representados pelas proteoglicanas, colágenos, glicoproteínas não colagênicas e a elastina, os quais participando em proporções diferentes entre si, condicionam características físicas e químicas variadas, assim como organizações estruturais peculiares em cada um dos tecidos.

No entanto, a proporcionalidade destes componentes entre si não deve ser o fator único e preponderante, na organização supra molecular da matriz extracelular do sistema conjuntivo animal. Por exemplo, a heterogeneidade na composição química dos colágenos isolados dos vários tecidos, classificando-os como colágeno I, II, III, IV, V ou outros; e mais ainda, a predominância de uma determinada glicosaminoglicana na

fração proteoglicânica, torna sugestiva a hipótese de que o fator heterogeneidade também tenha uma participação de efeito regulatório na organização e estruturação dos diferentes tecidos do sistema conjuntivo.

Neste contexto, as glicoproteínas também compõem um conjunto de elementos bastante heterogêneo na matriz do tecido conjuntivo. ANDERSON (1976) propõe embora não explicitamente, dois tipos glicoprotéicos com relação ao comportamento frente aos processos de suas extrações; a população de glicoproteínas ditas "solúveis" e uma outra denominada de "estruturais" (G.P.Es.). Estas últimas encontram-se intimamente associadas à "matriz insolúvel" (ROBERT & DISCHE, 1963; ROBERT & COMTE, 1968; ANDERSON, 1976; SMITH et al., 1980; HAY, 1981) e mostram-se altamente resistentes aos processos usuais de extrações de glicoproteínas. As primeiras, são facilmente extraídas em soluções tampões simples, como pode ser observado pelos processos utilizados por BOURILLON & GOT, (1962); SHIMADA e colaboradores (1972) em dermes; DUNSTONE & FRANEK, (1967); JANADO & DUNSTONE (1972) em cartilagens; HERRING & KENT (1963) e QUELCH & MELICK (1980) em ossos; RADHAKRISHNAMURTHY e colaboradores (1964) em aortas; ANDERSON & JACKSON (1972) em tendões; THOMAS & LEAVER (1977); SMITH e colaboradores (1980) em dentina.

Embora o colágeno também seja uma glicoproteína estrutural e componente da "matriz insolúvel", classifica-se à parte (HAY, 1981) dada a sua peculiaridade morfo-funcional, estrutural e bioquímica.

Inicialmente denominadas de "proteínas estruturais acídicas", por apresentarem o seu ponto isoelétrico (pI) no intervalo de pH entre 4,7 e 4,8 (TIMPL et al., 1968;

FURTHMAYR e TIMPL, 1970; WOLFF et alii, 1971), as glicoproteínas estruturais foram extraídas de diferentes tecidos a partir do processo preconizado por ROBERT & DISCHE (1963). Este processo, modificado posteriormente por ROBERT e colaboradores (1965), TIMPL e colaboradores (1968) e ROBERT & COMTE (1968), consiste na extração seletiva dos constituintes da matriz do tecido conjuntivo.

As proteoglicanas são extraídas através da sua solubilização em soluções de cloreto de cálcio tamponadas em pH alcalino (8,0 a 8,5). Os colágenos solúveis, podem ser extraídos tanto antes como depois da extração das proteoglicanas, ou mesmo concomitantemente, por meio de solução salina tamponada em pH neutro. Ao material residual do tratamento acima, denomina-se "matriz insolúvel" (ROBERT & DISCHE, 1963; ROBERT & COMTE, 1968; TIMPL et al, 1968; WOLFF et alii, 1971; FURUTO e SCHNEIR, 1975) e é composto de colágeno insolúvel, glicoproteínas estruturais e elastina.

Os colágenos da "matriz insolúvel" são extraídos por meio de hidrólise em ácido tricloroacético (T.C.A.) 0,3M, aquecida a temperatura de 90-95°C (FITCH et al, 1955) ou alternativamente pelos tratamentos com colagenase ou hidroxilamina em tiocianeto de potássio (WOLFF et alii, 1971).

BACH & BANTLEY (1980) criticam severamente o procedimento usual para a extração das glicoproteínas estruturais, principalmente no que se refere à utilização do T.C.A. aquecido ou colagenases. Isto, creditado respectivamente à ação hidrolítica e desnaturante do T.C.A. aquecido sobre as proteínas em geral e a procedência duvidosa das colagenases utilizadas, implicando na sua falta de especificidade. Os referi-

dos autores questionam ainda, a existência destas glicoproteínas estruturais na matriz extracelular animal, admitindo que as propriedades químicas e físicas das proteínas isoladas por eles da aorta bovina, correspondem e equivalem às características da actina.

Outros autores (ANDERSON & JACKSON, 1971; WOLFF et alii, 1971; ANDERSON, 1976), embora não questionem a existência destas glicoproteínas estruturais na matriz acelular do tecido conjuntivo, mantêm alguma reserva quanto ao emprego de métodos de extrações que fazem uso de altas temperaturas e extremos de pH, o que favoreceriam modificações químicas nas glicoproteínas isoladas.

Estas refutações fizeram com que ROBERT (1982), estabelecesse parâmetros e critérios que caracterizassem as glicoproteínas estruturais (G.P.Es.). Cabe aqui por ora, citar alguns destes parâmetros no âmbito das propriedades físicas, químicas e funcionais, como meios de se reconhecer este constituinte fundamental do tecido conjuntivo.

. Estas glicoproteínas, encontram-se invariavelmente na matriz extracelular, porém são distintas daquelas que se dissolvem livremente no líquido intersticial ou no plasma sanguíneo.

. São sintetizadas no local onde se encontram pelas células de origem mesenquimal, e permanecem associadas intimamente com outras macromoléculas da matriz.

. Estão envolvidas com funções específicas, relacionadas com o estado diferenciado do tecido, tais como, regulação do tamanho das fibras de colágeno e interações célula-matriz.

. Caracterizam-se ainda pela diversidade dos seus pesos moleculares (12.000 a 600.000) e variedade na composição em carboidratos, configurando sua heterogeneidade, além de pronunciado caráter antigênico, com especificidade de órgão e/ou de espécie.

O fator solubilidade não foi por ele considerado como sendo um critério importante para a caracterização das glicoproteínas estruturais.

Os critérios acima são bastante gerais, o que permite uma grande variedade de constituintes da matriz acelar serem classificadas como glicoproteínas estruturais.

Seguindo-se este raciocínio, mesmo as glicoproteínas que foram consideradas por ANDERSON (1976) como sendo "glicoproteínas solúveis" podem ser classificadas como "glicoproteínas estruturais" de ROBERT (1982). As glicoproteínas estruturais consideradas como "associadas aos feixes de colágeno" na presente tese, compreendem uma categoria mais restrita quanto ao conceito, características e procedências. Consideram-se como tais apenas aquelas glicoproteínas, intimamente associadas à "matriz extra celular insolúvel" de origem mesenquimal; extraíveis desta matriz somente após remoção do colágeno insolúvel; com estabilidade físico-química elevada; e com participação efetiva na estruturação do arcabouço do feixe colagênico.

Neste âmbito conceitual mais restrito de glicoproteínas estruturais, poucos dados têm sido relatados.

Quanto à composição, as glicoproteínas estruturais, caracterizam-se pelo alto teor dos aminoácidos ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, lisina + hidroxilisina e au

sência ou apenas traços de hidroxiprolina (TIMPL et al, 1968, 1969; ROBERT & COMTE, 1968), independentemente do tecido e espécie animal utilizados para as suas extrações (aorta, cartilagem, derme, córnea). A presença ainda de cerca de 20 resíduos de cistina por 1000 aminoácidos, permite assegurar a ocorrência de pontes dissulfetos como o foi proposto por FUTHMAYR & TIMPL (1970) e ROBERT e colaboradores (1970).

Concernente à composição de carboidratos, MOCZAR e colaboradores (1967) apresentaram as G.P.Es. de aorta bovina contendo hexoses (com teor maior de galactose) e hexosaminas (teor maior de glicosaminas), porém com a predominância da última sobre as primeiras. Por outro lado, ROBERT & DISCHE (1963) encontraram nas glicoproteínas da córnea, uma relação menor para as galactoses dentre as hexoses, porém sempre as hexosaminas prevalecendo sobre as hexoses.

ROBERT e colaboradores (1970) estabeleceram as diferenças na composição de açúcares entre a córnea e a aorta, mostrando uma grande quantidade de ácido siálico entre os carboidratos das G.P.Es. da aorta, os quais eram removidos durante o tratamento pelo T.C.A. aquecido. Estabeleceram ainda que, mesmo em órgãos homólogos, porém de espécies diferentes (como nas córneas de bois, coelhos e tubarões), os teores e proporções dos açúcares galactose, glicose, manose e glicosaminas são variáveis.

O extrato glicoprotéico da córnea obtido pela solubilização em uréia 8M, mostra uma única fração pela cromatografia de gel filtração (Bio-gel P-100), cuja homogeneidade foi confirmada pelos padrões eletroforéticos e velocidade de sedimentação (ROBERT et al, 1970). No entanto, este componente

que possui um peso molecular igual a 78.000, quando submetido à ação de 2-mercaptoetanol, fornece duas subfrações; uma com P.M. = 34.000 (cerca de 80% do total) e outra com P.M.=78.000, sugerindo uma estrutura constituída de subunidades.

FURTHMAYR & TIMPL (1970), utilizando outros métodos além de uréia 8M para solubilização das G.P.Es. de dermes, encontraram um número maior de frações nas eletroforeses. Uma fração de maior mobilidade (com P.M. estimado em 15.000) fora observado somente nos materiais solubilizados pela adição de boroidreto de sódio 0,1M à uréia 8M. O extrato de uréia 8M com tióis, forneceu um padrão eletroforético, onde a fração maior, corresponde a um constituinte com P.M. próximo a 40.000 dentre as 6-7 frações observadas.

Independentemente dos processos utilizados para a extração das glicoproteínas estruturais, tanto as classificações de acordo com conceito mais restrito aqui proposto, como as compreendidas dentro do conceito mais amplo de ROBERT (1980), encontra-se um consenso quanto às suas funções, isto é, atribui-se-lhes uma participação na estruturação da matriz extra-celular.

JACKSON & BENTLEY (1968) e ANDERSON & JACKSON (1972), propuseram que as glicoproteínas tenham como função a estabilização do tecido e manutenção da estabilidade estrutural das fibras de colágeno. Por outro lado, HERRING (1976) propõe que às glicoproteínas encontradas somente nos ossos, também possam ser atribuídas alguma participação na mineralização óssea.

As diferenças de composições de aminoácidos, principalmente nos teores de lisina e hidroxilisina, somadas às va

riações nas composições de açúcares, devem contribuir para as propriedades das glicoproteínas dos diferentes tecidos (ROBERT & COMTE, 1968; MOCZAR & MOCZAR, 1970).

Todas as evidências sugerem que o colágeno está firmemente ligado às glicoproteínas e que desta ligação surge uma maior estabilidade estrutural do colágeno insolúvel.

JACKSON & BENTLEY (1968) propõem um modelo hipotético da estruturação dos feixes de colágenos e da participação de cada um dos componentes. Segundo estes autores, as glicoproteínas estariam envolvidas na agregação das fibrilas de colágeno formando fibras, obviamente mais espessas. Isto seria possível graças às cadeias laterais de carboidratos das glicoproteínas que interagindo com o colágeno, promoveriam as suas aproximações. Uma supra-organização das fibras de colágeno teria a participação também das proteoglicanas para a sua estabilização como feixes de colágeno (VIDAL, 1963, 1964, 1977).

Os feixes de colágeno são complexos biopoliméricos compostos de proteoglicanas, colágenos, glicoproteínas estruturais e eventualmente de elastina, os quais segundo VIDAL (1980_b), integram-se em estruturas com alto grau de ordem molecular, conferindo um estado de cristalinidade detectável e mensurável.

O método de eleição para o estudo destes complexos biopoliméricos consiste na determinação qualitativa e quantitativa das propriedades anisotrópicas ópticas (birrefringência e dicroísmo), as quais têm sido utilizadas nas pesquisas de ordem molecular e das variações decorrentes de estado patológico e fisiológico do grau de agregação dos feixes de colágeno (*"i n s i t u e i n v i-*

t r o ") (VIDAL, 1963, 1964, 1966, 1967, 1981; VIDAL & MELLO, 1970; MELLO & VIDAL, 1973; MELLO et alii, 1975, 1979; PIMENTEL, 1981; VIDAL et al, 1982).

VIDAL (1977, 1980_b), analisando as propriedades anisotrópicas dos feixes de colágeno (tendões) propõe uma distribuição ordenada das glicoproteínas estruturais, que teriam o eixo das suas cadeias paralelas às fibras de colágeno, confirmando a hipótese de JACKSON & BENTLEY (1968).

Por outro lado SMITH e colaboradores (1980) propõem que as glicoproteínas estruturais da dentina extraídas em uréia, com e sem tióis, devam exercer um papel estrutural sem ligar-se diretamente ao colágeno, e que a insolubilidade destas glicoproteínas é devida ao alto grau de associação entre si.

Neste contexto, as questões centrais a serem esclarecidas são as seguintes:

. Se as G.P.Es. realmente contribuem para a estabilidade físico-química da matriz colagênica.

. Sendo esta premissa acima verdadeira, seria em decorrência da interação direta com o colágeno por meio de ligações eletrostáticas, ou covalentes, ou ainda tipo lectina? Teriam estas ligações uma disposição ordenada?

. Seria a interação apenas com o colágeno na forma de auto-agregados de glicoproteínas com ou sem ordenamento molecular, mas que por si só, apresentaria alta estabilidade físico-química?

. Qualquer que seja a interação, quer diretamente com o colágeno, ou quer na forma de auto-agregados glicoprotéi

cos, que grau de participação teriam efetivamente as G.P.Es. na organização dos feixes de colágeno?

. Faz-se necessário ainda, reavaliar as refutações feitas à metodologia proposta por ROBERT & DISCHE (1963) quanto ao emprego do ácido tricloroacético aquecido, e da uréia com redutores de pontes dissulfeto, durante as extrações das G.P.Es.. Supõe-se que, em ambos os casos promovam-se modificações irreversíveis das G.P.Es., transformando-as em produtos artefatuais que invalidam-nas para estudos bioquímicos subsequentes.

. E por último, tendo sido sugerida a natureza heterogênea das G.P.Es. extraídas de diferentes tecidos, mas sem a generalização do termo por falta de dados extensivos, faz-se necessário ainda estabelecer eventuais diversidades entre modelos biológicos diferentes, porém estrutural e funcionalmente semelhantes, como o são tendões e ossos.

OBJETIVOS

Com base no que foi descrito até agora para as G.P.Es. associadas aos feixes de colágeno, o presente trabalho enfoca os seguintes aspectos como objetivos fundamentais:

. Reformular a partir de técnicas já pré-estabelecidas, uma metodologia simples e eficiente para extração das G.P.Es..

. Avaliar quais estados de agregações e/ou interações se fazem presentes entre as G.P.Es. e qual seria a sua participação na organização supra-molecular da matriz colagênica. Estas informações possibilitariam por sua vez uma correlação morfo-funcional das G.P.Es..

. Obter dados que permitam averiguar a heterogeneidade proposta para as G.P.Es., no que diz respeito a dois tecidos diferentes (tendões e ossos de um mesmo animal), porém com naturezas estruturais e funcionais similares.

. Tentar avaliar, pelas análises preliminares das propriedades físico-químicas das G.P.Es., o seu papel na estabilização e estruturação dos feixes de colágeno.

MATERIAIS E MÉTODOS

MODELOS BIOLÓGICOS EMPREGADOS

Para o isolamento e estudos das glicoproteínas estruturais, foram utilizados:

- . Tendão calcanear de bois adultos jovens recém abatidos.
- . Segmentos do osso diafisário da tíbia de bois.

1. EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DAS GLICOPROTEÍNAS ESTRUTURAIS DOS TENDÕES.

As peças tendinosas pesando uma média de 45-60 g foram submetidas a um processo de dissecação prévia para facilitar as etapas de extrações subsequentes. Este processo inclui descongelamento das peças, remoção da camada de tecido conjuntivo superficial destacável e também do tecido muscular remanescente. Em seguida foram lavadas em água destilada refrigerada para eliminar os resquícios de sangue.

O tendão uma vez limpo, foi dissociado manualmente, obtendo-se fragmentos de espessura não superior a 2mm e o comprimento maior não ultrapassando 4-5mm. Tomou-se sempre o cuidado para que o eixo maior fosse coincidente e paralelo ao eixo maior do tendão, o que posteriormente facilitou a orientação do material para estudos morfológicos. Eventualmente os tendões foram congelados em nitrogênio líquido durante a clivagem, o que facilitava o seu manuseio e diminuindo os riscos de provocar alterações morfológicas por ação mecânica.

Usou-se uma extração seletiva segundo os métodos

propostos por ROBERT & DISCHE (1963) e TIMPL e colaboradores (1968), com modificações introduzidas de acordo com a necessidade inerente ao material empregado. A sequência sumarizada do processo pode ser visualizada no esquema 01.

1.1. Extração pela solução de NaCl 0,14M pH 7,0-7,5

Os fragmentos do tendão clivado foram submetidos a extrações em 250-300ml da solução de cloreto de sódio 0,14M em tampão fosfato 0,02M pH 7,0-7,5, durante 12-16 horas à temperatura de 0-4°C. Repetiu-se a extração por três vezes no período total de 48 horas. Ao final da última extração, decantou-se o sobrenadante e os resíduos foram lavados em várias trocas de água destilada refrigerada, para eliminar os resíduos de cloreto de sódio.

1.2. Extração pela solução de CaCl₂ 0,1M pH 8,0-8,5

Aos resíduos da etapa anterior foram adicionados 250-300ml da solução de cloreto de cálcio (p.a. Carlo Erba) 0,1M em tampão Tris-Acetato 0,05M pH 8,0-8,5, e mantidas em contato durante 12 horas à temperatura de 0-4°C. Ao final das 12 horas decantou-se o sobrenadante, adicionou-se igual volume da solução extratora e o material foi submetido a rápida trituração mecânica (15-20 segundos) em um liquidificador. O material triturado foi filtrado em pano (entretela não gomada), e o resíduo ressuspenso em nova solução extratora. Após duas renovações da solução, que se processou ao longo de 24 horas, o resíduo da última extração foi lavado em água destilada por várias vezes no intuito de retirar todo o excesso de cálcio do meio.

TENDÃO CLIVADO

+

NaCl - 0,14 M

Tampão fosfato 0,02M pH 7,0-7,5

(3x) - 12 h a temp. de 4°C

+

-Proteoglicanas
-Colágeno insolúvel

FILTRAÇÃO

Resíduo

Filtrado

- Proteínas séricas
- Glicoproteínas solúveis

CaCl₂ - 0,1 M

Tampão Tris-acetato 0,05 M pH 8,0

(3x) - 12 h a temp. de 4°C

+

-Colágeno insolúvel
-GPEs.
-Elastina

FILTRAÇÃO

Resíduo

Filtrado

- Proteoglicanas

T.C.A. 3%

(3x) - 30 min. a 90 - 95°C

+

-GPEs
-Elastina

CENTRIFUGAÇÃO

Resíduo

sobrenadante

Colágeno insolúvel

Uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1%

(3x) - 12 a 24 h a temp. de 4°C

+

-Elastina

CENTRIFUGAÇÃO

Resíduo

sobrenadante

GPEs*

Descartado

Esquema 1. Fluxograma do processo de extração das glicoproteínas estruturais (GPEs*) baseado na metodologia proposta por ROBERT & DISCHE (1963).

Dos sobrenadantes de cada um dos extratos do cloreto de cálcio foram retiradas alíquotas, e estas submetidas a dois testes. Um dos testes consistiu na adição de igual volume de acetona (p.a. Carlo Erba) mantendo-se temperatura de 0°C durante 30 minutos. O segundo pela adição de 2ml de uma solução meio saturada em água de brometo de N,N,N,N, trimetilcetil amônio (R.P.E. Carlo Erba) sobre 5ml da amostra, mantendo-se temperatura ambiente durante 60 minutos. Observou-se o precipitado formado de ambos os testes após submetidos a centrifugação a 3.000g durante 15 minutos.

1.3. Extração pela solução de ácido tricloroacético (T.C.A.) 3% aquecido.

O resíduo total do tratamento anterior foi ressuspenso em 200-250ml da solução aquosa de T.C.A. (p.a.Reagen) 3% e aquecido em banho-maria fervente ($\pm 93^{\circ}\text{C}$) durante 30 minutos. O tratamento foi repetido por mais duas vezes, com o tempo total da extração variando de 50 a 60 minutos.

Os resíduos da última extração, classificados como "extrato insolúvel em T.C.A.", foram lavados várias vezes em água e uma pequena alíquota deste resíduo foi coletado para estudos morfológicos. Para este último propósito preferiu-se as peças tendinosas oriundas da clivagem em meio ao nitrogênio líquido.

1.3.1. Extração pela colagenase

Os resíduos da extração pela solução de CaCl_2 tamponado foram submetidos paralelamente à extração pela colagenase tipo III (Sigma) como processo alternativo do tratamen-

to pelo ácido tricloroacético aquecido.

2,0mg de collagenase tipo III preparada em 200 ml de tampão Tris - HCl 0,02M pH 7,4 contendo 0,1M de acetato de cálcio foi adicionada sobre os resíduos do tratamento pelo cloreto de cálcio durante 96 horas a 37°C. A este meio foi adicionada 0,1% de azida sódica (p.a. Merck) como agente bacteriostático.

Este produto de digestão enzimática foi submetido a centrifugação (3.000g durante 20 minutos) e o resíduo coletado e lavado várias vezes em água destilada.

1.4. Extração pela Uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1%

Tanto o extrato insolúvel em T.C.A. 3% como o resíduo do tratamento pela collagenase III, foram submetidos à extração de uréia 8M+2-mercaptoetanol 0,1% com o pH ajustado em 8,0 com hidróxido de sódio 0,2N. O volume empregado para cada amostra foi cerca de 40-50ml, e assim mantidos à temperatura de 0-4°C com ocasionais agitações. Após 24 horas, os extratos foram centrifugados a 3.000g durante 40 minutos e os sobrenadantes filtrados em papel de filtro duplo (Whatman nº 2). Os resíduos foram novamente solubilizados na solução de uréia 8M e 2-mercaptoetanol 0,1% com o volume deste reduzido para a metade. O conjunto de filtrados foi coletado e acondicionado para purificação e isolamento.

