

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 [11, 12].

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 [4, 12].

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[16, 6].

As fibrilas apresentam um formato alongado, com a sua região mais densa sendo a central e, conseqüentemente, as pontas afinadas[2, 6]. As fibrilas apresentam comprimento típicos de $500\mu m$ com $500nm$ de diâmetro, além de serem constituídas por moléculas da ordem de 10^7 [10].

2 Metodologia

Em nosso trabalho, nos tivemos duas etapas desenvolvidas: 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)[13] em três dimensões para tentar simular a formação das fibrilas de colágeno. As moléculas são lançadas de uma distância R da origem do nosso agregado e se difundem até encontrarem o mesmo ou atingirem uma distância $2R$, de modo que a simulação é reiniciada caso isso ocorra. Ao atingir o agregado, a molécula

é capturada apenas se ela estiver em uma posição que é um múltiplo de $D = 4$ com relação a uma molécula pertencente ao agregado[9].

Cada molécula é representada por um bastão de dimensão $1 \times 18 \times 1$ e pode se mover entre os primeiros e segundos vizinhos no plano XZ, enquanto pode se mover para frente e para trás no eixo Y.

O processo de formação das fibrilas é dirigido por uma força hidrofóbica devido a interação entre as moléculas, de modo que elas tentam minimizar sua superfície exposta para tal[5, 9]. Para representar esse processo, utilizamos um algoritmo de rolamento sobre a superfície, que permite um bastão recém agregado explorar a superfície do agregado, mantendo seu y fixo, para encontrar um local que minimize sua superfície exposta[3]. Caso ocorra mais de um local, a primeira posição é mantida. Esse movimento é controlado pelo parâmetro T_s que define o número de passos que a molécula tem para explorar a superfície do agregado[9].

Com esse algoritmo, geramos 10 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 as fibrilas geradas não possuem um carácter elástico para ser estudado como normalmente é feito[8].

Para cada amostra de um dado valor do parâmetro T_s , fizemos o corte de um tronco de dimensão $101 \times 201 \times 101$ na região central das fibrilas afim de minimizar efeitos de borda. Depois, realizamos uma limpeza nesse tronco para eliminar moléculas que não estavam pertencentes ao esqueleto ativo[8].

Ao aplicarmos uma força no esqueleto, calculamos a pressão σ , onde a área é dada pelo número de elementos do esqueleto ativo em uma dada camada do tronco. No modelo mecânico estocástico, para cada molécula no agregado, determinamos uma probabilidade de remoção dada por:

$$P_R = \left(\frac{\langle \sigma \rangle}{N\sigma_s} \right)^m, \quad (1)$$

onde σ é a média da pressão que cada pedaço de uma molécula sente, N é o número de ligações que uma dada molécula possui, assumimos que cada face em contato com uma molécula vizinha contribui com uma ligação, σ_c a força da ligação entre as moléculas, que tomamos como unitária e m é um fator de amortecimento da energia[8, 1].

A simulação consiste em aplicarmos uma força no esqueleto ativo, com isso, calculamos as probabilidades de cada molécula ser removida e sortíamos um número para ver se ocorre a ruptura. Caso ocorra pelo menos uma única quebra, repetimos o procedimento para uma dada força até que não mais ocorra

rupturas. Nesse ponto, incrementamos a força em meio e repetimos a simulação. A fibrila se quebra se ocorrer a existência de pelo menos uma camada vazia.

(fazer uma figura disso)

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 1, 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.

