Ana Paula Abdalla Goissis

**ANÁLISE ESTRUTURAL DO COLÁGENO TIPO I.
CORRELAÇÃO ESTRUTURA:ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia –Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Goissis

São Carlos – SP

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

G616a	<p>Goissis, Ana Paula Abdalla</p> <p>Análise estrutural do colágeno do tipo I : correlação estrutura : atividade biológica / Ana Paula Abdalla Goissis ; orientador Gilberto Goissis -- São Carlos, 2007.</p> <p>Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia) -- Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2007.</p> <p>1. Colágeno. 2. colágeno - estrutura. 3. Correlação estrutural. 4. Atividade biológica. 5. Matriz extracelular. I. Título.</p>
-------	---

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Gilberto e Vilma, aos meus irmãos Nando, Bia e Tina, alicerce e apoio em todas as minhas conquistas.

A todos os meus avós, em especial aos paternos, vô João e vó Otília que me acolheram durante toda esta jornada de minha vida, dando força e coragem para enfrentar os meus desafios.

Aos meus tios João Carlos e Márcia, e ao meu primo Marcelo, que embora distantes, sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e ensinando que para vencer nesta vida, precisamos de muita luta para conquistar vitórias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar presente em todo os dias de minha vida, pois tenho certeza que Ele nunca me deixou só, durante toda essa minha jornada.

Aos meus pais e aos meus irmãos que sempre me apoiaram, me deram forças e que acreditaram em mim durante toda essa minha trajetória.

Ao orientador Prof. Dr. Gilberto Goissis pela sua orientação, colaboração e estímulo à pesquisa.

A todos meus professores da pós-graduação, pela dedicação ao ensino, incentivo e orientação.

A secretaria do curso de pós-graduação da bioengenharia e especialmente, a Janete pela atenção que sempre me dispensaram.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração do tecido conjuntivo contendo a Matriz Extracelular e células, da qual o colágeno do tipo I é um dos integrantes mais importantes. O fundo cinza representa o colágeno da matriz extracelular.....2
- Figura 2.** Representação esquemática da biossíntese do colágeno por fibroblastos e sua posterior organização na estrutura em forma de fibras.....3
- Figura 3.** Micrografia de pericárdio bovino obtido por Microscopia Eletrônica de Transmissão mostrando o padrão alternado de bandas mais claras e mais escuras que no conjunto é denominado de período **D**.....4
- Figura 4.** Representação esquemática da Matriz Extracelular e seus componentes majoritários.....6
- Figura 5.** Esquema representativo das características estruturais da Laminina e seus domínios funcionais de interação com ligantes.....7
- Figura 6.** Esquema representativo das características estruturais da Fibronectina e seus domínios funcionais de interação com ligantes.....8
- Figura 7.** Representação esquemática de uma Glicosaminoglicana: **a** – Ácido Hialurônico; **b** – Proteoglicana.....10
- Figura 8.** Esquema representativo das características estruturais da tripla hélice e sua formação a partir das cadeias alfa.....13
- Figura 9.** Esquema ilustrativo para a reorganização fibrilar do colágeno do tipo I nos tecidos após sua liberação para o meio extracelular.....16

Figura 10. Representação esquemática da interação do Fosfotungstato de Amônio com grupos carregados positivamente na fibrila de colágeno.....	17
Figura 11. Micrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão de fibras de colágeno do tipo I obtida após impregnação negativa.....	18
Figura 12. a - Micrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão de fibras de colágeno do tipo I obtida após impregnação positiva. Overlap: bandas c₁ , b₂ , b₁ e a₄ . Gap: bandas a₃ , a₂ , a₁ , e₂ , e₁ , d , c₃ e c₂ ; b – Densitometria correspondente à distância de um período D	19
Figura 13. Esquema representativo da distribuição dos aminoácidos no período D de moléculas de Tropocolágeno dispostas alternadamente de $\frac{1}{4}$ de seu comprimento. Representação apenas das bandas b₁ , a₄ , a₃ e a₂	20
Figura 14. Modelo pentafibrilar de Smith para a organização fibrilar do colágeno baseado no deslocamento da molécula de Tropocolágeno de $\frac{1}{4}$ de seu comprimento.....	20
Figura 15. Estrutura primária para o intervalo entre as bandas b₁ – a₂ para o modelo pentafibrilar proposto por Smith: região limite Gap:Overlap	21
Figura 16. Esquema da transdução de sinais provenientes da Matriz Extracelular para o interior da célula.....	26
Figura17. Representação esquemática da estrutura das Integrinas.....	27
Figura 18. Remodelagem do Tecido Ósseo: formação de osso novo por osteoblastos associados à reabsorção simultânea por osteoclastos.....	29
Figura 19. Esquema da remodelagem do osso induzida por estímulos mecânicos.....	30

Figura 20. Esquema representativo das alterações da atividade celular do fibroblasto em função de tensões aplicadas sobre a Matriz Extracelular. Forma relaxada (a) e forma sob tensão (b).....	31
Figura 21. Estrutura química dos aminoácidos Ácido Aspártico, Arginina e Lisina...	32
Figura 22. Modelo para mineralização <i>in vitro</i> de matrizes de colágeno polianiónico com 46 ± 12 cargas adicionais negativas, preparadas por hidrólises de cadeias laterais de resíduos de Asparagina e Glutamina presentes na estrutura colagênica.....	36
Figura 23. Representação esquemática para a formação do trombo plaquetário após trauma da parede vascular.....	38
Figura 24. a - Representação esquemática das relações do colágeno do tipo I com funções teciduais que incluem a adesão celular, moléculas de ancoragem, propriedades estruturais e “Ageing” de acordo com Di Lullo ¹¹ . As posições relativas se referem à molécula de Tropocolágeno com cerca de 1000 resíduos de aminoácidos; b – Representação do Tropocolágeno.....	40
Figura 25. Representação esquemática da molécula de Tropocolágeno.....	50
Figura 26. Representação esquemática da microfibrila de colágeno de acordo com o modelo de Smith. As caixas colocadas entre os segmentos que formam a microfibrila correspondem á estrutura primária de 80 a 90, contando a partir do resíduo N-terminal.....	51
Figura 27. Representação em modelo de bolas e bastão dos aminoácidos ácidos (a) e básicos (b) presentes no colágeno do tipo I.....	53

Figura 28. Representação em modelo de bolas e bastão dos aminoácidos hidrofóbicos presentes no colágeno do tipo I.....	54
Figura 29. Representação esquemática de um segmento da planilha da estrutura primária do período D para ilustrar a origem dos gráficos apresentados neste trabalho.....	55
Figura 30. Distribuição da somatória dos valores numéricos relativos ao Overlap e Gap para os resíduos de Valina, Leucina, Isoleucina, Metionina, e Fenilalanina.....	58
Figura 31. Distribuição dos resíduos de Ácido Aspártico e Glutâmico nas alfas hélices da microfibrila correspondente ao intervalo de um período D	60
Figura 32. Distribuição dos resíduos de Lisina e Arginina nas alfas hélices da microfibrila correspondente ao intervalo de um período D	61
Figura 33. Perfil da distribuição de aminoácidos ácidos mais básicos (área em laranja) e dos hidrofóbicos (linha preta) para a região do período D : Overlap : bandas c1, b2, b1 e a4 . Gap , bandas a3, a2, a1, e2, e1, d, c3 e c2	62
Figura 34. Representação esquemática em três dimensões da distribuição dos aminoácidos hidrofóbicos do período D do colágeno do tipo I.....	63
Figura 35. Representação esquemática tridimensional da distribuição dos aminoácidos hidrofóbicos do período D do colágeno do tipo I ilustrando a formação de canais. Visão de duas posições diferentes (giro de 180 °).	63
Figura 36. Representação esquemática tridimensional aminoácidos ácidos (em vermelho) juntamente com os aminoácidos hidrofóbicos (em preto) para o período D do colágeno do tipo I. Visão de duas posições diferentes (giro de 180 °).....	64

- Figura37.** Representação esquemática tridimensional dos aminoácidos básicos (em azul) juntamente com os aminoácidos hidrofóbicos (em preto) para o período **D** do colágeno do tipo I. Visão de duas posições diferentes (giro de 180 °)64
- Figura 38.** Representação esquemática em três dimensões da distribuição de aminoácidos ácidos mais básicos (em azul) e hidrofóbicos (em preto) para o período **D** do colágeno do tipo I.....65
- Figura 39.** Distribuição dos aminoácidos ácidos e básicos no período: área preenchida em laranja - distribuição normal; linha verde - distribuição resultante da subtração do número de **aa** (ácidos mais básicos) menos o número de aminoácidos hidrofóbicos.....67
- Figura 40.** Ilustração da formação de pontes salina entre dois aminoácidos (**a**) e numa proteína (**b**, seta).....68
- Figura 41.** Representação esquemática para a resultante total de cargas na molécula de Tropocolágeno do tipo I com base na sua estrutura primária.70
- Figura 42.** Curva em laranja: distribuição normal de aminoácidos ácidos e básicos no período **D**; Curva em preto: distribuição normal dos aminoácidos hidrofóbicos; Curva em verde: resultante da distribuição de cargas ao longo do período **D**.....71
- Figura 43.** Curva em preto: distribuição normal dos aminoácidos hidrofóbicos; Curva em verde: resultante da distribuição de cargas ao longo do período **D**.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de colágeno com cerca de 300 nm de comprimento e com um domínio helicoidal ininterrupto.....	12
Tabela 2. Números de resíduos de aminoácidos presentes na tripla hélice do colágeno do tipo I.....	15
Tabela 3. Localização de eventos de natureza estrutural associado ao período D do colágeno do tipo I. Identificação do ligante e sítio da interação.....	41
Tabela 4. Localização de eventos que envolvem ligantes associados à adesão celular e, relacionados com o período D do colágeno do tipo I. Identificação do ligante e sítio da interação.....	42
Tabela 5. Localização das seqüências e/ou integrinas envolvidas na adesão celular associados ao período D do colágeno do tipo I. Identificação da célula e sítio da interação.....	44
Tabela 6. Localização de eventos de natureza química associados ao período D do colágeno do tipo I. O agente e o sítio da interação.....	45
Tabela 7. Distribuição dos aminoácidos ácidos, básicos e hidrofóbicos no Overlap e Gap do período D do colágeno tipo I.....	57
Tabela 8. Resumo da localização das interações de ligantes com o colágeno do tipo I e sua identificação dentro do período D	73
Tabela 9. Número de eventos envolvendo as zonas Overlap e Gap do Período D do colágeno do tipo I nas atividades da Matriz Extracelular.....	75
Tabela 10. Número de eventos envolvendo o colágeno do tipo I nas atividades da Matriz Extracelular nas zonas: mistas (regiões formando aglomerados de aminoácidos hidrofóbicos, ácidos e básicos em cinza); bolsões ou canais (regiões de densidades de cargas positivas e/ou negativas delimitadas por regiões hidrofóbicas em amarelo).....	76

RESUMO

GOISSIS, A. P. A. **Análise estrutural do colágeno do tipo I. Correlação estrutura: atividade biológica.** 2007. 98 f. Dissertação (Mestrado)- Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia-Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2007.

Além das funções mecânicas, sabe-se que o colágeno do tipo I é um dos componentes mais ativos na modulação das atividades biológicas que ocorrem na matriz extracelular (MEC) tais como a adesão celular, a coagulação e a mineralização do osso. Estes eventos ocorrem nos limites do período **D**, que é provavelmente o domínio funcional que mais prevalece em relação à transferência da informação extracelular para o interior da célula. O objetivo deste trabalho foi estudar as correlações existentes entre as atividades biológicas da MEC e as características estruturais do colágeno do tipo I, principalmente em relação à distribuição topográfica dos aminoácidos (**aa**) ácidos, básicos e hidrofóbicos. A metodologia empregada foi baseada em informações já existentes sobre a estrutura colágeno do tipo I e suas atividades relacionadas com a MEC. Os resultados mostraram que **aa** ácidos, básicos e hidrofóbicos formam duas regiões distintas. Em uma delas, **aa** ácidos e básicos se alojam em áreas delimitadas por **aa** hidrofóbicos; na outra, **aa** básicos, ácidos e hidrofóbicos formam aglomerados localizados principalmente nas proximidades dos limites **Overlap:Gap**. Exceto para os eventos de natureza estrutural são as regiões do colágeno do tipo I mais envolvidas na modulação das atividades da MEC, com a interface **Overlap:Gap** funcionando como um divisor do controle destas atividades. Enquanto 83,2% das atividades de adesão estão localizadas na zona do **Overlap**, 93,3% das atividades de natureza estruturais ocorrem a partir da zona limite **Overlap:Gap** e em direção à zona **Gap**. Embora nenhuma correlação possa ter sido estabelecida para a resultante de carga, sugere-se que a participação do colágeno do tipo I nas atividades da MEC, possa estar associada á diferenças de interações dos ligantes (carga, massa molecular e hidrofobicidade) com gradientes eletrostático e hidrofóbico existentes ao longo do período **D**.

Palavras-chave: Colágeno. Correlação estrutural. Atividade biológica. Matriz extracelular.

ABSTRACT

GOISSIS, A. P. A. **Structural analysis of type I collagen. Structure activities relationships.** 2007. 98 f. Dissertation (master degree)- Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia-Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2007.

Besides mechanical function, it is known today that type I collagen plays a major role in the modulation of many of the activities occurring in the extra-cellular matrix (ECM) such as cell adhesion, coagulation cascade and mineral deposition during bone formation. All these events occur by interaction of cells and ligands within the **D**-period of collagen microfibril assembly, which is perhaps the most prevalent module of ECM information in the body. The purpose of this work was the study of correlations between the biological activities of ECM and the structural features of collagen associated with the distribution of acidic, basic and hydrophobic amino acids (**aa**) within the **D** period. The methodology used was based on existing information with respect to the structure of type I collagen and its function with respect to ECM activities. The results showed that acidic, basic and hydrophobic **aa** are found in two major distinct regions: one in which acidic and basic **aa** are located in areas defined by hydrophobic **aa** barriers; the other in which acidic, basic and hydrophobic **aa** forming clusters located preferentially in the boundaries of the **Overlap:Gap** zones. Except for the structural event, these clusters are the major sites for the interaction involving cell adhesion. The results also suggest that the **Overlap:Gap** interface function as a borderline for collagen interactions with ECM since 83,2% of the activities related to cell adhesion are located in the **Overlap** region while 93,3% of the activities of structural nature are enclosed within the limiting zone of **Overlap:Gap** to the direction of the **Gap** zone. Although no correlation could be established for net charge along the **D** period it is suggested that type I collagen participation in the activities of the ECM may also be associated to differences in ligand interactions (charge, molecular mass and hydrophobicity) with the electrostatic and the hydrophobic gradients that exists within the **D** period.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

I. INTRODUÇÃO

I.1. A Matriz extracelular	5
I.1.1. Constituintes macromoleculares presentes em todos os tecidos	6
I.1.1.1. Proteínas não colagênicas	6
I.1.1.2. Colágeno	11
I.1.1.2.1. Estrutura do colágeno do tipo I	12
I.1.1.2.2. Composição química	13
I.1.1.2.3. Organização do colágeno do tipo I	16
I.1.2. Componentes presentes apenas em tecidos mineralizados	22
I.1.2.1. Componentes comuns aos dois tecidos	22
I.1.2.2. Componentes exclusivos do Tecido Ósseo	23
I.1.2.3. Componentes exclusivos da Dentina	24
I.2. A Interação célula:matriz extracelular	25
I.2.1. Transdução de sinais mediados por Integrinas	27
I.3. Controle da atividade celular	28
I.3.1. Com base na adesão	29
I.3.1.1. Remodelagem de tecidos	29
I.3.1.1.1. Tecido Ósseo	29
I.3.1.1.2 Tecido Mole	30
I.3.1.1.3 Ageing	32
I.3.2. Com Base na interação macromolecular	33
I.3.2.1. Biomineralização do Tecido Ósseo	33
I.3.2.2. Processo de coagulação: plaquetas e a homeostase	37
I.4. Localização das interações de ligantes com o colágeno do tipo I e sua identificação dentro do período D	39
II. OBJETIVOS	48
III. METODOLOGIA	50

III.1. Descrição do mapa de distribuição da estrutura primária das cadeias alfas que formam a microfibrila de acordo com o Modelo de Smith.....	50
III.2. Elaboração dos gráficos.....	52
A – Programa Origin.....	52
B – Programa Excel – Windows 98.....	55
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
IV.1. Análise estrutural do colágeno do tipo I.....	56
IV.2. Distribuição dos aminoácidos ácidos, básicos e hidrofóbicos presentes no período D da Microfibrila.....	57
IV.3. Análise da distribuição dos aminoácidos de acordo com o Modelo de Smith.....	61
IV.4. Características ácido-básicas das regiões do período D do colágeno envolvidas na interação com a MEC.....	68
IV.5. Características das Inter-relações do colágeno tipo I com eventos da matriz extracelular.....	73
V. CONCLUSÕES.....	79
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
VII. ANEXOS	91

I. INTRODUÇÃO

No novo conceito de biomateriais, estes não devem servir apenas para o preenchimento de espaços (RATNER, 1993), mas também devem estimular uma resposta biológica, quando implantados. O desenvolvimento desses biomateriais está baseado não apenas na função que se deseja substituir, mas nas relações entre estrutura e propriedade dos materiais (LANGER et al., 1990). Nesta categoria enquadram-se os materiais inteligentes (HOFFMAN, 1995), biomiméticos (MARK, 1994) e as Matrizes Extracelulares sintéticas (MECs) destinados principalmente à engenharia de tecido (KIM, 1998). Dentro destes novos conceitos, o colágeno, principalmente o colágeno tipo I vem desempenhando um papel preponderante, não apenas em virtude de suas propriedades como material (MATSUI, 1996), mas também pela sua participação nas interações célula: Matriz Extracelular (MEC) (RATNER, 1993) cuja resultante é a manutenção da homeostase dos tecidos.

O termo colágeno deriva da palavra grega que significa cola e sua primeira definição surgiu em 1983 no dicionário de Oxford (ALBERTS, 1994) como sendo aquele constituinte dos tecidos que, por aquecimento, dá origem à gelatina. É o principal constituinte dos seres vivos e além de ser encontrado em abundância na pele, tendão, vasos sanguíneos, cartilagem, osso, córnea, está presente também nos interstícios de todos os outros tecidos e órgãos, com exceção do sangue, linfa e tecidos queratinosos.

Figura 1. Ilustração do tecido conjuntivo contendo a Matriz Extracelular e células, da qual o colágeno tipo I é um dos integrantes mais importantes. O fundo cinza representa o colágeno da Matriz Extracelular.

No ser humano, o colágeno corresponde à cerca de 25% da proteína total (ALBERTS, 1994) e, por conseguinte, a 6% do peso corporal. Até recentemente, sua principal função era somente a de manter a estrutura física de uma espécie, devido à sua grande resistência mecânica conferida pela sua organização macromolecular, que resulta na formação de fibras, principalmente no caso do colágeno tipo I (Figura 1), tecido ósseo (TO) e tendões.

É produzido na forma de pró-colágeno, pelos fibroblastos (tecido conjuntivo), células musculares lisas (parede vascular) e osteoblastos (células formadoras do TO) (KRUKOWSKI et al., 1995). Uma vez lançado para o meio extracelular, perde parte de sua estrutura protéica e, por um processo denominado fibrilogênese, que consiste

do empacotamento lateral e longitudinal das moléculas de tropocolágeno dá origem a estruturas fibrilares (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática da biossíntese do colágeno por fibroblastos e sua posterior organização na estrutura em forma de fibras.

O colágeno mais importante é o do tipo I que é responsável não apenas pela manutenção da integridade da maioria dos tecidos em função das suas propriedades mecânicas (RAMACHANDRAN, 1967), mas também por sua participação ativa na funcionalidade dos tecidos em função de sua interação com as células presentes na MEC. Está presente em todos os vertebrados, e incluído na lista das maiores e mais complexas macromoléculas encontradas no reino animal. Juntamente com outras macromoléculas formam o que se denomina MEC (HAY, 1992).

