

paper collagen

robert.tavares

November 2023

1 Introduction

O colágeno tipo I é uma proteína abundante no corpo humano, de forma que compõe 90% dele. Ele está presente na matriz extracelular bem como em estruturas como pele, osso, tendão e córnea [13, 14].

O colágeno tipo I é uma molécula composta por um tripla hélice de cadeias polipeptídicas(cadeias α). Ele possui tamanhos típicos de 300 nm de comprimento por 1,5 nm de diâmetro e apresenta um formato tipo haste [5, 14].

As moléculas de colágeno tipo I possuem, intrinsecamente, a informação necessária para se auto-organizar em estruturas mais complexas chamadas fibrilas. Esse processo, denominado fibrilo-gênese, ocorre o mediante a agregação de milhares dessas moléculas de forma escalonada por um período $D = 67$ nm, de modo que existem cinco posições possíveis para que ocorra a interação entre elas[18, 8].

As fibrilas apresentam um formato alongado, com a sua região mais densa sendo a central e, conseqüentemente, as pontas afinadas[3, 8]. As fibrilas apresentam comprimento típicos de $500\mu m$ com $500nm$ de diâmetro, além de serem constituídas por moléculas da ordem de 10^7 [12].

2 Metodologia

Em nosso trabalho, nos desenvolvemos o estudo em duas etapas: Modelo para formação de fibrilas e Morfologia e propriedades mecânicas das fibrilas.

2.1 Formação de fibrilas

Nos utilizamos um modelo baseado em DLA(difusion limited aggregation)[15] em três dimensões para simular a formação de fibrilas de colágeno. Nos consideramos as moléculas de colágeno como sendo paralelepípedos regulares de dimensões $1 \times 18 \times 1$. Usando uma rede regular cúbica, nos definimos o centro como a origem e fixamos a primeira molécula do agregado, chamada de seed, em

seguida, novas moléculas são lançadas de uma distância R do centro do agregado e se difundem até encontrarem o agregado e serem capturadas ou atingirem uma distância $2R$ com relação ao centro, de modo que a simulação é reiniciada caso isso ocorra, esse processo está esquematizado na Figura 1.

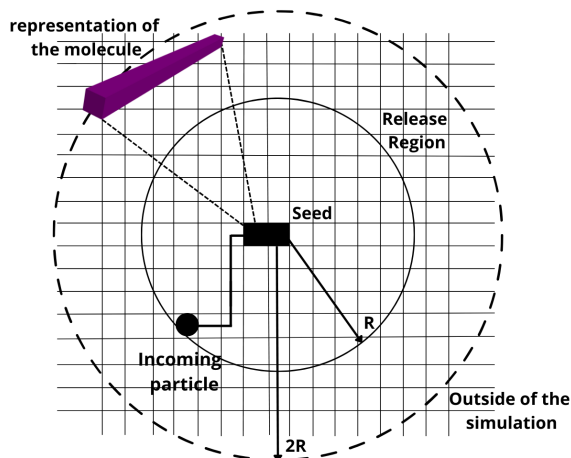


Figure 1: .

O processo de difusão dessas moléculas acontece mediante um random walk tridimensional. As moléculas podem caminhar para os primeiros e os segundos vizinhos, no plano X-Z, no eixo Y, elas realizam movimento para frente e para trás. As moléculas de colágeno reais se agregam de forma lateral e em posições escalonadas com relação ao comprimento $D = 67$ nm. Dessa forma, ao atingir o agregado, a molécula é capturada apenas se ela estiver em uma posições específicas, múltiplos de $D = 4$, com relação a uma molécula pertencente ao agregado[11]. Dessa forma, visto o tamanho 18 da nossa representação, temos cinco configurações possíveis para que uma molécula seja captura, na Figura 2 podemos ver cada posição possível.

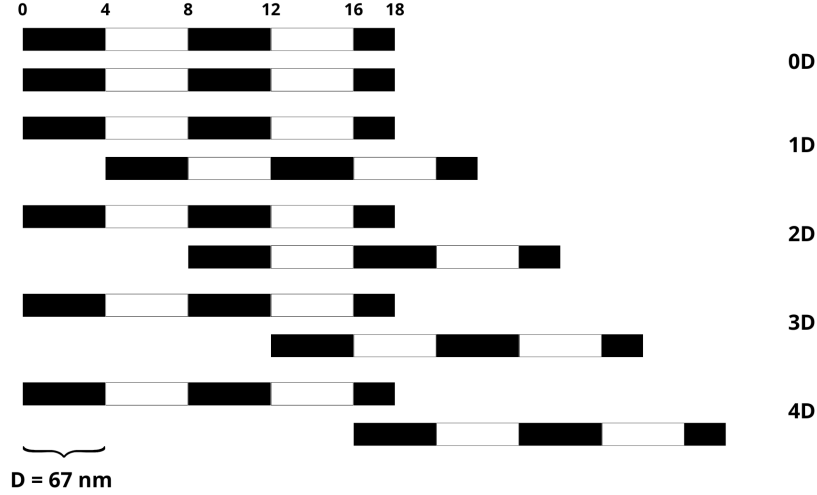


Figure 2: .

