SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO I. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

JOÃO BATISTA GIFONI VIEIRA

ANÁLISE BIOQUÍMICA E MORFOLÓGICA DO EFEITO DE SOLUÇÃO FISIOLÓGICA E CLORETO DE GUANIDINA SOBRE CARTILAGEM XIFÓIDE DE FRANGO

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) João Batista Gifoni Vieira e aprovada pela Comissão Julgadora. 15/12/2000

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL

TD/UNICAMP

UNIDADE BC
CHAMADA: T/ UNICAMP V673a
Ex.
TOMBO BC/ 44177
PROC. 16-392/01
C D T
PREÇO R$ 11,00
DATA 26/04/01
N.º CPD

CM-00155023-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

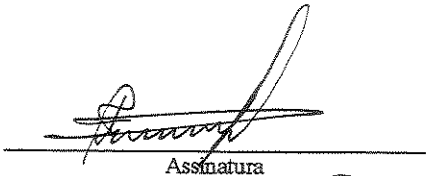
Vieira, João Batista Gifoni

V673a Análise bioquímica e morfológica do efeito de solução fisiológica e cloreto de guanidina sobre cartilagem xifóide de frango/João Batista Gifoni Vieira. -- Campinas, SP. [s.n], 2000
45 f: ilus.
Orientador: Edson Rosa Pimentel
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Campinas. Instituto de Biologia.
Cartilagem. 2. Matriz extracelular. 3. Frango. I. Pimentel, Edson Rosa.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: 15/12/2000

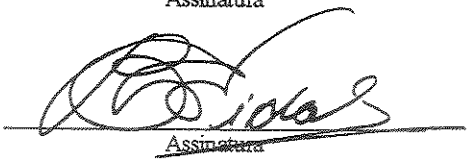
BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. Edson Rosa Pimentel (Orientador)



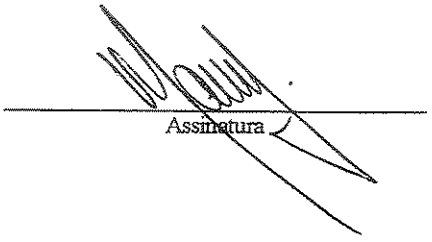
Assinatura

Prof.Dr. Benedicto de Campos Vidal



Assinatura

Prof.Dr. Marcelo Augusto Marretto Esquisatto



Assinatura

Profa.Dra. Laurecir Gomes

Assinatura

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

DEDICATÓRIA

A ***DEUS***, fonte de toda vida, de todo o bem e de toda a graça,o qual nada acontece sem SUA presença

Á minha querida esposa *Wanda*, pelo incentivo, paciência e profunda abnegação que teve durante a jornada deste trabalho.

À minha filha *Andréa*, pelo apoio que recebi dia a dia.

Ao meu filho *André* (*in memorium*) pela presença em nossas vidas.

À minha neta *Raíssa*, que sem saber foi fonte de inspiração para continuar lutando.

Ao meu genro *Wilson*, que muito contribuiu com a sua amizade.

Aos meus pais e irmão (*in memorium*), o meu mais profundo agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Édson Rosa Pimentel que além da competência como orientador, mostrou-se também amigo e solidário nos momentos oportunos.

À Profa. Dra. Laurecir Gomes, pela amizade e atenção à minha pessoa.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino pelo zelo ao analisar o relatório anual.

Ao Prof. Dr. Benedito de Campos Vidal pela amizade e incentivo durante este curso.

Ao meu amigo Francisco Roque que, no início, proporcionou grande ajuda aos meus trabalhos.

Aos meus colegas de pós-graduação, Pedro Ângelo, Francisco, Lino, Vera, Jussara, Marcelo, Nazário, Guido, Ricardo, Edinho, Silvia, Karina, Aninha, Odair, Cristina, Sergio, Heloisa, Laércio, Gustavo, Uyrá, Sidnei e Líliam, pela amizade do dia a dia.

"A VIDA NÃO TEM SENTIDO SE ELA NÃO SE TORNAR SERVIÇO PARA A HUMANIDADE"

ABREVIATURAS

BSA	Albumina de Sérica Bovina
CMP	Proteína de Matriz de Cartilagem
COMP	Proteína Oligomérica de Matriz de Cartilagem
DEAE	Dietilaminoetil
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
GuHCl	Cloridrato de Guanidina
MEC	Matriz Extracelular
PBS	Solução Salina Tamponada
PG	Proteoglicano
PMFS	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ÍNDICE

I.	Resumo	01
II.	Abstract	02
III.	Introdução	03
IV.	Objetivos	12
V.	Material e Métodos	13
5.1	Obtenção e extração do material de cartilagem	13
5.2	Fracionamento e eletroforese	13
	5.2.1 Cromatografia em Sephadex G-50	13
	5.2.2 Cromatografia de troca em DEAE-Sephacel	14
	5.2.3 Eletroforese	14
5.3	Digestão enzimática	15
5.4	Teste de agregação	15
5.5	Morfologia	16
5.6	Análise quantitativa	16
VI.	Resultados	17
VII.	Discussão	26
VIII.	Conclusões	29
IX.	Referências bibliográficas	30

I. RESUMO

A matriz extracelular de cartilagem é constituída por moléculas de colágeno, proteoglicanos e proteínas não colagênicas. Estes componentes normalmente interagem fortemente entre si sendo dessa forma só extraídos em presença de agentes caotrópicos como o cloreto de guanidina 4M. A extração utilizando estes agentes geralmente é precedida de homogeneização em solução de PBS (NaCl 0,15M, 5mM de tampão fosfato de sódio pH 7,4), seguida de uma centrifugação onde o sobrenadante é descartado, e a extração é continuada com o precipitado. Neste trabalho foram analisados os componentes presentes no extrato em PBS da cartilagem xifóide de frango, e comparado com o extrato obtido com cloreto de guanidina. Também foram avaliadas a estabilidade dos componentes da matriz diante da presença de PBS e cloreto de guanidina. Foram identificadas as proteínas com M_r de 30, 40, 52, 58 e 110 kDa no extrato em PBS. Pequenos proteoglicanos foram detectados nos extratos obtidos a partir do tratamento em guanidina mas não em PBS, o que sugere a existência de interações que não foram rompidas com soluções de baixa força iônica. Análise dos efeitos de PBS e guanidina em cortes de cartilagem posteriormente corados com azul de toluidina e ponceau S, mostraram que embora o PBS extraia alguns componentes da matriz, não tem efeito sobre a organização do tecido, como ocorre quando o tratamento é feito com cloreto de guanidina. Os resultados encontrados sugerem que parte das proteínas não colagênicas da matriz não estão envolvidas em processos interativos.

II. ABSTRACT

The extracelular matrix of cartilages is composed of colagen, proteoglycans and non colagenous proteins. These components may interact strongly amongst themself, so they only can be extracted using chaotropic agents as guanidinium chloride 4M. Normally the extraction in this treatment is preceded by a homogeneization in PBS solution (0.15M NaCl, 5mM phosphate buffer pH 7.4), followed by a centrifugation to obtain a preciptate which is used for extraction in guanidinium.chloride. In this work the components of the chicken xyphoide cartilage present in the PBS extract were analyzed and compared with the extract obtained with guanidinium chloride. The stability of matrix components was also analyzed. In the PBS extract were identified the proteins with 30, 40, 52, 58 and 110 kDa. Small proteoglycans were detected in the guanidinium but not in PBS extracts, sugesting that they are strongly bound to other components of the matrix. The analysis of the effects of PBS and guanidinium in cartilage sections afterward stained with toluidine blue and ponceau S, showed that although PBS doesnot remove substantial amount of glycosaminoglycans, it causes structural changes in the organization of the extracelular matrix. However the effect is much smaller than the guanidinium. Our results indicate that part of the non collagenous protein are not entangled in interactive processes.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

III - INTRODUÇÃO

A matriz extracelular (MEC), é uma estrutura presente no meio extracelular dos tecidos em geral, constituída por um conjunto de macromoléculas agregadas e organizadas formando um complexo que interage com as células através de receptores, conferindo características mecanofisiológicas aos tecidos (Vidal 1987). A MEC, é basicamente formada de proteoglicanos (PGs), colágenos e proteínas não colagênicas. Estes componentes são metabolizados pelas células e se encontram margeando as superfícies celulares promovendo funções de interações do meio com as células. A MEC, pode ter função de proteção, sustentação, adesão e de barreira filtrante nas diversas partes do organismo. Dependendo do tipo de estrutura, a MEC, caracteriza a função e diferenciação dos tecidos. Ela também influencia na diferenciação, migração, proliferação e forma das células que mantém contato. As propriedades dos componentes da MEC são essenciais para o funcionamento normal dos tecidos conjuntivos, tais como a cartilagem, derme, tendões, ossos, discos intervertebrais, dentes e lâmina basal. Os componentes da MEC, interagem com as células através de proteínas tais como a fibronectina e por via de receptores de superfície celular. As macromoléculas que constituem a matriz são secretadas localmente por todas as células, com exceção das células sanguíneas. A exata composição da MEC depende do tipo celular, do grau de diferenciação e estado metabólico.