Mais recentemente (DI LULLO et al., 2002) uma questão relevante em relação ao colágeno tipo I vem sendo levantada e diz respeito à relação entre a unidade física “período **D**” (Figura 3) e sua participação no controle de eventos

biológicos envolvendo a atividade celular frente a estímulos que, no conjunto, preservam a funcionalidade biológica dos tecidos (LODISH et al., 1995). Na Figura 3, a denominação período **D**, na fibrila de colágeno, corresponde à distância limitada por uma zona clara e uma escura disposta consecutivamente como indicada pelas setas (Figura 3).

Figura 3. Micrografia de pericárdio bovino obtido por Microscopia Eletrônica de Transmissão mostrando o padrão alternado de bandas claras e escuras que no conjunto é denominado de período **D**.

Embora não seja possível separar com uma linha divisória bem definida, pois na grande maioria são eventos interligados, por uma questão didática, este trabalho divide as interações matrizes: eventos teciduais em duas categorias:

1 – Eventos onde a expressão da atividade depende da adesão celular sobre a MEC. Esses processos são resultantes tanto de alterações bioquímicas como da ação mecânica sobre os tecidos (GUMBINER, 1996). Nesta categoria estão enquadrados, por exemplo, a dinâmica da remodelagem óssea (POLLACK, 1984), a remodelagem

de tecido mole (HODDE, 2002) e o Ageing (BAILEY, 2001). Esses processos são afetados pela simples presença, da seqüência de **aa** Arg, Gly, Asp quer na estrutura primária do colágeno tipo I, quer em outras proteínas da MEC tal como na Fibronectina. As seqüências aminoácidos (**aa**) – Arg – Gly - Asp - é das mais importantes para adesão celular e a ancoragem de moléculas funcionais presentes na MEC (HYNES, 2002; BHADRIRAJU; LINDA, 2000), apesar de existirem outras seqüências de **aa**, que também são responsáveis pela adesão celular (KNIGHT et al., 1998).

2 - Eventos teciduais resultantes de interações químicas macromoleculares que ocorrem na MEC; principalmente interações eletrostáticas, a partir das quais são desencadeados eventos tão importantes quanto aqueles resultantes da adesão celular. Um exemplo é a interação da Fosfoforina (DAHL; SABSAY; VEIS, 1998) com colágeno tipo I que, nos dentes, dispara o processo de mineralização pela deposição de Hidroxiapatita (HA) resultando na formação da Dentina. A Fosfoforina é uma proteína exclusiva da Dentina (HIDALGO; ITANO; CONSOLARO, 2005).

I.1. A Matriz Extracelular

A MEC é um produto celular complexo formado por glicoproteínas, colágeno, glicosaminoglicanas (GAGs) e proteoglicanas (PG) como componentes estruturais majoritários mais importantes. Estes componentes são excretados pelas células e se organizam no meio extracelular por meio de interações múltiplas com receptores específicos, situados na membrana citoplasmática (ZAGRIS, 2001). Além da função estrutural, controlam a pressão oncótica e as propriedades mecânicas. Esquemáticamente a MEC é mostrada pela Figura 4. Como será descrito a seguir,

existem na MEC componentes comuns a todos os tecidos, e outros apenas em alguns, como acontece, nos tecidos mineralizados.

Figura 4. Representação esquemática da Matriz Extracelular e seus componentes majoritários.

I.1.1. Constituintes macromoleculares presentes em todos os tecidos.

Esta divisão está baseada nas características químicas das macromoléculas, a maioria polissacarídeos, proteínas ou suas associações.

I.1.1.1. Proteínas não colagênicas

1 – Glicoproteínas (GLYCOSAMINOGLYCANAS, 2006; TENÓRIO; SANTOS; ZORN, 2003).

Seu número é bastante variável e incluem a Fibronectina, Bronectina, Tenascina, Entactina e Laminina. Essas macromoléculas estão envolvidas no processo da adesão celular, em etapas específicas do desenvolvimento dos tecidos. São moléculas que contém múltiplos sítios de ligação podendo interagir entre si, com outras moléculas da MEC, ou com a superfície celular. São responsáveis pela

organização do colágeno, das PG e das células em uma estrutura ordenada, configurando o que chamamos de tecido.

A – Lamininas: são glicoproteínas triméricas caracterizadas por apresentar elevada massa molecular e presentes como componentes majoritários da MEC, da membrana basal e dos tecidos embrionários. Uma molécula de Laminina típica (Figura 5) é formada por três cadeias polipeptídicas distintas, caracterizadas por funções variadas, atribuídas a diferentes domínios funcionais existentes na sua estrutura. Um domínio é uma região específica de uma proteína e responsável por uma função biológica bem definida.

Figura 5. Esquema representativo das características estruturais da Laminina e seus domínios funcionais de interação com ligantes.

Suas interações com as células acontecem sempre através das Integrinas, receptores existentes na membrana celular, e parciais responsáveis pelo início dos sinais intracelulares de transdução. A Laminina é importante na adesão celular, migração direcional, modulação mitogênica, direcionamento do axônio, manutenção do fenótipo de célula diferenciada e a indução de novas maneiras de expressão celular. Liga-se também ao colágeno tipo IV e a Ebronectina.

B - Entactina: aparece nos estágios iniciais da fibrilogênese e aparentemente, está relacionada com a migração direcional das células.

C - Fibronectina: é uma proteína formada por duas cadeias polipeptídicas iguais, e como a Laminina, apresenta domínios múltiplos de adesão. Podem ligar-se ao colágeno, Entactina, GAGs e células, em processos importantes para a migração celular, durante a gastrulação. A Fibronectina tem importância, também, na regulação do gen responsável pela produção da collagenase, uma enzima específica para a degradação do colágeno.

Figura 6. Esquema representativo das características estruturais da Fibronectina e seus domínios de interação com ligantes.

2. Glicosaminoglicanas

Glicosaminoglicanas (GAGs) são componentes majoritários da MEC, e importantes nos processos que controlam a proliferação celular, a migração, a diferenciação e a manutenção das estruturas morfogênicas. As mais importantes, do ponto de vista fisiológico, são o ácido hialurônico, o sulfato de condroitina, o sulfato de dermatana, o sulfato de queratana e o sulfato de heparana. Suas unidades básicas são dissacarídeos, formados por uma molécula de ácido urônico e uma de N-acetylgalactosamine ou de N-acetylglucosamine. As GAGs apresentam alta massa molecular, com um número elevado de cargas negativas localizadas na superfície das células ou na MEC. O ácido hialurônico é o único, entre as GAGs, que não contém o grupo sulfato e também não está ligado covalentemente a proteínas. Sua massa molecular pode variar entre 100,000 - 10,000,000 D. Em relação à sua associação com proteínas, as GAGs podem ser divididas em dois grandes grupos:

A – O grupo dos Ácidos Hialurônicos: formado por milhares de unidades do dissacarídeo ácido d-hialurônico - N-acetil-d-glucosamina (Figura 7a), dando origem a moléculas de milhões de Daltons de massa molecular e que formam, na MEC, complexos com as PG, sem a participação de ligações covalentes.

B – O grupo das Proteoglicanas: é composto de macromoléculas formadas pela associação das outras GAGs, por meio de ligação covalente, e caracterizadas por elevada massa molecular (Figura 7b).

Dentre as PG mais importantes estão a Decorina e a Biglicana (TENÓRIO; SANTOS; ZORN, 2003; BHADRIRAJU; LINDA, 2000) com massa molecular reduzida e rica em leucina. São formadas por uma proteína central estrutural, na qual várias moléculas de GAGs estão covalentemente ligadas (Figura 7b). Intervêm em

vários processos celulares que incluem a proliferação, a migração, a adesão e agregação celular. São importantes no controle dos processos inflamatórios, remodelagem e mineralização (HOSHI et al., 1999).

Figura 7. Representação esquemática de uma glicosaminoglicanas: **(a)** Ácido Hialurônico **(b)** Proteoglicana.

Em relação ao colágeno, sua função é manter íntegra a estrutura fibrilar, ao mesmo tempo em que esconde os sítios potenciais que dão origem não apenas a mineralização, mas também a outros eventos celulares (DOUGLAS et al., 2000). O sítio de ligação da Decorina ao colágeno parece ser o mesmo, onde deformações

estruturais ocorrem induzidas por ações mecânicas (BARENBERG; FILISKO; GEIL, 1978). As concentrações da Biglicana e Decorina são bastante elevadas na pré-dentina (RIMINUCCI; BIANCO, 2003).

3 – Osteopontina (SREENATH et al., 2003)

Embora seja uma glicoproteína, é descrita separadamente. Pertence à família das Sialoproteínas encontradas na MEC de todos os tecidos, mas tem função importante no tecido ósseo (TO). No TO, depois do colágeno é o componente protéico mais abundante. É rica em resíduos de Ácido Aspártico (Asp) e torna-se mais ácida após a fosforilação dos resíduos de Serina (Ser) e Treonina (Thr), presentes na sua estrutura primária. Têm vários domínios para adesão celular do tipo Arg-Gly-Asp importantes para a adesão de osteoblastos e osteoclastos. Sua concentração nos tecidos aumenta significativamente na presença de doenças tais como câncer, aterosclerose, estenose de biopróteses valvulares e infarto do miocárdio.

I.1.1.2. Colágeno

Em relação aos tipos, resultantes do processo biossintético, os colágenos são formados de 19 cadeias α diferentes (cadeia α : denominação dada a cada cadeia polipeptídica que forma a tripla hélice do colágeno) e que por associação 3 a 3, dão origem à, pelo menos, 27 tipos diferentes de colágeno. Estes são classificados em três grandes grupos, em função das características da organização macromolecular da tripla hélice (SILVA, 2005):

1 - Moléculas com cerca de 300 nm de comprimento, com um domínio helicoidal ininterrupto, dos quais alguns exemplos são mostrados na Tabela 1. São

encontrados nos diferentes tipos de tecidos e sua classificação é feita de acordo com as características da estrutura primária das cadeias α que formam a tripla hélice.

2 - Moléculas com domínios helicoidais ininterruptos com comprimento igual ou maior que 300 nm;

3 - Moléculas menores que 300 nm de comprimento com domínios helicoidais ininterruptos ou não.

O colágeno tipo I, enfoque principal deste trabalho, é formado por três cadeias polipeptídicas do tipo $\alpha_1(I)$, $\alpha_1(I)'$ e $\alpha_2(I)$. Nos tecidos, é encontrado na forma de fibras com diâmetros entre 80 e 160 nm, formando as estruturas do sistema vascular, tendões, tecido ósseo e muscular.

Tabela 1. Tipos de colágenos com cerca de 300 nm de comprimento e com um domínio helicoidal ininterrupto.

Tipo	Composição em α hélice	Localização
I	$[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$	Pele, tendão, ossos, córnea.
II	$[\alpha_1(II)]_3$	Cartilagem, humor vítreo.
III	$[\alpha_1(III)]_3$	Vasos sanguíneos, trato gastrointestinal.
IV	$[\alpha_1(IV)]_2\alpha_2(IV)]$	Membrana basal.

I.1.1.2.1. Estrutura do colágeno tipo I (SILVA, 2005)

O colágeno tipo I é formado por três cadeias polipeptídicas caracterizadas pela repetição de um triplete Gly-X-Y onde X é, geralmente, uma Prolina (Pro) e Y é uma Hidroxiprolina (Hypro) (Figura 8). Nas cadeias α , a distância entre dois resíduos consecutivos de Gly é 8,7 Å e, no eixo maior da tripla hélice, cada resíduo de **aa** contribui na descendência em cerca de 2,8 Å. As posições X e Y além da Pro ou

Hypro podem ser ocupadas por outros **aa** naturais. Esta estrutura corresponde à sua unidade monomérica e recebe o nome de Tropocolágeno.

Figura 8. Esquema representativo das características estruturais da tripla hélice e sua formação a partir das cadeias alfa.

Cada cadeia α apresenta uma massa molecular de aproximadamente 100.000 mol/g e, para o caso do colágeno tipo I, a cadeia alfa-1 contém 1056 resíduos de **aa** e a alfa-2 1038 resíduos, dando origem a uma tripla hélice com cerca de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. Além da região helicoidal, existem nas extremidades, seqüências que não fazem parte desta estrutura e são denominadas de telopeptídeos N- terminal com 16 resíduos de **aa** e C-terminal com 26 resíduos de **aa** (Figura 8) (SILVA, 2005).

I.1.1.2.2 Composição química

Em relação aos **aa** mais significativos o colágeno tipo I apresenta uma concentração de Gly de 33%, a Pro de 12% e a Hypro 11%. As concentrações para os outros **aa** constituintes são mostradas abaixo (Tabela 2).

Resumidamente, em relação ao conteúdo de **aa**, podemos dizer que o colágeno tipo I apresenta as seguintes características:

A - 0,7% de Hidroxilisina (Hyl);

B - Não possui Triptofano (Trp) e os resíduos de Tirosina encontram-se exclusivamente na região dos telopeptídeos, que correspondem às regiões não helicoidais do Tropocolágeno;

C - Os **aa** polares constituem quase 40% da molécula: 11% são básicos e 9% ácidos, os outros 17%, correspondem a **aa** hidroxilados;

D - Cerca de 4% dos resíduos correspondem a amidas de Asp e Glutâmico (Glu).

E - Uma das características da estrutura primária que diferencia o colágeno de outras proteínas é a presença, em altas concentrações, de Gly, Pro, e Hypro em concentrações menores. Estes dois últimos se originam da hidroxilação dos resíduos de Pro e Lys, após o processo de tradução.

F - A distribuição ordenada dos **aa** no período **D** tem origem na interação particular das moléculas de Tropocolágeno para a formação das estruturas fibrilares, e está presente como unidade repetitiva, em todos os colágenos formados por triplas hélices, não segmentados (CHAPMAN; TZAPHLIDOU; MEEK, 1990), cuja origem será mostrada a seguir.

Tabela 2. Número de resíduos de aminoácidos presentes na tripla hélice do colágeno tipo I.

Aminoácido	Cadeia		Aminoácido	Cadeia	
	Alfa-1	Alfa-2		Alfa-1	Alfa-2
<u>Estruturais</u>			<u>Hidrofóbicos</u>		
Glicina	345	346	Leucina	9	18
Hidroxiprolina	114	99	Isoleucina	22	33
Prolina	127	108	Metionina	7	4
<u>Básicos</u>			Fenilalanina	13	15
Lisina	34	21	Tirosina	5	4
Arginina	53	56	Valina	17	34
Histidina	3	8	<u>Outros</u>		
Hidroxilisina	4	9	Alanina	124	111
<u>Ácidos/Amidas</u>			Treonina	17	20
Ácido Aspártico	33	24	Serina	37	35
Asparagina	13	23			
Ácido Glutâmico	52	46			
Glutamina	27	24			

Uma vez fora da célula, o tropocolágeno organiza-se, formando estruturas fibrilares (Figura 9).

Figura 9. Esquema ilustrativo para a reorganização fibrilar do colágeno tipo I nos tecidos após sua liberação para o meio extracelular.

I.1.1.2.3. Organização do colágeno tipo I

Muito do que se sabe da organização macromolecular do colágeno, foi pela avaliação, por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (CHAPMAN; TZAPHLIDOU; MEEK, 1990), de amostras impregnadas com sais de metais pesados, principalmente com o Acetato de Uranila (AU^{1+}) e Fosfotungstato de Amônio (FTA^{3-}).

Para entendermos melhor a origem do período **D** e sua natureza, será feita uma breve descrição das técnicas utilizadas para impregnação de materiais de colágeno com metais pesados. Basicamente, resume-se a duas técnicas, onde as imagens geradas são uns reflexos da distribuição dos metais pesados sobre a estrutura fibrilar.

A - Impregnação negativa

Amostras são imersas seqüencialmente em soluções de Acetato de Uranila (AU) e Fosfotungstato de Amônio (FTA), e em seguida, submetidas à técnica de MET. Neste caso, a micrografia (semelhante a um negativo de fotografia comum) é resultante da interação dos feixes de elétrons com AU e FTA, fixados na matriz por dois mecanismos: 1 – simples distribuição das substâncias nos espaços vazios existentes na matriz; 2 – por interação eletrostática dos ânions e cátions dos metais pesados, com sítios carregados negativa e positivamente. No caso do AU com sítios de cargas negativas (resíduos de Asp e Glu) e, no caso do FTA, com sítios de cargas positivas (Lys, Arg, His e Hyl), como mostradas pela Figura 10.

Figura 10. Representação esquemática da interação do Fosfotungstato de Amônio com grupos carregados positivamente na fibrila de colágeno.

No caso de matriz de colágeno tipo I (Figura 11) a imagem mostra uma estrutura formada alternadamente por zonas escuras e clara, que somadas, têm cerca de 67 nm. A zona mais clara com cerca de 31 nm, foi denominada de **Overlap** e a mais escura, com cerca de 36 nm, foi denominada de **Gap**. O conjunto **Overlap: Gap** é o período **D** da estrutura fibrilar do colágeno tipo I.

Figura 11. Micrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão de fibras de colágeno tipo I obtida após impregnação negativa.

B - Impregnação positiva

A técnica consiste, simplesmente, na lavagem da amostra, após a impregnação negativa. Este processo de lavagem remove o AU e o FTA distribuídos fisicamente nos espaços vazios e os metais pesados restantes são aqueles ligados eletrostaticamente a sítios positivos ou negativos existentes na matriz. Portanto, a imagem resultante é um reflexo da distribuição dos **aa** básicos e ácidos presentes e mostra que, na estrutura da fibrila, estes **aa** não estão distribuídos aleatoriamente, como evidenciados pelas bandas existentes. Estas bandas mostram que, no sentido transversal da fibrila, os **aa** ácidos e básicos estão concentrados transversalmente à fibrila de colágeno, distribuídas em zonas perpendiculares ao eixo maior do período **D**, bem definidas e também periódicas (Figura 12a). Estes sub-períodos no **Overlap**, zona de maior densidade de **aa**, foram denominados de bandas **c₁**, **b₂**, **b₁** e **a₄**. No **Gap**, a zona de menor densidade de **aa**, estes sub-períodos foram denominados de bandas **a₃**, **a₂**, **a₁**, **e₂**, **e₁**, **d**, **c₃** e **c₂** (Figura 12a).

Figura 12. a - Micrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão de fibras de colágeno tipo I obtida após impregnação positiva. **Overlap**: bandas **c₁**, **b₂**, **b₁** e **a₄**. **Gap**: bandas **a₃**, **a₂**, **a₁**, **e₂**, **e₁**, **d**, **c₃** e **c₂**; **b** – Densitometria correspondente à distância de um período **D**.

A Figura 13 mostra um perfil de distribuição de **aa** ácidos e básicos, no sentido transversal de uma fibrila (unidade básica da fibrila), apenas das regiões correspondentes aos sub-períodos **b₁** até **a₂**, onde fica caracterizada a distribuição preferencial dos **aa** ácidos e básicos ao longo do período **D** (CHAPMAN; TZAPHLIDOU; MEEK, 1990).

Com base no padrão de interação de cátions e ânions, de metais pesados com materiais de colágeno tipo I, Smith (1998) propôs um modelo (Figura 14), aceito até hoje, criando a microfibrila como unidade básica da estrutura fibrilar. Este modelo, denominado de penta-fibrilar quarto alternado, é formado (Figura 14) por cinco moléculas de Tropocolágeno justapostas ao longo de um eixo longitudinal e

deslocadas umas das outras em $\frac{1}{4}$ de seu comprimento, ou seja, cerca de 234 resíduos de aa. O modelo justifica a formação de bolsões de aa ácidos e básicos como mostrado pela sua estrutura primária (Figura 15), que tem a mesma distribuição quantitativa que aquela da densitometria mostrada na Figura 12b, e obtida experimentalmente.

