

Este exemplar
corresponde a redação
final da tese de graduação,
pela candidato Maria Izabel Gallão
e aprovada pela comissão julgadora.
9/08/90 *M. Gallão*

MARIA IZABEL GALLÃO

Ação de agentes químicos no processo de
diferenciação celular induzida pelo filtro
de colágeno microcristalino "in vitro".

Tese apresentada ao Institu-
to de Biologia da Universi-
dade Estadual de Campinas,
para a obtenção do título de
Mestre em Biologia, na área
de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada

Campinas, 1990.

G135a

12318/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1. Preparo do substrato.....	10
2.1.1. Feltro de colágeno controle.....	11
2.1.2. Feltro de colágeno tratado com glutaraldeído.....	11
2.1.3. Feltro de colágeno tratado com ácido periódico.....	11
2.2. Manutenção das células em cultura.....	12
2.3. Fixação do material.....	13
2.4. Inclusão em parafina e microtomia.....	13
2.5. Métodos de coloração geral e citoquímica.....	13
2.5.1. Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE).....	13
2.5.2. Coloração com Azul de Toluidina pH 4,0 (AT).....	14
2.6. Contagem de células.....	14
3. RESULTADOS.....	15
3.1. Aspectos macroscópicos gerais dos Feltros de colágeno com e sem tratamento.....	15
3.1.1. Preparo dos feltros.....	15
3.1.2. Feltro de colágeno sem tratamento.....	16
3.1.3. Feltro tratado com glutaraldeído.....	16
3.1.4. Feltros tratados com ácido periódico.....	16
3.2. Exame microscópico das células em cultura: aspectos morfológicos e citoquímicos.....	17
3.2.1. Células que cresceram sobre as lamínulas.....	17
3.2.2. Células que cresceram no feltro de colágeno.....	21

3.2.2.1	Cultura com 24 horas de incubação.....	21
3.2.2.2	Cultura com 5 dias de incubação.....	26
3.2.2.3	Cultura com 10 dias de incubação.....	39
3.2.2.4	Cultura com 15 dias de incubação.....	41
4.	DISCUSSÃO.....	50
5.	CONCLUSÕES.....	64
6.	RESUMO.....	66
7.	SUMARY.....	68
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

Ao meu pai, pelo amor e carinho que sempre me dedicou, apesar de não se encontrar pessoalmente ao meu lado, sei que aonde quer que esteja, estará muito feliz por eu ter concluído mais uma etapa na minha vida.

A minha mãe, Dirce, irmãos e
irmãs, Máximo, Magda, Nilson,
Junior, Valéria e Eduardo.

AGRADECIMENTOS

Profa. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada, que com sua compreensão e orientação tornou possível a realização deste trabalho, uma vez que, desde o início, foi amiga nos momentos mais difíceis.

Profa. Dra. Regina Bicudo Pisani, pela correção da redação preliminar, sugestões e críticas apresentadas a este trabalho, bem como o empréstimo do instrumental necessário e constante incentivo.

Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, pela correção da redação preliminar, sugestões e críticas apresentadas a este trabalho.

Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Hoffling, pelas críticas e sugestões apresentadas na análise prévia deste trabalho.

Aos meus amigos Profa. Célia Guadalupe Tardelli de Jesus Andrade e Prof. José Antonio Novaes da Silva, que foram importantes, pois, incentivaram-me desde o início para a continuidade deste trabalho.

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo, pelas valiosas críticas e sugestões apresentadas a este trabalho.

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder e Fábio Guimarães pela tradução do resumo.

Professores do Departamento de Biologia Celular, que muito contribuíram para o meu crescimento científico.

As minhas amigas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Receptores Hormonais, Denise, Isildinha, Lúcia Maria, Márcia e D. Helena, e ao Prof. Dr. Francisco Pisani, pela estima e carinho que me dedicaram todo este tempo.

Ao meu amigo Fernando Guimarães, de tantas esperanças compartilhadas, que por sua participação, foi muito importante para conclusão deste trabalho, além do empréstimo do seu microcomputador.

Ao meu companheiro Beto, pela paciência e carinho com que me acompanhou todo este tempo, bem como pela correção do texto.

Gláucia, Carmem, Mara, Tereza e Estela, pelo incentivo e presecã constante durante a realizaçã deste trabalho.

A CAPES, pela concessã da bolsa de estudo durante a participaçã deste curso.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular, e todas as demais pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a elaboraçã deste dissertaçã.

1-INTRODUÇÃO

O colágeno é a proteína mais abundante no reino animal e é a proteína estrutural vital para a sustentação da matriz extracelular. Esta molécula pode substituir "in vitro" a matriz extracelular com a qual as células interagem em seus ambientes normais "in vivo".

A fibra de colágeno é constituída por uma unidade precursora denominada tropocolágeno. Este é formado por três cadeias polipeptídicas com uma estrutura em hélice tripla, compondo cerca de 95% da molécula (HAY, 1981).

O aminoácido mais abundante na fibra de colágeno é a glicina, que compõe quase um terço dos resíduos de aminoácidos, seguido da prolina, responsável por cerca de um quarto dos resíduos obtidos. Muitos resíduos de lisina e prolina no colágeno estão covalentemente modificados para 4-hidroxiprolina e 5-hidroxilisina (LINSENMAYER, 1985; VIDAL, 1987; RAWM, 1989).

As ligações cruzadas ("cross-link") intramoleculares, de natureza covalente, ocorrem entre as cadeias polipeptídicas adjacentes da molécula de tropocolágeno (BORNSTENN & PIEZ, 1966; LINSENMAYER, 1985; RAWN, 1989), contribuindo para a manutenção da hélice tripla. As moléculas de tropocolágeno vizinhas se ligam ainda através de

ligações cruzadas intermoleculares principalmente nas regiões N e C terminais, local onde existe maior concentração do aminoácido lisina. Estas ligações conferem uma alta estabilidade estrutural às fibras de colágeno e tem sido implicadas como as responsáveis pela alta força tênsil, e resistência ao ataque químico, apresentados por estas fibras (BAILEY et alii, 1974; HARRIS & FARREL, 1972; BARKER et alii, 1980).

Alguns resíduos de hidroxilisina estão covalentemente ligados a carboidratos, fazendo do colágeno uma glicoproteína. Uma unidade de carboidrato comumente encontrada é um dissacarídeo que consiste de um resíduo de glicose ligado a um resíduo de galactose por uma ligação glicosídica. O resíduo de galactose é ligado ao grupo hidroxila do resíduo de hidroxilisina. Durante a síntese da molécula de colágeno, nas cisternas do Retículo Endoplasmático Rugoso, resíduos de prolina e lisina são convertidos para resíduos de hidroxiprolina e hidroxilisina, e os resíduos de açúcar são adicionados às cadeias de procolágeno (VIDAL, 1987; RAWN, 1989).

A molécula de colágeno é altamente resistente à proteases. Essa resistência é devida à localização das pontes de hidrogênio, as quais ligam aminoácidos de uma cadeia a outra estabilizando a estrutura em tripla hélice da molécula. As únicas enzimas que têm capacidade de agir sobre a porção de tripla hélice de colágeno nativo são as collagenases (LINSEMYER, 1985).

O colágeno constitui uma classe heterogênea de moléculas com propriedades químicas e físicas comuns. São até agora conhecidos onze tipos de colágeno (MILLER, 1985), os quais se diferenciam pela composição em aminoácidos, e conseqüentemente pela variação dos tipos de cadeias que compõem as triplices, e pelas variações quantitativas de açúcares ligados às hidroxilisinas (VIDAL, 1987).

Diversos tipos de colágeno identificados "in vivo" e extraído de vários tecidos tem sido utilizados como substratos para estudos de proliferação, migração e diferenciação celular "in vitro" (GREENBERG et alii, 1981; BILOZUR & HAY, 1988).

Nestes estudos empregando-se substrato a base de colágeno na forma de géis, filme seco ou esponjas, concluiu-se que a capacidade indutora que o colágeno exerce na diferenciação celular, dependia da organização molecular do substrato, sendo esta organização importante para a expressão do genótipo celular (SCHOR & COURT, 1979). Por exemplo, as células epiteliais provenientes de glândula mamária de camundongo em fase gestacional, perdiam seu estado diferenciado quando cultivadas sobre uma superfície de plástico ou vidro, mas mantinham suas características morfológicas e bioquímicas quando o substrato utilizado para o cultivo era constituído por um gel de colágeno em um meio hormonal apropriado (EMERNAN & PITELKA, 1977; EMERNAN et alii, 1977, 1979). No primeiro caso, as células epiteliais cultivadas em monocamadas confluentes eram fi-

nas, achatadas e perdiam a diferenciação específica de células mamárias, mas preservavam as características de células epiteliais. Quando cultivadas sobre gel de colágeno, o espalhamento era menor, mas as células ainda se mantinham achatadas. Entretanto quando mantidas em gel flutuante sua forma passava a ser cuboidal ou colunar, caracterizando-se pela abundância de numerosas vesículas secretoras contendo micelas de α -caseína (EMERNAM et alii, 1979; ROCHA et alii, 1985).

SCHOR & COURT (1979) utilizaram filmes de colágeno desnaturado e gel de colágeno nativo para o crescimento de células HELA. Estes autores observaram que, na presença do soro estas células aderiam mais intensamente quando cultivadas sobre filmes de colágeno desnaturado do que quando o substrato utilizado era o gel de colágeno nativo. Este tipo de célula crescia sobre a superfície do gel de colágeno tridimensional, sendo que a mesma não tinha a capacidade de penetrar dentro deste gel, enquanto que células epiteliais normais ou tumorais cultivadas nas mesmas condições apresentavam capacidade infiltrativa (SCHOR, 1980).

Alterações quanto à taxa de proliferação celular foram observadas por Vidal, 1985 (comunicação pessoal) cultivando células tumorais mamárias MCF-7 em um feltro de colágeno tridimensional. Estas células apresentavam taxa de proliferação mais lenta quando comparadas com a taxa de proliferação apresentadas pelas células cultivadas sobre

lamínula.

A migração celular também é afetada pela presença de elementos da matriz extracelular. Foi demonstrado por YOUNG e HERMAN (1985) que quando tapetes de células endoteliais cultivadas sobre vidro, vidro coberto com soroalbumina bovina, colágeno tipo I, III e IV eram submetidos a uma lesão, as células íntegras presentes na periferia da lesão migravam para este local. Os substratos a base de matriz extracelular, utilizados por estes autores influenciavam diretamente esta resposta celular diminuindo o grau de motilidade celular e modificando o arranjo citoplasmático da actina. Estas alterações não foram encontradas nas células endoteliais cultivadas sobre vidro com ou sem cobertura de soroalbumina bovina, pois estas continuavam apresentando alta motilidade no local da lesão, e o seu citoesqueleto não sofria muita variação.

Foi demonstrado que fibroblastos cultivados dentro de gel de colágeno tridimensional, adquiriam morfologia semelhante a que apresentavam "in vivo", reduziam a taxa de proliferação e modificavam sua atividade metabólica, quando comparados com células cultivadas em monocamadas (MAUCH et alii, 1988). As alterações de síntese protéica observadas por estes autores estavam relacionadas com a redução da síntese de colágeno e de outras proteínas não colagênicas. NISHIDA et alii (1988) observaram também a presença de junções intercelulares nas células cultivadas em gel de colágeno tridimensional, as quais estavam

ausentes quando estas células eram cultivadas em monocamada. Cultivados sobre plástico, os fibroblastos comportavam-se de maneira independente sem qualquer regulação a partir de células vizinhas, apresentando, também, alta motilidade e alta capacidade proliferativa.

KARST & MERKER (1988) trabalharam com células MDCK, cultivando-as sobre vários substratos à base de colágeno, matriz extracelular ou substrato de vidro sem cobertura nenhuma. Processos de diferenciação celular foram observados em células crescendo sobre colágeno flutuante e no interior do gel de colágeno. Mudanças na forma da célula, aumento no número de microvilosidades, aumento no comprimento das zonas de contato, presença de junções comunicantes ("gap junctions") e desmossomos, bem como aumento em número e tamanho de organelas, foram as alterações relacionadas com a diferenciação celular. Estes autores demonstraram que a composição química do substrato não é o principal fator na diferenciação, sendo mais importante as propriedades físicas do mesmo e dentre estas, provavelmente, a plasticidade.

O comportamento das células que crescem sobre substrato à base de colágeno pode ser alterado quando este é submetido a alguma ação física ou química. Isto não ocorre apenas com o colágeno, mas também com outros componentes da matriz extracelular. Após pré-tratamento de substratos à base de matriz extracelular com tripsina, observou-se a ação inibitória desta, sobre a adesão de célu-

las de Sarcoma de Ewing, enquanto em células de Carcinoma de Colo, este efeito, era menor (FRIDMAN et alii, 1985). Células HELA e BHK, crescendo sobre gel de colágeno nativo, não são tão sensíveis a tripsina como quando em crescimento sobre filme de colágeno denaturado, provavelmente, porque os receptores envolvidos na adesão as fibras de colágeno nativo são pouco afetados (SCHOR & COURT, 1979). O calor também é um importante inibidor da adesão celular, agindo principalmente sobre a fibronectina, quando esta é utilizada na forma purificada como substrato para crescimento celular (FRIDMAN et alii, 1985).

Vários trabalhos tem demonstrado a ação do glutaraldeído e do ácido periódico sobre as fibras de colágeno. Submetendo-se substratos a base de colágeno a tratamento com glutaraldeído pode-se obter diferentes respostas celulares "in vitro". Células de glândula mamária de rata, por exemplo, permanecem com suas características morfológicas e sua capacidade para produzir caseína, unicamente se cultivadas sobre gel de colágeno flutuante, quando apresentam uma forma cuboidal. Quando este substrato é submetido ao tratamento com glutaraldeído, observa-se uma contração do gel, e a célula cultivada sobre ele apresenta agora uma forma colunar. Esta alteração da forma é acompanhada por variação no padrão de síntese de caseínas (LEE et alii, 1984).

Diferentes tipos celulares sofrem influências na adesão e desenvolvimento, quando cultivados sobre com-

ponentes da matriz extracelular submetidos ao glutaraldeído, como é o caso das células do Sarcoma de Ewing, células de carcinoma de colo, oligodendrócitos (FRIDMAN et alii, 1985) e fibroblastos 3T3 (SPEER et alii, 1980).

Assim, com o desenvolvimento do conhecimento básico da química e reatividade do colágeno foi possível desenvolver vários produtos de aplicação médica altamente sofisticados, empregando esta proteína fibrosa (CHVAPIL et alii, 1973; PHARRIS, 1980). Embora largamente distribuído pelo corpo, certos tecidos, são utilizados preferencialmente na produção de produtos médicos e não-médicos devido ao seu alto conteúdo protéico. Por exemplo, suturas cirúrgicas absorvíveis são fabricadas a partir da sub-mucosa do intestino de carneiro e serosa do intestino de boi. O colágeno pode ser extraído, para diversas finalidades, de tendão e pele de boi e de porco (CHVAPIL et alii, 1973).

SPEER e colaboradores (1979) utilizaram esponjas de colágeno reconstituído para auxiliar a regeneração em lesões da cartilagem articular. Os autores justificaram tal utilização devido às propriedades especiais destas esponjas que servem como suporte mecânico, para a instalação de células, possuem superfície hidrofílica que possibilita adesão e crescimento celular, apresentam facilidade de esterilização e manipulação, além de serem biodegradáveis.

Devido a sua importância médica, a boa qualidade do colágeno obtido por processos extrativos, é muito importante para o desenvolvimento celular normal tanto "in

vivo" quanto "in vitro".

