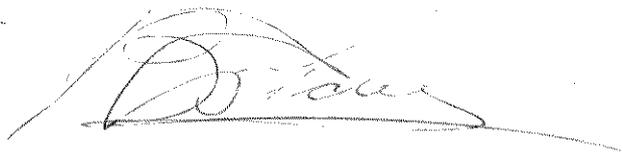


Este exemplar corresponde
à redação final da tese
defendida pelo Dr. João Baptista

Freire de Andrada Filho e aprovada
pelo Conselho Julgador.

Cópia 22/11-1974



CARTILAGEM HIALINA: EXTRACTIBILIDADE E
ESTADO DE AGREGAÇÃO DE SEUS COMPONENTES

João Baptista Freire de Andrada Filho

JOÃO BAPTISTA FREIRE DE ANDRADE FILHO

CARTILAGEM HIALINA: Extractibilidade e
estado de agregação de seus componentes

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da UNICAMP para
obtenção do título de Mestre
em Biologia, na área de Biolo
gia Celular.

Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal
Orientador

CAMPINAS

- 1984 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À SANDRA

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, agradeço não só pelo trabalho de orientação de Programa e Tese, mas pelos valiosos ensinamentos diários, fruto da convivência cordial.

- Aos Profs. Dr. Guilherme Blumen, Dr. Lourenço Bozzo, Dr. Mário Roberto Vizioli e Dra. Mary Anne Heidi Dolder, pela leitura criteriosa dos originais desta tese, e pelas sugestões apresentadas.

- Ao Departamento de Biologia Celular e seu curso de Pós-Graduação, pelos recursos materiais e humanos, essenciais à realização deste trabalho.

- Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular, que prestaram auxílio voluntário para realização deste trabalho, em especial às Sras. Luiza P. Burghi e Maria Aparecida L.P. Biancalana.

- À técnica do Centro de Microscopia Eletrônica, Maria Tereza de Paula, pelos serviços fotográficos, e sobretudo pelo carinho e dedicação.

- Aos meus pais, João e Célia, pelo apoio incondicional e pelos estímulos constantes.

- À Sandra, pela paciência, compreensão e mais que tudo, pela companhia.

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo CNPq.

INDICE

	página
INTRODUÇÃO	1
MATERIAIS E MÉTODOS	12
1. Cortes obtidos por Microtomia de Congelação	12
C1 e C2 - Não tratados	12
C3 e C4 - Digeridos pela hialuronidase testicular ...	13
C5 e C6 - Digeridos pela hialuronidase testicular/co- lagenase bacteriana	13
C7 e C8 - Digeridos pela papaína	13
C9 e C10 - Digeridos pela alfa-amilase bruta	14
2. Cortes obtidos após inclusão em parafina	14
P1 - Não tratados	15
P2 - Tratados pelo $MgCl_2$ 3M	15
P3 - Tratados seqüencialmente pelo $MgCl_2$ 3M e $CaCl_2$ 0,1M	15
P4 - Tratados pelo TCA 3%	15
P5 - Tratados segundo o método de MILLER	15
P6 e P7 - Digeridos pela hialuronidase testicular ...	16
P8 e P9 - Digerido pela colagenase bacteriana	16
P10 e P11 - Digeridos pela hialuronidase testicular/ colagenase bacteriana	16
P12 e P13 - Digeridos pela papaína	17
P14 e P15 - Digeridos pela alfa-amilase bruta	17
3. Citoquímica	17
3.1. Basofilia metacromática	17
3.2. Glicosaminoglicanas sulfatadas	18
3.3. Glicosaminoglicanas ácidas totais	18
3.4. Radicais eletropositivos totais	18
3.5. Radicais Vic-Glicóis	18
4. Microspectrofotometria	18
5. Microscopia de polarização	19
RESULTADOS	20
1. Resultados obtidos em cortes por congelação	22
1.1. Coloração pelo Azul de Toluidina pH 3,4	22
1.1.1. Cortes não tratados	22
1.1.2. Tratamento pela hialuronidase testicular.	30

1.1.3. Tratamento pela mistura hialuronidase/ colagenase	31
1.1.4. Tratamento pela papaína	33
1.1.5. Tratamento pela alfa-amilase bruta	33
1.2. Coloração pelo Azul de Alcian pH 1,0	35
1.2.1. Cortes não tratados	35
1.2.2. Tratamento pela hialuronidase testicular	39
1.2.3. Tratamento pela mistura hialuronidase/ colagenase	42
1.2.4. Tratamento pela papaína	42
1.2.5. Tratamento pela alfa-amilase bruta	43
1.3. Coloração pelo Azul de Alcian pH 2,5	43
1.3.1. Cortes não tratados	43
1.3.2. Tratamento pela hialuronidase testicular	45
1.3.3. Tratamento pela mistura hialuronidase/ colagenase	45
1.3.4. Tratamento pela papaína	46
1.3.5. Tratamento pela alfa-amilase bruta	46
1.4. Coloração pelo Xilidine Ponceau pH 1,7	46
1.4.1. Cortes não tratados	47
1.4.2. Tratamento pela hialuronidase testicular	47
1.4.3. Tratamento pela mistura hialuronidase/ colagenase	51
1.4.4. Tratamento pela papaína	51
1.4.5. Tratamento pela alfa-amilase bruta	52
1.5. Coloração pela técnica de PAS	52
1.5.1. Cortes não tratados	53
1.5.2. Tratamento pela hialuronidase testicular	53
1.5.3. Tratamento pela mistura hialuronidase/ colagenase	55
1.5.4. Tratamento pela papaína	55
1.5.5. Tratamento pela alfa-amilase bruta	56
2. Resultados obtidos após inclusão em parafina	56
2.1. Coloração pelo Azul de Toluidina pH 3,4	57
2.1.1. Cortes não tratados	57
2.1.2. Tratamento por Cloretos	59
2.1.3. Tratamento pelo Ácido Tricloroacético ..	59
2.1.4. Tratamento pelo Método de MILLER	60

	página
2.1.5. Tratamento pela hialuronidase testicular .	60
2.1.6. Tratamento pela colagenase bacteriana	61
2.1.7. Tratamento pela mistura hialuronidase/cola genase	61
2.1.8. Tratamento pela papaína	62
2.1.9. Tratamento pela alfa-amilase bruta	63
2.2. Coloração pelo Azul de Alcian pH 1,0	63
2.2.1. Cortes não tratados	64
2.2.2. Tratamento por Cloretos	64
2.2.3. Tratamento pelo Ácido Tricloroacético	66
2.2.4. Tratamento pelo Método de MILLER	67
2.2.5. Tratamento pela hialuronidase testicular .	67
2.2.6. Tratamento pela colagenase bacteriana	68
2.2.7. Tratamento pela mistura hialuronidase/cola genase	68
2.2.8. Tratamento pela papaína	69
2.2.9. Tratamento pela alfa-amilase bruta	69
2.3. Coloração pelo Azul de Alcian pH 2,5	70
2.3.1. Cortes não tratados	70
2.3.2. Tratamento por cloretos	72
2.3.3. Tratamento pelo Ácido Tricloroacético	72
2.3.4. Tratamento pelo Método de MILLER	73
2.3.5. Tratamento pela hialuronidase testicular .	73
2.3.6. Tratamento pela colagenase bacteriana	74
2.3.7. Tratamento pela mistura hialuronidase/cola genase	74
2.3.8. Tratamento pela papaína	75
2.3.9. Tratamento pela alfa-amilase bruta	75
2.4. Coloração pelo Xilidine Ponceau pH 1,7	76
2.4.1. Cortes não tratados	76
2.4.2. Tratamento por cloretos	78
2.4.3. Tratamento pelo Ácido Tricloroacético	79
2.4.4. Tratamento pelo Método de MILLER	79
2.4.5. Tratamento pela hialuronidase testicular .	80
2.4.6. Tratamento pela colagenase bacteriana	80
2.4.7. Tratamento pela mistura hialuronidase/cola genase	81
2.4.8. Tratamento pela papaína	81
2.4.9. Tratamento pela alfa-amilase bruta	82

	página
2.5. Coloração pela técnica de PAS	82
2.5.1. Cortes não tratados	82
2.5.2. Tratamento por cloretos	84
2.5.3. Tratamento pelo Ácido Tricloroacético ...	85
2.5.4. Tratamento pelo Método de MILLER	85
2.5.5. Tratamento pela hialuronidase testicular	86
2.5.6. Tratamento pela colagenase bacteriana ...	86
2.5.7. Tratamento pela mistura hialuronidase/co- lagenase	87
2.5.8. Tratamento pela papaína	87
2.5.9. Tratamento pela alfa-amilase bruta	88
DISCUSSÃO	89
CONCLUSÕES	109
RESUMO	111
ABSTRACT	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

INTRODUÇÃO

A matriz extracelular da cartilagem hialina apresenta em sua estruturação básica três componentes principais: O colágeno tipo II, as proteoglicanas (PG) e as glicoproteínas não colagênicas. Independentemente da espécie animal considerada, a cartilagem hialina mantém a composição básica acima referida, embora com variações, geralmente associadas às quantidades relativas de seus constituintes.

Os trabalhos de caráter essencialmente bioquímico, existentes na literatura, pesquisaram principalmente a extracutibilidade das macromoléculas da cartilagem, como sendo uma forma de estimar a estabilidade e o estado de agregação das mesmas. Os chamados métodos químicos dissociativos (SAJDERA & HASCALL, 1969) foram largamente utilizados como meio de extração, em especial das PG. Basicamente, tais métodos consistem da extração das PG em solventes contendo concentrações ótimas de vários eletrólitos, especialmente cloretos. As PG são separadas das Glicoproteínas Estruturais (GPEs) e colágeno solúvel, através da sedimentação em gradiente de densidade. Após a separação, a quantidade de PG extraída pode ser determinada, através da quantificação química do hexuronato (ou ácido hexurônico), liberado nas soluções extrativas.

A cartilagem hialina e seus componentes também foram estudados do ponto de vista morfo-fisiológico, sendo que as principais técnicas utilizadas para tal finalidade foram a radioautografia, aplicadas ao nível das microscopias óptica, de polarização e eletrônica (QUINTARELLI & DELLOVO, 1966; MATUKAS et al. 1967; ANDERSON & SAJDERA, 1971; BONNUCCI et al. 1974;

GLANT et al. 1977; VIDAL, 1977, 1983; HASCALL, 1980; SHEPARD & MITCHELL, 1981; POOLE et al. 1982).

A remoção de complexos proteoglicânicos existentes em cartilagens, também pode ser feita por soluções enzimáticas diversas, como a hialuronidase testicular (MATUKAS et al. 1967; RUGGERI et al. 1975; FOLDES et al. 1980; ANDRADE FILHO & VIDAL, 1984), a tripsina (ANDERSON & SAJDERA, 1971; MINNS & STEVEN, 1977) e a papaína (THYBERG et al. 1973; MINNS & STEVEN, 1977). Desde o trabalho de ANDERSON & SAJDERA (1971), é regra geral que os tratamentos enzimáticos são considerados capazes de remover também certas frações de PG, não extraíveis por métodos químicos dissociativos.

Diferentes metodologias foram empregadas para extrair as PG da cartilagem hialina. Sobre as frações extraídas, e caracterizadas bioquimicamente, foram realizadas as análises das propriedades físico-químicas das PG, cujo resultado levou à formação do atual conjunto de conhecimentos acerca das mesmas (para revisão, KLEINE, 1981).

As PG consistem de uma porção protéica denominada "core", constituída basicamente por duas seqüências peptídicas repetitivas (MATHEWS, 1971). A seqüência menor apresenta 10 resíduos de aminoácidos, sendo que tanto na porção amino-terminal, quanto na porção carboxi-terminal da mesma, encontra-se um resíduo de Serina. A seqüência maior apresenta cerca de 35 resíduos de aminoácidos, sendo que, comparativamente, tal seqüência é mais susceptível à ação proteolítica do que a seqüência menor (MATHEWS, 1971).