Figura 13. Esquema representativo da distribuição dos aminoácidos no período D de moléculas de tropocolágeno dispostas alternadamente de $\frac{1}{4}$ de seu comprimento. Representação apenas das bandas **b1**, **a4**, **a3** e **a2**.

Figura 14. Modelo pentafibrilar de Smith para a reorganização fibrilar do colágeno baseado no deslocamento da molécula de tropocolágeno de $\frac{1}{4}$ de seu comprimento.

I.1.2. Componentes presentes apenas em tecidos mineralizados

Os componentes mais importantes dos tecidos mineralizados são os elementos celulares, a fase mineral, colágeno tipo I, PG e proteínas ácidas.

O tecido ósseo (KAPLAN et al., 1996) tem funções de sustentação, proteção de órgãos internos vitais, produção de células sanguíneas e armazenamento de cálcio, o qual tem papel importante na contração muscular, secreções, impulsos nervosos e outros mecanismos. Da massa total do osso, 75 % estão sob a forma de HA ($C_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), depositada sobre as fibras colagênicas, sendo que a relação cálcio/fósforo (Ca/P) pode variar entre 1,5 a 1,77. A HA pode estar associada, também, aos ânions citrato, carbonato, fluoreto e o íon hidroxila (MAITLAND; ARSENAULT, 1991).

A **Dentina** (HIDALGO; ITANO; CONSOLARO, 2005) é encontrada apenas nos dentes. Sua composição química é semelhante ao TO, com o colágeno encontrado em concentrações de cerca 90%, associado a uma HA rica em carbonato (CO_3^{-2}). As outras proteínas existentes, na sua maioria, são proteínas ácidas, algumas encontradas também no TO e outras encontradas exclusivamente na dentina. Histologicamente, a Dentina é formada por duas zonas distintas, a pré-dentina, onde estão os odontoblastos e a frente de mineralização, separadas entre si por uma distância entre 10-30 μm . Assim como no TO, o processo de biomineralização envolve uma interação complexa entre célula, odontoblastos, colágeno e proteínas não colagênicas. Em roedores, sua formação é contínua em virtude do desgaste permanente.

I.1.2.1. Componentes comuns aos dois tecidos.

As proteínas da MEC de Dentina e TO podem ser divididas em duas categorias: as colagênicas e não colagênicas. Estas últimas, na sua maioria, são

proteínas ácidas do tipo PG (Decorina e Biglicana) (BHADRIRAJU; LINDA, 2000; TENÓRIO; SANTOS; ZORN, 2003), osteopontina, sialoproteína bovina ou BSP, osteonectina (HARRIS et al., 2000; ALDINGER et al., 2001) e osteocalcina (BERDAL et al., 1991).

Proteínas Não Colagênicas Comuns aos dois Tecidos

- **SIALOPROTEÍNA BOVINA (BSP)** (HARRIS et al., 2000; ALDINGER et al., 2001)

A BSP é produzida por células osteogênicas totalmente maduras, portanto, capazes de depositar uma matriz mineral, mas apenas nos estágios iniciais da mineralização. Da mesma forma que a Decorina, a BSP tem grande afinidade pelo colágeno tipo I e sua interação ocorre, também, na vizinhança da interface **Overlap:Gap** do período **D**, da estrutura fibrilar do colágeno. Apresenta, na sua estrutura primária, a seqüência Arg-Gly-Asp e, portanto, está envolvida com a interação matriz:célula.

- **OSTEOCALCINA** (BERDAL et al., 1991)

Corresponde à cerca de 10% do total das proteínas não colagênicas e é produzida por osteoblastos. Sua concentração, estequiometricamente, é aproximadamente igual ao número de moléculas de Tropocolágeno presentes no osso e é produzida apenas nos estágios finais da mineralização.

I.1.2.2. Componentes exclusivos do Tecido Ósseo.

PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS (BMPS) (ALDINGER et al., 2001).

É um conjunto de várias proteínas capazes de induzir a formação de TO quando implantadas no subcutâneo ou no tecido muscular, razão pela qual foram denominadas de proteínas morfogenéticas do TO. Sua função exata ainda não é conhecida, mas sabe-se que tem um papel importante no desenvolvimento de TO, principalmente na embriogênese.

I.1.2.3. Componentes exclusivos da Dentina (BENIASH et al., 1991; HE et al., 2003)

A - FOSFOPROTEÍNA SIÁLICA DENTINÁRIA (DSPP): é uma proteína que dá origem a sialoproteína dentinária (DSP) e a fosfoproteína dentinária (DPP). Até recentemente, pensava-se pertencerem exclusivamente à dentina. Sabe-se hoje que DSP e DPP também são produzidas no TO numa razão de concentração estimada de 1:400.

B - FOSFOPROTEÍNA DENTINÁRIA (DPP): é uma proteína, localizada na frente de mineralização, ricas em seqüências de **aa** contendo resíduos de Asp e Fosfoserina. Tem uma grande afinidade com cálcio.

C - SIALOPROTEÍNA DENTINÁRIA (DSP): é uma glicoproteína perfazendo cerca de 5% do total das proteínas não colagênicas. Apresenta um alto grau de fosforilação sendo rica em seqüências de **aa** contendo resíduos de Asp. Está associada ao crescimento da HA. Apresenta também a seqüência Arg-Gly-Asp para adesão celular.

D - MATRIZ PROTÊICA DENTINÁRIA (DMP1): é uma proteína ácida rica em Ser e Asp, produzida por odontoblastos maduros, e envolvida ativamente na produção da matriz mineralizada da Dentina.

E - MATRIZ PROTÊICA DENTINÁRIA (DMP2) (BENIASH et al., 1991): também chamada Fosfoforina e, depois do colágeno, é a proteína mais abundante na Dentina. É uma proteína exclusiva da Dentina, apresentando um elevado grau de fosforilação. Fosfoforinas de várias fontes contêm entre 35% e 45% resíduos de Asp e 40 a 55% de Ser, dos quais 90% se encontram fosforilados. Têm um pI de 1,1 e só são observadas na fase inicial da mineralização. Seu sítio de ligação com o colágeno ocorre próximo à interface **Overlap:Gap** (DAHL; SABSAY; VEIS, 1998). Esta ligação ocorre com alterações conformacionais do colágeno, com um encurtamento das distâncias interbandas nesta região (DAHL; SABSAY; VEIS, 1998).

1.2. A Interação célula:matriz extracelular (LODISH et al., 1995; GUMBINER, 1996; HYNES, 2002; BHADRIRAJU; LINDA, 2000).

A MEC interage com as células promovendo ou regulando funções tais como a migração, a adesão, proliferação, diferenciação e morfogênese. Este controle é exercido pela interação entre múltiplos sítios que formam a MEC dando origem a uma MEC estável. A célula, por sua vez, responde por meio de receptores colocados na membrana celular que incluem as Integrinas e não Integrinas. Em resumo:

A - A célula interage com o meio externo por meio de proteínas presentes na membrana celular cuja função é intermediar a transposição de informações originadas na MEC, para seu interior;

B - Muitas destas proteínas são receptores caracterizados por sítios de ligação com a MEC acoplada a um sistema de sinalização que regula ou modifica a atividade celular;

C - Quando um receptor interage com seu ligante específico, normalmente uma macromolécula da MEC, como resposta a um sinal recebido e às alterações conformacionais que ocorrem, a célula inicia uma reação em cascata intermediada por enzimas, resultando na amplificação deste sinal. Esta cadeia de eventos é denominada de Transdução de Sinal (LAUFENBURGER; LINDERMAN, 1993);

D - A Transdução de Sinal modula a resposta dos genes controlando, portanto, funções celulares que incluem a sobrevivência, a proliferação, a migração e a diferenciação.

Figura 16. Esquema da transdução de sinais provenientes da Matriz Extracelular para o interior da célula.

I.2.1. Transdução de sinais mediados por Integrinas

As Integrinas (Figura 17) descobertas em 1980, pertencem a uma família de glicoproteínas localizadas na superfície da célula. São responsáveis pela adesão celular a vários substratos.

Figura17. Representação esquemática da estrutura das Integrinas.

Conquanto possam mediar a interação célula:célula, sua função mais importante é promover a adesão celular à MEC, influenciando seu comportamento em relação à morfologia celular, adesão celular, migração bem como sua proliferação e diferenciação.

As Integrinas (COPPOLINO; DEDHAR, 2000) são moléculas heterodiméricas formadas por associação entre si de 16 subunidades denominadas α e

β . A combinação de uma subunidade α com uma β define um receptor com identidade específica. Nem todas as subunidades são capazes de interagir, razão pela qual só foram identificadas até hoje, apenas 20 Integrinas diferentes.

Com base na sua composição (XU et al., 2000), as Integrinas são classificadas de acordo com o tipo de subunidades. As de maior interesse, neste trabalho são: as Integrinas β_1 , que na sua maioria, estão associadas com a interação entre a célula e a MEC; as Integrinas do tipo β_2 que estão restritas aos leucócitos e tipicamente ligam-se a proteínas da superfície de outras células, como à Integrina $\alpha_1\beta_2$, específica da adesão celular sobre o colágeno.

Hoje se sabe que as Integrinas não são apenas receptores de adesão utilizada para mediar conexões físicas entre a MEC e a célula. Estão envolvidas também em atividades complexas das células tais como a citocinese (processo pelo qual durante a mitose uma célula divide-se em duas células filhas) e migração celular. Conseqüentemente, está associada, também, a várias doenças que incluem as cardiovasculares, desordem de natureza imunológica e vários tipos de câncer.

I.3. Controle da atividade celular

Como já mencionado anteriormente, embora não seja possível separar com uma linha divisória bem definida (pois na grande maioria são eventos interligados), por uma questão didática, este trabalho dividiu as interações matrizes: eventos teciduais em duas categorias e alguns exemplos serão descritos a seguir.

I.3.1. Com base na Adesão

I.3.1.1. Remodelagem de Tecidos

I.3.1.1.1. Tecido Ósseo

Um exemplo clássico do controle de fatores externos sobre a fisiologia celular e conseqüentemente a adesão, da qual depende a atividade celular, é a remodelagem do TO (NOMURA; YAMAMOTO, 2000). O osso é um tecido dinâmico, constantemente em formação pela ação osteoblástica, simultaneamente com a reabsorção pela atividade osteoclástica (Figura 18) (LEMER, 2000).

Figura 18. Remodelagem do Tecido Ósseo: formação de osso novo por osteoblastos associados à reabsorção simultânea por osteoclastos.

A resultante é a adaptação da forma do osso a novas demandas de pressão. Esse mecanismo recebe o nome de Remodelagem e pode ser resumidamente descrito:

A - Estímulos mecânicos agem sobre o TO, gerando correntes elétricas resultantes da variação de potenciais de corrente e da piezeletricidade. Nas zonas de maior compressão (potencial negativo), há um estímulo à formação do tecido e nas zonas de menor compressão (potencial positivo), a reabsorção (Figura 19).

B - Como consequência destes efeitos, temos osteoblastos e osteoclastos que ao interagirem com uma sequência de **aa** Arg-Gly-Asp localizada na MEC (LEMER, 2000) iniciam o processo de construção e reconstrução, a Remodelagem.

A piezeletricidade é uma propriedade de materiais, incluindo o colágeno e as PG que têm a capacidade de gerar correntes elétricas após um estímulo mecânico e, no caso dos materiais naturais, não dependem da viabilidade do tecido (WEINSTEIN; BUCKWALTER, 2000).

A função de sensor mecânico é exercida por osteócitos, presente no TO. São osteoblastos maduros aprisionados na matriz mineralizada que, ao detectar alterações de pressão, induzem a matriz a formar ou reabsorver TO de acordo com a carga mecânica transmitida para as células efetoras, que são os osteoblastos jovens e os osteoclastos (MARTIN, 2000). Uma evidência da sensibilidade de osteoblastos a correntes elétricas sobre a remodelagem é o aumento significativo sobre a velocidade de sua proliferação também observada “*in vitro*” (WIESMANN et al., 2001).

Figura 19. Esquema da remodelagem do osso induzida por estímulos mecânicos.

I.3.1.1.2 Tecido Mole

O efeito de estímulos externos sobre a fisiologia celular não se limita ao TO, sendo um fenômeno geral. No caso do fibroblasto (Figura 20), os estímulos

provenientes do meio externo, também na forma de forças mecânicas, alteram a interação da superfície celular na zona de contato com a MEC definindo a atividade da célula (INGBER, 1994).

Esta atividade é mediada por Integrinas que, fisicamente, ligam a MEC ao citoesqueleto e são responsáveis por sensoriar mudanças de estados tencionados da MEC. Na sua forma sob tensão, predomina a produção de collagenase, enquanto na forma relaxada, há uma diminuição desta enzima com conseqüente aumento da produção de colágeno. A função da collagenase é digerir o colágeno, o principal componente da MEC.

Figura 20. Esquema representativo das alterações da atividade celular do fibroblasto em função de tensões aplicadas sobre a Matriz Extracelular. Forma relaxada (a) e forma sob tensão (b).

Outros efeitos sobre a regulação da atividade de fibroblastos estão associados à contração ou relaxamento de matrizes colagênicas (GRINNELL et al., 1999), que tem como resultantes alterações da morfologia celular. Fibroblastos aderidos em superfícies não tencionadas, antes de sua proliferação, tomam uma forma esférica. Em matrizes estressadas, se alongam e perdem protuberâncias celulares, sugerindo a

produção de diferentes fatores de crescimento celular, mecanismos de transdução de sinal como resposta ao stress mecânico (GRINNELL et al., 1999).

Este conhecimento vem permitindo o desenvolvimento de tecnologias para o tratamento de escaras hipertróficas ou em lesões de grande extensão, como no caso de queimados (INGBER, 1994), no sentido de minimizar a formação de tecido fibrótico responsável, muitas vezes, pela perda do movimento de articulações nas lesões de grande extensão.

I.3.1.1.3. Ageing

O termo "ageing" (envelhecimento) aplica-se a todas as alterações químicas e estruturais da MEC, que ocorrem nas cadeias laterais de **aa** (Figura 21), principalmente Arg, a Lys, e o Asp presentes no colágeno tipo I.

Figura 21. Estruturas químicas dos aminoácidos Ácidas Aspártico, Arginina e Lisina.

São alterações lentas, levando meses, ou mesmo anos e avançam com a idade (BAILEY; PAUL; KNOTT, 1998). A resultante é a redução na renovação celular e perda das propriedades físicas dos tecidos, o que diminui a sua flexibilidade e

permeabilidade. Essas alterações são aceleradas no indivíduo diabético devido à hiperglicemia, sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade nesses indivíduos (BAILEY, 2001). Outras doenças relacionadas com o Ageing incluem a aterosclerose (GRINNELL et al., 1999) e a osteoporose (BAILEY; PAUL; KNOTT, 1998).

A reação química mais importante no “**Ageing**” é a glicação envolvendo a glicose, um açúcar com seis átomos de carbono. Estas ocorrem também com a ribose, um açúcar com 5 átomos de carbono. Nos tecidos seus produtos são denominados AGEs (Advanced Glycation End-Products) (BAILEY, 2001). As consequências do “Ageing” são:

1 – A modificação da Arg é particularmente importante porque a sequência – **Arg – Gly – Asp** é um sítio de reconhecimento de Integrinas responsáveis pela mediação da adesão de várias células sobre a MEC, inclusive osteoblastos e osteoclastos (REKHTER, 1999). Outros sítios de adesão celular também são alterados e incluem principalmente a Asp e a Arg.

2 – As reações envolvendo os **aa** Lys e Arg provocam alterações significativas no perfil de distribuição de carga ao longo do período **D**, alterando significativamente interações dependentes exclusivamente, de interações eletrostáticas, como por exemplo, o caso da fibrilogênese do colágeno (PROCKOP; FERLATA, 1998) ou da interação com a heparina (DELACOUX et al., 2000).

I.3.2. Com base na interação Macromolecular

I.3.2.1. Biomineralização do Tecido Ósseo

A **Biomíneralização** é um processo através dos quais organismos vivos constroem estruturas funcionais, formadas por uma fase mineral associada a uma matriz orgânica como no TO, dentes e carapaças de moluscos. Essas matrizes controlam a cristalização, crescimento e orientação da fase mineral, sobre sítios específicos, distribuídos uniformemente sobre a matriz orgânica.

No TO e na Dentina (MANN, 1989; CALVERT, 1994), o colágeno tipo I, dá início ou inibe por completo, a deposição de HA por um mecanismo complexo e desconhecido que envolve proteínas ácidas presentes na MEC. Em animais superiores o desequilíbrio dos mecanismos que mantêm estas estruturas mineralizadas resulta em doenças tais como a osteoporose, a aterosclerose, a formação do cálculo renal e a desmineralização dos dentes (CALVERT, 1994).

Na formação da Dentina, a Biomíneralização é disparada apenas pela interação de uma das moléculas de proteínas existentes na MEC, da Fosfoforina com o colágeno tipo I. A resultante é a deposição de HA. Embora o colágeno tipo I esteja distribuído em todo organismo, sua mineralização, além do TO e dentes, só ocorre em outros tecidos em condições patológicas como na calcificação de válvulas cardíacas biológicas (BRAILE, 1990) e metaplasia (METAPLASIA, 2006) óssea ou na presença de um osteoindutor com a BMP (ALDINGER et al., 1991).

Na Dentina, a interação do colágeno com a Fosfoforina ocorre na interface **Gap:Overlap** (BENIASH et al., 2000) com alterações conformacionais do colágeno, principalmente com um encurtamento das distâncias interbandas nesta região (DAHL; SABSAY; VEIS, 1998), de modo análogo, mas na direção oposta ao descrito para a proteína **G**. A proteína **G** controla a formação e o crescimento de cristais de oxalato de cálcio sobre si mesma em um sítio contendo 10 grupos carboxílicos

(Grupos do tipo COOH de resíduos de Asp e Glu). Em mutantes, onde 4 destas carboxilas são substituídas por grupos carboxamida (COONH₂) (CLARK et al., 1999), a formação do oxalato de cálcio é inibida como consequência de mudanças no potencial eletrostático de superfície da proteína, associado a alterações das características de natureza eletrostáticas e hidrofóbicas superficiais da proteína **G**. Como mostraremos posteriormente, esta é uma característica das zonas **Gap:Overlap** do colágeno.

Com base na interação da Fosfoforina com o colágeno tipo I e em função de resultados de mineralização observados para colágeno aniônico *in vitro* e *in vivo* foi proposto um modelo para a mineralização do colágeno como resultado da interação com a Fosfoforina (Figura 22) (GOISSIS; MARGINADOR; MARTINS, 2003; SILVA, 2005). O modelo propõe as seguintes etapas:

Primeiro: íons cálcio ligam-se na matriz colagênica, mas a mineralização das fibrilas do colágeno não prossegue devido à presença de uma barreira hidrofóbica presente na junção **Gap:Overlap**.

Segundo: a interação com a Fosfoforina na interface **Gap:Overlap**, da mesma forma que na proteína **G**, provoca mudanças no padrão de interações eletrostáticas induzindo a modificações na topografia dos **aa** hidrofóbicos presentes. Isto foi sugerido pela diminuição da distância entre bandas observadas nessas regiões (BENIASH et al., 2000; GOISSIS; MARGINADOR; MARTINS, 2003).

Terceiro: esta alteração no padrão de interação eletrostática seria a responsável por mudanças na conformação da barreira hidrofóbica nas zonas **Overlap** e **Gap** permitindo a migração do cálcio através da região do **Gap**.

Quarto: a força que estimula o avanço da mineralização é o crescimento da fase mineral que encontram seus limites nas zonas do **Gap** e do **Overlap**, que são separados por uma região de alta hidrofobicidade (BRAILE, 1990). *In vivo*, o início da mineralização ocorre na interface **Gap:Overlap** tanto no TO normal quanto na Dentina onde o sinal para mineralização é dado pela Fosfoforina, uma proteína altamente aniônica que se liga ao colágeno na zona entre **Gap** e **Overlap** (WEINER; TRAUB, 1986) dando início, assim, a deposição de Fosfato de Cálcio.

O modelo proposto (Figura 22) sugere que a zona de pré-mineralização de matrizes de colágeno é altamente dinâmica.

Figura 22. Modelo para mineralização *in vitro* de matrizes de colágeno polianiónico com 46 ± 12 , cargas adicionais negativas, preparadas por hidrólises de cadeias laterais de resíduos de Asparagina e Glutamina, presentes na estrutura colagênica.

I.3.2.2. Processo de coagulação: plaquetas e a homeostase (LI, 2004).

A função das plaquetas é evitar a continuação do processo hemorrágico que ocorre pós-trauma, por meio da formação do coágulo. O principal gatilho para a formação de um trombo hemostático é a descontinuidade da barreira endotelial que separa o sangue da MEC (Figura 23a). Em contato com a MEC o sistema reage por meio de três etapas consecutivas que correspondem à adesão plaquetária, à ativação da membrana e à agregação celular.

O primeiro contato entre plaquetária e a MEC exposta é estabelecida pela interação da glicoproteína plaquetária Ib-V-IX com o fator de von de Willebrand, já aderido à superfície do colágeno (figura 23b).

Este processo diminui a velocidade da plaqueta, permitindo a ligação do receptor GPVI, presente na sua membrana interna, com o colágeno, ativando desta forma o sistema Integrina da plaqueta. O resultado é uma firme adesão (figura 23 b). Esta ligação é mediada por Integrinas $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha II\beta 3$. Estas, mais o fator de von de Willebrand, ligado ao colágeno, são as interações mais importantes para a adesão (Figura 23c).

A ligação da plaqueta não apenas ativa como também alteram a forma da plaqueta já aderida (Figura 23 d) que é seguida por mais adesões plaquetárias. Estas ligações são feitas por moléculas de fibrinogênio (Figura 23 e). Dá-se o início da secreção de grânulos que não apenas reforça o processo de ativação mas torna irreversível a agregação. Durante o processo de ativação a plaqueta expõe pequenas vesículas, a partir de sua membrana plasmática, e a homeostase se inicia com a

ativação do processo de coagulação, associado à formação de trombina e fibrina (Figura 23f).

Figura 23. Representação esquemática para a formação do trombo plaquetário após trauma da parede vascular.

I.4. Localização das interações de ligantes com o colágeno tipo I e sua identificação dentro do período D.

Antes de discutirmos a topografia da distribuição dos **aa** na microfibrila do colágeno tipo I, com base no exposto na introdução, onde mostramos que o colágeno não tem apenas função mecânica, mas participa ativamente de eventos importantes, que mantêm a funcionalidade dos tecidos, cremos que a pergunta mais importante seria qual a relação entre a unidade físico período **D** e estes eventos, assunto abordado pela primeira vez por Di Lullo (2002). Embora seu trabalho não entre em detalhes sobre a importância da topografia dos **aa** no período **D**, isto é, sua distribuição em relação à sub-periodicidade, ela deixa clara sua importância em relação à participação do colágeno tipo I nos eventos biológicos que ocorrem na MEC. Isto faz sentido se considerarmos que as proteínas correspondem a aproximadamente 20% da massa corporal e deste valor, 30% ou mais é representado pelos diferentes tipos de colágeno.

Sabendo-se que o colágeno tipo I representa cerca de 90% do total do colágeno existente, uma estimativa grosseira do número de monômeros de colágeno tipo I (tropocolágeno), no homem adulto tem cerca de 10^{21} unidades. Assim sendo, o colágeno tipo I, em relação ao período **D** é a molécula biológica com o maior número de domínios funcionais existentes no reino animal, sendo talvez o domínio mais importante em relação à transferência de informação extracelular existente.

Em relação ao período **D**, a aproximação de Di Lullo (2002) para a localização das regiões responsáveis pela adesão celular, moléculas de ancoragem como Fibronectina e Laminina, mutações, como por exemplo, a síndrome de Marfan e Ageing, foi feita de modo abrangente, identificando zonas associadas a conjunto de sub-períodos, responsáveis por interações biológicas. Entretanto, nenhuma correlação

foi feita entre os tipos de interações e a topografia de distribuição de **aa**, característica da sub-periodicidade do período **D**. As zonas definidas por Di Lullo (2002) estão representadas esquematicamente na Figura 24a e resumidamente são descritas a seguir:

Zona 1: Uma zona próxima à região N-terminal do Tropocolágeno (Figura 28b) que inclui as bandas **c₃** até **a₄**;

Zona 2: Outra região próxima à região C-terminal que inclui as bandas **c₂** até **a₁**;

Zona 3: Coincidente com a zona 2, exceto que em triplas hélices diferentes e também próximas à região C-terminal.

Figura 24. **a** - Representação esquemática das relações do colágeno tipo I com funções teciduais que incluem a adesão celular, moléculas de ancoragem, propriedades estruturais e “Ageing” de acordo com Di Lullo (2002). As posições relativas se referem à molécula de tropocolágeno com cerca de 1000 resíduos de aminoácidos; **b** – Representação do tropocolágeno.

As Tabelas abaixo (Tabelas 3, 4, 5 e 6) resumem as relações entre as atividades biológicas e as bandas dos sub-períodos do colágeno tipo I envolvidas na intermediação das respostas.

O resultado da Tabela 3 resume as interações do colágeno tipo I, com ligantes associados a eventos estruturais.

Tabela 3. Localização de eventos de natureza estrutural associado ao período **D** do colágeno tipo I. Identificação do ligante e sítio da interação.

Identificação	Função	Sítio de interação	Localização na cadeia α
Decorina (PG, ácida)	Estabilização da fibrila de colágeno	Bandas d, e	Não identificado
A Decorina é uma proteoglicanas de massa molecular pequena e rica em Leucina (Leu). Participam da organização da MEC e associada à transparência da córnea, propriedades mecânicas da pele e tendões, elasticidade de vasos sanguíneos e proliferação de células tumorais. Uma de suas funções mais importantes é modular o processo de fibrilogênese ao interagir com as bandas d e e (FLEISCHMANGER, 1991; KEENE ET AL, 2000).			
Identificação	Função	Sítio de interação	Localização na cadeia α
Sulfato de Dermatana Condroitina (PG, ácidas)	Estrutural: estrutura da MEC	Bandas e, d	Não identificado
Os Sulfatos Dermatana e de Condroitina, são responsáveis, assim como o colágeno tipo I, pela manutenção das propriedades da MEC. Sítios de interação estão localizados nas bandas d e e (SCOTT, 1991).			
Identificação	Função	Sítio de interação	Localização na cadeia α
Sulfato de Queratana (PG, ácida)	Estrutural: estrutura da MEC	Bandas a, c	Não identificado
Tem as mesmas funções que os Sulfatos Dermatana e de Condroitina e interagem com o colágeno tipo I por meio das bandas a e c (SCOTT, 1991).			
Identificação	Função	Sítio de interação	Localização na cadeia α
Colágeno tipo I	Fibrilogênese	Bandas a4, a3.	781-794 e 776 e 822 cadeia α(I)
Interação colágeno tipo I: colágeno tipo I para formação das fibrilas que ocorrem entre os telopeptídeos N- e C- terminais envolvendo a sequência de aa 776-822 da cadeia alfa 1(I) e 781-794 da outra cadeia alfa I. As interações são de natureza hidrofóbica e eletrostática, com participação ativa de resíduos de Phe e Tyr (MARTIN, 2000).			

Tabela 3 (Continuação). Localização de eventos de natureza estrutural associado ao período **D** do colágeno tipo I. Identificação do ligante e sítio da interação.

Identificação	Função	Sítio de interação	Localização na cadeia α
Fibronectina (Glicoproteína)	Formação de fibras de fibronectina	a4	774-777 cadeia α (I)
A fibronectina é uma proteína de adesão celular que interage com o colágeno tipo I por meio dos aa Gln e Ala das posições 774 e 777 da cadeia alfa 1(I). Esta interação resulta in fibrilas de colágeno menores (DZAMBA et al., 1993).			
Identificação	Função	Sítio de interação	Localização na cadeia α
Colágeno tipo IV	Interação com colágeno tipo I	Banda d	Não identificado
Colágeno tipo IV está distribuído na MEC tanto na pele como em outros tecidos conectivos. Sua forma é de microfilamentos, orientados transversalmente às fibrilas de colágeno tipo I. A interação ocorre na banda d , o mesmo sítio que para as Decorinas (KEENE; RIDGWAY; IOZZOB, 1998).			

Tabela 4. Localização de eventos que envolvem ligantes associados à adesão celular e relacionados com o período **D** do colágeno tipo I. Identificação do ligante e sítio da interação.

Identificação	Função	Sítio de interação	Localização na cadeia α
Decorina (PG, ácida)	Inibição fagocitose do colágeno	Bandas c1	Não identificado
Além de regular a fibrilogenese do colágeno tipo I, mascara a interação da Integrina $\alpha 2\beta 1$ inibindo a fagocitose das fibras de colágeno tipo I (remodelagem fisiológica da MEC). Liga-se na banda c1 (BHIDE et al., 2005).			
Identificação	Função	Sítio de interação	Localização na cadeia α
Heparina (PG)	Inibição da angiogênese	Banda a3	87-92 cadeia α I
Heparina é um análogo do sulfato de heparana associada à regulação da adesão e proliferação celular e na organização da MEC. Interage com o colágeno próximo à região N-terminal no limite da zona Overlap:Gap . O único sítio de interação é básico e corresponde à sequência de aa 87-92 (LysGlyHisArgGlyPhe) da cadeia α1(I) (banda a3) . Esta região do colágeno, identificada através da heparina, está associada a células endoteliais responsáveis pela angiogênese (SAN ANTONIO et al., 1994).			

Tabela 4 (Continuação). Localização de eventos que envolvem ligantes associados à adesão celular e relacionados com o período **D** do colágeno tipo I. Identificação do ligante e sítio da interação.

Identificação	Função	Sítio de interação	Localização na cadeia α
Precursor da proteína amielóide (glicoproteína)	Adesão celular (Mal de Alzheimer)	Banda a3	87-92, cadeia α 1
O Precursor da Proteína Amielóide (PPA) está associado à deposição da proteína amielóide A4 no cérebro de pacientes com histórico do mal de Alzheimer. Seu sítio de interação é o mesmo que aquele da Heparina, sugerindo uma interação competitiva e associada à adesão celular. Possui também sítios de ligações Laminina, e GAGs (BEHER et al., 1996).			
Identificação	Função	Sítio de interação	Localização na cadeia α
POMC, Prot. oligomérica da matriz da cartil.	Crescimento celular	Banda a3 e b2 (dois sítios/banda)	83-93 e 23-45
Na MEC de cartilagem e tendão, depois do colágeno é a proteína mais importante. Esta envolvida com as atividades de crescimento celular e desenvolvimento da matriz e liga-se ao colágeno por meio de 4 sítios bem definidos, dois deles localizados na banda a3 e dois na banda b2 , correspondendo às seqüências 83-93 e 23-45 (ROSENBERG et al., 1998).			
Identificação	Função	Sítio de interação	Localização na cadeia α
PLCC, Proteína de ligação célula colágeno	Adesão celular	Banda b1	757-791, cadeias α 1 (I)
Associada à adesão ao colágeno de algumas células como de ovário de hamster e fibroblastos. O sítio de ligação sobre o colágeno corresponde 757 e 791, banda b1 . Este sítio de ligação é único (KLEINMAN et al., 1978).			
Identificação	Função	Sítio de interação	Localização na cadeia α
Fator de von de Willebrand	Ativação da coagulação	Banda a3	Não identificado
O fator de von de Willebrand (FvW) é uma glicoproteína associada à adesão das plaquetas na região lesionada de vasos sanguíneos. O sítio de ligação sobre colágeno tipo I é conhecido, mas em função das características da topografia de aa do seu sítio de ligação, foi proposto que o FvW interage com uma região formada por aa básicos e hidrofóbicos, contendo cerca de oito resíduos consecutivos da banda a3 . É responsável pelo disparo do processo de coagulação ao promover a adesão plaquetária sobre o colágeno através de Integrina $\alpha 2\beta 1$ (ROMIJN et al., 2003).			
Identificação	Função	Sítio de interação	Localização na cadeia α
Fosfoforina	Biomineralização TO	Bandas c e a	Não identificado
A Fosfoforina, depois do colágeno, é a proteína mais abundante e exclusiva da Dentina. Contêm entre 35% e 45% resíduos de Asp e 40 a 55% de Ser, dos quais 90% se encontram fosforilados e, só é observada na fase inicial da mineralização. Liga-se ao colágeno próximo à interface Overlap:Gap , bandas c e a , e altera tanto a conformação quanto as distâncias interbandas (encurtamento) (BENIASH et al., 2000).			

Em relação à Tabela 5, vale lembrar que embora diferentes tipos de colágeno sejam reconhecidos por receptores celulares específicos (HEINO, 2000), dentre as Integrinas, as duas mais importantes são as $\alpha1\beta1$ e $\alpha2\beta1$. A Integrina $\alpha1\beta1$ é encontrada nas células da musculatura lisa, enquanto a $\alpha2\beta1$ nas células epiteliais e plaquetas. Entretanto, muitas células, tais como os fibroblastos, osteoblastos, condrócitos, células endoteliais e linfócitos podem, concomitantemente, expressar os dois receptores. Na sua interação com colágeno, Integrinas $\alpha1\beta1$ e $\alpha2\beta1$ utilizam apenas o domínio $\alpha1$.

Tabela 5. Localização de seqüências e/ou integrinas envolvidas na adesão celular associados ao período **D** do colágeno tipo I. Identificação da célula e sítio da interação.

Identificação da integrina	Identificação do ligante	Sítio de interação	Localização na cadeia α
$\alpha2\beta1$ e $\alpha1\beta1$	Adesão celular	b2, e2	501-509 e 127-134
Integrinas $\alpha2\beta1$ e $\alpha1\beta1$ são os dois receptores celulares mais importantes da superfície de células de eucariotos que interagem com o colágeno tipo I. Seus sítios de interação sobre o colágeno, ou se sobrepõem, ou são adjacentes. Estes sítios correspondem a tripletes do tipo GlyGluArg contidos nas seqüências GlyPheProGlyGluArg (banda b2 , resíduos 501-509) e seqüência GlyLeuProGlyArgGlyArgPro (banda e2 , Resíduos 127-134). A seqüência GlyLeuProGlyGluArg está presente nas três cadeias alfa (XU et al., 2000).			
Identificação da integrina	Identificação do ligante	Sítio de interação	Localização na cadeia α
$\alpha2\beta1$	Plaquetas e Laminina	Início c3, a4	435-438, cadeia $\alpha1(I)$
A seqüência mínima para reconhecimento e AspGlyGluAla, resíduos 552-822 e 435-438 (início c3 e a4) da cadeia $\alpha1(I)$ (STAATZ et al., 1991).			
Identificação da integrina	Identificação do ligante	Sítio de interação	Localização na cadeia α
Fibroblasto da derme	Adesão ($\beta1$ integrina)	a3	a1(I)772– 786 (784–786 (Gly-Leu-Hyp)
A atividade para adesão de fibroblasto normal foi observada para a seqüência 1(I) 772– 786 com a seqüência 784–786 (GlyLeuHyp) banda a3 importante para o reconhecimento celular. A integridade da tripla hélice é fundamental para os eventos de adesão e reconhecimento (GRAB et al., 1996).			

Tabela 5 (continuação). Localização de seqüências e/ou integrinas envolvidas na adesão celular associados ao período **D** do colágeno tipo I. Identificação da célula e sítio da interação.

Identificação da integrina	Identificação do ligante	Sítio de interação	Localização na cadeia α
$\alpha 2\beta 1$	Fibroblastos e outras células	Banda a4, c3, b2, b1.	Ver seqüências abaixo
Seqüências responsáveis pela adesão: A – Células de ovário (hamster): seqüência 757-791 (b1, b2), cadeia $\alpha 1(I)$. B – Células de carcinoma de mama: seqüência 434-438, c3 , $\alpha 1(I)$. Seqüências responsáveis pela inibição da adesão: A – Linfócitos T: eqüência 769-783 (b1, a4) $\alpha 1(I)$ (GRAB et al., 1996).			
Identificação da integrina	Identificação do ligante	Sítio de interação	Localização na cadeia α
$\alpha 2\beta 1$	Inibição da fagocitose do colágeno	Banda c1	Não identificado
Inibição pela Decorina do processo envolvendo a fagocitose das fibras de colágeno tipo I contribui para a remodelagem fisiológica da MEC. Em fibroblastos a Integrina tipo $\alpha 2\beta 1$ e provavelmente se liga ao mesmo sítio de ligação da Decorina, isto é, banda c1 (BHIDE et al., 2005).			
Identificação da Integrina	Identificação do ligante	Sítio de interação	Localização na cadeia α
$\alpha 2\beta 1$	Células endoteliais: angiogênese	banda a3	87-92, cadeia $\alpha 1(I)$
Heparina é um análogo do sulfato de heparana uma PG que interage com colágeno tipo I na região próxima à região N-terminal do tropocolágeno e dependente da estrutura helicoidal. Interação: resíduos 87-92, LysGlyHisArgGlyPhe da cadeia $\alpha 1(I)$. Esta seqüência também está envolvida na angiogênese (SWEENEY et al., 1998).			

Tabela 6. Localização de eventos de natureza química associados ao período **D** do colágeno tipo I. Identificação do agente e sítio da interação.

Identificação	Função	Sítio de interação	Localização na cadeia α
Colagenase (enzima)	Hidrólise de ligação peptídica	Bandas a4	775-776, $\alpha 1$ e $\alpha 2$
A colagenase é uma enzima da MEC que degrada especificamente fibras de colágeno tipo I. Sítio de hidrólise: ligação Gly775-Ile/Leu776, banda a4 . Está associada a várias doenças: a artrite, a aterosclerose e células de tumor em metástase (FIELDS et al., 2000; WU et al., 2001).			
Identificação	Função	Sítio de interação	Localização na cadeia α
Glicação	Ageing	c3,c2,c1 (todas as cadeias)	Identificado (ver texto)

Tabela 6 (Continuação). Localização de eventos de natureza química associados ao período **D** do colágeno tipo I. Identificação do agente e sítio da interação.

"Ageing" (envelhecimento): alterações químicas e estruturais da MEC resultantes da reação de açúcares, principalmente a glicose, com as cadeias laterais de **aa**, Arg, a Lys, e o Asp presentes no colágeno tipo I. Resultante: a redução da renovação celular e perda de propriedades tais como a sua flexibilidade e permeabilidade. Doenças relacionadas: aterosclerose a osteoporose. Sítios da glicação: Lys: α 1(I) e α 2: Lys-434 (banda **c3**), Lys-453 (**c2**), Lys-479 (**c1**), e Lys-924 (**c2**). As últimas três com mais de 80%, principalmente na banda **c1** (CHAPMAN; TZAPHLIDOU; MEEK, 1990; RIESER; AMIGABLE; LAST, 1992).

Identificação	Função	Sítio de interação	Localização na cadeia α
Ácido Acetilsalicílico	Estudos de embebição	c2, d	Não identificado
A aspirina é um potente inibidor das reações de Ageing. Na fibrila de colágeno tipo I interage na banda c2 e d (HADLEY; MALIK; MEEK, 2001).			
Identificação	Função	Sítio de interação	Localização na cadeia α
Frutose	Estudos de Ageing	c1	Não identificado
Utilizada para identificação dos sítios de reações que dão origem ao Ageing. Interage com o colágeno tipo I na banda c1 (HADLEY; MALIK; MEEK, 2001).			
Hidrólise seletiva	Preparação biomateriais	c2-c1, a	Não identificado
Técnica utilizada para a preparação de colágeno aniônico (SILVA, 2005).			

Os resultados nas Tabelas 3, 4, 5 e 6 mostram, de modo claro, a importância do colágeno tipo I na atividade da MEC. Tanto do ponto de vista da adesão e proliferação, como no aspecto estrutural da própria matriz colagênica, quanto de outras macromoléculas que participam ativamente da MEC.

Portanto, a grande questão é: qual o significado da periodicidade **D** do colágeno tipo I e sua participação em eventos biológicos, que são traduzidos em mudanças, na engenharia da fabricação de proteínas pelas células? Com certeza, interações de natureza eletrostática e hidrofóbica devem estar envolvidas, pois são elas que comandam ou refinam a grande maioria dos eventos biológicos, principalmente, aqueles de função modulada. Este é o caso de enzimas,

transportadoras de oxigênio, no processo de biomineralização, interações moleculares dentre os muitos existentes (MAHLER; CORDES, 1972).

No caso do colágeno tipo I, entre as interações que, comprovadamente, alteram os parâmetros da estrutura microfibrilar, estão aquelas envolvendo a Fosfoforina (BENIASH et al., 2000) e praticamente todos os eventos mencionados nas Tabelas 3-6.

Como avaliação preliminar, os resultados mostrados nas Tabelas 3, 4, 5 e 6 foram resumidos em Tabelas (Tabela 9 e 10 Resultados e discussão) de modo a facilitar a estimativa da frequência com a qual as bandas da sub-periodicidade do período **D** participam nos processos nelas descritos. O que chama a atenção, no entanto, é que a maioria das interações descritas nas Tabelas 3, 4, 5 e 6, ocorrem na região das bandas **c** e **a**.

II. OBJETIVOS

O colágeno tipo I, que representa cerca de 90% do total de colágenos existentes no homem adulto, tem cerca de 10^{21} unidades de moléculas de tropocolágeno. Assim sendo, considerado o período **D**, o colágeno é a molécula biológica com o maior número de domínios funcionais existentes no reino animal, no que diz respeito à transferência da informação extracelular para o interior da célula.

Entretanto, apesar da sua reconhecida importância funcional, diferentemente de outras proteínas da MEC tais como a Fibronectina e Laminina, não existia um mapa dos seus domínios funcionais e sítios de interações com ligantes até o trabalho publicado por Di Lullo (2002). Neste trabalho, foi sugerida a existência de três zonas, onde estão incluídas todas as interações conhecidas do colágeno tipo I com ligantes ou células. Todavia, para essas zonas além de abrangentes quanto às dimensões do período **D** do colágeno tipo I, não há qualquer análise entre as interações e a topografia da distribuição dos **aa**.

Os objetivos deste trabalho foram:

1 – Correlacionar às interações biológicas do colágeno tipo I, com as bandas do período **D**, para a construção de um mapa que defina sua frequência de envolvimento com os eventos bioquímico-celulares envolvidos. Dessa forma, seria possível analisar a distribuição dos **aa** ácidos, **aa** básicos e **aa** hidrofóbicos no mapeamento do período **D**: **a)** do ponto de vista topográfico; **b)** de algumas

propriedades, tais como a distribuição de cargas positivas e negativas. Além disto, seria possível associar a topografia de **aa** ácidos e **aa** básicos à distribuição de cargas.

2 – Estabelecer uma correlação entre a topografia de distribuição dos **aa** ácidos, **aa** básicos e **aa** hidrofóbicos do colágeno tipo I com as atividades biológicas da MEC.

3 – Propor um mecanismo para explicar a participação: **a)** do colágeno nos eventos de natureza estrutural; **b)** de ligantes envolvidos nas atividades de adesão celular, ou mesmo de natureza química, como no caso do “Ageing”.

III. METODOLOGIA

III. 1. Descrição do mapa de distribuição da estrutura primária das cadeias alfas que formam a microfibrila de acordo com o modelo de Smith.

Esse trabalho foi desenvolvido com base na associação de moléculas de tropocolágeno (Figura 25). A associação de segmentos superpostos de um quarto do comprimento do tropocolágeno dão origem ao modelo penta-fibrilar de Smith (1968), caracterizado pelo período **D**, formado pelas zonas **Overlap** e **Gap** (Figura 26).

Figura 25. Representação esquemática da molécula de tropocolágeno

A Figura 26 representa esquematicamente a estrutura primária dos resíduos de aminoácidos e a definição dos intervalos das zonas do **Overlap** e **Gap** que formam um período **D**. Cada segmento, contém 234 aminoácidos, ou seja, um quarto do comprimento da molécula de tropocolágeno (Figura 26). Os números referem-se à posição dos **aa** na molécula com a repetição Gly-X-Y. Os números nos círculos referem-se à posição da cadeia alfa na microfibrila. Os números em círculos definem a posição da molécula em relação ao plano que se alinha com o cristal.

A soma dos cinco segmentos que formam o período **D**, de forma repetitiva constitui a microfibrila.

Figura 26. Representação esquemática da microfibrila de colágeno de acordo com o modelo de Smith. As caixas colocadas entre os segmentos que formam a microfibrila correspondem à estrutura primária de 80 a 90, contando a partir do resíduo N-terminal.

Características:

1. A estrutura primária das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ está alinhada segundo o modelo penta-fibrilar quarto alternado de Smith (1968).
2. Na representação plana, as cadeias que formam a tripla hélice estão deslocadas da esquerda para a direita, ao longo do eixo maior da microfibrila. Esta representação é porque na molécula de colágeno os **aa** na sua descendência e ao longo do eixo maior estão deslocados umas das outras de 120° .
3. Da esquerda para a direita, os resíduos de **aa** são mostrados do N para o C terminal.
4. Localização das zonas **Gap** e **Overlap** e sua sub-periodicidade **a, b, c, d e e** tem a orientação do C para o N-terminal.

III. 2. Elaboração dos gráficos**A – Programa Origin.**

Todos os gráficos foram construídos com o auxílio do programa Origin 6.0 e em todos foram aplicados a mesma normalização de curva (Smoothing, FFT 7). Esse valor foi escolhido porque reduz a resolução ao longo do período a 2 nm, um valor comparável com aqueles obtidos pelas técnicas de microscopia (CHAPMAN; TZAPHLIDOU; MEEK, 1990).

Curvas de distribuição para as cadeias alfa

Aminoácidos ácidos e básicos: as curvas foram obtidas para os **aa** Asp, Glu (ácidos, Figura 27a) e His, Lys e Arg (básicos, Figura 27b) individualmente após ter sido atribuído a cada um na planilha, o valor 1. As curvas para distribuições nas cadeias alfa foram obtidas pelas somatórias de cada **aa** existente, ácidos ou básicos, em cada cadeia nas regiões do **Overlap**, **Gap** do período **D**.

Figura 27. Representação em modelo de **bolas e bastões** dos aminoácidos ácidos (a) e básicos (b) presentes no colágeno tipo I

Aminoácidos hidrofóbicos: Procedimento similar foi adotado para os aminoácidos hidrofóbicos exceto que foi considerada a somatória de todos contidos na mesma hélice e, da mesma forma que para os **aa** ácidos e **aa** básicos, em cada cadeia nas regiões do **Overlap**, **Gap** do período **D**. Os **aa** hidrofóbicos utilizados foram Val, Ile, Leu, Phe, Met e Tyr. Suas estruturas são mostradas na Figura 28.

Figura 28. Representação em modelo de **bolas** e **bastões** dos aminoácidos hidrofóbicos presentes no colágeno tipo I.

As curvas de distribuição têm nas ordenadas o número de aminoácidos/cadeia alfa e nas abscissas o número da cadeia alfa (três por tripla hélice) ao longo do período. Foi considerada alfa hélice número 1 aquela da primeira tripla hélice como mostrado na Figura 29, que representa um segmento da planilha maior de distribuição de **aa**, que compõem a estrutura primária do colágeno tipo I segundo modelo pentafibrilar de Smith (1968) e de acordo com a convenção de Chapman (1990).

Figura 29. Representação esquemática de um segmento da planilha da estrutura primária do período **D** para ilustrar a origem dos gráficos apresentados neste trabalho.

B – Programa Excel – Windows 98.

As representações gráficas em três dimensões foram feitas utilizando os recursos gráficos do programa Excel do Windows 98 e não tem qualquer refinamento. Sua confecção teve como objetivo ilustrar as diferenças de topografia nas distribuições de **aa** ácidos e **aa** básicos em relação aos **aa** hidrofóbicos que não são possíveis de serem visualizadas nas curvas obtidas pelo Programa Origin.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV. 1. Análise estrutural do colágeno tipo I

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a distribuição topográfica dos **aa** ácidos, **aa** básicos e **aa** hidrofóbicos no período **D**, para verificar particularidades que eventualmente permitam estabelecer algum tipo de correlação entre a estrutura do colágeno e sua participação nos eventos da MEC. Embora já exista uma análise desta distribuição em decorrência do modelo de Smith (1968) proposto para a microfibrila, onde **aa** ácidos, **aa** básicos e **aa** hidrofóbicos se distribuem formando aglomerados bem localizados que justifica o padrão observado na MET do colágeno tipo I (Figura 12b), nenhuma correlação entre esta distribuição e atividades da MEC foi estabelecida. Por outro lado, o trabalho de Di Lullo (2002) que delimita zonas bastante abrangentes envolvendo o período **D** e as bandas aí contidas nas atividades da MEC, também não faz qualquer correlação com a distribuição dos **aa** ácidos, **aa** básicos e **aa** hidrofóbicos.

Portanto, será apresentada a seguir, uma análise da distribuição topográfica dos **aa** hidrofóbicos, ácidos e básicos, em relação ao modelo pentafibrilar de Smith para posteriormente, correlacionar a distribuição topográfica destes **aa** no período **D** com eventos que ocorrem na MEC.

IV. 2. Distribuição dos aminoácidos ácidos, básicos e hidrofóbicos presentes no período D da microfibrila.

A composição percentual de **aa** ácidos, **aa** básicos e **aa** hidrofóbicos nas zonas **Gap** e **Overlap** é mostrada na Tabela 7.

Tabela 7. Distribuição dos aminoácidos ácidos, básicos e hidrofóbicos no **Overlap** e **Gap** do período **D** do colágeno tipo I.

Aminoácidos	Período D						
	Overlap			Gap			Totais resíduos
	n° Res.	%	Hidrofóbico.	n° Res	%	Hidrofóbico.	
Hidrofóbicos							
Val,	34	14,9	238,	43	18,9	301,0	77
Leu,	40	17,6	408,0	28	12,3	285,6	68
Ile	11	4,8	137,5	17	7,4	212,5	28
Met.	11	4,8	60,5	8	3,5	44,0	19
Phe,	15	6,6	166,5	20	8,8	222,0	35
Totais	111	48,9	1010,5	116	51,1	1065,1	227
Ácidos							
Ac. Aspártico	28	12,4		57	25,2		85
Ác. glutâmico	65	28,7		76	33,2		141
Totais	93	41,2		133	58,2		226
Amidas							
Asparagina	17			31			48
Glutamina	39			35			74
Totais	56			66			122
Ácidos + Amidas	149			199			348
Básicos							
Arginina	75	27,5		80	29,3		155
Histidina	9	3,2		7	2,6		16
Lisina	39	14,3		63	23,1		102
Totais	123	45,0		150	55,0		273

Aminoácidos Hidrofóbicos

– Val, Ile e Phe, percentualmente se distribuem menos na zona do **Overlap** com respectivamente 14,9, 4,8 e 6,6% (total de 23,6%) e mais na zona do

Gap com respectivamente 18,9, 7,4 e 8,8% (total de 35,4%), quase 1,5x o valor encontrado na zona **Overlap**.

- O oposto ocorre com os **aa** Leu e Met. Enquanto na zona **Overlap** suas distribuições correspondem respectivamente a 17,6 e 4,8% (total de 22,4%) na zona do **Gap** suas distribuições são de respectivamente 12,3 e 3,5% (total de 15,8%). Portanto a zona **Overlap** tem aproximadamente cerca de 1,5x a quantidade de resíduos de Leu e Met que a zona **Gap**.

- Nas zonas **Gap** e **Overlap** a relação numérica de resíduos e os valores de hidrofobicidade mostram que no seu conjunto, as duas zonas são praticamente iguais.

Em relação às suas distribuições (somatória de todos os **aa** hidrofóbicos) ao longo do eixo maior do período **D**, isto é, ao longo de cada cadeia alfa que forma a microfibrila, podemos observar (Figura 30) que existe uma preferência.

Figura 30. Distribuição da somatória dos valores numéricos relativos ao **Overlap** e **Gap**, para os resíduos de Valina, Leucina, Isoleucina, Metionina, e Fenilalanina.

Ao longo das cadeias alfa, os **aa** hidrofóbicos estão presentes em todas, com predominância nas cadeias alfa-2, cerca de 66%, tanto na zona do **Gap** quanto do

Overlap. Embora não mostrado, estes resíduos correspondem, na sua maioria, aos resíduos de **aa** Val, Ile e Leu (Figura 30). Enquanto Phe se distribui ao longo das três cadeias alfa, a MET está distribuída apenas nas cadeias alfa-1.

A - Val: cadeias alfa-2 da primeira, terceira e quarta triplas hélices;

B - Leu: cadeias alfa-2 da primeira, segunda e quarta triplas hélices;

C - Ile: cadeias alfa-2 da segunda e da quarta triplas hélices;

D - Met: cadeias alfa-1 e alfa-1 da primeira tripla hélice;

E - Phe: cadeias alfa-1, alfa-2 e alfa-1 da primeira tripla hélice.

Aminoácidos Ácidos

Em relação à distribuição percentual, enquanto o Glu praticamente se distribui igualmente nas zonas do **Gap** (28,7%) e do **Overlap** (33,2%), o Asp, no **Gap** tem 25,2% e no **Overlap** 12,4%, isto é, praticamente o dobro de resíduos. Em relação ao conteúdo deste dois **aa** nas zonas **Overlap** e **Gap**, podemos dizer que a última é significativamente mais ácida. Coincidentemente esta é a região onde ocorre a maioria das interações com ligantes carregados negativamente, a Decorina, os Sufatos de Dermatana e Queratana (Tabela 3) sugerindo que as ligações entre estes ligantes e o colágeno tipo I ou não são feitas apenas por interação de cargas, ou as cargas positivas estão concentradas em regiões bem específicas dentro do período **D**.

Em relação a distribuição destes **aa** ao longo das cadeias alfa os resultados da Figura 31 mostram diferenças significativas:

- **Asp:** Independentemente da região do período **D** está distribuído principalmente nas cadeias α_1 da **terceira tripla hélice** da microfibrila, com grande predominância para a zona do **Gap**;

- **Glu:** Distribuído homogeneamente não apenas nas zonas **Gap** e **Overlap**, mas também ao longo de todas as cadeias alfa-1.

Figura 31. Distribuição dos resíduos de Ácido Aspártico e Glutâmico nas α hélices da microfibrila correspondente ao intervalo de um período **D**.

Aminoácidos Básicos

Em termos percentuais, Lys e Arg praticamente repetem o perfil de distribuição de Asp e Glu, isto é, enquanto que numericamente, a Arg apresenta uma distribuição mais homogênea em relação às zonas **Overlap** e **Gap** (27,5% e 29,3% respectivamente), a Lys tem praticamente o dobro do número de resíduos na zona do **Gap** (23,1%) em relação à zona do **Overlap** (14,3%). A His está distribuída praticamente de modo igual nas zonas **Gap** e **Overlap**. Em relação à distribuição nas cadeias, a Lys predomina nas cadeias alfa-1 da segunda e terceira triplas hélices (Figura 32) tanto no **Gap** quanto no **Overlap**. A Arg **Overlap** distribui-se igualmente entre cadeias alfa-1 e alfa-2, principalmente na terceira tripla hélice (Figura 32). No **Gap**, nas cadeias alfa-1 da quarta tripla hélice, nas cadeias alfa-2 nas segunda e terceira.

Figura 32. Distribuição dos resíduos de Lisina e Arginina nas α hélices da microfibrila correspondente ao intervalo de um período **D**.

IV.3. Análise da distribuição dos aminoácidos de acordo com o Modelo de Smith (1968).

A primeira característica observada na distribuição é aquela descrita na introdução (Figura 12b) e repetida abaixo na Figura 33. Aminoácidos ácidos mais **aa** básicos e **aa** hidrofóbicos formam zonas de distribuição alternadas dentro do período **D** e, aparentemente, com alguma superposição.

Aminoácidos Hidrofóbicos

Embora não mostrado, os **aa** hidrofóbicos Met, Tyr, Phe, Val, Leu e Ile podem ser incluídos em duas categorias em relação à suas distribuições ao longo da penta-fibrila no período **D**:

A – Um grupo que inclui a Val, Leu e Ile que é distribuído regularmente ao longo do período **D**.

B – Um segundo grupo incluindo a Phe e a Met que apresenta uma distribuição mais pontual (mais localizada) ao longo do período **D**.

Figura 33. Perfil da distribuição de aminoácidos ácidos mais aminoácidos básicos (área em laranja) em comparação com aquela dos aminoácidos hidrofóbicos (linha preta) para a região do período **D**: **Overlap**: bandas **c1, b2, b1 e a4**. **Gap**, bandas **a3, a2, a1, e2, e1, d, c3 e c2**.

A somatória da sua distribuição, numa visão tridimensional, é mostrada na Figura 34. Como podem ser observados os aa hidrofóbicos, se distribuem ao longo da microfibrila em forma de aglomerados bem localizados e sua associação com aa ácidos e aa básicos pode ser de dois tipos: uns onde aa hidrofóbicos delimitam áreas livres (bolsões) (Figura 34 setas e círculos) ou canais (Figura 35) onde se alojam os aa ácidos mais aa básicos; uns onde aa ácidos mais aa básicos e aa hidrofóbicos formam verdadeiros aglomerados.

Figura 34. Representação esquemática tridimensional da distribuição dos aminoácidos hidrofóbicos do período **D** do colágeno tipo I. Formação de bolsões.

Figura 35. Representação esquemática tridimensional da distribuição dos aminoácidos hidrofóbicos do período **D** do colágeno tipo I ilustrando a formação de canais. Visão de duas posições diferentes (giro de 180 °).

Aminoácidos Ácidos

Uma grande parte dos **aa** ácidos (Figura 36) literalmente ocupa os espaços delimitados pelos **aa** hidrofóbicos e mostrados nas Figuras 34 e 35.

Figura 36. Representação esquemática tridimensional aminoácidos ácidos (em vermelho) juntamente com os aminoácidos hidrofóbicos (em preto) para o período **D** do colágeno tipo I. Visão de duas posições diferentes (giro de 180 °).

Aminoácidos Básicos

Valem para os **aa** básicos (Figuras 37), o mesmo comentário acima feito para os **aa** ácidos.

Figura37. Representação esquemática tridimensional dos aminoácidos básicos (em azul) juntamente com os aminoácidos hidrofóbicos (em preto) para o período **D** do colágeno tipo I Visão de duas posições diferentes (giro de 180 °).

Entretanto, a ilustração tridimensional da distribuição dos **aa** ácidos mais **aa** básicos e **aa** hidrofóbicos, ao longo do período **D** (Figura 38), mostra que a distribuição destes **aa**, embora seja basicamente caracterizada pela presença de regiões onde **aa** ácidos mais **aa** básicos estão delimitados por **aa** hidrofóbicos, apresenta, pelo menos, três regiões (Figura 38, indicado por elipses) onde esses **aa** estão agrupados formando verdadeiros aglomerados de **aa** básicos, ácidos e hidrofóbicos. Estas regiões, que estão localizadas entre as bandas **a4** e **a3**, entre **c2** e **c3** e em **c1**, também são regiões caracterizadas por um grande número de eventos envolvendo o colágeno tipo I nas atividades da MEC (Tabelas 4, 5 e 6).

Figura 38. Representação esquemática tridimensional da distribuição de aminoácidos ácidos mais básicos (em azul) e hidrofóbicos (em preto) para o período **D** no colágeno tipo I.