O processo de formação das fibrilas reais é dirigido por uma força hidrofóbica devido a interação entre as moléculas, de modo que elas tentam minimizar sua superfície exposta para tal[7, 11]. Para representar esse processo, utilizamos um algoritmo de difusão lateral sobre a superfície, que permite uma molécula recém agregada possa explorar a superfície, mantendo seu y fixo, para encontrar um local que minimize sua superfície exposta[4]. Caso ocorra mais de um local, a primeira posição é mantida. Esse movimento é controlado pelo parâmetro T_s que define o número de tentativas que a molécula tem para explorar a superfície do agregado[11].

Com esse algoritmo, geramos 50 fibrilas contendo 30.000 bastões para diferentes valores de T_s a fim de ver o efeito desse parâmetro na morfologia das fibrilas.

2.2 Propriedades das fibrilas

Para analisar as propriedades mecânicas das fibrilas, utilizamos um modelo mecânico probabilístico, visto que os agregados gerados não possuem um carácter elástico para ser estudado usando modelos baseado em molas[10, 6].

Primeiramente, iniciamos realizando o corte de um tronco de dimensão $17 \times 201 \times 17$ em uma fibrila. Após isso, nos fazemos uma limpeza para garantir que não ocorra a presença de moléculas desafixadas e determinar o esqueleto ativo. Para isso, nos consideramos que o tronco é dividido em 201 camadas e que cada molécula possui parcelas, de tamanho unitário, em mais de uma camada. Iniciando pela primeira camada, marcamos todas as moléculas como ativas, em seguida, verificamos se, em uma camada superior, uma partícula pertencente a uma molécula ativa possui uma partícula vizinha inativa, se sim,

ela é considerada ativada bem como todas as partículas, tanto acima quanto abaixo, pertencentes aquela molécula. Repetimos esse procedimento até atingir a ultima camada. Esse procedimento pode ser visto na Figura 3. Com essa seleção de moléculas ativas, nos repetimos o procedimento, agora de cima para baixo, nesse conjunto até obtermos o esqueleto ativo, o conjunto de moléculas pela qual uma força aplicada é capaz de percolar.

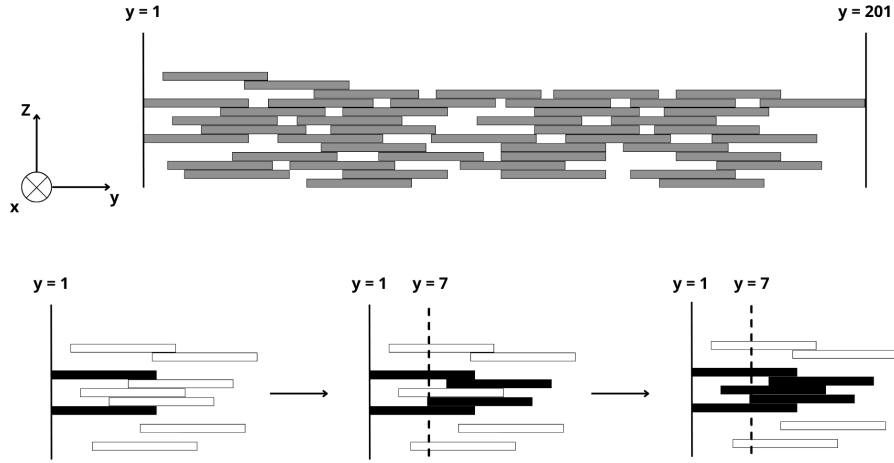


Figure 3: .

Uma vez que obtivemos o esqueleto ativo, nos atribuímos uma probabilidade P_R a cada molécula. Uma vez que aplicamos uma força ao agregado, cada molécula sente uma fração da mesma, onde ela é diminuída pelo número de partículas em uma dada camada. Dessa forma, todas as M partículas na i -ésima camada sentem uma força na forma

$$\sigma_i = \frac{F}{M_i}, \quad (1)$$

com isso, a força que uma molécula sente no agregado é a media dos seus σ_i .

As moléculas de colágeno possuem uma estrutura em tripla helice[2], dessa forma, a ruptura da propria molécula é mais improvavel de acontecer do que a quebra das ligações entre as moléculas[10]. Portanto, nos consideramos uma probabilidade de ruptura para uma molécula ao inves de cada particula que a compõe. Nos tambem consideramos que o numero de ligações, responsaveis por manter a molécula presa no esqueleto ativo, é igual somatorio do numero de partículas vizinhas em cada camada que a molécula está presente.

Com isso, nossa probabilidade é determinada pela equação

$$P_R = \left(\frac{\langle \sigma \rangle}{N\sigma_s} \right)^m, \quad (2)$$

N é o número de ligações que uma dada molécula possui, σ_s é a força das ligações entre as moléculas e m é um fator de amortecimento da energia [10, 1]. Para todas as simulações, nos utilizamos $m = 2$.

A simulação consiste em aplicarmos uma força no esqueleto ativo, tentando reproduzir comportamentos observados em experimento de distensão. Com isso, calculamos a probabilidade de remoção para cada molécula. Após isso, sorteamos um valor entre 0 e 1 e comparamos com o P_R de uma dada molécula, se for \leq , ela então é removida e continuamos esse processo até varrer todo o agregado. Nos repetimos o procedimento de calcular P_R para todo o agregado restante, mantendo a mesma força fixa, até que pare de ocorrer quebras. Nesse momento, incrementamos a força em meia unidade e repetimos o procedimento listado anteriormente. Nos consideramos que a fibrila se quebrou se houver a existência de pelo menos uma camada vazia, de forma que o esqueleto ativo deixe de ser um agregado percolante. Nós observamos como ocorre o processo de remoção de moléculas contando quantas saem para uma dada força e também qual a tensão limite suportada antes de ocorrer a ruptura.