O tecido cartilaginoso, um tipo de tecido conjuntivo, com diferentes funções e estruturas, pode ser de origem neurodermal como a traquéia, laringe e cartilagem nasal, ou de origem mesenquimal sob o ponto de vista morfológico (Heinegård & Paulsson 1987). As cartilagens são encontradas em locais específicos do corpo e formam estruturas que tem características próprias. Nos fetos, a maioria dos ossos longos tem origem a partir de modelos cartilaginosos. Tres diferentes tipos de cartilagens são distinguidas: cartilagem hialina, fibrosa e elástica. A cartilagem hialina é distinguida pela aparente homogeneidade amorfa da matriz. O nome hialino de origem grega "hyalos" é devido ao aspecto vítreo deste tecido. Esta cartilagem é a precursora dos ossos longos que por um processo de ossificação endocondral, desenvolve e progride num determinado espaço de tempo. Esta

cartilagem serve como um sítio de crescimento epifisário. Em ossos adultos, a cartilagem hialina, está presente em superfícies articulares, traquéia, brônquios, nariz e extremidades das costelas. A cartilagem elástica é distinguida pela presença de elastina na matriz de cartilagem. A organização deste tecido acrescenta à mesma, propriedades elásticas em adição a outras características como resistência mecânica e flexibilidade. É encontrada no pavilhão auditivo, na parede do canal auditivo externo, tubo auditivo, epiglote e laringe. Em algumas estruturas são encontrados tecidos com características intermediárias tanto estruturais como funcionais, entre um tecido denso fibroso e a cartilagem hialina. Esse tecido é conhecido como fibrocartilagem. (Benjamin & Evans 1990). É encontrada nos discos articulares da junção esternoclavicular, articulações têmporo-mandibulares, meniscos das articulações dos joelhos e em estruturas sesamóides em que tendões contornam uma determinada articulação ou ainda na entese (Benjamim & Ralphs 1998). Usualmente, a presença de fibrocartilagem indica resistência requerida pelo tecido fibroso quando submetido a um esforço ou a um estado de compressão. Outra estrutura presente nas cartilagens é o pericôndrio, que consiste de um tecido conjuntivo denso cujas células não se distinguem dos fibroblastos. Em muitos aspectos, o pericôndrio é semelhante a uma cápsula que circunda as glândulas de muitos órgãos. Este tecido, é mais que uma simples cobertura capsular, pois serve como fonte para novas células cartilaginosas quando o tecido está em crescimento. O pericôndrio parece ser dividido em duas camadas: uma mais externa composta por tecido conjuntivo denso, consistindo principalmente de fibras de colágenos entre as quais, há poucos fibroblastos aplainados ou fibrócitos. Outra camada mais profunda, formada por grandes células condrogênicas, capazes de proliferarem, sendo responsáveis pelo crescimento aposicional, contribuindo para o crescimento superficial da cartilagem (Ross et al 1999).

Os condrócitos são as células que produzem e mantém a MEC da cartilagem, esta última apresenta uma estrutura heterogênea (Bloom & Fawcett 1975, Stockwell 1979, Szirmai 1969). Os grupos isógenos dos condrócitos aparecem circundados por uma matriz que contem abundante substância metacromática. Essa porção é denominada de matriz pericelular (Meachim & Stockwell 1979). Na matriz de cartilagem hialina foi descrito uma unidade estrutural chamada condron, constituído de condrócitos cercados por um micro

ambiente pericelular (Poole et al 1988). A cartilagem hialina está presente em diferentes estruturas anatômicas. A organização morfológica mais estudada do tecido cartilaginoso está presente na superfície articular. A cartilagem articular pode ser dividida em quatro camadas facilmente identificadas quando coradas com azul de toluidina: camada superficial contendo fibras de colágenos paralelas entre si, condrócitos achatados, e matriz intercelular com pouca basofilia; camada média com uma estrutura semelhante a uma cesta de basquete contendo um ou mais condrócitos em lacunas, separados por uma matriz que apresenta forte basofilia (Szirmai 1969); a camada mais profunda, com condrócitos enfileirados em forma de paliçadas, é a zona de proliferação e camada de calcificação da cartilagem onde podem ser visto condrócitos em processo de degeneração (Bloom & Fawcett 1975, Stockwell 1979, Szirmai 1969).

Dentre os vários componentes encontrados na matriz de cartilagem, os colágenos são os componentes mais abundantes. Pelo menos, 19 tipos de colágenos geneticamente distintos são reconhecidos e caracterizados em graus variados (Smith & Wood 1996). Todos os colágenos são compostos de três cadeias α contendo cada uma aproximadamente 1000 aminoácidos com repetições de uma seqüência peptídica Gly-X-Y necessários para a formação da tripla hélice. Os resíduos X e Y são em muitos casos os aminoácidos prolina e hidroxiprolina respectivamente. Este último é essencial para a formação de pontes de hidrogênio e estabilização da estrutura helicoidal. Além disso, pontes intermoleculares formadas por resíduos de lisina e hidroxilisina ocorrem em graus variados, dependendo da espécie, sítio e idade, podendo estar envolvidas na regulação dos diâmetros das fibrilas. A síntese das cadeias α de colágeno, segue o mesmo caminho geral de outras proteínas secretadas. Entretanto, as cadeias α são extensivamente modificadas previamente por hidroxilação de resíduos de prolina e lisina, e em alguns casos até recebendo a adição de cadeias complexas de carboidratos ou glicosaminoglicanos. São secretadas para o meio extracelular como moléculas de pró-colágenos, em seguida as extensões pro-peptídicas carboxi e amino terminais, são clivadas por uma peptidase. Os tipos de colágenos I, II, III, V e XI podem se associar formando fibrilas de 100 a 300 nm de diâmetro. O colágeno tipo IV é encontrado nas membranas basais cujas moléculas se associam formando uma verdadeira malha de colágeno junto com laminina, nidogênio e proteoglicano de tipo

heparan sulfato. Outros colágenos apresentam interrupção da tripla hélice e estão sempre associados aos colágenos fibrilares. (FACIT). Os exemplos dessa classe são os colágenos IX, XII e XIV, encontrados em cartilagens, humor vítreo, discos intervertebrais, tendões e derme. O colágeno tipo XII tem triplas hélices curtas com regiões separadas por domínios não helicoidais, sendo encontrado no endotélio, epiderme, placenta, ossos, e músculos estriados. Outros tipos: VI, VII, VIII e X tem uma tripla hélice simples, curta e pequena com domínios não helicoidal e globular e não estão associados em simples estruturas fibrilares. O tipo de colágeno VI, é encontrado no útero, córnea, derme e cartilagens, o tipo VII em derme, intestino, membrana amniótica, e o tipo VIII na membrana de Descemet's (Smith & Wood 1996). Os colágenos encontrados na cartilagem incluem os tipos I, II, V, VI, IX e X (van der Rest & Garrone 1991, Thomas et al. 1994). O colágeno predominante na cartilagem é o tipo II, e forma a estrutura fibrilar básica da matriz extracelular neste tecido, conferindo resistência à presença de forças de tensão (Palotie et al. 1989, Kokko et al. 1990). O colágeno tipo II, um homotrímero contendo três cadeias α, é polimerizado extracelularmente para formar fibrilas de pequenos diâmetros entre 10 e 25 nm. O tipo IX contribui somente com 1% do total do colágeno em cartilagens articulares adultas. É constituído de três cadeias distintas α1 (IX), α2 (IX) e α3 (IX) e pertence ao grupo de colágeno que tem tripla hélice interrompida e associam-se a colágenos fibrilares, como por ex: o colágeno tipo II ao qual está ligado por ligação covalente (van der Rest & Mayne 1988). Este colágeno parece ter importância na estabilização e organização tridimensional da rede de colágeno na cartilagem. A redução da função do colágeno tipo IX contribui potencialmente na degeneração da cartilagem articular (Fassler et al 1994).O colágeno tipo XI presente na cartilagem do disco intervertebral possui três cadeias α1 (XI), α2 (XI) e α3 (XI) e também esta associado com as fibrilas de colágeno tipo II.

Outros componentes abundantes no tecido cartilaginoso, são os proteoglicanos. São moléculas complexas compostas de um núcleo protéico ao qual uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos estão ligadas covalentemente. Nas cartilagens, o agrecam é o maior proteoglicano, e tem sido extensivamente estudado devido sua importância nas cartilagens articulares (Poole 1986, Heinegard & Ordberg 1989, Hardingham & Fosang 1992). O agrecam e versicam, proteoglicanos produzidos por fibroblastos, contribuem com cerca de

50 a 85% dos proteoglicanos em relação aos tipos não agregantes, que contribuem com 10 a 40%. As moléculas de agrecam quando interagem com o ácido hialurônico podem formar complexos de macromoléculas de 300-400 MDa e assim oferecer uma maior contribuição para as propriedades mecânicas e biomecânicas da cartilagem (Maroudas 1968, Mow et al. 1980, 1984 Lai et al. 1991). O agrecam tem um total de massa de 1-4 MDa, e consiste de um extenso núcleo protéico com 220-250 kDa ao qual estão covalentemente ligadas cadeias de queratam sulfato e de condroitim sulfato (Heinegard & Oldberg 1989, Doege et al. 1991, Hardingham & Fosang 1992, Valhmu et al. 1995). Os proteoglicanos formam na cartilagem junto às fibrilas de colágeno um compléxo macromolecular, dotando o tecido de habilidade de voltar à situação original após ser submetido a uma força deformante. Além dos proteoglicanos agregantes, existem os de alto peso não agregantes, isto é, não interagem com ácido hialurônico. Também são encontrados os pequenos PG como o biglicam (Heinegârd et al. 1985, Sampaio et al. 1988, Fischer et al. 1989), decorim (Danielson et al. 1993, Vertter et al. 1993), e o fibromodulim que contribuem com menos de 10% do total de proteoglicanos na cartilagem adulta (Oldberg et al. 1989). O biglicam tem um peso molecular de aproximadamente 100 kDa, com um núcleo protéico de 40 kDa e duas cadeias de glicosaminoglicanos. Está presente na forma de dermatam sulfato ou de condroitim sulfato dependendo do tecido. Estrutura semelhante é encontrada para o pequeno proteoglicano decorim, que também possui um núcleo protéico de 40 kDa e apenas uma cadeia de glicosaminoglicano que também pode ser condroitim sulfato ou dermatam sulfato (Iozzo 1997). O proteoglicano fibromodulim, foi isolado originalmente a partir do tecido cartilaginoso, mas também foi encontrado em tendões e aorta (Heinegârd et al. 1986). É constituído por uma cadeia polipeptídica de 375 aminoácidos, apresentando homologia com os dois pequenos proteoglicanos decorim e biglican (Oldberg et al. 1989). Ele tem papel na modulação das fibrilas de colágenos que é relevante para as propriedades mecânicas e fisiológicas do tecido (Hukins & Aspden 1985). Uma das características desses pequenos proteoglicanos é que seus núcleos protéicos são ricos em leucina.(Iozzo 1997).