Estes resultados sugerem, portanto, que a topografia da distribuição dos **aa** ácidos mais **aa** básicos e **aa** hidrofóbicos pode ser agrupada em:

- Um primeiro grupo cuja organização dá origem a espaços ou canais nos quais estão alojadas as grandes maiorias dos **aa** ácidos e básicos, abrangendo as bandas **b1, b2, a2, a1, e1, e2, d** e **c3** (Figura 33);

- Um segundo grupo alinhado ao longo dos mesmos eixos transversos do período **D** da microfibrila, com **aa** básicos e ácidos, formando aglomerados com **aa** hidrofóbicos localizados entre as bandas **a4 - a3, c2-c1** e **c1**.

Para definir melhor estas zonas foi utilizado um artifício na construção de um novo perfil de distribuição de **aa** ácidos mais **aa** básicos com base:

1 – Na planilha do anexo I, em que todos os **aa** do período **D** tiveram um valor atribuído igual 0, exceto os **aa** ácidos e os **aa** básicos, que tiveram um valor atribuído igual a 1;

2 – No eixo perpendicular do período, onde os números foram somados de tal forma que o resultante corresponde ao total de resíduos de **aa** ácidos e **aa** básicos, para cada posição no período que vai de a posição 1 até 260 a fim de incluir a banda **c1** do próximo período. A curva resultante é a mesma mostrada nas Figuras 12b e Figura 29;

3 – No mesmo procedimento feito para os **aa** hidrofóbicos;

4 – Com esses dois conjuntos de dados (itens 1 e 2), o total de **aa** ácidos mais básicos para uma posição na microfibrila, (por exemplo, a posição número 10), foi subtraído do total de **aa** hidrofóbicos existentes na mesma posição;

5 – Na subtração, se na mesma posição não houver **aa** hidrofóbicos, o total de **aa** ácidos mais básicos permanece o mesmo, indicando que não estão alinhados na mesma posição do período **D**. Se houver **aa** hidrofóbicos, o número total de **aa** ácidos e básicos diminui, alterando a curva de distribuição destes **aa** refletindo, portanto, os níveis de superposição ou alternância entre eles, ao longo do período **D**.

A curva resultante em comparação com a distribuição de **aa** ácidos mais **aa** básicos esta mostrada na Figura 39.

Figura 39. Distribuição dos aminoácidos ácidos e aminoácidos básicos no período: área preenchida em laranja: distribuição normal; linha verde: distribuição resultante da subtração entre o número de aminoácidos (ácidos mais básicos) e o número de aminoácidos hidrofóbicos.

A curva resultante mostra que quando se faz a subtração dos **aa** ácidos mais **aa** básicos do número de resíduos hidrofóbicos, embora alterações menores sejam observadas em todas as bandas, algumas delas, perdem suas identidades em relação ao perfil original da distribuição de **aa** ácidos mais básicos de acordo com o padrão obtido por MET (Figura 12b). Estas bandas foram:

- 1 – Bandas **a4** e **a3**;
- 2 – Intervalo entre as bandas **c2** e **c1**;
- 3 – Banda **c1**.

4 – Ombro à direita da banda **b2** que não passível de definição quando da avaliação da Figura 38.

Um aspecto interessante é que, exceto pela banda **b2**, todas estas regiões estão localizadas próximas ao limite das zonas **Gap** e **Overlap** e que no conjunto estão associadas à cerca de 71,9% dos sítios das interações que envolvem o colágeno tipo I com as atividades que ocorrem na MEC (Tabelas 3, 4, 5, 6 e 8).

IV.4. Características ácido-básicas das regiões do período D do colágeno envolvidas na interação com a MEC

Um outro aspecto analisado neste trabalho foi a distribuição de cargas negativas e positivas ao longo do período **D** para avaliação das resultantes de carga, principalmente porque muitos dos ligantes associados ao colágeno tipo I (Tabelas 3, 4, 5 e 6) são macromoléculas carregadas negativamente em pH fisiológico.

Em proteínas no pH fisiológico, as cadeias laterais dos **aa** ácidos e **aa** básicos (exceção feita a His) contribuem respectivamente com uma unidade de carga negativa e uma positiva respectivamente.

Figura 40. Ilustração da formação de pontes salinas entre dois aminoácidos **(a)** e numa proteína **(b)**, seta).

Portanto, para saber se uma proteína em pH fisiológico é carregada negativa ou positivamente, basta subtrair o total de cargas negativas do total de cargas positivas independentemente da posição da carga na proteína.

Este excedente de carga tem origem na formação de pontes salinas (Figura 40), onde uma carga negativa neutraliza uma carga positiva. Guardadas as devidas proporções, a ponte salina se assemelha à ligação entre um íon Cl^- e um íon Na^+ nos cristais de cloreto de sódio e, nas proteínas, tem um papel importante para a estabilização da estrutura tridimensional.

Em maior escala, estas interações ocorrem também com macromoléculas carregadas positivamente e negativamente. Portanto, se a maioria dos ligantes das Tabelas 3 e 4 são carregados negativamente em pH fisiológico, do ponto de vista químico, a reação destes com o colágeno seria um evento espontâneo na direção de formar complexos salinos.

No caso do colágeno tipo I, com um total de 226 resíduos de Glu^- e Asp^- e 256 resíduos de Lys^+ e Arg^+ (Tabela 3) a resultante de carga é de 30 unidades de cargas positivas. Como consequência, em pH fisiológico, o colágeno tipo I é uma molécula carregada positivamente ou próxima da neutralidade. Entretanto, o fato do colágeno tipo I ser uma molécula carregada positivamente em pH fisiológico (Figura 41) e ter uma distribuição de carga como aquela mostrada na Figura 12b esta não descreve qual a resultante de carga para cada banda.

Portanto, foi determinado qual o perfil da resultante de carga no colágeno tipo I ao longo do período **D** e sua eventual correlação com seus os ligantes (Tabela 4-6).

Figura 41. Representação esquemática para a resultante total de cargas na molécula de tropocolágeno tipo I com base na sua estrutura primária.

Para isto, foi utilizado o mesmo expediente quando da subtração dos **aa** hidrofóbicos da soma total de **aa** ácidos mais **aa** básicos (Figura 39, curva a). Neste caso o número total de **aa** básicos foi subtraído do total de **aa** ácidos e o critério de subtrair **aa** básicos de **aa** ácidos foi baseado no seu maior número. O resultado obtido está mostrado na Figura 42 e apresentou as seguintes características:

1 – A resultante para distribuição de cargas positivas e negativas é pontual, isto é, localizadas em regiões bem definidas;

2 – Uma região caracterizada por uma elevada densidade de carga positiva (Figura 42, setas azuis escuras) superposta com **aa** hidrofóbicos. Regiões como estas, que chamamos de zonas mistas, foram localizadas junto às bandas **a4-a3**, banda **c2-c1** e **c1**.

3 – Outras regiões caracterizadas por elevada densidade de cargas positivas ou negativas e envolvidas nas atividades do colágeno com a MEC (Figura 42, setas azuis claras e vermelhas) se diferenciam das zonas mistas, pelo fato de estarem em vales

formados por **aa** hidrofóbicos. Estas regiões foram denominadas de bolsões e aquelas com densidade de carga positiva foram localizadas entre os resíduos 20-41 (**b1**), 20-70 (**b2**), 121-166 (**e1**) e 166-195 (banda **d**) (critério utilizado foi o pico para o número de resíduos de **aa** hidrofóbicos). Aquela com densidade de carga negativa, está localizada entre os **aa** 1-21 (banda **c1**) e 121-166 (banda **e2**). A estas regiões não são atribuídas quaisquer atividades envolvendo a MEC e o colágeno em eventos de adesão.

Figura 42. Curva em laranja: distribuição normal de aminoácidos ácidos e aminoácidos básicos no período **D**; Curva em preto: distribuição normal dos aminoácidos hidrofóbicos; Curva em verde: resultante da distribuição de cargas ao longo do período **D**.

Outro aspecto da topografia, em relação à resultante de carga, comparativamente à distribuição dos **aa** hidrofóbicos é mostrado na Figura 43.

Figura 43. Curva em preto (área preenchida): distribuição normal dos aminoácidos hidrofóbicos; Curva em verde: resultante da distribuição de cargas ao longo do período **D**. As posições das bandas estão distribuídas corretamente ao longo da abscissa; em vermelho: linha perfil da resultante de carga ao longo do período **D**; em azul claro: linha perfil da distribuição dos aminoácidos hidrofóbicos ao longo do período **D**.

A curva resultante para a distribuição de cargas (Figura 43, linhas vermelhas) apresenta um máximo em **c2** (resultante positiva), decrescendo a partir deste ponto

até aproximadamente a posição da banda **b2** (resultante negativa), voltando a crescer com um novo ponto de máximo próximo da banda **a3** (resultante positiva). Decresce, novamente, até a posição **a1** (resultante negativa), completando o ciclo com o máximo na banda **c2**. Com pequenos deslocamentos para posições mais altas no período, este foi também o comportamento da distribuição para os **aa** hidrofóbicos (Figura 43, linha azul clara).

IV.5. Características das Inter-relações do colágeno tipo I com eventos da matriz extracelular

A Tabela 8 mostra os resultados das interações do colágeno tipo I e as bandas envolvidas nas interações.

Tabela 8. Resumo da localização das interações de ligantes com o colágeno tipo I e sua identificação dentro do período **D**.

RESUMO ENVOLVENDO EVENTOS DE NATUREZA ESTRUTURAL											
Ligante	Atuação	Bandas									
		c1	b2	b1	a4	a3	e2	e1	d	c3	c2
Decorina ^{64,65}	Colágeno						-	-/+	+		
Dermat, Condroi ⁶⁶	MEC						-	-/+	+		
Queratina	MEC	-			+	+					-
Colágeno	Fibrilogênese				+	+					
Fibronectina	Fibras				+						
Colág. tipo IV	Fibrilogênese								+		
		Número de interações/banda									
Número de interações = 15		1			3	2	2	2	3	1	1
% Total		6,6			19,8	13,2	13,2	13,2	19,8	6,6	6,6
Tipo de banda		c		b		a		e		d	
Total/ banda		3		0		5		4		3	
%		19,8				33,0		26,4		19,8	

Sinais de - e +: Resultante de carga nestas bandas.

Tabela 8 (continuação). Resumo da localização das interações de ligantes com o colágeno tipo I e sua identificação dentro do período **D**.

RESUMO ENVOLVENDO EVENTOS LIGANTES ASSOCIADOS À ADESÃO											
Ligante	Atuação	Bandas									
		c1	b2	b1	a4	a3	e2	e1	d	c3	c2
Decorina	Fagocit. col	-									
Heparina	Cél endotel.					+					
Prec prot. Amielói.	Adesão					+					
Prot. oligom cartil.	Crescim. Cel.		-			+					
Prot. lig. cel. Col.	Adesão			+							
von de Willebrand	Coagulação					+					
Fosfoforina	Mineralização	-				+					
Número de interações = 9		Número de interações/banda									
		2	1	1		5					
% Total		22,2	11,1	11,1		55,5					
Tipo de banda		c		b		a		e		d	
Total/ banda		2		2		5		0		0	
%		22,2		22,2		55,5					
RESUMO ENVOLVENDO INTEGRINAS E ADESÃO											
Identificação da Integrina	Atuação	Bandas									
		c1	b2	b1	a4	a3	e2	e1	d	c3	c2
α2β1 e α1β1	Adesão cel.		-				-				
α2β1	Plaquet. Lam.				+					0	
α2β1	Fibroblastos e outra céls.		-	+	+					0	
α2β1	Fibroblasto derme					+					
α2β1	Cels Ovário Hamster		-	+							
α2β1	Cel Carcinoma mama									0	
α2β1	Linfócitos T inibição			+	+						
α2β1	Angiogênese					+					
Número de interações = 15		Número de interações/banda									
			3	3	3	2	1			3	
% Total			20,0	20,0	20,0	13,3	6,6			20,0	
Tipo de banda		c		b		a		e		d	
Total/ banda		3		6		5		1		0	
%		20,0		40,0		33,3		6,6			

Sinais de - e +: Resultante de carga nestas bandas.

Tabela 8 (Continuação). Resumo da localização das interações de ligantes com o colágeno tipo I e sua identificação dentro do período **D**.

RESUMO ENVOLVENDO EVENTOS DE NATUREZA QUIMICA											
Identificação Do agente	Atuação	Bandas									
		c1	b2	b1	a4	a3	e2	e1	d	c3	c2
Colagenase	Hidrólise col.				+						
Glicação	Ageing	-									-
Ácido acetil salicílico	Embebição								+		-
Frutose	Embebição	-									
hidrólise	c2-c1, a	-			+						-
Número de interações = 11		Número de interações/banda									
		3			2	1			1	1	3
% Total		27,3			18,2	9,1			9,1	9,1	27,3
Tipo de banda		c		b		a		e		d	
Total/banda		7		0		3		0		1	
%		93,7		0		27,3		0		9,1	

Sinais de - e +: Resultante de carga nestas bandas.

Tabela 9: Número de eventos envolvendo as zonas **Overlap** e **Gap** do período **D** do colágeno tipo I nas atividades da Matriz Extracelular.

	Overlap					Gap				
	c1	b2	b1	a4	a3	e2	e1	d	c3	c2
Natureza Estrutural (15) ^a	1	-	-	3	2	2	2	3	1	1
% Eventos Overlap/Gap	38,6					59,4				
Ligantes Associados à Adesão (9)	2	1	1	-	5	-	-	-	-	-
% Eventos Overlap/Gap	100,0									
Adesão com Integrina (15)	-	3	3	3	2	1	-	-	3	-
% Eventos Overlap/Gap	73,3					26,7				
Natureza Química (11)	3	-	-	2	1	-	-	1	1	3
% Eventos Overlap/Gap	54,5					45,5				
SOMA (Total 50)	6	4	4	8	10	3	2	4	5	4
% total/banda	13,0	8,7	8,7	17,4	21,8	6,5	4,3	8,7	11,9	8,7
	Total Overlap = 69,6%					Total Gap = 30,4%				

a – Número total de ventos.

Tabela 10: Número de eventos envolvendo o colágeno tipo I nas atividades da Matriz

Extracelular nas zonas: **mistas** (regiões formando aglomerados de aminoácidos hidrofóbicos, ácidos e básicos em cinza); **bolsões ou canais** (regiões de densidades de cargas positivas e/ou negativas delimitadas por regiões hidrofóbicas em amarelo).

	Overlap					Gap				
	c1	b2	b1	a4	a3	e2	e1	d	c3	c2
Natureza Estrutural	1	-	-	3	2	2	2	3	1	1
Total de interações	1	0		5		7			2	
% Interações	6,7	0		33,3		46,7			13,3	
% Eventos Overlap/Gap	Mistas					Bolsão				
	53,3					46,7				
Adesão (integrinas e ligantes)	2	4	4	3	7	1	-	-	3	-
Total de interações	2	8		10		1			3	
% Interações	8,3	33,3		41,6		4,1			12,5	
% Eventos Overlap/Gap	Mistas					Bolsão				
	62,6					37,4				
Natureza Química	3	-	-	2	1	-	-	1	1	3
Total de interações	3	0		3		1			3	
% interações	27,3	0		27,3		9,1			27,3	
% Eventos Overlap/Gap	Mistas					Bolsão				
	90,9					9,1				

Características das Interações (Tabelas 9 e 10)

1 – Eventos de Natureza estrutural: do total de eventos, 40,0% ocorre na zona do **Overlap** e 60,0% na zona do **Gap**. O fato interessante é que, todos os eventos na zona **Gap** são devidos a Decorina, Sulfato de Condroitina e Dermatana, moléculas envolvidas na manutenção da estrutura da MEC. Apenas o Sulfato de Queratana, também envolvido na manutenção da estrutura da MEC, interage na zona do **Overlap**, próximo as interfaces das zonas **Overlap/Gap**. Esses resultados

sugerem que, a maior parte do controle estrutural da MEC, envolvendo o colágeno tipo I, está localizado na zona do **Gap**.

Levando-se em consideração que do total das interações atribuídas à zona do **Overlap**, 33,3% ocorrem na interface **Overlap/Gap** podemos dizer que as interações de natureza estruturais têm origem na interface **Overlap/Gap** se estendendo para zona do **Gap** e como consequência é provável que a zona **Overlap** tem pouca ou nenhuma participação nestes eventos. A somatória dos eventos neste intervalo é de 93,3%.

Enquanto Decorina, Sulfato de Condroitina e Dermatana interagem com o período **D** em regiões carregadas delimitadas por barreiras hidrofóbicas (bolsões), o sulfato de Dermatana interage em zonas mistas, isto é, aglomerados de **aa** sobre o período **D** contendo uma alta densidade de **aa** hidrofóbicos associados a uma elevada densidade de carga positiva (Figuras 42 e 43).

2 – Macromoléculas associadas a eventos de adesão: 100% das adesões foram observadas na zona **Over**. De um total de nove interações (Tabela 9), sete ocorrem nas zonas mistas (duas na banda **c1** e cinco na banda **a3**). As outras duas foram observadas em bolsões correspondentes as zonas **b1** e **b2**.

3 – Adesão mediada por Integrinas: no caso das Integrinas, o padrão observado foi similar ao das moléculas de adesão com uma predominância de 73,3% da zona **Overlap** em relação à zona do **Gap** que tem apenas 26,7% das ocorrências.

Em relação aos eventos de adesão, levando em consideração a participação das moléculas de adesão e aqueles mediados pelas Integrinas, 83,3% ocorrem na zona do **Overlap** e 12,7% na zona do **Gap**.

Em comparação com os dados observados para moléculas estruturais, os resultados sugerem que a junção **Overlap/Gap** é um divisor funcional das interações do colágeno tipo I que ocorrem na MEC.

Em relações aos bolsões, eventos de adesão ocorrem preferencialmente nas zonas mistas, 44,3%, e 55,7% nos bolsões, uma distribuição similar àquelas observadas para as interações de natureza estrutural.

4 - Interações de Natureza Química: embora as distribuições nas zonas **Overlap/Gap**, sejam aproximadamente iguais, surpreendentemente, 63,6% das interações ocorrem nas regiões das mistas. Em princípio, o que se esperaria, é um maior número de interações nas regiões dos bolsões por serem menos impedidas de acessar essas zonas por estarem mais expostas. Esses resultados sugerem que, apesar de aparentemente mais acessíveis, não permitem a entrada de moléculas pequenas.

5 – Resultante de carga: Como mostram os resultados da Tabela 8 (indicações feitas pelos sinais de – e +) não foi possível chegar a qualquer tipo de correlação entre resultante de carga do período **D** do colágeno tipo I e atividades na MEC.

V. CONCLUSÕES

1 – Em relação à distribuição dos **aa** ácidos, mais **aa** básicos e **aa** hidrofóbicos o período **D** do colágeno tipo I é caracterizado por apresentar duas regiões distintas: uma, onde **aa** se alojam em espaços delimitados por **aa** hidrofóbicos; a outra, onde **aa** básicos, **aa** ácidos e **aa** hidrofóbicos formam aglomerados.

2 – A interface **Overlap: Gap** parece funcionar com um divisor das atividades da MEC envolvendo o colágeno tipo I. Enquanto a zona do **Overlap** está envolvida nas atividades de adesão (83,2% das interações) a zona do **Gap** controla efeitos de natureza estrutural. Levando-se em consideração as interações que ocorrem a partir do limite **Overlap: Gap** e em direção ao **Gap** 93,3% destas interações ocorrem neste intervalo.

3 – Exceto para o caso dos eventos de natureza estrutural, as zonas mistas isto é, aquelas formadas por **aa** ácidos, **aa** básicos e **aa** hidrofóbicos e localizadas nas proximidades do limite **Overlap:Gap** são aquelas mais envolvidas nas outras atividades da MEC moduladas pelo colágeno tipo I.

4 – Para explicar a amplitude de atividade biológica resultante da interação de ligantes com o colágeno tipo I é proposto o que se segue baseado na existência de gradientes eletrostático e hidrofóbico existentes ao longo do período **D**. Assim sendo, os ligantes poderiam:

A – Interagir em sítios diferentes sobre o colágeno por meio de um “ajuste” entre suas propriedades (carga, massa molecular e hidrofobicidade) e o gradiente eletrostático e hidrofóbico existente.

B – Em função das características do gradiente eletrostático e hidrofóbico a interação do ligante induz alterações na superfície do colágeno expondo sítios específicos para atividades biológicas da MEC. Para citar alguns exemplos, temos a Fosfoforina no processo de biomineralização da Dentina, o fator de von de Willebrand na formação do coágulo sanguíneo, da formação de estruturas tubulares por células endoteliais e a ação da collagenase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B et al. (1994). **Molecular Biology of the Cell**, 3.ed. New York: Garland.

ALDINGER, G. et al. (1991). Bone morphogenetic protein: a review. **Journal International Orthopaedics**, Berlin/Heidelberg, v.15, n.2, p.169-177, June.

BAILEY, A.J. (2001). Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. **Mechanisms of Ageing and Development**, Amsterdam, v.122, n.7, p.735-755, May.

BAILEY, A.J.; PAUL, R.G.; KNOTT, L. (1998). Mechanisms of maturation and ageing of collagen. **Mechanisms of Ageing and Development**, Shanon, v.106, n.12, p.1-56, Dec.

BARENBERG, S.A.; FILSKO, F.E.; GEIL, P.H. (1978). Ultrastructural deformation of collagen. **Connective Tissue Research**, Philadelphia, v.6, n.1, p.25-35, Jan.

BEHER, D. et al. (1996). Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on app and collagen type i. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.271, n.3, p.1613-1620, Jan.

BENIASH, E. Et al. (2000). Transmission electron microscope study using vitrified ice sections of predentin: structural changes in the dentin collagenous matrix prior to mineralization. **Journal of Structural Biology**, Duluth, v.132, n.3, p.212-225, Dec.

BERDAL, A. et al. (1991). The cellular and extracellular distribution of osteocalcin and phosphoprotein in teeth of vitamin D-deficient rats. **The Journal of Biological Buccale**, Roma, v.19, n.1, p.45-53, Mar.

BHADIRAJU, K.; LINDA, K. (2000). Hansen hepatocyte adhesion, growth and differentiated function on RGD-containing proteins. **Biomaterials**, Liverpool, v.21, n.3, p.267-272, Feb.

BHIDE, V.M. et al. (2005). Collagen phagocytosis by fibroblasts is regulated by decorin. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.280, n.24, p.23103–23113, Jun.

BRAILE, D.M. (1990). **Prótese valvular de pericárdio bovino: desenvolvimento e aplicação clínica na posição mitral**. São Paulo. 110f. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

CALVERT, P.D. (1994). Biomimetic mineralization: processes and prospects. **Materials Science and Engineering**, Lausanne, v.1, n.2, p.69-74, June.

CHAPMAN, J.A.; TZAPHLIDOU, M.; MEEK, K.M. (1990). The collagen fibril: a model system for studying the staining and fixation of a protein. **Electron Microscope Review**, Oxford, v.3, n.1, p.143-182, Jan.

CLARK, R.H et al. (1999). Protein eletrostatic surface distribution can determine whether calcium oxalate crystal growth is promoted or inhibited. **Calcified Tissue International**, New York, v.64, n.6, p.516–521, June.

COPPOLINO, M.G.; DEDHAR, S. (2000). Review Bi-directional signal transduction by integrin receptors. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Philadelphia, v.32, n. 2, p.171-188, Feb.

DAHL, T.; SABSAY, B.; VEIS, A. (1998). Type I collagen-phosphoryn interactions: specificity of the monomer-monomer binding. **Journal of Structural Biology**, Duluth, v.123, n.2, p.162-168, Oct.

DELACOUX, F. Et al. (2000). Unraveling the amino acid sequence crucial for heparin binding to collagen V. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.275, n.38, p.29377-29382, Sept.

DI LULLO, G.A. et al. (2002). Mapping the ligand binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. **Journal of Biology Chemistry**, Bethesda, v.277, n.6, p.4223-4231, Feb.

DOUGLAS, R. et al. (2000). Decorin binds near the C terminus of type I collagen. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.275, n.29, p.21801–21804, July.

DZAMBA, B.J. et al. (1993). Fibronectin binding site in type I collagen regulates fibronectin fibril formation. **Journal of Cell Biology**, New York, v.121, n.5, p.1165-1172, May.

FIELDS, J.L.L. et al. (2000). Hydrolysis of triple-helical collagen peptide models by matrix metalloproteinases. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.275, n.18, p.13282-13290, May.

FLEISCHMAJER R. et al. (1991). Decorin interacts with fibrillar collagen of embryonic and adult human skin. **Journal of Structural Biology**, Duluth, v.106, n.1, p.82-90, Feb.

GLYCOSAMINOGLYCANAS. Disponível em: <<http://www.indstate.edu/thcme/mwking/glycans.html>> Acesso em: 3 abr.2006.

GOISSIS, G.; MAGINADOR, S.V.S.; MARTINS, V.C.A. (2003). Biomimetic mineralization of charged collagen matrices: in vitro and in vivo study. **Artificial Organs**, Painesville, v.27, n.4, p.425-431, Apr.

GRAB, B. et al. (1996). Promotion of fibroblast adhesion by triple-helical peptide models of type i collagen-derived sequences. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.271, n.21, p.12234-12240, May.

GRINNELL, F. et al. (1999). Differences in the regulation of fibroblast contraction of floating versus stressed collagen matrices. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.274, n.2, p.918-923, Jan.

GUMBINER, B.M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, Cambridge, v. 84, n.3, p.345-57, Feb.

HADLEY, J.; MALIK, N.; MEEK, K. (2001). Collagen as a model system to investigate the use of aspirin as an inhibitor of protein glycation and crosslinking. **Micron**, Orlando, v.32, n.32, p.307–315, Apr.

HARRIS, N.L et al. (2000). Analysis of bone sialoprotein: identification of the hydroxyapatite-nucleating and cell-binding domains by recombinant peptide expression and site-directed mutagenesis. **Bone**, New York, v.27, n.27, p.795-802, June.

HAY, E. (1992). **Cell biology of extracellular matrix**. 2.ed. New York: Plenum Press.

HE, G. et al. (2003). Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein. **Nature Materials**, London, v.2, n.2, p.552-558, Aug.

HEINO, J. (2000) The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. **Matrix Biology**, Philadelphia, v.19, n.4, p.319-323, Aug.

HIDALGO,M.M.; ITANO, E.N.; CONSOLARO, A.C. (2005). Humoral immune response of patients with dental trauma and consequent replacement resorption. **Dental Traumatology**, v. 21, n.4 Page 218 – 225, Aug.

- HODDE, J. (2002). Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration. **Tissue Engineering**, New Rochelle, v.8, n.2, p.295-308, Apr.
- HOFFMAN, A. S. (1995). Intelligent polymers in medicine and biotechnology. **Artificial Organs**, Painsville, v.19, n.5, p.458-467, May.
- HOSHI, K. et al. (1999). The primary calcification in bones follows removal of Decorin and fusion of collagen fibrils. **Journal of Bone and Mineral Research**, Durham, v.14, n.2, p.273-280, Feb.
- HYNES, R.O. (2002). Integrins Bidirectional, Allosteric Signaling Machines, **Cell**, Cambridge (USA), v.110, n.6, p.673-687, Sept.
- INGBER, D. (1994). Cellular tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis. **International Review of Cytology**, London, v.150, p.173-224.
- KAPLAN, F.S. et al. (1996). Form and function of bone. In: SHELDON, R.S. **Orthopaedic basic science**. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons. Cap.4, p.127-184.
- KEENE, D.R. et al. (2000). Decorin binds near the C terminus of type I collagen. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.275, n.29, p.21801-21804, July.
- KEENE, D.R.; RIDGWAY, C.C.; IOZZOB, R.V. (1998). Type VI microfilaments interact with a specific region of banded collagen fibrils in skin. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Seattle, v.46, n.2, p.215-220, Feb.
- KIM, B.; MOONEY, D.J. (1998). Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. **Trends in Biotech**, Orlando v.16, n.5, p.224-230, May.

- KLEINMAN, H.K. et al. (1978). Localization of the binding site for cell attachment in the $\alpha 1(I)$ chain of collagen. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.253, n.16, p.5642-5646, Aug.
- KNIGHT C.G. et al. (1998). Identification in collagen type I of an Integrin $\alpha 2\beta 1$ -binding site containing an essential GER sequence. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.273, n.50, p.33287–33294, Dec.
- KRUKOWSKI, M. et al. (1995). Hard and soft connective tissue growth and repair in response to charged surfaces. In: DAVIES, J.E.; SHELTON, R.M. **The bone-biomaterial interface**. Toronto: Toronto Press, p 275-284.
- LANGER, R.; CIMA, L.G.; TAMADA, J.A.; WINTERMANTEL, E. (1990). Future directions in biomaterials. **Biomaterials**, Liverpool, v.11, n.9, p.38-745, Nov.
- LAUFENBURGER, D.A., LINDERMAN, J.L. (1993). **Receptors: models for binding, tracking, and signaling**, New York: Oxford University Press.
- LEMER, U.H. (2000). Osteoclast formation and resorption. **Matrix Biology**, Philadelphia, v.19, n.2, p.107-120, May.
- LI, Z. (2004). **Characteristics of platelet surface expression of glycoprotein vi in type 2 diabetes**. 91f. Dissertação Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen der Technischen Universität München – Munchen – Germany, 2004.
- LODISH, H. et al. (1995) **Molecular Cellula Biology**. New York, W. H. Freeman, v.1.
- MAHLER, H.R.; CORDES, E.H. (1972). **Biological Chemistry**. 2.ed. New York, Harper and Row Publishers, 44p.
- MAITLAND, E.M.; ARSENAULT, L. (1991). A correlation between the distribution of biological apatite and aminoacids sequence of type I collagen. **Calcified Tissue International**, New York, v.48, n.5, p.341-352, May.

- MANN, S. (1989). Crystallochemical strategies in biomineralization. In: MANN, S., WEBB, J., WILLIAMS, R.J.P **Biomineralization: Chemical and Biochemical perspectives**. Ed Weinheim: Federal Republic of Germany; New York: VCH, p. 1-39.
- MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. (1996). **Osteoporosis**. San Diego: Academic Press.
- MARK, J.E.; CALVERT, P.D. (1994). Biomimetic, hybrid and in situ composites. **Material Science and Engineering**, Orlando, C1, 159-173, Mar.
- MARTIN, R.B. (2000). Toward a unifying theory of bone remodeling. **Bone**, New York. v.26, p.1-6.
- MATSUI, S. (1996). Histological evaluation of skin reconstruction using artificial dermis. **Biomaterials**, Liverpool, v.17, n.10, p.995-1000, May.
- METAPLASIA. Definition: Metaplasia is the reversible replacement of one differentiated cell type into another cell. In connective tissue metaplasia is the formation of cartilage. **Bone**. Disponível em: <http://www.humpath.com/article.php>. Acesso: 07 Jul, 2006.
- NOMURA S.; YAMAMOTO T.T. (2000). Molecular events caused by mechanical stress in bone. **Matrix Biology**, Philadelphia, v.19, n.2, p.91-96, May.
- POLLACK, S.R. (1984). Bioelectrical properties of bone. In: BRIGTHON C.T. ed. **The Orthopedic Clinics of North America**. Pennsylvania: WB. Saunders Company, v.15, p.3-14
- PROCKOP, D.J.; FERTALA, A. (1998). Inhibition of the self-assembly of collagen i into fibrils with synthetic peptides. demonstration that assembly is driven by specific binding sites on the monomers. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.273, n.25, p.15598-15604, Feb.

- RAMACHANDRAN, G.N. (1967). **Treatise on collagen**. London: Academic Press. v.1, p.337-353.
- RATNER, B.D. (1993). New ideas in biomaterials science a path to engineered biomaterials. **Journal Biomedical Material Research**, Rotterdam, v.27, n.7, p.837-850, July.
- REISER, K.M.; AMIGABLE, M.A.; LAST, J.A. (1992). Nonenzymatic glycation of type I collagen: the effects of aging on preferential glycation sites. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.267, n.34, p.24207-24216, Dec.
- REKHETER, M. D. (1999). Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. **Cardiovascular Research**, Giessem, v.41, n.2, p.376-384, Feb.
- RIMINUCCI, M.; BIANCO, P. (2003). Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.36, n 8p.1027-1036, Aug.
- ROMIJN, R.A. et al. (2003). Mapping the collagen-binding site in the von willebrand factor-a3 domain. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.278, n.17, p.15035–15039, Apr.
- ROSENBERG, K. et al. (1998). Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.273, n.32, p.20397-20403, Aug.
- SAN ANTONIO, J.D.; LANDER, A.D.; KARNOVSKY, M.J.; SLAYTER, H.S. (1994). Mapping the heparin-binding sites on type I collagen monomers and fibrils. **Journal of Cell Biology**, New York, v.125, n.5, p.179-1188, Jun.
- SCOTT, J.E. (1991). Proteoglycan: collagen interactions in connective tissues. Ultrastructural, biochemical, functional and evolutionary aspects. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v.13, n.3, p.157-161, Mar.

- SILVA, S.V. (2005). **Mineralização biomimética in vivo e in vitro de matrizes de colágeno aniônico: modelo de biomineralização**. 115f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
- SMITH, J.W. (1968). Molecular pattern in native collagen. **Nature**, London, v.219, n.5150, p.157-165, July.
- SREENATH, T. et al. (2003). Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.278, n.27 p.24874-24880, July.
- STAATZ, W.D. et al. (1991). Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the $\alpha 2\beta 1$ integrin in collagen. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.266, n.12, p.7363-7367, Apr.
- SWEENEY, S.M. et al. (1998). Defining the domains of type I collagen involved in heparin- binding and endothelial tube formation. **Biochemistry**, Philadelphia, v.95, n.13, p.7275-7280, June.
- TENÓRIO, D.M.H.; SANTOS, M.F.; ZORN, T.M.T. (2003). Distribution of biglycan and decorin in rat dental tissue. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.36, n.8, p.1061-1065, Aug.
- WEINER, S.; TRAUB, W. (1986). Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils. **Federation of European Biochemical Society**, Paris, v.206, n.2, p.262-266, Oct.
- WEINSTEIN, S.L.; BUCKWALTER, J.A. (2000). **Ortopedia de Turek: princípios e sua aplicação**. 5.ed. São Paulo: Manole. v.1.

WIESMANN, H.P. et al. (2001). Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**, Philadelphia, v.1538, n.5, p.28-37, Feb.

WU, H. et al. (2001). Generation of collagenase-resistant collagen by site-directed mutagenesis of murine pro(I) collagen gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.87, n.15, p.5888-5892, Aug.

XU, Y. et al. (2000). Multiple binding sites in collagen type i for the integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.275, n.50, p.38981-38989, Dec.

ZAGRIS, N. (2001). Extracellular matrix in development of the early embryo. **Mícron**, v.32, p.427-438, Feb.

VII. ANEXO

Planilha representativa da distribuição dos aminoácidos no período D quando cinco moléculas de colágeno são dispostas alternadamente de $\frac{1}{4}$ de seu comprimento.

X	HIS	SER	X	SER	ASN	X	PRO	LYS	X	ALA	PRO	X	PRO	LEU	10
GLU	X	PRO	X	PRO	X	ALA	X	PRO	X	PRO	X	GLY	PRO	X	PRO
GLN	ASP	X	X	PRO	PRO	X	X	ARG	GLU	X	THR	X	PRO	ALA	X
X	GLN	GLU	X	PRO	PRO	PRO	X	VAL	X	GLN	THR	PRO	X	ALA	PRO
PRO	X	GLN	950	PRO	PRO	X	PRO	LEU	X	X	PRO	PRO	ALA	X	PRO
SER	ALA	X	X	PRO	PRO	X	X	HIS	VAL	X	ALA	X	PRO	ALA	X
X	PRO	PRO	X	PRO	PRO	PRO	X	ASP	X	PRO	ARG	PRO	250	X	PRO
ALA	X	SER	X	PRO	PRO	X	ALA	LEU	GLU	X	LEU	X	LYS	PRO	PRO
SER	SER	X	X	ALA	PRO	X	720	PHE	ASP	X	VAL	ASN	X	GLN	PRO
X	VAL	ALA	X	LYS	X	ALA	X	ALA	X	LEU	X	SER	X	GLN	PRO
PRO	X	SER	X	GLU	LYS	X	X	PRO	LEU	X	GLU	X	GLU	PHE	X
ALA	PRO	X	X	X	GLU	LYS	X	PRO	ALA	X	PRO	GLU	X	GLN	PHE
X	ALA	PRO	X	GLY	X	GLU	X	PRO	X	PRO	490	ALA	X	GLN	GLN
PRO	X	ALA	X	LYS	LEU	X	X	SER	PRO	X	PRO	PRO	X	PRO	X
ARG	PRO	X	960	X	ARG	GLY	X	ALA	PRO	X	X	ALA	ALA	PRO	b2
X	ARG	PRO	X	PRO	X	LYS	X	ALA	X	SER	X	ALA	PRO	PRO	b2
PRO	X	ARG	X	PRO	PRO	X	730	ARG	PRO	X	LYS	SER	X	PRO	b2
PRO	PRO	X	X	ARG	PRO	X	X	X	ARG	ALA	X	LYS	SER	GLU	b2
X	ALA	PRO	X	GLU	X	ARG	X	GLU	X	ARG	THR	GLU	X	PRO	b2
SER	X	PRO	X	THR	ASP	X	X	ARG	GLU	X	X	THR	GLU	X	30
ALA	PRO	X	X	X	GLN	GLU	X	X	ARG	GLU	X	X	ASP	PRO	b2
X	SER	SER	X	PRO	X	THR	X	PHE	X	ARG	500	ALA	X	PRO	b2
ALA	X	ALA	X	ALA	PRO	X	ALA	PRO	PRO	X	LYS	ASN	X	GLN	b2
PRO	PRO	X	X	X	PRO	X	X	PRO	PHE	X	X	LYS	ALA	THR	b2
X	ALA	ALA	970	X	ALA	PRO	X	GLU	X	PRO	GLU	X	LYS	ALA	b2
LYS	X	PRO	X	ARG	X	ALA	X	ARG	GLU	X	PRO	GLU	X	PRO	b2
ASP	LYS	X	X	PRO	ARG	X	PRO	X	GLU	X	PRO	GLU	X	MET	b2
X	ASP	LYS	X	X	PRO	ARG	X	X	SER	GLU	X	PRO	GLU	ALA	PRO
LEU	X	ASP	X	GLU	X	PRO	740	VAL	X	ARG	X	PRO	PRO	X	MET
ASN	ARG	X	X	VAL	GLU	X	X	GLN	ALA	X	VAL	SER	X	ARG	ALA
X	THR	LEU	X	X	VAL	GLU	X	X	GLN	VAL	X	ALA	PRO	X	PRO
LEU	X	ASN	X	PRO	X	VAL	X	PRO	X	GLN	510	VAL	X	VAL	PRO
PRO	HIS	X	X	PRO	ALA	X	PRO	PRO	PRO	X	X	PRO	X	PRO	X
X	PRO	LEU	980	X	PRO	PRO	X	X	THR	PRO	X	GLN	PRO	VAL	ALA
PRO	X	PRO	X	PRO	PRO	PRO	X	PRO	X	PRO	PRO	X	GLN	VAL	PRO
ILE	THR	X	X	PRO	PRO	X	PRO	ALA	PRO	X	PRO	PRO	X	PRO	PRO
X	VAL	PRO	X	PRO	PRO	PRO	X	X	ILE	PRO	X	PRO	PRO	PRO	PRO
PRO	X	ILE	X	PRO	X	PRO	X	PRO	X	ALA	PRO	PRO	X	LYS	X
PRO	PRO	X	X	ALA	PHE	X	750	X	ARG	SER	X	ALA	PRO	LYS	X
X	ALA	PRO	X	X	ALA	PRO	X	X	ARG	PRO	X	SER	PRO	ALA	LYS
PRO	X	PRO	X	GLU	X	ALA	X	ALA	X	ARG	X	GLU	X	ASP	ASN
PRO	X	PRO	X	X	X	ALA	X	X	X	ARG	X	X	ALA	X	50
PRO	X	PRO	X	X	X	ALA	X	X	X	ARG	X	X	ALA	X	b1

PRO	X	PRO				GLU	X	ALA				ALA	X	ARG				GLU	X	ALA				ASP	X	ASN	50	b1
ARG	ILE	X				LYS	GLU	X				ASN	PRO	X				GLU	GLU	X				ASP	GLU	X		b1
X	ARG	PRO				X	LYS	GLU				X	SER	ALA	520			X	GLU	GLU				X	ASP	ASP	18	b1
ARG	X	ARG				SER	X	LYS				ALA	X	ASN				LYS	X	GLU				GLU	X	ASP		b1
THR	PRO	X			990	PRO	PRO	X				PRO	PRO	X				X	ARG	LYS	X			ALA	HIS	X		b1
X	GLN	ARG				X	SER	SER				X	SER	SER				X	ARG	LYS				X	PRO	GLU	19	b1
ASP	X	THR				ALA	X	PRO				ALA	X	PRO				ALA	X	ARG				LYS	X	ALA		b1
ALA	HIS	X				ASP	GLU	X				X	ALA	ALA	760			X	ASN	ALA				X	PRO	LYS	20	b1
X	GLN	ASP				PRO	X	ASP				PRO	X	ASP				PRO	X	ARG				ARG	X	PRO		b1
PRO	X	ALA				ALA	THR	X				ALA	THR	X				ALA	THR	GLU				PRO	ARG	X	60	b1
GLY	PRO	X				X	ALA	PRO				X	ALA	PRO				ALA	ALA	PRO				X	PRO	ARG	21	b1
X	ALA	PRO				ALA	X	ALA				ALA	X	ALA				ALA	X	ALA				PRO	VAL	X		b1
PRO	X	GLY				PRO	PRO	X				PRO	PRO	X				PRO	PRO	GLU				GLU	X	PRO		b1
PRO	PRO	X				X	PRO	ALA				ALA	PRO	ASP	530			PRO	X	PRO				PRO	GLU	X		b1
X	PRO	PRO				THR	X	PRO				ALA	X	ALA				PRO	PRO	GLU				PRO	GLU	X		b1
PRO	PRO	X				PRO	PRO	X				PRO	VAL	X				PRO	PRO	GLU				PRO	GLU	X		b1
X	PRO	PRO				X	THR	THR				X	VAL	ALA				PRO	PRO	GLU				PRO	GLU	X		b1
PRO	X	PRO				PRO	X	PRO				ALA	X	PRO				PRO	PRO	GLU				PRO	GLU	X		b1
PRO	PRO	X				GLN	PRO	X				PRO	ALA	X				PRO	PRO	GLU				PRO	GLU	X		b1
X	PRO	PRO				X	GLN	PRO				X	PRO	ALA				PRO	PRO	GLU				PRO	GLU	X		b1
PRO	X	PRO				ILE	X	GLN				GLN	THR	X	540			GLU	X	PRO				ALA	X	GLN		a4
PRO	PRO	X				ALA	LEU	X				GLN	THR	X				ARG	LEU	X				ARG	ALA	X		a4
X	PRO	PRO				X	LEU	ILE				X	ALA	SER				X	ARG	GLU				X	ARG	ALA		a4
PRO	X	PRO				GLN	X	ALA				ALA	X	GLN				GLY	X	ARG				LEU	X	ARG		a4
PRO	VAL	X				ARG	ALA	X				PRO	PRO	X				PRO	SER	X				PRO	PHE	X		a4
SER	SER	PRO				X	PRO	GLN				X	SER	ALA				X	PRO	GLY				X	PRO	LEU		a4
ALA	GLY	PRO				VAL	X	ARG				LEU	X	PRO				SER	X	PRO				THR	X	PRO		a4
X	GLY	SER				VAL	ILE	X				GLN	PRO	X				ARG	SER	X				ALA	THR	X		
PHE	X	ALA				X	LEU	VAL				X	SER	LEU				X	ARG	SER				X	PRO	THR		
ASP	TYR	X				LEU	X	VAL				MET	X	GLN				PHE	X	ARG				LEU	X	ALA	80	
LEU	GLU	PHE				PRO	LEU	X				PRO	LEU	X				PRO	LEU	X				PRO	LEU	X		
SER	PHE	ASP				X	PRO	LEU				X	PRO	MET	550			X	PRO	PHE				X	PRO	LEU		
LYS	0	GLN				X	PRO	PHE				X	PRO	LEU				X	MET	PRO				X	ASN	PHE		
ALA	0	GLU				LEU	X	PRO				PRO	X	PRO	560			PRO	X	LYS				LEU	X	SER		
HIS	0	LYS				PRO	VAL	X				LYS	GLY	X				ALA	PRO	X				ASP	LEU	X		
ASP	0	ALA				X	ALA	LEU				X	LYS	PRO				X	ALA	PRO				X	ASP	LEU		
GLY	0	HIS				PRO	X	PRO				ASP	X	LYS				GLU	X	ALA				ALA	X	ASP		a2
GLY	0	ASP				SER	PRO	X				ARG	GLU	X				ARG	SER	X				LYS	LEU	X		a2
ARG	0	GLY				X	VAL	PRO				X	LYS	ASP				X	ARG	GLU				X	LYS	ALA		a2
TYR	0	GLY				GLU	X	SER				ASP	X	ARG				SER	X	ARG				ASP	X	LYS		a2
TYR	0	ARG				PRO	GLU	X				ALA	GLU	X				PRO	ALA	X				ALA	GLN	X		a2
TYR	0	TYR				X	PRO	GLU				X	PRO	ASP				X	SER	SER				X	PRO	ASP	100	a2

TYR	0	TYR	X	PRO	GLU	X	PRO	ASP	X	X	SER	SER	X	PRO	ASP	100	a2
0	0	TYR	LYS	X	PRO	PRO	X	ALA	PRO	X	PRO	PRO	PRO	X	ALA		a2
0	0	TYR	GLN	PRO	X	LYS	LEU	X	570	ALA	PRO	X	ALA	ALA	X		
0	0	0	X	LEU	LYS	X	ARG	PRO		X	ALA	PRO	X	PRO	PRO		
0	0	0	PRO	X	GLN	ALA	X	LYS		PRO	X	ALA	PRO	X	ALA		
0	0	0	SER	ILE	X	ASP	GLU	X		LYS	VAL	X	LYS	VAL	X		
0	0	0	X	SER	PRO	X	ILE	ALA		X	ARG	PRO	340	X	LYS	PRO	
0	0	0	ALA	X	SER	SER	X	ASP		SER	X	LYS		GLU	X	LYS	a1
0	0	0	SER	PRO	X	810	PRO	ASN	X	PRO	PRO	X		PRO	GLU	X	a1
0	0	0	X	PRO	ALA		X	PRO	SER	X	ASN	SER		X	PRO	GLU	a1
0	0	0	GLU	X	SER		LYS	X	PRO	GLU	X	PRO		SER	X	PRO	110
0	0	0	ARG	ALA	X		ASP	ARG	X	ALA	ASP	X		PRO	ALA	X	a1
0	0	0	X	ARG	GLU		X	ASP	LYS	580	X	ALA	GLU	X	PRO	SER	
0	0	0	PRO	X	ARG		VAL	X	ASP		ARG	X	ALA	GLU	X	PRO	
0	0	0	PRO	PRO	X		ARG	ALA	X	PRO	ARG	X		ASN	GLU	X	
0	0	0	X	PRO	PRO		X	ARG	VAL		X	PRO	ARG	X	ASN	GLU	
0	0	0	PRO	X	PRO		LEU	X	ARG		GLU	X	PRO	350	ALA	X	ASN
0	0	0	MET	ALA	X		THR	ALA	X	ALA	GLU	X		PRO	THR	X	
0	0	0	X	VAL	PRO	820	X	HIS	LEU	X	PRO	GLU		X	PRO	ALA	
0	0	0	PRO	X	MET		PRO	X	THR	LEU	X	ALA		GLN	X	PRO	
0	0	0	PRO	SER	X		ILE	ALA	X	PRO	LEU	X		MET	GLN	X	120
0	0	0	X	PRO	PRO		X	VAL	PRO	X	MET	LEU		X	THR	GLN	
0	0	0	LEU	X	PRO		PRO	X	ILE	590	ALA	X	PRO	PRO	X	MET	
0	0	0	ALA	VAL	X		PRO	ALA	X		LYS	PRO	X	ALA	X		
0	0	0	X	ASN	LEU		X	PRO	PRO		X	ARG	ALA	X	ARG	PRO	
0	0	0	PRO	X	ALA		PRO	X	PRO		LEU	X	LYS	LEU	X	ARG	e1
0	0	0	PRO	ALA	X		ALA	PRO	X		THR	LEU	X	360	PRO	LEU	e1
0	0	0	X	PRO	PRO		X	ALA	PRO		X	PRO	LEU		X	PRO	e1
0	0	0	GLU	X	PRO	830	ALA	X	ALA		SER	X	THR	GLU	X	PRO	e1
0	0	0	SER	GLU	X		PRO	ALA	X		PRO	SER	X	ARG	GLU	X	e1
0	0	0	X	ALA	GLU		X	THR	ALA		X	PRO	SER	X	ARG	GLU	130
0	0	0	X	ALA	GLU		X	THR	ALA		X	PRO	SER	X	ARG	GLU	130
0	0	0	ARG	X	SER		ASP	X	PRO		SER	X	PRO	ARG	X	ARG	e1
0	0	0	GLU	ARG	X		LYS	ASP	X	600	PRO	ASN	X	PRO	ARG	X	e1
0	0	0	X	ASP	ARG		X	ARG	ASP		X	ILE	SER	X	VAL	ARG	e1
0	0	0	ALA	X	GLU		GLU	X	LYS		PRO	X	PRO	ALA	X	PRO	e1
0	0	0	PRO	ASN	X		SER	GLU	X		ASP	PRO	X	PRO	ALA	X	e1
0	0	0	X	PRO	ALA		X	ALA	GLU		X	ALA	PRO	370	X	PRO	ALA
0	0	0	ALA	X	PRO		PRO	X	SER		LYS	X	ASP	PRO	X	PRO	e1
0	0	0	GLU	ASN	X	840	SER	ALA	X		THR	LYS	X	ALA	PRO	X	e1
0	0	0	X	ASP	ALA		X	ALA	PRO		X	GLU	LYS	X	ALA	PRO	e1
0	0	0	SER	X	GLU		PRO	X	SER		PRO	X	THR	ALA	X	ALA	140
0	0	0															

0	0	0	SER	X	GLU	PRO	X	SER	PRO	X	THR	ALA	X	ALA	140	e2
0	0	0	PRO	PRO	X	ALA	PRO	X	PRO	PRO	X	ARG	ALA	X	e2	
0	0	0	X	PRO	SER	X	ALA	PRO	X	VAL	PRO	X	ARG	ALA	e2	
0	0	0	ARG	X	PRO	PRO	X	ALA	PRO	X	PRO	ASN	X	ARG	e2	
0	0	0	ASP	ARG	X	THR	PRO	X	ALA	LEU	X	ASP	SER	X	e2	
0	0	0	X	ASP	ARG	X	ALA	PRO	X	PRO	PRO	X	ASP	ASN	e2	
0	0	0	SER	X	ASP	ALA	X	THR	GLN	X	ALA	ALA	X	ASP	e2	
0	0	0	PRO	GLN	X	ARG	PRO	X	ASP	ILE	X	THR	SER	X	e2	
0	0	0	X	PRO	SER	X	ARG	ALA	X	ASP	GLN	X	VAL	ALA	e2	
0	0	0	ALA	X	PRO	ALA	X	ARG	PRO	ARG	X	ALA	X	THR	e2	
0	0	0	LYS	HIS	X	PRO	SER	X	PRO	ARG	X	ALA	PRO	X	150	e2
0	0	0	X	LYS	ALA	X	PRO	ALA	X	PRO	ARG	X	VAL	ALA	e2	
0	0	0	ASP	X	LYS	ASP	X	PRO	PRO	X	PRO	PRO	X	ALA		
0	0	0	ARG	GLU	X	ARG	GLU	X	PRO	PRO	X	X	ALA	PRO		
0	0	0	X	ARG	ASP	X	ARG	ASP	PRO	X	PRO	PRO	X	PRO		
0	0	0	GLU	X	ARG	PRO	GLU	X	PRO	VAL	PRO	THR	PRO	X		
0	0	0	THR	TYR	X	X	VAL	GLU	ALA	X	PRO	X	ASN	PRO		
0	0	0	X	PRO	GLU	PRO	X	PRO	ARG	ALA	X	ALA	SER	X		
0	0	0	PRO	X	THR	PRO	PRO	X	X	ARG	ALA	X	ALA	PRO	160	
0	0	0	ALA	ASN	X	PRO	ALA	PRO	GLN	X	ARG	PRO	X	ALA		
0	0	0	X	ILE	PRO	ALA	PRO	X	ALA	GLU	X	X	PRO	PRO		
0	0	0	PRO	X	ALA	PRO	PRO	X	PRO	GLN		X	PRO	PRO		
0	0	0	PRO	PRO	X	X	ASN	PRO	X	PRO	GLN	X	PRO	PRO		
0	0	0	X	VAL	PRO	PHE	X	ALA	VAL	X	ALA	PHE	X	PRO		
0	0	0	ALA	X	PRO	ALA	PHE	X	MET	ASN	X	PRO	PHE	X		
0	0	0	PRO	ALA	X	X	ALA	PHE	X	ILE	VAL	X	PRO	PHE		
0	0	0	X	ALA	ALA	PRO	X	ALA	PHE	X	MET	X	ALA	X		
0	0	0	ALA	X	PRO	PRO	PRO	X	PRO	PHE	X	VAL	ALA	X	d	
0	0	0	PRO	ALA	X	X	ALA	PRO	X	PRO	PHE	X	PRO	ALA	d	
0	0	0	X	PRO	ALA	ALA	X	PRO	PRO	X	PRO	ALA	X	VAL	170	d
0	0	0	ALA	X	PRO	ASP	ALA	X	LYS	PRO	X	LYS	PRO	X	d	
0	0	0	PRO	PRO	X	X	ALA	ALA	X	LYS	PRO	X	LYS	ALA	d	
0	0	0	X	HIS	ALA	GLN	X	ASP	ALA	X	LYS	GLU	X	LYS	d	
0	0	0	PRO	X	PRO	PRO	GLN	X	PRO	GLN	X	ALA	GLU	X	d	
0	0	0	VAL	PRO	X	X	PRO	GLN	ALA	X	PRO	X	ILE	GLU	d	
0	0	0	X	VAL	PRO	ALA	X	PRO	LYS	ALA	X	PRO	X	ALA	d	
0	0	0	PRO	X	VAL	X	LYS	ALA	X	PRO	ASP	X	GLN	ALA	d	
0	0	0	ALA	PRO	X	X	LYS	ALA	X	PRO	GLU	X	VAL	PRO	d	
0	0	0	X	ALA	PRO	GLU	X	LYS	ALA	LYS	X	PRO	X	GLN	d	
0	0	0	LYS	X	ALA	PRO	GLU	X	ALA	LYS	X	ARG	ASN	X	180	d
0	0	0	SER	LYS	X	PRO	GLU	X	ALA	LYS	X					

0	0	0	X	GLU	LYS	X	ARG	GLU	X	ASN	LYS	X	ALA	PRO	α
0	0	0	ASP	X	SER	ASP	X	PRO	650	GLU	X	ALA	SER	X	α
0	0	0	ARG	ASN	X	ALA	GLY	X	ARG	ASP	X	GLU	PRO	X	α
0	0	0	X	ARG	ASP	X	LYS	ASP	X	LYS	GLU	X	THR	SER	α
0	0	0	GLU	X	ARG	ALA	X	ALA	VAL	X	ARG	PRO	X	GLU	α
0	0	0	THR	GLU	X	LYS	PRO	X	PRO	HIS	X	420	GLN	PRO	α
0	0	0	X	THR	GLU	X	LYS	ALA	X	ALA	VAL	X	ALA	PRO	α
0	0	0	PRO	X	THR	890	ASP	X	LYS	PRO	X	PRO	VAL	X	α
0	0	0	ALA	PRO	X	ALA	GLU	X	PRO	LEU	X	ARG	PRO	X	
0	0	0	X	SER	PRO	X	ASN	ASP	X	ALA	PRO	X	ARG	VAL	190
0	0	0	PRO	X	ALA	PRO	X	ALA	ALA	X	PRO	GLU	X	ARG	
0	0	0	ALA	PRO	X	PRO	VAL	X	660	VAL	ALA	X	PRO	GLU	X
0	0	0	X	VAL	PRO	X	VAL	PRO	X	ARG	ALA	X	VAL	GLU	
0	0	0	PRO	X	ALA	PRO	X	PRO	PRO	X	VAL	PRO	PRO	PRO	
0	0	0	VAL	PRO	X	ALA	PRO	X	ALA	ALA	X	PRO	LEU	X	
0	0	0	X	ALA	PRO	X	THR	PRO	X	PRO	PRO	430	X	PRO	PRO
0	0	0	PRO	X	VAL	990	PRO	X	ALA	LYS	X	ALA	PRO	PRO	
0	0	0	ALA	ALA	X	ALA	PRO	X	ASP	PRO	X	ALA	LEU	X	
0	0	0	X	VAL	PRO	X	VAL	PRO	X	ASP	LYS	X	SER	PRO	
0	0	0	ALA	X	ALA	PRO	X	ALA	GLU	X	ASP	ALA	X	ALA	200
0	0	0	ARG	PRO	X	PRO	ALA	X	ALA	ASN	X	ALA	PRO	X	
0	0	0	X	ARG	ALA	X	ALA	PRO	670	X	ASN	GLU	X	VAL	ALA
0	0	0	PRO	X	ARG	PRO	X	PRO	ALA	X	ALA	PRO	X	ALA	
0	0	0	ALA	PRO	X	ILE	PRO	X	GLN	ALA	X	ALA	PRO	X	
0	0	0	X	SER	PRO	X	ALA	PRO	X	GLN	ALA	ALA	X	PRO	PRO
0	0	0	PRO	X	ALA	ASN	X	ILE	PRO	X	GLN	440	ASN	X	ALA
0	0	0	GLN	PRO	X	VAL	PRO	X	PRO	PRO	X	PRO	ASN	X	
0	0	0	X	GLN	PRO	910	X	ASN	ASN	X	VAL	ALA	X	PRO	α2
0	0	0	PRO	X	GLN	PRO	PRO	X	ALA	PRO	X	ALA	ALA	X	α2
0	0	0	ARG	ILE	X	X	PRO	ALA	680	X	GLN	PRO	X	ASN	α2
0	0	0	X	ARG	PRO	X	PRO	PRO	PRO	X	ALA	ALA	GLN	X	α2
0	0	0	ASP	X	ARG	ALA	X	PRO	ALA	VAL	X	PRO	LEU	X	α2
0	0	0	LYS	ASP	X	LYS	PRO	X	X	GLY	PRO	X	THR	GLN	α2
0	0	0	X	LYS	ASP	X	ALA	ALA	GLU	X	ALA	ALA	X	PRO	α2
0	0	0	GLU	X	LYS	ALA	X	LYS	ARG	GLY	X	450	LYS	ALA	α2
0	0	0	THR	GLU	X	ARG	SER	X	X	LYS	GLU	X	LYS	ALA	α2
0	0	0	X	PRO	GLU	X	ARG	ALA	GLU	X	ARG	ALA	X	LYS	α2
0	0	0	GLU	X	THR	920	SER	X	ALA	GLN	GLU	X	ASN	ALA	α2
0	0	0	GLN	GLU	X	ALA	ASP	X	X	GLN	GLU	X	X	ALA	220
0	0	0	X	LYS	GLU	X	GLY	SER	X	GLN	GLU	X	X	ALA	α2

234