1.5. Isolamento e purificação

Os extratos solúveis em uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1% (2 - Me) provenientes tanto do tratamento pelo T.C.A.

como pela colagenase, foram dialisados exaustivamente em água corrente (12-24 horas) seguida de diálise em água destilada a temperatura de 0-4°C durante 12 horas. Eventualmente foram dialisados também em meio a tampão acetato 0,01M pH 4,7-4,8 durante 6 horas. No caso deste último, efetuou-se novas diálises em água destilada até o retorno do pH próprio desta última. O precipitado formado foi coletado por meio de centrifugação a 2.000g (Centrífuga IEC - Universal Model UV) e então submetido ao processo de purificação. A purificação consistiu em repetir-se a solubilização em uréia 8M + 2-Me 0,1% e precipitação pela diálise.

Aos produtos da última etapa da purificação foi permitido apenas o processo de sedimentação espontânea para a separação do precipitado. Os precipitados foram divididos em duas alíquotas. Uma das alíquotas foi liofilizada e a outra mantida em suspensão aquosa. A estes produtos isolados e purificados, denominou-se "glicoproteínas estruturais solúveis em uréia 8M + 0,1% de 2-Me" ou simplesmente "G.P.Es. -UM".

2. EXTRAÇÃO DAS GLICOPROTEÍNAS ESTRUTURAIS DE OSSO

O segmento diafisário da tíbia de boi após exaustivas lavagens em água para eliminar da melhor maneira possível o material não pertencente à matriz óssea, foram clivados (serrados) em segmentos de aproximadamente 1cm³ e desmineralizados pela solução de ácido clorídrico 5% (7 dias à temperatura de 4°C). Com cerca de 20g deste material seguiu-se os mesmos processos de tratamento submetidos aos tendões, a partir da extração pelo TCA 3% ou colagenase III.

3. PREPARO DE COLÁGENO I DE TENDÕES DE RATO E DE BOI

Os colágenos do tendão de rato e de boi foram isolados com o propósito de se comparar as possíveis diferenças químicas existentes entre si e com as G.P.Es..

Os tendões das caudas de três ratos foram submetidos à extração pela solução de ácido acético 1-2% (pH 2,7), segundo a técnica de WOOD (1964). O filtrado deste extrato contém o colágeno solúvel em ácido acético, e este pode ser precipitado pelo processo de "salting-out". Para este último foi utilizado uma solução aquosa de cloreto de sódio 10%. O precipitado formado, uma vez coletado, foi dialisado exaustivamente em água destilada (72-96 horas) à temperatura de 4°C. Para purificação deste colágeno tipo I, foram repetidas as operações de solubilização em ácido acético, precipitação por "salting-out" e diálise em água por mais duas vezes. O produto final foi liofilizado.

O mesmo processo foi utilizado para tendões bovinos (10g) porém os fragmentos dos tendões foram previamente tratados pela pepsina (Merck) a 0,1% em tampão fosfato 0,02M pH 7,0 durante 24 horas a 37°C. Do resíduo deste tratamento fez-se a extração pelo ácido acético 1%.

4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS G.P.Es.

4.1. Solubilidade

Os extratos de uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1%, provenientes tanto do material liofilizado como do não liofilizado

zado (em suspensão aquosa) foram submetidos a vários testes qualitativos de solubilidade.

Foram utilizados para tal propósito os sistemas tampões Tris-HCl 0,01M pH 9,5; Fosfato 0,02M pH 7,2; Acetato 0,02M pH 4,7; e ácido acético 1% pH 2,7. A 20ml de cada um destes tampões foram adicionados 10mg do material liofilizado ou 0,1 ml do material em suspensão aquosa, mantidos durante 6 horas com agitações constantes, e por mais 2 horas a 37°C. Ao final deste período foram centrifugados a 3.000g durante 30 minutos e observados os resíduos não solubilizados.

Outros testes foram realizados utilizando-se os tampões Tris-HCl 0,02M pH 9,5 e fosfato 0,02M pH 7,2 contendo uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1%, com e sem 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS). Utilizaram-se também outros agentes caotrópicos tais como, solução de hidróxido de sódio 0,2M; solução de uréia 8M com 0,1% de SDS e solução de cloreto de guanidina 10 - 15M, estes sem qualquer ajuste de pH ou tamponamento.

4.2. Eletroforeses (em disco) em gel de poliacrilamida / SDS

As eletroforeses levadas a efeito neste trabalho foram idealizadas com base em duas técnicas diferentes de preparo do gel.

4.2.1. Técnica de SEGRETT & JACKSON (1972) modificado.

Reagentes e tampões

Solução "A" de Acrilamida. "N" gramas de acrilamida (Bio-Rad), onde "N" é a percentagem do gel desejado, e "N/25" g de metileno bis-acrilamida (Bio-Rad) preparado em tam

pão Tris-HCl 0,1M pH 9,5 contendo uréia 4M (Bio-Rad) e 0,1% de 2-mercaptoetanol (Bio-Rad) e 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS).

Solução de "TEMED". 5ml de tetrametiletileno - diamino (TEMED) em 100ml de água destilada.

Persulfato de Amônio (P.S.A.). 1,5g de P.S.A. (Bio-Rad) em 100ml de água destilada. Preparar no momento do uso.

Tampão para cuba. Tampão Tris-HCl 0,01M pH 9,5 contendo SDS 0,1%, uréia 1M e 2-mercaptoetanol 0,1%.

Corante traçador. 0,5g de Azul de Bromofenol (Merck), dissolvidos em 100ml de tampão Tris-HCl 0,05M pH 9,5.

. Preparo do gel

Para o preparo de géis com concentração de 7,5, 10,0, e 15,0%, de poli(acrilamida), foram misturados na seguinte sequência; 19ml da solução A de acrilamida na concentração desejada; 1,0ml de P.S.A. e 0,2ml de TEMED.

. Preparo da amostra

As amostras não liofilizadas foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 0,05M pH 9,5 contendo uréia 8M e 2-mercaptoetanol 1%, numa proporção de 1:20 (v/v). Após 30 minutos à temperatura de 37°C, foi adicionado 1% de SDS. Imediatamente antes de ser levada a efeito a eletroforese, foram adicionados 10µl do corante traçador sobre 0,2ml desta solução amostra.

Procedimento

Alíquotas de 10 μ l da amostra foram aplicadas em cada um dos géis, e submetidas a um campo elétrico de 1,5 a 2,0 mA/tubo e 10-12 Volts/cm de gel. A fonte utilizada foi o modelo Permatron F-250.

Fixação e coloração do gel pelo "Comassie Brilliant Blue"

Foi processado conforme a técnica original descrita por SEGREST & JACKSON (1972).

4.2.2. Técnica de WEBER, PRINGLE & OSBORN (1972) modificada

Embora a técnica de preparo do gel tenha sido inicialmente baseada na técnica proposta por WEBER e colaboradores (1972), foram introduzidas algumas modificações para otimização da técnica ao nosso propósito.

. Reagentes e tampões

Solução "A" de acrilamida

22,2g de acrilamida

1,11g de bis-acrilamida

100ml de água destilada

Solução "B" de acrilamida

44,4g de acrilamida

2,22g de bis-acrilamida

100ml de água destilada

Persulfato de amônio (P.S.A.)

1,5 mg/ml em água destilada.

N.N.N'.N'. Tetrametiletileno diamino (TEMED)

Uso sem diluição

Tampão para gel

Tampão Tris-HCl 0,2M pH 9,5 contendo uréia 8M + 0,2% de SDS e 0,2% de 2-mercaptoetanol

Tampão para cuba

Tampão Tris-HCl 0,05M pH 9,5 contendo uréia 4M + 2-mercaptoetanol 0,1% e SDS 0,1%

Tampão para amostra

Tampão Tris-HCl 0,1M pH 9,5 contendo uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1% e SDS 0,1%.

Corante traçador

0,5g% de Azul de Bromofenol (p.a. Merck) em tampão Tris-HCl 0,1M pH 9,5.

. Preparo da amostra

Segundo os mesmos procedimentos descritos para a técnica anterior (vide 4.2.1)

. Preparo do gel

Para o preparo de diferentes concentrações dos géis (7,5%; 10,0%; 12,5%; 15,0%) seguiram-se as proporções estabelecidas na tabela abaixo.

Tabela de proporções estabelecidas para obtenção de géis de poliacrilamida em várias concentrações

Soluções	Concentração final do gel de acrilamida (%)				
	20	15	10	7,5	5,0
Acrilamida "A"	-	-	6,75	5,05	3,40
Acrilamida "B"	6,75	5,05	-	-	-
Água destilada	-	1,70	-	1,70	3,35
Tampão para gel	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50
P.S.A.	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
TEMED	20ul	20ul	20ul	20ul	20ul

Esta tabela semelhante àquela elaborada por WEBER, PRINGLE & OSBORN (1972), apresenta como diferença fundamental a proporção existente entre Acrilamida / bis-acrilamida, e nos sistemas tampões utilizados. Os valores estabelecidos em cada coluna são as quantidades de cada solução em "ml" e suficientes para o preparo de 6 géis de 10 x 0,6cm.

. Procedimento

Condições iguais àquelas utilizadas pela técnica descrita anteriormente em 4.2.1.

Fixação e coloração pelo "Comassie Brilliant Blue"

Conforme a técnica proposta por SEGREST & JACKSON (1972).

. Amostras analisadas

Foram analisadas eletroforeticamente as seguintes amostras: G.P.Es. - UM de tendão e matriz óssea de bovinos, colágenos de tendão da cauda de rato e de tendões calcaneanos de bovinos.

4.2.3. Outras técnicas de observação da migração eletroforética

Reação de P.A.S. (Periodic Acid Schiff) para gel de Acrilamida.

Usou-se do método proposto por GLOSSMAN & NEVILLE (1971)

Coloração pelo "amarelo naftol-S" (DEITCH, 1955)

Os géis foram fixados e submetidos a coloração pelo "amarelo naftol - S" 0,1% em solução de ácido acético 1%. O tempo de coloração variou de 4 a 6 horas (a temp. ambiente). Os géis foram posteriormente descorados em solução de ácido acético 1% durante 48-72 horas.

4.3. Fracionamento das G.P.Es.

As G.P.Es. solubilizadas em tampão Tris - HCl - 0,02M pH 9,5 contendo uréia 8M e 2-mercaptoetanol 0,1%.

Coluna cromatográfica (60 x 2,0cm) empacotada com resina de gel filtração Bio-Gel P-100 (Bio Rad) previamente equilibrada em pH 9,5 com tampão Tris-HCl 0,02M foi empregado para tentativa de fracionamento das G.P.Es. solubilizadas em tampão Tris-HCl 0,02M pH 9,5 contendo uréia 8M e 2-mercap -

toetanol 0,1%. Para equilibrar a concentração de uréia e 2-mercaptoetanol antes da aplicação da amostra, foi eluído um volume de 100 ml de tampão Tris - HCl 0,02M contendo uréia 8M e 2-mercaptoetanol 0,1%. O fluxo inicial da eluição estabelecido para 1 ml / minuto, teve o seu fluxo reduzido a zero após eluição de 30ml deste sistema tampão, impossibilitando mesmo a aplicação da amostra:

4.4. Teste da interação G.P.Es. - colágeno

G.P.Es. - UM de tendões bovinos solubilizados em uréia 8M e 2-mercaptoetanol 0,1% e colágeno I de tendão de rato purificado e solubilizado em ácido acético 2% foram colocados em iguais proporções dentro de um saco de diálise (2,5 x 15cm).

A diálise foi levada a efeito primeiramente em água corrente (4 horas a temperatura ambiente) e posteriormente em água deionizada (Temperatura de 0 - 4°C durante 24 horas).

Ao final deste período, o material precipitado foi coletado cuidadosamente e decantado o maior volume possível da água. Este material em suspensão aquosa foi mantido nesta forma até o momento do seu processamento para estudos morfológicos.

5. CAPACIDADE DE INTERAÇÃO COM CORANTES

5.1. "Naphthol Yellow - S" (Amarelo Naftol -S)

Curva espectral do corante "Naphthol Yellow - S" foi obtida com preparados a 0,004g% em meio aquoso e acético (pH 2,7). As leituras das densidades ópticas (Absorbância)

foram obtidas no intervalo de comprimento de onda de 350 a 500nm, no espectrofotômetro Zeiss mod. PMQ-3. A concentração de 0,004g% de corante foi escolhida em função da sensibilidade do aparelho para leitura em cubeta de vidro com caminho óptico de 10mm.

5.1.1. Interação com as G.P.Es.

Concentrações crescentes de G.P.Es. (tendão de boi) liofilizadas foram colocadas em tubos de ensaio (10x0,8cm) e a estas adicionados 5ml da solução de "Naphthol Yellow -S" (0,004g% em ácido acético 2%) e mantidos em contato durante 15-30 minutos. Após este tempo, foram centrifugados a 5.000g durante 20 minutos (Centrífuga IEC - Universal Model UV), e os sobrenadantes coletados para leituras espectrofotométricas. As absorvâncias (A) de cada um dos sobrenadantes foram obtidas em $\lambda = 430\text{nm}$ no espectrofotômetro Zeiss PMQ-3 com cubetas de vidro de 10mm.

A concentração do corante captado (CCC) foi calculada pela diferença entre as concentrações do corante do sobrenadante (CCS) e a concentração referência do corante (CRC). CRC foi estabelecida em 0,0002g (5ml da solução corante a 0,004g%).

CCS foi calculado pela fórmula $A_R / A_S \times CRC$, onde:

A_R = Absorvância da concentração referência do corante

A_S = Absorvância dos sobrenadantes.

5.1.2. Interação com o colágeno

Colágeno de tendão da cauda de rato e tendão cal

caneano de boi liofilizados foram fragmentados mecanicamente e submetidos a iguais condições de teste usadas para as G.P.És. liofilizadas.

A única modificação necessária foi com relação à separação dos sobrenadantes, que se fez por meio de ultra-centrifugação (SPINCO Mod. L-75 B) a 30.000g durante 60 minutos. Os cálculos para se obter a concentração do corante captado (CCC) foram iguais àsquelas utilizadas para as G.P.Es. (Tabela 2, 3 e Figura 6).

5.1.3. Relação entre G.P.Es. e colágenos quanto a capacidade de interação com corantes (N.Y.-S)

A relação existente entre as G.P.Es. e colágeno I foi obtida formulando-se as razões entre cada uma das concentrações de corantes captados correspondentes às G.P.Es. e colágeno I. Os quocientes desta relação podem ser analisados na tabela 4.

6. ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL

6.1. Extrato insolúvel em Ácido Tricloroacético 3% aquecido

6.1.1. Microscopia de Polarização

Fragmentos do extrato insolúvel em T.C.A. 3%, foram cuidadosamente dissociados e montados em lâminas histológicas. O material uma vez aderido foi sucessivamente embebido em meios de índice de refração (n_D) diferentes para se obter a curva de birrefringência de forma.

Os meios de embebição escolhidos para tal finalidade foram água destilada ($n_D - 1,3328$). Glicerina 20% ($n_D - 1,3634$). Glicerina 40% ($n_D - 1,3867$), Glicerina 60% ($n_D - 1,4159$) Glicerina 100% ($n_D - 1,4655$) e Nujol ($n_D - 1,4786$). As medidas dos retardos ópticos (Γ) em cada um dos meios foram obtidas sempre de um mesmo segmento do material. As medidas foram realizadas com auxílio do compensador de Sénarmont $\lambda/4$ (Zeiss) e em luz monocromática ($\lambda = 546,1\text{nm}$) no microscópio Pol-Interfer. (Zeiss).

Outros fragmentos do extrato insolúvel em T.C.A. 3% foram fixados em glutaraldeído 3% (aquoso) e preparados adequadamente conforme a técnica rotineira para inclusão em parafina. Os cortes de $7\mu\text{m}$ deste material foram submetidos a coloração pelo "Sirius Red F₃B" (Gurr Ltda) 0,1% a pH 2,7; (VIDAL et al, 1982); Azul de toluidina 0,05% a pH 4,0 e 6,0; e à reação de P.A.S. (Periodic Acid Schiff). Cortes simplesmente desparafinizados foram embebidos em água destilada e observadas as suas propriedades anisotrópicas e do mesmo modo, cortes embebidos em solução de uréia 8M.

6.1.2. Microscopia Eletrônica

O material residual da extração pelo T.C.A. 3% aquecido após ser lavado em água destilada, foi submetido aos seguintes tratamentos para observação em microscopia eletrônica.

Tratamento pelo Ácido Fosfotúngstico (PTA)

- . Fixação em glutaraldeído (Merck) 3% aquoso durante 2 e 3 horas à temperatura ambiente.

- . Lavagem em água destilada
 - . Pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% aquoso. 1 hora à temperatura ambiente.
 - . Desidratação em concentrações crescentes de etanol (50, 70, 80, 95, 100%) contendo ácido fosfotúngstico (PTA) 2%. 30 minutos para cada troca. Faz-se repetição na passagem em etanol 100% mas esta sem PTA.
 - . Etanol-acetona (1:1) durante 30 minutos. Em seguida duas passagens em acetona pura durante 30 minutos.
- Embebição em acetona: epon (1:1) durante 12 a 16 horas à temperatura ambiente.
- . Inclusão em Epon. Polimerização da resina a 57°C durante 72-96 horas.
 - . Cortes finos obtidos em ultra-micrótomo LKB e montagem em telas de 200 "mesh" previamente recobertas com película de parlódio e carbono.
 - . Observações realizadas em microscópio eletrônico EM-9 S-2 (Zeiss).

6.2. Extrato de uréia 8M+2-mercaptoetanol 0,1% (G.P.Es. -UM)

Os auto-agregados obtidos pela diálise do extrato de uréia 2-mercaptoetanol foram analisados pelos seguintes meios.

6.2.1. Microscopia de polarização

- . Montagem total a fresco do material entre lâmina e lamínula

. Observação destas montagens em microscopia de polarização para análise das suas propriedades anisotrópicas ópticas.

- . Técnicas citoquímicas pelo "Sirius Red F₃B", Azul de Toluidina pH 4,0, 6,0 e pela reação de P.A.S.

Fizeram-se esfregaços do material glicoprotéico sobre lâminas histológicas e estes após secos foram tratados pelo "Sirius Red F₃B" 0,1% em ácido acético 2%, conforme a técnica de VIDAL e colaboradores (1982). Após diferenciação em ácido acético 2% foram desidratados e montados em bálsamo conforme as técnicas rotineiras. Foram feitas também colorações pelo Azul de Toluidina pH 4,0 e pH 6,0 durante 30 minutos. Após este tempo foram rapidamente lavados em água, desidratados ao ar e montados em bálsamo. A reação de P.A.S. foi realizada segundo a técnica descrita por LILLIE (1947).

6.2.2. Microscopia Eletrônica

- . Tratamento pelo ácido fosfotúngstico (PTA)

Foi utilizado o mesmo processo descrito para o extrato insolúvel em T.C.A. 3% (6.1.2).

- . Tratamento rotineiro

Seguiram-se os mesmos procedimentos empregados para o tratamento pelo P.T.A. porém omitindo-se apenas a adição do PTA, e efetuando-se a pós-coloração pelo citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) e acetato de uranila (WATSON, 1958).

- . Coloração negativa com ácido fosfotúngstico aquoso.

Os agregados de G.P.Es.-UM foram suspensos em água destilada e espalhados sobre telas de 200 "mesh" com películas de "parlódio" e carbono. Após a aderência do material, foram fixados em glutaraldeído 3% aquoso (30 minutos), lavados em água destilada e sobre este material foi adicionada uma gota da solução de ácido fosfotúngstico 2% aquoso com auxílio de uma micropipeta. Após o completo evaporação da água foram observados ao microscópio eletrônico.

6.3. Produto de interação G.P.Es. - Colágeno

Os agregados obtidos da interação G.P.Es. - colágeno pela diálise, foram analisados da seguinte maneira:

6.3.1. Microscopia de Polarização

Montagens totais do agregado sobre lâminas foram desidratadas ao ar livre e fixadas pelo formaldeído 4%. O material fixado foi corado com "Sirius Red F₃B (0,1% em ácido acético 1%) e observado ao microscópio de polarização.

6.3.2. Microscopia Eletrônica

O produto da agregação G.P.Es. - colágeno I foi suspenso em água destilada e submetido ao processamento para coloração negativa em PTA aquoso. A técnica utilizada é a mesma descrita em 6.2.2.

RESULTADOS

1. EXTRAÇÃO DAS GLICOPROTEÍNAS ESTRUTURAIS1.1. Extração pela solução de NaCl 0,14M em tampão fosfato 0,02M pH 7,0 - 7,5

O filtrado desta etapa das extrações apresentou-se mais viscoso e menos translúcido com o decorrer do tempo de contato com o material, porém este efeito diminui à cada troca da solução de cloreto de sódio, indicando a extração de parte dos componentes da matriz extra-celular do tendão. Estão incluídas nesta categoria as proteínas séricas, pequenas frações do colágeno solúvel em soluções salinas e parte de glicoproteínas e glicosaminoglicanas ácidas. O resíduo obtido nestas condições, praticamente manteve a sua integridade sem que fossem notadas modificações na sua consistência ou resistência à atuações de forças mecânicas, prevalecendo as peças com o formato original do plano de clivagem.

1.2. Extração pela solução de CaCl₂ 0,1M em tampão Tris-acetato 0,05M pH 8,0 - 8,5

O cloreto de cálcio parece ter uma ação mais efetiva na desestabilização dos feixes de colágeno. Logo nas primeiras 12 horas de extração com esta solução, as regiões mais periféricas das peças tendinosas começaram a se dissociar como se estivessem desfiando. No entanto esta dissociação é limitada mesmo com o prolongamento do tempo de extração.

Com a finalidade de auxiliar esta dissociação, os tendões foram submetidos a contusões mecânicas. Com este procedimento os fragmentos se desfizeram, tornando-se uma massa única altamente auto-aderente e de natureza fibrosa. Esta dissociação mecânica efetuada logo após as primeiras 12 horas de tratamento mostrou-se muito mais eficaz do que quando efetuada logo no início desta etapa de extração pelo CaCl_2 .