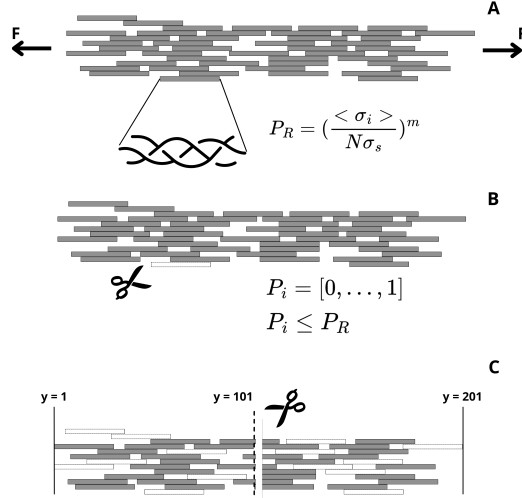


Figure 4: .

Nos consideramos a quantidade de moléculas rompidas como uma medida para a deformação da nossa molécula. Nos também determinamos a tensão com relação as forças calculadas, afim de aproximar a simulação de uma fibrila real. Consideramos que a força para quebrar uma ligação é dada por σ_s e usamos o diâmetro médio para determinar a tensão.

Com isso, realizamos, para cada fibrila com um determinado valor de T_s , mil experimentos. Guardamos informações dos valores, para cada força, do número removido do esqueleto, bem quantas restaram.

3 Resultados

3.1 Morfologia das fibrilas

Os agregados gerados pelo modelo apresentam uma morfologia fibrilar, com características relevantes de sua forma sendo determinadas pelo parâmetro T_s . Podemos observar, na Figura 5, a estrutura desses agregados para os valores de $T_s = 2$, baixa difusão, e $T_s = 10000$, alta difusão lateral sobre a superfície. As fibrilas com menor T_s apresentam uma forma mais aberta, enquanto para valores mais altos, observamos uma forma mais compacta e regular. A coloração indica o quão antiga uma molécula é no agregado, indo do azul escuro, mais antigas, para o amarelo, mais recentes. Nos agregados mais compactos, temos dificuldade em observar moléculas mais antigas visto que essas estão muito no interior da estrutura. Para as mais abertas, temos uma maior facilidade em observar moléculas mais antigas. Além disso, na visão lateral, observamos o comportamento alongado e com pontas afinadas, típico de fibrilas reais.