Os pequenos proteoglicanos decorim e fibromodulim são conhecidos pela sua capacidade de regular a fibrilogênese de colágenos tipo I e II *in vitro* (Hedbon & Herinegârd 1989). Estes proteoglicanos são produzidos por muitos tipos celulares incluindo

condrócitos e fibroblastos. O decorim interage com fibrilas de colágenos na cartilagem, derme e ossos e é localizado periodicamente em posições determinadas ao longo de fibrilas de colágenos controlando o crescimento lateral destas fibrilas (Scott 1988, Fleischmajer et al 1991). O arranjo molecular junto às fibrilas de colágenos é rapidamente estabilizado nos tecidos pela formação de ligações cruzadas. Estas ligações conferem propriedades físicas e mecânicas para as fibras e as provê de resistência às forças de tensão que é um papel fundamental na estrutura das fibrilas de colágenos e tecidos conjuntivos (Eyre 1984, Yamauchi & Mecanic 1988). Moléculas de colágenos e PG podem interagir entre si através de ligações eletrostáticas especialmente considerando a natureza catiônica e aniônica daqueles componentes. Interações eletrostáticas entre glicosaminoglicanos e colágenos tem sido estudada com técnica de dispersão de luz, mostrando significantes interações com condroitim sulfato, dermatam, heparam e heparina mas não para keratam sulfato e ácido hialurônico (Obrink 1973). A força das interações parece relacionada com o comprimento da cadeia e densidade de carga. Interações de proteoglicanos com colágenos, foram observados através de microscopia eletrônica (Smith 1970, Shepard & Micthell 1977, Poole et al. 1982). Também é conhecido que moléculas de agrecam podem acelerar a formação de fibrilas enquanto que agregados de agrecam tem pouca influência na formação destas fibrilas (Ratcliff & Mow 1996). Assim, é possível que diferentes proteoglicanos na matriz afetem diferentemente a formação destas fibrilas, podendo controlar biologicamente a arquitetura do colágeno em todo o tecido. Por exemplo o pequeno proteoglicano decorim, é capaz de se ligar ao colágeno tendo papel importante na regulação da formação de fibrilas de colágeno, (Vogel et al. 1984, Brown & Vogel 1989). Experimentos "*in vitro*" mostraram que decorim reduz a velocidade de crescimento da fibrila de colágeno, ao mesmo tempo que estimula a produção de fibrilas com maior diâmetro (Kuc & Scott 1997) Além dos proteoglicanos e colágenos, as proteínas não colagênicas também tem sido isoladas e caracterizadas. A fibronectina é encontrada em maior quantidade, sendo muito importante em processos biológicos como migrações celulares, desenvolvimento embrionário, cicatrização de ferimentos, coagulação sanguínea, indução de tumores e metástases (Hynes 1990). Outras proteínas não colagênicas tem sido encontradas principalmente em cartilagem como a de 58 kDa, uma proteína básica encontrada em cartilagem articular de

bovinos, traquéia, cartilagem nasal e esterno (Heinegård et al. 1986). A proteína de matriz de cartilagem (CMP) de peso molecular de 148 kDa foi isolada de cartilagem de traquéia junto com a extração dos grandes proteoglicanos, consiste de três subunidades de Mr de 54 kDa, ligados via pontes dissulfeto. Esta proteína é encontrada apenas em cartilagem, embora, não em todas. É muito abundante na traquéia. Um outro componente, a proteína oligomérica de matriz de cartilagem (COMP) de alto peso molecular tem sido isolada de cartilagem articular. Apresenta Mr de aproximadamente 500 kDa e é composta de cinco subunidades contendo galactosamina que não está ligada à proteína por via O-glicosídica (Spitz-Fife 1985). É possível que contenha condroitim sulfato. Outra proteína, com Mr ao redor de 36 kDa é encontrada em cartilagem, e tecido ósseo. Ela tem uma composição semelhante a de outras proteínas da matriz ricas em ácido aspártico, asparagina e leucina. Estes aminoácidos representam 25% do total desta proteína (Sommarin et al. 1989). Experimentos mostraram que a proteína de 36 kDa se liga à superfície de condrócitos isolados (Somarin et al. 1989). Outra molécula descrita na cartilagem,é a ancorina. Ela se liga especialmente ao colágeno tipo II (Pfaffe et al. 1988). É constituída de 329 aminoácidos e tem Mr de 34 kDa e também foi encontrada na superfície dos condrócitos (Fernandez et al. 1988). A condrocalcim, outra proteína presente em todos os tipos de cartilagem é muito proeminente na região de mineralização deste tecido. Foi primeiramente isolada de cartilagem epifisária ligando cristais de hidroxiapatita, e tem papel no processo de mineralização da cartilagem (Hinek et al 1987). Por último, uma proteína de baixo peso molecular Ch 21 kDa, rica em ácido aspártico, asparagina, ácido glutâmico, glutamina e leucina foi isolada de condrócitos de cartilagem de frango (Cancedda et al. 1988). Essa molécula parece ser sintetizada por condrócitos hipertróficos e estaria associada ao colágeno tipo X, a qual tem sido identificada como um marcador para cartilagens em processos de calcificação (Linsenmayer 1991).

Outro grupo de proteínas importantes, são as integrinas. Estas não fazem parte da MEC mas funcionam como receptores para componentes da mesma agindo como moléculas mecanotransdutoras. As integrinas estão relacionadas na transdução de sinais dentro dos condrócitos, transmitindo sinais de alterações extracelulares para organelas intracelulares (Ingber 1991). Essa interação ocorre via microfilamentos associados às

proteínas (vinculina, talina, gelosim), as quais estão fisicamente ligadas à MEC pelas integrinas (Ingber 1991). Assim componentes dos microfilamentos como actina, poderão transmitir informações para o núcleo e induzir modificações na expressão gênica.

A extração dos constituintes de matriz de cartilagem é dificultada devido à relativa insolubilidade de seus componentes. Para uma extração mais eficiente é recomendável um forte agente caotrópico (Sjadera & Hascal 1969). Assim, a extração com cloreto de guanidina GuHCl tem demonstrada ser muito eficiente para muitos componentes da matriz (Arcanjo et al 1994). A concentração em que foi observado o melhor rendimento foi de 4 M. Nestas condições são rompidas as ligações intermoleculares não covalentes. Em concentrações inferiores, o efeito dissociante do GuHCl é menos pronunciado e a extração não é eficiente. Em concentrações mais altas do que 4M a extração e o rendimento podem também ser baixos. Trabalhando com pequenos fragmentos de tecido, o tempo de extração pode ser limitado de 12 a 24 horas para a maioria dos tecidos. Extrações também podem ser obtidas com $CaCl_2$ 2M ou $MgCl_2$ 3M (Sajdera & Hascall 1969), e mesmo em outras concentrações de $MgCl_2$ (Arcanjo et al 1994). Estas soluções, contudo, tem sido pouco usadas especialmente porque podem favorecer a ação de metaloproteases. A solução de uréia, e o detergente dodecil sulfato de sódio mostram ser pouco eficientes para extração de proteoglicanos de tecidos. Normalmente, as condições usadas para as extrações, utilizam procedimentos para minimizar a atividade das proteases. O uso de um agente caotrópico e temperaturas baixas entre 0 e 4^0C são recomendáveis. Em alguns casos é necessário, usar temperaturas mais baixas como -18^0C, no caso de extração de componentes da MEC de osso em pó (Frazén & Heinegård 1984). No entanto para esta temperatura o tempo de extração deve ser longo, e isto é adverso para a eficiência da extração. Embora agentes caotrópicos como GuHCl sejam recomendados para extração de componentes da MEC, Paulsson & Heinegard (1979) extraíram 50% dos proteoglicanos de cartilagem traqueal, empregando NaCl 0,15M com homogeneização em alta velocidade. Extração eficiente de componentes de condrossarcoma de ratos tem sido obtida agitando o material em GuHCl 5M, contendo inibidores de proteases. Tais extratos contém agregados de alto peso molecular, que não tem sido dissociado (Faltz et al. 1979). A tentativa de isolar os proteoglicanos remanescentes em resíduos de extrações tem incluído mercaptoetanol ou

ditotreritol, 2% (v/w) ou 10 mM respectivamente em solução de GuHCl. 4M. Embora, os proteoglicanos não sejam ligados a outros componentes da matriz através de ligações dissulfeto, sua extração pode ser facilitada devido ao rompimento de pontes S-S presentes em outros componentes da MEC (Noro et al. 1983), ou até mesmo, dentro das próprias moléculas de PG, como ocorrem nos pequenos PG, e no colágeno tipo IX (Vaughan et al. 1985). A maioria dos processos extrativos é precedida de homogeneização em PBS em que normalmente se despreza o sobrenadante após a centrifugação e a extração é continuada com o precipitado.

IV - OBJETIVOS

Geral:

Com o intuito de conhecer quais os componentes que interagem menos intensamente na matriz, este trabalho tem por objetivo identificar estes componentes, utilizando no processo extrativo sais não caotrópicos, mas sim solução salina fisiológica tamponada, e comparar com o que é extraído com solução caotrópica como o cloreto de guanidina 4M.

Específicos:

1- Extrair os componentes de MEC de cartilagem utilizando um sal não caotrópico de baixa força iônica.

2-Extrair os componentes de MEC de cartilagem utilizando um agente caotrópico de alta fôrça iônica.

3-Analisar e comparar os dois extratos com PBS e GuHCl respectivamente.

4-Analisar os efeitos da solução de PBS e GuHCl em cortes de cartilagem xifóide de frango.

V. MATERIAL E MÉTODOS

5. 1. Obtenção e Extração do material de cartilagem

A cartilagem xifóide obtida de frango com 60 dias de idade, foi cortada em pequenos pedaços após ter sido retirado o pericôndrio. Foi desprezada a porção central por conter pequenos vasos. Quantidades de 1,5 g foram homogeneizadas em 12 volumes de NaCl 0,15M, tampão fosfato de sódio 5mM pH 7,4 (PBS). A homogeneização com intensidade 4 foi realizada com um Politron modelo PT 1200. Foram realizadas três homogeneizações de 20 seg com 15 seg de descanso entre cada homogeneização. Após centrifugação a 10.000 r p m, por 25 min. em centrífuga Beckman J2-21 (Rotor J A-20), o sobrenadante contendo extrato em PBS foi armazenado em temperatura de $-20^{\circ}C$ e o precipitado foi tratado com 15 volumes de cloreto de guanidina (GuHCl) 4M em tampão acetato 0,05 M pH 5,8 contendo EDTA 50 mM e PMSF 1mM. A extração foi durante 24h em temperatura de $4^{0}C$ e agitação constante. Após este tempo, o material foi centrifugado a 18.000 r p m durante 20 min, $4^{0}C$, em centrífuga Beckman J2-21 (Rotor JA-20). O material sobrenadante contendo o material extraído em GuHCl, foi utilizado para análise bioquímica (Sajdera & Hascall 1969). Todos os reagentes empregados neste trabalho foram de grau PA.