Ao "core" protéico das PG, em especial aos resíduos de Serina (MATHEWS, 1971), e Treonina (TAKAGI et al. 1982),

ligam-se muitas cadeias glicânicas, genericamente denominadas glicosaminoglicanas ácidas (GAGA). Na cartilagem hialina, tais cadeias são principalmente representadas pelo Condroitin Sulfato (CS) 4 e 6 e pelo Keratan Sulfato (KS). Proporcionalmente, as cadeias glicânicas constituem a maior porção das moléculas de PG, o que confere às mesmas um caráter polianiónico, em virtude do grande número de grupos carboxila e sulfato presentes nas GAGA (HASCALL, 1977; KLEINE, 1981).

As moléculas de PG apresentam três regiões distintas: a) região de ligação com o ácido hialurônico, localizada numa das extremidades da proteína "core"; b) região rica em keratan sulfato (KS), localizada imediatamente após a região de ligação com o ácido hialurônico, e c) região rica em condroitin sulfato (CS), localizada posteriormente à região rica em KS (HASCALL, 1977) (Fig. 01).

A maior parte das PG presentes nas cartilagens hialinas em geral, e especialmente no septo nasal bovino, encontram-se sob a forma de agregados (HASCALL & HEINEGARD, 1974; KLEINE, 1981). Tais agregados são constituídos por 16 a 42 monômeros de PG, ligados a uma única molécula de ácido hialurônico (Ach), formando uma estrutura com peso molecular (PM) da ordem de $6 \text{ a } 7 \times 10^7$ (KLEINE, 1981). Os referidos agregados de PG foram visualizados ao microscópio eletrônico (ROSENBERG et al. 1975; HASCALL, 1980), e foram detectadas duas glicoproteínas (PM $4,9 \text{ e } 4,1 \times 10^4$) fazendo parte de sua estrutura (HASCALL & HEINEGARD, 1974; BAKER & CATERSON, 1979). O papel de ligação dos monômeros de PG ao Ach, desempenhado pelas ditas glicoproteínas, foi revisto por HASCALL (1977).

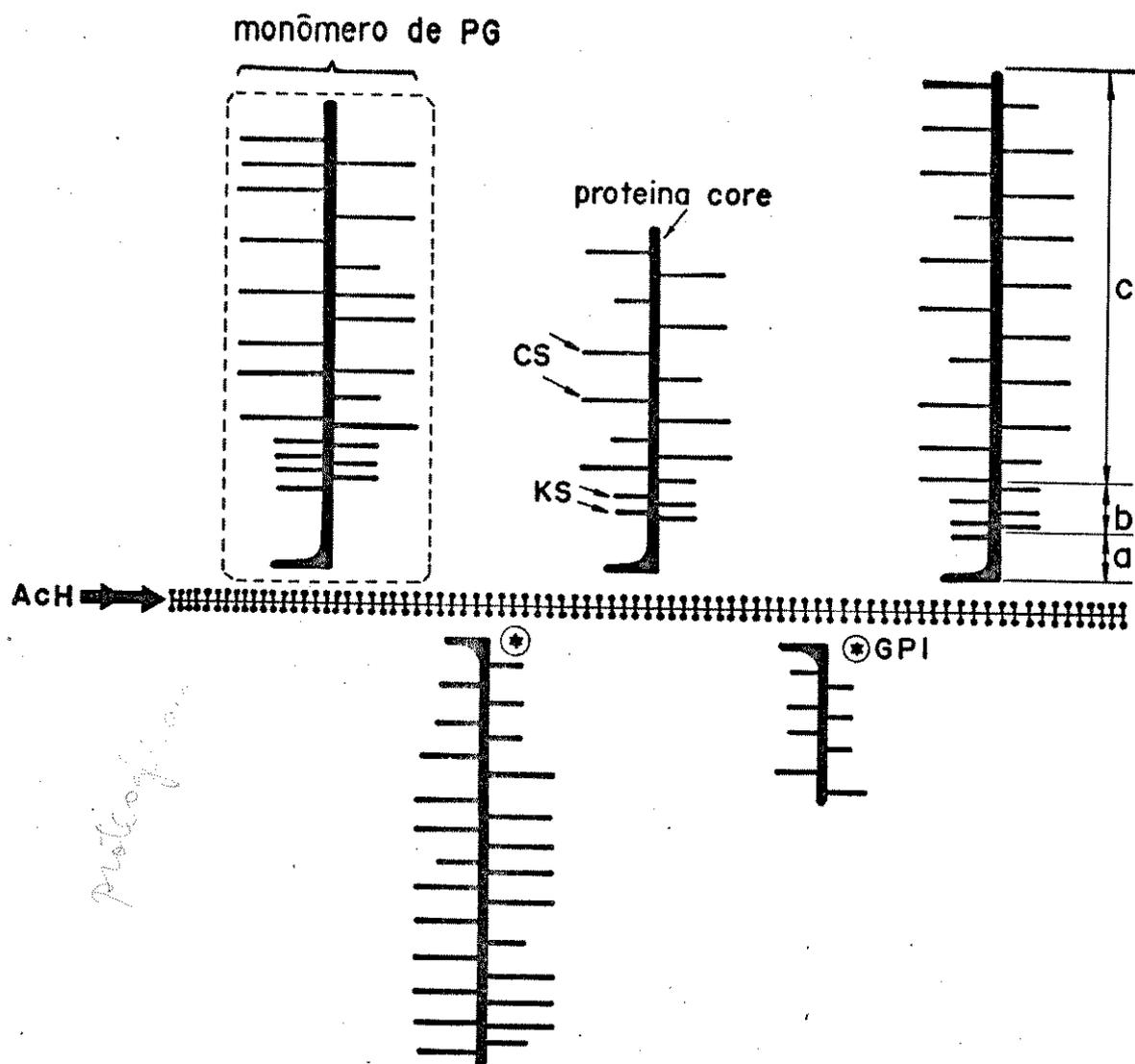


FIGURA 01

Representação esquemática de parte de um agregado de proteoglicanas (PG), onde se observam monômeros de PG ligados ao ácido hialurônico (ACh). Tal ligação é estabilizada pelas glicoproteínas de ligação (GPI). Cada monômero de PG é constituído por uma proteína "core", à qual se associam moléculas de Condroitin Sulfato (CS) e Keratan Sulfato (KS), sendo que tais monômeros apresentam 3 regiões distintas: a região de ligação com o ACh (a), a região rica em KS (b) e a região rica em CS (c).

Após tratamentos químicos dissociativos, como pelo cloreto de guanidina (GuCl) 4 M, entre 80 e 90% das PG presentes na cartilagem do septo nasal bovino são extraídas (HASCALL & SAJDERA, 1969; SAJDERA & HASCALL, 1969). Em condições "associativas", ou seja, baixa concentração do agente caotrópico (GuCl 0,5 M), cerca de 85% das PG extraídas reagregam-se (OEGEMA et alii, 1975). A ausência da região de ligação com o Ach nas PG não-agregáveis, foi indicada por HEINEGARD & HASCALL (1979), como sendo a razão pela qual tais PG não participam da composição dos agregados.

Os componentes dos agregados são todos sintetizados pelos condrocitos, porém são exportados separadamente, e somente no meio extracelular é que ocorrem as alterações conformacionais das moléculas secretadas, e então a agregação (GLANT, et al. 1977). MITCHELL & HARDINGHAM (1982), trabalhando com células de condrosarcoma de rato, demonstraram que até mesmo a síntese de componentes glicosaminoglicânicos dos agregados de PG, ocorrem em diferentes compartimentos celulares, como é o caso do hialuronato e do CS.

Em culturas de cartilagem traqueal bovina, foi observado que os monômeros de PG complexam-se com a glicoproteína de ligação independentemente da presença ou da combinação com o Ach. Em outras palavras, os monômeros de PG isolados normalmente apresentam a glicoproteína de ligação associada a uma das suas extremidades (BJORNSSON & HEINEGARD, 1981).

As PG da cartilagem representam uma população de macromoléculas polidispersas com respeito a diversas variáveis, como tamanho hidrodinâmico, comprimento do "core" proteico, conteúdo de GAGA e composição química (FELLINI et al. 1981). HASCALL & SAJDERA (1970), determinaram que as PG do

septo nasal bovino apresentam pesos moleculares (PM) variando de menos de 1×10^6 até mais de 4×10^6 . Tal amplitude de variação dos pesos moleculares (PM) das PG é devida principalmente a: a) variações no comprimento da proteína "core", o que, conseqüentemente, altera o número de cadeias de CS por molécula; b) diferenças nos comprimentos médios das cadeias de CS presentes em diferentes moléculas de PG; c) variações no número de cadeias de CS por unidade de comprimento da proteína "core" (ou seja, o grau de substituição ocorrido nos resíduos de serina); d) combinações entre os fatores mencionados (FELLINI et al, 1981).

Especificamente com relação às PG do septo nasal bovino, sabe-se que o peso molecular médio das mesmas gira em torno de $2,5 \times 10^6$ (HASCALL & SAJDERA, 1970) sendo que a proteína "core" tem peso perto de 200.000. Na região rica em CS, ligam-se perto de 100 cadeias de CS (cada uma delas com PM próximo a 20.000), enquanto que na região rica em KS ligam-se entre 30 e 60 cadeias de KS, cada uma delas com PM entre 4.000 e 8.000 (HASCALL, 1977 LINDAHL & HOOK, 1978).

A elevada densidade de cargas aniônicas nas PG, faz com que as cadeias laterais das GAGA sofram um fenômeno de repulsão eletrostática mútua, permanecendo "estendidas" e uniformemente dispersas com relação ao "core" protéico. Tal disposição das GAGA é que possibilita às PG como um todo, ocuparem grandes domínios moleculares, que encerram elevadas quantidades de solvente por unidade de massa de PG (HASCALL, 1977). O caráter altamente hidrofílico das PG é também responsável pelo fato de que tais macromoléculas, quando em solução, ocupam volumes de 30 a 50 vezes o seu peso seco (HASCALL & SAJDERA, 1970). Baseando-se nestes aspectos é que se atribui às PG a

função de preencher espaços ("space filling role")(HASCALL, 1980).

As GAGA das PG ligam-se com outras macromoléculas extracelulares. Tal ligação já foi descrita em tendões (VIDAL, 1963, 1964) e na ossificação endocondral (VIDAL, 1977). Provavelmente, as GAGA atuariam também durante o desenvolvimento das fibras de colágeno, determinando o crescimento lateral (diâmetro) das ditas fibras (PARRY et al, 1982).

Considerando-se as relações (interações) entre as macromoléculas constituintes da cartilagem, a água e os microfions da matriz extracelular, ficam evidentes as implicações fisiológicas deste arcabouço macromolecular que se estende por toda a matriz (LINDAHL & HOOK, 1978). Em outras palavras, as PG ocupam grandes volumes da matriz extracelular da cartilagem hialina, propiciando a existência de uma "rede" aniônica capaz de reter elevadas quantidades de solvente (água de solvatação). A importância fisiológica deste arranjo, é que as PG da cartilagem hialina podem ser comprimidas (reversivelmente) deslocando solvente do domínio molecular, às custas de interações intramoleculares crescentes (HASCALL, 1977).

Ao longo do curso de fenômenos biológicos importantes como crescimento e envelhecimento, as PG da cartilagem hialina sofrem modificações diversas. BONNUCCI et al. (1974), estudando histoquímica e bioquimicamente as cartilagens costal e traqueal de ratos, determinaram que o conteúdo de CS diminui em função da idade, ocorrendo um aumento simultâneo no conteúdo de KS. Saliente-se o fato de que as citadas alterações ocorrem entre 20 e 30 dias após o nascimento do animal.

Demonstração da ocorrência de alterações bioquímicas na matriz extracelular da cartilagem hialina, logo no primeiro mês de vida, também foi realizada por QUINTARELLI et al. (1975). Tais autores determinaram que na cartilagem costal de coelhos com até quatro semanas de idade, ocorre um de crescimento no conteúdo de PG (até 30%), acompanhado de um aumento simultâneo do teor colagênico, aumento este capaz de atingir até três vezes a quantidade de colágeno existente no momento do nascimento.