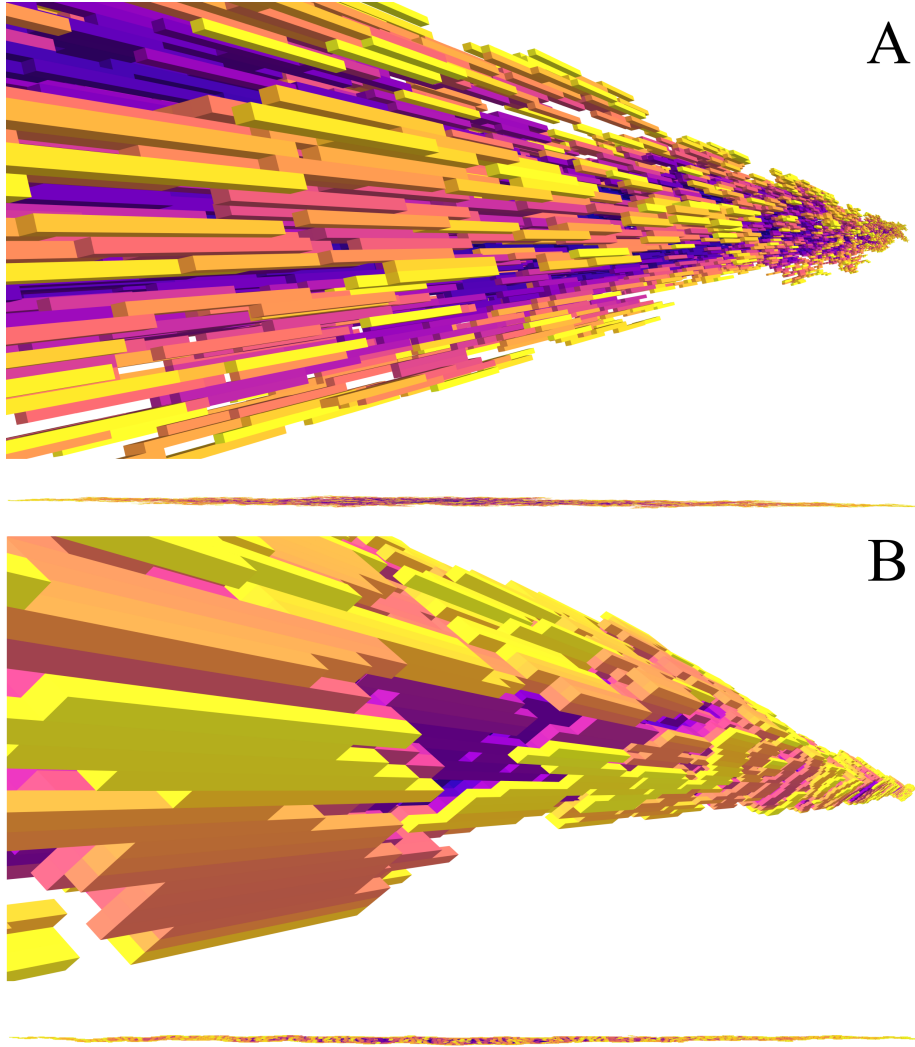


Figure 5: Visualização transversal e lateral das fibrilas geradas com o algoritmo de DLA contendo 30.000 moléculas. A coloração indica quão antigo é a molécula no agregado. Quanto mais pro azul escuro, mais antigo no agregado, quanto mais para o amarelo, mais recente. A) Fibrila gerada para $T_s = 2$, baixa difusão. B) Fibrila gerada para $T_s = 10000$, alta difusão.

O comprimento, o diâmetro e a densidade da região central das fibrilas são características influenciadas pelo parâmetro T_s . Na Tabela 1, podemos observar como essas dimensões se alteram, em média, com o aumento desse parâmetro. O comprimento e a densidade tendem a aumentar com o incremento de T_s , en-

quanto o diâmetro tende a diminuir. Uma propriedade comum a essas medidas é que elas exibem um comportamento de estabilização à medida que nos aproximamos de $T_s = 512$; a partir desse ponto, elas oscilam em torno de um valor médio.

Table 1: Valores médios dos comprimentos, diâmetros e densidade de fibrilas geradas para diferentes valores de T_s .

T_s	Length(u.m)	Ray(u.m)	Density(%)
2	3668.36	32.40	0.17
8	3695.16	28.68	0.25
16	3764.27	24.63	0.34
32	3808.68	21.67	0.46
64	3891.56	17.6	0.57
128	3928.6	16.06	0.62
512	3913.24	14.07	0.66
1024	3912.52	14.14	0.65
4096	3892.28	14.06	0.66
8192	3892.52	14.16	0.66
10000	3917.16	13.94	0.65
Limit Upper	3905.54	14.08	0.65

Outra característica desses agregados é a relação linear entre a massa e a distância até as pontas. Na Figura 6, observamos que, independentemente do valor de T_s , todos os agregados exibem esse comportamento. Tal característica é recorrentemente observada tanto em fibrilas reais quanto nas simuladas com este modelo [11, 7].

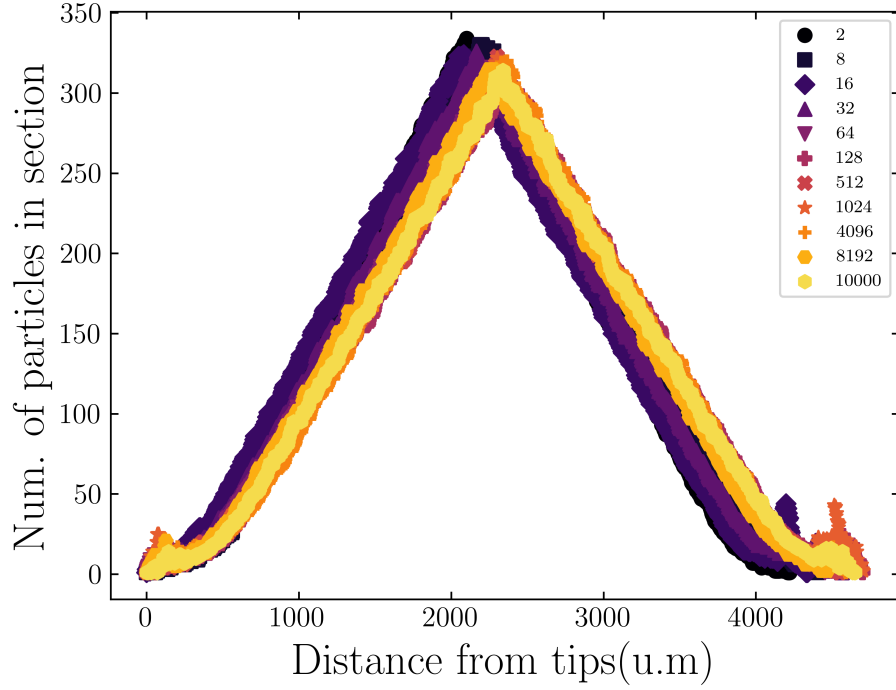


Figure 6: A quantidade de partículas por seção das fibrilas geradas segue uma relação linear da distancia em que medimos para a ponta. Nos observamos que, partindo de uma ponta, a massa cresce linear até bem proximo da região central da fibrila. A medida que nos afastamos dessa região, a massa decaí linearmente. Esse comportamento foi observado para todas as fibrilas, indicando que o parâmetro T_s não tem efeito sobre essa característica.