5. 2. Fracionamento e eletroforese

5. 2. 1. Cromatografia em Sephadex G-50

Para substituir o PBS e GuHCl por uréia e assim garantir um ambiente dissociante durante o fracionamento em cromatografia de troca iônica, os extratos em PBS e em GuHCl 4M, foram aplicados em uma coluna de filtração Sephadex G-50 15x1cm. A coluna foi previamente equilibrada com 45 ml de uréia 7M em tampão tris-acetato 0,05M pH 8 com um fluxo de 5 a 6 gotas por minuto. Em seguida, foram aplicados 2,6 ml de amostra. Foi novamente colocado uréia tamponada, e coletadas as frações de 3 ml em 7

tubos de ensaio. A eluição de proteínas foi monitorada por absorbância em 280 nm. O material eluído no 1° pico foi reunido em um único tubo para ser fracionado em DEAE-Sephacel

5. 2 .2 Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel

A coluna de DEAE-Sephacel (3 x 1,5 cm) foi equilibrada inicialmente em 20 ml de tampão Tris acetato 0,5M pH 8.0, em seguida com 20 ml de uréia 7M, em tampão Tris acetato 0,05 M pH 8.0. A fração protéica eluída da coluna de Sephadex G-50 foi integralmente aplicada na coluna DEAE-Sephacel. O material não ligado ao DEAE foi eluído com 20 ml de uréia 7M tampão Tris acetato 0,05M pH 8,0. Em seguida, foi aplicado o gradiente de NaCl de 0,1 - 1,0 M no tampão acima. Após o término do gradiente foram adicionados 12ml de NaCl 1,5 M. para remoção de algum componente mais fortemente ligado à resina. Foram coletadas frações com volume de aproximadamente 2,5 ml cada. A eluição de proteínas foi monitorada por absorbância em 280 nm em Espectrofotômetro 8452 A Diode Array da Hewlette Packard.

5. 2. 3.Eletroforese

As amostras obtidas após cromatografia de troca iônica foram analisadas em gradiente de 4 a 16% de poliacrilamida em presença de SDS-PAGE Zingales (1984), usando o sistema de tampão de acordo com Laemmli (1970).

As amostras de 200 e 300 µl das frações de cromatografia dos diferentes extratos foram precipitadas em presença de 0,03 M tampão acetato pH 7,4 e nove volumes de etanol, durante 24 horas, a 4°C. As centrifugações foram a 8000 r p m realizadas em microcentrífuga Fischer Scientific Model 235 V. O precipitado obtido foi secado a 37°C e ressuspendido em tampão de amostra contendo Tris HCl 62,5 mM, SDS 2%, glicerol 1%, EDTA 1 mM em pH 6,8 e azul de bromofenol 0,01 %. As amostras foram fervidas durante 5 min. O tampão utilizado nas cubas de eletroforese foi Tris 25 mM, glicina 190 mM e SDS 0,1% em pH 6.8. A corrente aplicada foi de 30 mA durante 4 horas. Os padrões de peso moleculares empregados para o cálculo das massas moleculares relativas (Mr) foram: fosforilase b (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase

carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa), α lactoalbumina (14 kDa). Colágeno tipo II extraído de cartilagem xifóide de frango foi utilizado como padrão.

A coloração foi feita através impregnação pela prata (Blum et al. 1987). O gel foi fixado em solução contendo metanol 50%, ácido acético 12% e 75µl de paraformaldeído 37% durante 1 hora. Após a fixação foi lavado em etanol 50% durante 20 min (3x). O gel foi então tratado durante 1 min com tiossulfato de sódio (0,2%). O excesso do sal foi removido por lavagem do gel com água Milli-Q (3x-20seg.) A impregnação por prata foi realizada em solução de nitrato de prata (0,2%) contendo 75µl de paraformaldeído 37%, durante 20 min. Em seguida o gel foi lavado com água Milli-Q 3x-20 seg. A redução da prata foi feita com uma solução de carbonato de sódio (6%), 50 ul de paraformaldeído 37% e tiossulfato de sódio (8mg/l). Após a visualização das bandas a reação foi bloqueada pela imersão do gel durante 2 min em ácido acético 7%. A estocagem foi feita a 4^0C em metanol 50% e glicerol 3%. Todas as etapas foram realizadas em temperatura ambiente com agitação constante e suave. As massas moleculares aparentes foram inferidas por cálculo de Rf e curva de regressão dos marcadores de peso molecular (Klaus & Osborn, 1969).

5. 3. Digestão enzimática

Para liberação de GAGs sulfatados 0,05 g de cartilagem xifóide de frango, foi digerida com 500µl de solução de papaína, 40 mg de papaína por grama de cartilagem em tampão citrato de sódio 0,03 M, pH 5,5 contendo 0,04 M de EDTA e 0,08 M 2-mercaptoetanol (Michelacci et al 1989). O material foi incubado em banho maria à 50°C durante 24 horas. O digesto foi centrifugado e o sobrenadante foi adicionado 1 ml de etanol e deixado por 24 horas a 4°C. Após centrifugação o precipitado obtido foi lavado em etanol 80% (2x) e em acetona (1x) O precipitado final foi ressuspendido em 100 µl de água e guardado para posterior dosagens de glicosaminoglicanos sulfatados

5. 4.Teste de agregação

Extratos de cartilagem xifóide em GuHCl 4M e PBS, foram dialisados contra água durante 3 dias com 6 trocas. Completada a diálise, o material agregado foi coletado e

colocado sobre um lâmina histológica e corada com azul de toluidina 0,025 % em tampão Mc Ilvaine pH 4,0 (Vidal & Mello 1980) e ponceau S 0,1% em ácido acético 3% pH 2,5 (Vidal - informação pessoal).

5. 5. Morfologia

Cortes com 20 μm de espessura foram obtidos em micrótomo de congelação à temperatura de –25°C que foram fixados em formol 4% por 10 min, lavados em água por 2 min e tratados com GuHCl 4M e/ou PBS por de 10 min. Após isso, para a detecção dos PGs alguns cortes foram lavados em água por 2 min e corados com azul de toluidina 0,025% em tampão Mc Ilvaine pH 4.0 (Vidal & Mello 1980) durante 30 min. Para observação das proteínas, cortes foram corados com Ponceau S 0,1% em pH 2,5.Este corante é azóico –aniônico, contendo radicais SO_3 que podem ligar aos radicais -NH_3 de proteínas. Alguns cortes foram tratados com hialuronidase testicular (40 mg de enzima em 20 ml de NaCl 0,15M) (Pearse 1972) por 20 min em câmara úmida, lavados em água e corados com azul de toluidina (20 min) e Ponceau S (30 min).

5. 6. Análise quantitativa

As dosagens de proteínas dos extratos em PBS e GuHCl foram realizadas usando Coomansie brillant blue G 250 (Bradford 1976). Como padrão foram utilizadas diferentes concentrações de solução de albumina bovina (BSA) nas seguintes concentrações: 10; 20; 40; 80 μg/100ul. As leituras foram realizadas em 595 nm. As dosagens de glicosaminoglicanos foram realizadas usando azul de dimetilmetileno com emprego de curva padrão constituída com as seguintes concentrações de condroitim sulfato: 5; 10; 15; 20; 25 μg/100ul.(Farndale et al 1986). As leituras foram efetuadas em 526 nm em espetrofotômetro 8452 A Diode Array da Hewlett Packard.

VI. RESULTADOS

A homogeneização em PBS resultou em uma extração significativa de proteínas, mas com relação aos glicosaminoglicanos sulfatados rendeu menos que 1 mg/g de tecido (Tabela I). As dosagens do extrato em GuHCl resultou em uma quantidade de proteína aproximadamente igual à obtida no extrato em PBS, já com relação aos glicosaminoglicanos sulfatados, foi obtido uma quantidade 8x maior com GuHCl, em relação ao obtido no extrato em PBS (Tabela I). A quantidade de glicosaminoglicanos totais obtidos após tratamento de tecido com papaína foi de 20 mg/g de cartilagem, que corresponde a 2% do peso úmido do tecido.

Tabela I. Quantidades de proteínas e GAGs sulfatados removidos pela ação do PBS e GuHCl 4 M.

	Proteína mg/g tecido	GAGs sulfatados mg/g tecido
PBS	10,42± 0,65	< 1,00
GuHCl	9,38± 0,61	7,95± 0,37

Os componentes extraídos em GuHCl após diálise contra excesso de água formaram pequenos agregados que foram corados e observados a ocorrência de material agregad, tanto pelo Ponceau S como pelo azul de toluidina. No caso do material extraído em PBS praticamente não foi notado o aparecimento de agregados (não mostrado).

A análise dos componentes da MEC extraídos em PBS após a cromatografia em DEAE-Sephacel e eletroforese em SDS-PAGE (figura 1), mostrou significativa presença de componentes catiônicas (1° pico) e aniônicas (2^0 pico) são extraídos com PBS (Fig. 1A). Em SDS-PAGE foram analisadas as frações eluídas, após o gradiente de NaCl, (figura 1 A), foram detectadas proteínas com Mr de 30, 40, 52, 58 e 110 kDa, entre outras menos expressivas (Fig. 1B).

Cromatografia em DEAE-Sephacel do material extraído em GuHCl 4M, mostrou no 1° pico presença de material catiônico e no 2° pico, material aniônico (Fig. 2A). SDS-PAGE (figura 2B) das frações 5 e 12 a 20 do material ligado à resina, mostrou presença de um componente polidisperso (70-100 kDa) que provavelmente corresponde ao pequeno proteoglicano decorim. Um outro material polidisperso pode ser visto discretamente corado, migrando em torno de 60 kDa. Além desses componentes também foram detectados componentes com 30, 50, 52 e 58 kDa.