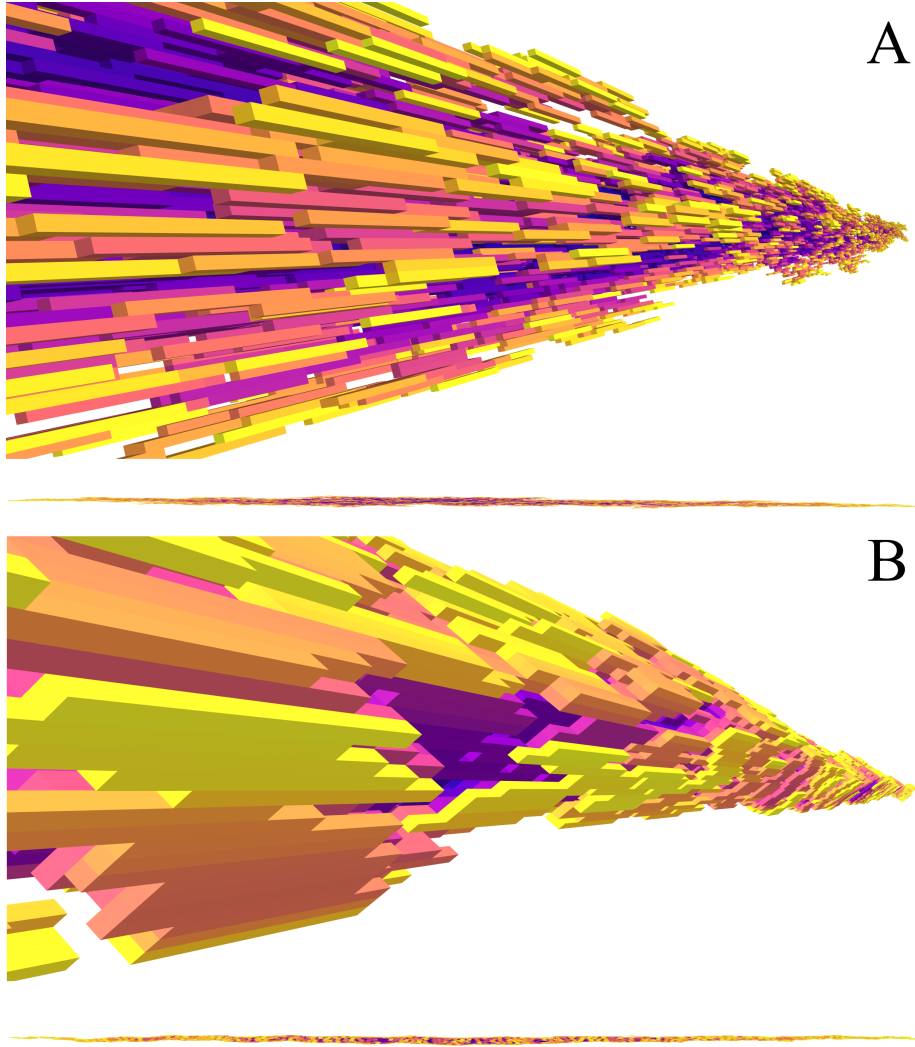


Figure 1: Visualização transversal e lateral das fibrilas geradas com o algoritmo de DLA contendo 30.000 moléculas. A coloração indica quão antigo é a molécula no agregado. Quanto mais pro azul escuro, mais antigo no agregado, quanto mais para o amarelo, mais recente. A) Fibrila gerada para $T_s = 2$, 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: .

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 2, 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 [9, 5].

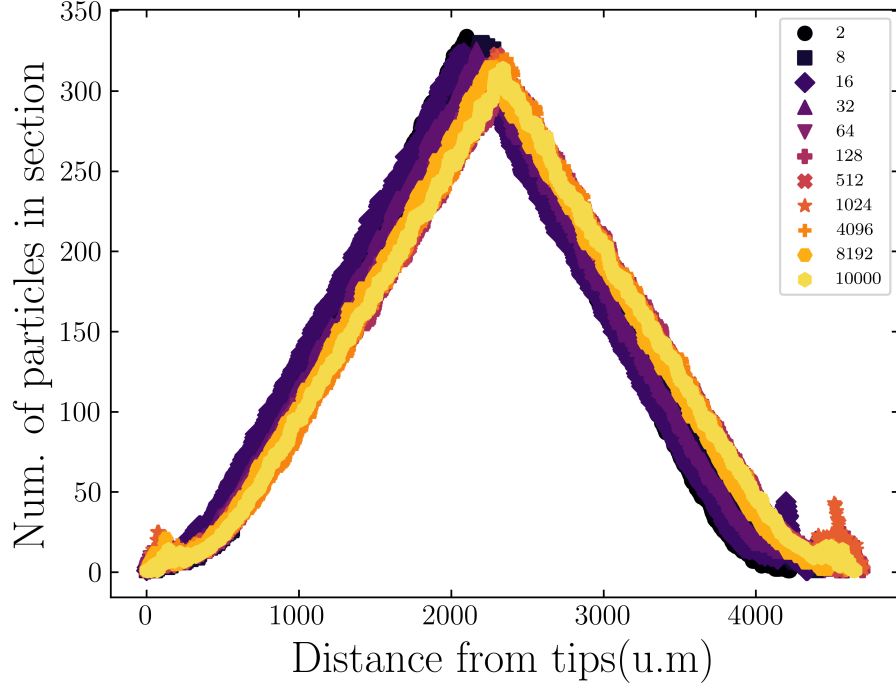


Figure 2: A quantidade de partículas por seção das fibrilas geradas segue uma relação linear da distancia em que medimos para a ponta. Nos observamos que, partindo de uma ponta, a massa cresce linear até bem proximo da região central da fibrila. A medida que nos afastamos dessa região, a massa decaí 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 3, 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 4, 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) [13], 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.

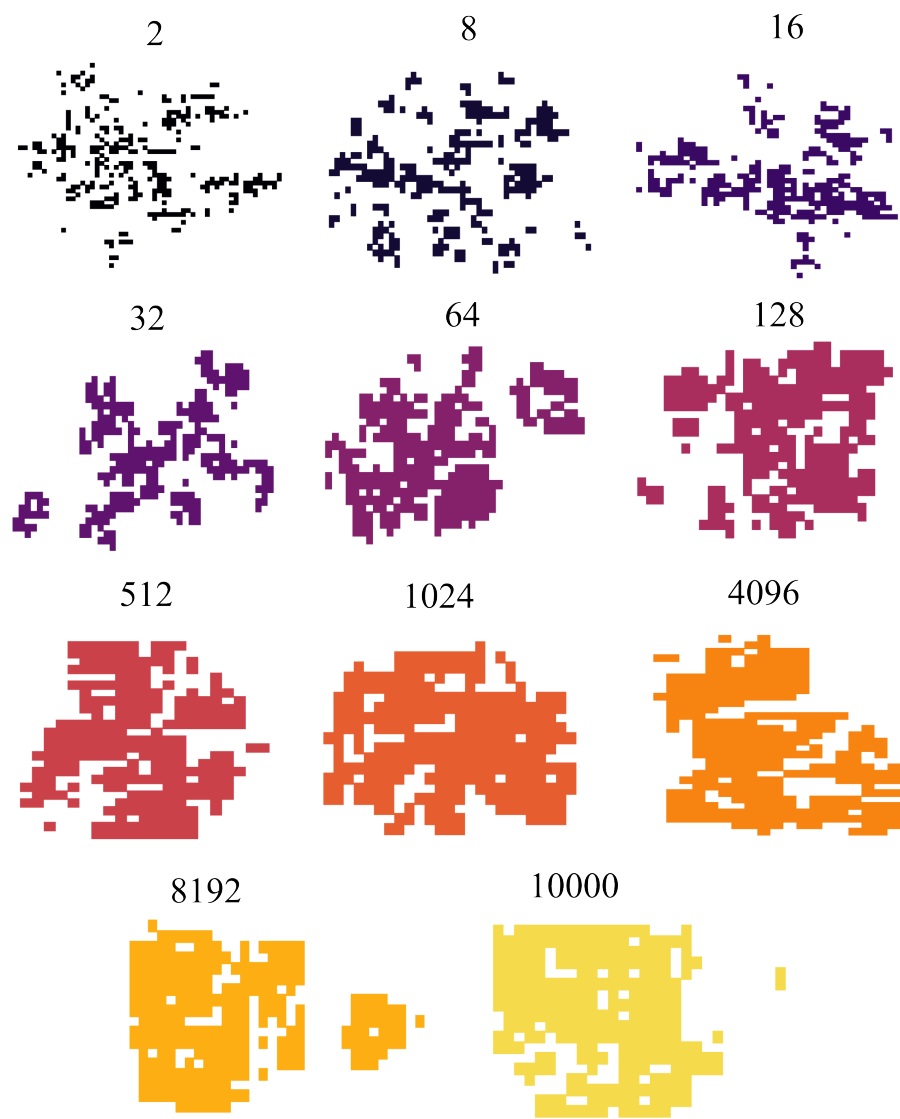


Figure 3: Variação da forma da seção transversal das fibrilas para diferentes valores de T_s .

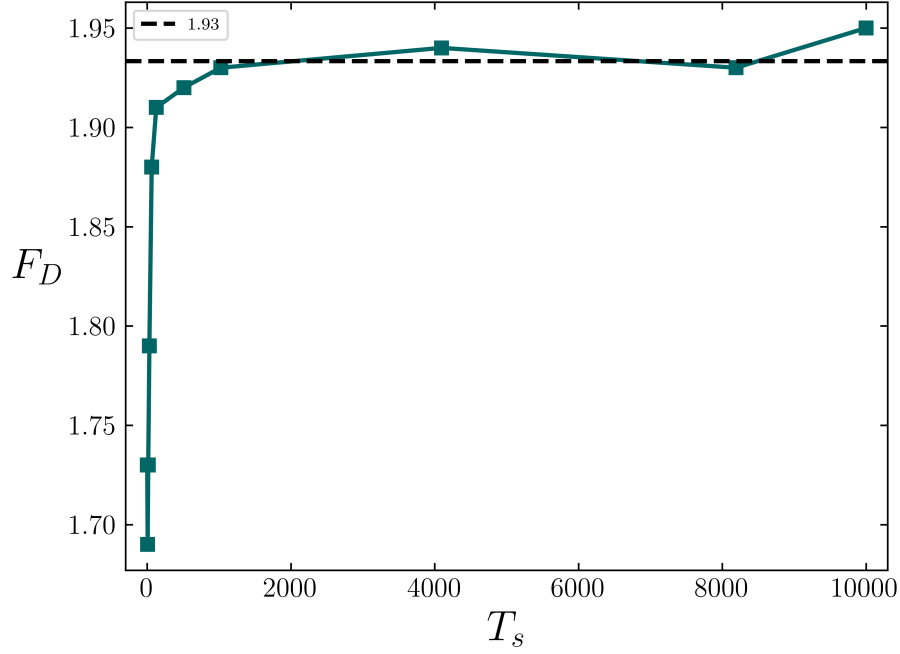


Figure 4:

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 5, 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 [8]. A tensão máxima suportada que encontramos foi de 45,6 MPa, valor muito próximo ao encontrado por Yang et al. [15] ao analisar fibrilas reconstituídas do tendão de Aquiles bovino purificado. Em contraste, no trabalho de Yamamoto [14], 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.

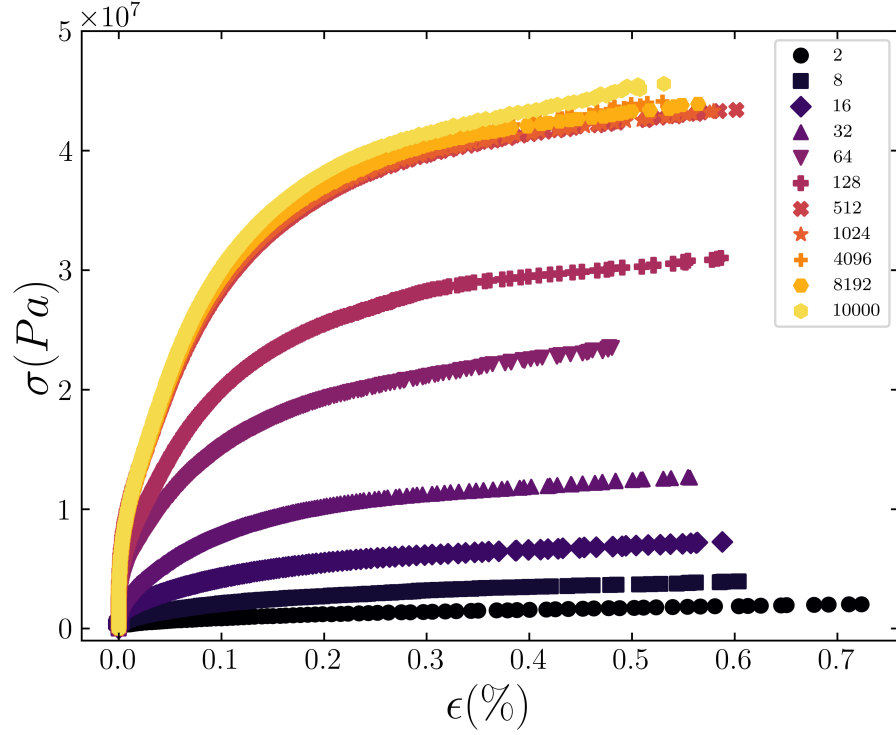


Figure 5: Tensão em função da deformação da fibrila para diferentes valores de T_s .

Na Figura 6, 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.[9] com esse modelo, porém um pouco abaixo do determinado por Katz et al.[7], 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.

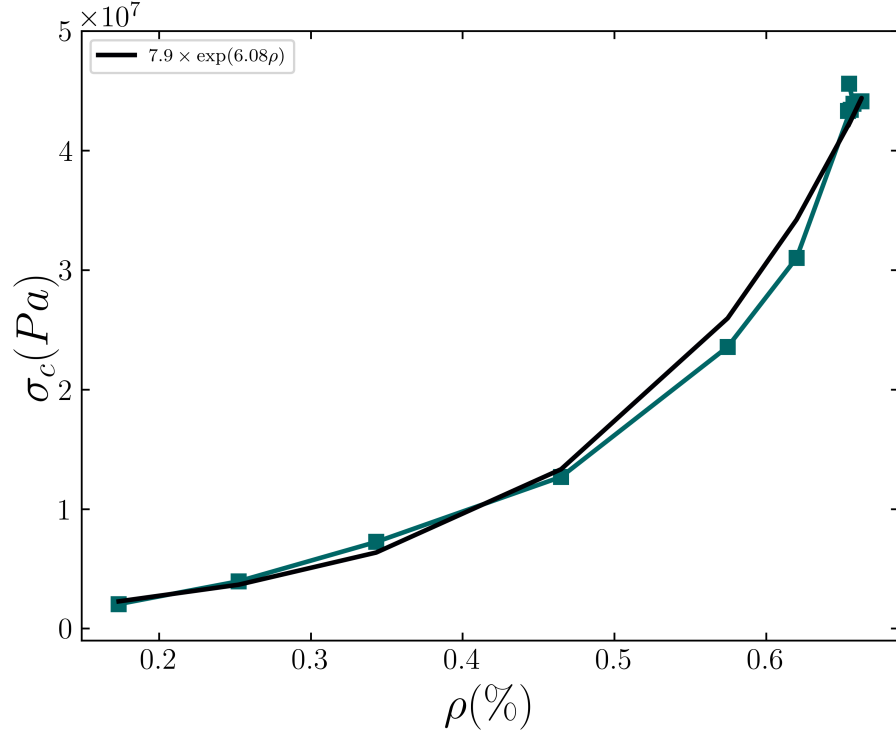


Figure 6: Tensão crítica em função da densidade. Observamos que esse valor cresce exponencialmente com a densidade até ambos os parâmetros atingirem um limite superior.

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 7, 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.

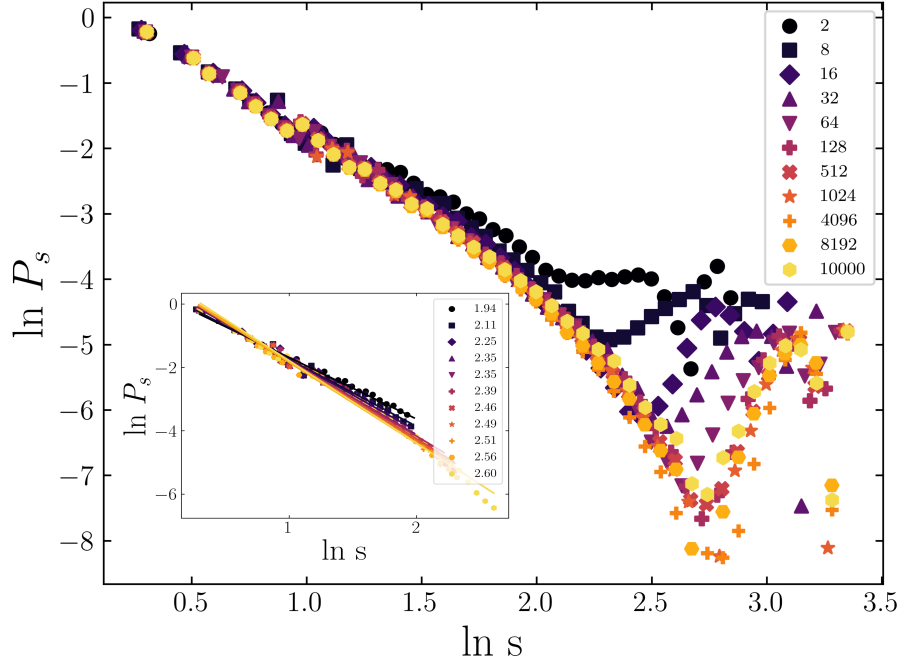


Figure 7: Distribuição das avalanches de ruptura em função do seu tamanho para diferentes valores de T_s . Podemos observar um comportamento em lei de potencia com expoentes γ bem definidos para todos valores do parâmetro. Os expoentes variam de -1.94 a -2.60.

Conclusões

References

- [1] *Engineering Materials 2*. Elsevier, 2013.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] K Gelse. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12):1531–1546, November 2003.
- [5] 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.

- [6] Karl E. KADLER, David F. HOLMES, John A. TROTTER, and John A. CHAPMAN. Collagen fibril formation. *Biochemical Journal*, 316(1):1–11, May 1996.
- [7] Elton P. Katz and Shu Tung Li. The intermolecular space of reconstituted collagen fibrils. *Journal of Molecular Biology*, 73(3):351–369, 1973.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] T. A. Witten and L. M. Sander. Diffusion-limited aggregation. *Physical Review B*, 27(9):5686–5697, May 1983.
- [14] Noritaka Yamamoto. Tensile strength of single collagen fibrils isolated from tendons. *European Journal of Biophysics*, 5(1):1–6, 2017.
- [15] 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.
- [16] 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.