Analisando a seção transversal das fibrilas, conforme ilustrado na Figura 7, observamos que o aumento do parâmetro T_s resulta na diminuição dos espaços vazios dentro da seção, levando à formação de agregados mais compactos e quase completamente preenchidos. Devido a essa característica progressiva em função do parâmetro T_s , calculamos a dimensão fractal das seções e constatamos que, à medida que T_s aumenta, ocorre um incremento no valor médio da dimensão fractal da seção até atingir uma saturação. Na Figura 8, é evidente que para valores mais baixos de T_s , a dimensionalidade é próxima da observada em agregados gerados pelo modelo de Agregação Limitada por Difusão (DLA) [15], que é de 1.71, remetendo ao nosso modelo de formação. Enquanto isso, para valores mais elevados de T_s , a dimensão fractal tende a estabilizar em valores próximos a 1.93, que se assemelha muito à dimensão euclidiana para objetos bidimensionais.

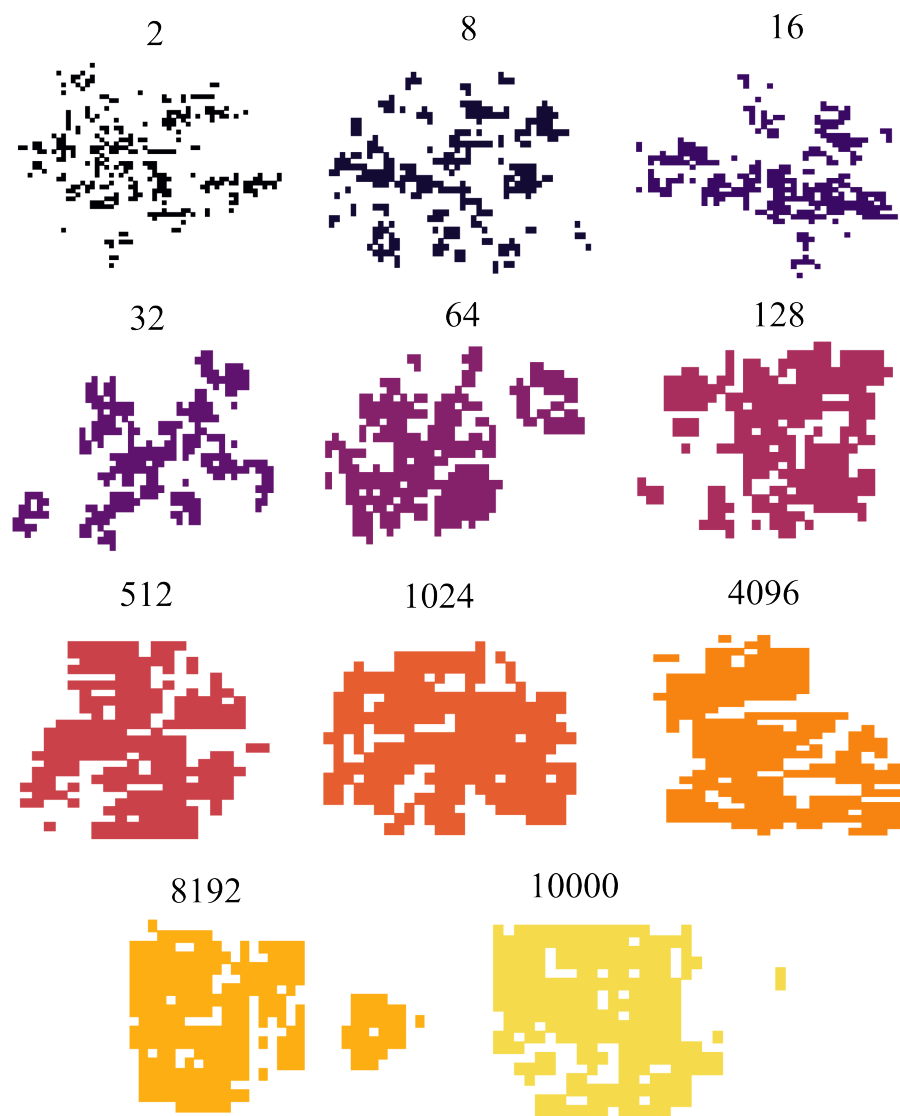


Figure 7: Variação da forma da seção transversal das fibrilas para diferentes valores de T_s .

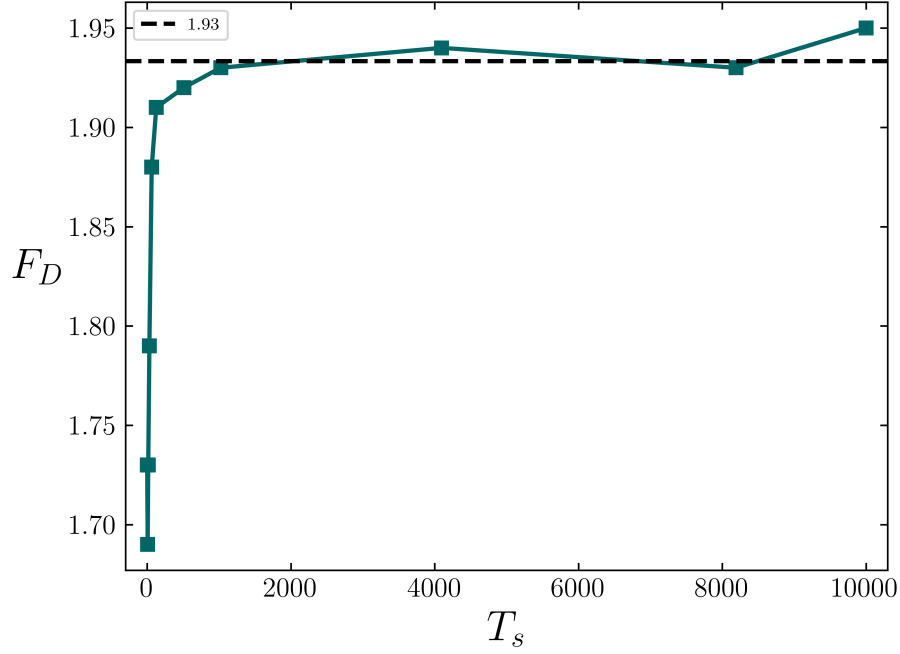


Figure 8: Dimensão fractal média da seção transversal em função do parâmetro T_s .