O tratamento com PBS de cortes da cartilagem e posterior coloração com azul de toluidina pH 4,0 (Fig.3A), mostrou uma coloração menos intensa em relação a cortes não tratados com PBS (Fig. 3B). Em maior aumento, pode ser visto que o aspecto metacromático dos grânulos, provavelmente agregados de PG foi sensivelmente diminuído nos cortes tratados com PBS (Fig. 3C), em relação aos cortes não tratados (Fig. 3D). A análise de cortes de cartilagem tratados e não tratados com GuHCl 4M e corados com azul se toluidina pH 4,0, mostrou que os cortes tratados apresentaram uma basofilia menos intensa (Fig 4 A), em comparação ao corte contrôle, especialmente em torno dos vasos sanguíneos (figura 4B).Uma avaliação da estabilidade físico-química dos proteoglicanos, foi feito atavés de tratamento de cortes de cartilagem com hialuronidase e poterior coloração com azul de toluidina (Fig. 5AB),mostrou com base na basofilia que a enzima não consegue remover completamente os gicosaminoglicanos presentes na matriz dentro do protocolo utilizado (figura 5B), quando comparado com o controle (figura5A) Alguns cortes de cartilagem tratados separadamente com hialuronidase, PBS e GuHCl foram corados com Ponceau S (figura 6).Curiosamente, quando os cortes foram previamente tratados com hialuronidase, a coloração por Ponceau S foi notoriamente mais intensa (Fig. 6B) comparado com cortes não tratados (Fig. 6C). Praticamente não se nota diferença no corte controle e naquele tratado com PBS (Fig. 6C). Já nos cortes tratados com GuHCl, ocorrem uma significativa redução na intensidade de coloração (Fig. 6D) em relação ao corte não tratado.

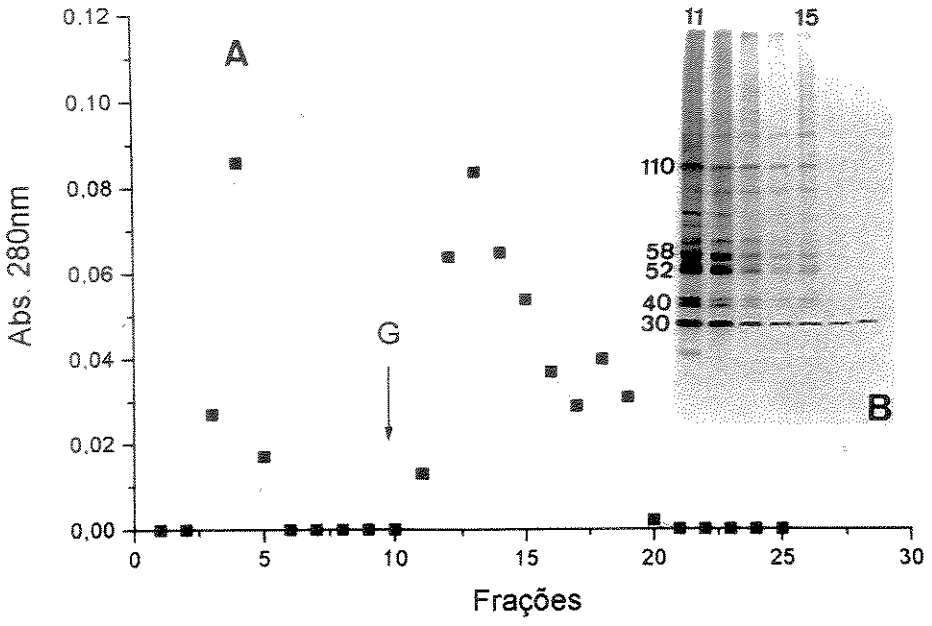


Figura 1. Fracionamento e identificação dos componentes de matriz de cartilagem extraídos em PBS. **A**. Cromatografia em DEAE-Sephacel mostrando presença de componentes catiônicos que não se ligaram ao DEAE (1° pico), e material eluído da resina após gradiente (G) de NaCl (0,1-0,1M). **B**. Eletroforese em gradiente de SDS-poliacrilamida das frações, de 11 a 15 contendo componentes aniônicos. Gel foi corado pelo método da prata.

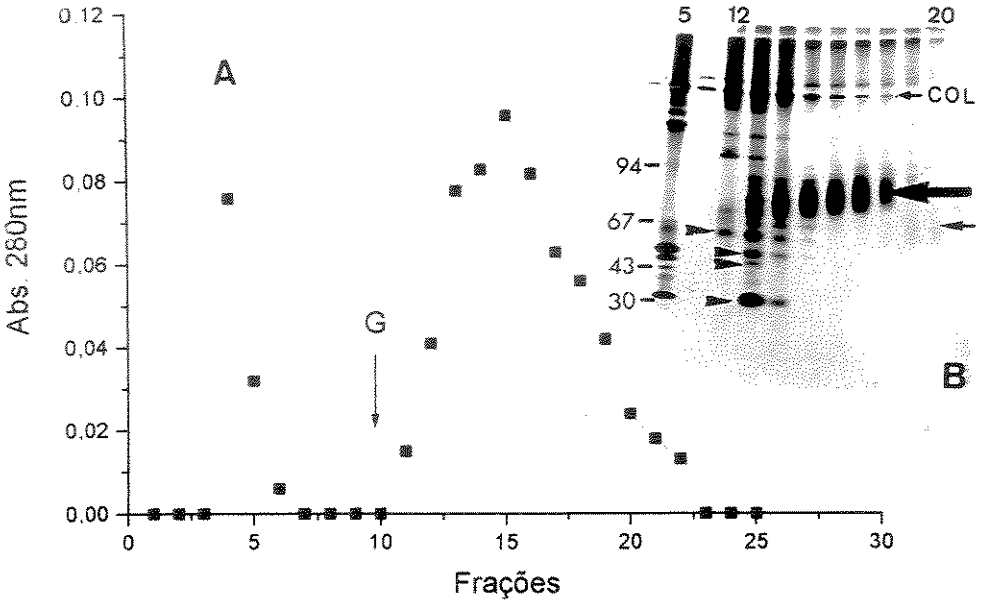
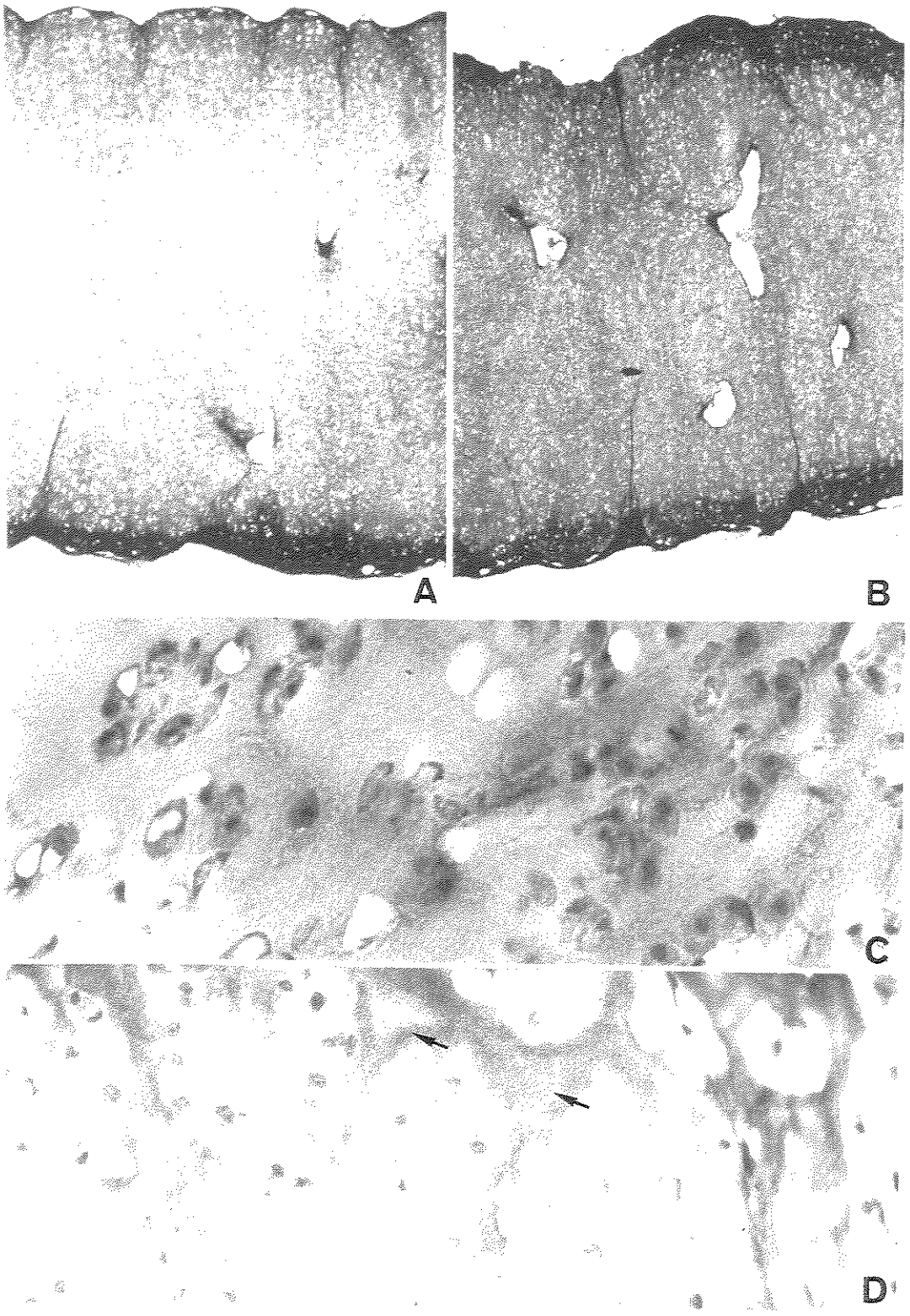


Figura 2. Fracionamento e análise eletroforética dos componentes obtidos após extração com GuHCl 4 M. **A**. Cromatografia em DEAE-Sephacel mostrando pico correpondendo o material catiônico, e um pico com frações eluídas após aplicações de um gradiente de NaCl (0,1-1,0M). **B**. Eletroforese em gel 4-16% de SDS-poliacrilamida. Observar a marcante presença de um componente polidisperso com Mr de 70-90 kDa, (➔) e um outro componente fracamente polidisperso migram em torno de 60 kDa (→). Cabeças de setas compreendem as proteínas com 58, 52, 50 e 30 kDa. Colágeno (col) também pode ser visto.