Assim, o modo como o colágeno é processado é de fundamental importância para que ele mantenha suas propriedades indutoras de diferenciação.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a ação de agentes químicos, como glutaraldeído e ácido periódico, sobre o filtro de colágeno microcristalino, utilizando-se como parâmetros as alterações sobre a adesão, proliferação e diferenciação de células VERO mantidas "in vitro".

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Preparo do substrato

Como substrato para o crescimento celular foram utilizadas várias partidas de feltro de colágeno microcristalino, em placas liofilizadas estéreis, obtidas a partir de colágeno tipo I extraído de tendão de boi, fornecidas pelo Dr. B.C. Vidal (Departamento de Biologia Celular - Unicamp).

As placas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm^2 . Esta etapa e as subsequentes foram realizadas utilizando-se material cirúrgico, vidraria e soluções estéreis sendo os mesmos manipulados no interior de uma capela de fluxo laminar.

Os fragmentos do feltro de colágeno foram inicialmente lavados oito vezes (5 minutos cada) com água bi-destilada e a seguir foram separados em três grupos:

Grupo A - Colágeno controle, não recebeu tratamento.

Grupo B - Colágeno tratado com Glutaraldeído.

Grupo C - Colágeno tratado com Ácido Periódico.

2.1.1- Feltro de colágeno controle

Os fragmentos de colágeno usados como controle, após a lavagem com água bidestilada, foram lavados com solução salina de Hanks e transferidos para o meio de Eagle com 10% de soro de vitelo onde permaneceram por 48 horas à temperatura ambiente, antes de receberem o inóculo celular.

2.1.2- Feltro de colágeno tratado com Glutaraldeído

Os fragmentos de colágeno foram imersos em glutaraldeído (GL) 0,1% por 10 minutos a temperatura ambiente (FRIDMAN et alii, 1985), sendo em seguida lavados cinco vezes em água bidestilada (5 minutos cada) e pelo menos três vezes com salina de Hanks (5 minutos cada). Estas lavagens foram necessárias para que todo o excesso desse aldeído fosse retirado do material. A seguir o material foi transferido para o meio Eagle com 10% de soro de vitelo, por 48 horas, antes de receber o inóculo celular.

2.1.3- Feltro de colágeno tratado com Ácido Periódico

O material foi colocado no ácido periódico (AP) 0,1M por 30 minutos a temperatura ambiente (FRIDMAN et alii, 1985). A seguir lavado cinco vezes em água bidestilada e em solução salina de Hanks. As lavagens com solução de Hanks foram efetuadas até que não houvesse mais alteração do pH desta solução. A seguir o material foi transferido para o meio Eagle por 48 horas à temperatura ambiente, an-

tes de receber o inóculo inicial de células VERO.

Os fragmentos assim preparados foram distribuídos em tubos de Leighton com laminula, sendo que em cada tubo foram colocados dois fragmentos de colágeno iguais.

2.2- Manutenção das células em cultura

Células VERO, provenientes do Instituto Adolf Lutz (São Paulo), foram mantidas em frascos tipo xarope em meio Eagle com 10% de soro de vitelo, em estufa à 37°C.

Utilizou-se para os estudos de adesão e crescimento, uma suspensão de $1,5 \times 10^5$ células/ml determinada por contagem em hemocitômetro pelo método de exclusão com Azul de Tripán. A partir desta suspensão foram retiradas aliquotas de aproximadamente 1 ml onde os fragmentos de feltro de colágeno foram embebidos. Em seguida os fragmentos de colágeno embebidos com a suspensão de células foram colocados em tubos de Leighton e mantidos em estufa a 37°C, em meio Eagle com 10% de soro de vitelo. As amostras foram retiradas após 1, 5, 10 e 15 dias de incubação. Durante este período o meio de cultura foi trocado diariamente com o objetivo de evitar possíveis deficiências nutricionais que pudessem interferir na análise dos resultados.

2.3- Fixação do material

Os fragmentos de colágeno tratados e não tratados retirados após 1, 5, 10 e 15 dias de incubação foram fixados em paraformaldeído a 4% em Tampão fosfato 0,2 M a pH 7,4, acrescido de glutaraldeído a 5%, por duas horas em temperatura ambiente. Estes fragmentos foram lavados em água destilada e guardados em álcool 70% a 4°C. As células que cresceram sobre laminulas foram fixadas utilizando-se o mesmo fixador por trinta minutos, lavadas várias vezes em água destilada, secas ao ar e guardadas a temperatura ambiente.

2.4- Inclusão em parafina e microtomia

Após a fixação os fragmentos de colágeno foram desidratados em uma bateria com concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol, imersos em parafina (três banhos de uma hora cada a 60°C) sendo em seguida incluídos em parafina e realizados então cortes seriados com 7 µm de espessura, em micrótomo R. Jung-Heidelberg.

2.5- Métodos de coloração geral e citoquímicos

2.5.1- Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE)

Esta coloração permite uma análise morfológica geral do material.

O material foi corado por três minutos em Hematoxilina, lavado por doze minutos em água destilada e

tratado pela Eosina durante dez minutos, com rápida desidratação em etanol, diafanização em xilol e montagem em bálsamo do Canadá.

2.5.2- Coloração com Azul de Toluidina a pH 4,0 (AT)

Foi empregada para a detecção de radicais aniônicos e metacromasia.

O material foi corado em uma solução a 0,025% de Azul de toluidina em tampão McIlvaine a pH 4,0 durante quinze minutos à temperatura ambiente, lavado rapidamente em água destilada, deixado secar ao ar e em seguida diafanizado em xilol e montado em bálsamo do Canadá. (MELLO e VIDAL, 1980).

2.6- Contagem de células

Para a avaliação do crescimento das células em cultura, nos diversos tempos e tratamentos utilizados, procedeu-se a contagem do número de células em três campos escolhidos aleatoriamente por corte, num total de quatro cortes por tempo de cultura. O resultado mostrado no histograma (fig. 41) se refere a média destes resultados.

3- RESULTADOS

3.1- Aspectos macroscópicos gerais dos Feltros de colágeno com e sem tratamento

3.1.1- Preparo dos feltros

Durante os experimentos foram testadas oito partidas de feltro de colágeno microcristalino. Três destas partidas durante as lavagens com água se desfizeram e não puderam ser utilizadas como substratos para o crescimento de células. Duas resistiram às lavagens mas, com sete dias de incubação dos fragmentos de colágeno, só restavam alguns pedaços pequenos, sendo portanto inviáveis para manter a cultura de células além deste período. Houve uma partida de feltro testado que inibiu totalmente o desenvolvimento celular. Desta forma os resultados descritos a seguir se referem as duas partidas que resistiram as lavagens e puderam ser mantidas "in vitro", a 37°C por até 15 dias, partidas estas que permitiram a adesão e crescimento das células "in vitro".

3.1.2- Feltros de colágeno sem tratamento

Os fragmentos sem tratamento, sem células, mantidos em estufa à 37°C, permaneceram íntegros até o período final de incubação, enquanto outros fragmentos usados como substrato para o crescimento de células VERO não tiveram o mesmo comportamento. Com quinze dias os fragmentos eram menores, e pareciam estar se desintegrando.

3.1.3- Feltros tratados com glutaraldeído

Depois de submetidos ao glutaraldeído os fragmentos de colágeno mostraram-se menos maleáveis do que os controles, quando manuseados com pinça estéril, permanecendo assim até o período final de incubação, quando mantidos à 37°C na ausência de células. Mesmo durante o tempo de cultura, depois de embebidos na suspensão celular, estes fragmentos permaneciam mais íntegros, enquanto o colágeno sem tratamento já no décimo quinto dia de incubação mostrava redução de tamanho, apresentando um aspecto de colágeno em desintegração.

3.1.4- Feltros tratados com ácido periódico

Os fragmentos, de colágeno tratados com ácido periódico também diminuíram de tamanho e eram tão maleáveis, quando manuseados com pinça estéril, quanto os fragmentos de colágeno sem tratamento. Os fragmentos mantidos à 37°C sem células também mantiveram as mesmas características até o final do tempo de incubação.

Durante o tempo de cultura esses fragmentos de colágeno diminuíram de tamanho dando a impressão de estarem se desfazendo, por desagregação dos feltros, característica essa que era mais acentuada no colágeno tratado com ácido periódico do que no colágeno sem tratamento

3.2- Exame microscópico das células em cultura: aspectos morfológicos e citoquímicos

3.2.1- Células que cresceram sobre as laminulas

As laminulas coradas com Azul de toluidina mostraram que após 24 horas as células que cresceram em tubos sem o feltro de colágeno tiveram o desenvolvimento esperado, apresentando forma poligonal e crescendo em monocamada com a presença de muitas células (figura 1a). A partir do quinto dia de incubação o tapete estava quase formado, podendo-se observar após dez dias um tapete completamente fechado. Com quinze dias o processo de degeneração celular já estava presente (figuras 1b, c e d).

O aspecto morfológico das células que cresceram sobre laminula, tendo no mesmo tubo de Leighton os feltros de colágeno sem tratamento, foi semelhante à descrição anterior, diferindo quanto ao número de células que era bem menor (figura 2a).

Nas lamínulas dos tubos que continham feltro de colágeno tratado com glutaraldeído, as células cresceram normalmente mas também em menor número (figura 2b).

O desenvolvimento das monocamadas sobre as lamínulas dos tubos com o feltro de colágeno tratado pelo ácido periódico foi semelhante ao do controle sem feltro de colágeno (figura 2c).

fig 01: Aspecto geral das monocamadas, em laminula dos tubos de Leighton, sem o feltro de colágeno. Material corado pelo Azul toluidina pH 4,0. a) Cultura com 24 horas de incubação, presença de muitas células; b) Cultura com 5 dias de incubação, tapete de células formado; c) Cultura com 10 dias de incubação; d) Cultura com 15 dias de incubação, algumas células em degeneração apresentando núcleo picnótico. Aumento: 240X.

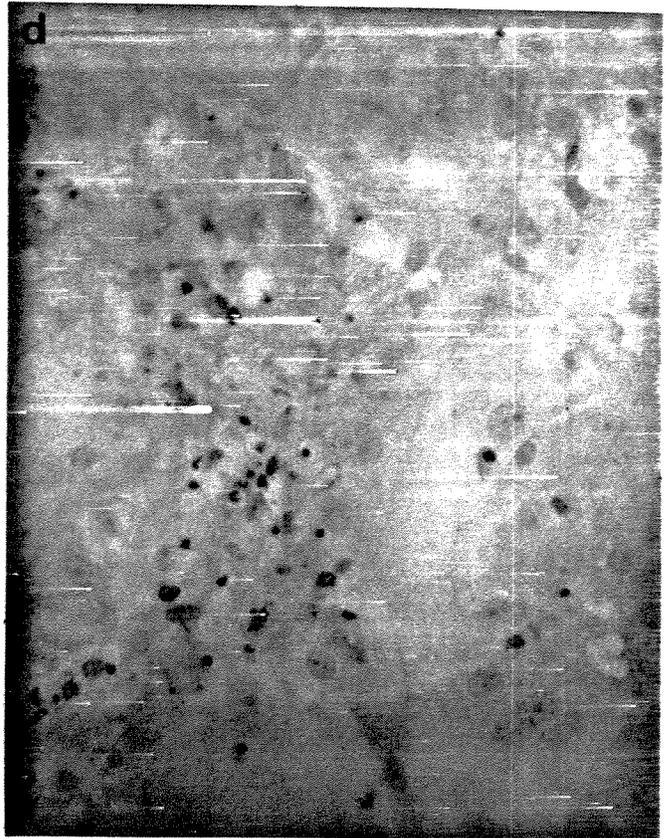
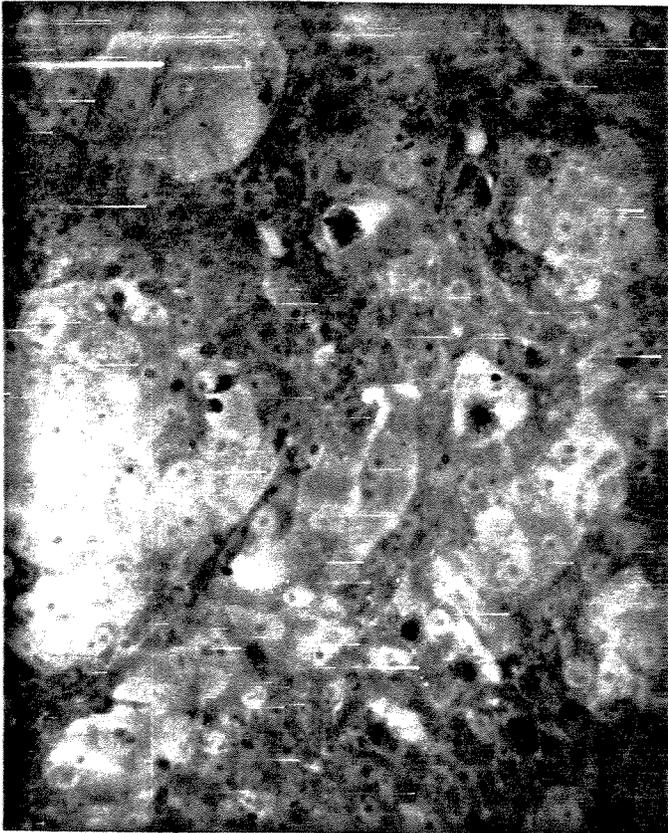
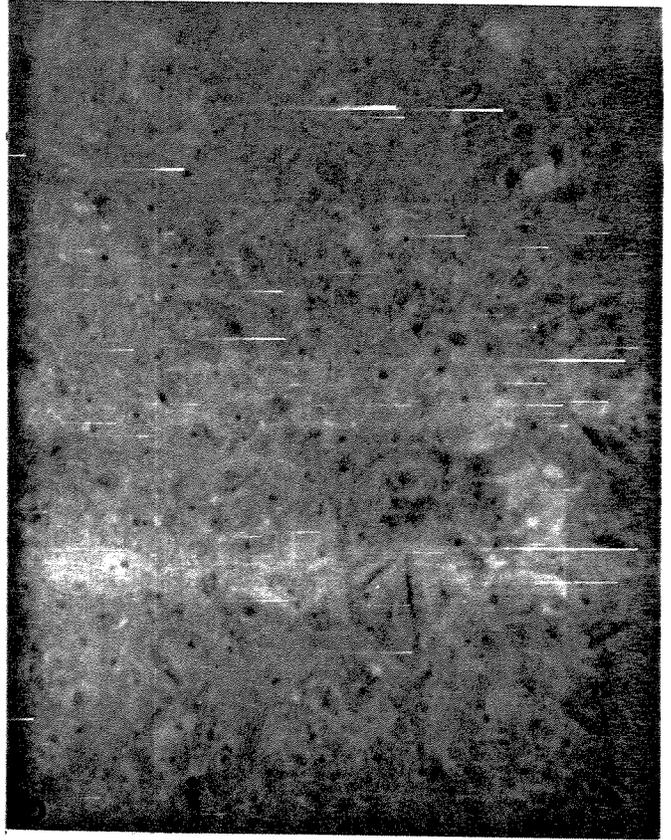
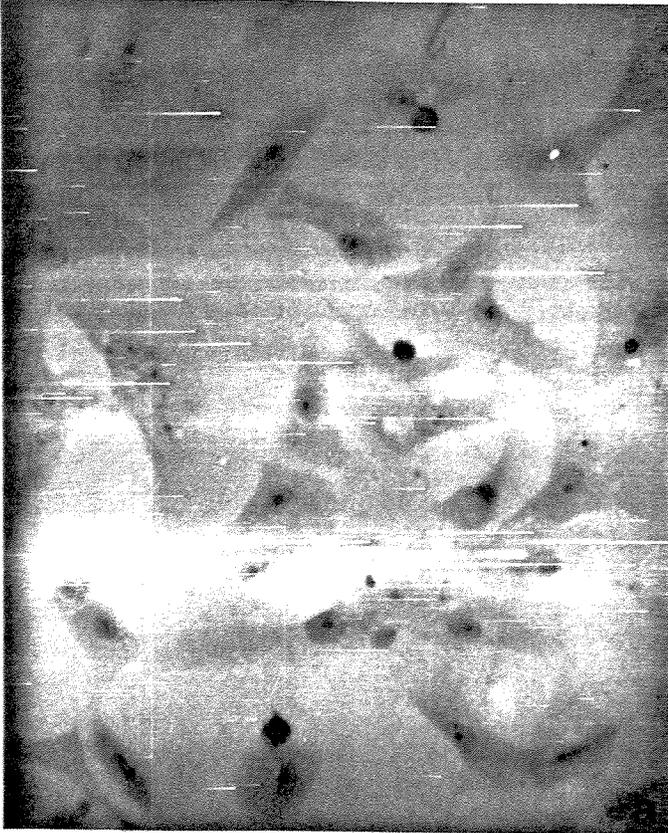
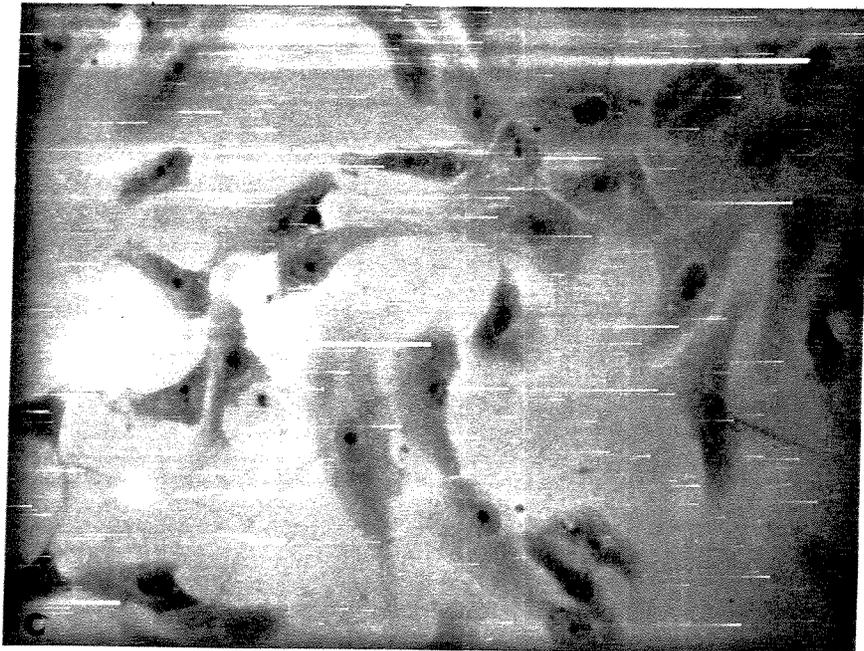
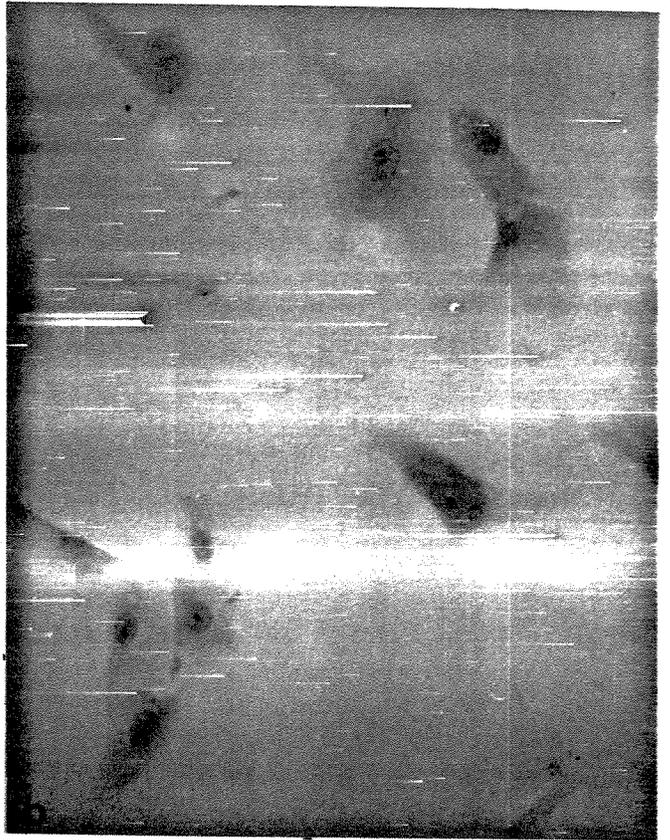


fig. 02. Aspecto geral das monocamadas em laminula dos tubos de Leighton com feltro de colágeno. Material corado pelo Azul de toluidina pH 4,0. a) Cultura com 24 horas de incubação na presença de feltro de colágeno sem tratamento: número de células menor quando comparado ao controle sem colágeno com 24 horas; b) Cultura com 24 horas de incubação, na presença de feltro de colágeno tratado pelo glutaraldeído; c) Cultura com 24 horas de incubação, na presença de feltro de colágeno tratado pelo ácido periódico. Aumento: 240X.



3.2.2- Células que cresceram no feltro de colágeno

3.2.2.1- Cultura com 24 horas de incubação

No colágeno controle, corado com HE, algumas células que cresceram sobre este substrato já apresentavam forma alongada enquanto outras mantinham-se ainda arredondadas. Presença de células aderidas totalmente às fibras ou iniciando adesão (figuras 3 e 4). As células cultivadas em colágeno tratado com GL e AP apresentavam forma arredondada e apareciam em menor número (figuras 5 e 6). Por outro lado o crescimento celular era menor no substrato tratado com ácido periódico do que no tratado com glutaraldeído (figura 41).

As células que cresceram no colágeno controle quando coradas com AT apresentavam núcleos com aspecto homogêneo, corados em azul esverdeado, isto é, ortocromáticos, nucléolo evidente e citoplasma basófilo (figura 7). Nas que utilizavam como substrato o colágeno tratado com GL e AP, o núcleo aparecia corado em azul, o citoplasma basófilo e o nucléolo era evidenciado em poucas células (figuras 8 e 9).

Fig 03: Colágeno sem tratamento. Cultura com 24 horas de incubação. Células apresentando morfologia arredondada (▶) e células em início de espalhamento (▶) sobre as fibras de colágeno (→). Material corado pela Hematoxilina-Eosina. Aumento: 460 X

Fig. 04: Colágeno sem tratamento. Cultura com 24 horas de incubação. Presença de célula em início de espalhamento (→). Material corado pela Hematoxilina-Eosina. Aumento: 1160 X.

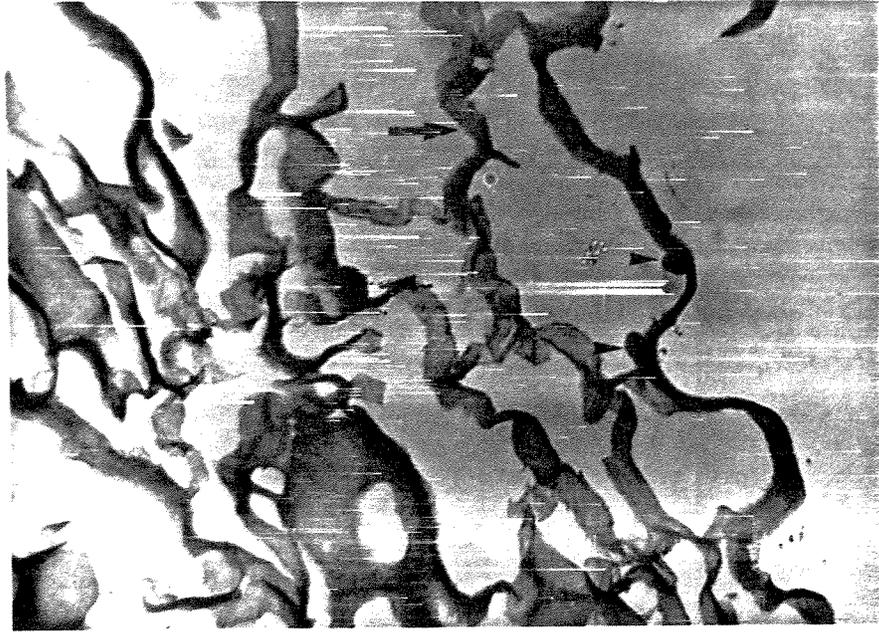


Fig 05 Colageno tratado com Gl. Cultura com 24 horas de incubação. Neste substrato o número de células é menor, quando comparado ao colágeno controle. Presença de células arredondadas (►). Material corado pela Hematoxilina-Eosina. Aumento: 460 X.

Fig. 06: Colágeno tratado com AP. Cultura com 24 horas de incubação. O número de células crescendo sobre este substrato também é pequeno, sendo que estas quando vistas são arredondadas (►). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 460 X.

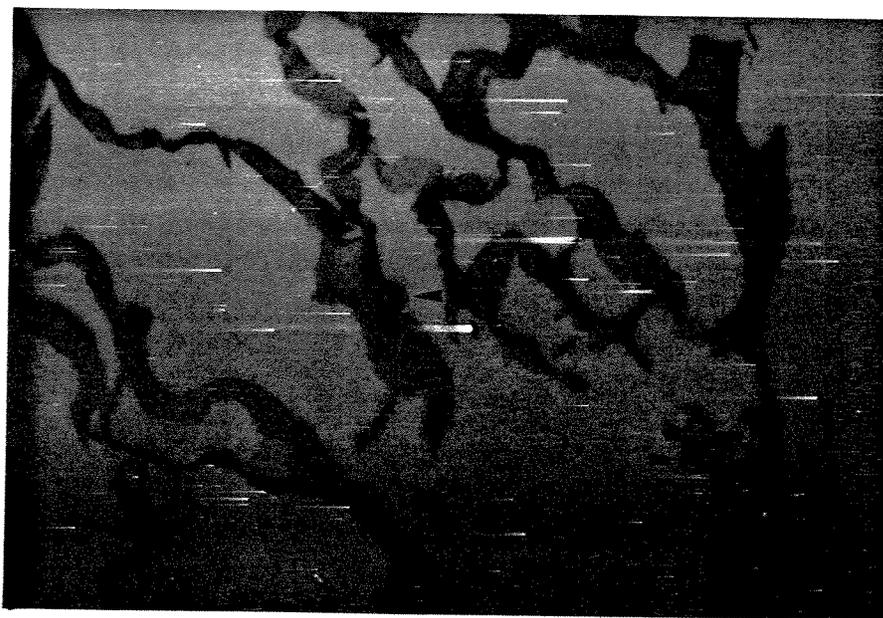
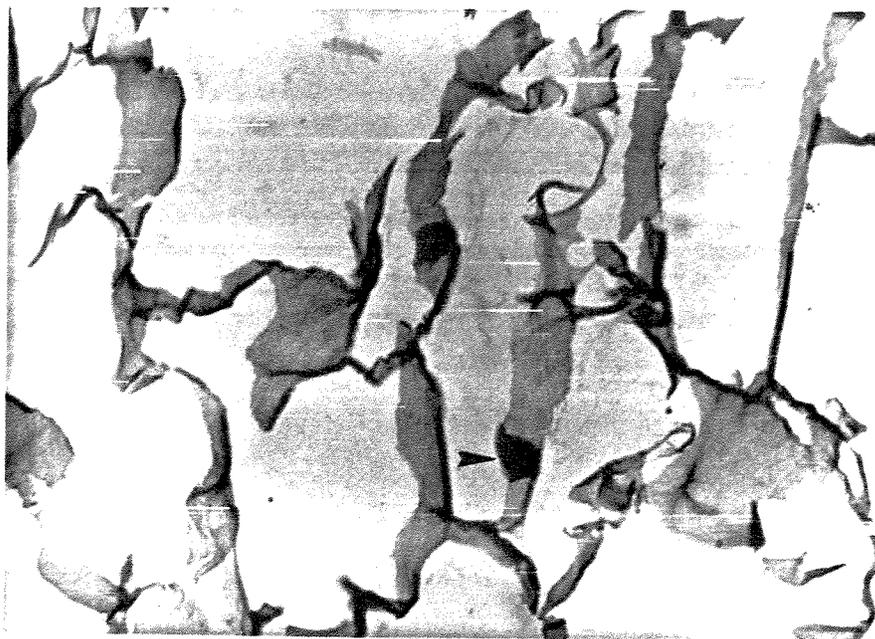
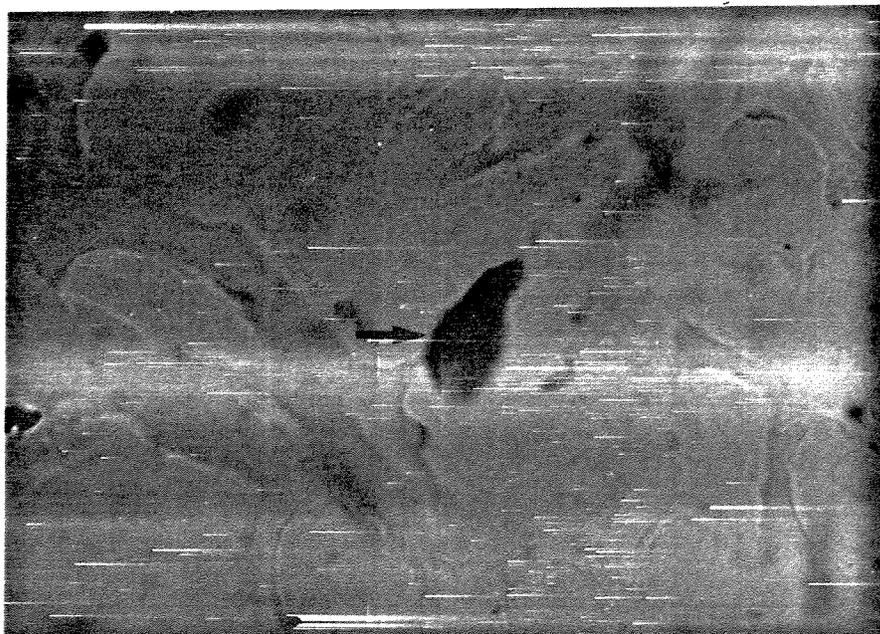


Fig. 07 Colágeno sem tratamento. Cultura com 24 de incubação. Célula apresentando núcleo levemente ortocromático, nucléolo basófilo evidente e citoplasma basófilo (→). Coloração. Azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 1160 X.

Fig. 08: Colágeno tratado com GL. Cultura com 24 horas de incubação. Célula arredondada com núcleo e citoplasma basófilos (▶). Material corado pelo Azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 1160 X.



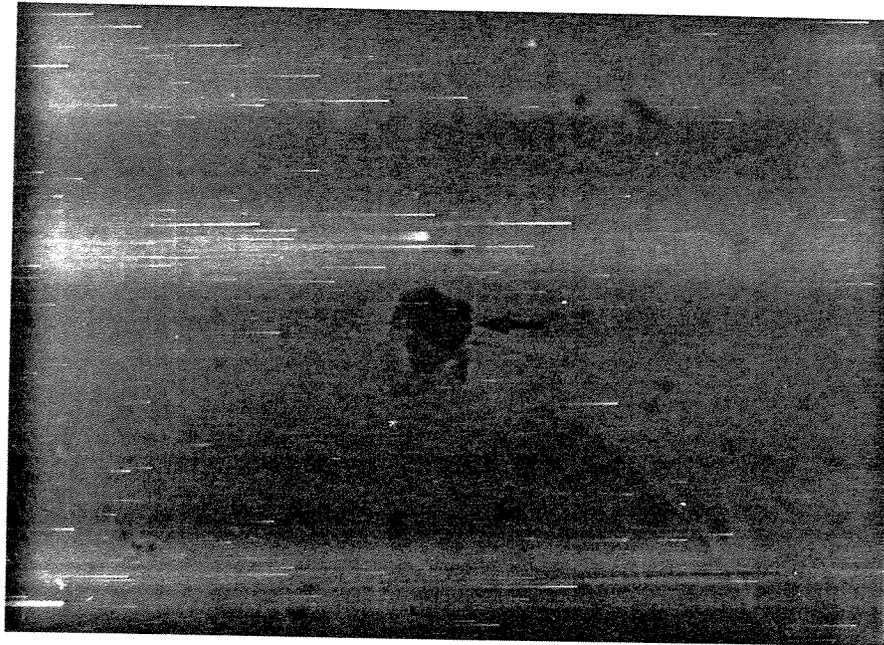


Fig. 09: Colágeno tratado pelo AP. Cultura com 24 horas de incubação. Célula com núcleo e citoplasma basófilos, núcleo pouco evidente (→). Material corado pelo Azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 1160 X.

3.2 2.2- Cultura com 5 dias de incubação

Neste período de incubação o número de células presentes no colágeno não tratado, corado com HF, era maior quando comparado com o número de células do início da cultura (figura 41), sendo a forma alongada de algumas células mais acentuada. Notava-se ainda uma heterogeneidade na morfologia das células deste grupo, podendo-se ver em uma mesma região células arredondadas e alongadas. Com 5 dias observava-se nas cavidades formadas pelas fibras de colágeno o início do seu preenchimento pelas células em crescimento (figuras 10 e 11). No material tratado com GL e AP o número de células aumentou, principalmente no tratado com GL (figura 41), mas a forma arredondada das células foi mantida (figuras 12 e 13). Algumas células que cresceram no colágeno tratado com GL já estavam em início de espalhamento (figuras 14 e 15).

Quando coradas com AT, as células VERO cultivadas no colágeno controle apresentavam citoplasma basófilo, levemente metacromático, núcleo ortocromático e nucléolo basófilo (figuras 16-18). No substrato de colágeno tratado com GL e AP o citoplasma e núcleo das células permaneceram basófilos. Por outro lado, o nucléolo só foi visualizado em algumas células (figuras 19 e 20), no que difere das células em cultura do colágeno não tratado, controle.

Fig. 10 Colágeno controle. Cultura com 5 dias de incubação. Vê-se neste período aumento no número de células com formato alongado (►) iniciando o preenchimento de cavidades (★) Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 460 X.

Fig. 11: Colágeno sem tratamento. Cultura com 5 dias de incubação. Observa-se células arredondadas (►) com núcleos claros e volumosos e presença de dois nucléolos e células alongadas (⇨) aderidas às fibras. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 1160 X.



Fig. 12. Colágeno tratado pelo GI. Cultura com 5 dias de incubação. Verifica-se aumento no número de células quando comparado ao mesmo material com 24 horas de incubação sendo a forma arredondada a mais encontrada (►). Material corado pela Hematoxilina-Eosina. Aumento 460 X

Fig. 13. Colágeno tratado pelo AP. Cultura com 5 dias de incubação. Número de células ainda pequeno, com aspecto morfológico arredondado (►). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 460 X.

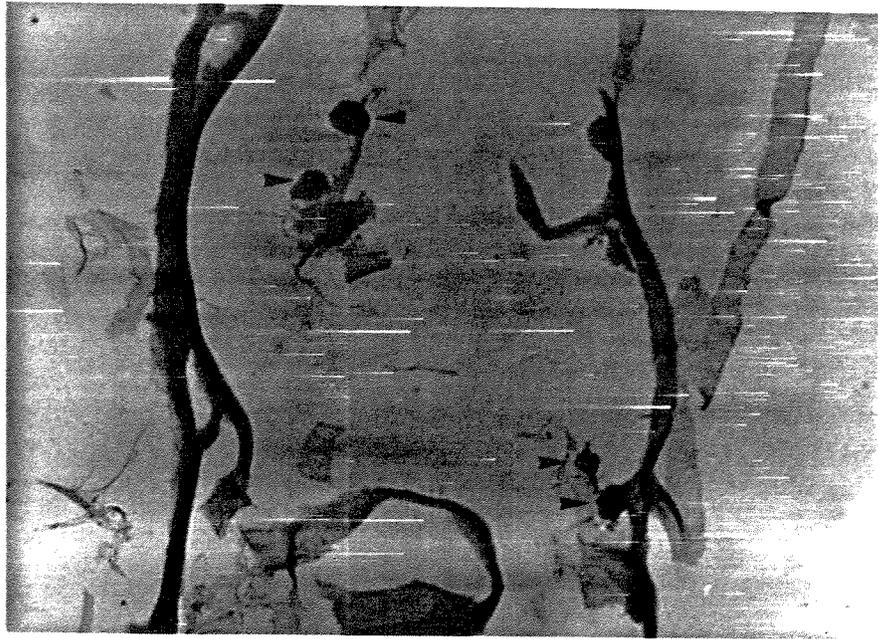


Fig. 14: Colágeno tratado pelo GI. Cultura com 5 dias de incubação. Presença de células arredondadas (▶) e células em início de espalhamento (→). Material corado pela Hematoxilina-Eosina. Aumento: 460 X

Fig. 15: Colágeno tratado pelo GL. Cultura com 5 dias de incubação. Célula em início de adesão (→). Material corado pela Hematoxilina-Eosina. Aumento: 1160 X.

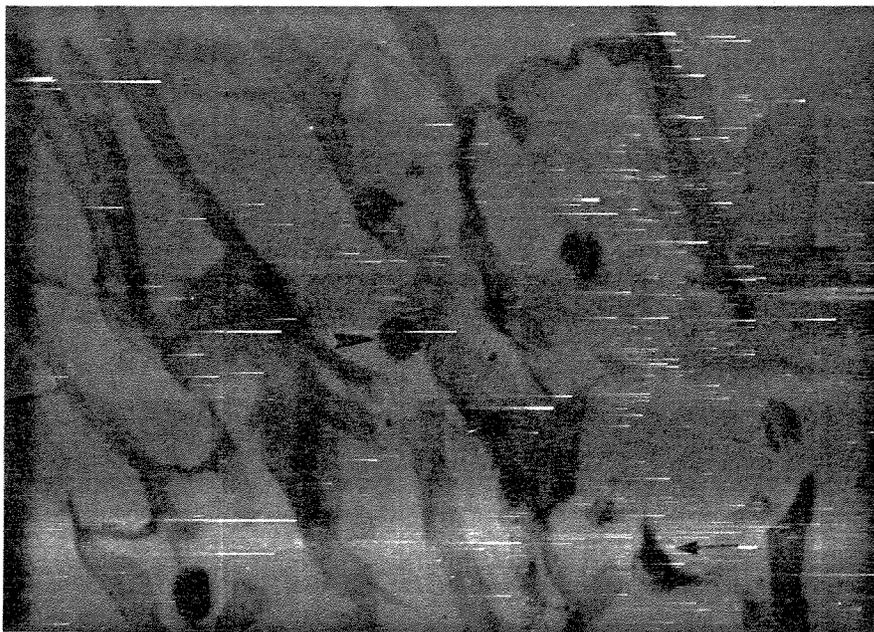


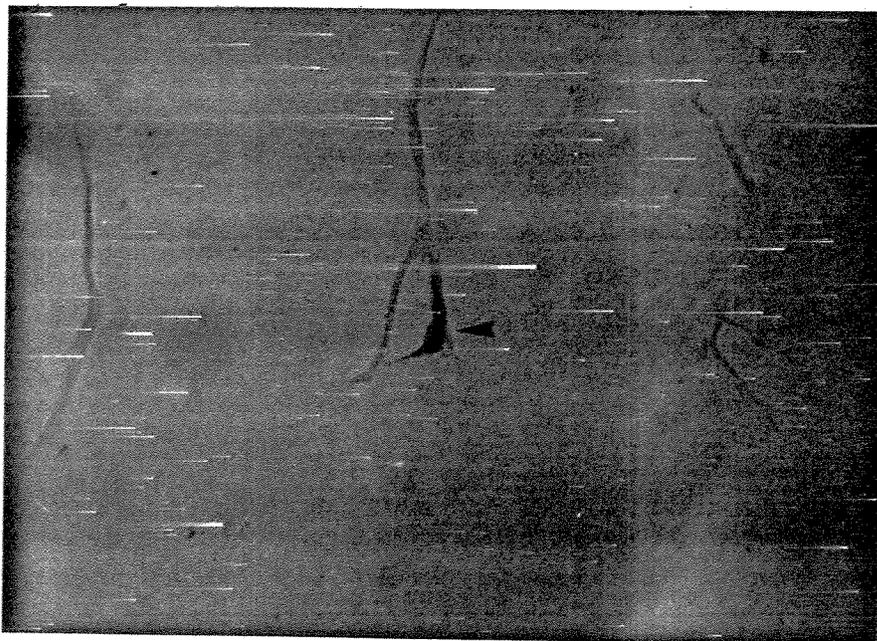
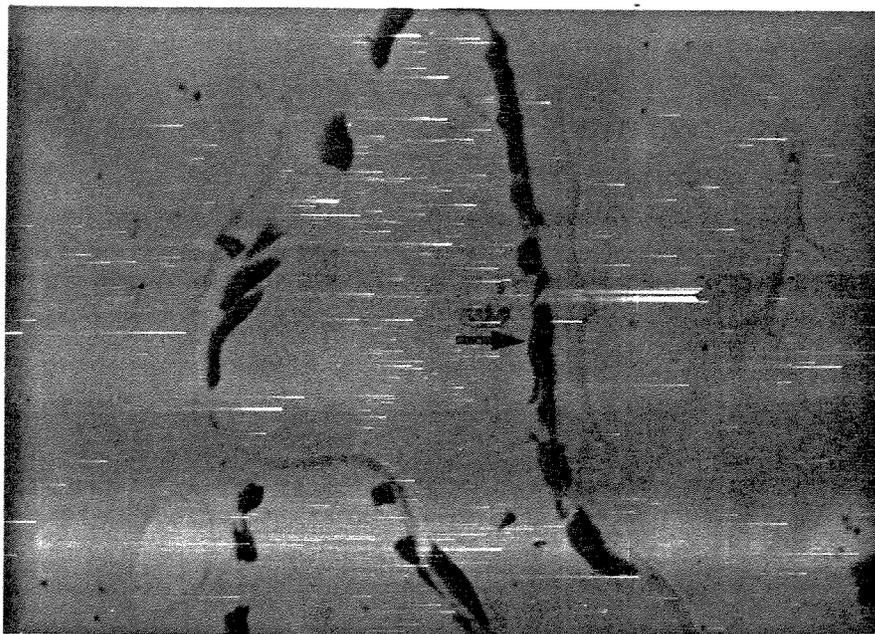
Fig. 16: Colágeno sem tratamento. Cultura com 5 dias de incubação. Célula apresentando núcleo ortocromático, nucleólo basófilo e citoplasma levemente metacromático (→) Material corado pelo Azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 1160 X.

Fig. 17: Colágeno sem tratamento. Cultura de 5 dias. Região mostrando células arredondadas ortocromáticas (★) preenchendo cavidades. Nas células alongadas (→) aderidas às fibras, nota-se uma leve metacromasia do citoplasma (►). Coloração: Azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 460 X.



Fig. 18. Colágeno sem tratamento. Cultura de 5 dias. Observa-se a presença de uma camada contínua de células alongadas aderidas às fibras colagênicas (→). Coloração: Azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 460 X.

Fig. 19. Colágeno tratado com GL. Cultura com 5 dias de incubação. Célula apresentando núcleo e citoplasma basófilos, nucléolo pouco evidente. Prolongamentos citoplasmáticos (▶) indicando um início de espalhamento. Material corado com Azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 460 X.



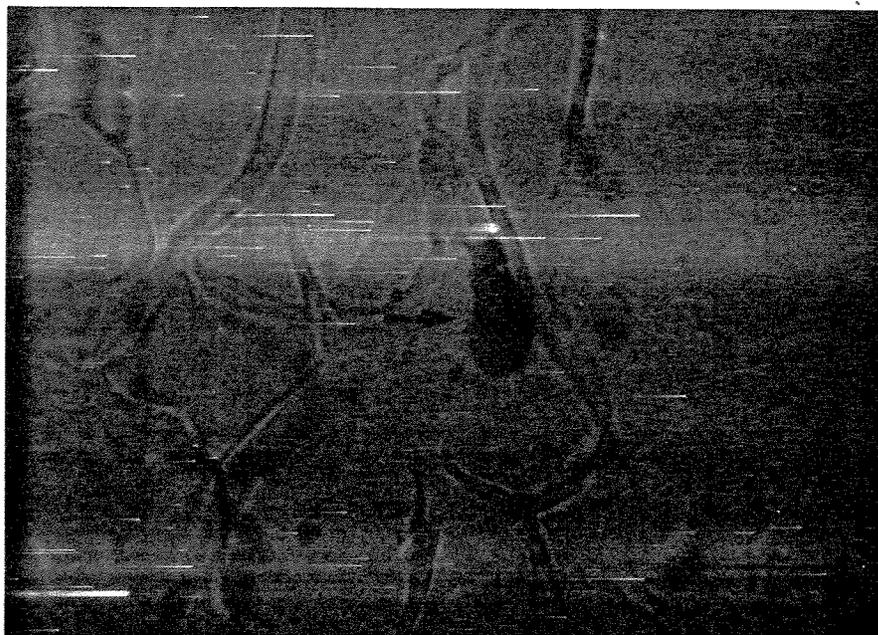


Fig. 20: Colágeno tratado pelo AP. Cultura com 5 dias de incubação. Núcleo e citoplasma basófilos, nucléolo quase não sendo visto (→). Material corado pelo Azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 1160 X.

3.2.2.3- Cultura com 10 dias de incubação

O número de células presente no colágeno controle, corado com HE, foi maior como já descrito no período anterior, onde se iniciava o preenchimento das cavidades com mais de uma camada de células. Com dez dias isto ocorreu com maior frequência, chegando a haver o preenchimento total das cavidades em alguns pontos (figuras 21-23). No feltro de colágeno tratado com GL as células apresentavam as mesmas características observadas no controle no início da cultura, mostrando forma alongada e dispendo-se em alguns pontos como uma camada contínua (figura 24). As células que cresceram sobre o substrato tratado com AP, permaneceram arredondadas, aumentaram em número no interior das cavidades, a ponto de preenchê-las totalmente (figura 25).

As células que cresceram no colágeno controle quando coradas com AT, apresentavam uma certa heterogeneidade na forma celular e coloração, expressa por células arredondadas presentes no interior dos aglomerados, sendo que nestas, a ortocromasia do núcleo e a metacromasia do citoplasma eram mais evidentes. Pôde-se observar em alguns pontos a deposição de material metacromático nas fibras de colágeno (figuras 26 e 27). O aspecto das células que cresceram sobre o substrato tratado com GL foi semelhante ao das células do substrato controle com cinco dias de incubação, mantendo-se alongadas e arredondadas, notando-se a presença de células com núcleo levemente ortocromático e

citoplasma metacromático. O nucléolo apresentou-se pouco evidente nas células com o núcleo e citoplasma basófilos (figuras 28 e 29). Observou-se em alguns locais o início do preenchimento das cavidades pelas células (figura 28). No feltro de colágeno tratado com AP pôde-se verificar a presença de algumas células isoladas, com núcleo levemente ortocromático e nucléolo basófilo evidente (figuras 30 e 31)

Fig. 21: Colágeno sem tratamento. Cultura com 10 dias de incubação. Pôde-se observar células arredondadas (→) preenchendo as cavidades formadas pelas fibras de colágeno. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 1160 X.

Fig. 22: Colágeno sem tratamento. Cultura com 10 dias de incubação. O preenchimento das cavidades em alguns pontos é completo e o número de células é maior quando comparado aos períodos anteriores (▶). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 460 X.



Fig. 23: Colágeno sem tratamento. Cultura com 10 dias de incubação, observa-se células arredondadas com núcleo claro e volumoso preenchendo as cavidades (►). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 1160 X

Fig. 24: Colágeno tratado pelo Gl. Cultura de 10 dias. Cavidade em início de preenchimento (*), células alongadas nas bordas das fibras de colágeno formando uma camada contínua (►). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 460 X.



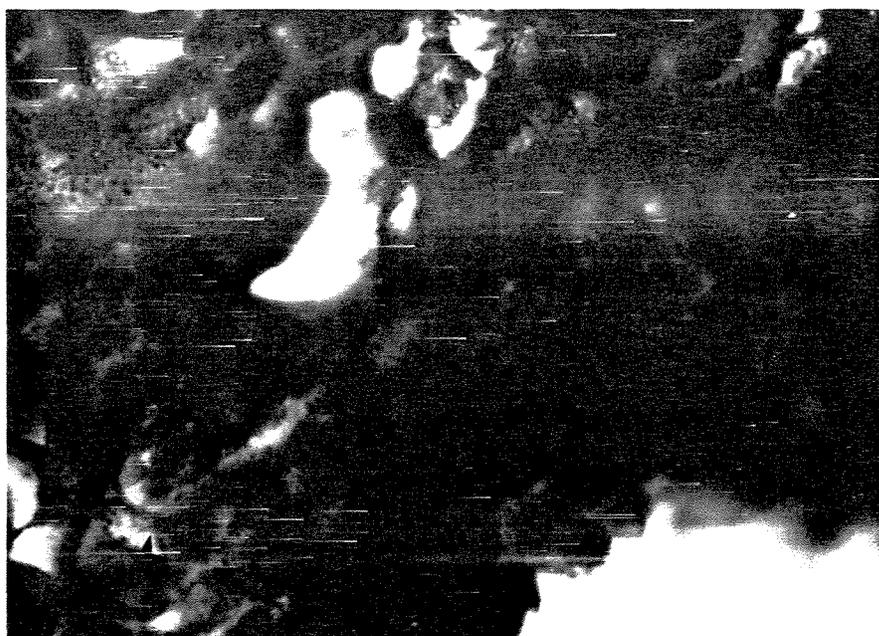


Fig. 25: Colágeno tratado pelo AP. Cultura com 10 dias de incubação. Células arredondadas preenchendo cavidades formadas pelas fibras de colágeno (★). Material corado pela Hematoxilina-Eosina. Aumento: 1160 X.

Fig. 26: Colágeno sem tratamento. Cultura com 10 dias de incubação. Forma celular variada, vê-se células arredondadas (▶) e células alongadas em maior número (→). A descompactação da cromatina e a metacromasia do citoplasma são bem evidentes (→). presença de material levemente metacromático depositado nas fibras de colágeno (*). Coloração: Azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 460 X.

Fig. 27: Colágeno sem tratamento. Cultura com 10 dias de incubação. Célula com núcleo ortocromático (▶), nucleólo basófilo (▶) e leve metacromasia do citoplasma (→). Material corado pelo Azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 1160 X.

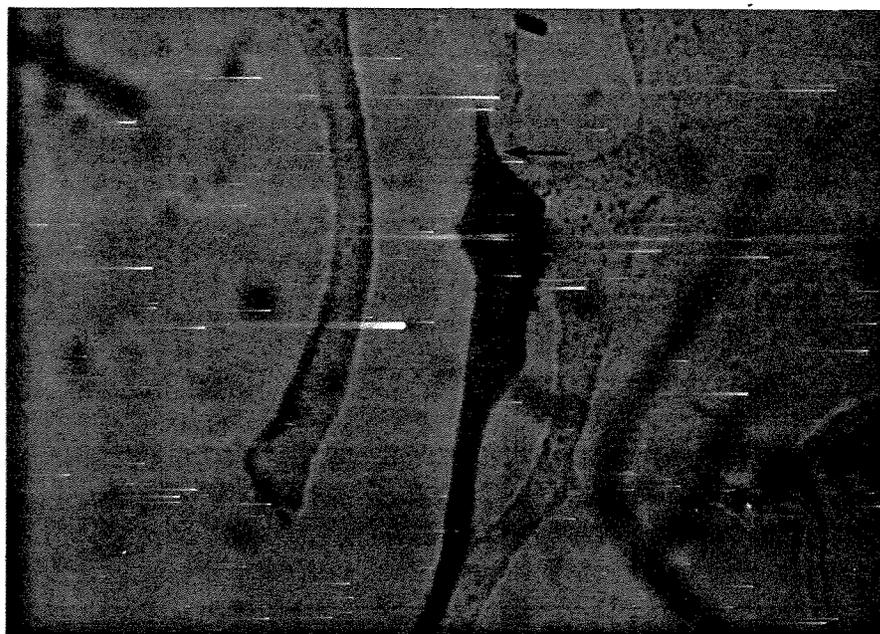
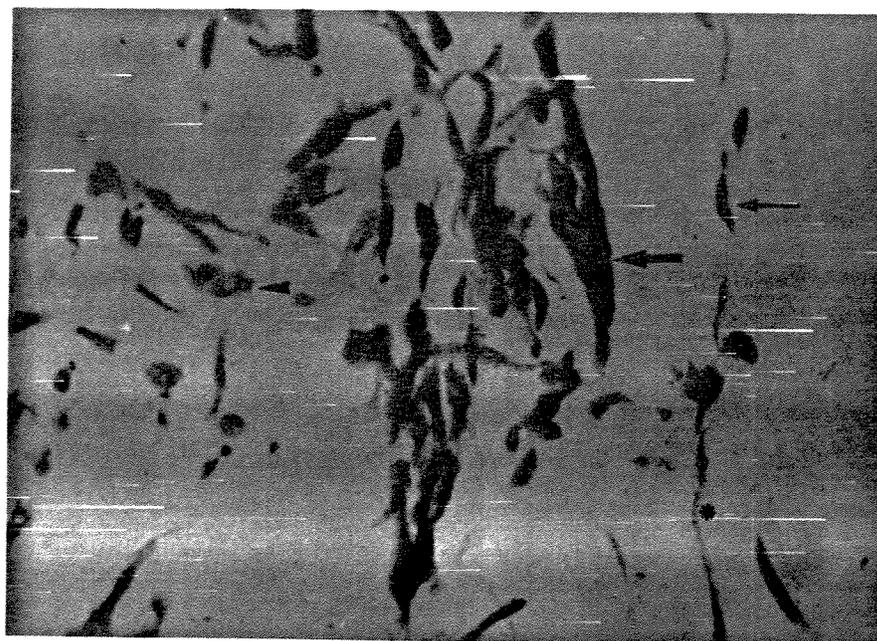


Fig. 28: Colágeno tratado pelo GL. Cultura com 10 dias de incubação. Presença de células alongadas (→) e arredondadas (⇨). Algumas células com núcleo levemente ortocromático e citoplasma levemente metacromático, nucléolo só é visto em algumas células. Cavidades preenchidas (✱) e outras em início de preenchimento (★). Coloração: Azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 460 X.

Fig. 29: Colágeno tratado pelo GL. Cultura com 10 dias de incubação. Células com nucléolo basófilo (→). Material corado pelo Azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 460 X.

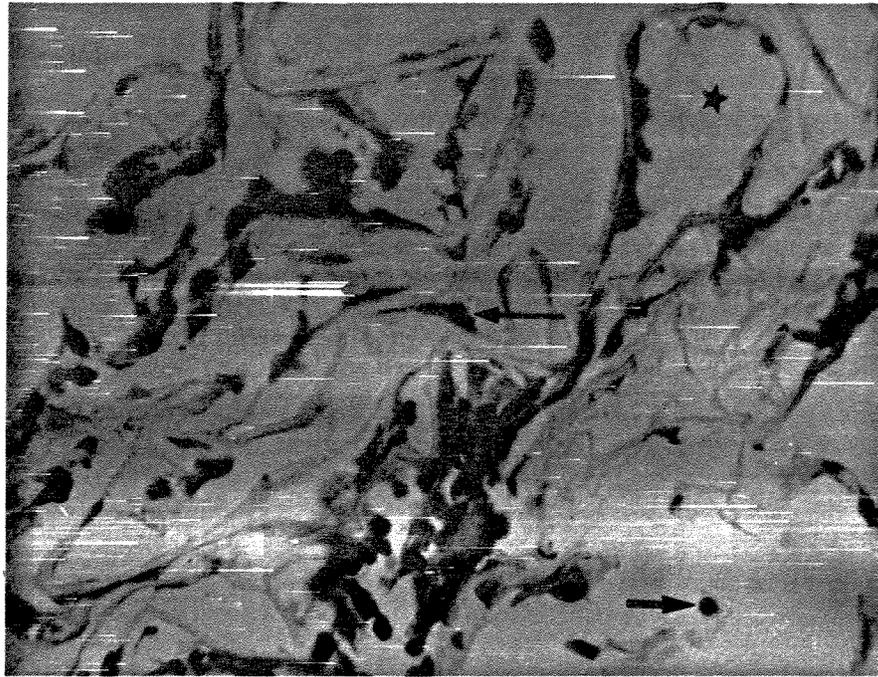
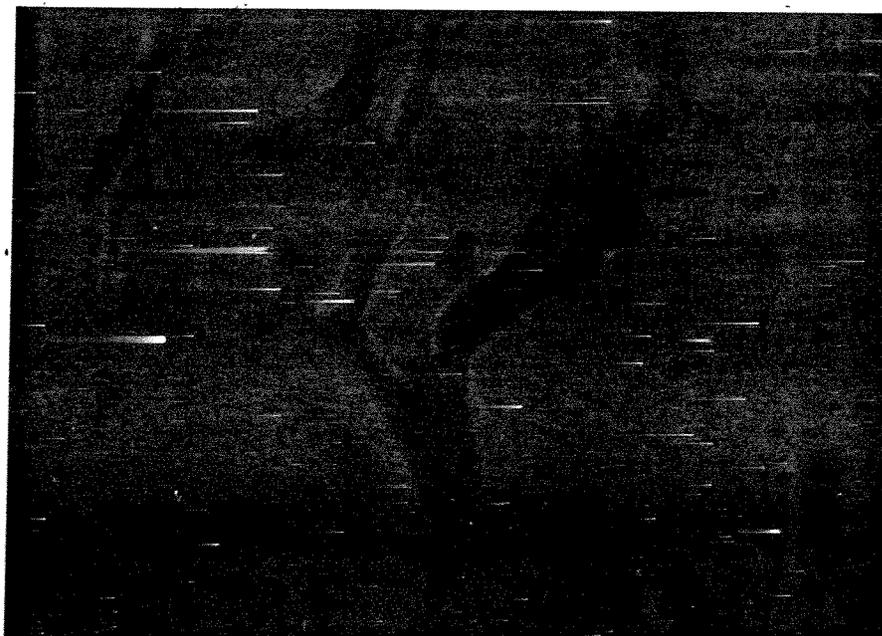
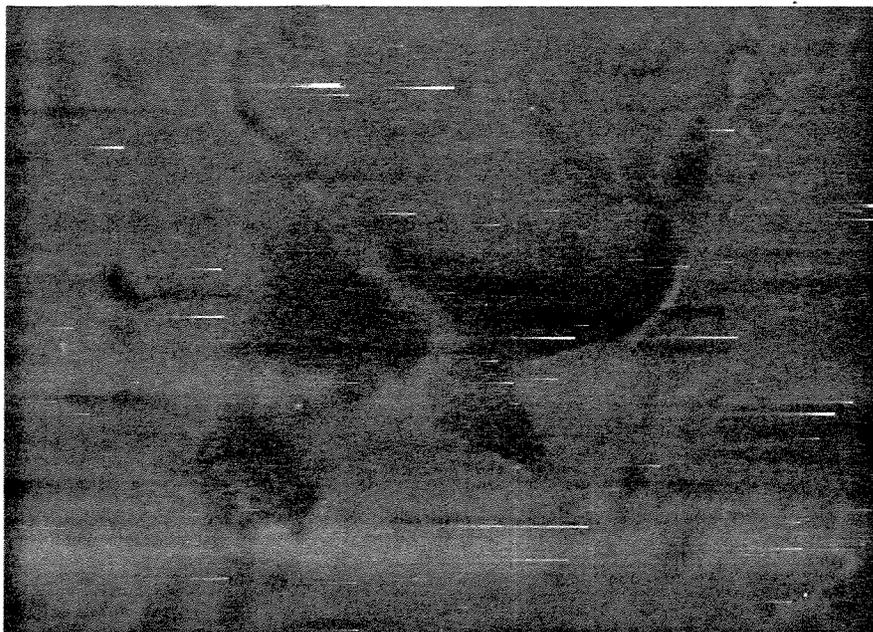


Fig. 30 Colágeno tratado pelo AP. Cultura com 10 dias de incubação. As células (→) que cresceram sobre este substrato apresentam uma leve ortocromasia do núcleo e nucléolo basófilo evidente (▶). Coloração: Azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 1160 X.

Fig. 31: Idem figura 30, núcleo heterocromático (→) citoplasma basófilo (→). Aumento: 1160 X.



3.2.2 4- Cultura com 15 dias de incubação

Muitas das cavidades do colágeno não tratado foram preenchidas totalmente pelas células, havendo em alguns casos degeneração celular no centro das mesmas (figura 32). As células que cresceram sobre o substrato tratado com GL apresentaram aspecto semelhante ao da cultura inicial do colágeno controle, ou seja, presença de células alongadas e arredondadas, algumas com morfologia semelhante a fibroblastos (figuras 33-35). As células cultivadas sobre o colágeno tratado com AP aparentemente não apresentaram alterações com relação ao período anterior. O aspecto morfológico geral das células neste tempo, foi na maioria arredondado, havendo o preenchimento total das cavidades (figuras 36 e 37).

Quando coradas com AT, as células que cresceram sobre o colágeno não tratado mantiveram as características já descritas. As regiões com material extracelular metacromático depositado se mostraram aumentadas neste período, principalmente nos prolongamentos citoplasmáticos que se estendiam sobre as fibras do feltro de colágeno (figura 38). As células cultivadas sobre os substratos tratados com GL e AP apresentaram-se semelhantes àquelas com 10 dias, sendo mais acentuada a ortocromasia do núcleo e a metacromasia do citoplasma (figuras 39 e 40).

Fig. 32: Colágeno sem tratamento. Cultura com 15 dias de incubação. Observa-se nesta figura uma vista geral do fragmento de colágeno com início de preenchimento de cavidades (★), preenchimento total (●) e degeneração celular em outras já preenchidas (*). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 90X

Fig. 33: Colágeno tratado pelo GL. Cultura de 15 dias. Heterogeneidade da forma celular, células arredondadas (▶) e células com morfologia tipo fibroblasto(←→). Material corado pela Hematoxilina-Eosina. Aumento: 1160 X.