Paralelamente à variada gama de conhecimentos bioquímicos existentes sobre as PG da cartilagem hialina, ocorre certa carência de trabalhos que relacionem tais achados com os aspectos morfológicos observados. Em outras palavras, é muito difícil correlacionar a estrutura das PG "in vitro" com os aspectos morfológicos relatados como sendo devidos à presença das mesmas nos tecidos.

A observação de cortes de tecido cartilaginoso ap microscópio eletrônico, mostra as PG como grânulos densos, distribuídos pela matriz extracelular (MATUKAS et al. 1967 ; KHAN & OVERTON, 1970; ANDERSON & SAJDERA, 1971; THYBERG et al. 1973; SHEPARD & MITCHELL, 1976b; KLEINE, 1981). Entretanto, quando observados segundo a técnica de "espalhamento" ("spread") (ROSENBERG et al. 1975), as PG apresentam o aspecto de uma escova para limpeza de tubos de ensaio ("bottlebrush"), ou seja, um longo filamento central, do qual protudem muitas ramificações perpendiculares. Tal morfologia é compatível com a idéia dos agregados de PG, onde o longo filamento central seria uma molécula de Ach, enquanto que as ramificações laterais seriam as proteínas "core" mais as GAGA.

A idéia geralmente aceita, para explicar a dife

rença entre as observações realizadas em corte e por "espalhamento", é de que as PG sofrem certa condensação durante o processamento do material para a microscopia eletrônica (ANDERSON & SAJDERA, 1971). Presumivelmente, tal condensação seria devida à ausência de um fixador capaz de estabilizar a estrutura "estendida" das PG. A utilização de corantes catiônicos durante o processo de fixação melhorou o grau de retenção de PG no tecido, porém, tais PG foram igualmente observadas como grânulos densos, quando vistas em corte (BEHNKE & ZELANDER, 1970 ; LUFT, 1971; SHEPARD & MITCHELL, 1976a, b).

As GAGA presentes na superfície celular ("cell-coat") dos condrôcitos da ossificação endocondral também foram estabilizadas por corantes catiônicos (VIDAL & DOLDER, 1978) e pelo acridine orange (SHEPARD & MITCHELL, 1981), sendo que em ambos os casos tais macromoléculas foram observadas como estruturas elêtron-densas.

Estes fatos levaram diversos autores a diferentes interpretações com relação à estrutura molecular provável dos grânulos de PG, uns considerando-os como monômeros, enquanto outros afirmaram tratar-se de formas agregadas. Uma interpretação recente é aquela de HASCALL (1980), que comparando os grânulos da matriz e moléculas de PG isoladas e "espalhadas" ("spread"), sugeriu que os grânulos representam porções monoméricas condensadas de PG, e não agregados inteiros.

VIDAL & MELLO (1984), por outro lado, interpretaram os grânulos vermelho de rutênio-positivos, observados em cortes ultra finos de tendões de ratos recém-nascidos, como sendo sítios onde as PG estão ligadas às proteínas de ligação. ("link") dos agregados.

A correlação dos achados resultantes de estudos bioquímicos, com a morfologia característica da cartilagem hialina, pode ser feita através da detecção "in situ" dos constituintes macromoleculares da mesma. Tal detecção "in situ" das glicoproteínas de ligação e mesmo de monômeros de PG, foi realizada através da imunocitoquímica (POOLE et al. 1980, 1982).

Embora de forma aparentemente não tão específica quanto a técnica de imunocitoquímica supra citada, a citoquímica é também um método de eleição para a detecção "in situ" das macromoléculas em aprêço. Acompanhada de reações de bloqueio, ou de digestões enzimáticas com controles adequados, a citoquímica atinge graus de especificidade que permitem a obtenção de resultados com resolução análoga àquela verificada através das técnicas de caráter imunológico.

Para garantir o grau de pureza das frações obtidas, o pericôndrio é usualmente removido das amostras utilizadas nos trabalhos de caráter bioquímico. Pretende-se aqui observar também o comportamento desta região da cartilagem do septo nasal bovino, com a finalidade de se obter, em especial, informações acerca da relação de maturação do tecido cartilaginoso, no sentido pericôndrio-subpericôndrio-endocôndrio.

Neste aspecto, deve-se destacar a importância das observações à microscopia de polarização, posto que, acompanhadas de técnicas citoquímicas adequadas, tais observações permitem não só detectar os componentes macromoleculares, como também avaliar sua organização estrutural (agregação e ordem molecular) ao nível sub-microscópico, "in situ".

É nossa intenção, portanto, reavaliar alguns dos processos utilizados na remoção de PG da cartilagem hiali-

na, relacionados na literatura. Especial atenção será dispensada à ação dos referidos processos extrativos sobre as regiões territorial e interterritorial da cartilagem do septo nasal bovino, no que tange à estabilidade físico-química das macromoléculas ali presentes frente aos diversos tratamentos realizados. Mais ainda, pretende-se determinar a eficiência de tais processos, em função da espessura do fragmento de material tratado.

OBJETIVOS

Os objetivos principais do presente trabalho são:

- Avaliar por técnicas citoquímicas a ação de tratamentos químicos dissociativos e enzimáticos sobre as diferentes regiões da cartilagem do septo nasal bovino.

- Determinar o grau de estabilidade dos diferentes componentes macromoleculares da citada cartilagem, frente aos tratamentos realizados.

- Estimar o estado de agregação e ordem molecular das macromoléculas constituintes da referida cartilagem, e determinar como os tratamentos realizados afetam tais parâmetros.

- Comparar a eficiência e a acessibilidade dos agentes (químicos ou enzimáticos) utilizados, nos tratamentos em bloco e sobre cortes obtidos por microtomia de congelação.

MATERIAIS E METODOS

1. Cortes Obtidos por Microtomia de Congelação

Septos nasais bovinos, retirados de animais em idade de abate, ou seja adultos jovens, foram cortados transversalmente em micrôtomos manual de congelação, e imediatamente montados sobre lâminas histológicas. A espessura prevista para os ditos cortes foi de 16 μ m, embora a técnica utilizada possa ter introduzido variações de espessura ao longo de um mesmo corte.

O material montado sobre lâmina sofreu tratamentos diversos (enzimáticos ou por soluções tampão), sendo posteriormente fixado em paraformaldeído 4% (5 °C, 4 a 6 hs) e submetido aos testes citoquímicos. Para que se minimizassem as variações inerentes aos tratamentos, bem como aquelas relacionadas com os testes citoquímicos, todas as lâminas submetidas a um dado tratamento foram processadas simultaneamente. Analogamente, os testes citoquímicos foram realizados sobre um grupo completo de lâminas (tratamento enzimático, tratamento controle, e ausência de tratamento), na mesma hora e mesma cuba de coloração.

No total, existem dez condições de trabalho distintas, entre tratamentos diversos e mesmo ausência total de tratamento, conforme descrito a seguir:

C1) Cortes não fixados e não tratados.

C2) Cortes fixados em paraformaldeído 4% e não submetidos a qualquer tratamento.

C3) Cortes tratados pela hialuronidase testicular (modificado de LISON, 1960). A enzima (SIGMA, 1091 UI/mg) foi dissolvida em NaCl 0,85% numa concentração final de 1,0 mg/ml, e o tratamento foi realizado em câmara úmida a 37°C por 6 horas (ANDRADE FILHO & VIDAL, 1984).

C4) Cortes controle para a digestão pela hialuronidase testicular, incubados como descrito em C3, em meio desprovido da enzima.

C5) Cortes digeridos pela mistura de enzimas hialuronidase testicular/colagenase bacteriana. A hialuronidase é a mesma descrita em C3. A colagenase, extraída de Clostridium histolyticum (BOERHINGER MANHEIM GmbH); foi dissolvida em tampão Tris-HCl 0,02 M pH 7,4, numa concentração final de 0,08 mg/ml. As duas soluções enzimáticas foram misturadas numa proporção 1:1, e a incubação foi realizada em câmara úmida a 37°C por 6 horas.

C6) Cortes controle para digestão pela mistura hialuronidase/colagenase, incubados como descrito em C5, em meio desprovido das enzimas.

C7) Cortes tratados pela papaína (MERCK), segundo o método de THYBERG et alii (1973). A enzima foi dissolvida em tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 numa concentração final de 2,6 mg/ml. Para cada ml de meio de incubação foram adicionadas 9 mg de NaCl, 0,8mg de L-cisteína hidrocloreada e 9 mg de EDTA. A incubação foi feita em câmara úmida a 37 °C por 30 minutos.

C8) Cortes controle para a digestão pela papaína, incubados como descritos em C7, em meio desprovido da enzima.

C9) Cortes tratados pela alfa-amilase bruta (FISHER SCIENTIFIC Co.), 1% na seguinte solução: 0,8 g de NaCl, 0,13 g de difosfato de sódio anidrido e 0,08 g de monofosfato de potássio monohidratado, em 100ml de água destilada (tampão PBS), sendo a incubação realizada em câmara úmida a 37 °C por uma hora.

C10) Cortes controle para a digestão pela alfa-amilase bruta, incubados como descrito em C9, em meio desprovido apenas da enzima.

Cumprir notar que todas as lâminas contendo cortes tratados, quer por soluções enzimáticas, quer por soluções tampão, foram, imediatamente após o tratamento, lavadas em água e fixadas em paraformaldeído 4%, a 5 °C por 4 a 6 horas.

2. Cortes obtidos após inclusão em parafina

Pequenos fragmentos de septos nasais bovinos (0,5 a 3,0 mm de espessura), contendo sempre uma certa porção de pericôndrio, foram submetidos a tratamentos químicos dissociativos e enzimáticos. Após os diversos tratamentos as peças de material biológico foram lavadas em água, fixadas em paraformaldeído 4% a 5 °C por 8 a 12 horas, e incluídas em parafina conforme a técnica histológica rotineira.

Os blocos de material tratado e incluído em parafina foram cortados em micrótomo manual (JUNG, HEIDELBERG), para obtenção de cortes com 7 µm de espessura, que foram aderidos sobre lâminas histológicas comuns.

Lotes completos de cortes desparafinizados (contendo portanto ao menos uma lâmina de cada tratamento, bem como lâminas não tratadas) foram simultaneamente submetidos aos diferentes testes citoquímicos. Após a coloração as lâminas foram montadas em bálamo do Canadá e observadas à microscopia óptica

No total existem quinze condições de trabalho distintas, entre tratamentos químicos dissociativos, enzimáticos, e mesmo ausência total de tratamento, conforme descrito a seguir:

P1) Material fixado em paraformaldeído 4% a 5 °C por 8 a 12 horas, sem qualquer tipo de tratamento prévio.

P2) Material tratado pelo $MgCl_2$ 3M, dissolvido em acetato de sódio 0,15 M pH 6,3 a 5 °C por 48 horas (modificado de SAJDERA & HASCALL, 1969). Segundo os autores este tratamento possibilita a remoção de até 85% das PG da cartilagem do septo nasal bovino.

P3) Material tratado seqüencialmente pelo $MgCl_2$ e $CaCl_2$ (modificado de SAJDERA & HASCALL, 1969). O tratamento pelo $MgCl_2$ é o mesmo descrito em P2, após o qual o material foi tratado com $CaCl_2$ 0,1M, dissolvido em acetato de sódio 0,15 M pH 6,3 a 5 °C por 48 horas. Utilizado após a ação do $MgCl_2$, o $CaCl_2$ pode extrair frações de PG insolúveis após o tratamento pelo $MgCl_2$ isolado.

P4) Material tratado por solução de ácido tricloroacético (TCA) 3% a 90 °C por 45-60 minutos (FITCH et al. 1955). O método permite a separação de colágeno e glicoproteínas estruturais, através da solubilização do primeiro.