Figura 3. Corte de cartilagem xifóide tratado (**A, C**) e não tratado (**B, D**) com solução de PBS, e corado com azul de toluidina pH 4.0. Observar que no caso do material tratado com PBS (A), a basofilia é ligeiramente mais fraca em relação ao corte não tratado (B). Em maior aumento pode ser visto a presença mais intensa de grânulos metacromáticos no material que não foi tratado com PBS (D),em relação ao corte que previamente tratado com PBS (C). Aumento final: Fig. **A, B** 26x; Fig. **C, D** - 420x

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE


A
B
C
D

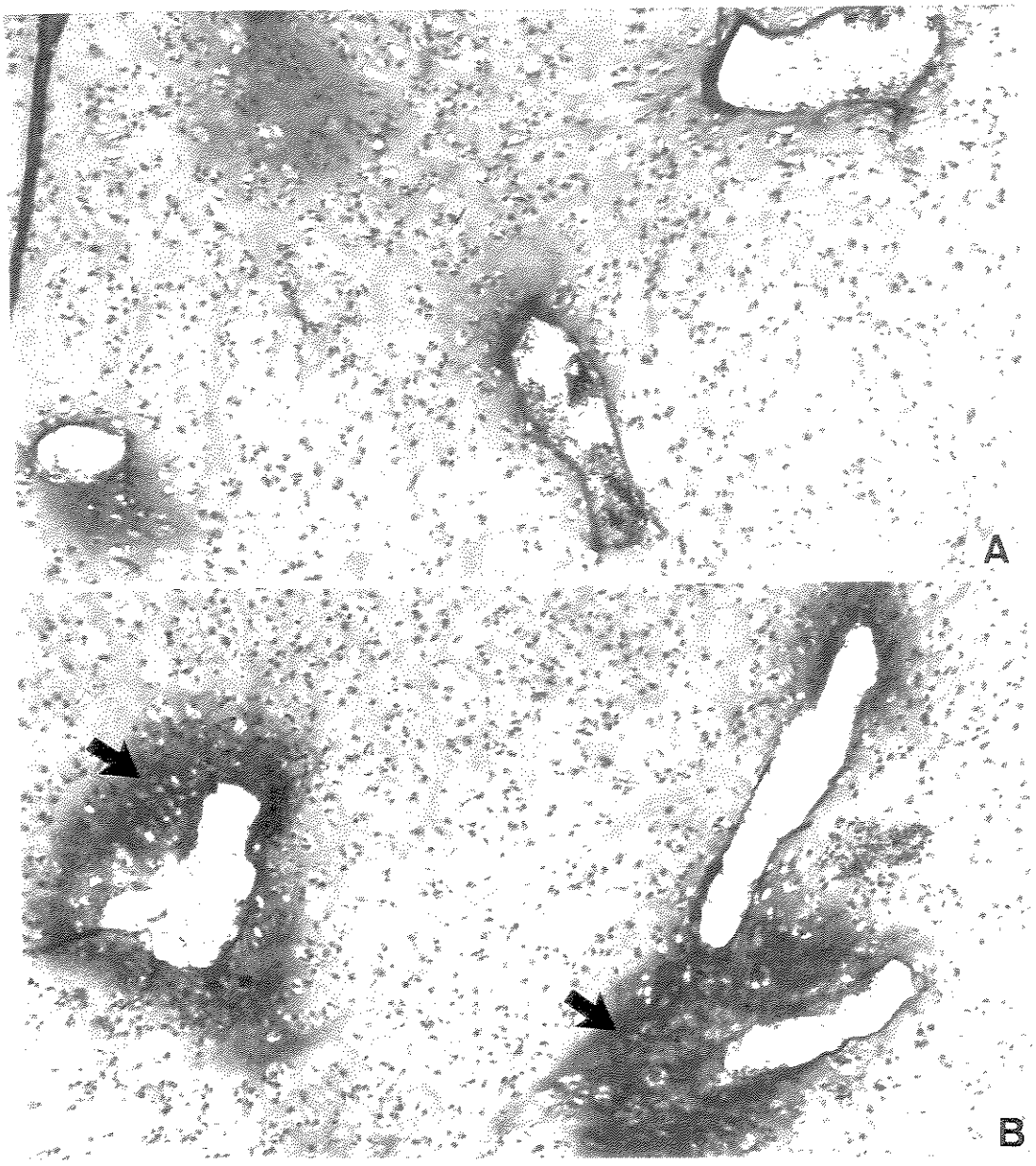


Figura 4. Corte de cartilagem tratada (**A**) e não tratada (**B**) com GuHCl 4M. Uma substancial redução de material metacromático é observado no corte tratado em relação ao controle, especialmente em torno dos vasos sangüíneos (➡). Coloração por azul de toluidina em pH 4,0. Aumento final: 105x.

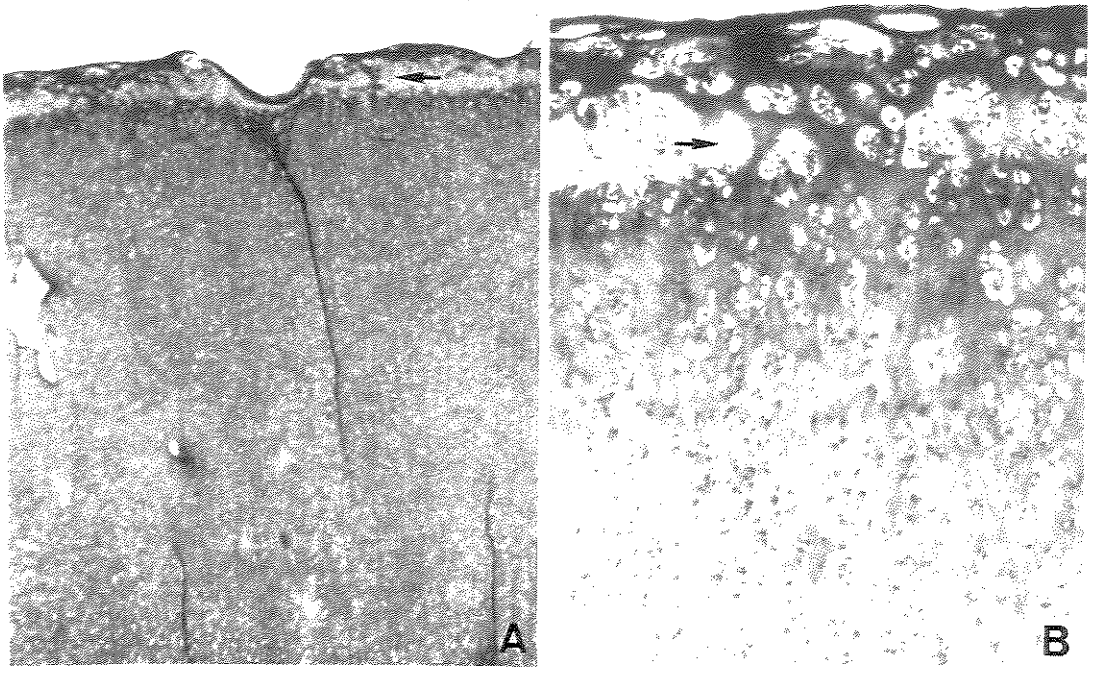


Figura 5. Corte de cartilagem tratados com hialuronidase e corado com azul de toluidina em pH 4,0. Observar que os GAGs localizados na periferia do tecido (→) são preferencialmente mais digeridos. Aumento final: Fig. **A** 26x; Fig. **B** 105x.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

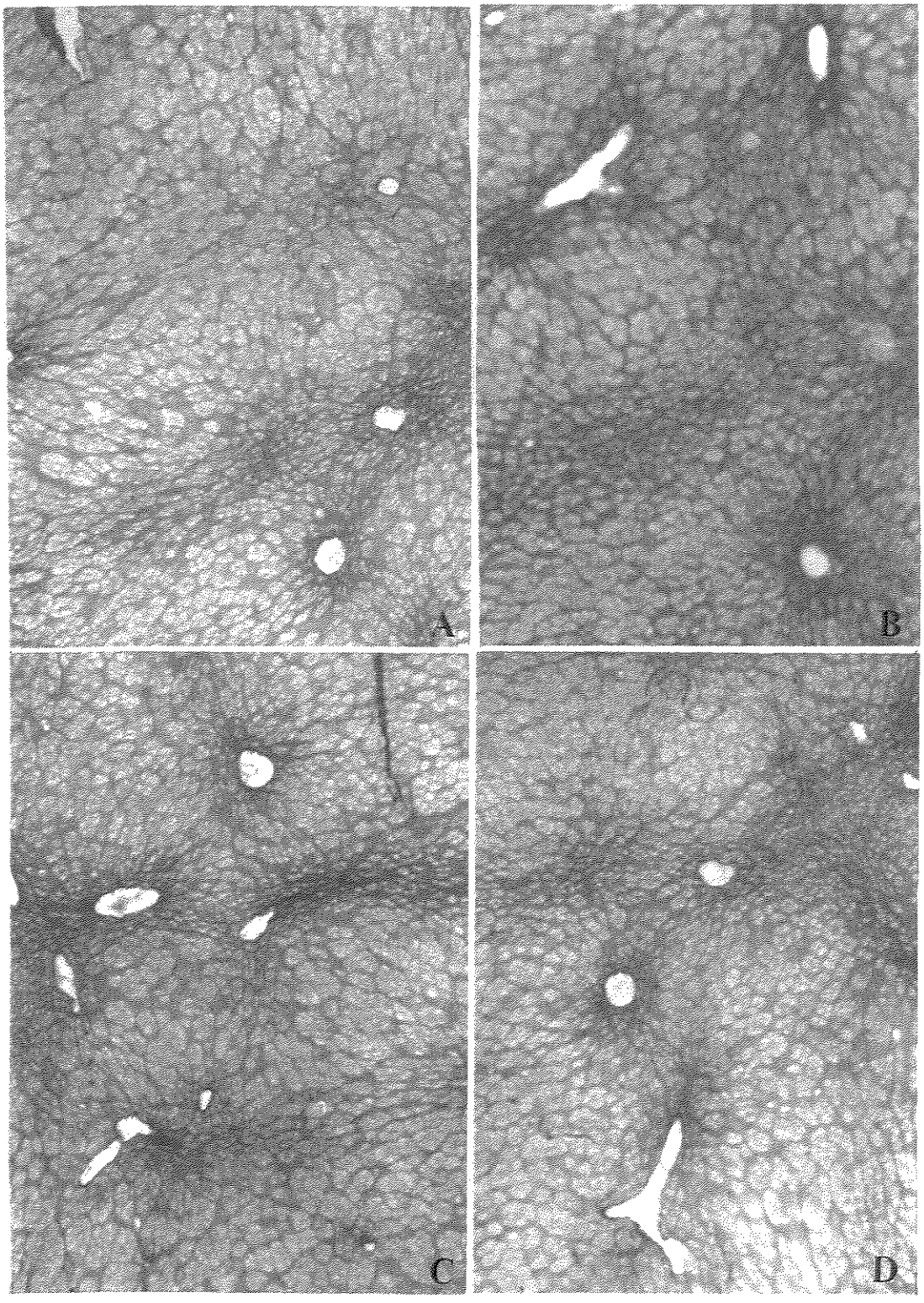


Figura 6. Cortes de cartilagem sem tratamento (**A**) e tratados com hialuronidase (**B**), PBS (**C**) e GuHCl (**D**). Coloração por Ponceau S. Aumento final: 26x.