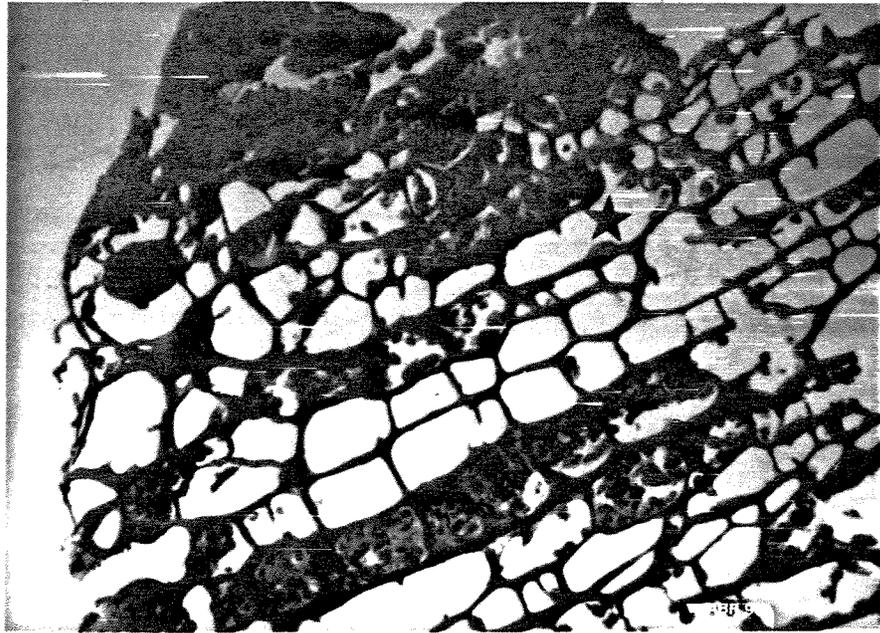


Fig. 34. Colágeno tratado pelo GL. Cultura com 15 dias de incubação. Presença de células alongadas (←→). Material corado pela Hematoxilina-Eosina. Aumento: 1160 X

Fig. 35. Colágeno tratado pelo GL. Cultura com 15 dias de incubação. Células aderidas as fibras de colágeno (▶). Material corado pela Hematoxilina-Eosina. Aumento: 1160 X.



Fig. 36. Colágeno tratado pelo AP. Cultura com 15 dias de incubação. Preenchimento de cavidades na maioria com células arredondadas (→). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 460 X.

Fig. 37. Colágeno tratado pelo AP. Cultura com 15 dias de incubação. Preenchimento de cavidades com células arredondadas (→). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 460 X.

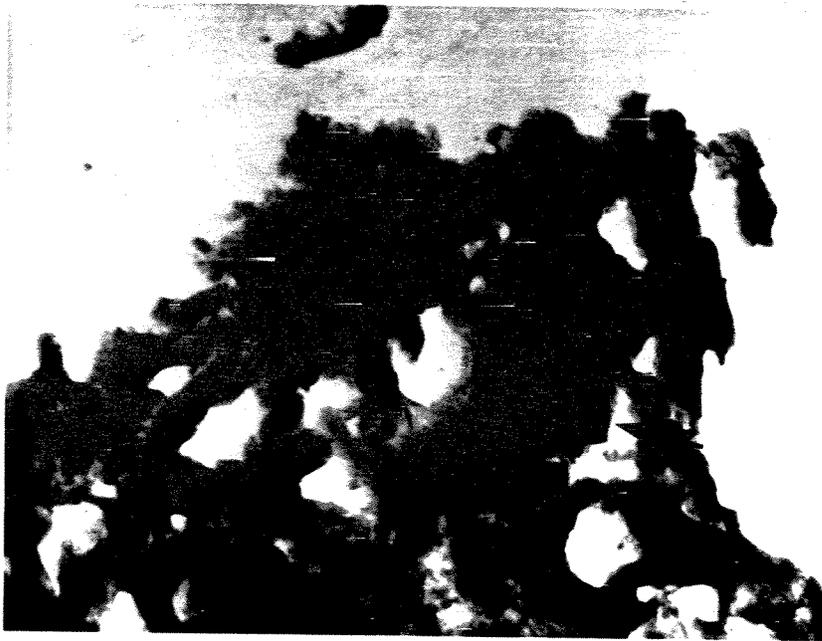
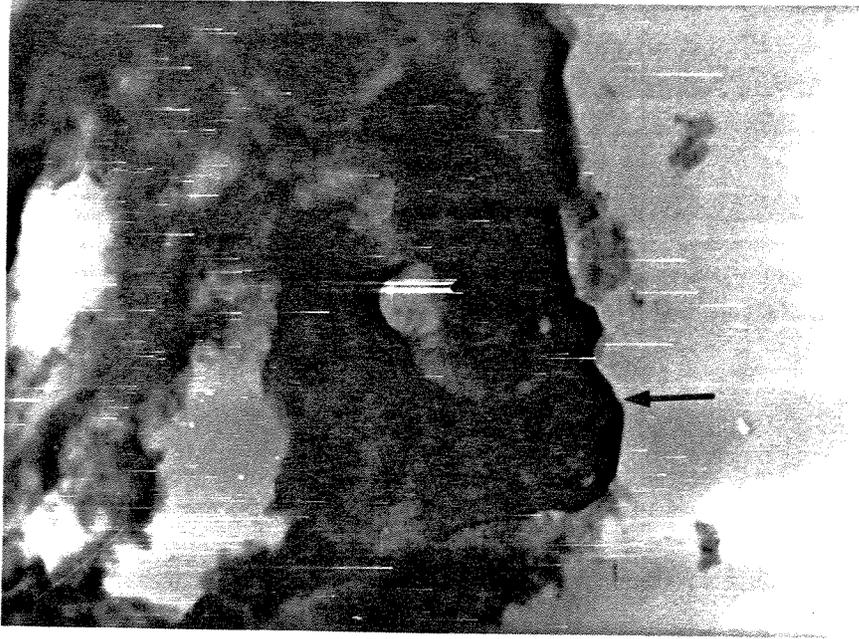


Fig. 38: Colágeno sem tratamento. Cultura de 15 dias. Nota-se a presença de células alongadas (←→) e arredondadas (→), e a deposição de material metacromático (▶). Material corado pelo Azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 460 X.

Fig. 39: Colágeno tratado pelo Gl. Cultura com 15 dias de incubação. Células apresentando citoplasma levemente metacromático (*), núcleo (▶) e nucléolo basófilo evidente (←→). Material corado pelo Azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 1160 X.



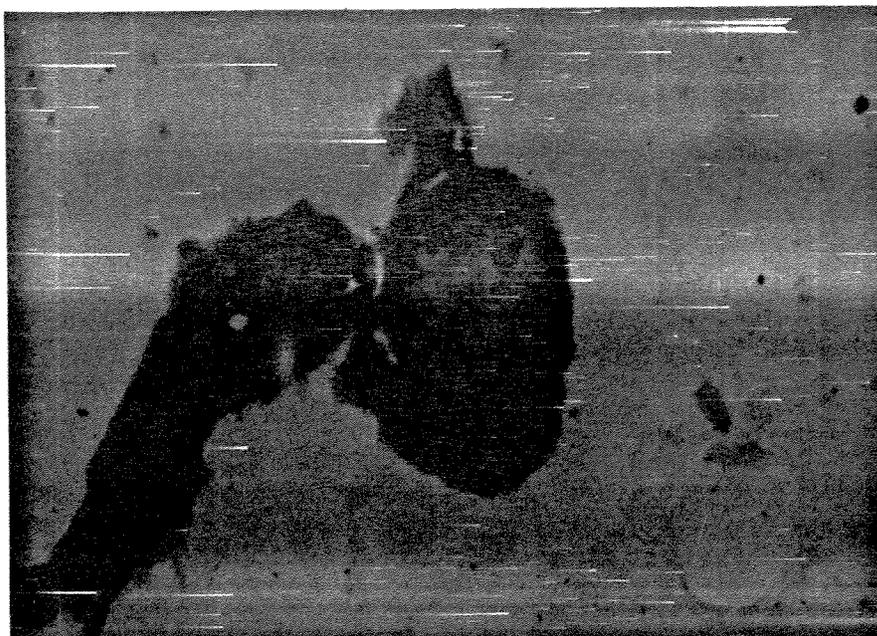


Fig. 40: Colágeno tratado pelo AP. Cultura de 15 dias. Observando células com nucleo ortocromático e nucléolo basófilo evidente (►). Material corado pelo Azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 460 X.

Para facilidade de compreensão é apresentado um resumo dos resultados obtidos em todos os métodos de coloração utilizados para os diversos materiais e tempos empregados (tabela I).

A variação do número de células de acordo com os diferentes tipos de substrato e tempos de cultivo está expressa no histograma da figura 41. Com relação ao colágeno sem tratamento, nota-se um aumento progressivo de número até o décimo dia de incubação e uma redução do mesmo no período seguinte.

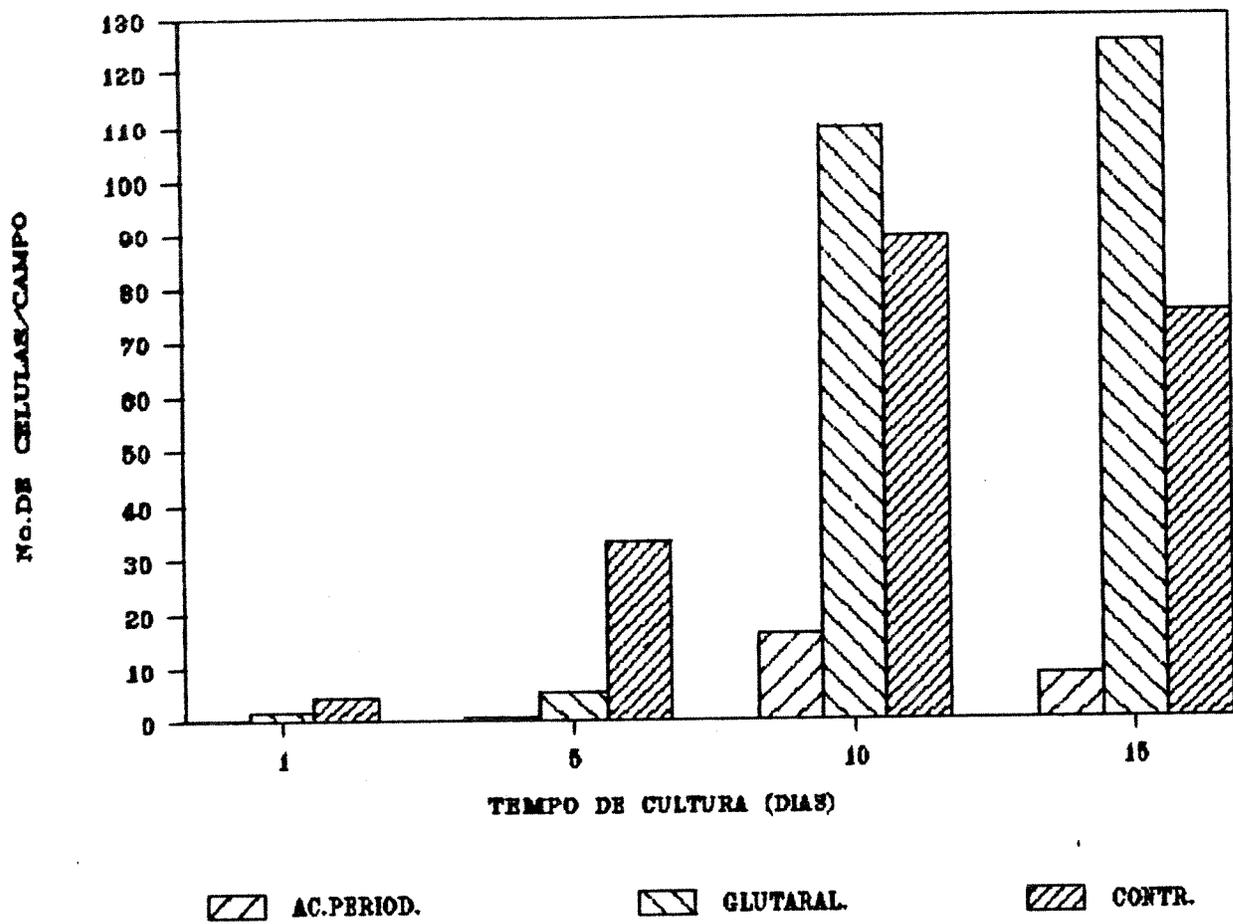
No material cultivado em colágeno pré-tratado com glutaraldeído o aumento do número de células até o quinto dia é inferior ao controle, ultrapassando o mesmo a partir do décimo dia de cultura. Embora no colágeno tratado com ácido periódico o número de células também tenha aumentado progressivamente até o décimo dia, diminuindo novamente após esse período, as contagens obtidas foram acentuadamente inferiores às encontradas no colágeno sem tratamento e no pré-tratado com glutaraldeído.

TABELA 1: RESUMO GERAL DOS RESULTADOS OBTIDOS:

	COLÁGENO NÃO TRATADO				COLÁGENO TRATADO C/ GLUTARALD.				COLÁGENO TRATADO C/ AC. PERIÓDICO			
	1 DIA	5 DIAS	10 DIAS	15 DIAS	1 DIA	5 DIAS	10 DIAS	15 DIAS	1 DIA	5 DIAS	10 DIAS	15 DIAS
FORMA DA CELULA	arred.	fibrob.	fibrob.	fibrob.	arred.	arred.	fibrob.	fibrob.	arred.	arred.	arred.	arred.
NUCLEO BASÓFILO (AT)	-	-	-	+	+++	+++	-	-	+++	++	-	-
NUCLEO ORTOCROMÁTICO (AT)	+++	+++	+++	-	-	++	++	-	-	++	++	++
NUCLEOLO EVIDENTE (AT)	+++	+++	+	+	++	+	+	+	+	+	++	++
CITOPLASMA BASÓFILO (AT)	+++	+++	-	-	+++	+++	-	-	+++	+++	+	+
CITOPLASMA METACROMÁTICO (AT)	-	-	+++	+++	-	-	++	+++	-	-	-	-
DEPOSIÇÃO EXTRACELULAR DE MATERIAL METACROMÁTICO (AT)	-	-	++	+++	-	-	++	++	-	-	-	-

Obs. Abreviaturas utilizadas: arred. = arredondado; fibrob. = fibroblástica. Sinais utilizados: +++ = coloração mais intensa; ++ = coloração intermediária; + = coloração menos intensa; - = ausência de coloração.

FIGURA 41



4- DISCUSSÃO

As células VERO que cresceram sobre o feltro de colágeno sem tratamento apresentaram adesão e proliferação esperadas preenchendo as cavidades formadas pelas fibras de colágeno ao longo do cultivo.

Células VERO crescendo sobre lamínulas de vidro apresentam uma forma poligonal e crescem em monocamada. Porém quando cultivadas no feltro de colágeno mostraram-se alongadas, indicando adesão às fibras, e características morfológicas de um fibroblasto.

As alterações celulares morfológicas estão geralmente associadas ao controle do crescimento e a expressão dos genótipos celulares. Isto pôde ser demonstrado em cultura, com diversos tipos celulares tais como células epiteliais mamárias (EMERMAN & PITELKA, 1977; EMERMAN et alii, 1977; HAEUPTLE et alii, 1983; LEE et alii, 1984; ROCHA et alii, 1985; DURBAN et alii, 1985; HAMAMOTO et alii, 1988), condrócitos (FRIDMAN et alii, 1985) e células nervosas (SANDERS et alii, 1988; BILOZUR & HAY, 1988; ISHIMURA et alii, 1989; SIMONSON et alii, 1989).

Muitos destes trabalhos citados anteriormente evidenciam a ação do colágeno sobre o processo de diferenciação e a manutenção do estado diferenciado de vários tipos celulares.

A partir dos resultados pode-se observar que este tipo de filtro de colágeno microcristalino sem tratamento induz modificações no complexo DNA-proteína do núcleo das células VERO. Estas modificações podem ser evidenciadas pela coloração verde pálida observada nos núcleos, resultante do número menor de radicais fosfatos do DNA disponíveis para a ligação com as moléculas do corante (fig. 38). Alterações desse tipo no complexo DNA-proteínas detectáveis por coloração com AT também foram evidenciados em cromossomos politênicos de Rhynchosciara americana (VIDAL, 1975; MELLO & VIDAL, 1979) em heterocromatina de Triatoma infestans (MELLO, 1980) e em espermatozoides de touro (MELLO, 1982).

Como foi visto anteriormente as células VERO se desenvolvem normalmente sobre o colágeno sem tratamento. Com o progredir da cultura e o maior preenchimento celular das cavidades, por volta do décimo dia iniciava-se um processo de degeneração celular principalmente na parte central dessas cavidades preenchidas, degeneração esta que pode ter sido provocada pela falta de nutrientes no centro destes aglomerados celulares. As células, através de suas funções, têm a capacidade de trocar metabólitos via canais fisiológicos presentes nas membranas (LOEWENSTEIN, 1981). Como o número de células nestes aglomerados é grande provavelmente a simples difusão dos elementos necessários para a nutrição celular adequada na parte central dos aglomerados, torna-se insuficiente levando a perda de ati-

vidades essenciais e iniciando, desta forma, o processo de degeneração celular. Isto parece ser verdadeiro visto que os resultados obtidos com o uso de implantes de colágeno "in vivo", mostram a partir do décimo dia do implante, grande número de células e presença de vasos sanguíneos neoformados que garantem a nutrição celular adequada, o que não poderia ocorrer "in vitro" com a técnica empregada neste trabalho (OLIVER et alii, 1980; McPHERSON et alii, 1986b; CHVAPIL et alii, 1987; DALTRO, 1987).

Observou-se durante o cultivo que os fragmentos de colágeno não tratados, na presença de células, sofriam uma diminuição de tamanho, chegando ao décimo quinto dia de incubação com tamanho inferior ao inicial.

Esta diminuição do tamanho dos fragmentos "in vitro" pode estar associada à produção de colagenase pelas células ou à contração do substrato induzida pelas próprias células. A produção de colagenases por células cultivadas "in vitro" é um fato conhecido tendo sido constatada também em fibroblastos (AGGELER et alii, 1984).

O processo de contração do colágeno utilizado como substrato para o crescimento das células "in vitro" foi muito estudado em fibroblasto e em células mamárias (ALLEN & SCHOR, 1983; MAUCH et alii, 1988; NISHIDA et alii, 1988; HAEUPTLE et alii, 1983; LEE et alii, 1984). Estes trabalhos descrevem que esta contração é necessária para que a célula adquira a morfologia semelhante à que apresenta "in vivo", favorecendo atividades fisiológicas

normais como a produção de proteínas colagênicas e não colagênicas por fibroblastos e a produção de algumas proteínas do leite pelas células mamárias.

Assim, podemos concluir que as células VERO cultivadas em feltro de colágeno microcristalino sem nenhum tratamento apresentaram diferenciação quando comparadas às células que cresceram sobre lamínula, em frasco sem colágeno. Este processo de diferenciação celular pôde ser caracterizado pela forma fibroblástica apresentada pelas células e pela deposição de matriz extracelular corada metacromaticamente com o Azul de toluidina.

As células VERO semeadas em feltro de colágeno tratado com glutaraldeído, não aderiram a este substrato nas primeiras 24 horas de incubação, ocorrendo início de adesão apenas a partir do quinto dia. A inibição da adesão celular em substratos tratados com glutaraldeído já foi demonstrada por FRIDMAN et alii (1985) em células de carcinoma de colo e células de Sarcoma de Ewing. Estes autores demonstraram também que esta alteração da adesão não pode ser generalizada para qualquer tipo celular uma vez que células derivadas de endotélio vascular aderem normalmente a este tipo de substrato, embora sofram posteriormente uma inibição da proliferação celular.

Os fragmentos de feltro de colágeno tratados com glutaraldeído além de apresentarem uma redução no tamanho e um endurecimento, apresentavam uma preservação melhor até o décimo quinto dia de incubação.

HARRIS & FARREL (1972), demonstraram que as fibras de colágeno adquirem resistência à ação de colagenases depois de tratadas com formaldeído, quando utilizaram "in vivo" enxertos de pele. Geralmente, o enxerto inicia uma resposta imune que pode ativar a produção de colagenases, levando à destruição de grande parte do mesmo. Se o material constituído por colágeno for tratado antes da implantação com glutaraldeído seu período de preservação fica aumentado, pois este agente tem como propriedade característica aumentar as ligações cruzadas na molécula de colágeno conferindo-lhe maior resistência (BARKER et alii, 1980; OLIVER et alii, 1980; SPEER et alii, 1980; McPHERSON et alii, 1986a e b; CHVAPIL et alii, 1987; NIMNI et alii, 1987). É em razão da aquisição desta resistência à biodegradação enzimática, que o colágeno tratado com glutaraldeído tem sido empregado na área médica como prótese.

Embora a utilização de tratamento com glutaraldeído aumente a preservação dos implantes, muitos trabalhos "in vivo" descrevem que a sua utilização produz também efeitos altamente citotóxicos, decorrentes do glutaraldeído residual que é liberado após o implante (OLIVER et alii, 1980; McPHERSON et alii, 1986a e b).

SPEER e colaboradores (1980) observaram dados semelhantes "in vitro" quando trabalharam com fibroblastos humanos 3T3, crescendo sobre esponja de colágeno tratado com glutaraldeído. A concentração de glutaraldeído liberado após o tratamento teve efeito citotóxico muito alto,

inibindo o crescimento destas células. Verificaram também que a variação de pH, temperatura, exposição à luz e proporção molar dos reagentes, são importantes na polimerização do glutaraldeído a ser utilizado no tratamento do colágeno, condições estas também observadas por outros autores (CHUAPIL et alii, 1977 e 1987).

O glutaraldeído a 0,1% não mostrou ser citotóxico para as células "in vitro" no presente trabalho pois as culturas, apesar de uma certa demora na adesão e achatamento celulares, tiveram um desenvolvimento considerado normal. A ausência de toxicidade pôde ser comprovada também pela análise das células presentes nas lamínulas recolhidas deste tubo. Apesar destas estarem presentes em número pequeno, a sua morfologia era idêntica à apresentada pelas células que foram cultivadas em lamínula e na ausência de colágeno. Uma das explicações para a ausência de efeito citotóxico, decorre da utilização, neste trabalho de colágeno lavado várias vezes com água bidestilada estéril e por 48 horas em meio de cultivo para que todo o excesso de glutaraldeído fosse retirado, antes desse substrato receber o inóculo celular. Desta forma o único glutaraldeído presente no material era o que estava envolvido nas ligações cruzadas entre as fibras de colágeno.

Como já foi discutido anteriormente substratos a base de colágeno induzem alterações morfológicas associadas à variação na fisiologia celular.

A partir do décimo dia de incubação pôde-se constatar este fato através da deposição de material metacromático produzido pelas células sobre as fibras de colágeno, nas preparações coradas com Azul de toluidina (AT) pH 4,0 (fig. 28).

Um aumento na disponibilidade de radicais aniônicos convenientemente próximos possibilita, a nível celular, a interação entre as moléculas planares do AT. Isso faz com que a energia necessária para a excitação dos elétrons pertencentes aos grupos cromofóricos dessas moléculas seja maior, diminuindo assim, o pico de absorção de 625 nm para comprimentos de onda menores, que podem atingir 550 nm ou menos. Este fenômeno denominado de metacromasia é comum a inúmeros corantes básicos e pode revelar, mesmo sem a utilização de medidas absorciométricas, um aumento na disponibilidade de radicais aniônicos em diferentes estágios fisiológicos de um mesmo tecido, ou de tecidos diferentes, pela simples visualização da cor obtida, que em função destas alterações passa de verde (basicamente monômeros de AT) para azul, azul-arroxeadado e róseo (empilhamento de moléculas de azul de toluidina) (VIDAL, 1987).

Quando cultivadas sobre colágeno tratado com glutaraldeído a metacromasia celular foi aqui observada mais tardiamente em relação aos controles, e o aparecimento de matriz extracelular coincidiu com o espalhamento das células sobre as fibras de colágeno. O que parece ocorrer

é que as células a partir de um certo período de cultivo adquirem a capacidade de sintetizar sua própria matriz extracelular, neutralizando desta forma as alterações do colágeno provocadas pelo glutaraldeído e permitindo assim o espalhamento celular. A partir dessa alteração na sua forma a célula modifica então seu padrão de síntese, produzindo matriz extracelular que fica depositada nas fibras, fato este que foi melhor observado a partir do décimo quinto dia de incubação, quando a deposição de material metacromático era maior.

De acordo com o histograma (figura 41) apresentado pode-se observar que o número de células que cresceram sobre o material tratado com glutaraldeído aumentou em relação ao controle a partir do décimo dia de incubação. Como já foi discutido anteriormente a capacidade do glutaraldeído de aumentar as ligações cruzadas da molécula de colágeno confere a este feltro maior integridade até o final da incubação, o que não ocorre com o colágeno sem tratamento. Desta maneira as células teriam também, no colágeno tratado pelo glutaraldeído mais substrato disponível para adesão e conseqüentemente proliferação do que no colágeno controle.

FRIDMAN et alii (1985) estudando a influência das porções glicosídicas da matriz extracelular na adesão, achatamento e diferenciação morfológica, verificaram que tipos celulares diferentes reagem de maneira diversa às alterações das porções glicosídicas decorrentes da oxida-

ção do substrato. Estes estudos foram feitos utilizando como substrato matriz extracelular produzida pelas células endoteliais da córnea e componentes isolados da matriz, como laminina e fibronectina, submetidos à oxidação com periodato. Estes autores verificaram, no decorrer do experimento, que células de carcinoma de colo não aderiam ao substrato a base de matriz extracelular tratada com periodato nem à laminina oxidada pelo ácido periódico. No entanto, a adesão e o espalhamento das células de sarcoma de Ewing no substrato não era influenciada por esse tratamento.

Embora, neste trabalho tenha sido muito pequeno o número de células VERO que aderiram e se espalharam inicialmente sobre as fibras do colágeno tratado pelo ácido periódico as que o fizeram expressaram sua atividade proliferativa, que pode ser constatada a partir do histograma (fig. 41).

A ausência de adesão de grande parte das células às fibras não deve ser atribuída a uma ação tóxica do ácido periódico pois as células que não aderiram ao colágeno tratado e que portanto caíram e aderiram à laminula presente no tubo apresentavam um aspecto semelhante ao das células cultivadas nas laminulas do tubo sem colágeno (figs 2c e 1a).

Além disso, até o décimo dia de cultivo a presença de células arredondadas era maior, sugerindo que as células VERO constituem um tipo celular, cuja capacidade

de adesão é alterada quando o substrato de colágeno tem suas porções glicosídicas comprometidas, ou seja, quando os resíduos de açúcar se abrem formando aldeídos. Assim, a diminuição na capacidade de adesão poderia desta maneira atrasar o desenvolvimento normal dessas culturas ou mesmo diminuir a proliferação celular esperada resultando nos dados aqui apresentados que mostram um número menor de células para este substrato quando comparado ao número de células presentes nos outros dois substratos, o tratado com glutaraldeído e o sem tratamento.

FRIDMAN et alii (1985) observaram além disso que oligodendrócitos cultivados sobre matriz extracelular, sofrem um processo de diferenciação morfológica, que também é inibido quando a matriz extracelular é tratada com periodato. Estes autores demonstraram assim que a adesão, o achatamento e a diferenciação morfológica, são processos celulares afetados pela oxidação do substrato.

Considerando o que foi dito anteriormente, o fato das células VERO em substrato tratado com ácido periódico, não terem apresentado alterações morfológicas características de diferenciação em qualquer momento de cultivo, nem terem produzido matriz extracelular, na forma de material metacromático depositado sobre as fibras de colágeno, parece ser indicativo da falta de diferenciação dessas células ao contrário do que foi observado nas culturas com colágeno controle e tratado com glutaraldeído.

Quando o feltro de colágeno microcristalino foi tratado com ácido periódico, observou-se que ele tendia a se desfazer durante o cultivo das células. Isto pode ser explicado uma vez que o ácido periódico como oxidante atua sobre as porções glicosídicas desta macromolécula (FRIDMAN et alii, 1985) que são importantes para manter a agregação ordenada das fibras do colágeno (VIDAL, 1986).

Foi demonstrado também que os resíduos de carboidrato das cadeias laterais da molécula de colágeno tem importante papel na adesão e na agregação plaquetária (CHESNEY et alii, 1972; PUETT et alii, 1973; SANTORO & CURNINGHAN, 1977; LEGRAND et alii, 1983).

BRASS & BENSUSAN (1976) demonstraram que com a oxidação do colágeno com periodato a capacidade de interação com as plaquetas é reduzida, sendo também comprometida a reação de liberação dos conteúdos plaquetários, indicando assim a importância dos resíduos de açúcar na ligação plaqueta-colágeno, e conseqüentemente no processo de agregação das mesmas.

Assim como a adesão de células VERU ao colágeno é alterado pelo tratamento do substrato com o ácido periódico da mesma forma com que ocorre nas plaquetas, provavelmente estes resíduos de açúcar tenham importante função no reconhecimento celular pelos receptores de superfície.

O reconhecimento, para a adesão às fibras de colágeno pelas células, é feito através de receptores pre-

sentas na superfície celular. Após o reconhecimento estes receptores transmitem sinais para o interior das células, sendo estes sinais efetuados através de duas vias. Uma das vias é a que estabelece interações fisiológicas entre as funções biomecânicas e os elementos celulares. Este mecanismo transductor depende da própria estrutura das fibras de colágeno e provavelmente seria o responsável pela liberação de sinais ao nível celular. Para que ocorra o reconhecimento célula-fibra, é necessário que as fibras tenham uma organização ordenada. Ocorrendo este reconhecimento das células pelas fibras seguem-se os fenômenos adesivos, e posteriormente, a diferenciação celular (VIDAL, 1989).

A expressão gênica de uma célula pode ser influenciada pelo tipo de substrato utilizado para o seu cultivo e pode ser alterada se este substrato for submetido a alguma ação química. Verificou-se neste trabalho que o feltro de colágeno microcristalino sem qualquer tratamento induziu diferenciação morfológica sobre células VERO. Este processo de diferenciação ocorreu também quando este feltro foi tratado com glutaraldeído, mas não quando o tratamento foi efetuado com ácido periódico.

Uma vez que, a expressão fenotípica, de uma célula é diretamente influenciada pelo tipo de substrato ao qual ela está aderida, pode-se concluir que é extremamente importante definir os objetivos para o emprego do colágeno tanto "in vitro" quanto "in vivo", preparando assim, o substrato de maneira adequada, obtendo desta forma

melhor crescimento e/ou diferenciação celular ou maior durabilidade do substrato. Da mesma forma que é importante a definição dos objetivos, a qualidade do substrato deve ser sempre mantida.

Desta maneira, o fato de várias partidas de feltros de colágeno terem sido testadas e apenas algumas apresentarem capacidade de induzir crescimento e diferenciação celular evidenciou que a preparação dos mesmos não obedeceu critérios semelhantes. Os feltros de colágeno utilizados neste trabalho estavam em fase de teste para a produção por uma indústria nacional.

De acordo com informações do Dr. Vidal, o qual forneceu a metodologia para a extração do colágeno e preparo do feltro para a indústria, o problema poderia estar na purificação das fibras de colágeno. Nos processos de extração do colágeno a partir de tendão bovino, a porção telopeptídica do tropocolágeno é removida por ação enzimática e em seguida a sua reagregação é efetuada. A desagregação dos feltros pode ter ocorrido pela não remoção das enzimas proteolíticas usadas na digestão da porção telopeptídica ou devido as más condições de reagregação das fibras efetuada após a extração.

O fato das várias partidas de feltros microcristalino testadas apresentarem grande variabilidade quanto ao seu aspecto e comportamento em um meio de cultura indica que a firma em questão não estava efetuando o controle de qualidade adequado ao produto, tornando-o portanto, inviável à comercialização.

5- CONCLUSÕES

Com os dados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

1) Algumas partidas do feltro de colágeno microcristalino foram inviáveis para a cultura de células, sugerindo que a produção deste material não foi efetuada de maneira correta, comprometendo, assim, a boa qualidade do produto e impedindo o seu emprego nestas condições, pela Clínica Médica.

2) O feltro de colágeno sem tratamento induziu alterações morfológicas nas células VERO.

3) As células que crescem no feltro de colágeno sem tratamento adquirem a capacidade de produzir a sua própria matriz extracelular, o que pode ser evidenciado pela metacromasia apresentada quando o material foi corado com Azul de toluidina pH 4,0.

4) O tratamento do feltro de colágeno com glutaraldeído conferiu-lhe maior resistência, preservando-o melhor.

5) A adesão e o espalhamento das células sobre o colágeno tratado com glutaraldeído foram mais demorados quando comparados ao controle.

6) Os fragmentos de feltro de colágeno tratados com ácido periódico sofreram retração maior em relação ao controle e aos tratados com glutaraldeído, não ficaram tão íntegros até o final do tempo de incubação. Isto confirmou as afirmações de que os resíduos de carboidrato são importantes para a agregação das fibras de colágeno.

7) O feltro de colágeno tratado pelo ácido periódico induz alterações, na morfologia, na adesão e espalhamento celulares, no entanto a capacidade proliferativa não é aparentemente afetada.

8) O melhor substrato para crescimento celular por tempo de incubação maior que quinze dias pode-se utilizar o colágeno tratado pelo glutaraldeído. A sua melhor preservação também foi demonstrado por muitos trabalhos "in vivo".

6- RESUMO

Muitos trabalhos têm sido feitos empregando substratos a base de colágeno para vários tipos celulares. É bem conhecida a ação indutora na diferenciação celular desta macromolécula. Neste trabalho utilizamos um feltro tridimensional de colágeno microcristalino fornecido pelo Dr. B.C. Vidal (Departamento de Biologia Celular - Unicamp), como substrato para a adesão e crescimento de células VERO, uma linhagem celular estabelecida partir de células renais de macaco. Este colágeno utilizado como substrato foi dividido em três grupos sendo um submetido ao tratamento com glutaraldeído, outro tratado com ácido periódico, e o terceiro permaneceu sem tratamento. As amostras foram retiradas com 1, 5, 10 e 15 dias de cultivo. Com os resultados obtidos pudemos concluir que este feltro de colágeno sem tratamento e com tratamento induzem um processo de diferenciação que se caracteriza por alterações na forma e no tamanho das células e por alterações no complexo DNA- proteínas, visualizadas através da coloração com Azul de toluidina. Como foi demonstrado por muitos trabalhos, o glutaraldeído tem a capacidade de aumentar as ligações cruzadas na molécula de colágeno. Devido a esta característica os fragmentos de colágeno tratados com glutaraldeído são melhor preservados, tornando-se mais re-

sistentes à ação enzimática. O ácido periódico age sobre as porções glicosídicas da molécula de colágeno. As células que crescem sobre este substrato têm sua capacidade de adesão e de espalhamento alteradas indicando que os carboidratos das cadeias laterais da molécula de colágeno exercem influências no processo de adesão e espalhamento das células VERO sendo proliferação celular parcialmente alterada.

7- SUMMARY

Collagen based substrate have been employed in many works. The induction action in the cell differentiation of this macromolecule is well known. Tridimensional microcrystalino collagen sponge provided by Dr. B.C. Vidal. Has been used as substratum for attachment and growth of VERO cells, a cell type derived from monkey kidney cells. The collagen used as substratum has been divided in 3 groups: one under glutaraldehyde treatment, the second under periodate acid treatment, while the third remained non treated. The samples were removed after 1, 5, 10 and 15 days of growth. The results led to the conclusion that both treated and non treated collagen sponge induce a differentiation process distinguished by alterations in shape and size of cells and modifications in the protein-DNA complex, observed by Toluidine blue staining. As widely demonstrated in other works the glutaraldehyde has the ability of increasing the number of cross-linking in the collagen molecule, making possible a better preservation of glutaraldehyde collagen fragments and increased resistance to enzyme activity. The periodate acid acts on glycosidic portion of the collagen molecule the cells that grow on this substratum have attachment and spreading ability altered, indicating that the lateral chains carbohydrates of the collagen molecule exert

influence on the attachment and spreading process of VERO cells, causing a partially altered cell proliferation.

B- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGELER, J; FRISCH, S. & WERB, Z. Changes in cell shape correlate with collagenase gene expression in rabbit synovial fibroblast. *J. Cell Biol.*, 98: 1662-71, 1984.
- ALLEN, T.D. & SCHOR, S.L. The contraction of collagen matrices by dermal fibroblasts. *J. Ultrastruct. Res.* 83: 205-219, 1983.
- BAILEY, J.; ROBINS, S.P. & BALIAN, G. Biological significance of the intermolecular crosslinks of collagen. *Nature*. 251: 105-9, 1974.
- BARKER, H.; OLIVER, R.; GRANTE, R. & STEPHEN, L. Formaldehyde as a pre-treatment for dermal collagen heterografts. *Bioch. biophys. Acta.* 632: 589-597, 1980.
- BILOZUR, M.E. & HAY, E.D. Neural crest migration in 3D extracellular matrix utilizes laminin, fibronectin, or collagen. *Devl. Biol.*, 125: 19-23, 1988.

BORNSTEIN, P. & PIEZ, K.A. The nature of the intramolecular crosslinks in collagen. The separation and characterization of peptides from the crosslink region of skin collagen. *Biochemistry*. 5: 3460-73, 1966.

BRASS, L.F. & BENSUSAN, H.B. On the role of the collagen carbohydrate residues in the platelet. *Biochim. biophys. Acta*. 444: 43-52, 1976.

CHESNEY, C.M.; HARPER, E. & COLMAN, R.W. Critical role of the carbohydrate side chains of collagen in platelet aggregation. *J. Clin. Inv.* 51: 2693-2701, 1972.

CHVAPIL, M.; GIBEAULT, D. & WANG, T.F. Use of chemically purified and cross-linked bovine pericardium as a ligament substitute. *J. Biom. Mat. Res.*, 21: 1383-1393, 1987.

CHVAPIL, M.; KRONENTHAL, R.L. & VAN WINKLE, W.Jr. Medical and surgical applications of collagen. *Int. Rev. Conn. tissue Res.* 6: 1-61, 1973.

DALTRO, D.M. Injeções intradérmicas de colágeno e suas aplicações na Matriz Extracelular. Campinas, 1987. 111p. Tese (Mestrado) Unicamp, Instituto de Biologia.

DURBAN, E.M.; MEDINA, D. & BUTEL, J.S. Comparative analysis of casein synthesis during mammary cell differentiation in collagen and mammary gland development "in vivo". *Devl. Biol.*, 109: 288-298, 1985.

EMERMAN, J.T.; BORWEN, S.J. & PITELKA, D.R. Substrate properties influencing ultrastructural differentiation for mammary epithelial cells in culture. *Tissue & Cell*, 11: 109-19, 1979.

-----; ENAMI, J.; PITELKA, D.R. & NANDI, S. Hormonal effects on intracellular and secreted casein in cultures of mouse mammary epithelial cells on floating collagen membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74: 4466-70, 1977.

----- & PITELKA, D.R. Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. *In vitro*, 13: 316-28, 1977.

FRIDMAN, R.; FUKS, Z.; OVADIA, H. & VLODAVSKY, I.
Differential structural requirements for the induction
of cell attachment, proliferation and differentiation by
the extracellular matrix. *Exp. Cell Res.*, 157:
181-194, 1985.

GREENBERG, J.H.; SEPPA, S.; SEPPA, H. & HEWITT, A.T.
Role of collagen and fibronectin in neural crest cell
adhesion and migration. *Devl. Biol.*, 87: 259-66,
1981.

HAEUPTLE, M.T.; SUARD, Y.L.M.; BOGENMANN, E.; REGGIO, H.;
RACINE, L. & KRAEHENBUHL, J.P. Effect of cell shape
change on the function and differentiation of rabbit
mammary cells in culture. *J. Cell Biol.* 96: 1425-1434,
1983

HAMAMOTO, S.; IMAGAWA, W.; YANG, J. & NANDI, S.
Morphogenesis of mouse mammary epithelial cells growing
within collagen gels: ultrastructural and
immunocytochemical characterization. *Cell Diff.*
22: 191-202, 1988.

HARRIS, E.D. Jr. & FARREL, M.E. Resistance to collagenase:
a characteristic of collagen fibrils cross-linked by
formaldehyde. *Biochem. biophys. Acta.* 278: 133-41,
1972.

HAY, E. Extracellular Matrix *J. Cell Biol.*, 91: 205-223,
1981

ISHIMURA, E.; STERZEI, R.B.; BUDDE, K. & KASHGARIAN, M.
Formation of extracellular matrix by cultured rat
mesangial cells. *Am. J. Path.*, 134(4): 843-854, 1989.

KARST, W. & MERKER, H.J. The differentiation behaviour of
MDCK cells grown on matrix components and in collagen
gels. *Cell Diff.* 22: 211-224, 1988.

LEE, E.Y.; PARRY, G. & BISSEL, M.J. Modulation of
secreted proteins of mouse mammary epithelial cells
by collagenous substrata. *J. Cell Biol.* 98: 146-55,
1984.

LEGRAND, Y.D.; KARNIGUIAN, A.; FAUVEL, F. & GUTMAN, N. The
molecular interaction between platelet and vascular
wall. *Blood Cells* 9: 263-274, 1983.

LINSENMAYER, T.F. Collagen. In: HAY, E.D. *Cell Biology
of Extracellular Matrix*. New York Plenum, 1985.
cap.1, p.5-37

LOEWENSTEIN, W.R. Junctional intercellular
communication: the cell-to-cell membrane channel.
Physiol. Rev., 61(4): 829-913, 1981.

- MAUCH, C.; HATAMUCHI, A.; SCHAARFFETER, K. & KRIEG, T.
Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within
a three-dimensional collagen gel. *Expl. Cell Res.* 178:
493-503, 1988.
- McPHERSON, J.M.; LEDGER, P.W.; SAWAMURI, S.; CONTI, A.;
WADE, S.; REIHANIAN, H. & WALLACE, D.G. The
preparation and physicochemical characterization of an
injectable form of reconstituted, glutaraldehyde cross-
linked, bovine corium collagen. *J. Biom. Mat. Res.*,
20: 79-92, 1986a.
- ; SAWAMURA, S. & ARMSTRONG, R. Examination of the
biologic response to injectable, glutaraldehyde cross-
linked collagen implants. *J. Biom. Mat. Res.*, 20:
93-107, 1986b.
- MELLO, M.L.S. Induced metachromasia in bull spermatozoa.
Histochemistry, 74: 387-92, 1982.
- Toluidine blue binding capacity of
heterochromatin and euchromatin of Triatoma infestans
Klug. *Histochemistry*, 69: 181-7, 1980.
- MELLO, M.L. & VIDAL, B.C. Padrões de basofilia em
cromossomos politênicos de Rhynchosciara americana.
Ciênc. Cult., 31: 604, 1979.

- MILLER, L. The structure of fibril-forming collagens.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 461: 1-13, 1985.
- NIMNI, M.E.; CHEUNG, D.; STRATES, B.; KODAMA, M. & SHIRK, K.
Chemically modified collagen: a natural biomaterial
for tissue replacement. J. Biomed. Mat. Res. 21:
741-771, 1987.
- NISHIDA, T.; UEDA, A.; FUKUDA, M.; MISHIMA, H.; YASUMOTO,
K. & OTORI, T. Interactions of extracellular collagen
and corneal fibroblasts: morphologic and biochemical
changes of rabbit corneal cells cultured in a collagen
matrix. In Vitro Cell & Devl. Biol. 24: 1009-1014,
1988.
- OLIVER, R.F.; GRANT, R.A.; COX, R.W. & COOKE, A. Effect
of aldehyde cross-linking on human derman collagen
implants in the rat. Br. J. exp. Path., 61: 544, 1980.
- PHARRIS, B.B. Collagen as a biomaterial. J. Am. Leath.
Chem. Ass. 75: 474-80, 1980.
- PUETT, D.; WASSERMAN, B.K.; FORD, J.D. & CUNNINGHAM, L.W.
Effects of collagen modification involving the protein
and carbohydrate moieties. J. Clin. Inv. 52:
2693-2506, 1973

RAWN, D. J. Fibrous Proteins. In: RAWN, D.J. Biochemistry 2nd ed. Burlington, North Carolina. Neil Patterson Publishers. 1989 p.84-94.

ROCHA, V.; RINGO, D. L. & READ, D.B. Casein production during differentiation of mammary epithelial cells in collagen gel culture. Exp. Cell Res. 159: 201-210, 1985.

SANDERS, E.J.; PRASAD, S. & CHEUNG, E. Extracellular matrix synthesis is required for the movement of sclerotome and neural crest cell on collagen. J. Ultrastruct. Res., 83: 205-219, 1983.

SANTORO, S.A. & CUNNINGHAM, L.W. Evidence for multivalent interactions of intermediate specificity between collagen and platelets. J. Clin. Invest., 60: 1054-1061, 1977.

SCHOR, S.L. Cell proliferation and migration on collagen substrata in vitro. J. Cell. Sci. 41: 159-175, 1980.

----- & COURT, J. Different mechanisms in the attachment of cells to native and denatured collagen. J. Cell Sci. 38: 267-281, 1979.

SIMONSON, M.S.; CULP, L.A. & DUNN, M.J. Rat Mesagial cell-matrix interactions in culture. *Exp. Cell Res.*, 184: 484-498, 1989.

SPEER, D.P.; CHVAPIL, M.; ESKELSON, C.D. & ULREICH, J. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J. Biom. Mat. Res.* 14: 753-764, 1980.

SPEER, D.P.; CHVAPIL, M.; VOLLS, R.G. & HOLMES, M.D. Enhancement of healing in osteochondral defects by collagen sponge implants. *Clin. Orth. Relat. Res.* 144: 326-35, 1979.

VIDAL, B.C. Interações células-matriz extracelular: uma unidade estrutural e sistemática. *Rev. Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp*, 1: 33-40, 1989.

----- Evaluation of the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles: microphotometric measurements of textural birefringence *Cell. and Molec. Biol.*, 32: 527-535, 1986.

----- Pleochroism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides. *Protoplasma*, 56: 529-36, 1963.

----- Cromossomos politênicos diferenças estruturais
reveladas pela basofilia metacromática. *Ciênc. Cult.*,
27: 54-6, 1975.

----- & MELLO, M.L.S. Macromolecular conformation
of the colon mucus revealed by detection of
anisotropic phenomena. *Ann. Histochem.* 19(2): 151-6,
1974.

VIDAL, Matriz Extracelular. In: VIDAL & MELLO, M.L.S.
Biologia Celular. 2 ed. São Paulo. Atheneu. 1987.
p.273-303.

WADA, M.L.F. Alterações fenotípicas induzidas por matriz
óssea desmineralizada (MOD), em cultura de células de
uma linhagem celular estabelecida. Campinas, 1985.
104p. Tese (Doutorado) Unicamp Instituto de Biologia.

YOUNG, W.C. & HERMAN, I.M. Extracellular Matrix
modulation of endothelial cell shape and motility
following injury in vitro. *J. Cell Sci.* 73: 19-32,
1985.