P5) Material tratado segundo o método modificado de MILLER (1972). Numa primeira etapa ocorreu o tratamento por solução de NaCl 1,0 M, dissolvido em tampão Tris-HCl 0,05 M pH

7,5 a 4 °C. A solução descrita foi substituída duas vezes ao dia, por cinco dias consecutivos. Seguiu-se o tratamento com solução de ácido acético 0,5 M a 4 °C, sendo que também esta solução foi substituída duas vezes ao dia, num total de cinco dias. Finalmente, realizou-se o tratamento por solução de ácido acético 0,5 M, acrescida de pepsina (2,0 mg/ml), a 4 °C por 18 horas. O autor afirma que o tratamento por solução salina seguido pelo tratamento ácido, remove a maioria dos componentes proteoglicânicos da cartilagem do esterno de galinhas, restando no tecido apenas uma fração de colágeno insolúvel. O tratamento subsequente pela pepsina deveria remover entre 60 e 70% do colágeno presente no tecido.

P6) Material digerido pela hialuronidase testicular, conforme descrito em C3, a não ser pelo fato de que a incubação se fez em bloco.

P7) Material controle para a digestão pela hialuronidase testicular, incubado em meio desprovido da enzima, conforme descrito em P6.

P8) Material tratado pela colagenase bacteriana, extraída de Clostridium histolyticum (BOEHRINGER MANHEIM, GmbH), dissolvida em tampão Tris-HCl 0,02 m pH 7,4, numa concentração final de 0,08 mg de enzima por ml de solução. A incubação foi realizada em bloco, a 37 °C por 18 horas.

P9) Material controle para a digestão pela colagenase bacteriana, incubado como descrito em P8, em meio desprovido da enzima.

P10) Material tratado pela mistura hialuronidase testicular/colagenase bacteriana. Basicamente, repetiu-se o tratamento C5, sendo que neste caso a digestão foi realizada em bloco, num total de 18 horas.

P11) Material controle para a digestão pela mistura hialuronidase/colagenase, incubado como descrito em P10, em meio desprovido das enzimas.

P12) Material digerido pela papaína, segundo o método de THYBERG et al. (1973), como em C7.

P13) Material controle para a digestão pela papaína, incubado como descrito em P12, em meio desprovido apenas da enzima.

P14) Material tratado pela alfa-amilase bruta, como descrito em C9, por 6 horas.

P15) Material controle para a digestão pela alfa-amilase bruta, incubado como em P14, em meio destituído da enzima.

3. Citoquímica

Cortes de septos nasais bovinos, quer obtidos por microtomia de congelação, quer obtidos após inclusão em parafina, e, independentemente da realização ou não dos tratamentos citados, foram submetidos aos seguintes testes citoquímicos:

3.1. Pesquisa da basofilia metacromática. Cortes foram corados com solução de Azul de Toluidina (AT) 0,025% em tampão Mc Ilvaine pH 3,4 (LISON, 1960, a).

* 3.2. Glicosaminoglicanas sulfatadas. Cortes foram corados por solução de Azul de Alcian 1%, em HCl 0,1 N pH 1,0 (PEARSE, 1968).

* 3.3. Glicosaminoglicanas ácidas totais. Cortes foram corados por solução de Azul de Alcian 1%, em ácido acético 2,5% pH 2,5 (PEARSE, 1968).

* 3.4. Radicais eletropositivos totais. Cortes foram corados por solução de Xilidine Ponceau (XP) 0,1% em tampão acetato pH 1,7 (VIDAL, 1970).

* 3.5. Radicais Vic-glicóis. Cortes foram submetidos à técnica de PAS (Periodic-acid-Sciff) (LISON, 1960, a).

4. Microspectrofotometria

Foram realizadas medidas absorciométricas das principais regiões de estudo dos cortes obtidos por microtomia de congelação, corados pelo AT pH 3,4. As medidas foram obtidas com um fotomicroscópio Zeiss-Pol equipado com fotômetro e um fotomultiplicador EMI 6256. Foram utilizados uma objetiva de 40 X (Plan), diafragma de campo com diâmetro de 0,2 mm, Optovar 2 e diafragma de medida com diâmetro de 0,25 mm.

As medidas absorciométricas foram realizadas nos comprimentos de onda de 555 e 625 nm, sendo a área de medidas igual a $7,66 \mu\text{m}^2$. Foi calculado o Índice Metacromático (IM), conforme descrito por VIDAL (1977), ou seja,

$$\text{IM} = A_{555} / A_{625}$$

5. Microscopia de Polarização

Foram realizadas observações qualitativas à microscopia de polarização, com especial interesse nos fenômenos de dicroísmo e birrefringência verificados nas diferentes regiões de estudo dos diversos cortes corados. Para tanto, foi utilizado um fotomicroscópio Zeiss-Pol e um compensador Brace Keller $\lambda/20$. Para todas as observações foi utilizado feixe de luz polarizada policromática.

RESULTADOS

Para facilitar a compreensão do relato que se segue, cabem aqui algumas explicações, que visam principalmente de limitar os termos utilizados ao longo do texto.

Uma vez que a análise realizada foi de caráter qualitativo, criou-se uma escala de intensidade de coloração, baseada tão somente na impressão visual obtida quando da observação das lâminas, e que possui seis graduações, a saber: não corado (-); coloração extremamente fraca (- +); coloração fraca (+); coloração média (++); coloração intensa (+++); e coloração muito intensa (++++).

Além das graduações citadas foram utilizadas graduações intermediárias, principalmente nos casos em que se tornou difícil precisar qual a coloração exibida pelo material. Assim, surgiram situações como "coloração de média a intensa" (++/+++), por exemplo.

No presente trabalho, o termo metacromasia representa o fenômeno de deslocamento do pico de absorção do corante Azul de Toluidina (AT) do comprimento de onda em torno dos 630 nm, para a faixa em torno dos 550 nm.

A metacromasia é aqui definida e quantificada através da utilização de um Índice Metacromático, já definido anteriormente em Materiais e Métodos. Entende-se por coloração metacromática aquela que se aproxima do violeta, e por coloração ortocromática aquela que se aproxima do verde azulado.

Topograficamente, a referida análise qualitativa realizou-se em seis regiões de estudo principais, assim descritas:

a) Pericôndrio. Constituído por fibroblastos e grande quantidade de fibras colagênicas, especialmente ricas em colágeno tipo I.

b) Subpericôndrio. Região situada imediatamente abaixo do pericôndrio, constituída por uma camada de 6 a 8 células com aspecto fusiforme.

c) Interterritório. Porção da matriz extracelular situada entre condrócitos isolados, ou grupos isogênicos de condrócitos, e que não se relaciona diretamente com os mesmos.

d) Território Pericelular. Fina faixa de matriz, localizada na vizinhança imediata da membrana plasmática dos condrócitos.

e) Território Domínio. Porção da matriz situada entre o território pericelular e o interterritório. O domínio tanto pode envolver um único condrócito, como todo um grupo isogênico de condrócitos.

f) Citoplasma dos condrócitos. O período que se inicia com exceção das regiões pericondrial e subpericondrial, que situam-se naturalmente nas porções mais externas dos cortes, as análises das características do interterritório, território (domínio e pericelular) e citoplasmas dos condrócitos, foram realizadas ao nível do endocôndrio. O termo endocôndrio não denomina uma região análoga ao pericôndrio, mas tão somente a porção de cartilagem hialina situada nas regiões mais centrais dos cortes transversais dos septos nasais aqui utilizados. No material incluído em parafina, não foram consideradas as porções endocondriais situadas na periferia dos fragmentos de cartilagem.

1, Resultados Obtidos em Cortes por Congelação

Os cortes obtidos por microtomia de congelação foram submetidos aos procedimentos descritos nos Ítens C1 a C10 dos Materiais e Métodos, realizando-se, a seguir, os testes citoquímicos já descritos.

1.1. Coloração pelo Azul de Toluidina

As respostas à coloração pelo AT pH 3,4, observadas nas diferentes regiões de estudo dos diversos cortes corados, encontram-se sumarizadas na tabela 1.

1.1.1. Cortes não tratados

Os cortes não tratados (C1 e C2), apresentaram os núcleos dos fibroblastos presentes no pericôndrio corados ortocromaticamente. As fibras pericondriais, embora não coradas, mostraram-se fortemente birrefringentes quando observadas à microscopia de polarização, exibindo cor de interferência branca de primeira ordem (figs. 02 e 03).

Note-se que a fixação melhorou muito o grau de preservação das fibras colagênicas do pericôndrio, chegando inclusive a possibilitar a realização de medidas absorciométricas (Tab. 02), impraticáveis no material não fixado.

A região subpericondrial apresentou coloração metacromática, independentemente da fixação (tab. 02). A metacromacia do subpericôndrio mostrou-se mais intensa ao nível do ter

TABELA 1

Intensidades de coloração observadas em cortes obtidos por microtomia de congelação após o teste pelo Azul de Toluidina pH 3,4.

Regiões Tratamentos	Pericôndrio	Subperi- côndrio	Interterri- tório endo- condrial	Território endo- condrial (domínio)	Território endo- condrial (Perice- lular)	Citoplas- mas
C1	-	++	+	+++	++++	+++ /++++
C2	-+	-+	+ /++	+++	+++ /++++	++++
C3	-	-	-	-	+	++
C4	-+	+	+	++	++	+++ /++++
C5	-	-	-	-	-	-+
C6	-+	-+	+	++	+++	+++
C7	-	-	-	-	-	-+
C8	-+	++	++	+++	++++	+++
C9	-	-	-	-	-	+
C10	-+	+	+ /++	++ /+++	+++	+++ /++++

LEGENDA: - não corado
 -+ coloração extremamente fraca
 + coloração fraca
 ++ coloração média
 +++ coloração intensa
 ++++ coloração muito intensa
 0 Não observado

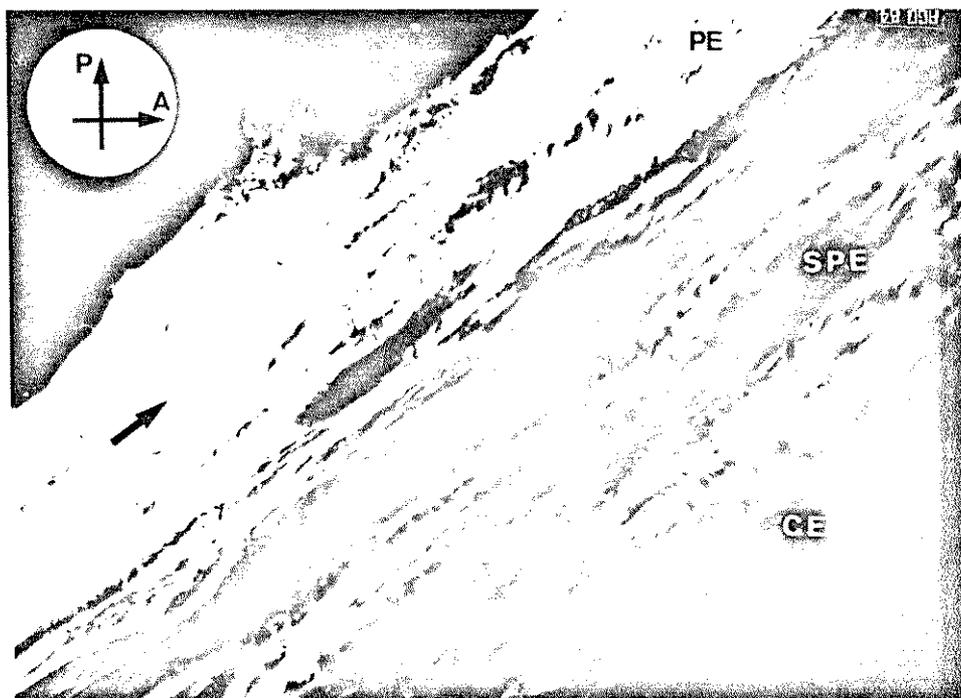


FIGURA 02

Corte transversal de septo nasal bovino, sem qualquer tratamento corado pelo AT pH 3,4. Imagem de birrefringência. O eixo maior das fibras de colágeno (seta) do pericôndrio (Pe) está orientado a 45° do analisador e polarizador. Notar as diferentes cores de interferência observadas nas regiões pericondrial (Pe), subperi-condrial (SPE) e na cartilagem endocondrial (CE). Observar também que as imagens birrefringentes apresentam-se em camadas paralelas desde Pe até CE. 100X.