VII - DISCUSSÃO

A literatura descreve vários métodos com diferentes agentes para extração de componentes de matriz de cartilagem dentre eles destaca-se o uso de: NaCl 0,15M EDTA (Schulman & Meyer 1970), GuHCl 4M precedido por NaCl 0,15M (Damle et al. 1979), $MgCl_2$ 3M (Michelacci & Horton 1989) e GuHCl 4M (Hascall & Sjadera 1969). O método mais amplamente usado é com GuHCl 4M por 24 horas (Bjelle et al.1974). Normalmente é usado a solução salina PBS, durante o processo de homogeneização, e em seguida, o material não solubilizado é recolhido por centrifugação é colocado em solução de GuHCl 4M sob constante agitação por 24 horas. Neste procedimento o material extraído em PBS é normalmente desprezado e só considerado aquele após a extração em GuHCl 4M. Neste trabalho foi analisado a composição do extrato obtido com PBS, uma solução salina de baixa força iônica, e comparado com o extrato obtido com o agente altamente caotrópico como é o caso do GuHCl 4M. Uma quantidade relativamente grande de proteínas não colagênicas, aproximadamente 10 mg/g de cartilagem foram solubilizadas durante a homogeneização em PBS. As proteínas extraídas durante a homogeneização em PBS correspondem às proteínas que interagem fracamente com outros componentes da MEC, mas que podem ter alguma participação em processos reguladores que ocorrem na MEC. A pequena quantidade de glicosaminoglicanos sulfatados (< 1mg/g tecido) encontrado no extrato de PBS está de acordo com o resultado da eletroforese.O SDS-PAGE não mostrou a presença de bandas polidispersas típicas de proteoglicanos, como observado na eletroforese do material tratado com GuHCl, onde se detectou uma banda polidispersa correspondente a um proteoglicano com Mr~70-100 kDa. No entanto é preciso considerar que uma significativa quantidade de proteínas com Mr entre 30 e 110 kDa foi extraída durante a homogeneização do tecido em PBS. Estas proteínas devem ter uma alta mobilidade entre as imbricadas estruturas formadas pelas fibrilas de colágeno e moléculas de grandes e pequenos proteoglicanos. É improvável que aquelas solubilizadas com PBS, tenham algum papel estrutural na cartilagem, mas é bem possível que sejam responsáveis pela manutenção de um ambiente adequado para que ocorram os vários processos interativos já constatados na MEC (Scott 1992). Algumas proteínas encontradas no extrato

BIBLIOTECA CENTRAL

de PBS, como as de 30, 52 e 58 kDa foram também detectadas no extrato com GuHCl. Isto nos leva a supor que parte da população das proteínas da MEC que são solubilizadas em PBS, podem estar interagindo com colágenos, com os proteoglicanos, com algum componente ou receptor da superfície celular, corroborando dessa forma com a idéia de que tenham algum papel regulador no meio extracelular. A ausência de componentes polidispersos de baixo peso molecular e de colágeno no extrato de PBS confirma que estes componentes interagem fortemente entre si. Vários trabalhos já indicaram que os pequenos proteoglicanos, decorim e fibromodulim interagem com colágenos (Hedbom & Heinegård 1989), e tem um papel na regulação da fibrilogênese dos mesmos (Vogel et al. 1984, Brown & Vogel 1989) além de manter espaço entre as fibrilas para a movimentação de componentes solúveis em água (Scott 1992). Os resultados encontrados em cortes de cartilagem tratados com PBS e corados com azul de toluidina pH 4, mostraram redução na metacromasia, significando remoção de componentes aniônicos, detectados nas frações de cromatografia e gel de eletroforese. A presença de grânulos metacromáticos correspondendo a agregados de proteoglicanos foi bastante reduzida no material previamente tratado com PBS, significando que o PBS embora não remova quantidades significativas de PG, ocasiona alterações estruturais na organização dos componentes da MEC. Já com GuHCl, um agente altamente caotrópico, a remoção de componentes aniônicos foi mais intensa, conforme foi constatado pela acentuada diminuição da basofilia em cortes corados com azul de toluidina.

A digestão não uniforme dos GAGs pela ação de hialuronidase, sugere que a estabilidade de componentes da MEC, em especial os PG, depende do envolvimento interativo destas moléculas com outros componentes da MEC, que pareceu ser homogênea nas diferentes áreas da cartilagem xifóide de frango. Sobre a resistência à remoção de proteoglicanos por soluções não caotrópicas, como o PBS, devem ser consideradas as possibilidades de que além da interação entre o núcleo central do pequeno PG e as fibrilas de colágeno, também pode haver interação eletrostática entre as cadeias de glicosaminoglicanos e os grupos positivamente carregados disponíveis nas superfície das moléculas de colágeno especialmente se considerarmos as cadeias de glicosaminoglicanos arranjadas paralelamente ao longo das fibrilas de colágeno (Vidal & Mello 1984). Também

não pode ser descartado a interação lateral entre cadeias de glicosaminoglicanos, tão bem conhecida em estroma da córnea (Scott 1991, 1992), mas que também pode ocorrer em outros tecidos, conferindo assim uma maior estabilidade àquelas moléculas.

De um modo geral nossos resultados mostraram que a MEC é constituída de componentes que interagem fortemente na matriz, e outros que embora em determinados momentos possam se associar e interagir seja com elementos da própria matriz ou com receptores da superfície celular, são em sua maioria removidos por solução não caotrópica e de baixa força iônica

VIII. CONCLUSÕES

1. Homogeneização da cartilagem em solução de baixa força iônica, solubiliza componentes da matriz extracelular.

2. Parte da população de proteínas com 30, 40, 52, 58 e 110 kDa, que são extraídos em presença de agentes caotrópicos pode ser solubilizada em solução de baixa força iônica, o que sugere que a interação com colágenos e proteoglicanos não ocorre de forma constante.

3. Pequenos proteoglicanos não são extraídos com soluçõesde baixa força iônica, mas com agentes caotrópicos, significando que interagem fortemente com outros componentes da matriz extracelular da cartilagem.

4. A remoção de glicosaminoglicanos em cortes de cartilagem por tratamento com hialuronidase testicular, expõe grupos catiônicos presentes em componentes de matriz.

IX REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD 1994. *Biologia molecular da célula.* 3nd ed. Garland Publishing, New York & London. 991 pp.

Arcanjo KDS, Gomes L, Pimentel ER. Effect of magnezium chloride and guanidinium chloride on the extraction of components of extracellular matrix from chicken cartilage.*Mens Inst Oswaldo Cruz 89* : 93-97.

Benjamin M, Evans E J, Pemberton D. J 1990. Histological studies on the triangular fibrocartilage complex of the wrist *J Anat 172*: 59-67.

Benjamin M, Ralphs JR 1998. Fibrocartilage in tendons and ligaments an adaptation to compressive load. *J Anat 193*: 481-494.

Bjelle A, Gardell S, Heinegård D 1974. Proteoglycans of articular cartilage from bovine lower femoral epiphiysis. Extraction and characterization of proteoglycans from two sites in the same joint. *Conn Tiss Res 2*: 111-116.

Bloom W, Fawcett D W 1975. Cartilage. *Methods in Enzimol* 145: 337-362

Bradford MM 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Ann Biochem 72*: 248-54.

Browm DC, Vogel KG 1989. Characteristics of the in vivo interactions of a small proteoglycans (PGII) of bovine tendons with type I collagen. *Matrix 9*: 468-478.

Cancedda FD, Manduca P, Tacchetti FP, Quarto R, Cancceda R. 1988. Developmentally regulated synthesys of low molecular weight protein (Ch21) by differentiating chondrocytes. *J Cell Biol 107:* 2455-2463.

Danielson KG, Fazzio A, Cohen I, Cannizzaro LA, Eichstetter I, Iozzo RV 1993. The human decorin gene: intron-exon organization, discovery of two alternatively spliced exons in the 5´ ultransllated region,and mapping of the gene to chromossome 12q23. *Genomics 15*: 146-160.

Doege KJ, Sasaki M, Kimura T, Yamada Y 1991. Complete coding sequence and deduced primary structure of human cartilage large aggregating proteoglycans, aggrecans *J Biol Chem 266:* 896-902.

Eyre DR 1984. Cross-linking in collage and elastin. *Ann Rev Biochem 53*: 717-748.

Faltz LL, Reddi AH, Hascall GK; Martin D, Pita JC, Hascall VC 1979. Characteristics of proteoglycans extracted from the swarm rat chondrosarcoma with associative solvents. *J Biol Chem 254:* 1375-1380.

Farndale RW, Buttle DJ, Barret AJ 1986. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethyleneblue. *Biochem and Biophys Acta 883*: 173-177.

Fassler R, Schnegelsberg PN, Dausmann J, Sahynia T, Muragaki Y, Mac Carthy MT, Olsen BR, Jaenisch R. 1994. Mice lacking alpha I (IX) collagen develop noninflamatory degenerative joint disease. *Proc Nat Acad of Sci* USA *91*: 5070-5074.

Fernandez MP, Selmin O, Martin GR, Yamada Y, Pfaffe M, Deutzmann R, Mollenhaur J, von der Mark K 1988.The structure of anchorin CII, a collagen binding protein isolated from chondrocyte membrane. *J Biol Chem 104* : 5921-5925.