3.2 Propriedades mecânicas

Para compreender como nosso agregado responde à aplicação de uma força axial, avaliamos como o número de moléculas na fibrila varia com a força. Na Figura 9, apresentamos a curva de stress-strain para agregados gerados com diferentes valores de T_s . Observamos que o aumento desse parâmetro influencia no incremento da tensão máxima de ruptura. No entanto, a partir de $T_s = 512$, esses valores se tornam bastante próximos e as curvas começam a se sobrepor. Comumente, esperaríamos que essas curvas crescessem de forma mais abrupta até o valor máximo, o que não é observado aqui. Esse comportamento mais suave até o valor limite é uma consequência do módulo de Weibull que utilizamos no modelo. Para valores baixos, a curva resultante é não determinística [10]. A tensão máxima suportada que encontramos foi de 45,6 MPa, valor muito próximo ao encontrado por Yang et al. [17] ao analisar fibrilas reconstituídas do tendão de Aquiles bovino purificado. Em contraste, no trabalho de Yamamoto [16], foram utilizadas fibrilas isoladas do fascículo dos tendões da cauda de ratos, obtendo um valor de 100 ± 32 MPa. A discrepância em relação ao nosso valor pode estar associada à dimensão das fibrilas utilizadas por ele, que apresentavam um diâmetro significativamente maior do que as modeladas neste trabalho.

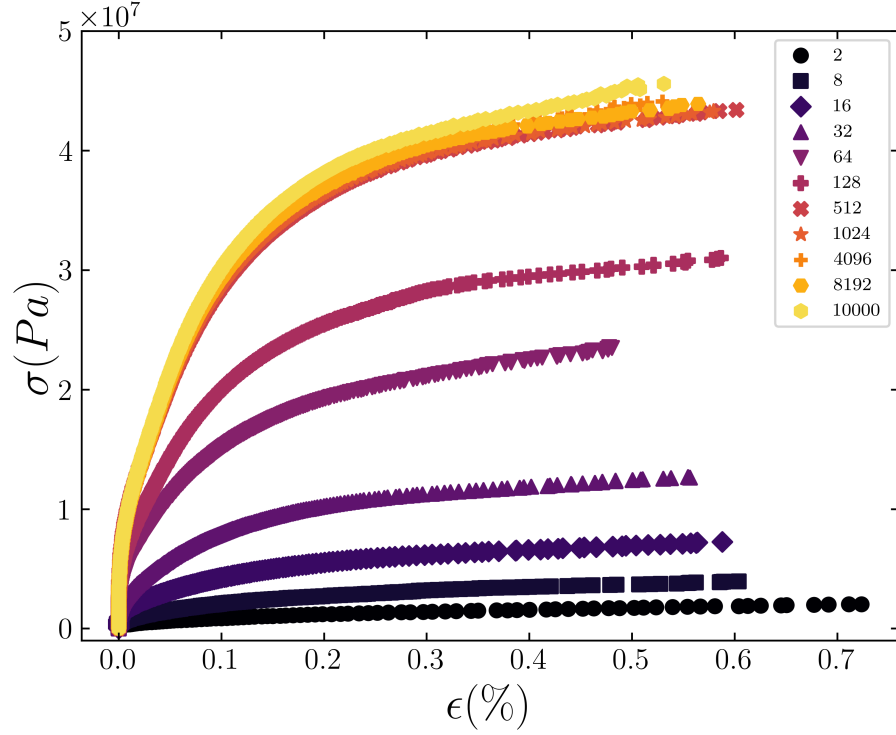


Figure 9: Tensão em função da deformação da fibrila para diferentes valores de T_s .

Na Figura 10, podemos observar como os valores de tensão máxima suportada variam com um parâmetro importante das fibrilas, a densidade. Escolhemos essa análise visto que o comportamento de σ e da densidade, ρ , exibem formas semelhantes quando analisados em função de T_s . Identificamos um comportamento exponencial no aumento da tensão máxima até um limite superior de 44,1 MPa. A saturação da densidade ocorre em 65%, valor este próximo ao encontrado por Parkinson et al.[11] com esse modelo, porém um pouco abaixo do determinado por Katz et al.[9], que calculou experimentalmente cerca de 80% do espaço disponível ocupado para as fibrilas de colágeno. Com base nessa característica de saturação, consideramos que, dado o custo computacional elevado, este modelo pode ser executado, para os parâmetros que inicialmente utilizamos, com $T_s = 512$, uma vez que nesse ponto já obtemos fibrilas com os valores de interesse médios equivalentes para valores superiores desse parâmetro.