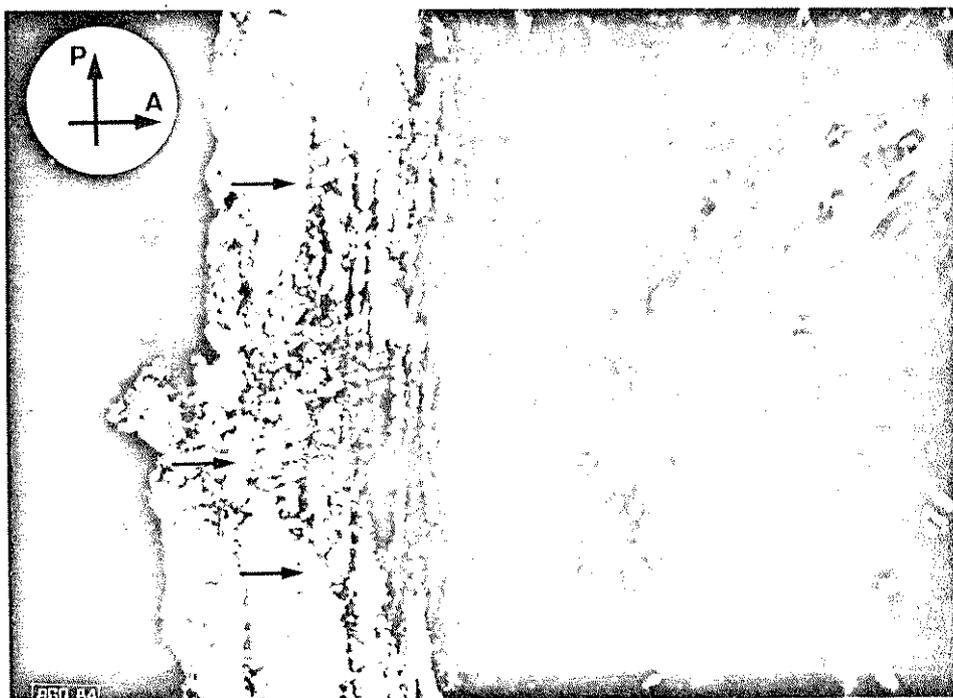


FIGURA 03

Mesmo corte descrito na fig. 02, porém com o eixo maior do Peri cõndrio (Pe) orientado paralelamente ao polarizador. Comparar com a fig. 02 e notar a presença de feixes de colágeno com birrefringência (setas), quando deveriam tê-la em extinção; isto indica a presença de fibras e feixes a 45° do eixo longitudinal do pericõndrio. Notar também o aspecto da birrefringência da porção pericelular da cartilagem endocondrial (setas duplas) e de fibras da cartilagem entrecruzando-se. 100X.

TABELA 2

Valores de absorvância (A) a 555 e 625 nm e respectivos Índices Metacromáticos (IM), de cortes obtidos por microtomia de congelação, fixados e não fixados, corados pelo Azul de Toluídina pH 3,4.

$$IM = \frac{A_{555}}{A_{625}}$$

REGIÕES	NÃO FIXADOS			FIXADOS		
	A ₅₅₅	A ₆₂₅	IM	A ₅₅₅	A ₆₂₅	IM
Pericôndrio	-	-	-	0,010	0,022	0,454
Subpericôndrio (Interterritório)	0,300	0,213	1,408	0,352	0,267	1,318
Interterritório Endocondrial	0,332	0,248	1,338	0,561	0,414	1,355
Território Endocondrial	1,140	0,642	1,775	0,870	0,620	1,403

ritório das células fusiformes, características da região, onde se verificou maior acúmulo de material metacromático (fig. 04).

O interterritório do subpericôndrio exibiu grande quantidade de grânulos intensamente metacromáticos. Tais grânulos foram observados alinhados em "filamentos", acompanhando o longo eixo das células ali presentes, sugerindo um aspecto estratificado do material (fig. 04).

O interterritório da cartilagem endocondrial apresentou coloração metacromática pouco intensa (tab. 1). Morfológicamente, foi observada a presença de discreta quantidade de grânulos metacromáticos na região (fig. 05). A fixação parece ter aumentado o número de grânulos existentes no interterritório. Muito embora a análise qualitativa não forneça dados conclusivos a este respeito, as medidas absorciométricas realizadas parecem corroborar tal impressão visual (tab. 02).

Ao nível da região territorial da cartilagem endocondrial, mais especificamente no domínio, foi observado um elevado acúmulo de grânulos metacromáticos. Assim, ao redor de um condrócito, ou grupo isogênico de condrócitos, observou-se uma coloração bem mais intensa que a do interterritório vizinho (tab. 1). À microscopia de polarização, os referidos grânulos apresentaram cor de interferência esverdeada.

A porção pericelular do território endocondrial também teve sua coloração devida à granulação metacromática. É interessante notar que nem sempre o pericelular foi morfologicamente distinguível ao exame visual; geralmente tal região apresentou-se como uma faixa de matriz muito delgada, intimamente associada à própria membrana plasmática. Observada ao microscópio de polarização, a região pericelular mostrou-se intensamen

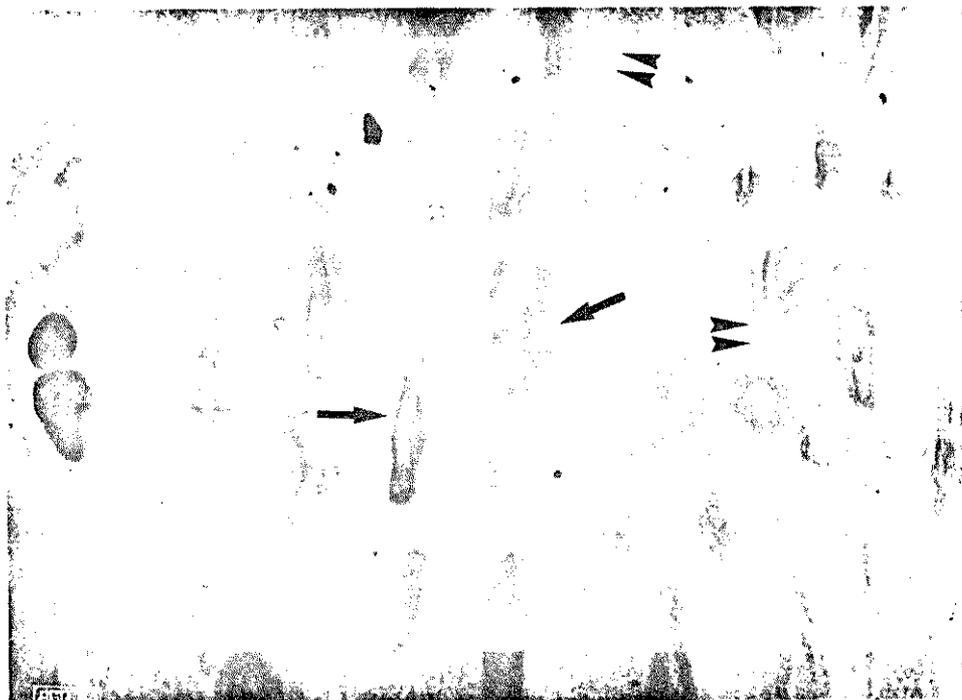


FIGURA 04

O mesmo corte anteriormente descrito, mostrando um detalhe da região subpericondrial. Notar o acúmulo de material metacromático na porção pericelular dos condrocitos (setas), a disposição filamentar dos grânulos interterritoriais (setas duplas), os núcleos com coloração ortocromática e a variação na coloração das diversas células. 400X.



FIGURA 05

O mesmo material anteriormente descrito, mostrando um detalhe da cartilagem endocondrial. Notar a nítida distinção entre as regiões territorial e interterritorial. Observar também a granulação metacromática nas duas regiões citadas e a variação da intensidade de coloração citoplasmática exibida pelos vários condrôcitos. 400X.

te birrefringente (fig. 03).

Analisado como um todo, o território endocondrial corou-se sempre metacromaticamente (tab. 02). Embora de forma não conclusiva, as medidas absorciométricas realizadas também sugerem que a fixação diminuiu os radicais aniônicos disponíveis para a ligação com o AT pH 3,4 (tab. 02).

Independentemente da fixação, os citoplasmas dos condrocitos responderam à coloração pelo AT de forma bastante variada. O aspecto morfológico mais marcante foi a presença de grânulações intracitoplasmáticas, cuja distribuição não apresentou qualquer padrão detectável. Aliás, o grau de concentração das referidas grânulações causou alterações na coloração dos citoplasmas como um todo. Quando visualizados, os núcleos dos condrocitos apresentaram-se corados ortocromaticamente.

1.1.2. Tratamento pela Hialuronidase Testicular

A digestão pela hialuronidase testicular (C3) aboliu completamente a coloração das regiões do pericôndrio, subpericôndrio, interterritório e domínio da cartilagem endocondrial. Na porção pericelular do território endocondrial, assim como nos citoplasmas dos condrocitos, a enzima provocou a diminuição da intensidade de coloração, em comparação com o material controle para a digestão (C4).

Com relação aos citoplasmas, a queda da intensidade de coloração foi acompanhada por uma aparente redução numérica das grânulações intracitoplasmáticas.

Ao microscópio de polarização observou-se que a hialuronidase testicular causou não só a diminuição da birrefringência normalmente observada nas diferentes regiões de estu

do, como também o desaparecimento da maioria das cores de interferência anteriormente registradas (fig. 06).

Todas as regiões de estudo dos cortes submetidos ao tratamento controle para a digestão em aprêço (C4), exibiram intensidade de coloração no máximo iguais, e muito mais frequentemente inferiores aquelas registradas nos cortes não tratados em absoluto (C1 e C2).

1.1.3. Tratamento pela mistura Hialuronidase/Colagenase

Comparando-se os cortes digeridos pela mistura de enzimas hialuronidase testicular/colagenase bacteriana (C5) e os cortes submetidos aos tratamento controle (C6), observou-se que, sem nenhuma exceção, o tratamento enzimático provocou a diminuição ou eliminação da intensidade de coloração exibida pelas regiões estudadas. Mais ainda, os cortes incubados na ausência das enzimas (C6) também exibiram certa redução da intensidade de coloração, em comparação com os cortes não tratados (C1 e C2).

O tratamento enzimático em questão (C5), acarretou acentuada remoção das granulações intracitoplasmáticas, além de provocar o desaparecimento das cores de interferência normalmente observadas à microscopia de polarização.

Nos cortes incubados em meio não enzimático (C6), ocorreu certa extração de material metacromático, evidenciada pela diminuição da intensidade de coloração (tab. 1). Tal extração, entretanto, exibiu um certo padrão, principalmente na porção da cartilagem situada imediatamente abaixo do subpericôndrio. Na região citada, foi possível visualizar uma espécie de "rede

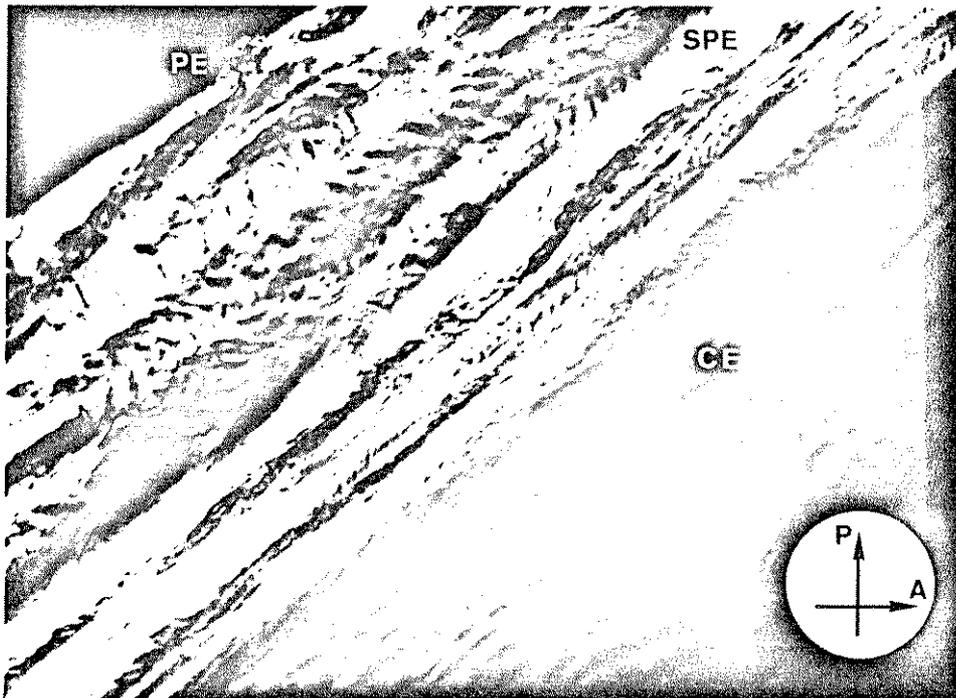


FIGURA 06

Corte transversal de septo nasal bovino, digerido pela hialuronidase testicular e corado pelo AT pH 3,4. Imagem da birrefringência total (eixo longitudinal do corte orientado a 45° do analisador e polarizador). Comparar com a fig. 02 e notar o desaparecimento da maioria das cores de interferência, em função do tratamento enzimático. Pe, pericôndrio; SPE, subpericôndrio; CE, cartilagem endocondrial. 100X.

de projeções digitiformes", que parecia radiar-se da porção endocondrial para o pericôndrio, na periferia do corte. Além de metacromáticas, tais estruturas são birrefringentes, apresentando cor de interferência verde, e também dicrônicas (Fig. 07).

1.1.4. Tratamento pela Papaína

Exceto pelos citoplasmas dos condrocitos, a digestão pela enzima proteolítica papaína (C7), provocou a supressão da coloração pelo AT em todas as regiões de estudo. Por outro lado, o tratamento controle para a citada digestão (C8), não alterou significativamente (tab. 1) o padrão de coloração observado nos cortes não tratados (C1 e C2).

A presença de grânulos metacromáticos na matriz extracelular foi detectada, em cortes submetidos ao tratamento controle (C8), nas regiões do subpericôndrio, interterritório e território da cartilagem endocondrial. Destaque-se o fato de que a referida granulação, ao exame visual, pareceu ser numericamente inferior àquela registrada no material não tratado em absoluto.

Os citoplasmas dos condrocitos apresentaram grande variação de resposta ao teste citoquímico, independentemente do fato de terem sido tratados enzimaticamente ou não. Como regra geral, a digestão enzimática provocou uma queda de coloração mais acentuada que o tratamento controle, porém nos dois casos foram observadas células absolutamente não coradas.

1.1.5. Tratamento pela Alfa-amilase Bruta

Analogamente ao descrito após a digestão pela pa



FIGURA 07

Corte transversal do septo nasal bovino, submetido ao tratamento controle para a digestão pela mistura de enzimas hialuronidase testicular/colagenase bacteriana (C6), corado pelo AT pH 3,4. Imagem da birrefringência compensada. Notar a existência da chamada "rede de projeções digitiformes", radiando-se do subpericôndrio para o pericôndrio (setas). Observe-se que tais "projeções" não se sobrepõem aos condrocitos. 100X.

paína, o tratamento pela alfa-amilase bruta (C9) também provocou o desaparecimento da coloração observada nas diferentes regiões de estudo do material controle (C10), exceto os citoplasmas dos condrocitos. O tratamento controle, por sua vez, não alterou de forma significativa as intensidades de coloração observadas no material não tratado em absoluto (C1 e C2).

A exemplo do que foi mencionado anteriormente, a presença de grânulos metacromáticos na matriz foi detectada nas regiões do subpericôndrio, interterritório e território da cartilagem endocondrial, dos cortes submetidos ao tratamento controle para a digestão (C10).

Quanto aos citoplasmas dos condrocitos, apesar da variação de resposta observada, tanto a intensidade de coloração, quanto a granulação intracitoplasmática, sofreram redução após o tratamento enzimático em aprêço. Note-se que a referida granulação, além de metacromática (fig. 08) é também intensamente birrefringente (fig. 09).

1.2. Coloração pelo Azul de Alcian pH 1,0

As respostas à coloração pelo AA pH 1,0, observadas nas diferentes regiões de estudo dos diversos cortes corados, encontram-se sumarizadas na tabela 3.

1.2.1. Cortes não tratados

Ao nível do pericôndrio, praticamente repetiram-se os achados descritos após coloração pelo AT 3,4, ou seja, a preservação das fibras foi melhor no grupo fixado (C2), e a in

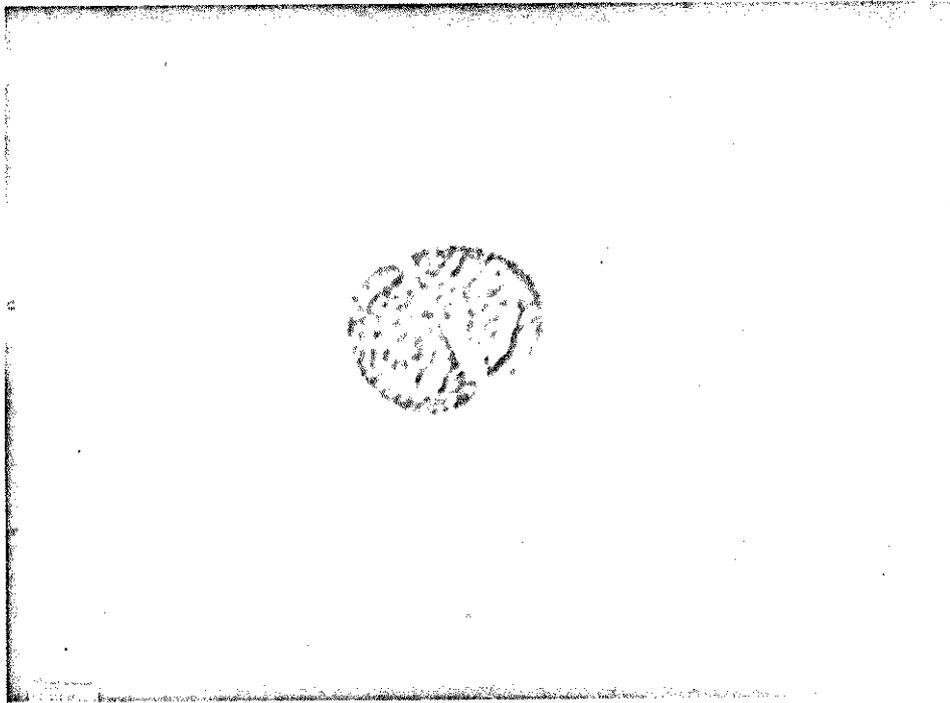


FIGURA 08

Corte transversal do septo nasal bovino, submetido ao tratamento controle para a digestão pela alfa-amilase bruta (C10), corado pelo AT pH 3,4. Detalhe da cartilagem endocondrial mostrando dois condrocitos isogênicos em sua lacuna. Notar os núcleos ortocromáticos, a intensa granulação intracitoplasmática metacromática (que parece sofrer certo acúmulo junto à parede celular) e a discreta granulação da matriz extracelular circunvizinha. 820X.

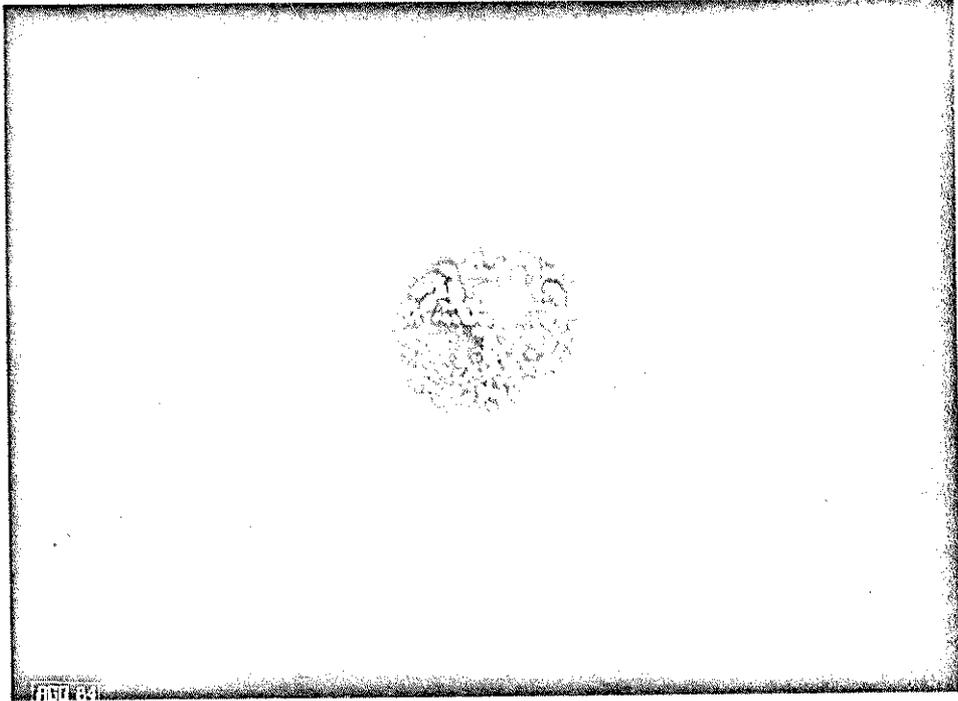


FIGURA 09

O mesmo corte descrito na fig. 08, mostrando aqui aspectos da birrefringência total. Observar as cores de interferência da matriz extracelular e a intensa birrefringência das granulações intracitoplasmáticas. 820X.

TABELA 3

Intensidades de coloração observadas em cortes obtidos por microtomia de congelação após o teste pelo Azul de Alcian pH 1,0

Regiões Tratamentos	Pericôndrio	Subpericôndrio	Interterritório endocondrial	território endocondrial (domínio)	Território endocondrial (Pericelular)	Citoplasmas
C1	+	++	++	+++	+++/++++	+++
C2	+	++	+++	++/+++	+++	+++
C3	-+	-	-	-	-	-
C4	-+	-/-+	+	+/++	++	++
C5	-	-	-	-	-	-
C6	-+	-+	+	++	+++	+++
C7	-	-	-	-	-	-
C8	-+	-+	++	+	+++	+++
C9	-	-	-	-	-	-
C10	-+	++	++/+++	+++	+++/++++	+++

LEGENDA: - não corado
 -+ coloração extremamente fraca
 + coloração fraca
 ++ coloração média
 +++ coloração intensa
 ++++ coloração muito intensa
 0 não observado

tensidade de coloração não foi afetada pela fixação.

A fixação não parece ter afetado a intensidade de coloração do subpericôndrio, mas, tanto o acúmulo de material na porção pericelular das células fusiformes, quanto o aspecto estratificação da matriz interterritorial, pareceram mais evidentes no grupo fixado (figs. 10 e 11).

O interterritório da cartilagem endocondrial, independentemente da fixação, apresentou-se com grânulos alcianófilos (Fig. 11) similares aos grânulos metacromáticos descritos, com a distinção que as dimensões dos primeiros pareceram visualmente maiores que as dos últimos.

Nos dois grupos aqui em discussão, ao nível do território da cartilagem endocondrial, a porção pericelular corou-se mais intensamente que o domínio (tab. 3), e os citoplasmas dos condrocitos apresentaram-se com granulação alcianófila evidente.

1.2.2. Tratamento pela Hialuronidase Testicular

A hialuronidase testicular aboliu completamente a coloração em todas as regiões de estudo (tab. 3), com exceção do pericôndrio. Mais ainda, no material controle para a referida digestão (C4), as intensidades de coloração observadas nas diferentes regiões de estudo foram sempre inferiores âquelas registradas nos cortes absolutamente não tratados.

Morfologicamente, não se detectaram grandes alterações que pudessem ser atribuídas â ação da enzima, uma vez que os aspectos morfológicos descritos para as diversas regiões dos cortes não tratados, repetiram-se também neste caso.



FIGURA 10

Corte transversal do septo nasal bovino, sem tratamento, corado pelo AA pH 1,0, mostrando os diferentes padrões de coloração observados nas regiões do pericôndrio (Pe), subpericôndrio (SPe) e cartilagem endocondrial (CE). Notar o acúmulo de material alcianófilo na porção pericelular dos condrocitos subpericondriais. 100X.

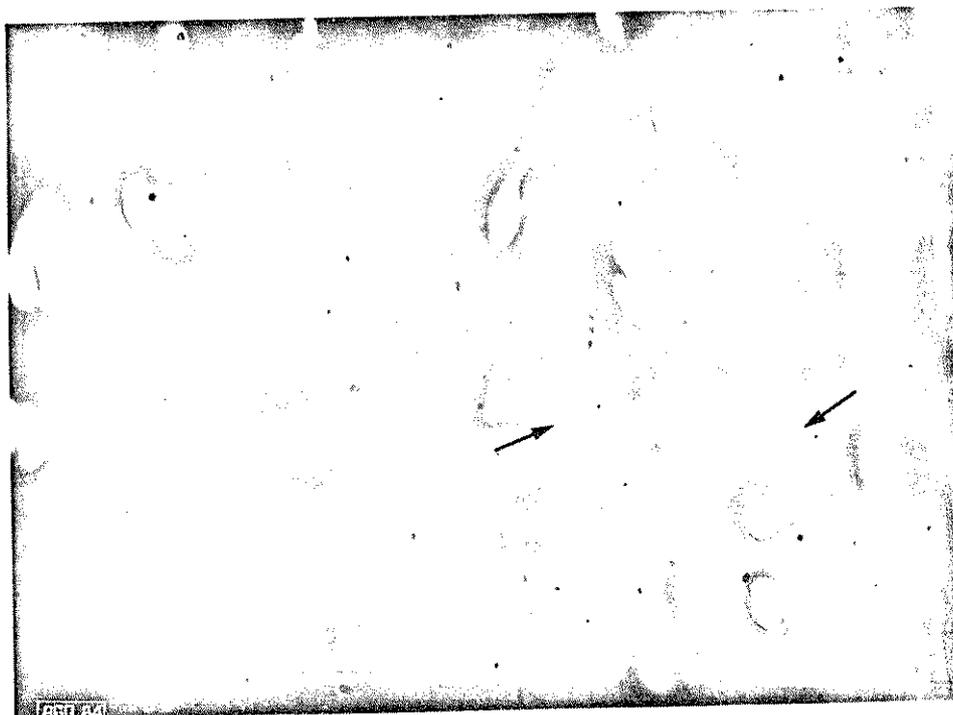


FIGURA 11

O mesmo corte descrito na fig. 10, mostrando um detalhe do subpericôndrio. Observar o já mencionado acúmulo de material intensamente alcianófilo na porção pericelular dos condrocitos, e também a disposição filamentar dos grânulos interterritoriais (setas). 400X.

1.2.3. Tratamento pela mistura Hialuronidase/Colagenase

A exemplo do que já foi anteriormente descrito, a digestão pela mistura de enzimas hialuronidase/colagenase (C5), aboliu por completo toda e qualquer coloração observável (tab. 3). Mais ainda, nos cortes controle para a digestão (C6), a intensidade de coloração registrada nas diversas regiões de estudo foi frequentemente inferior àquelas registradas no material absolutamente não tratado (C2). Os aspectos morfológicos básicos permaneceram praticamente inalterados, com exceção da "rede de projeções digitiformes", descrita no item 1.1.3., que não foi visualizada após a coloração pelo AA pH 1,0.

1.2.4. Tratamento pela Papaína

A papaína eliminou a coloração pelo AA em todas as regiões de estudo. Nos cortes submetidos ao tratamento controle para a citada digestão (C8), o domínio apresentou intensidade de coloração menor que o interterritório e o pericelular vizinhos, o que favoreceu a visualização de um halo claro envolvendo os condrócitos.

No que concerne aos aspectos morfológicos básicos como a granulação da matriz extracelular e a distribuição de material alcianófilo nas diversas regiões estudadas, a digestão pela papaína produziu resultados similares aos descritos após coloração pelo AT pH 3,4.

1.2.5. Tratamento pela Alfa-Amilase Bruta

O tratamento pela alfa-amilase bruta (C9) eliminou a coloração em todas as regiões de estudo. No material submetido ao tratamento controle (C10), a intensidade de coloração variou mais ou menos da mesma forma que no material absolutamente não tratado (C1 e C2), não tendo sido detectadas alterações morfológicas de grande monta.

1.3. Coloração pelo Azul de Alcian pH 2,0

Os resultados da análise qualitativa, realizada sobre as diferentes regiões de estudo dos cortes corados pelo AA 2,5, estão resumidos na tabela 4.

1.3.1. Cortes não tratados

A fixação melhorou a preservação das fibras pericondriais, embora não tenha afetado sua coloração. O subpericôndrio dos cortes fixados exibiu granulação irregular da matriz, sendo que a variação de tamanho de tais grânulos foi a característica que mais se destacou ao exame visual.

Ao nível da cartilagem endocondrial, observou-se uma granulação muito discreta na região interterritorial. Tal granulação acumulou-se na porção pericelular, tornando-a mais intensamente corada que o domínio vizinho. Os citoplasmas dos condrocitos, por sua vez, não pareceram ter sido grandemente alterados pela fixação.

TABELA 4

Intensidades de coloração observadas em cortes obtidos por microtomia de congelação após o teste pelo Azul de Alcian pH 2,5.

Regiões Tratamen- tos	Pericôndrio	Subpericôn- drio	Interterrí- tório endo- condrial	Território endocon- drial (Domínio)	Território endocon- drial (Pe- ricelular)	Citoplas-
C1	+	+/++	++	++	+++	++/+++
C2	+	++	++	++/+++	+++	++/+++
C3	-	-	-	-	-	-
C4	-+	-/-+	-/-+	-/-+	+/++	+/++
C5	-	-	-	-	-	-
C6	-	-	-	-	+/++	+/++
C7	-	-	-	-	-	-
C8	-	+/++	+	+	++/+++	+/++
C9	-	-	-	-	--/+	-+
C10	+	++/+++	+++	+++	++++	+++

LEGENDA:

- não corado
- + coloração extremamente fraca
- + coloração fraca
- ++ coloração média
- +++ coloração intensa
- ++++ coloração muito intensa
- 0 não observado

1.3.2. Tratamento pela Hialuronidase Testicular

Não houve qualquer coloração em nenhuma das regiões de estudo, dos cortes tratados pela hialuronidase testicular (C3). Por outro lado, nos cortes submetidos ao tratamento controle para tal digestão (C4), as diferentes regiões apresentaram intensidades de coloração conforme exposto na tabela 4; note-se que tais colorações foram sempre inferiores às aquelas registradas no material não tratado (C2).

Uma vez que as intensidades de coloração exibidas pelas diferentes regiões de estudo foram, de uma forma geral, bastante fracas nos dois materiais em questão, a análise das características morfológicas foi impraticável.

1.3.3. Tratamento pela mistura Hialuronidase/Colagenase

O tratamento pela mistura de enzimas hialuronidase testicular/colagenase bacteriana (C5), suprimiu a coloração de todas as regiões de estudo. Após o tratamento controle para a referida digestão (C6), as regiões do pericôndrio, subpericôndrio, interterritório e domínio, também apresentaram-se não coradas em absoluto. Mais ainda, as regiões coradas dos cortes controle (território pericelular e citoplasmas dos condrocitos), apresentaram as mesmas intensidades de coloração observadas após o tratamento controle para a digestão pela hialuronidase (C4), sendo portanto inferiores aos valores registrados no material sem tratamento (C1 e C2). Em vista da ausência de coloração, não foram observadas alterações morfológicas passíveis de registro.

1.3.4. Tratamento pela Papaína

Nos cortes digeridos pela papaína (C7) não foi observada qualquer coloração em nenhuma das regiões de estudo, enquanto que no material tratado somente pela solução tampão (C8) as intensidades de coloração registradas para cada região de estudo foram sempre inferiores àquelas observadas no material absolutamente não tratado (C1 e C2). A região do pericôndrio também não se corou nos cortes submetidos ao tratamento controle para a digestão (C8).

1.3.5. Tratamento pela Alfa-Amilase Bruta

Após o tratamento pela alfa-amilase bruta (C9) verificou-se uma coloração fraca na cartilagem endocondrial, mais especificamente na porção pericelular da região territorial e nos citoplasmas dos condrócitos; nas demais regiões de estudo não se observou qualquer coloração. Opostamente, no material controle para tal digestão (C10), as intensidades de coloração registradas nas diferentes regiões foram no mínimo iguais, e frequentemente superiores, às observadas no material não tratado.

Paralelamente a este aumento na intensidade de coloração, ocorrido após o tratamento pelo tampão PBS (C10), observou-se que a granulação característica das porções interterritoriais em geral tornou-se muito difícil de ser visualizada.

1.4. Coloração pelo Xilidine Ponceau pH 1,7

As intensidades de coloração observadas nas diferentes regiões de estudo, após a coloração pelo XP 1,7, encon-

tram-se sumarizadas na tabela 5.

1.4.1. Cortes não tratados

A fixação não só melhorou o grau de compactação das fibras pericondriais, como também aparentemente aumentou a capacidade das mesmas de ligar moléculas do corante, o que tornou o pericôndrio mais intensamente corado após a fixação. Concordando com os resultados já apresentados, o pericôndrio mostrou-se intensamente birrefringente (fig. 12). Com relação ao subpericôndrio, observou-se que as porções mais próximas do pericôndrio coraram-se mais intensamente que aquelas mais afastadas (fig. 13).

O interterritório da cartilagem endocondrial apresentou-se finamente granulado, independentemente da fixação. A coloração da citada região foi sempre mais intensa que aquela registrada no domínio (tab. 5), o que favoreceu a visualização dos halos claros envolvendo os condrócitos.

No que tange à coloração, os citoplasmas dos condrócitos não foram afetados pela fixação. O aspecto morfológico básico observado consistiu na presença de um material mais ou menos homogêneo, às vezes superposto. Muito frequentemente observaram-se citoplasmas colapsados, e contendo uma espécie de "grumo" de material em seu interior. Os núcleos também apareceram bem corados.

1.4.2. Tratamento pela Hialuronidase Testicular

A digestão pela Hialuronidase testicular (C3) acar

TABELA 5

Intensidades de coloração observadas em cortes obtidos por microtomia de congelação após o teste pelo Xilidine Ponceau pH 1,7

Regiões Tratamentos	Pericôndrio	Subpericôndrio	Interterritório endocondrial	Território endocondrial (Domínio)	Território endocondrial: (Pericelular)	Citoplasmas
C1	+++	++/+++	++	+	+++	++/+++
C2	++++	+++/++++	++/+++	-+/+	+++	++/+++
C3	++++	+++/++++	+++	+++	++++	++/+++
C4	+++	++/+++	++	++/+++	+++	++/+++
C5	++	+	-+	-+	-+	-+
C6	++/+++	++	++	++/+++	+++	++/+++
C7	++++	+++/++++	+++	+++	+++	+++
C8	+++/++++	+++	+++	+	+	++/+++
C9	+++/++++	+++/++++	+++	+++	+++	+++
C10	+++	+++	++	+++	+++	++/+++

LEGENDA:

- não corado
- + coloração extremamente fraca
- + coloração fraca
- ++ coloração média
- +++ coloração intensa
- ++++ coloração muito intensa
- 0 não observado



FIGURA 12

Corte transversal do septo nasal bovino, sem tratamento, corado pelo XP pH 1,7. Imagem da birrefringência compensada, onde se nota que as regiões pericondrial (Pe), subpericondrial (SPE) e a cartilagem endocondrial (CE), apresentam diferentes arranjos macromoleculares, que se traduziram nos diferentes padrões de birrefringência observados. 50X.