Fisher LW, Termine JD, Young MF 1989. Deduced protrein sequence of bone small proteoglycan I (Biglycan) shows homology with proteoglycan II (Decorin) and several nonconnective tissue in a variety of species. *J Biol Chem 264*: 4571-4576.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Fleischmajer R, Fischer LW, MacDonald ED, Jacobs L Jr, Perlish JS, Termine JD 1991. Decorin Interacts with fibrilar collagen of embrionic and adult human skin. *J Estr Biol 106:* 82-90.

Frazém A, Heinegård D 1984. Cartilage *Methods in Enzimology 145* : 337-362.

Frazier WA 1987. Thrombospondin: A modular adhesive glycoprotein of platelets and nucleated cells. *J Cell Biol 105*: 625-632.

Hardingham TE, Fosang AJ 1992. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB 6*: 861-870.

Hascal VC, Sjadera SW 1969. Protein Polysaccharide complex from bovine nasal cartilage. *J Biol Chem 244*: 2384-2396.

Hedbom E, Heinegård D 1989. Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrilar collagens. *J Biol Chem 268*: 27307-27312.

Heinegård D Oldberg A 1989. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB 3*: 2042-2050.

Heinegård D, Bjorne-Persson A, Coster L, Frazén A, Gardell S, Malmstrom A, Paulsson M, Sandfalk R, Vogel K. 1985. The core proteins of large and small interstitial proteoglycans from various connective tissues form distinct subgroups. *Biochem J 230*: 181-194.

Heinegård D, Frazén A, Hedbom E, Sommarin Y. 1986. Common structures of the core proteins of interstitial proteoglycans. *Ciba Foundation Symposium 24*: 69-88.

Heinegård D, Larsson T, Sommarin Y, Frazén A, Paulsson M, Hedbom E. 1986. Two novel matrix proteins isolated from articular cartilage show wide Distributions among connective tissues. *J Biol Chem 29*: 13862-13872.

Heinengård D, Paulsson M 1987. Cartilage. *Methods in Enzymo* 45: 337-362.8

Hinek A, Reiner A, Poole AR 1987. The calcification of cartilage matrix in condrocyte culture: studies of the C-propeptide of type II collgen (chondrocalcin). *J Cell Biol 10:* 1435-1441.

Hukins DWL, Aspden RM 1985. Composition and properties of connective tissues. *Elsevier Sci Publis B V* Amsterdan 260:263

Hynes RO 1990. Fibronectins.New York.Springer-Verlage

Ingber D 1991. Integrins mechanochemical transducers. *Curr Opin Cell Biol 3*: 841-848.

Iozzo RV 1997. The family of the small leucine-riche proteoglycans: key regulators of matrix assemblay and cellular growth. *Crit Rev in Biochem and Mol Biol 32* (2): 141-174.

Kokko A, Baldwin L, Moskowistz RW, Prockop DJ 1990. Single base mutation in the type II procolagen gene (COL2A1) as a case of primary osteoartritis associated with a mild chondrodysplasia. *Proc of the Nat Acad of Sci* USA. *87*: 6565-6568.

Kuc IM, Scott PG 1997. Increased diameters of collagen fibrils precipitated *in vitro* in the presence of decorin from various connective tissues. *Conn Tiss Res 36 (4)*: 287-296.

Laemmli VK 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bactriophage Ty. *Nature 227*: 680-685.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO

Lai WM, Hou JS, Mow VC 1991. A trifasic theory for the swelling and deformational behaviors of articular cartilage. *J Biomechan Eng. 113:* 245-258.

Linsenmayer TF 1991. Collagen. *Cell Biology of Extracellular Matrix.* 2nd ed Elizabeth D. Hay Plenum Pres NY. 7-44 pp.

Maroudas A 1968. Physicochemical properties of cartilage in the light of ion-exange theory. *Bioph J 8:* 575-595.

Michelacci YM, Horton DSPQ 1989. Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna Lewini. Comp Biochem Physiol 92b*: 651-658.

Mow VC, Kuei SC, Lai WM, Armstrong GC 1980. Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression: theory and experiment. *J Biomechan Eng 102*: 73-84.

Mow VC, Holmes MH, Lai WM 1984. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage. *J Biomechan Eng. 17* : 377-394

Noro A, Kimata K, Oike Y, Shinomura T, Maeda N, Yano S, Takahashi N, Suzuki S 1983. Isolation and characterization of a third proteoglycan (PG-Lt) from chicken embryo cartilage which contains dissulfide-bonded collagenous polypeptide. *J Biol Chem 258*: 9323-9331

Obrink B 1973. A study of interations between monomeric tropocollagem and glycosaminoglycans. *Eur J Biochem 33*: 387-400..

Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegård D 1989. A collagen binding 59 kD protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-Sl and PG-S2 (decorin). *EMBO J 8*: 2601-2604.

Palotie A, Vaisanen P, Ott J, Ryhanen L, Elima K, Vikkula M, Cheah K, Vuorio E, Peltonen L 1989. Predisposition familial osteoartrosis linked to type II collagen gene. *Lancet I* 924-927.

Paulsson M, Heinegård D 1979. Matrix proteins bound to associatively prepared proteoglycans from bovine cartilage. *Biochem J l83*: 539-545.

Pearse AGE 1972. *Histochesmitry,theoretical and applied.* 3nd ed. 2 vols. London and Endinburgh: Chulchill-Livingstone.

Pfaffe M, Ruggiero F, Hofmann H, Fernandez MP, Selmin O, Yamada Y, Garrone R, van der Mark K 1988. Biosynthesis, secretion and extracellular localization of anchorin CII, a collagen binding protein of the calpactin family. *EMBO J 7:* 2335-2342.

Poole AR 1986. Proteoglycans in health and disease: structures and functions. *Biochem J* 236: 1-14

Poole AR, Pidoux I, Reiner A, Rosemberg L 1982. An immunoelectron microscope study of the organization of proteoglycan monomer, link protein, and collagen in the matrix of articular cartilge. *J Cell Biol 93:* 921-937.

Poole CA, Ayad S, Shofield JR 1988. Chondrons form articular cartilage: I Immunolocalization of type VI collagen in pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons. *J Cell Sci 90:* 635-643.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Ratcliffe A, Mow VC 1996. Articular cartilage. *Extracellular matrix*. Vol 1 ed by Wayne D. Comper 253 pp.

Ross MH, Romrell LJ, Kaye GL 1999. Histology. A Text and atças 3 rd ed William & Wilkins Philadelphia USA. 132 pp.

Sampaio L, Bayliss MT, Hardingham TE, Muir H 1988. Dermatan sulphate proteoglycan from human articular cartilage. *Biochem J 254:* 757-764.

Schulman HJ, Meyer K 1970. Protein-polysaccharide of chicken cartilage and chondrocyte cell cultures. *Biochem J 120 :* 689-697.

Scott JE 1991. Proteoglycan: collagen interactions and corneal structure. *Biochem Soc Trans 19*: 877-881.

Scott JE 1992. Morphometry of cupromeronic blue stained proteoglycan molecules in animal cornea versus that of purified proteoglycans stained in vitro implies that tertiary strutures contribute to corneal ultrastructure. *J Anat 180*: 155-164.

Scott JE 1988. Fibrillar collagen-proteoglycan interactions. *Biochem J 252:* 139-143.

Shepard N, Mitchell N 1977. The use of ruthenium red and p-phenylenediamine to stain cartilage simultaneously for light and electron microscopy. *J Histochem And Cytochem 25*: 1163-1168.

Sjadera SW, Hascall VC 1969. Proteinpolysaccharide complex from bovine nasal cartilage. A comparison of low and high shear extraction procedures. *J Biol Chem 244:* 77-87.

Smith JW 1970. The disposition of protein polysaccharide in the epiphysial plate cartilage of the young rabbit. *J Cell Sci 6*: 843-864.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Smith C.A,Wood EJ 1996. *Cell Biology.* 2nd ed.Published by Chapman & Hall London, 254 pp.

Sommarin Y, Larsson T, Heinegard D 1989. Chondrocyte- Matrix interaction. Attachment protein isolated from cartilage. *Exp Cell Res 184*: 181-192.

Spitz-Fife RS 1985. Identification of link proteins and a 116,000 dalton matrix protein in canine meniscus. *Arch Biochem Biophys 240:* 682-688.

Stockwell RA, Szirmai JA 1979. Cartilage. *Methods in Enzymol 145*: 337-362.

Szirmai JÁ 1969. Cartilage. *Methods in Enzymol* 145: 337-362

Thomas JT, Ayad S, Grant ME 1994 Cartilage collagens: strategies for the study of their organization and expression in the extracellular matrix. *Ann of Rheum Dis 53*: 488-496.

Valhmu WB, Palmer GD, Rivers PA, Ebara S, Cheng JF, Fischer S, Ratcliffe A 1995. Structure of the human aggrecan gene: exon-intron organization and association with the protein domains. *Biochem J 309:* 535-542.

van der Rest M, Garrone R 1991. Collagen family of proteins. *FASEB J 5*: 2814-2822.

van der Rest M, Mayne R 1988. Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross-linked to type II collagen. *J Biol Chem 263*: 1615-1618.

Vaughan L, Winterhalter KL, Brukner P 1985. Proteoglycan Lt from chicken embryo sternum identified as type IX collagens. *J Biol Chem 260*: 4758-4763.

Verter U, Vogel W, Just W, Young MF, Fischer LW 1993. Human decorin gene: intron-exons junctions and chromosomal localization. *Genomics 15:* 161-168

Vidal BC, Mello MLS 1980. *Práticas de biologia celular*.Editora Edgard Blucher Ltda.SP..57 pp.

Vidal BC, Mello MLS 1987. *Biologia Celular* RJ Atheneu 273 pp.

Vidal BC, Mello MLS 1984. Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. *Cell and Mol Biol 30(3):* 195-204.

Vogel KG, Paulsson M, Hinegård D 1984. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrinogenesis by the small proteoglicans of tendon. *Biochem J 223:* 587-597.

Yamauchi M, Mechanic G 1988. *Cross linking of collagens. In collagens biochemistry Nimi.M.* (ed) Boca Raton CRC Press. 157-172 pp.

Zingales B 1984. Analysis of protein sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletroforesis. In: Genes and Antigens so Parasites *Fiocruz* RJ 357-363.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE