

POPULAÇÃO DE PROTEOGLICANOS EM DIFERENTES SÍTIOS ANATÔMICOS DA CARTILAGEM ARTICULAR DO JOELHO BOVINO

POPULATION OF PROTEOGLYCANS IN DIFFERENT ANATOMICAL SITES OF BOVINE KNEE JOINT ARTICULAR CARTILAGE

ESQUISATTO, Marcelo Augusto Marretto¹; CONTRICIANI, Renata Erbert²; PIMENTEL, Edson Rosa²; GOMES, Laurecir²

¹Núcleo de Pesquisa em Ciências da Saúde, Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto – FHO, Araras, São Paulo, Brasil. ²Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

marcelosquisatto@fho.edu.br

RESUMO. As forças mecânicas que atuam sobre uma articulação sinovial induzem alterações na composição e organização da cartilagem articular. Os condrócitos respondem a estímulos tanto de maneira quantitativa quanto qualitativa em relação à matriz extracelular. No presente estudo, foram investigadas cinco regiões diferentes da articulação do joelho bovino em termos de populações de proteoglicanos e seu conteúdo de glicosaminoglicanos. A população de PG de alta densidade foi isolada por ultracentrifugação (fração D1) e filtração em gel. O PG apresentou tamanho semelhante em todas as regiões, porém na tíbia essas moléculas apresentam maior Mr. O sulfato de condroitina foi o glicosaminoglicano mais proeminente detectado na fração D1 e suas cadeias apresentaram em torno de 40 KDa. Duas populações de PG não agregantes foram isoladas em quantidade similar de todas as regiões. Essas moléculas apresentaram características polidispersas e migrando em torno de 70 e 200 kDa e exibindo um comportamento semelhante ao dos pequenos proteoglicanos decorin e biglican. A presença de decorin foi confirmada por immunoblotting. A análise do gel de agarose após a digestão com papaína mostrou a presença de dermatan sulfato nesses PGs. A presença de decorin e especialmente de biglican na fração D2 sugere que esses pequenos proteoglicanos podem interagir fortemente com proteoglicanos não agregantes de alto peso molecular. O immunoblotting para fibromodulina foi positivo para essas moléculas. Nenhuma diferença foi verificada em relação aos aspectos quantitativos, mas o tratamento com anti-fibromodulina também foi positivo para moléculas com 150 kDa. Essas moléculas desaparecem quando a amostra é tratada com agentes redutores. Esse fenômeno pode estar relacionado a autoagregação. A presença de FM agregado de 150 kDa foi mais proeminente na cartilagem articular da tíbia. Esses resultados indicam o efeito da estimulação mecânica nas diferentes regiões de uma mesma articulação. Ao considerar a relação existente entre a composição da matriz e estímulos mecânicos ou químicos, deve-se ter em mente que os condrócitos são sensíveis a diferentes estímulos e podem apresentar um comportamento metabólico heterogêneo em diferentes regiões de uma mesma articulação.

Palavras-chave: Forças biomecânicas, glicosaminoglicanos, variação anatômica.

ABSTRACT. The mechanical forces that act on a synovial joint induce changes in the composition and organization of articular cartilage. Chondrocytes respond to stimuli both in a quantitative and qualitative manner with respect to the extracellular matrix. In the present study, it is investigated five different regions of the bovine knee joint in terms of proteoglycan populations and their glycosaminoglycan content. The high density PG population was isolated using ultracentrifugation (D1 fraction) and gel filtration. The PG presented similar size in all

regions, but in tibia these molecules present higher Mr. The chondroitin sulfate was the more prominent glycosaminoglycan detected from D1 fraction and their chains presented around 40 KDa. Two populations of non-aggregating PG were isolated in similar quantity from all regions. These molecules presented polydisperse characteristics and migrating at about 70 and 200 kDa and exhibiting a behavior similar to that of the small proteoglycans decorin and biglycan. The presence of decorin was confirmed by immunoblotting. Agarose gel analysis after papain digestion showed the presence of dermatan sulfate in these PGs. The presence of decorin and especially of biglycan in the D2 fraction suggests that these small proteoglycans can strongly interact with high molecular weight non-aggregating proteoglycans. Another PG population, with MW around 60 Kda, was also isolated in low density ultracentrifugation fractions (D4). The immunoblotting for fibromodulin was positive to these molecules. No difference was verified in relation to quantitative aspects, but the treatment to fibromodulin antibody was also positive to molecules with 150 kDa. These molecules disappear when the sample is treated with reduced agents. This phenomenon can be related to a self-aggregation. The presence of 150 kDa aggregated FM was more prominent in the tibia articular cartilage. These results indicate the effect of mechanical stimulation on the different regions of the same joint. When considering the relationship existing between matrix composition and mechanical or chemical stimuli, one should keep in mind that chondrocytes are sensitive to different stimuli and may present a heterogeneous metabolic behavior in different regions of the same joint.

Keywords: Biomechanical forces, glycosaminoglycans, anatomical variation.

INTRODUÇÃO

O papel da cartilagem articular é proteger a epífise óssea da ação de forças mecânicas. Essa propriedade é determinada pela composição e disposição dos componentes da matriz extracelular (MEC) e está diretamente relacionada às características funcionais de cada região de uma mesma superfície articular (HEINEGARD; OLDBERG, 1989).

A MEC da cartilagem hialina é constituída por colágeno, principalmente tipo II, proteoglicanos (PG) e proteínas não colagênicas. O colágeno, organizado em fibras, é responsável pela resistência às forças de tensão e também mantém a cartilagem dentro de certos limites. Os PG são ricos em cargas negativas provenientes de cadeias de glicosaminoglicanos (GAG) e são os principais responsáveis pela resistência a forças compressivas. Os grandes PG agregadores representam cerca de 60% do PG total, enquanto os PG não agregadores representam 10 a 40% do PG total. Apenas 1-3% de todos os PG são representados pelos pequenos PG (HEINEGARD; PAULSSON, 1987) fibromodulina (FM - 59 kDa), decorina (70 kDa) e biglicano (200 kDa), que formam uma família de moléculas estruturalmente relacionadas, mas geneticamente distintas. A proteína central dessas PG tem cerca de 45 kDa e contém sequências homólogas (FISHER *et al.*, 1987). Estes PG são amplamente distribuídos entre os tecidos vertebrados (KRUSIUS; RUOLATHI, 1986).