Nas tentativas de separações do material residual do extrato solubilizado por meio de filtração, observou-se que o material remanescente de natureza fibrilar possuía além do poder de auto-agregação, um alto grau de adesividade ao contato com superfícies porosas como o papel de filtro e tecidos de algodão (entretela). Esta dificuldade fez merecer uma atenção especial durante a recuperação do resíduo para evitar contaminantes de fibras de celulose.

Durante este processo de extração há uma nítida variação na relação soluto/solvente em termos de volume, ou seja, mantendo-se o volume total de solução, há um aumento considerável no espaço ocupado pelo soluto (fragmentos do tendão em processo de dissociação). Este processo de intumescimento do material tendinoso era observado já nas primeiras 12 horas, e acentuado após a dissociação mecânica.

A realização de testes, embora não específicos para detecção das glicosaminoglicanas ácidas e outras proteínas extraídas durante este processo, por meio da solução aquosa meio saturada de N, N, N, N, trimetilcetil amônio e pela acetona a $0 - 4^\circ\text{C}$, mostraram-se positivos pela formação de precipitados em grande quantidade nos primeiros 500ml da solução extratora, decrescendo gradativamente até atingir o volume de

1000 ml, onde praticamente não se observou qualquer vestígio de precipitado formado.

1.3. Extração pela solução de T.C.A. 3% aquecido

Quando os resíduos centrifugados e/ou filtrados da etapa anterior, após exaustivas lavagens em água destilada refrigerada (4°C), foram tratados com o T.C.A. 3% a quente, observou-se logo nos 10 minutos iniciais uma acentuada retração do seu volume, com a solução do T.C.A. tomando uma coloração branco-amarelada.

Após 30 minutos de banho-maria fervente, dos fragmentos de tendão transformados em massa fibrilar pela etapa anterior, restaram somente alguns resíduos de tamanho superior a 3 - 5 mm de comprimento no seu eixo maior. A maioria restante praticamente se desfez em resíduos finamente filamentosos.

Este resíduo é facilmente separado pela centrifugação, e notou-se que após a centrifugação do 3º extrato desta etapa o sobrenadante era totalmente límpido e não apresentando qualquer vestígio de gorduras na superfície do sobrenadante, os quais eram observados na 1a. extração e algum vestígio ainda na 2a. extração. O resíduo da 3a. extração, após sucessivas lavagens em água destilada, continuou apresentando uma coloração branco-leitosa, de consistência cremosa, facilmente desagregado em um material de aspecto filamentosos quando submetido à agitação mecânica.

1.4. Extração pela solução de Uréia 8M + 2 - mercaptoetanol a 0,1%

A ação de uréia 8M + 2 - mercaptoetanol (0,1%) sobre o resíduo do tratamento anterior, mostrou-se bastante eficiente e enérgico. Já nas primeiras horas em contato, o material é quase que totalmente solubilizado. Após 12 - 24 horas a 4°C, observou-se um acastanhamento da solução e pouquíssimo material residual. Submetido a centrifugação, o resíduo apresentou-se numa massa amorfa como que formando uma película única de consistência gelatinosa e de cor acastanhada. O sobrenadante por outro lado, que deve conter o seu teor maior em glicoproteínas estruturais, tornou-se mais denso, opalescente e de cor também acastanhada.

Uma segunda extração do material residual em iguais condições, não pareceu ser muito produtiva, uma vez que a parte residual mantém o mesmo aspecto inicial, e o sobrenadante não apresenta também as características observadas durante a 1ª extração, assim como a recuperação de material proteico deste 2º extrato é tão reduzido que pode-se considerar como esgotado logo na primeira extração.

1.5. Purificação do extrato solúvel em Uréia 8M + 2 - mercaptoetanol 0,1%

O extrato solúvel de uréia + 2 - mercaptoetanol após exaustivas diálises em água corrente (48 - 72 hs) perde a tonalidade acastanhada, apresentando-se gradativamente com um aspecto leitoso, porém sem formação de precipitados visíveis.

A passagem em diálise com água destilada a 0 - 4°C parece iniciar o processo de precipitação, mas pode ser acelerada com a passagem da diálise em tampão acetato 0,01M pH 4,7 - 4,8. O precipitado formado nesta última passagem é um material floculoso, uniforme, de tonalidade branco-leitosa que sedimenta facilmente em soluções aquosas.

O precipitado não apresentou agregados muito grandes, e os poucos de um tamanho maior eram facilmente desagregados com ligeira agitação do meio onde se encontravam.

No entanto, apesar dessa desagregação das partículas maiores, os flocos menores mostraram-se bastante estáveis, não se solubilizando ou se desfazendo em soluções aquosas, mesmo quando mantidos nesta por longos períodos para diálise ou mesmo para o seu acondicionamento.

A ressolubilização deste precipitado em soluções de uréia + 2 - mercaptoetanol com a finalidade de purificação das glicoproteínas, eliminando contaminantes colagênicos ou de elastina, mostrou um pequeno resíduo não solúvel que uma vez retirado do meio pela centrifugação e filtração, não voltava a aparecer em uma segunda ressolubilização em iguais condições.

É interessante notar que, numa experiência em que foram utilizados os resíduos obtidos após um único tratamento com T.C.A. 3% a 95°C e a seguir submetidos à extração pela solução de 8M uréia com 0,1% de 2-mercaptoetanol; já na diálise deste extrato em água corrente observou-se a formação de precipitados, indicando uma tendência de auto-agregação muito maior na presença de contaminantes não extraídos totalmente pelo T.C.A.

2. EXTRAÇÃO DAS G.P.Es. DA MATRIZ DESMINERALIZADA DO OSSO

Os fragmentos ósseos da tíbia do boi, após o processo de desmineralização em HCl 5%, foram submetidos a tratamentos semelhantes àqueles realizados para os tendões, com a diferença de terem sido omitidas as etapas das extrações pelas soluções salinas e de CaCl₂ tamponadas.

Embora as peças ósseas fossem de um tamanho consideravelmente maior do que os fragmentos dos tendões clivados, o tratamento pelo TCA 3% a quente forneceu um resíduo muito semelhante ao dos tendões. O mesmo aconteceu com o extrato obtido com a solução de uréia + 2 - mercaptoetanol, que quando dialisados em água corrente seguido de diálise em tampão acetato pH 4,7 - 4,8, formou um precipitado branco, floculado e auto - agregado muito estável.

3. ISOLAMENTO DO COLÁGENO I DE TENDÃO

3.1. Tendão da cauda de rato

Com a extração do colágeno I solúvel em ácido acético 1 - 2% e precipitado por "salting-out", quando purificado com tratamentos sucessivos destas duas soluções e prolongadas diálises em água, temos um creme de colágeno branco-hialino. Este creme montado em lâmina e tratado com azul de toluidina pH 4,0, mostra pouca afinidade por este corante no pH empregado e mostra pouquíssima ou ausência total de material celular residual.

Este produto após liofilização toma um aspecto esponjoso muito leve, branco e homogêneo.

A liofilização parece promover algumas modificações nas propriedades físico-químicas do colágeno, uma vez que a sua solubilidade em solução de ácido acético 2% ou mesmo em solução de uréia a 8M com 0,1% de 2 - mercaptoetanol, torna-se mais dificultosa, sendo necessárias várias horas com agitação mecânica contínua para a dissolução completa.

3.2. Tendão calcâneo bovino

A ação enzimática da pepsina propicia a solubilização de grande parte do colágeno pertencente à matriz antes insolúvel dos feixes do colágeno em soluções de ácido acético (1 - 2%) pH 2,7.

Este colágeno precipitado por "salting-out" com solução de NaCl 10%, purificado várias vezes demonstra ser mais denso e mais consistente em soluções acéticas. Porém, uma vez liofilizados, ambos os colágenos mostram as mesmas propriedades: um material esponjoso, branco, leve e uniforme, com sua solubilidade diminuída em ácido acético a 1 - 2% em relação ao colágeno não liofilizado.

4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS G.P.Es.

4.1. Solubilidade

As glicoproteínas estruturais extraídas e purificadas conforme a técnica descrita, apresentaram peculiaridades

na sua solubilidade. Uma vez isoladas em uréia 8M com 2-mercaptoetanol 0,1%, mostraram-se plenamente solúveis somente nesta solução e parcial ou totalmente insolúveis nos sistemas tampões usuais com o pH variando entre 2,5 a 10,5.

Pelos testes de solubilização realizados em diferentes sistemas tampões, contendo uréia 8M e 2-mercaptoetanol 0,1%, verificou-se a sua menor solubilidade no pH ao redor de 4,5 - 5,0; a solubilização em tampão fosfato 0,02M pH 5,8 - 7,5 mostrou ser apenas parcial e somente no tampão Tris-HCl 0,02M pH 9,0 - 9,5 a solubilização pareceu ser plena.

Na ausência do agente redutor de pontes dissulfeto (2-mercaptoetanol), o extrato de G.P.Es. deixa um resíduo insolúvel que desaparece somente após a adição do redutor. Do mesmo modo, as G.P.Es. solubilizadas em uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1% quando mantidas à temperatura ambiente durante 16 horas, principiavam a sua precipitação. Este precipitado formado não pode ser ressolubilizado por uma simples agitação mecânica, mas apenas pela reposição de 2-mercaptoetanol ao meio.

As tentativas de solubilização deste extrato em outros agentes caotrópicos tais como solução de hidróxido de sódio 0,2M, dodecil sulfato de sódio em uréia ou mesmo em cloreto de guanidina 10 - 15M, demonstraram ser sempre parciais.

Por outro lado, o extrato de G.P.Es. uma vez liofilizado, aumenta o seu grau de insolubilidade mesmo na solução de uréia + 2-mercaptoetanol, sendo necessária a adição de 0,1% de SDS.

4.2. Eletroforeses em géis de poliacrilamida-SDS

As eletroforeses em géis de poliacrilamida - SDS em diferentes concentrações (7,5 a 15,0%), conforme a técnica de SEGREST & JACKSON (1972) para separação de glicoproteínas, mostraram-se ineficientes no caso das G.P.Es., obtendo-se para as mesmas padrões de bandas irregulares e muito difusas, dificultando a interpretação.

As poucas frações observadas em géis de 7,5% (Fig. 1), apresentaram-se dispostas numa única região próxima à porção terminal do gel.

Com o aumento da concentração dos géis para 10 e 15%, observou-se separação de algumas frações, porém com as bandas de aspecto ainda muito difuso (Fig. 1).

As tentativas pela técnica modificada de WEBER e colaboradores (1972), para o preparo dos géis, proporcionaram melhoras significativas nos padrões de separações das bandas.

Os géis preparados na concentração de 7,5% permitiram a migração das frações para a região terminal do gel, apresentando-se como se fossem uma única banda (Fig. 2). O aumento da concentração do gel para 10,0%, promoveu a separação de algumas bandas, sendo apenas uma delas bastante nítida ocupando a região intermediária do gel, e as demais bandas extensas e difusas (Fig. 02).

Os melhores padrões de comportamento eletroforético foram observados com géis de poliacrilamida preparados na concentração de 15,0%. Nesta concentração, obteve-se a separação de cerca de sete frações quando visualizadas após coloração pelo "coomassie brilliant blue" (Fig. 2). Analisando-se os

géis a partir do ponto de aplicação das amostras, observaram - se os seguintes padrões de disposição das bandas; duas bandas F_1 e F_2 pouco coradas, extensas e difusas ocupando as posições na altura de $7/8$ e $6/8$ respectivamente dos géis; quatro bandas F_3 , F_4 , F_5 e F_6 , ocupando a região mediana dos géis, tendo sido as bandas F_3 e F_4 caracterizadas como as constituintes de maior proporção entre as frações separadas; a última banda F_7 , se sobressaiu como sendo a fração de menor peso molecular (pela sua maior mobilidade eletroforética).

Os géis submetidos a técnicas de P.A.S. não forneceram os mesmos padrões de visualização das bandas. Mostraram-se P.A.S. positivas somente as frações F_1 , F_2 , F_3 , F_4 e F_7 , as demais frações (F_5 e F_6) não sendo detectadas por esta reação (Fig. 03).

A coloração dos géis pelo "Naphthol Yellow - S" em ácido acético 1%, apresentou um padrão semelhante ao observado nos géis corados pelo "coomassie brilliant blue". Uma disposição esquemática da migração eletroforética é mostrada junto à Fig. 03.

4.2.1. Padrão comparativo entre G.P.Es. de tendão e de osso

Comparando-se o padrão de migração e as disposições das bandas em géis de poliacrilamida / SDS de 15,0% entre as amostras de G.P.Es. de osso e tendão, observou-se um comportamento idêntico de separação e fracionamento (Fig. 02). Mesmo quando submetidas à técnica de coloração de géis pelo P.A.S., ou pelo "Naphthol Yellow-S" foram constatados os mesmos resultados. No entanto parece haver uma ligeira diferença quanto ao teor de cada fração, tendo-se observado um aumento significati

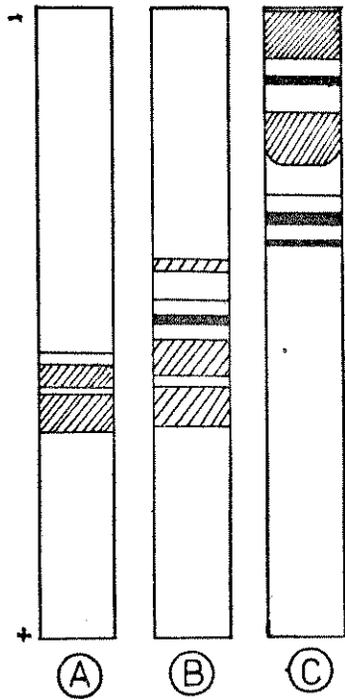


Figura 01. Disposição esquemática do padrão eletroforético das GPEs. de tendão bovino em géis de poliacrilamida/SDS, preparados segundo a técnica de SEGREST & JACKSON (1972) modificado. (A) (B) e (C) mostram respectivamente o comportamento das GPEs. em concentrações de 7,5, 10,0 e 15% do gel. As áreas achuleadas indicam bandas mais difusas, a intensidade desta guarda relação direta com a intensidade de coloração.

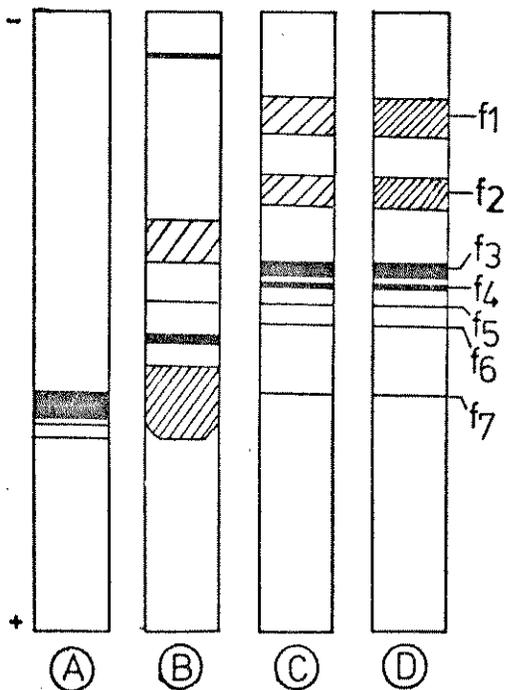


Figura 02. Disposição esquemática do comportamento eletroforético das GPEs. em géis de poliacrilamida/SDS preparados pelo método de WEBER & Colaboradores (1972). (A), (B) e (C), padrões de fracionamento das GPEs. de tendões bovinos em géis com concentrações de 7,5, 10,0 e 15,0% respectivamente. (D) - GPEs. de osso bovino em géis com concentração de 15,0%.

vo nas frações F₁ e F₂, procedentes de ossos que mostram - se mais intensamente coradas do que as do material proveniente dos tendões.

4.2.2. Padrão de comportamento dos colágenos I de rato e de boi

Os colágenos extraídos de tendões de ratos e de bois, ambos mostram em géis de 7,5%, a migração de uma fração de baixo peso molecular (Fig. 04). Esta mesma fração apresenta uma reação positiva para o P.A.S.. A maior parte das proteínas (colágeno) teve uma migração muito reduzida, permanecendo junto ao ponto de aplicação da amostra.

4.3. Fracionamento das glicoproteínas estruturais

A solubilidade restringida a uréia 8M e 2-mercaptoetanol 0,1%, restringe também os meios e as condições para os estudos bioquímicos e das propriedades físico-químicas das G.P.Es..

A tentativa de fracionamento do extrato total de G.P.Es. através de colunas cromatográficas com resina de gel-filtração (Bio gel P-100), tornou-se inviável uma vez que a alta concentração exigida de uréia e a presença de um potente agente redutor, como é o caso do 2-mercaptoetanol, fez esta resina de poliacrilamida perder as suas propriedades tornando-se uma massa altamente compacta no interior da coluna, dificultando mesmo a eluição do sistema tampão de equilíbrio da resina.

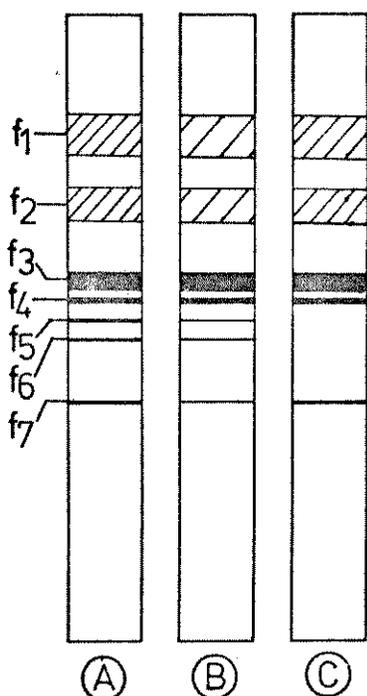


Figura 03. Fracionamento eletroforético das GPEs. de tendão bovino em géis de poliacrilamida / SDS a 15%. (A) disposição esquemática das frações em géis corados pelo "Comassie Brilliant Blue"; (B) gel corado pelo "Naphthol Yellow S"; e (C) gel submetido à reação de P.A.S. (periodic acid Schiff).

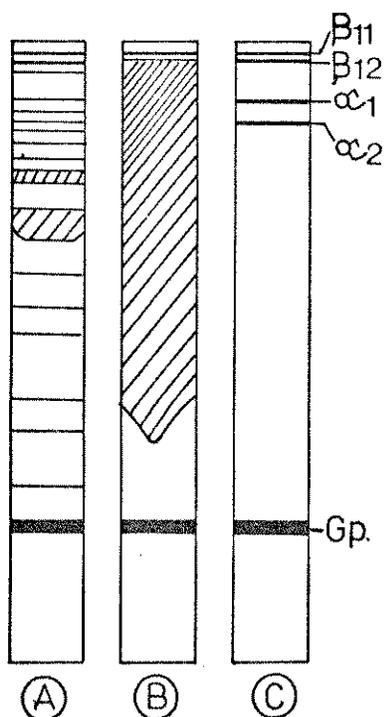


Figura 04. Disposição esquemática do fracionamento de colágeno de tendão bovino extraído pela colagenase III (A); colágeno de tendão bovino extraído em T.C.A. 3% (B); e colágeno de tendão de rato extraído em ácido acético 1,0% (C). Em (A), (B) e (C) a fração Gp. é P.A.S. positiva.

4.4. Interação G.P.Es. - colágeno

As G.P.Es. e o colágeno individualmente solubilizados em uréia 8M com 2-mercaptoetanol 0,1%, quando reunidos e submetidos a diálise em água, apresentaram alto grau de afinidade entre si. Isto é, observou-se primeiramente que o intervalo de tempo necessário para a precipitação do conteúdo do saco de diálise era reduzido para duas horas, enquanto a diálise contendo apenas as G.P.Es. necessita a média de 48 horas em água, seguida de uma diálise em tampão acetato pH 4,8 durante duas horas para a sua precipitação. O mesmo acontece com o colágeno solubilizado em ácido acético 1% ou mesmo em solução de uréia + 2-mercaptoetanol, que para a sua precipitação por meio de diálise, necessita um período muito maior.

Apesar do produto da reassociação ter mostrado este alto grau de afinidade, os grumos maiores observados não parecem ter uma estabilidade muito grande, uma vez que com apenas uma ligeira agitação do meio, se desfazem em fragmentos menores. No entanto estes fragmentos menores são sempre maiores que aqueles observados em precipitados obtidos unicamente pelas G.P.Es.. Este precipitado foi facilmente separado da solução através da sedimentação espontânea à temperatura de 4°C, sem necessidade de se submeter à centrifugação.

5. CAPACIDADE DE INTERAÇÃO COM CORANTES

5.1. "Naphthol Yellow -S"

A curva espectral obtida como teste controle pa-

ra verificar a qualidade do corante "Naphthol Yellow -S" exibiu os dois picos de absorção dentro do espectro de luz visível, no comprimento de onda de 430nm e em 390nm, o que está de acordo com os dados descritos na literatura (DEITCH, 1955; TAS et al, 1974; GAUB, 1975; TAS, 1976). Os picos de absorção máxima são invariáveis tanto para os preparados em meio acético como em meio aquoso (Fig. 05) embora comparativamente sejam verificados para os primeiros valores absolutos menores de absorbância e hipocromismo para o pico de $\lambda = 430\text{nm}$.

5.1.1. Interação com as G.P.Es.

As glicoproteínas estruturais liofilizadas do tendão bovino mostram uma afinidade muito grande pelo corante "Naphthol Yellow -S". Concentrações crescentes das amostras mostraram uma captação também crescente do corante, porém sem apresentar uma relação linear, uma vez que como mostra a Tabela 01, enquanto a concentração inicial de 1mg de G.P.Es. interage estequiometricamente com 0,048mg do corante, a concentração dez vezes superior de G.P.Es. capta apenas 0,192mg. As curvas obtidas pela interação do corante em função de concentrações crescentes de G.P.Es. (Fig. 06) mostraram claramente a relação não linear, tendendo para uma curva parabólica que culmina na concentração de saturação das G.P.Es. no meio, isto é, na concentração de G.P.Es. capaz de interagir com praticamente todo o corante disponível do meio da reação.

5.1.2. Interação com o colágeno

As interações dos colágenos liofilizados obtidos tanto do tendão da cauda de rato como do tendão de Aquiles

bovino, com o "Naphthol Yellow -S" não mostraram diferenças significativas entre si (Tabelas 02 e 03 respectivamente). Ambos os colágenos em concentrações crescentes, também tiveram a capacidade de captar o corante do meio em quantidades crescentes, sendo que, a forma desta captação é muito semelhante à daquela observada com as G.P.Es..

Para uma concentração de 1mg de colágeno liofilizado houve uma captação de 0,023mg do corante, enquanto que para uma concentração dez vezes superior de colágeno, houve captação apenas de 0,097mg do corante, onde teoricamente poderia ser esperado um valor próximo a 0,2mg.

5.1.3. Padrão comparativo da capacidade de captação

Comparando-se a capacidade de captação do corante "Naphthol Yellow -S" entre G.P.Es.-colágeno I (do tendão de rato), observa-se uma relação mais ou menos constante num valor próximo de dois (Tabela 04), ou seja para uma mesma concentração do material em peso seco, as glicoproteínas estruturais mostraram uma afinidade duas vezes superior aos valores obtidos com o colágeno.

Devido à fácil solubilização do colágeno em meio em que o corante foi preparado (ácido acético 1-2%), o produto de reação tornou-se um gel que pode ser separado somente por meio de ultra-centrifugação. Com as glicoproteínas estruturais não se observaram tais problemas, uma vez que sendo praticamente insolúveis em soluções acéticas, não demonstraram quaisquer diferenças nas leituras da densidade óptica dos sobrenadantes procedentes da centrifugação comum (3.000 x g).

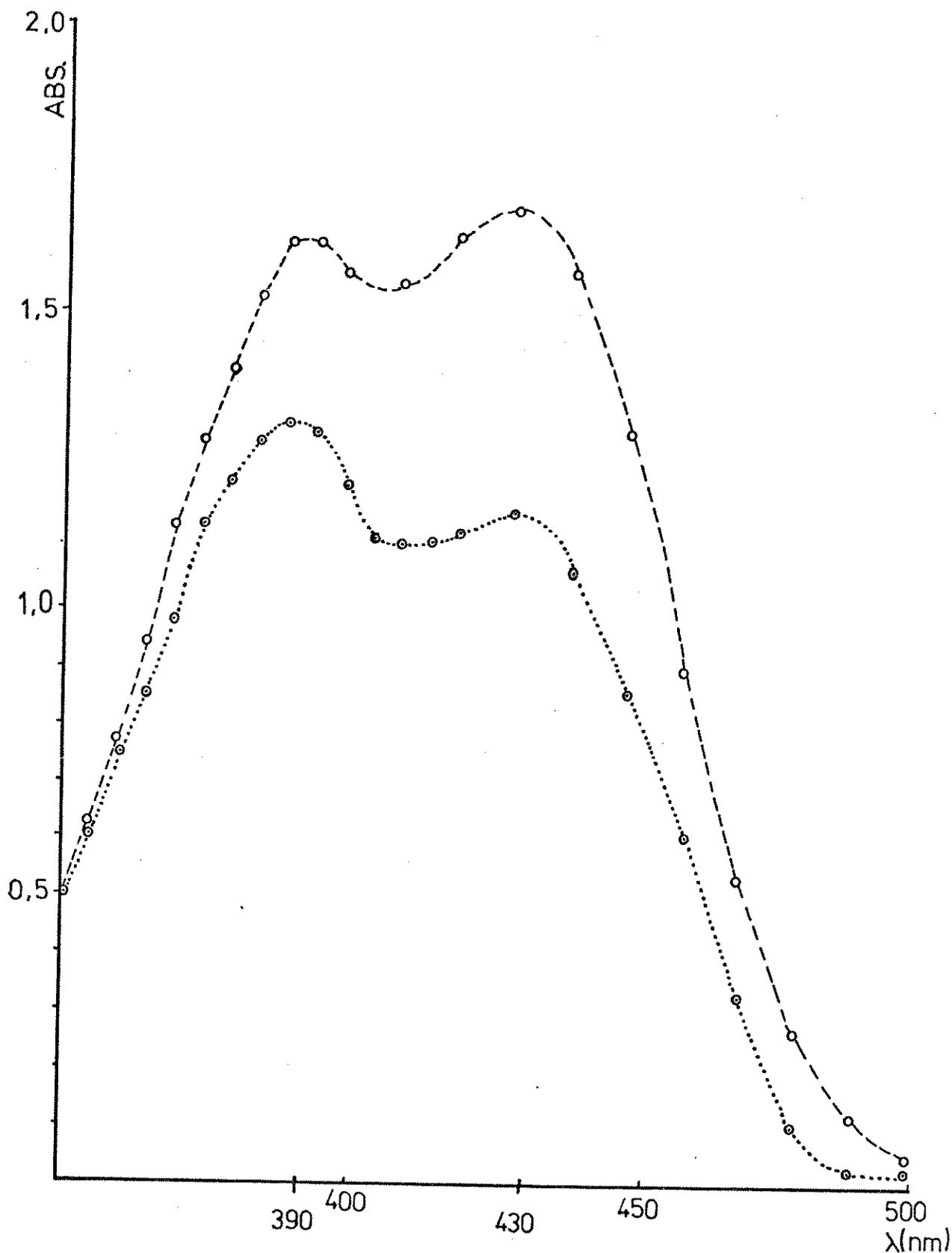


Figura 05 - Curva espectral do corante " NAPHTHOL YELLOW - S" a 0,004g% em meio acético (o.....o) e em meio aquoso (o-----o). As leituras foram realizadas com intervalos de 10 nm entre os (λ) comprimentos de onda de 350 a 500 nm. Para as leituras foram utilizadas cubetas de vidro com caminho óptico de 10 mm. Picos de absorção máxima em "λ" de 390 e 430 nm.

Tabela 01. Capacidade de captação do "Naphthol Yellow-S" pelas G.P.Es.

Amostra	Concent. G.P.Es.	Concent. corante	Absorbância	C.C.S.	C.C.C.
1	0,001 g	0,0002 g	1,205	$1,520 \times 10^{-4}g$	$0,48 \times 10^{-4}g$
2	0,002 g	0,0002 g	0,768	$0,976 \times 10^{-4}g$	$1,02 \times 10^{-4}g$
3.	0,004 g	0,0002 g	0,322	$0,409 \times 10^{-4}g$	$1,59 \times 10^{-4}g$
4	0,010 g	0,0002 g	0,056	$0,071 \times 10^{-4}g$	$1,92 \times 10^{-4}g$
5	0,015 g	0,0002 g	0,023	$0,029 \times 10^{-4}g$	$1,97 \times 10^{-4}g$
Refer.	-	-	1,574	$2,000 \times 10^{-4}g$	-

A concentração das G.P.Es. corresponde ao peso seco do material liofilizado. Leitura espectrofotométrica em $\lambda = 430nm$; C.C.S. - concentração do corante no sobrenadante; C.C.C. - concentração do corante captado (pela G.P.Es.); * Refer. - concentração do corante utilizado como padrão de referência para interação com o substrato.

Tabela 02. Capacidade de captação do "Naphthol Yellow-S" pelo colágeno do tendão da cauda de rato.

Amostra	Concent. colágeno	Concent. corante	Absorbância	C.C.S.	C.C.C.
1	0,001 g	0,0002 g	1,373	$1,75 \times 10^{-4}g$	$0,25 \times 10^{-4}g$
2	0,002 g	0,0002 g	1,180	$1,50 \times 10^{-4}g$	$0,50 \times 10^{-4}g$
3	0,004 g	0,0002 g	0,943	$1,20 \times 10^{-4}g$	$0,86 \times 10^{-4}g$
4	0,010 g	0,0002 g	0,786	$1,00 \times 10^{-4}g$	$1,00 \times 10^{-4}g$
5	0,015 g	0,0002 g	0,750	$0,95 \times 10^{-4}g$	$1,04 \times 10^{-4}g$
Refer.	-	0,0002 g	1,572	$2,00 \times 10^{-4}g$	-

- Condições iguais às usadas para as G.P.Es.. O sobrenadante foi obtido após ultra-centrifugação a 30.000 g durante 60 min. Leitura em $\lambda = 430nm$

Tabela 03. Capacidade de captação do "Naphthol Yellow-S" pelo colágeno I do tendão calcaneano bovino.

Amostra	Concent. colágeno	Concent. corante	Absorbância	C.C.S.	C.C.C.
1	0,001 g	0,002 g	1,391	$1,77 \times 10^{-4}g$	$0,23 \times 10^{-4}g$
2	0,002 g	0,002 g	1,204	$1,53 \times 10^{-4}g$	$0,47 \times 10^{-4}g$
3	0,004 g	0,002 g	0,996	$1,27 \times 10^{-4}g$	$0,73 \times 10^{-4}g$
4	0,010 g	0,002 g	0,807	$1,03 \times 10^{-4}g$	$0,97 \times 10^{-4}g$
5	0,015 g	0,002 g	0,761	$0,97 \times 10^{-4}g$	$1,03 \times 10^{-4}g$
Refer.	-	0,002 g	1,571	$2,00 \times 10^{-4}g$	-

- Condições idênticas às aquelas usadas para Colágeno I de cauda de rato

Tabela 04. Relação entre G.P.Es. e colágeno I da cauda de rato quanto a capacidade de captação do corante "Naphthol Yellow-S"

Conc. GPEs	CCC* GPEs	0,001	0,002	0,004	0,010	0,015	→ Conc. colágeno → CCC* Colágeno
0,001	0,48	1,92	-	-	-	-	
0,002	1,02	-	2,04	-	-	-	
0,004	1,59	-	-	1,84	-	-	
0,008	1,86	-	-	-	-	-	
0,010	1,92	-	-	-	1,92	-	
0,015	1,97	-	-	-	-	1,87	

* = Capacidade de captação de corantes. Os valores da tabela são os quocientes das razões entre CCC de GPEs e CCC de colágeno I.

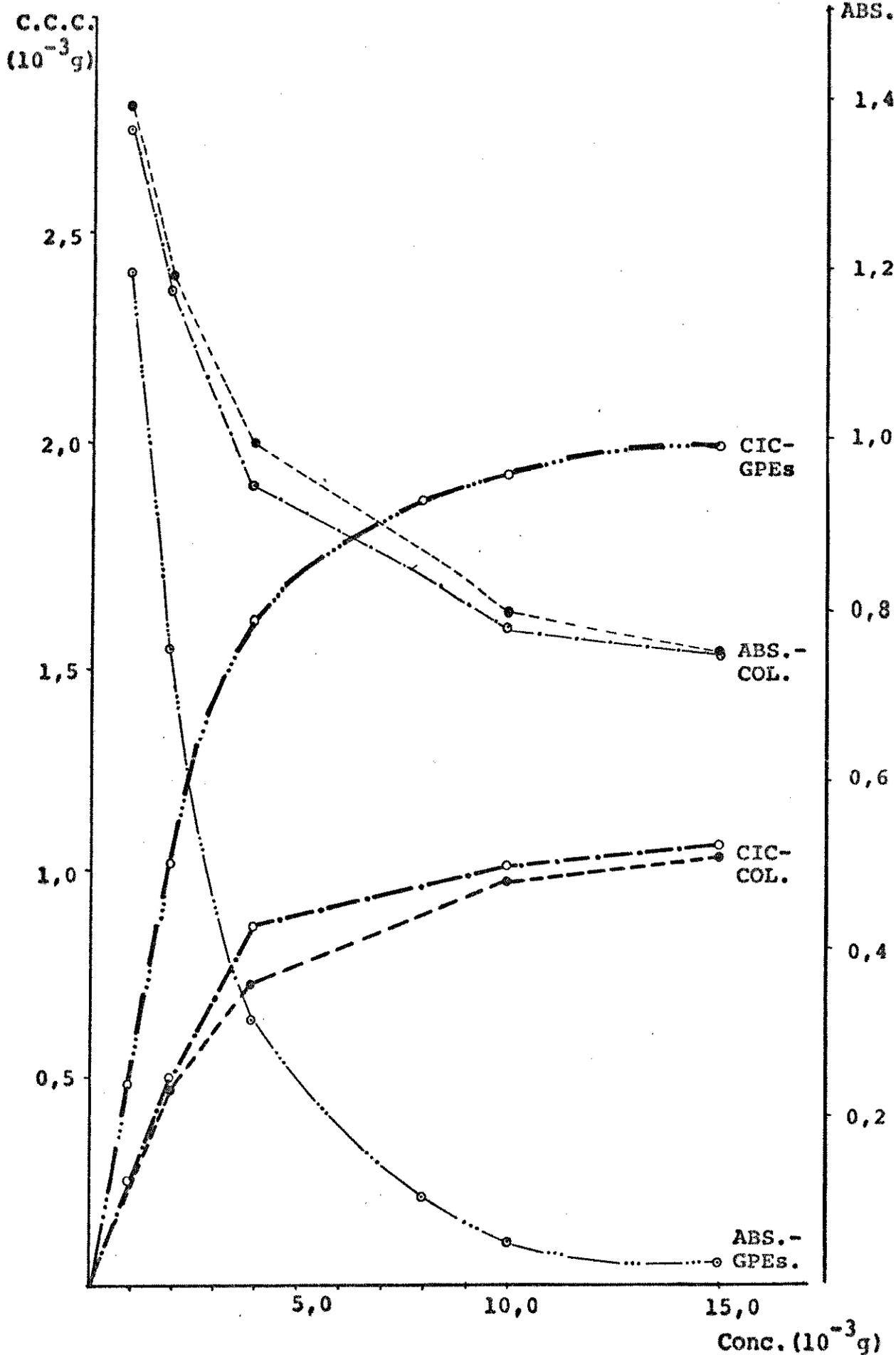


Fig.06 - As curvas descendentes representam a absorvância (ABS) em $\lambda=430\text{nm}$ do corante remanescente após complexação com GPEs (o—...—o) colágeno de rato (o—...—o) e colágeno de boi (e-----e) em concentrações (Conc.) crescentes. As curvas ascendentes representam a Capacidade de Interação com Corante (CIC) das GPEs (o—...—o), colágeno de rato (o—...—o) e boi (e-----e). CCC= Concentração de Corante Captado.

6. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

6.1. Microscopia de Polarização

6.1.1. Extrato insolúvel em T.C.A. 3% aquecido.

A análise morfológica ao microscópio de polarização do extrato insolúvel em T.C.A. 3% montado a fresco entre lâmina e lamínula, ou mesmo dos cortes do material incluído em parafina, mostrou terem estes, o aspecto de um agregado formado por feixes de filamentos dispostos paralelamente ao longo do seu eixo maior (Figs, 08,09 e 10). Estas estruturas apresentam propriedades anisotrópicas ópticas caracterizadas por uma birrefringência (mensurável) cuja cor de interferência é branca de primeira ordem. O sinal de birrefringência determinado com compensador de Sénarmont $\lambda/4$, mostrou ser positivo quando considerada a orientação paralela ao seu eixo maior (Fig. 08). Esta mesma birrefringência desaparece quando o material é embebido em uréia 8M.

As curvas de birrefringência de forma mostram a presença de birrefringência intrínseca (ou cristalina) positiva para o índice de refração (n_D) igual 1,465 (Fig. 07). Embora possam variar os valores absolutos do retardo óptico correspondente à esta birrefringência intrínseca em cada segmento do material analisado, a relação obtida entre os valores absolutos de retardo óptico (Γ) máximo (material embebido em água destilada; $n_D = 1,1333$) e retardo óptico (Γ) mínimo (material embebido em glicerina 100% $n_D = 1,465$) mantêm-se constante e próximo a $2,50 \pm 0,37$ (tabela 05).

Tabela 05. Medidas de retardo óptico em diferentes meios de embebição do extrato insolúvel em T.C.A. 3%.

Meios de embebição	RETARDO ÓPTICO (nm)		
	lâmina 1	lâmina 2	lâmina 3
Água destilada	6,06	4,85	4,242
Glicerina 20%	5,454	3,94	3,636
Glicerina 40%	4,242	3,63	3,030
Glicerina 60%	3,03	2,424	2,424
Glicerina 100%	2,424	1,818	1,818
Nujol	4,242	3,636	2,727
Relação $\Gamma_{\max}/\Gamma_{\min}$	2,5	2,67	2,33

As medidas dos retardos ópticos (Γ) foram obtidas com auxílio do compensador de Sénarmont $\lambda/4$ e em luz monocromática de $\lambda = 546,1\text{nm}$. Os meios de embebição utilizados - H_2O ; Glicerina 20% 40%; 60%; 100% e nujol têm respectivamente os índices de refração (n_D) igual a 1,3328; 1,3634; 1,3867; 1,4159; 1,4655 e 1,4786. A relação $\Gamma_{\max}/\Gamma_{\min}$ corresponde a razão entre os retardos ópticos (Γ) em $n_D = 1,3328$ e $n_D = 1,4655$ de cada segmento.

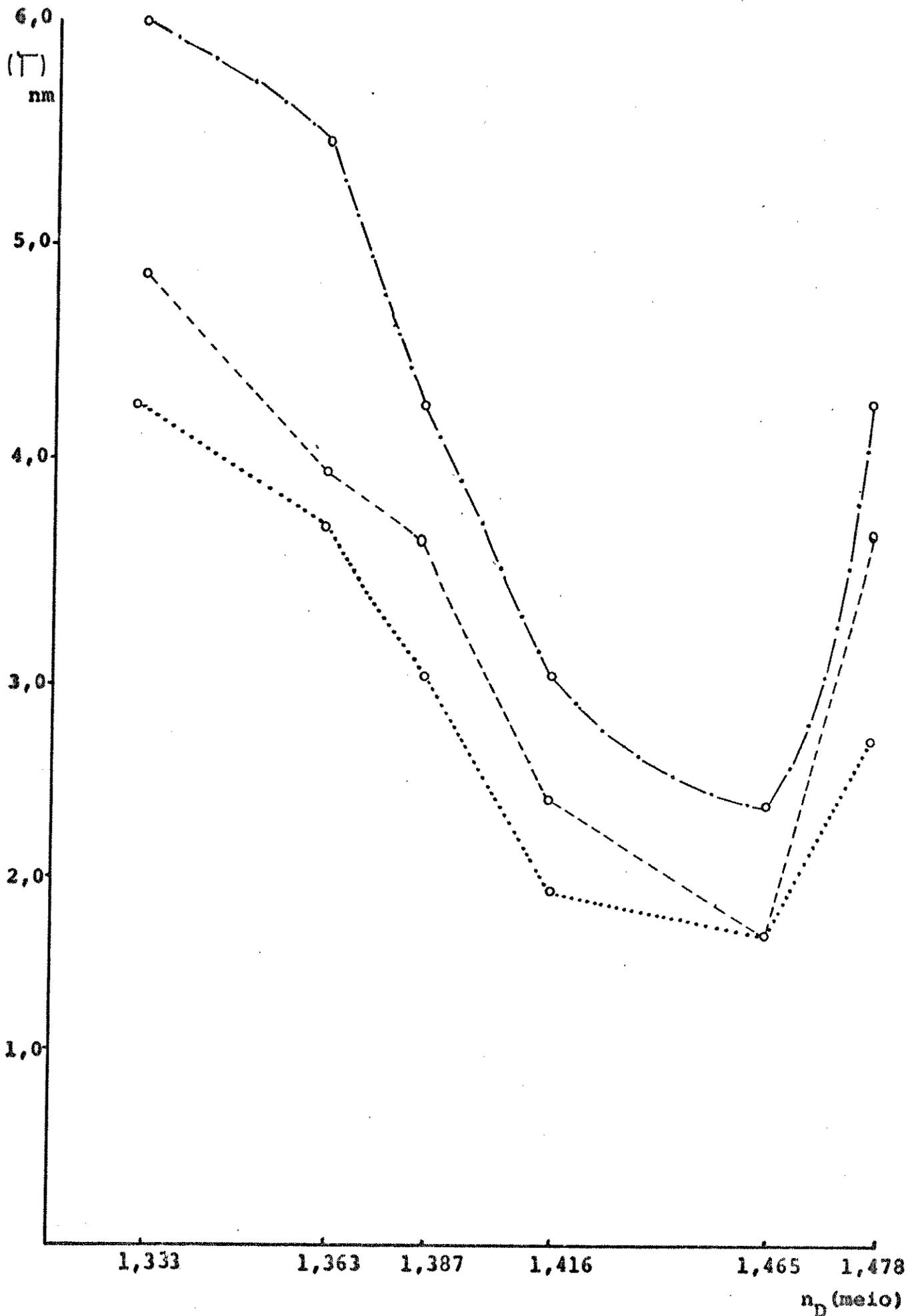


Fig.07 -Curva de Birrefringência de Forma do ext. insol. em TCA 3%. Na abscissa n_D (índice de refração) dos meios de embebição. Na ordenada os valores do retardo óptico (Γ) obtidos com compensador de Sénarmont $\lambda/4$ e em luz monocromática ($\lambda = 546,1$ nm).

6.1.2. Extrato de uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1% (G.P.Es. -UM)

O extrato de uréia+2-mercaptoetanol obtido diretamente da diálise, montado em lâmina, não apresenta qualquer fenômeno de birrefringência. Este material corado com "Sirius Red F₃B" a pH 2,7 também não apresenta o fenômeno de birrefringência, mostrando-se apenas como agregados de materiais fracamente corados em vermelho, porém altamente positivos à reação de P.A.S..

Por outro lado o precipitado residual obtido da interação "Naphthol Yellow-S" -G.P.Es., apresentou uma fraca birrefringência, notadamente nos fragmentos maiores, mas imperceptível nos fragmentos menores. Esta presença de birrefringência deve ser interpretada com cautela, uma vez que o material glicoprotéico empregado neste teste proveio do material submetido à liofilização. Observações em microscopia óptica comum (fotônica) revelam ser este material um produto altamente compacto e estável, não se dissociando ou solubilizando com facilidade.

6.1.3. Produto de interação G.P.Es. - colágeno

O complexo G.P.Es. - colágeno quando montado a fresco entre lâmina e lamínula e observado ao microscópio de polarização apresenta uma birrefringência muito fraca, detectável apenas em regiões de aspecto fibrilar (Fig. 11). Mesmo esta birrefringência pode ser observada utilizando-se um pequeno artifício de técnica, isto é, deslocando-se ligeiramente o analisador em relação aos 90° do "azimuth" do polarizador e

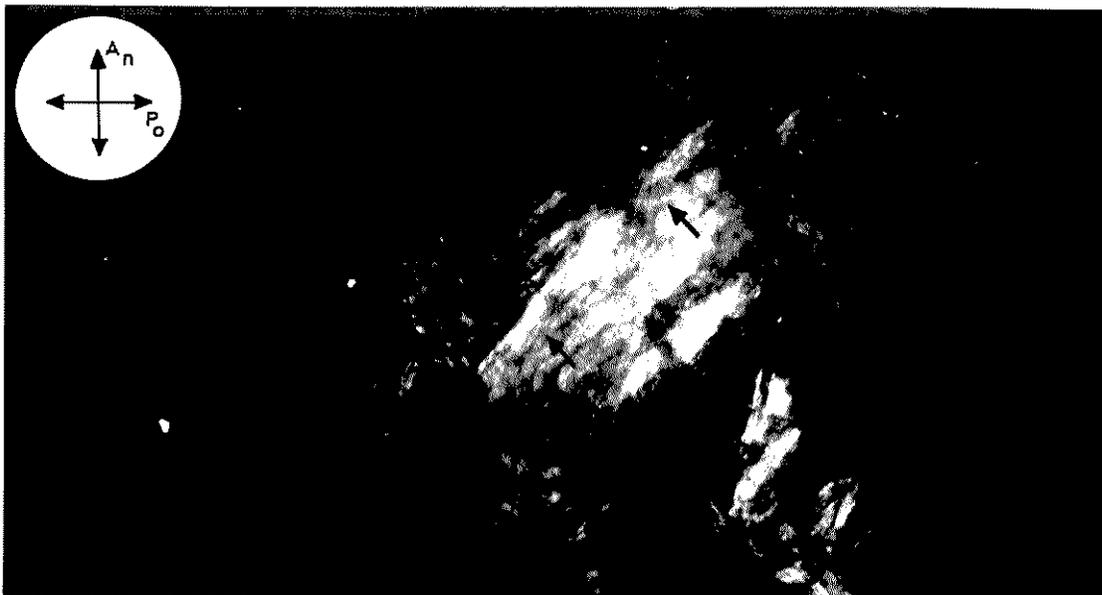


Figura 08. Imagem ao microscópio de polarização do extra_{to} insolúvel em T.C.A. 3% montado a fresco. Intensa birrefringência (branca de primeira ordem) do material quando orientado a $\pm 45^\circ$ do "azimuth" do polarizador. Observar junto às setas o aspecto fibrilar em disposição paralela com relação ao maior eixo do material. (A_n) e (P_o) - "azimuth" de polarização respectivamente do analisador e polarizador.

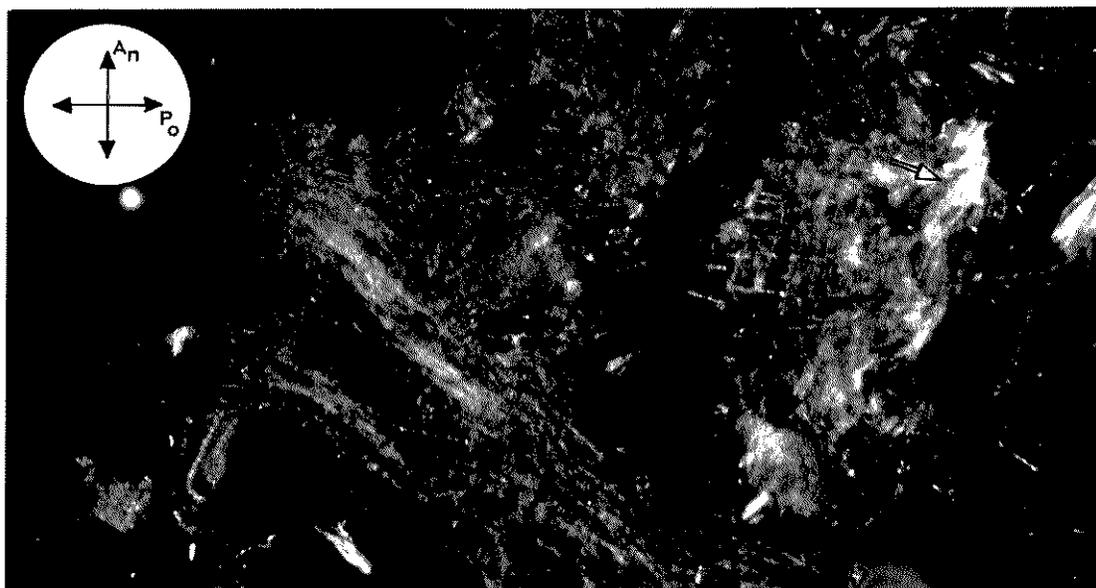


Figura 09. Idem material anterior. As setas cheias indicam as fibrilas paralelas que compõem o conjunto agora mais dissociado. Observar que as regiões onde o estado de agregação das fibrilas é mais compacto (setas vazias), a birrefringência é mais intensa. (A_n) e (P_o) - "azimuth" do analisador e polarizador.

e acoplado o compensador de Sénarmont $\lambda/4$. Nestas condições observamos o material que se torna mais escuro ou mais claro, dependendo de o deslocamento do analisador ser para a posição de adição ou subtração do retardo óptico do material em observação.

A presença de anisotropia óptica neste material complexado, torna-se mais evidente quando corado com "Sirius Red" em solução acética, dando um aspecto de birrefringência muito semelhante ao observado em colágenos isolados. Observa-se porém, uma diferença pela presença de delgadas ramificações também birrefringentes (amarela e verde de 1.ª ordem) dispostas perpendicularmente ao longo dos filamentos maiores (birrefringente de cor vermelha de 1.ª ordem), que em conjunto se dispõem numa malha trabecular intimamente associada (Figs. 12a e 12b).

6.2. Microscopia Eletrônica

6.2.1. Extrato insolúvel em T.C.A. 3% aquecido

O extrato insolúvel em T.C.A. 3%, submetido ao tratamento pelo P.T.A. - etanólico apresentou duas estruturas distintas. Uma primeira que se organiza em longas faixas (eletrodensas) de espessuras variáveis (Fig. 13 e 14), cujas porções mais delgadas confundem-se com as estruturas de natureza fibrilar (Fig. 14). Esta outra, de aspecto fibrilar, organiza-se como que formando "alvéolos" de diâmetros variáveis quando observadas em cortes transversais (Fig. 14). Em cortes longitudinais, estas estruturas apresentam-se formados por pequenas fibrilas alinhadas ao longo de um eixo e paralelas entre si.



Figura 10. Aspecto da birrefringência do extrato insolúvel em T.C.A. 3%. Material obtido em cortes de parafina (10 μ m de espessura) e corados com "Sirius Red F3B". As fibrilas birrefringentes estão orientadas a $\pm 45^\circ$ do "azimuth" do polarizador (P_o) e analisador (A_n).

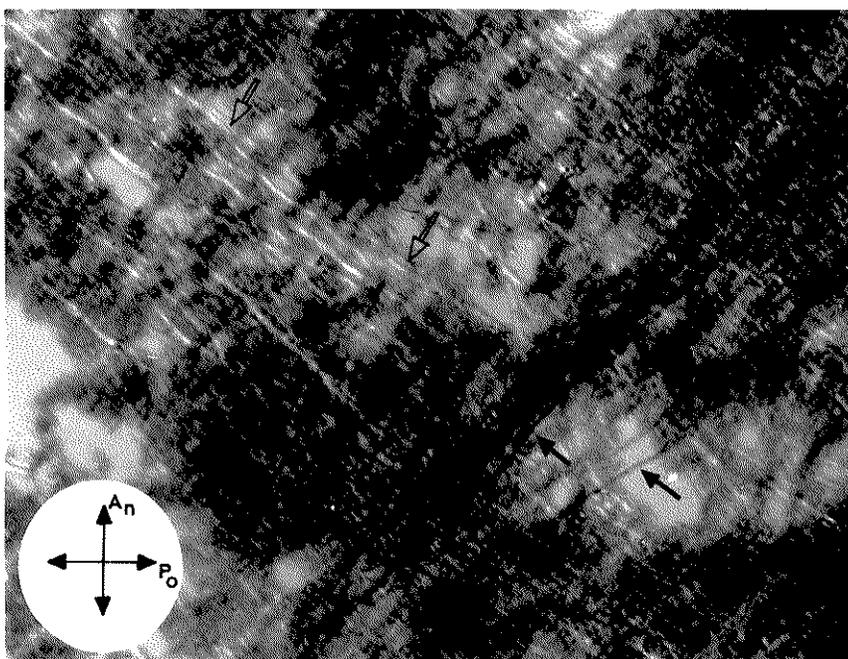


Figura 11. Imagem de birrefringência compensada do produto de interação GPEs - Colágeno I (montagem a fresco). As setas cheias indicam os filamentos compensados (em escuro) e as setas vazias indicam os filamentos em posição de adição. Entremeeando estes filamentos a presença de uma massa opticamente isotrópica. (A_n) e (P_o) - "azimuth" do analisador e polarizador respectivamente.

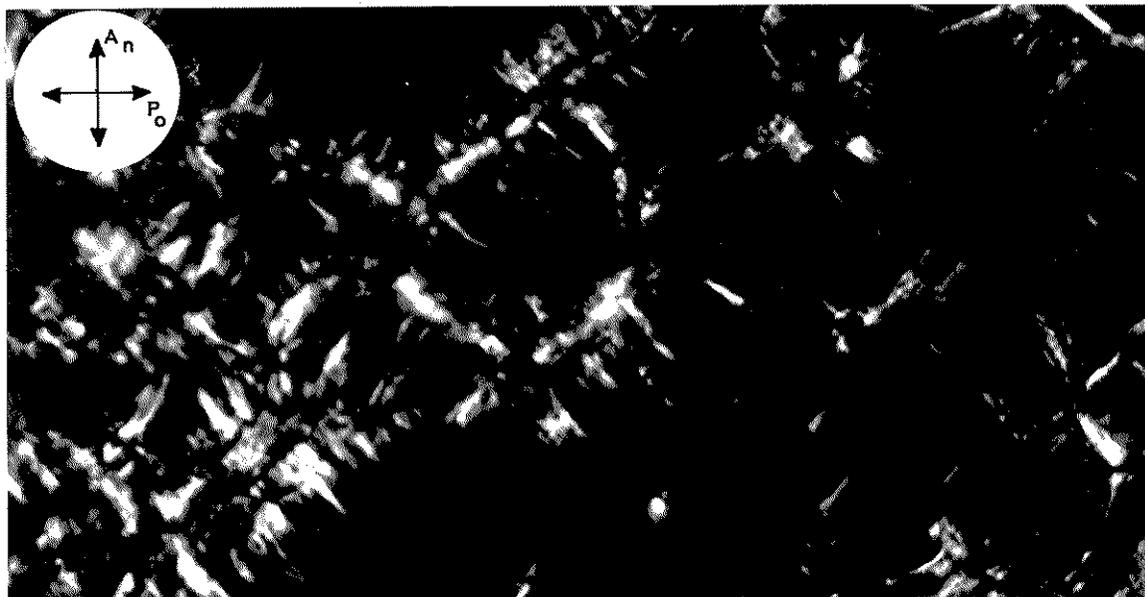


Figura 12a. Aspecto da birrefringência do agregado GPEs - co
lâgeno I corado com "Sirius Red F₃B". Ao longo dos filamen
tos altamente birrefringentes (vermelho de primeira ordem) ,
a presença de filamentos delgados e curtos também birrefrin
gentes (amarelo e verde de primeira ordem), orientados per
pendicularmente aos primeiros. (P_o) e (A_n) - "azimuth" do po
larizador e analisador respectivamente.

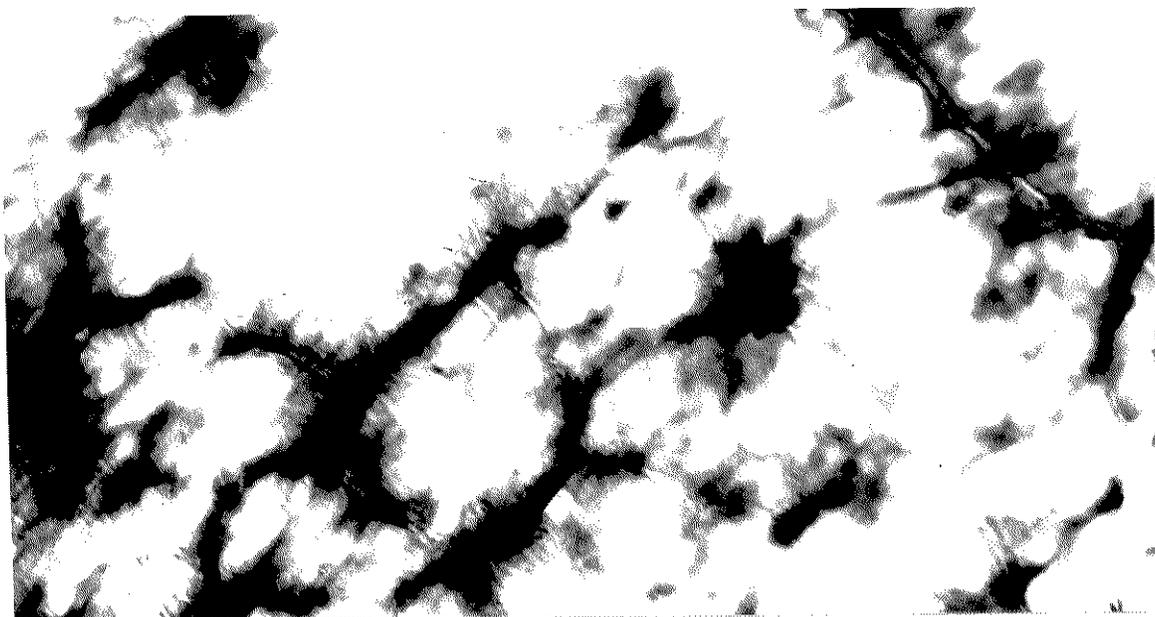


Figura 12b. Idem região anterior. Birrefringência compensa
da.

Entremeando as fibrilas, encontra-se uma massa amorfa menos eletrodensa disposta como que "cimentando" estas fibrilas lado a lado (Fig. 13). Tal aspecto é mais evidente nos cortes eminentemente tangenciais dos "alvéolos", cujas paredes apresentam-se formadas pelas fibrilas segmentadas interligadas pelo material amorfo, organizando-se numa verdadeira "paliçada circunscrita" (Fig. 15).

6.2.2. Extrato de uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1% (G.P.Es. -UM)

. Tratamento rotineiro

As G.P.Es. isoladas, produto de diálise do extrato de uréia e 2-mercaptoetanol, quando submetidas ao tratamento rotineiro de fixação e desidratação não proporcionaram densidade suficiente para observações ao microscópio eletrônico.

A pós-coloração com citrato de chumbo e acetato de uranila aumenta ligeiramente o seu contraste para estudos ultra-estruturais em cortes finos. As observações destes cortes finos mostraram um material fibrilar irregular no seu arranjo e frequentemente ramificado ou anastomosado entre si. (Fig. 16). O padrão das fibrilas também é irregular quanto à espessura, apresentando regiões mais e menos espessas dando um aspecto de fibrilas formadas por segmentos globulares, sem contudo mostrarem ser contínuas nem muito extensas.

. Tratamento com P.T.A. etanólico

A adição do ácido fosfotúngstico (P.T.A.) durante o processo de desidratação proporcionou um contraste no material suficiente para a observação dos seus cortes finos em

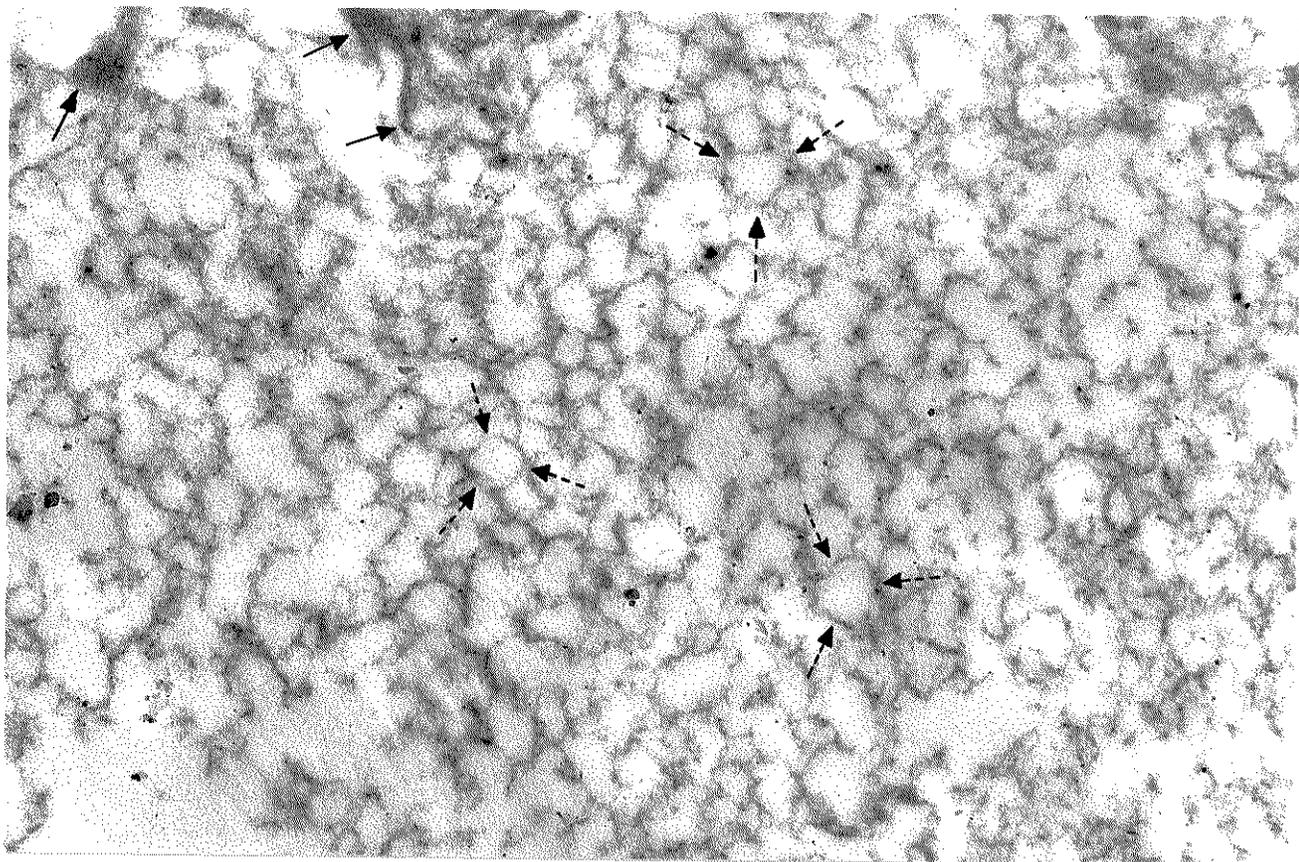


Figura 13. Micrografia eletrônica do extrato insolúvel em TCA 3%, tratado com PTA etanólico. Corte transversal. As setas descontínuas circundam as fibrilas de GPEs. organizadas em "alvéolos" de tamanhos variados. O material eletron-denso indicado pelas setas cheias é mais espesso e longo confundindo-se nas suas porções terminais com as fibrilas que se organizam em "alvéolos". Aumento final = 22,630 x

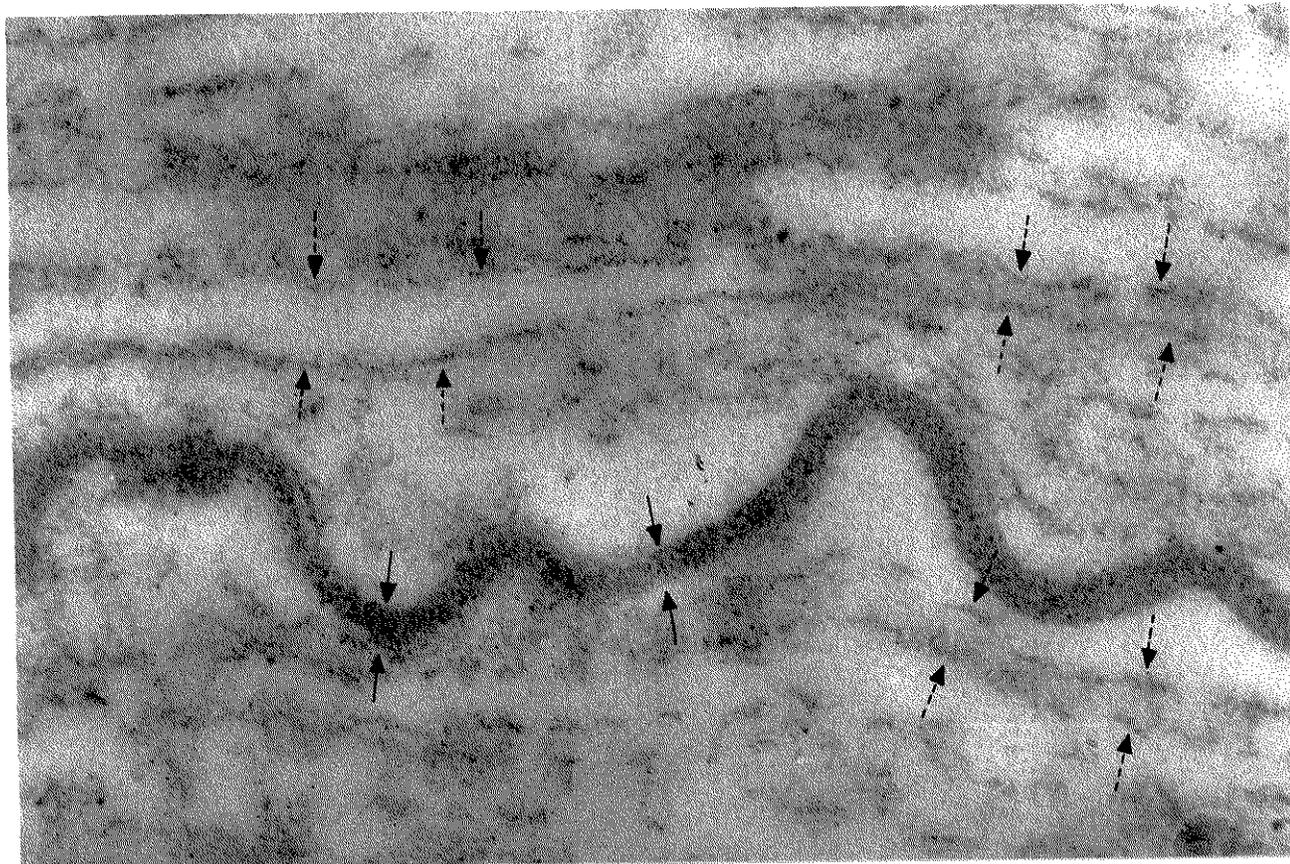


Figura 14. Idem material anterior em corte longitudinal com relação ao maior eixo do tendão. Observar o padrão fibrilar do material (setas descontínuas) que embora segmentado mantém-se ordenadamente alinhado e paralelo entre si. Entre estas fibrilas paralelas, em alguns segmentos observa-se a presença de uma massa pouco eletrônica e uniformemente distribuída. A estrutura eletrônica indicada pelas setas cheias que se apresenta como faixas contínuas de espessura variada assemelha-se à estrutura elástica. Aumento final - 44,000 x.

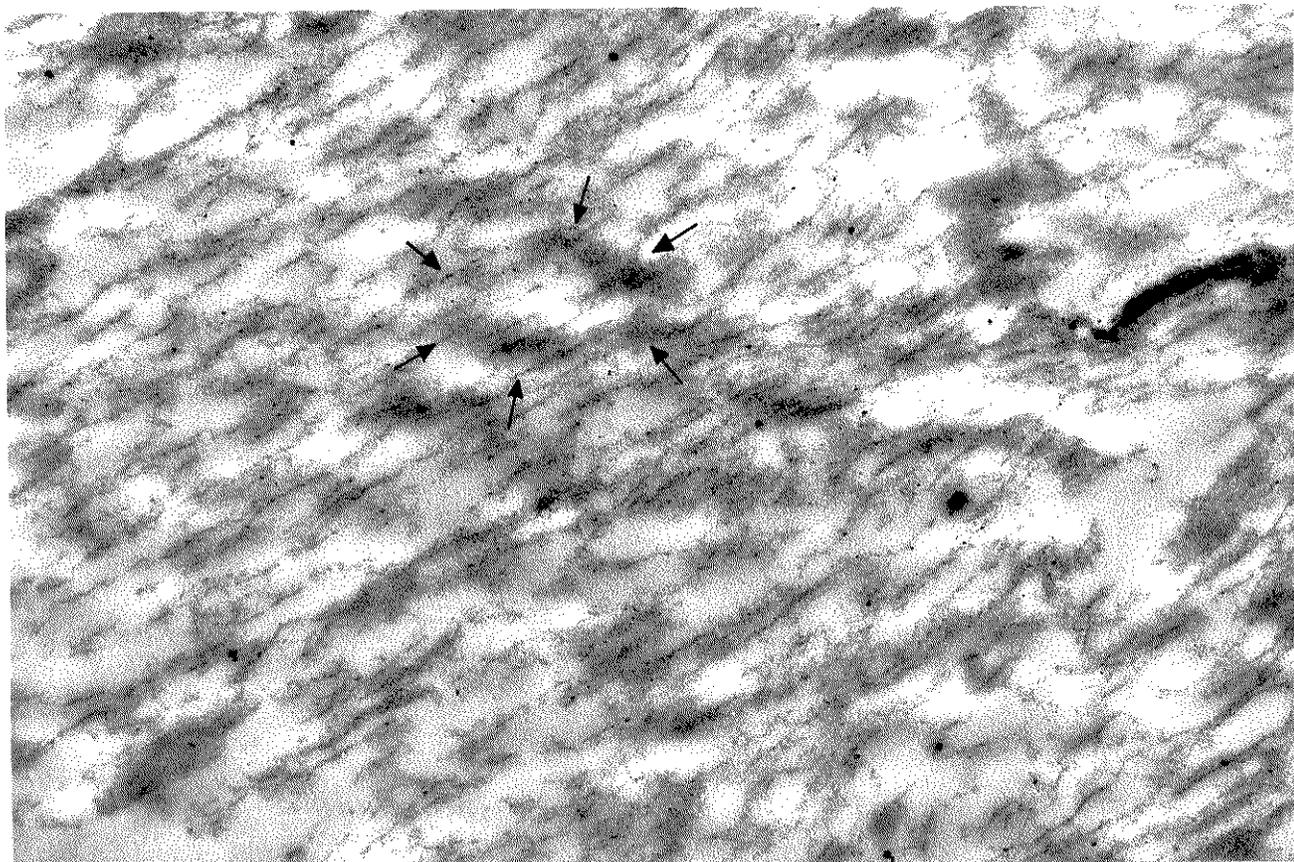


Figura 15. Idem material anterior. As setas circundam uma região em corte tangencial. Os pequenos segmentos fibrilares entremeads pelo material amorfo dispõem-se paralelamente entre si organizando-se numa verdadeira "paliçada circunscrita". Aumento final = 40,000 x.

microscopia eletrônica de transmissão, sem o procedimento da pós-coloração pelo citrato de chumbo e acetato de uranila.

As características morfológicas mostraram-se semelhantes às aquelas observadas para o material processado pela técnica rotineira. A diferença consiste na acentuação do contraste das fibrilas, observando-se ainda a presença de regiões das fibras com densidade eletrônica ligeiramente maior, sem contudo apresentar simetria na disposição destas regiões eletrôn-densas (Figs. 17 e 18).

. Coloração com P.T.A. aquoso - "Coloração negativa"

Esta técnica empregada no material glicoproteico, mostrou-se ineficiente para a obtenção de imagens negativas do seu estado de agregação. A observação em microscopia eletrônica mostrou apenas massas amorfas, pouco eletrôn densas, que se confundiam com a coloração do precipitado de P.T.A. presente no fundo dando pouco contraste, portanto pouco elucidativas para estudos morfológicos ao nível ultra-estrutural. A imagem obtida tende a ser muito mais de uma coloração positiva pelo ácido fosfotúngstico do que propriamente de uma coloração negativa.

6.2.3. Produto de interação G.P.Es. - colágeno

. Coloração negativa

O produto da interação G.P.Es. - colágeno apresentou em imagem negativa um material filamentosso bastante fino que se entrecruza sem um padrão ordenado (Fig. 19). Constatou-se nas regiões de maior acúmulo do material um componente

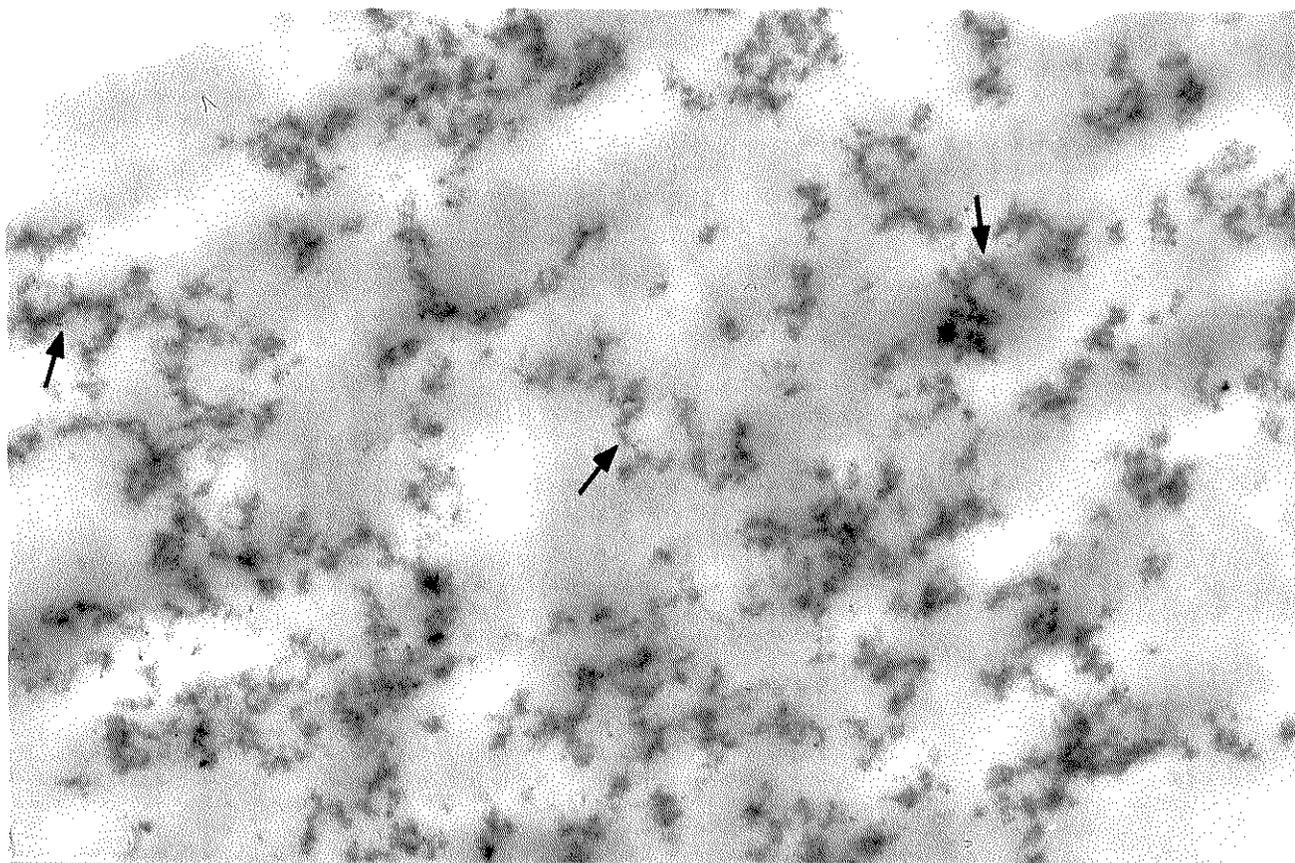


Figura 16. Micrografia eletrônica do extrato de uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1% dialisado. Cortes ultra-finos em resina epoxi com pós-coloração pelo citrato de chumbo e acetato de uranila. As setas indicam as fibrilas de contornos e densidades irregulares, frequentemente ramificadas. Aumento final = 22,630 x.

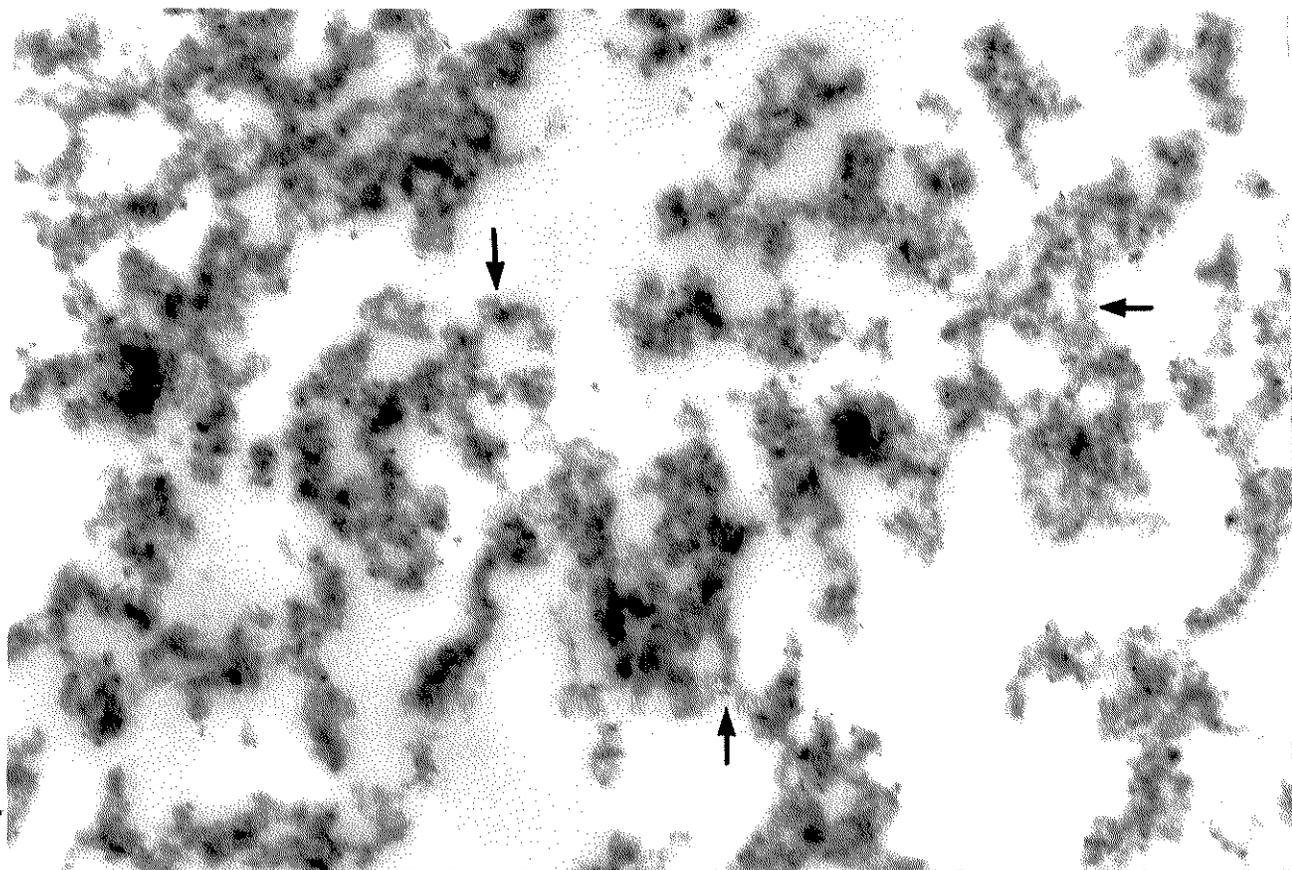


Figura 17. Idem material anterior, porém tratado pelo PTA etanólico. As setas indicam as fibrilas irregularmente organizadas frequentemente ramificadas. Aumento final = 22,630 x

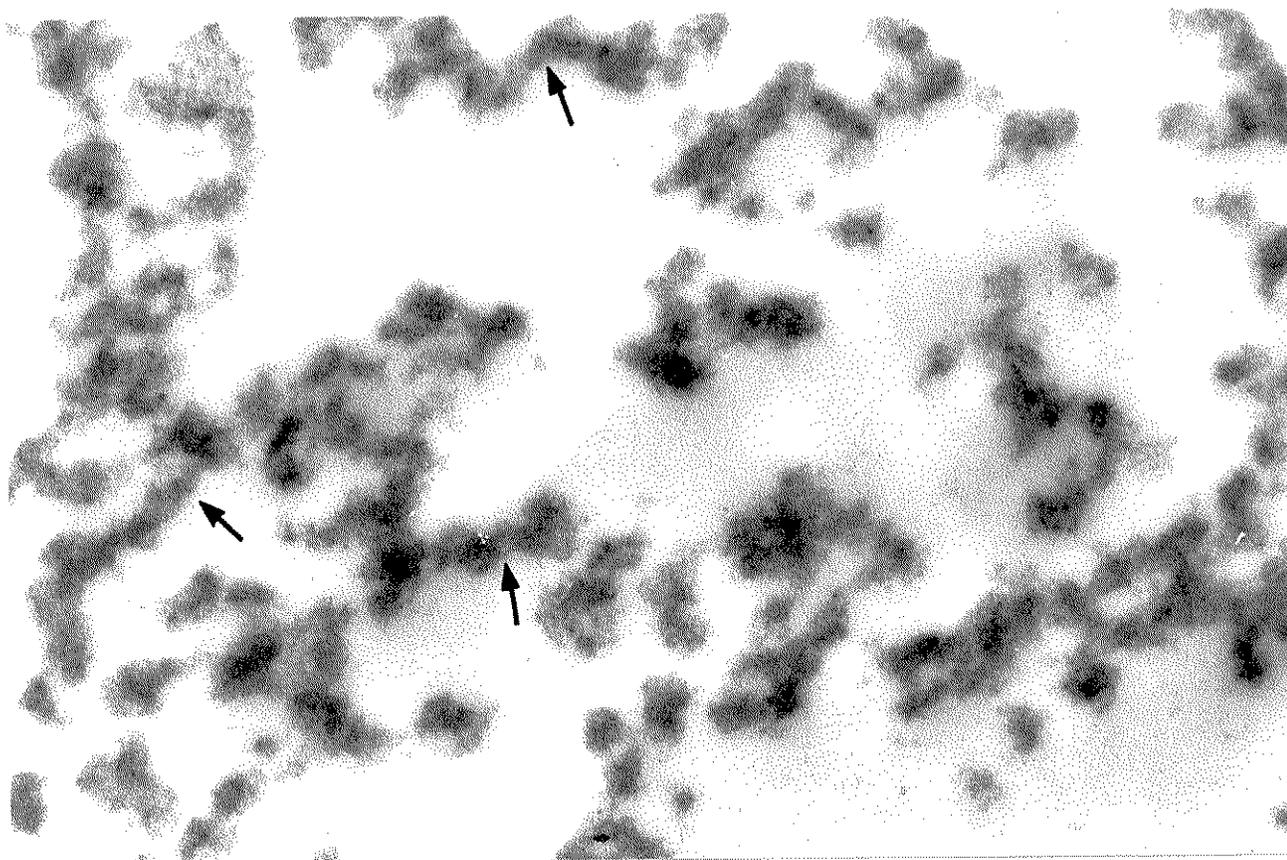


Figura 18. Idem anterior em detalhe. As fibrilas apresentam-se em padrões pouco constantes de espessura e densidade eletrônica. Os agregados fibrilares não apresentam uma extensão muito longa e frequentemente são ramificados. Aumento final = 44,000 x

que apresenta-se em coloração negativa.

Por outro lado, os filamentos parecem anastomosarem-se em determinadas regiões, formando um filamento ligeiramente mais espesso, mas de extensão limitada.(Fig. 19).

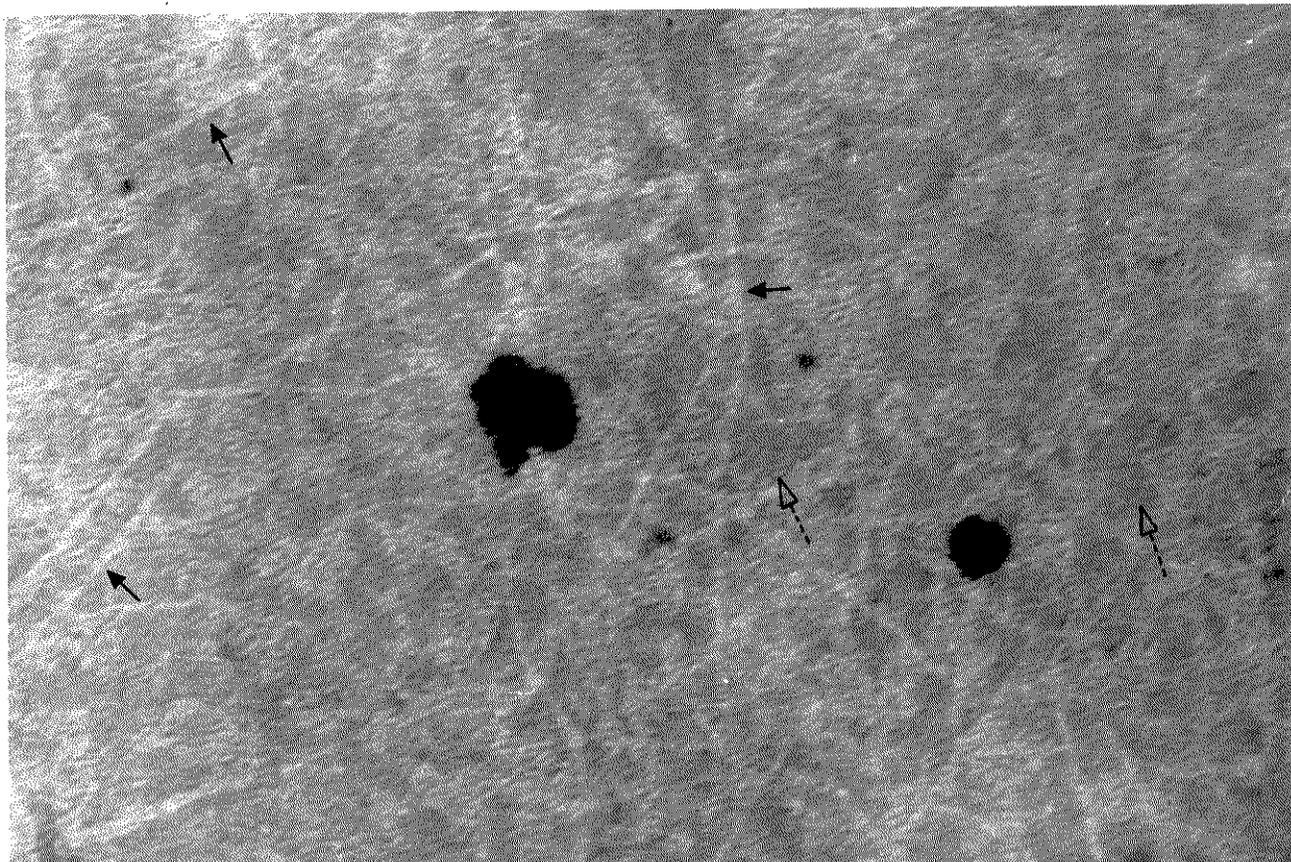


Figura 19. Micrografia eletrônica do agregado GPEs - colâgeno I em coloração negativa. As setas cheias indicam as fibrilas de diferentes tamanhos em imagem negativa. A distribuição destas não é organizada; apresentam-se anastomosadas em determinados segmentos, formando uma fibrila de espessura maior. As setas vazias indicam uma massa amorfa em imagem positiva que se entremeia às fibrilas em imagem negativa. Aumento final = 44,000 x.

DISCUSSÃO

Dentre as expressões fisiológicas do tecido conjuntivo, destacam-se as de natureza mecano-estruturais, as quais dependem da composição e interações das macromoléculas da matriz extra celular. No caso dos tendões, assumem importância as propriedades mecânicas intimamente dependentes da sua estabilidade estrutural. Estabilidade esta que pode ser definida segundo a proposição de CHVAPIL (1967), como "a resistência que a estrutura apresenta frente a fatores destrutivos de natureza mecânica ou físico-química". Com relação ao colágeno, a sua estabilidade é avaliada entre outros meios, pela sua extractibilidade ou pela temperatura de fusão (T_m), (CHVAPIL, 1967).

Diversos procedimentos têm sido empregados para extração de glicoproteínas (G.P.) associadas aos feixes de colágeno (BOURILLON & GOT, 1962; HERRING & KENT, 1963; RADHAKRISHNAMURTHY et alii, 1964; DUNSTONE & FRANEK, 1967; ANDERSON & JACKSON, 1972; BACH & BENTLEY; 1980), o que vem revelando uma gama relativamente rica em glicoproteínas tomando parte na estruturação dos feixes de colágeno. Estas glicoproteínas, com relação àquelas de natureza estrutural (G.P.Es.) estudadas na presente pesquisa, são em termos de extractibilidade, de menor estabilidade físico-química.

O processo extrativo de ROBERT & DISCHÉ (1963) e TIMPL e colaboradores (1968), empregado com ligeiras modificações pelo autor da presente tese, deixa um resíduo de elastina de alta estabilidade (TIMPL et al, 1968), o qual só é solu-

bilizado frente a autoclavagem, ou guanidina 5M com agentes redutores de ponte dissulfeto, ou ainda hidróxido de sódio diluído e aquecido a temperatura de 95°C (PARTRIDGE, 1970).

A eficiência do tratamento pelo T.C.A. a quente para a remoção do colágeno pertencente a matriz insolúvel, é conhecida de longa data (FITCH et al, 1955; ROBERT & DISCHE, 1963; ROBERT & COMTE, 1968; TIMPL et al, 1968, 1969; WOLFF et alii, 1971). No entanto, estes autores acima e outros como ANDERSON (1976) e BACH & BENTLEY (1980), advertem para os possíveis danos que possam ser provocados pela ação do ácido tricloroacético aquecido sobre as glicoproteínas estruturais. Um evento provável, seria a hidrólise dos resíduos de oligossacarídeos e/ou mesmo das proteínas, e como consequência o aparecimento na eletroforese apenas de frações peptídicas não representativas de G.P.Es.

Em não se encontrando dados experimentais publicados que justifiquem o raciocínio acima, tornam tais suposições apenas especulativas, uma vez que no material protéico aqui denominado de G.P.Es., mantiveram-se resíduos de hexoses suficientes para identificá-las como glicoproteínas pela reação de P.A.S., tanto nas eletroforeses levadas a efeito como nos precipitados montados sobre lâminas.

Confirma-se também a presença de resíduos de carboidratos, pela alta reatividade observada nos testes de interações entre as G.P.Es. e as fitohemaglutininas (lectinas) de soja e a concanavalina A (YAMADA e VIDAL, 1983). Sabidamente as lectinas interagem com resíduos de açúcares terminais não redutores com certa especificidade. No caso, a concanavalina A é específica à α -D-Glicopirranose, α -D-Manopirranose e β -D-Frutose

furanose (AVRAMEAS, 1970; BERNHARD & AVRAMEAS, 1971; ANDERSON & LEE-OWN, 1974), e as lectinas da soja possuem alta afinidade pela D-Galactose e N-Acetil D-Galactosamina (LIS et al, 1970). Tal evidência sugere a presença de alguns destes açúcares na porção terminal dos radicais oligossacarídicos das G.P.Es. do tendão bovino. O fato de, o mesmo teste mostrar menor reatividade quando se trata do extrato insolúvel em T.C.A. 3% de tendões da cauda de rato (YAMADA e VIDAL, 1983) enfatiza a microheterogeneidade sugerida por ROBERT (1982) com relação aos resíduos oligossacarídicos das G.P.Es.

Estã fora dos objetivos desta tese, e portanto desta discussão, qualificar as possíveis hidrólises das glicoproteínas solubilizadas junto com o colágeno, sem com isto deixar de admitir que tal processo químico possa ocorrer em parte.

O tratamento com collagenase para a remoção do "colágeno insolúvel", em comparação com a ação do ácido tricloroacético, realizado por WOLFF e colaboradores (1971), demonstrou não haver variações entre os resíduos dos dois tratamentos, quanto às suas propriedades de solubilidade e na composição pela análise dos aminoácidos.

O experimento realizado neste trabalho, em que se utilizou collagenase tipo III, com o intuito de estabelecer um controle, permitiu determinar a eficiência do ácido tricloroacético, e concomitantemente demonstrar que o mesmo não promove perdas notáveis das frações glicoproteicas detectáveis pela reação de P.A.S. nas eletroforeses em géis de poliacrilamida.

Confirma-se pois, a hipótese de WOLFF e colabora

dores (1971), isto é, o T.C.A. 3% aquecido não introduz modificações significativas nos tipos de G.P.Es. obtidas.

Com relação ao comportamento do colágeno frente aos tratamentos pelo T.C.A. aquecido e colagenases, pode-se considerar que embora ossos e tendões calcaneanos tenham a mesma composição em termos de colágeno (Tipo I), suas estabilidades frente à ação da colagenase III diferem substancialmente. Encontra-se maior resistência em solubilizar o colágeno do osso, o que revela uma maior estabilidade das fibras de colágeno deste tecido, esta conferida provavelmente pela participação das G.P.Es.

Por outro lado o tratamento pelo ácido tricloroacético promove hidrólise de tal ordem sobre os colágenos tanto dos ossos como dos tendões, que os seus fragmentos peptídicos resultantes não são resolvidos pela eletroforese em géis com 7,5% de concentração em poliacrilamida.

Os géis a 7,5% de concentração, além de permitirem a separação das cadeias de colágeno, apresentaram uma fração proteica P.A.S. positiva comum a todos os preparados colagênicos, inclusive naqueles utilizados como padrões de referência (colágeno extraído e purificado em ácido acético 2%). Interpretar-se esta banda P.A.S. positiva, não descrita antes na literatura, como sendo uma fração glicoprotéica adicional intimamente associada ao colágeno, que dissocia nas condições de tratamento utilizadas para solubilização das amostras, qual seja, em meio a uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1% + dodecil sulfato de sódio 0,1%.

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS G.P.Es.Solubilidade

A solubilização dos resíduos de G.P.Es. obtidos após o tratamento pelo ácido tricloroacético só é conseguida em meio a uréia 8M e 2-mercaptoetanol 0,1%, o que revela o seu alto grau de estabilidade, só suplantada pelo da elastina. Esta estabilidade das G.P.Es. é supostamente conferida, principalmente por pontes de hidrogênio e pontes dissulfeto. Tal presunção é condicionada pela necessidade insubstituível da presença de uréia e 2-mercaptoetanol para a sua solubilização. A remoção destes agentes por meio de diálises provoca reagregações gradativas à medida que se restabelecem as ligações inter e/ou intra-moleculares.

O fato de não terem sido detectadas variações significativas entre as G.P.Es. extraídas da matriz óssea e tendões bovinos, contradiz substancialmente os relatos de WOLFF e colaboradores (1971) quanto ao comportamento da solubilidade do material extraído pelos mesmos acessos. As diferenças entre os resultados obtidos por WOLFF e colaboradores (1971) e os da tese em análise podem ser atribuídas à heterogeneidade apresentada pelas G.P.Es. associadas aos feixes de colágeno de diferentes estruturas, entendendo-se que entre os mesmos existem não apenas diferenças nos estados de agregação de colágeno como também em tipos de colágeno, conseqüentemente glicoproteínas diferentes.

Não obstante, esta heterogeneidade conferida às G.P.Es. de diferentes origens não pode ser generalizada, vis-

to que as G.P.Es. isoladas tanto de tendões como dos ossos de boi apresentaram propriedades físicas e químicas idênticas. Da mesma forma, esta aparente homogeneidade entre ambas não pode ser extrapolada à fisiologia das G.P.Es., visto que os ossos apresentam maior resistência à ação da colagenase III. De fato as G.P.Es. podem segundo MEYER (1982), estabilizar o colágeno com ele se complexando.

Embora não se tenham realizado comparações com processos de extrações "menos drásticos" (STEVEN, 1967; HASCALL & SAJDERA, 1969; ANDERSON & JACKSON, 1976; HERRING, 1976) é sugestivo que a maioria das "glicoproteínas estruturais" isoladas pelos autores acima referidos sejam de uma classe distinta daquela que se tem referido aqui como G.P.Es. -UM, ou seja, "glicoproteínas estruturais extraíveis e solúveis somente em presença de uréia 8M e 2-mercaptoetanol 0,1%.

Comportamento eletroforético

A presença de cadeias laterais de carboidratos nas glicoproteínas, faz com que estas tenham um comportamento anômalo na migração eletroforética (SEGREST & JACKSON, 1972; GORDON, 1972).

A estimativa dos pesos moleculares, mesmo quando se emprega o dodecil sulfato de sódio (SDS), não pode ser obtida com exatidão, uma vez que os radicais laterais de carboidratos não permitem ligações uniformes do SDS à proteína (GORDON, 1972; WEBER et al, 1972; NOELKEN et al, 1981).

Os géis de poliacrilamida/SDS, com poros de diâmetro adequado para a retenção das sub-frações das glicoproteí

nas, foram obtidos com a proporção de bis-acrilamida 5% em relação à concentração total de acrilamida. Esta proporção segundo GORDON (1972) proporciona após a polimerização do gel, a formação de malhas com poros de menor diâmetro para uma dada concentração de poliacrilamida.

A presença de uréia, 2-ME e SDS, nos géis e no tampão de preparo das amostras é imprescindível para a melhoria do padrão de separação. Tais elementos possuem atividades bem definidas, quais sejam, a uréia desestabiliza pontes de hidrogênio, o SDS se associa às proteínas tornando-as mais hidrofílicas, e o 2-ME reduz as pontes dissulfetos.

Apesar de todas as precauções e modificações introduzidas a partir dos métodos padrões já estabelecidos para eletroforese em disco de poliacrilamida (DAVIS, 1964; SHAPIRO et al, 1967; DUNKER & RUECKERTS, 1969; WEBER & OSBORN, 1969; WEBER et al, 1972), algumas das sub-frações não foram perfeitamente visualizadas e individualizadas nos géis com a concentração de 15%, referindo-se principalmente àquelas de peso molecular maior.

Nas tentativas realizadas com géis nas concentrações de 7,5%, 10,0% e 12,5% não se obtiveram separações das frações com padrões definidos, em decorrência dos pesos moleculares da maioria dos constituintes estarem muito aquém da capacidade de retenção pela malha de poros.

Mesmo na melhor alternativa, com os géis de 15,0%, onde se conseguiu a visualização das 7 frações, a região próxima àquela da aplicação da amostra manteve-se intensamente corada pelo "Comassie Brilliant Blue", indicando a permanência de proteínas pouco ou não migradas.

O padrão de coloração obtido com o "Naphthol Yellow-S" a pH 2,7, indica que as sub-frações das G.P.Es. não apresentaram distinções quanto à afinidade por este corante, uma vez que o padrão é idêntico àquele apresentado pelos géis corados com "Comassie Brilliant Blue". Por outro lado, a reação de P.A.S. mostrando-se positiva apenas para 5 das 7 frações presentes em géis de 15,0%, configura a natureza glicoprotéica apenas para parte do conjunto de proteínas extraídas. No entanto estas frações glicoprotéicas devem ser as de maior proporção, pois correspondem às frações de maior destaque na coloração pelo "Comassie Brilliant Blue".

CAPACIDADE DE INTERAÇÃO COM CORANTES

Naphthol Yellow-S (N.Y.-S)

Desde que DEITCH em 1966 descreveu a utilização do "Naphthol Yellow-S" para detecção de proteínas em cortes histológicos, este corante preparado em meio acético tem sido empregado em técnicas citoquímicas qualitativas e quantitativas para proteínas totais e principalmente para proteínas nucleares (TAS et al, 1974; GAUB et al, 1975; GAUB, 1976). Este corante possui intensa afinidade pelos grupamentos básicos das proteínas, especialmente àquelas dos aminoácidos lisina, arginina e histidina (TAS et al, 1974).

Comparando-se a capacidade de captação do "N.Y.-S" entre as G.P.Es. e o colágeno, as primeiras mostram uma capacidade duas vezes maior de captar o corante do que igual massa (em peso) de colágeno I, o que quer dizer: as G.P.Es. de

veriam possuir duas vezes mais radicais catiônicos disponíveis para interagirem com o corante preparado a pH 2,7. Contudo, as G.P.Es. possuem um teor de aminoácidos básicos totais apenas 10-15% maior que os colágenos. Esta interação acentuada das G.P.Es. com o corante comparada à do colágeno pode ser interpretada em função do estereó arranjo das moléculas de glicoproteínas submetidas ao tratamento pelo T.C.A. 3% aquecido, e posteriormente solubilizado em uréia e 2-ME. Dentro desta hipótese, é plausível supor-se que as modificações químicas levadas a efeito durante a extração e purificação, sejam de tal ordem que permitam uma exposição maior dos aminoácidos antes menos acessíveis.

Isto equivale a dizer que as duas proteínas (colágeno e G.P.Es.) embora possuam teores semelhantes de aminoácidos básicos, os estados conformacionais regulam o menor grau de acessibilidade do "Naphthol-Yellow-S" aos resíduos de aminoácidos. Este tipo de correlação foi considerado em outro material (ribonuclease S pancreática) por LEE & RICHARDS (1971) como "estimativa da acessibilidade estática", formulada sobre os possíveis efeitos, por exemplo, da troca de um único aminoácido na sequência de uma proteína, que pode além de alterar a flexibilidade da cadeia polipeptídica, modificar toda a carga elétrica da superfície proteica tornando-a mais ou menos polar, e conseqüentemente modificando suas propriedades físico-químicas.

A correspondência linear na relação concentração do substrato em função da concentração do corante captado, é observada somente para os segmentos da curva correspondente até o valor de $0,5 \times 10^{-4}g$ de corante captado pelas G.P.Es. (Fig.

06), sendo que a causa deste efeito observado também para os colágenos permanece ainda por estabelecer,

ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL

A birrefringência é propriedade anisotrópica óptica que pode ser detectada em materiais biológicos em consequência da presença de micelas ou de ligações químicas com distribuição assimétrica orientada apresentando um nível maior ou menor de cristalinidade (VIDAL, 1982).

A birrefringência positiva apresentada pelos resíduos dos tendões tratados pelo ácido tricloroacético 3% aquecido a 90-95°C demonstra que este material não deve ter os seus constituintes distribuídos ao acaso, mas sim com uma orientação preferencial numa determinada direção no espaço. Segundo VIDAL (1982), o sinal positivo da birrefringência apresentado pelos feixes de colágeno indica que estatisticamente os componentes estejam orientados na direção paralela ao longo do maior eixo das fibras.

Há uma variedade de tipos de organizações da matéria que podem resultar em anisotropia óptica, assim como várias categorias de birrefringência têm sido descritas baseadas nos arranjos e mecanismos de alinhamento das ligações e interações da matéria.

Um corpo misto anisotrópico é melhor interpretado através da birrefringência de forma (ou textural), porque o mesmo têm a sua anisotropia variável em função das propriedades dos meios em que estão embebidos (FREY-WYSSLING, 1948).

A birrefringência de forma é um tipo de anisotropia presente em estruturas compostas por moléculas assimétricas dispostas ordenadamente, de tal forma que as distâncias mantidas retenham alguma relação com o comprimento de onda de observação, ou das medidas quantitativas (VIDAL, 1982).

As curvas de birrefringência de forma com os perfis característicos em "U-côncavo" obtidas dos extratos insolúveis em T.C.A. 3% mostram muita semelhança com os perfis das curvas obtidas para os feixes de colágeno intacto (VIDAL, 1980; PIMENTEL, 1981) e feixes de colágenos desprovidos das cadeias de proteoglicanas (VIDAL, 1964, 1980). Todos os pontos destas curvas estando acima do eixo da abscissa, conferem o sinal positivo para as mesmas (BENNET, 1967). O ponto de " Γ " mínimo da curva, que se apresenta no índice de refração (n_D) do meio igual a 1,465 e cujo valor absoluto de seu retardo óptico (Γ) sendo maior que zero, indica a presença de birrefringência "cristalina" ou "intrínseca" positiva, para um ou mais dos constituintes deste material residual do tratamento pelo ácido tricloroacético.

O fato de se desconhecer a espessura, não invalida a possibilidade de análise dos perfis das curvas e da determinação da birrefringência intrínseca, mesmo porque, as relações entre o $\Gamma_{\text{máx.}}$ e $\Gamma_{\text{mín.}}$ de cada uma das curvas não mostrando variações, permitem estabelecer um índice, como parâmetro de controle para as medidas obtidas (VIDAL, 1982 - comunicação pessoal).

A curva de birrefringência de forma dos extratos insolúveis em ácido tricloroacético de tendões foi descrita por VIDAL & PIMENTEL (1980), tendo os mesmos atribuído esta

propriedade física à presença da organização das glicoproteínas estruturais.

Embora as G.P.Es. isoladas e autoagregadas por meio de diálises, sendo opticamente isotrópicas, possam levantar dúvidas quanto a suposição acima o fato de o extrato insolúvel em T.C.A. 3% (montagem a fresco em lâmina) perder a birrefringência quando embebido em meio contendo uréia 8M, permite afirmar que o material solubilizado pela uréia seja o responsável pela anisotropia óptica detectável neste extrato. Fato é que utiliza-se a uréia 8M como um dos agentes para a solubilização das G.P.Es. aqui estudadas, e não consta que a uréia nesta concentração e nas condições utilizadas seja capaz de solubilizar a elastina. Mais ainda, segundo AARON & GOSLINE (1980), a elastina uma vez isolada é opticamente isotrópica.

Sustenta-se pois agora de forma mais explícita a primeira proposição de VIDAL & PIMENTEL (1980), isto é, as glicoproteínas estruturais pela sua disposição e/ou pela forma de interação com a elastina, apresentam um grau de cristalinidade capaz de conferir uma anisotropia óptica.

A aparente isotropia óptica dos auto-agregados de G.P.Es. obtidas pela diálise faz supor ainda que se processe alguma mudança conformacional ao nível molecular durante as etapas de isolamento e purificação. Além do que, o material glicoproteico isolado, sendo produto de auto-agregação artificial obtida por meio de diálise, não pode ser considerado como uma réplica da sua configuração "in situ".

A montagem a fresco do produto da complexação G.P.Es. -colágeno é pouco birrefringente. Esta birrefringência

é notada somente nos filamentos maiores, o que torna difícil a sua interpretação. No entanto, a intensa birrefringência encontrada tanto nos filamentos maiores como nos menores do mesmo material quando corados com "Sirius Red F₃B", deve também ser interpretada com cautela. Supõe-se que esta birrefringência acentuada pode ser proveniente de uma outra configuração molecular artefactual das G.P.Es. isoladas, incorrendo num fenômeno semelhante àquela birrefringência apresentada por estruturas orientadas e estiradas artificialmente por forças mecânicas externas (desidratação).

A participação das G.P.Es. nas propriedades anisotrópicas dos feixes de colágeno é irrefutável, e os resultados obtidos corroboram o modelo proposto por JACKSON & BENTLEY (1968) e VIDAL (1980b), com relação à disposição e participação destas G.P.Es. na organização e ordenamento molecular dos feixes de colágeno.

A análise ultra-estrutural levada a efeito pela microscopia eletrônica demonstra o material finamente fibrilar dos extratos auto-agregados das G.P.Es.. No entanto, este auto-agregado apresenta padrões pouco regulares e sem uma organização que lembre algum ordenamento molecular, fortalecendo a hipótese da aparente isotropia deste material isolado.

O material do extrato insolúvel em T.C.A. 3% observado em microscopia eletrônica apresenta-se formado por uma malha de fibrilas organizadas, ora em padrão "alveolar", ora em segmentos fibrilares descontínuos porém paralelos entre si. Estas duas organizações diferentes representam respectivamente as imagens provenientes dos planos de cortes transversais e longitudinais do tendão destituído de colágenos e proteoglica-

nas. Considerando-se que este extrato insolúvel em T.C.A. 3% seja constituído predominantemente de glicoproteínas estruturais, supõe-se que os segmentos fibrilares relativamente longos que se dispõem paralelamente entre si (Fig. 09) sejam a imagem bidimensional da disposição organizada das G.P.Es. ao longo dos feixes de colágeno; o que por sua vez é compatível com o modelo atualmente em proposição de JACKSON & BENTLEY, (1968) e VIDAL (1980b).

O aspecto "alveolar" da organização das G.P.Es. (Fig. 13) pode ser interpretado juntamente com a imagem obtida em corte tangencial das mesmas (Fig. 15). Através da imagem desta última supõe-se uma organização dos segmentos fibrilares dispostos paralelamente entre si formando a parede dos alvéolos numa verdadeira "paliçada circunscrita". A interpretação desta imagem sugere uma interação bastante íntima das G.P.Es. entre si, por meio de ramificações laterais (provavelmente radicais oligossacarídicos) e/ou presença de proteínas que promovam ligações cruzadas entre duas moléculas de G.P.Es.