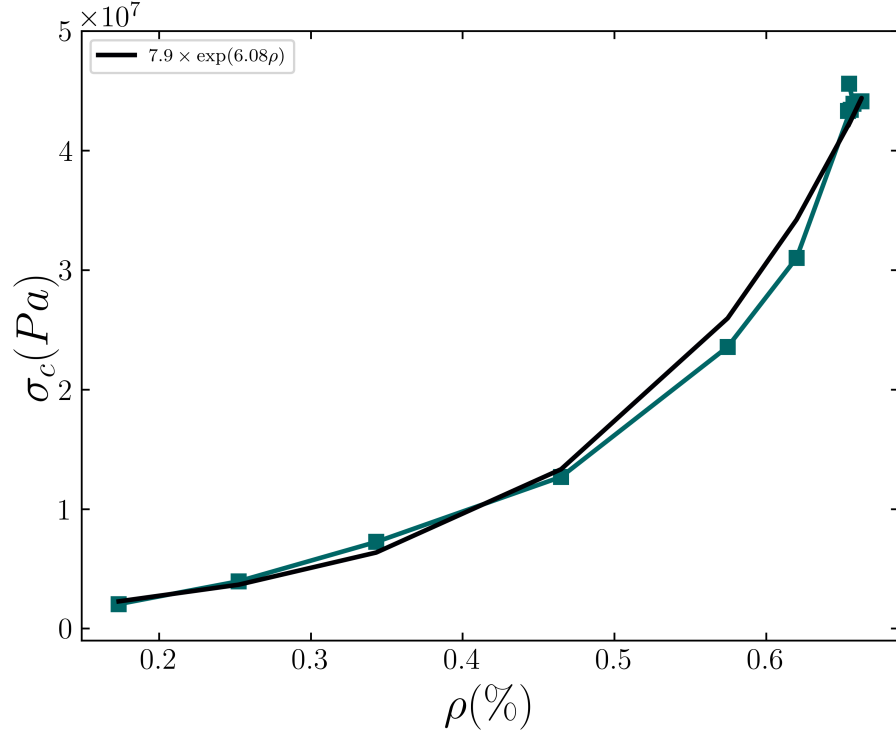


Figure 10: Tensão crítica em função da densidade. Observamos que esse valor cresce exponencialmente com a densidade até ambos os parâmetros atingirem um limite superior.

Ao analisar como o processo de ruptura ocorre no nosso modelo, bem como em outros, constatamos que a redistribuição de tensão, para uma mesma força, pode levar à ocorrência de rupturas em cascata. Na Figura 11, apresentamos a distribuição das avalanches de ruptura em função do seu tamanho. É possível observar a existência de duas ordens de grandeza bem definidas; após isso, os dados são afetados pelo efeito de tamanho finito. Analisando a região de interesse, até próximo de $10^{2.5}$, conseguimos determinar o expoente das leis de escala de modo que eles aumentam com o crescimento de T_s . Este comportamento é compreensível ao considerarmos que a densidade aumenta com este parâmetro, resultando em mais moléculas para contribuir com os tamanhos das avalanches. Assim, temos que as avalanches durante o processo de ruptura são independentes do tamanho do sistema; contudo, elas são influenciadas pelo quão compacta é a fibrila, com o expoente γ variando de -1.94 até -2.60.

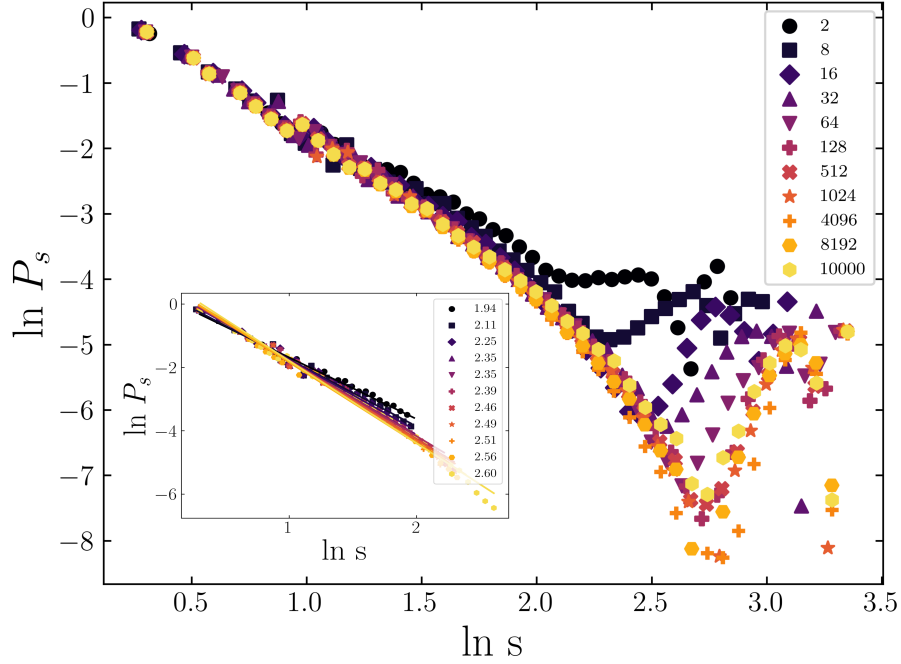


Figure 11: Distribuição das avalanches de ruptura em função do seu tamanho para diferentes valores de T_s . Podemos observar um comportamento em lei de potencia com expoentes γ bem definidos para todos valores do parâmetro. Os expoentes variam de -1.94 a -2.60.

4 Conclusões

Neste estudo, demonstramos a capacidade de um modelo baseado em Agregação Limitada por Difusão (DLA) com difusão superficial para simular a formação de fibrilas de colágeno, resultando em agregados com características morfológicas semelhantes às das fibrilas reais. O parâmetro T_s mostrou-se crucial para definir várias propriedades das fibrilas, como comprimento, densidade e diâmetro, que tendem a variar de maneira inversamente proporcional a T_s . Observou-se uma relação linear entre a massa das fibrilas e a distância até as pontas, além de uma variação na dimensão fractal da seção central, que aumenta com T_s , variando de 1.71 a 1.93.

A resistência máxima à tensão das fibrilas aumenta com T_s , alcançando um limite de 44,1 MPa, e a tensão crítica suportada apresenta uma correlação exponencial com a densidade das fibrilas. O processo de ruptura revelou avalanches de ruptura com leis de potência definidas, cujos expoentes variam de -1.94 a -2.60, indicando que, embora as avalanches sejam independentes do tamanho do sistema, elas são influenciadas pela compactação da fibrila.

Essas descobertas sugerem que as fibrilas geradas pelo modelo apresentam uma tensão máxima suportada que aumenta com a densidade e com T_s . Fibrilas mais resistentes tendem a ter uma dimensão fractal mais próxima da dimensão euclidiana de objetos bidimensionais e exibem valores mais elevados no expoente das leis de potência. Além disso, muitas das propriedades analisadas tendem a saturar, indicando que simulações realizadas com $T_s = 512$ são suficientes para observar os valores máximos de interesse, otimizando o uso de recursos computacionais.

References

- [1] *Engineering Materials 2*. Elsevier, 2013.
- [2] Barbara Brodsky and John A.M. Ramshaw. The collagen triple-helix structure. *Matrix Biology*, 15(8):545–554, 1997.
- [3] Jean Charvolin and Jean-François Sadoc. Type-i collagen fibrils: From growth morphology to local order. *The European Physical Journal E*, 42(4), April 2019.
- [4] Juan M. García-Ruiz and Fermín Otálora. Diffusion limited aggregation. the role of surface diffusion. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 178(3):415–420, November 1991.
- [5] K Gelse. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12):1531–1546, November 2003.
- [6] Ken ichi Saitoh, Tomohiro Sato, Masanori Takuma, and Yoshimasa Takahashi. Molecular dynamics study of collagen fibrils: Relation between mechanical properties and molecular chirality. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2020.
- [7] K E Kadler, Y Hojima, and D J Prockop. Assembly of collagen fibrils de novo by cleavage of the type i pC-collagen with procollagen c-proteinase. assay of critical concentration demonstrates that collagen self-assembly is a classical example of an entropy-driven process. *Journal of Biological Chemistry*, 262(32):15696–15701, November 1987.
- [8] Karl E. KADLER, David F. HOLMES, John A. TROTTER, and John A. CHAPMAN. Collagen fibril formation. *Biochemical Journal*, 316(1):1–11, May 1996.
- [9] Elton P. Katz and Shu Tung Li. The intermolecular space of reconstituted collagen fibrils. *Journal of Molecular Biology*, 73(3):351–369, 1973.
- [10] John Parkinson, Andy Brass, Giles Canova, and Yves Brechet. The mechanical properties of simulated collagen fibrils. *Journal of Biomechanics*, 30(6):549–554, June 1997.

- [11] John Parkinson, Karl E. Kadler, and Andy Brass. Simple physical model of collagen fibrillogenesis based on diffusion limited aggregation. *Journal of Molecular Biology*, 247(4):823–831, April 1995.
- [12] David A. D. Parry and Alan S. Craig. Growth and development of collagen fibrils in connective tissue. In *Ultrastructure of the Connective Tissue Matrix*, pages 34–64. Springer US, 1984.
- [13] Gustavo A. Rico-Llanos, Sara Borrego-González, Miguelangel Moncayo-Donoso, José Becerra, and Rick Visser. Collagen type i biomaterials as scaffolds for bone tissue engineering. *Polymers*, 13(4):599, February 2021.
- [14] Frederick H. Silver, Michael Jaffe, and Ruchit G. Shah. Structure and behavior of collagen fibers. In *Handbook of Properties of Textile and Technical Fibres*, pages 345–365. Elsevier, 2018.
- [15] T. A. Witten and L. M. Sander. Diffusion-limited aggregation. *Physical Review B*, 27(9):5686–5697, May 1983.
- [16] Noritaka Yamamoto. Tensile strength of single collagen fibrils isolated from tendons. *European Journal of Biophysics*, 5(1):1–6, 2017.
- [17] L. Yang, K.O. van der Werf, P.J. Dijkstra, J. Feijen, and M.L. Bennink. Micromechanical analysis of native and cross-linked collagen type i fibrils supports the existence of microfibrils. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 6:148–158, 2012.
- [18] Shichen Zhu, Qijuan Yuan, Tao Yin, Juan You, Zhipeng Gu, Shanbai Xiong, and Yang Hu. Self-assembly of collagen-based biomaterials: preparation, characterizations and biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(18):2650–2676, 2018.