O biglicano e a decorina ligam-se a diferentes isoformas do fator de crescimento TGF- β (YAMAGUCHI; MANN; RUOLATHI, 1990; HILDEBRAND *et al.*, 1994). A decorina e o FM podem se ligar à superfície do colágeno, regulando sua fibrilogênese (HEDBON; HEINEGARD, 1989; ROSENBERG, 1992).

A resposta da cartilagem articular a um estímulo ambiental é governada pelo arranjo estrutural e pelas interações moleculares dos componentes da MEC. Dentre os diferentes estímulos que afetam a organização da cartilagem, as forças mecânicas são as mais importantes. Essas forças induzem mudanças na composição e estrutura (VENN, 1979). Embora presentes

em pequenas quantidades, os condrócitos respondem à sobrecarga contínua e cíclica alterando suas atividades metabólicas (REFIOR; HACKENBROCH, 1978; SALTER *et al.*, 1980; PAKKINEN *et al.*, 1993). Durante a movimentação articular, os condrócitos são inicialmente expostos a um gradiente de pressão hidrostática antes da deformação e fluxo de fluido (ZAMBETTI *et al.*, 1985). Tem sido sugerido que a pressão hidrostática é responsável pela regulação da síntese de PG durante a sobrecarga articular (MANICOURT *et al.*, 1986).

Devido à alta frequência de doenças articulares degenerativas e inflamatórias na medicina humana, muito esforço tem sido direcionado para a compreensão detalhada da estrutura, composição molecular e função da matriz da cartilagem. Embora a compreensão da bioquímica da cartilagem esteja aumentando rapidamente, a composição da matriz da cartilagem em diferentes regiões da mesma articulação não é totalmente compreendida. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi analisar as populações de PG e sua composição de GAG em cinco regiões da cartilagem articular da articulação do joelho submetidas *in vivo* a diferentes forças biomecânicas (SIMON, 1970; SWANN; POWELL; SOTMAN, 1979).

METODOLOGIA

Material Biológico

Cartilagem articular fresca foi retirada da articulação do joelho de nove bois de 24 meses de idade logo após o abate em abatedouro comercial da cidade de Paulínia/SP. A criação, manutenção, transporte e critérios de abate dos animais seguiram as normas previstas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e da Secretaria Estadual de Agricultura do Estado de São Paulo. A cartilagem do joelho foi dividida em cinco regiões distintas, seguindo a orientação biomecânica e anatômica propostas por SIMON (1970) e ESQUISATTO; PIMENTEL; GOMES (1997): F1 (fêmur) - borda medial e lateral da face patelar; F2 (fêmur) - superfície patelar; F3 (fêmur) - côndilos medial e lateral; P - superfície articular da patela e T - côndilos medial e lateral da tíbia.

Extração dos Components da Matriz Extracelular

Amostras (1g) de diferentes regiões da cartilagem foram extraídas com 15 volumes (p/v) de cloreto de guanidina 4 M em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,8, contendo inibidores proteolíticos (10 mM EDTA e 1 mM PMSF). A extração foi realizada por 24 horas a 4°C com agitação constante. O extrato obtido foi separado dos remanescentes teciduais por centrifugação a 39.200 rpm por 30 min a 2°C em centrífuga Beckman Rotor 80 TI.

Ultracentrifugação em gradiente de Cloreto de Césio

O sobrenadante obtido de cada região foi ajustado para uma densidade de 1,36 g/ml pela adição de CsCl (1,35 g/g de sobrenadante). A ultracentrifugação foi realizada a 35.000 rpm por 61 h a 150C em centrífuga Beckman Rotor 80 TI. O tubo foi então dividido em quatro partes iguais, ou seja, D1 (fundo do tubo), D2, D3 e D4 (topo do tubo). As frações D1 (alta densidade – 1,40 g/ml), D2 (densidade intermediária) e D4 (baixa densidade – 1,30 g/ml).

Procedimentos Analíticos

O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de BRADFORD (1976), o ácido urônico (AU) foi determinado pelo método de DISCHE (1947) e o conteúdo de GAG foi determinado pelo método de Farndale *et al.* (1986).

Análise dos Proteoglicanos

As frações D1 das cinco regiões obtidas após a separação do gradiente CsCl foram analisadas na coluna Sepharose CL-4B (2x 120 cm). As frações foram dialisadas contra Gu-HCl 4 M e tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 5,8. A amostra (2 mg de conteúdo de AU) foi aplicada a uma coluna equilibrada com o tampão acima. O efluente foi monitorado continuamente quanto à absorvância a 526 nm pelo método de FARNDALÉ *et al.* (1986). As amostras cromatográficas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose-poliacrilamida (0,6/1,2%, respectivamente) (ZINGALES, 1994). As amostras foram preparadas em Tris-acetato 40mM, pH 6,8, sulfito de sódio 1mM e glicerol 40% e incubadas por 10 min em água fervente. O tampão do eletrodo era Tris-acetato 10mM, pH 6,8, contendo sulfito de sódio 0,25mM e EDTA 1mM. A eletroforese foi realizada a 20 mA por 1 hora e 30 minutos. CS foi usado como padrão. As amostras foram coradas com azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1%.

As frações D2 e D4 das diferentes regiões foram cromatografadas em DEAE-Sephacel. As frações foram dialisadas contra tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7, contendo ureia 7 M. A amostra (1mg de teor de proteína) foi aplicada a uma coluna equilibrada com o tampão acima. As frações foram eluídas através de um gradiente de NaCl de 0 - 1,5 M. O efluente foi monitorado continuamente quanto à absorvância a 526 e 280 nm, respectivamente. As amostras obtidas por cromatografia de troca iônica foram analisadas por SDS-PAGE (ZINGALES, 1994) em um gradiente de 4-16%, seguido de coloração com prata (BLUM; BEIER; GROSS, 1987).

Análise dos Glicosaminoglicanos

Amostras (1mg) das frações D1 e D2 de cada região foram submetidas à β -eliminação com NaOH 0,5 M a 40°C por 24 h, para liberação das cadeias GAG do núcleo central do PG. As amostras foram então precipitadas em etanol por 16 h a 40°C, centrifugadas e secas. A principal identificação de GAG nas frações foi baseada na mobilidade eletroforética em eletroforese em gel de agarose em tampão propilenodiamina 20 mM, pH 9,0 (DIETRICH; DIETRICH, 1976). O material foi corado com azul de toluidina 0,1% em ácido acético 3%. O tamanho médio da cadeia GAG (M_r) de cada fração foi determinado usando filtração em gel. Cada amostra foi ressuspensa em 1,5 ml de NaCl 0,15 M e submetida à coluna Sephadex G-75 (2 x 12 cm). O efluente foi continuamente monitorado por absorvância a 526 nm (método de FARNDALÉ *et al.*, 1986). As amostras de cromatografia foram analisadas por eletroforese em gel de poliácrlamida a 6% usando tampão de barbital 60 mM, pH 8,6. CS foi usado como padrão e o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1%.

Immunoblotting

Alíquotas das frações DEAE-Sephacel obtidas após as análises D2 e D4 foram precipitadas com etanol e submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 7,5%. As proteínas foram transferidas para nitrocelulose e incubadas com anticorpos primários: anti-decorina humana (ABCAM, ab137508) e anti-fibromodulina humana (ABCAM, ab267465). Foram utilizados

anticorpos secundários específicos marcados (ABCAN, ab6789) para reação com diaminobenzidina.

Análise estatística

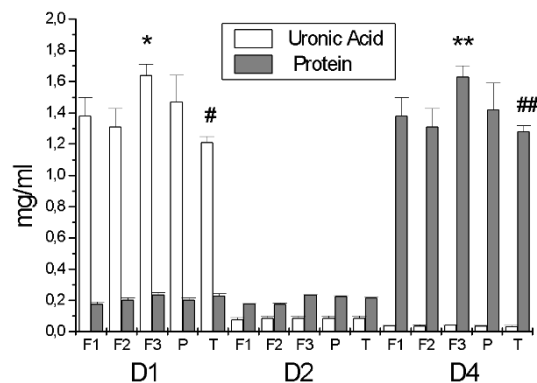
Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Tukey usando o software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, EUA) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$, $n=5$). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($X \pm DP$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise Quantitativa das Frações de Ultracentrifugação

A quantidade de proteínas e ácido urônico foi avaliada nas frações D1, D2 e D4 e apresentaram diferenças entre as regiões. A maior quantidade de ácido urônico foi detectada na fração D1 da região F3 e a maior quantidade de proteína foi detectada na fração D4 da região F3 (Figura 1).

Figura 1. Dosagem de proteína e ácido urônico nas frações D1, D2 e D4 das diferentes regiões da articulação do joelho bovino. (*) - maior concentração de ácido urônico, (#) – menor concentração de ácido urônico, (**) - maior concentração de proteína, (##) – maior concentração de proteína. Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Tukey com nível de significância de 5% ($p < 0,05$, $n=5$).

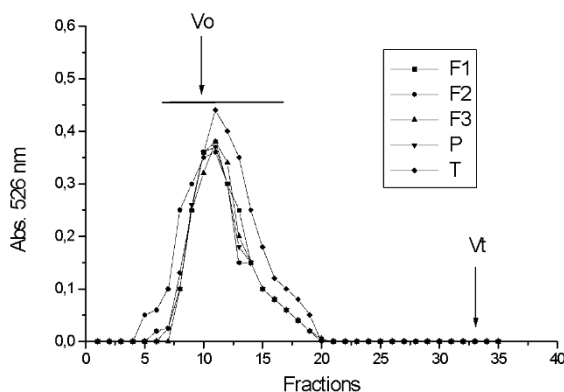


Fonte: Próprio autor

Análise dos Proteoglicanos

O perfil de eluição das frações D1 de ultracentrifugação de diferentes regiões, quando analisado em Sepharose CL-4B, apresentou variação. As regiões F1, F2, F3 e P (Figura 2) apresentaram comportamento de eluição semelhante. O material nestas regiões foi eluído com $k_{av}=0,23$, enquanto para a região T a eluição foi com $k_{av} 0,13$.

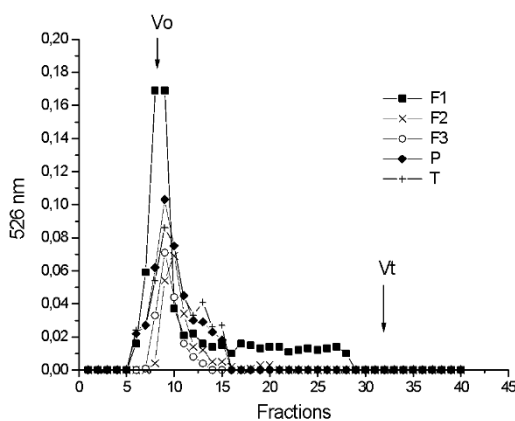
Figura 2. Cromatograma das frações D1 das diferentes regiões da articulação do joelho bovino após fracionamento em coluna de gel filtração Sepharose CL-4B. A absorbância foi medida a 526 nm V0 – volume vazio; Vt – volume total.



Fonte: Próprio autor

A separação cromatográfica dos componentes das frações D2 (Figura 3) apresentou perfil semelhante. Os componentes foram eluídos da coluna DEAE com gradiente de NaCl entre 0,2 e 0,6 M.

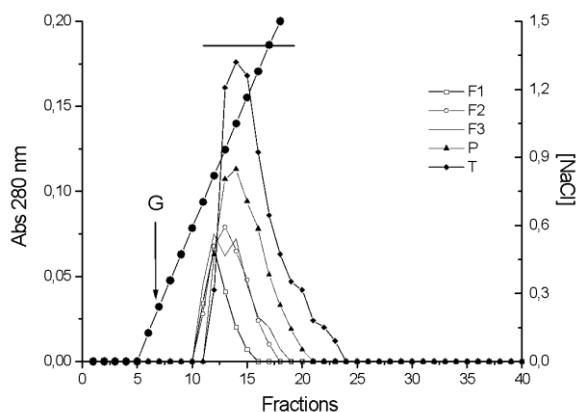
Figura 3. Cromatograma das frações D2 das diferentes regiões da articulação do joelho bovino após fracionamento em coluna de troca iônica DEAE-Sepharose. A seta indica o início do gradiente de NaCl 0-1,5 M (G). A absorbância foi medida a 526 nm (ver Materiais e Métodos). V0 – volume vazio; Vt – volume total. A absorbância foi medida a 526 nm.



Fonte: Próprio autor

Em relação às frações D4 (Figura 4), o cromatograma de troca iônica resultou em perfil de eluição semelhante, após gradiente de NaCl, para todas as regiões. As moléculas foram eluídas com uma faixa de gradiente de NaCl entre 0,7 e 1,0 M.

Figura 4. Cromatograma das frações D4 das diferentes regiões da articulação do joelho bovino após fracionamento em coluna de troca iônica DEAE-Sephacel. A absorvância foi medida a 280 nm. A seta indica o início do gradiente de NaCl 0-1,5 M (G).

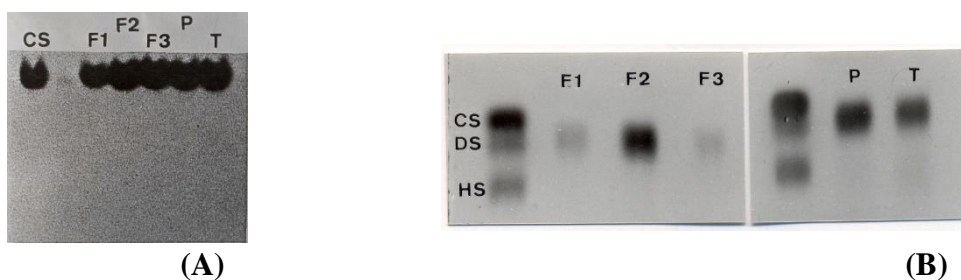


Fonte: Próprio autor

Análise dos Glicosaminoglicanos

A análise qualitativa de glicosaminoglicanos foi realizada por eletroforese em gel de agarose. O principal GAG presente nas frações D1 é o sulfato de condroitina e nas frações D2 é o dermatan sulfato (DS) (Figura 5).

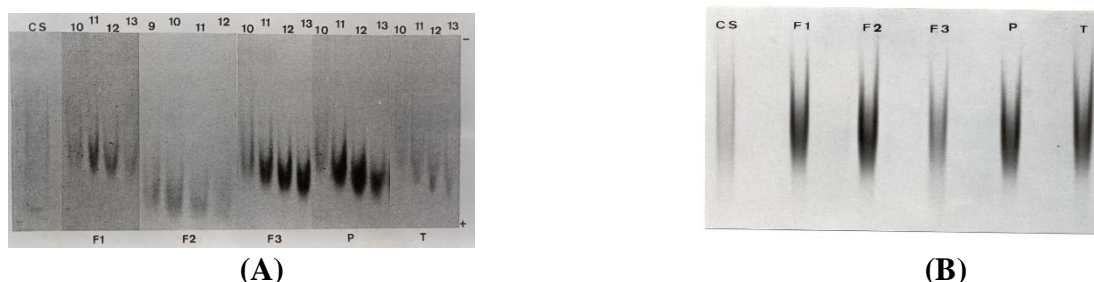
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose com tampão propilenodiamina. Em (A), amostras obtidas das frações D1 e em (B) das frações D2. O principal GAG presente nas frações D1 é o sulfato de condroitina e nas frações D2 é o dermatan sulfato (DS). Padrão: CS – sulfato de condroitina, DS – sulfato de dermatan e HS – sulfato de heparam.



Fonte: Próprio autor

O tamanho das cadeias de GAG (M_r) da fração D1 e D2 foram estimados em gel de poliacrilamida com tampão de barbital após a alquilação e cromatografia de filtração em gel. Todas as regiões apresentaram perfil eletroforético semelhante (Figura 6). Porém, nas frações D1, as regiões F3 e P, e nas frações D2, as regiões F2 e P, as moléculas parecem estar mais concentradas.

Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras obtidas das frações D1 (A) após β -eliminação e em (B) das frações D2. Mr em torno de 40 kDa. Padrão: CS – Sulfato de condroitina.

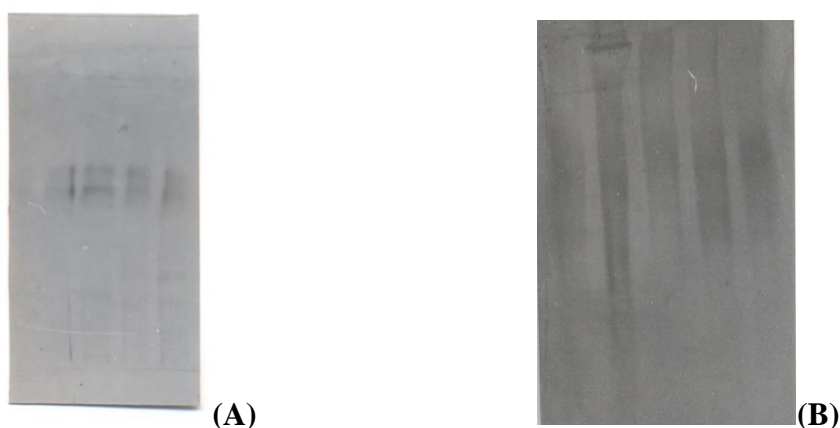


Fonte: Próprio autor

Immunoblotting

Alíquotas cromatográficas de D2 e D4 foram utilizadas para ensaio imunológico para comprovar a presença de proteoglicanos decorina (DC) e fibromodulina (FM) (Figura 7). O immunoblotting foi marcado positivamente para ambas as moléculas. Esses resultados confirmaram a presença de FM em D4 (A) e DC em D2 (B) de todas as regiões do joelho bovino. Nenhuma diferença foi verificada em relação aos aspectos quantitativos, mas o tratamento com anticorpo fibromodulina também foi positivo para moléculas com 150 kDa. Essas moléculas desaparecem quando a amostra é tratada com agentes redutores. Esse fenômeno pode estar relacionado a uma autoagregação. A presença de FM agregado foi mais proeminente na região T.

Figura 7. Reação por immunoblotting das frações ricas em fibromodulina (D4) (A) e decorina (D2) (B) após eletroforese em SDS-PAGE. A tira de nitrocelulose foi tratada com anticorpos primários: anti-decorina humana (ABCAM, ab137508) e anti-fibromodulina humana (ABCAM, ab267465). Em seguida, as tiras foram tratadas com anticorpos secundários específicos marcados (ABCAN, ab6789) para reação com diaminobenzidina.



Fonte: Próprio autor

A articulação sinovial permite a transmissão de forças entre as estruturas ósseas, favorecendo sua movimentação. A função da cartilagem articular, neste contexto, é reduzir o estresse quando as forças são aplicadas nas articulações e proteger a epífise óssea do atrito e fragmentação (FREEMAN; SWANSON; MANLEY, 1975). As propriedades biomecânicas da cartilagem articular dependem em grande parte de sua ECM, produzida e mantida pelos condrócitos inseridos na matriz. Em condições fisiológicas, a cartilagem articular é submetida a várias magnitudes e ciclos de carga que são suportadas pela matriz, mantida através da atividade metabólica dos condrócitos (KEMPSON, 1979). As propriedades bioquímicas e biofísicas da cartilagem articular variam em diferentes locais de superfície de acordo com a carga articular (KIM *et al.*, 1994).

A regulação dos condrócitos da síntese e degradação da matriz cartilaginosa é influenciada por fatores mecânicos e biológicos (KIVIRANTA *et al.*, 1987). *In vivo*, estudos demonstraram que a carga estática e reduzida na articulação promove dano aos GAGs e diminuição da síntese de PG e proteínas (HAYES; BODINE, 1978; KIVIRANTA *et al.*, 1988; PARKKINEN *et al.*, 1992; SAH *et al.*, 1989). Por outro lado, a aplicação dinâmica de forças compressivas estimula a síntese do PG (SIMON, 1970; CATERSON; LOWTHER, 1978; KIVIRANTA *et al.*, 1992), mas a deposição do PG varia com a intensidade da força e geometria de aplicação (MOURÃO, 1991; TAMMI *et al.*, 1987).

Mockenhaupt (1990) mostrou que articulações congruentes não distribuem equitativamente as forças compressivas entre as diferentes regiões anatômicas. No joelho bovino, por exemplo, as forças compressivas são mais intensas na patela do que na cartilagem tibial e femoral (ROSENBERG *et al.*, 1976). As características bioquímicas da cartilagem articular em diferentes sítios anatômicos refletem a adaptação fisiológica do tecido ao estímulo mecânico (COTTA; PUHL, 1978).

A resistência de carga da cartilagem se deve ao PG onde seu alto teor está relacionado a pouca deformidade do tecido. Estudos bioquímicos sobre a distribuição do PG em diferentes regiões de uma mesma articulação em alguns animais revelaram a heterogeneidade da cartilagem articular. Em joelho de coelho, o conteúdo de PG, avaliado por GAG sulfatado, é homogêneo nas diferentes regiões (HEISE; TOLEDO, 1993). KIVIRANTA *et al.* (1987) demonstraram que a cartilagem tibial de cães apresenta maior conteúdo de PG do que os côndilos do fêmur. Esses dados, aparentemente discordantes, estão relacionados a aspectos mecânicos próprios de cada articulação. A distribuição topográfica do PG (GAG sulfatado) na cartilagem não pode ser considerada apenas em relação às forças biomecânicas e espessura do tecido (VENN, 1979), mas sim com a estrutura anatômica e cinesiologia da peça analisada (KIVIRANTA *et al.*, 1992). No joelho humano, por exemplo, o menisco suporta mais forças compressivas do que a cartilagem tibial (MAQUET; VAN DER BERG; SIMONET, 1975). Os meniscos são capazes de reduzir a carga na superfície tibial, uma vez que distribuem a carga por toda a superfície articular (AHMED; BURKE, 1983). Além da presença do menisco, deve-se considerar as particularidades de cada animal, com movimentos e posturas próprias, que podem contribuir para a composição diferencial da MEC de cada região.

Além disso, os condrócitos apresentam comportamento metabólico heterogêneo. Seu padrão de síntese não é o mesmo para as diferentes regiões de uma cartilagem (AYDELOTE; SCHUMACHER; KUTTNER, 1992). A heterogeneidade da síntese de condrócitos têm reflexo na estrutura monomérica de PG agregados e não agregados. Talvez o estímulo biomecânico não seja o fator inicial desse fenótipo, mas é o principal suporte (BUSCHMANN *et al.*, 1992).

A caracterização do PG entre diferentes regiões anatômicas foi feita primeiramente por Bjelle *et al.* (1974). Eles não detectaram diferenças entre PGs em duas regiões da epífise distal do fêmur bovino. Na articulação metacarpal falange bovina foram descritas populações de PGs

de alta e baixa densidade (SWANN; POWELL; SOTMAN, 1979). Os mesmos resultados foram encontrados em epífise proximal bovina de úmero (ROSENBERG *et al.*, 1976), cão (KIVIRANTA *et al.*, 1987) e cartilagem do joelho de coelho (MANICOURT *et al.*, 1986).

Estudos iniciais realizados em cães mostraram que os componentes da cartilagem tibial diferem quantitativamente da cartilagem femoral oposta, sendo o conteúdo de PG maior na tíbia do que no fêmur (KIVIRANTA *et al.*, 1987). Normalmente, espera-se encontrar mais PG em regiões onde as forças compressivas são mais acentuadas (BJELLE; GARDELL; HEINEGARD, 1974). Entretanto, nem sempre as forças compressivas são mais intensas na tíbia, como demonstrado no cão.

Nossos resultados mostraram maior presença de PG em F3 do que em tíbia e patela. Embora a patela sofra alto estresse compressivo no joelho (SIMON, 1970), sua menor concentração de PG provavelmente se deve ao caráter estático da força compressiva que suporta. Foi provado que a compressão dinâmica tem um efeito estimulador na síntese de PG (PALMOSKI; BRANDT, 1984). A discrepância entre nossos dados e os de Kiviranta *et al.* (1987) pode ser devido a outros fatores além dos mecânicos, como influências genéticas que regulam a espessura do tecido e outras propriedades. O conteúdo de PG também é influenciado por diferenças entre os animais que podem ser devido ao sexo, raça, exercício e outros parâmetros ambientais. Como esperado, o principal GAG na cartilagem articular do joelho bovino adulto foi o CS, e nenhuma diferença foi encontrada nos diferentes locais.

A diferença de distribuição do PG pode ser devida a mudanças na organização estrutural do MEC. Este fato pode manter algum PG aprisionado no tecido mesmo quando submetido à ação de um agente caotrópico (ARCANJO; GOMES; PIMENTEL, 1994). Sabe-se que mudanças na orientação das fibras colágenas podem se refletir no conteúdo de PG de regiões cobertas ou não pelo menisco (BULLOUGH *et al.*, 1985). As diferenças na composição e organização da MEC em diferentes regiões da articulação sinovial fornecem características estruturais importantes que permitem os movimentos exigidos pela articulação (KIVIRANTA *et al.*, 1992).

Essas superfícies têm componentes principalmente cilíndricos e são de design mecânico semelhante quando se opõem a imagens complementares umas das outras. Para o movimento de cada articulação, o movimento é uniaxial e a tensão na cartilagem é em uma direção. Stridder *et al.* (1975) demonstraram que a cartilagem ulnar proximal apresenta três vezes menos proteínas que a cartilagem umeral distal. Essas observações sugerem que não apenas a intensidade da carga, mas também a direção do estresse na cartilagem é importante para a distribuição dos componentes da matriz. A importância de uma distribuição de componentes de matriz heterogênea e variável mostra a sensibilidade dos condrócitos à tensão. A heterogeneidade metabólica dessas células reflete a adaptação regional às forças biomecânicas (AYDELOTE; SCHUMACHER; KUTTNER, 1992). Esta adaptação significa a criação de gradientes de pressão osmótica apropriados em diferentes regiões do mesmo tecido (PALMOSKI; BRANDT, 1984).

Neste estudo, utilizamos protocolos consagrados para isolamento e caracterização de PGs. O perfil de eluição precoce em T é semelhante para outros, caracteriza moléculas com alto Mr em T e semelhante para outros. Esse resultado se deve às diferentes ações adaptativas dos tecidos em uma articulação sob forças biomecânicas. CS foi o único GAG encontrado na fração PG de grande densidade obtida nas cinco regiões anatômicas. Este resultado é confirmado por outros autores para cartilagem articular obtida de mamíferos adultos jovens (MUIR, 1995). As cadeias Mr de GAG foram avaliadas por cromatografia de exclusão de tamanho. Em todas as regiões detectamos uma população de cadeias com 40 kDa.

Um estudo *in vitro* relacionou o estresse contínuo com a presença de cadeias GAG com menor incorporação de sulfato e agrecano com diminuição da mobilidade em eletroforese em gel de agarose poliacrilamida (LAMMI *et al.*, 1994). Nossos resultados mostraram que a região T PG com maior Mr, devido ao alto teor de cadeias GAG, enquanto outras regiões têm populações provavelmente de GAGs subsulfatados (resultados não mostrados).

In vivo, a geometria articular é complexa e a resposta dos condrócitos é feita com a adição de diferentes eventos biomecânicos e bioquímicos. Muitos relatos têm sugerido alguns eventos celulares que tentam explicar a regulação do fenótipo tecidual e a síntese de PG. Um possível retardo no tráfego e secreção de proteínas intracelulares pode, através de um mecanismo atualmente desconhecido, levar às alterações observadas na estrutura do PG durante a pressão hidrostática contínua (LAMMI *et al.*, 1994). Mitchell e Hardingham (1985) observaram que a repressão da síntese proteica em culturas de células de condrossarcoma diminuiu a incorporação de sulfato, ao mesmo tempo em que aumentou o tamanho do PG e o comprimento do SC. Há evidências de que os microtúbulos facilitam a secreção de macromoléculas, direcionando-as para os compartimentos corretos da célula. A alta pressão hidrostática também tem múltiplos efeitos nos elementos do citoesqueleto (BEGG; SALMON; HYATT, 1983). A ruptura do citoesqueleto, portanto, pode explicar a incorporação reduzida de sulfato em culturas de condrócitos sob alta pressão contínua (LAMMI *et al.*, 1994). Além disso, foi demonstrado que histonas e mRNAs polissomais estão associados ao citoesqueleto, e foi sugerido que a interrupção dessa associação afeta a estabilidade da síntese de PG grandes (BAGCHI; LARSON; SELLS, 1987). A cultura celular e o tecido *a fresco* são situações distintas, mas os condrócitos presentes em ambas as amostras revelam comportamento biossintético semelhante.

Os pequenos PG são moléculas que parecem estar envolvidas no efeito biomecânico nas cartilagens. Na cartilagem xifóide de frango, a FM foi detectada principalmente na região central (carina), possivelmente devido à maior força de compressão que ocorre nessa região (GOMES; PIMENTEL, 1994). No presente estudo, pequenas PG foram claramente observadas em todas as regiões que sofrem tensões compressivas. A presença de decorin e biglicano nas diferentes regiões - F1, F2, F3, P e T - pode estar relacionada à própria dinâmica das forças biomecânicas, que depende não só das características anatômicas da articulação, mas principalmente da atividade do animal.

Os PGs biglicano (ROSENBERG *et al.*, 1995) e decorina (CHOI *et al.*, 1989) foram isolados pela primeira vez da cartilagem articular bovina. Esses investigadores confirmaram imunologicamente a individualidade de cada PG, bem como a presença de sulfato de dermatan ligado covalentemente à proteína central. No joelho humano, DS-PG foram isolados e caracterizados na cartilagem articular da epífise proximal da tíbia e da epífise distal do fêmur (ROUGLHEY; WHITE, 1989). Esses PG de baixo peso molecular são normalmente detectados na fração D4, mas também foram recentemente detectados na fração D1 (alta densidade) apesar da presença de Gu-HCl, sugerindo algum tipo de interação entre esses pequenos PG e os monômeros do PG agregador (ROSENBERG *et al.*, 1995). Também já foi demonstrado que a decorina, o biglicano e a fibromodulina podem se ligar ao colágeno tipo VI através do esqueleto proteico, especialmente na sequência rica em leucina (ROUGLHEY; WHITE, 1989). Talvez uma interação semelhante ocorra com esses pequenos PG e com o PG não agregante de alto peso molecular presente em D2. A presença de biglicano e decorina na fração D2 foi claramente demonstrada no presente estudo. Com base nos resultados obtidos por SDS-PAGE, a presença ou ausência do agente redutor não interferiu na interação dessas moléculas com o PG de alto peso molecular. Isso contrasta com os dados obtidos para a cartilagem articular humana, na

qual a migração DS-PG ocorre independentemente da agregação de PG e apenas na presença de SDS e 2-Me (CHOI *et al.*, 1989).

A análise em gel de poliacrilmida das cadeias GAG com tampão barbital sugere a presença de uma cadeia com Mr ligeiramente superior a 40 kDa, semelhante ao Mr da cadeia GAG de decorina e biglicano. No entanto, a presença de fibromodulina na fração D4, sua aparente alta concentração na região T e sua capacidade de formar agregados confirmam um estudo anterior. Neste artigo anterior, descrevemos a agregação FM na cartilagem tibiotársica de galinhas (GOMES *et al.*, 1996). Essas duas regiões são análogas em relação ao comportamento biomecânico. No mesmo artigo, indicamos que este pequeno PG só pode ser autoagregado sob condições não redutoras. Este pode indicar que a interação direta dos elementos da MEC com os condrócitos ou células próximas atua como um mediador biológico da função celular (SOMMARIN; LARSON; HEINEGARD, 1989).

CONCLUSÃO

Com base nos dados, este estudo nos permite concluir que a matriz da cartilagem articular do joelho de bovinos expressa quantidades diferentes de PGs e essas moléculas podem ter diferentes habilidades de agregação. Essas interações podem estar relacionadas a resposta às diferentes forças compressivas presentes nas diferentes regiões da superfície articular dentro de uma mesma articulação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Herminio Ometto (FHO) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

AHMED, A.M.; BURKE, D.L. In vitro measurement of static pressure distribution in synovial joints. I-Tibial surface of the knee. **Journal of Biomedical Engineering**, v. 105, n.2, p. 216-225, 1983.

AYDELOTE, M.B.; SCHUMACHER, B.L.; KUTTNER, H.E. Heterogeneity of articular chondrocytes. In: **Articular Cartilage and Osteoarthritis**, edited by KUETTNER, K.E.;

SCHLEYERBACH, R.; PEYRON, J.G.; HASCALL, V.C. Raven Press, New York, 1992.

ARCANJO, K.D.S.; GOMES, L.; PIMENTEL, E.R. Effect of magnesium chloride and guanidinium chloride on the extraction of components of extracellular matrix from chicken cartilage. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n.2, p. 93-97, 1994.

BAGCHI, T.; LARSON, D.E; SELLS, B.H. Cytoskeletal association of muscle-specific mRNAs in differentiating L6 rat myoblasts. **Experimental Cell Research**, v. 168, n. 2., p. 160-172, 1987.

BEGG, D.A.; SALMON, E.D.; HYATT, H.A. Changes in the structural organization of actin in the sea urchin egg cortex in response to hydrostatic pressure. **Journal of Cell Biology**, v. 97, n.12, p. 1795-1805, 1983.

BJELLE, A.; GARDELL, S.; HEINEGÅRD, D. Proteoglycans of articular cartilage from bovine lower femoral epiphysis. Extraction and characterization of proteoglycans from two sites within the same joint. **Connective Tissue Research**, v. 2, n. 3, p. 111-116, 1974.

BLUM, B.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 1, p. 93-99, 1987.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 3, p. 248-254, 1976.

BULLOUGH, P.G. *et al.* Topographical variation in the morphology and biochemistry of adult canine tibial plateau articular cartilage. **Journal Orthopaedical Research**, v. 3, n.1, p. 1-16, 1985.

BUSCHMANN, M.D. *et al.* Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. **Journal Orthopaedical Research**, v. 10, n. 7, p. 745-758, 1992.

CATERSON, B.; LOWTHER, D.A. Changes in the metabolism of the proteoglycans from sheep articular cartilage in response to mechanical stress. **Biochemica Biophysica Acta**, v. 540, n.2, p. 412-422, 1978.

CHOI, H.V. *et al.* Characterization of dermatan sulfate proteoglycans, DS-PG I DS-PG II, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-sepharose chromatography. **Journal Biological Chemistry**, v. 264, n. 4, p. 2876-2884, 1989.

COTTA, H.; PUHL, W. The pathophysiology of damage to articular cartilage. In: **The Knee**, edited by HASTINGS, D.E., Springer, Berlim, 1978.

DIETRICH, C.P.; DIETRICH, S.M.C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, n. 4, p. 645-647, 1976.

DISCHE, Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. **Journal Biological Chemistry**, v. 167, n. 1, p. 189-199, 1947.

ESQUISATTO, M.A.M.; PIMENTEL, E.R.; GOMES, L. Extracellular matrix composition of different regions of knee joint cartilage in cattle. **Annals of Anatomy**, v. 179, n.7, p. 433 – 437, 1997.

FARNDAL, R.W.; BUTTLE, D.J.; BARRET, A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochemica Biophysica Acta**, v. 883, n. 1, 1986.

FISCHER, L. W. *et al.* Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral component of developing human bone. **Journal Biological Chemistry**, v. 262, n. 4, p. 702-708, 1987.

FREEMAN, M.A.R.; SWANSON, S.H.V.; MANLEY, P.T. Stress-lowering function of articular cartilage. **Medical and Biological Engineering**, v. 7, n. 2, p. 245-251, 1975.

GOMES, L.; PIMENTEL, E.R. Detection of small proteoglycans present in xiphoid cartilage regions submitted to different biomechanical forces. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 12, p. 2117-2124, 1994.

GOMES, L. *et al.* Is there a relationship between the state of aggregation of small proteoglycans and the biomechanical properties of tissue? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 8, p. 1243-1246, 1996.

KEMPSON, G. The mechanical properties of articular cartilage. In: **The Joints and Synovial Fluid**, edited by Sokoloff, L. Academic Press, New York, 1979

KRUSSIUS, T.; RUOLATHI, E. Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v. 87, n. 3, p. 683-687, 1986.

HAYES, W.C.; BODINE, A.J. Flow-independent viscoelastic properties of articular cartilage matrix. **Journal of Biomechanics**, v. 11, n. 3, p. 407-419, 1978.

HEDBON, E.; HEINEGÅRD, D. Interaction of a 59 kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. **Journal Biological Chemistry**, v. 264, n. 12, p. 6898-6905, 1989.

HEINEGÅRD, D.; OLDBERG, A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. **Faseb Journal**, v. 3, n. 6, p. 2042-2051, 1989.

HEINEGÅRD, D.; PAULSSON, M. Cartilage. **Methods in Enzymology**, v. 145, n. 1, p. 336-363, 1987.

HEISE, N.; TOLEDO, O.M.S. Age-related changes in glycosaminoglycan distribution in different anatomical sites on the surface of knee-joint articular cartilage in young rabbits. **Annals of Anatomy**, v. 175, n. 1, p. 35-40, 1993.

HILDEBRAND, A. *et al.* Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor β . **Biochemical Journal**, v. 302, n. 3, p. 527-534, 1994.

KIM, Y.J. *et al.* Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: physical stimuli. **Archives in Biochemistry and Biophysics**, v. 311, n. 1, 1994.

KIVIRANTA I, *et al.* Weight bearing controls glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young beagle dogs. **Arthritis and Rheumatism**, v. 30, n.5, p. 801-809, 1987.

KIVIRANTA, I. *et al.* Moderate running exercise augments glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the knee joint of young beagle dogs. **Journal Orthopaedic Research**, v. 6, n. 2, p. 188-195, 1988.

KIVIRANTA, I. *et al.* Effect of motion and load on articular cartilage in animal models In: **Articular Cartilage and Osteoarthritis**, edited by KUETTNER, K.E.; SCHLEYERBACH, R.; PEYRON, J.G.; HASCALL, V.C. Raven Press, New York, 1992.

LAMMI, M.J. *et al.* Expression of reduced amounts of structurally altered aggrecan in articular cartilage chondrocytes exposed to high hydrostatic pressure. **Biochemical Journal**, v. 304, n.7, p. 723-730, 1994.

MAQUET, P.G.; VAN DER BERG, A.J.; SIMONET, J.C. Femorotibial weight bearing areas. **Journal of Bone and Joint Surgery – American**, v. 57, n. 5, p. 766-771, 1975.

MANICOURT, D.H. *et al.* Characterization of the proteoglycans recovered under nondissociative conditions from normal articular cartilage of rabbits and dogs. **Journal Biological Chemistry**, v. 261, n. 12, p. 5426-5433, 1986.

MITCHELL, D.; HARDINGHAM, T. The effects of cycloheximide on the biosynthesis and secretional proteoglycans by chondrocytes in cultures. **Biochemical Journal**, v. 196, n. 5, p. 521-529, 1985.

MOURÃO, P.A.S. Proteoglycans, glycosaminoglycans and sulfated polysaccharides from connective tissues. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 13-22, 1991.

MOCKENHAUPT, J. Pressure distribution in partly contracting joints a computerized simulation model. **Anatomischer Anzeiger**, v. 171, n.3, p. 313-321, 1990.

MUIR, H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. **BioEssays**, v. 17, n. 12, p. 1039-1048, 1995.

PALMOSKI, M.J.; BRANDT, K.D. Effects of static and cyclic compressive forces on articular cartilage plugs in vitro. **Arthritis and Rheumatism**, v. 27, n. 5, p. 675-681, 1984.

PARKKINEN, J.J. *et al.* Local stimulation of proteoglycan synthesis in articular cartilage explants by dynamic compression in vitro. **Journal Biological Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 610-620, 1992.

PARKKINEN, J.J. *et al.* Effects of cyclic hydrostatic pressure on proteoglycan synthesis in cultured chondrocytes and articular cartilage explants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 6, p. 458-465, 1993.

REFIOR, H.J.; HACKENBROCH, M.H. The reaction of articular cartilage to pressure, immobilization and distraction. In: **The Knee**, edited by HASTINGS, D.E. Springer, Berlin, 1978.

ROSENBERG, L.C. *et al.* Proteoglycans from bovine proximal humeral articular cartilage. Structural basis for the polydispersity of proteoglycan subunit. **Journal Biological Chemistry**, v. 251, n.11, p. 6439-6444, 1976.

ROSENBERG, L.C. Structure and function of dermatan sulfate proteoglycans in articular cartilage. In: **Articular Cartilage and Osteoarthritis**, edited by KUETTNER, K.E.; SCHLEYERBACH, R.; PEYRON, J.G.; HASCALL, V.C. Raven Press, New York, 1992.

ROSENBERG, L.C. *et al.* Isolation of dermatan sulphate from mature bovine articular cartilage. **Journal Biological Chemistry**, v. 260, n.11, p. 6304-6313, 1995.

ROUGLHEY, P.J.; WHITE, R.J. Dermatan sulphate proteoglycans of human articular cartilage. The properties of dermatan sulphate proteoglycans I and II. **Biochemical Journal**, v. 162, n. 8, p. 823-827, 1989.

SAH, R.L.Y. *et al.* Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression. **Journal Orthopaedical Research**, v. 7, n. 6, p. 619-636, 1989.

SALTER, R.R. *et al.* The biological effects of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. **Journal of Bone and Joint Surgery – American**, v. 62, n.10, p. 1232-1251, 1980.

SIMON, W.H. Scale effects in animal joints. I. Articular cartilage thickness and compressive stress. **Arthritis and Rheumatism**, v. 13, n. 2, p. 244-255, 1970.

SOMMARIN, Y.; LARSON, T.; HEINEGÅRD, D. Chondrocyte-matrix interactions. Attachment to proteins isolated from cartilage. **Experimental Cell Research**, v. 184, n.1, p. 181-192, 1989.

STRIDER, W.; PAL, S.; ROSENBERG, L. Comparison of proteoglycan from bovine articular cartilage **Journal Biological Chemistry**, v. 254, n. 5, p. 945-954, 1975.

SWANN, D.A., POWELL, S., SOTMAN, S. The heterogeneity of cartilage proteoglycans. Isolation of different types of proteoglycans from bovine articular cartilage. **Journal Biological Chemistry**, v. 254, n. 4, p. 945-954, 1979.

TAMMI, M. *et al.* Joint induced alteration in articular cartilage. In: **Joint Loading: Biology and Health of Articular Structures**, edited by HELMINEN, H.J.; KIVIRANTA, I.; TAMMI, M.; SÄÄMÄNEN, A-M.; PAULLONEN, K; JURVELIN, J. John Wright (Butterworth), Bristol, England, 1987.

VENN, M.F. Chemical composition of human femoral head cartilage. Influence of topographical position and fibrillation. **Annals of Rheumatic Diseases**, v. 38, n. 1, p. 57-62, 1979.

YAMAGUCHI, Y.; MANN, D.M.; RUOSLATHI, E. Negative regulation of transforming growth factor β by the proteoglycan decorin. **Nature**, v. 336, n. 2, p. 281-284, 1990.

ZAMBETTI, G. *et al.* Subcellular localization of histone messenger RNAs on cytoskeleton-associated free polyssomes in Hela S3 cells. **Journal Cell Physiology**, v. 125, n. 3, p. 345-353, 1985.

ZINGALES, B. (1994). **Analysis of protein by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis**. In: Genes and Antigens of Parasites, edited by MOREL, C.M., Fiocruz, Rio de Janeiro.

Publicado em: 11/09/2023.