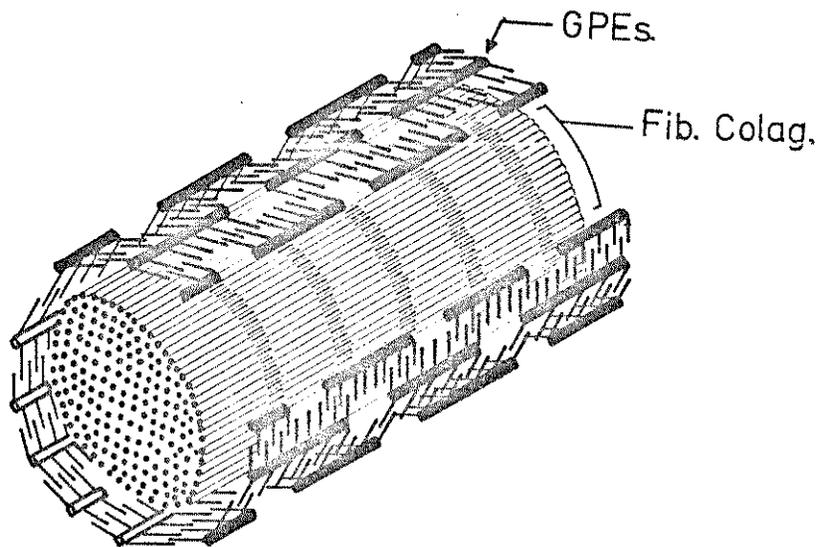
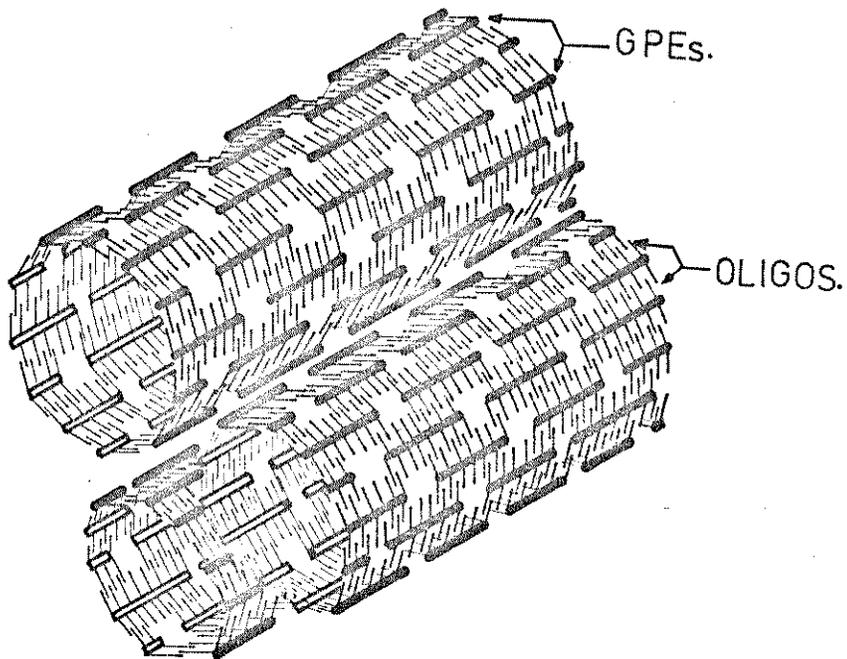
Esta interação teria de ser de tal forma, que as ramificações laterais das G.P.Es. tenham a sua orientação no sentido perpendicular ao longo do seu maior eixo, e estas, ligadas a outras G.P.Es. próximas e vizinhas, formando verdadeiras paredes envolvendo regularmente uma fibra de colágeno. Tais características de interação entre as G.P.Es. permitiriam que estas se associem com fibras de colágeno de diferentes tamanhos (em comprimento e em espessura), que por sua vez seria facultado e condicionado pela quantidade de G.P.Es. pareadas. Isto explicaria os "alvéolos" de diferentes diâmetros observados nas micrografias eletrônicas (Fig. 13), assim como as fi-

bras de colágeno de diferentes espessuras. Um modelo proposto da organização e associação das G.P.Es. e desta com o colágeno é apresentado no Esquema 2 (página 87).

Uma vez que os padrões acima referidos não mais são observados nos extratos de G.P.Es. auto-agregados por diálise, ou mesmo no produto de reassociação G.P.Es. - colágeno, é patente que embora ocorra o fenômeno de auto-agregação, este não reproduz a organização original, mesmo configurando-se ou não mudanças conformacionais e/ou modificações nas propriedades físico-químicas das moléculas de G.P.Es. durante o seu isolamento.

A afinidade demonstrada pelas G.P.Es. para com o colágeno durante o experimento de associação entre ambas, faz pressupor que haja algum tipo de interação direta entre os mesmos. Interação esta que deve ser rompida durante o tratamento pelo T.C.A. aquecido ou pela ação da uréia 8M com 2-mercapto - etanol 0,1%. Não se pode também desprezar a hipótese de que no "pool" das G.P.Es. se faça presente uma proteína que promova uma ligação "tipo lectina" entre o colágeno e as G.P.Es.

A peculiaridade da alta estabilidade físico-química das G.P.Es. constatada em decorrência dos comportamentos frente ao seu processamento e isolamento, condiz com um determinismo funcional, qual seja, o de participar efetivamente na organização estrutural dos feixes de colágeno (com alto grau de ordenamento molecular), conferindo-lhes por sua vez, a estabilidade necessária. Permite-se pois deduzir que, dentre as funções das G.P.Es. está a de manter os feixes de colágeno com higidez suficiente e necessária para as suas funções mecânicas e bioquímicas.



ESQUEMA 02 - Configuração esquemática do arranjo arquitetônico das GPEs. (Glicoproteínas Estruturais) - (A), e a sua disposição com relação à fibra de colágeno (Fib. Colag.) - (B). As GPEs. dispostas linearmente ao longo das Fib. de Colágeno também interagem entre si através dos radicais laterais de o ligossacarídeos (OLIGOS.) permitindo o seu pareamento. A s GPEs. nos modelos estudados (feixes de colágeno altamente o denado de tendão e osso), dispõem-se com alto ordenamento molecular, envolvendo quase que completamente cada Fibra de Colágeno (B), proporcionando ao conjunto uma maior o dade e resistência.

CONCLUSÃO

As abordagens e as análises dos resultados obtidos pela presente tese permitiram concluir que:

. a metodologia proposta, permitiu o isolamento de frações de glicoproteínas de papel estrutural, dentre os constituintes da matriz colagênica.

. o comportamento das G.P.Es. frente aos processos de isolamento e identificação permitiu avaliar o seu alto grau de estabilidade físico-química.

. a crítica com relação à metodologia empregada, principalmente no que diz respeito ao uso de ácido tricloroacético aquecido tornou-se improcedente, uma vez que este tratamento forneceu resultados idênticos àqueles obtidos pelo processo alternativo (colagenase III). A ação da uréia 8M com 2-mercaptoetanol 0,1% permaneceu questionável, apenas por não terem sido obtidos auto-agregados de G.P.Es. e G.P.Es.-Colágeno I com propriedades físicas originais.

. as G.P.Es. isoladas pelo processo empregado nesta tese não mostraram heterogeneidade quando comparadas os materiais provenientes de tecidos heterólogos (tendões calcaneanos e ossos corticais) de um mesmo animal (boi), porém apresentaram diferenças entre tecidos homólogos (tendões calcaneanos de bois e tendões da cauda de ratos).

. o caráter anisotrópico óptico dos extratos de G.P.Es. permitiu estabelecer a sua participação com o alto grau de ordenamento molecular na organização dos feixes de colágeno.

. a análise conjunta das imagens de microscopia de polarização e da microscopia eletrônica, permitiu propor um modelo de organização das G.P.Es. junto aos feixes de colágeno altamente ordenado.

RESUMO

Glicoproteínas estruturais (G.P.Es.) associadas aos feixes de colágeno foram isoladas por meio de extrações seletivas e analisadas as suas propriedades físicas, químicas e estruturais.

O processo de extração e isolamento, além de limitar conceitualmente uma fração de glicoproteínas dentre todas aquelas encontradas na matriz do tecido conjuntivo, permite também constatar o alto grau de estabilidade físico-química das G.P.Es. A utilização de ácido tricloroacético (T.C.A.) aquecido, criticada por ser considerada um tratamento drástico na extração destas glicoproteínas, foi reavaliada frente a um processo alternativo (extração pela collagenase tipo III), não revelando este diferenças significativas no produto final de extração. Por outro lado, a solubilidade destas glicoproteínas restrita a uréia 8M + 2-mercaptoetanol 0,1%, limitou alguns dos estudos bioquímicos.

A heterogeneidade atribuída às G.P.Es. é discutida frente aos resultados encontrados entre tecidos heterólogos de um mesmo animal (tendões e ossos de bovinos) e tecidos homólogos de animais diferentes (tendões da cauda de rato e tendões calcaneares bovinos).

Para se estabelecer a disposição e a organização das G.P.Es. nos feixes colagênicos foram efetuados estudos ultraestruturais ao nível da microscopia eletrônica e da polarização. Este último permitiu detectar " in situ " um grau de cristalinidade apreciável das G.P.Es. Tal grau de cristalinidade é atribuído ao ordenamento molecular decorrente do alinha

mento e interação das fibrilas de G.P.Es. entre sí, cuja organização espacial lembra uma paliçada de fibrilas circunscrevendo fibras colagênicas.

ABSTRACT

Structural glycoproteins (SGP) associated to collagen fibers were isolated by a selective extraction procedure and their physical, chemical and structural properties were analysed.

The extraction and isolation procedures used permit a conceptual separation of certain glycoproteins fraction from the connective tissue matrix, and appraisal of their high degree of physico-chemical stability.

The use of hot trichloroacet acid (TCA) has been criticised by various authors who consider it a drastic method for the extraction of glycoproteins. This treatment was therefore, re-evaluated in comparison with an alternative method (extraction with type III collagenase), and no significant differences were encountered in the resulting fraction. On the other hand the limiting solubility of this glycoprotein which occurs only at 8M urea + 0,1% 2-mercaptoetanol restricts others biochemical analyses.

The heterogeneity attributed to SGP is discussed in relation to the results found for heterogeneous tissues of the same animal (bovine tendon and bone) and homologous tissues from different animal sources (rat tail tendon and bovine Achilles tendon).

Based on the current model proposed by JACKSON & BENTLEY (1964) for the arrangement and organization of SGP around native collagen fibers, analyses were made at the ultra structural level with the polarizing and electron microscopes.

The polarizing microscope revealed a considerable crystallinity of the SGP " in situ ". This crystallinity is attributed to the molecular order formed by the arrangement and interaction of these fibrils. Considering this a spatial distribution, a model of SGP fibrils arranged as a palisade, and encircling collagen fibers, is suggested.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARON, B.B. & GOSLINE, J.M. Optical properties of single elastin fibres indicate random protein conformation. Nature, 287: 865-7, 1980.
- ANDERSON, J.C. & JACKSON, D.S. The isolation of glycoproteins from bovine Achilles tendon and their interaction with collagen. Biochem. J., 127: 179-86, 1972.
- _____ & LEE-OWN, V. The use of concanavalin A in the fractionation of tendon proteins. Biochem. Soc. Trans., 2: 623-4, 1974.
- _____. Glycoproteins of connective tissue matrix. Int. Rev. Connect. Tissue Res., 7: 251-322, 1976.
- AVRAMEAS, S. Emploi de la concanavaline-A pour l'isolament, la détection et la mesure des glycoprotéins et glucides extra ou endo-cellulaires. C. R. Acad. Sci., Paris, 270: 2205-8, 1970.
- BACH, P.R. & BENTLEY, J.P. Structural glycoproteins, fact or artefact. Connect. Tissue Res., 7: 185-96, 1980.
- BENNET, H.S. Methods applicable to the study of both fresh and fixed materials. In: Mc CLUNG-JONES, R., ed. Mc Clung's Handbook of Microscopical Technique, 3a. ed. New York, Hafner, 1967. Cap. 9, p. 591-677.

- BERNARD, W. & AVRAMEAS, S. Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of concanavalin A. Expl Cell Res., 64: 232-6, 1971.
- CHVAPIL, M. Physico-mechanical functions of connective tissue. In: _____. Physiology of Connective Tissue. London, Butterworths, 1967. Cap. 2, p. 11-25.
- DAVIS, B.J. Disc eletrophoresis II: method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121: 404-27.
- DEITCH, A.D. Microspectrophotometric study of the binding of the anionic dye, Naphthol Yellow S by tissue sections and by purified proteins. Lab. Invest., 4: 324-51, 1955.
- DUNKDER, A.K. & RUECKERT, R.R. Observations on molecular weight determination on polyacrylamide gel. J. biol. Chem., 244: 5074-80, 1969.
- DUNSTONE, J.R. & FRANEK, M.D. Isolation of a glycoprotein from cartilage protein polysaccharide. Biochem. biophys. Res. Commun., 27: 39-45, 1967.
- FITCH, S.M.; HARKNESS, M.L.R. & HARKNESS, R.D. Extraction of collagen from tissues. Nature , 176: 163, 1955.
- FREY-WYSSLING, A. Fundamentals of submicroscopic morphology. In: _____. Submicroscopic Morphology of Protoplasm and its Derivatives. New York, Elsevier, 1948. p. 7-90.

FURTHMAYER, H. & TIMPL, R. Acidic structural proteins of connective tissue. Evidence for disulfide cross-links. Biochim. biophys. Acta, 220: 396-8, 1970.

GAUB, J.; AUER, G. & ZETTERBERG, A. Quantitative cytochemical aspects of a combined Feulgen-naphthol yellow S staining procedure for the simultaneous determination of nuclear and cytoplasmic proteins and DNA in mammalian cells. Expl Cell Res., 92: 323-32, 1975.

_____. Feulgen-naphthol yellow S cytophotometry of liver cells. (The effect of formaldehydes induced shrinkage on nuclear naphthol yellow S binding). Histochemistry, 49: 293-301, 1976.

GLOSSMAN, H. & NEVILLE Jr., D.M. Glycoproteins of cell surfaces. A comparative study of three different cell surfaces of the rat. J. biol. Chem., 246: 6339-46, 1971.

GORDON, A.H. Acrylamide gel. In: WORK, T.S. & WORK, E., ed. Electrophoresis of proteins in polyacrilamide and starch gels, 4 ed., Amsterdam, North-Holland, 1972. p. 34-45. (Laboratory Techniques in biochemistry and molecular biology).

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: 2384-96, 1969.

HAY, E.D. Extracellular matrix. J. Cell Biol., 91: 205-23, 1981.

HERRING, G.M. & KENT, P.W. Some studies on mucosubstances of bovine cortical bone. Biochem. J., 89: 405-14, 1963.

_____. A comparasion of bone matrix and tendon with particular reference to glycoprotein content. Biochem. J., 159: 749-55, 1976.

JANADO, M. & DUNSTONE, J. A glycoproteins from bovine nasal cartilage. J. Biochem., 71: 635-43, 1972.

LEE, B. & RICHARDS, F.M. The interpretation of proteins structures: estimation of static accessibility. J. mol. Biol., 55: 379-400, 1971.

MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. Anisotropic properties of toluidine blue stained collagen. Annls Histochem., 18: 103-22, 1973.

_____; GODO, C.; VIDAL, B.C. & ABUJADI, J.M. Changes in macromolecular orientation of collagen fibers during the process of tendon repair in the rat. Annls Histochem., 20: 145-52, 1975.

_____; VIDAL, B.C.; CARVALHO, A.C. & CASEIRO-FILHO, A.C. Change with age of anisotropic properties of collagen bundles. Gerontology, 25: 2-8, 1979.

MEYER, F.A. Interactions of collagen, structural glycoproteins, hyaluronic acid and proteoglycans in Wharton's jelly. Connect. Tissue Res., 10: 119-20, 1982.

MOCZAR, E.; ROBERT, L. & MOCZAR, M. Études sur les fractions glucidiques de la trame fibreuse insoluble du stroma cornéen. Eur. J. Biochem., 6: 213-8, 1968.

_____ & MOCZAR, M. Distribution of carbohydrates in the insoluble network of connective tissue. In: BALAZS, E.A., ed. Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix. London, Academic, 1970. V. 1, p. 243-250.

MOCZAR, M.; MOCZAR, E. & ROBERT, L. Composition of the glycoproteins isolated from the structural glycoproteins of aortas of different species. Biochem. biophys. Res. Commun., 28: 380-4, 1967.

NOELKEN, M.E.; WISDOM, B.J. & HUDSON, B.G. Estimation of the size of collagenous polypeptides by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Analyt. Biochem., 110: 131-6, 1981.

PARTRIDGE, S.M. Isolation and characterization of elastin. In: BALAZS, E.A., ed. Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix. London, Academic, 1970. V. 1, p. 593-616.

- PIMENTEL, E.R. Form birefringence of collagen bundles. Acta Histochem., 14: 35-40, 1981.
- QUELCH, K.J. & MELICK, R.A. Non-collagenous protein composition of human bone matrix. Connect. Tissue Res., 7: 204-5, 1980.
- RADHAKRISHNAMURTHY, B.; FISHKIN, A.F.; HUBBELL, G.J. & BERENSON, G.S. Further studies of glycoprotein from a cardiovascular connective tissue. Archs Biochem. Biophys., 104: 19-26, 1964.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17: 208-11, 1963.
- ROBERT, A.M.; ROBERT, B. & ROBERT, L. Chemical and physical properties of structural glycoproteins. In: BALAZS, E.A., ed. Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix. London, Academic, 1970, v.1, p. 237-242.
- ROBERT, L. & DISCHE, Z. Analysis of sulfated sialofucoglucosaminogalactomannosidoglycan from corneal stroma. Biochem. biophys. Res. Commun., 10: 209-14, 1963.
- _____ ; PAYRAU, P.; POULIQUEN, Y.; PARLEBAS, J. & ROBERT, B. Role of a structural glycoprotein of corneal stroma in transplantation on immunity. Nature, 207: 383-5, 1965.

- _____ & COMTE, P. Aminoacid composition of structural glycoproteins. Life Sci., 7: 493-7, 1968.
- _____. Letter to the editor. Connect. Tissue Res., 8: 69-70, 1980.
- SEGREST, J.P. & JACKSON, R.L. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel eletrophoresis in sodium dodecyl sulfate. Meth. Enzy., 28: 54-63, 1972.
- SHAPIRO, A.L.; VIÑUELA, E. & MAIZEL, J. Molecular weight estimation of polyacrilamide chains by eletrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem. biophys. Res. Commun., 28: 815-20, 1967.
- SHIMADA, E.; YAMAGUCHI, T. & MATSUMURA, G. Glycoproteins in rabbit skin. J. Biochem., 71: 9-16, 1972.
- SMITH, A.M.; PRICE, R. & LEAVER, A.G. Components of the organic matrices of rabbit incisor and molar dentine isolated after digestion of the demineralized tissues with collagenase. Archs oral Biol., 24: 955-63, 1980.
- SPIRO, R.G. Glycoproteins. Adv. Protein Chem., 27: 349-467, 1973.
- STEVEN, F.S. The effect of chelating agents of collagen interfibrillar matrix interactions in connective tissue. Biochim. biophys. Acta, 140: 522-8, 1967.

- _____ ; JACKSON, D.S. & BROADY, K. Proteins of the human intervertebral disc. The association of collagen with a protein fraction having an unusual aminoacid composition. Biochim. biophys. Acta, 160: 435-46, 1968.
- TAS, J.; ORED, J. & JAMES, J. The naphthol yellow S stain for proteins tested in a model system of polyacrylamide films and evaluated for practical use in histochemistry. Histochemistry, 40: 231-40, 1974.
- THOMAS, M. & LEAVER, A.G. The less-acidic glycoproteins of the organic matrix of human dentine. Archs oral Biol., 22: 545-9, 1977.
- TIMPL, R.; WOLFF, I. & WEISER, M. A new class of structural proteins from connective tissue. Biochim. biophys. Acta, 168: 168-70, 1968.
- _____ ; _____ & _____. Acidic structural proteins of connective tissue: solubilization and preliminary chemical characterization. Biochim. biophys. Acta, 194: 112-20, 1969.
- VIDAL, B.C. Pleochroism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides. Protoplasma, 56: 529-36, 1963.
- _____. The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of the collagen. Protoplasma, 59: 29-35, 1964.

_____. Macromolecular disorientation in detached tendons. Protoplasma, 62: 121-32, 1966.

_____. Desorganização macromolecular dos feixes de coláge no sob influência da histamina: estudo experimental. Piraci caba, 1967. Fac. de Odontologia de Piracicaba. (Mimeografa do).

_____ & MELLO, M.L.S. Absorption spectral curves of dichroism on collagen bundles. Histochemistry, 23: 176-9, 1970.

_____. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossifi cation: microspectrophotometric evaluation and macro molecular orientation. Cell. mol. Biol., 22: 45-64, 1977.

_____. Feixes de colágeno: detecção e quantificação de or dem molecular. Dicroísmo com corantes azóicos sulfatados (Orange G, Xylidine Ponceau e Sirius Red). Ciênc. Cult. S Paulo, 32: 603-11, 1980a.

_____. The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. Cell mol. Biol., 26: 415-21, 1980b.

_____. Ordem molecular em feixes de colágeno. In: Congres so Ibero-Americano de Histoquímica e Citoquímica, 1. Espa nha, 1981. (Mimeografado).

- _____ ; MELLO; M.L.S. & PIMENTEL, E.R. Polarization microscopy and microspectrophotometry of Sirius Red, Picrosirius and Chlorantine Fast Red aggregates and of their complexes with collagen. Histochem. J., 14: 857-78, 1982.
- WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J. biophys. biochem. Cytol., 4: 727-30, 1958.
- WEBER, K. & OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis. J. biol. Chem., 244: 4406-12, 1969.
- _____ ; PRINGLE, J.R. & OSBORN, M. Measurement of molecular weights by eletrophoresis on SDS-acrylamide gel. Meth. Enzym., 26: 3-27, 1972.
- WOLFF, I.; FUCHSWANS, W.; WEISER, M.; FURTHMAYR, H. & TIMPL, R. Acid structural proteins of connective tissue: characterization of their heterogeneous natures. Eur. J. Biochem., 20: 426-31, 1971.
- WOOD, G.C. The precipitation of collagen fibers from solutions. Int. Rev. Connect. Tissue Res., 2: 1-28, 1964.
- YAMADA, A.T. & VIDAL, B.C. Interações de lectinas da soja com glicoproteínas não colagênicas. In: Simpósio Anual da Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 8, 1983. São Paulo.