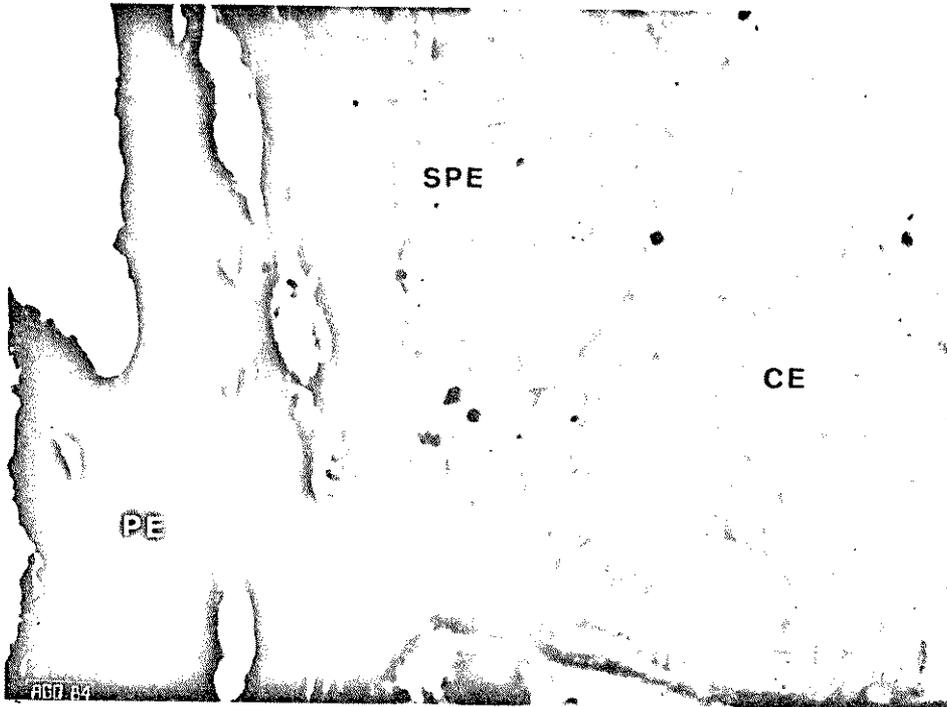


FIGURA 13

O mesmo corte descrito na fig. 12. Notar as diferenças na coloração exibida pelas regiões pericondrial (Pe), subpericondrial (SPE) e cartilagem endocondrial (CE). Comparar com a figura anterior e notar a correspondência entre a intensidade de coloração e a birrefringência. 64X.

retou um hipercromismo, em comparação com o material controle (C4), em todas as regiões de estudo, com exceção dos citoplasmas dos condrócitos, onde a enzima não atuou de forma perceptível sobre a coloração.

Quanto à morfologia, não se observaram alterações que pudessem ser cabalmente atribuídas à hialuronidase. Ao nível do interterritório da cartilagem endocondrial dos cortes enzimaticamente tratados (C3), foram observados grânulos com dimensões aparentemente superiores aquelas anteriormente observadas no material controle (C4). Entretanto, tal fato representa apenas uma impressão visual, sendo necessária a realização de medidas acuradas para determinar a validade desta observação.

1.4.3. Tratamento pela mistura Hialuronidase/Colagenase

Sem exceção, a digestão pela mistura de enzimas hialuronidase/colagenase (C5) provocou um hipocromismo em todas as regiões de estudo, em comparação com o material submetido ao tratamento controle para tal digestão (C6). A análise morfológica revelou apenas discretas alterações já descritas antes, como por exemplo, maior grau de desorganização das fibras pericondriais em função do tratamento enzimático, e variação na distribuição dos grânulos típicos das porções interterritoriais.

1.4.4. Tratamento pela Papaína

Exceto pelo interterritório da cartilagem endocondrial, a digestão pela papaína (C7) provocou um aumento da in-

tensidade de coloração observada em todas as regiões de estudo, em comparação com o assinalado nos cortes controle (C8).

No material digerido pela enzima em questão, o interterritório e o território (domínio e pericelular) da cartilagem endocondrial, exibiram exatamente a mesma intensidade de coloração, não sendo observados os halos claros que circundaramos condrocitos no material submetido ao tratamento controle.

A enzima agiu sobre os citoplasmas, tornando-os visualmente homogêneos e desprovidos dos "grumos", observados no material absolutamente não tratado.

1.4.5. Tratamento pela Alfa-Amilase Bruta

O material tratado pela alfa-amilase bruta (C9) apresentou intensidades de coloração no mínimo iguais, e frequentemente superiores às observadas nos cortes controle para tal digestão (C10).

A nível do subpericôndrio dos cortes tratados somente pelo tampão (C10), os grânulos da matriz interterritorial apresentaram-se ordenados em "filamentos" de forma análoga à descrita no item 1.1.1. A alfa-amilase também provocou uma homogeneidade da resposta, em termos de intensidade de coloração, do interterritório e das duas porções do território (domínio e pericelular) da cartilagem endocondrial (tab. 5).

1.5. Coloração pela técnica de PAS

Os resultados da análise qualitativa, expressos em termos de intensidade de coloração, obtidos após coloração pela

técnica de PAS, estão resumidos na tabela 6.

1.5.1. Cortes não tratados

A fixação não parece ter afetado grandemente a intensidade de coloração das diferentes regiões de estudo. Quanto à morfologia, repetiram-se observações já assinaladas, como aumento aparente do grau de compactação das fibras pericondriais em função da fixação. Ao nível do subpericôndrio, independente mente da fixação, não foi possível individualizar os grânulos da matriz, característicos da região. Entretanto, na região em questão foram observadas "linhas" mais intensamente coradas, que se distribuíram exatamente nas mesmas porções em que foram observados os "grânulos em filamentos", descritos no item 1.1.1. A fixação também não alterou significativamente o padrão de coloração dos citoplasmas dos condrócitos. Em ambos os grupos aqui em discussão, os citoplasmas exibiram aspecto não homogêneo, contendo grumos e granulações PAS-positivos, distribuídos sem padrão específico.

1.5.2. Tratamento pela Hialuronidase Testicular

Após a digestão pela hialuronidase testicular (C3), observou-se uma discreta queda na intensidade de coloração dos cortes em geral, com exceção de certas porções da cartilagem endôcondrial (interterritório e pericelular). Nos citados cortes (C3), ocorreu aparente diminuição dos grânulos PAS-positivos no domínio, sugerindo que os mesmos sejam hialuronidase-sensíveis.

TABELA 6

Intensidades de coloração observadas em cortes obtidos por microtomia de congelação após o teste pela reação de PAS

Regiões Tratamentos	Pericôndrio	Subpericôndrio	Interterritório endocondrial	Território endocondrial (Domínio)	Território endocondrial (Pericelular)	Citoplasmas
C1	++/+++	+++	+++	+++	++++	+++
C2	+++	++/+++	+++	+++/++++	++++	+++
C3	++/+++	++/+++	+++	++	++++	++/+++
C4	+++	+++	+++	+++/++++	++++	+++
C5	++	+ / ++	+	+	++	++
C6	++/+++	++	+++	+++/++++	++++	++/+++
C7	++	++/+++	++/+++	+++/++++	+++/++++	++/+++
C8	+++	++/+++	+++/++++	++/+++	+++/++++	++/+++
C9	++	++/+++	++/+++	++/+++	+++	+++
C10	+++	++/+++	+++	+++/++++	++++	+++

LEGENDA:

- não corada
- + coloração extremamente fraca
- + coloração fraca
- ++ coloração média
- +++ coloração intensa
- ++++ coloração muito intensa
- 0 não observado

A enzima tornou também os citoplasmas visualmente homogêneos, contendo apenas discreta granulação, posto que não foram observadas as grandes massas de material PAS-positivo, descritas no item 1.5.1.

1.5.3. Tratamento pela mistura Hialuronidase/colagenase

A digestão pela mistura de enzimas hialuronidase/colagenase (C5) causou um hipocromismo em todas as regiões de estudo, em comparação com o observado no material controle para tal digestão (tab. 6).

Não foram observadas quaisquer alterações morfológicas além daquelas descritas após o tratamento pela hialuronidase isolada (item 1.5.2.). Uma vez que o tratamento em questão introduziu modificações relacionadas principalmente com a colorabilidade das diferentes regiões, é interessante notar que no material submetido ao tratamento controle (C6), certas regiões dos cortes apresentaram-se menos intensamente corados que o anteriormente registrado nestas mesmas regiões após o tratamento controle para a digestão pela hialuronidase isolada (C4). Isto foi observado a nível do pericôndrio, subpericôndrio e citoplasmas dos condrócitos, e parece indicar certa ação desorganizadora ou solubilizadora por parte do tampão Tris utilizado como solvente da colagenase.

1.5.4. Tratamento pela Papaína

O tratamento pela papaína provocou alterações nas intensidades de coloração exibidas pelas diferentes regiões de estudo, em comparação com o material controle (tab. 6).

Ao nível do subpericôndrio dos cortes submetidos ao tratamento controle (C8), foi observada a presença de material PAS-positivo dispondo-se de forma análoga à "rede de projeções digitiformes", descrita no item 1.1.3. Ao que parece, os grânulos PAS-positivos da porção interterritorial da cartilagem endocondrial são papaína-sensíveis. Os citoplasmas dos condrocitos, por sua vez, mostraram-se visualmente homogêneos, contendo granulação muito fina.

1.5.5. Tratamento pela Alfa-Amilase Bruta

A digestão pela alfa-amilase bruta (C9) introduziu alterações de coloração nas diferentes regiões de estudo, em comparação com o material submetido ao tratamento controle para tal digestão, conforme demonstrado na tabela 6. Quanto à morfologia, a enzima não provocou alterações perceptíveis, que pudessem ser inequivocamente à ela atribuídas.

2. Resultados obtidos após inclusão em Parafina

Fragmentos de cartilagem hialina foram submetidos aos procedimentos descritos nos itens P1 a P15 dos Materiais e Métodos. Os cortes histológicos realizados sobre os blocos de parafina, contendo tais fragmentos, foram submetidos aos testes citoquímicos já citados e posteriormente analisados à microscopia óptica comum e de polarização.

A análise realizada sobre o material incluído em parafina foi, tanto em termos de caráter, quanto em termos de objeto de estudo, a mesma análise levada a efeito sobre os cortes obtidos por congelação. Em outras palavras, realizou-se uma análise qualitativa, que recaiu sobre as mesmas regiões de estudo já descritas.

2.1. Coloração pelo Azul de Toluidina pH 3,4

As respostas à coloração pelo AT pH 3,4, observadas nas diferentes regiões de estudo dos diversos cortes corados, encontram-se sumarizadas na tabela 7.

2.1.1. Cortes não tratados

O material absolutamente não tratado, mas simplesmente fixado pelo paraformaldeído (P1) apresentou um padrão de coloração para as diferentes regiões de estudo conforme indicado na tabela 7. Como já mencionado anteriormente, na região da cartilagem endocondrial, o domínio corou-se menos intensamente que o interterritório vizinho, favorecendo a visualização de halos claros envolvendo os condrôcitos.

Ao nível do interterritório da cartilagem endocondrial foi observada a presença de grânulos metacromáticos, muito similares àqueles descritos nos cortes obtidos por congelação (item 1.1.1.). Os condrôcitos também apresentaram granulações no interior dos citoplasmas.

TABELA 7

Intensidades de coloração observadas em cortes de material incluído em parafina, após teste pelo Azul de Toluidina pH 3,4

Regiões Tratamentos	Pericôndrio	Subperi- côndrio	Interterritório endo- condrial	Territorio endocon- drial (Domínio)	Território endocon- drial (Petricelular)	Citoplas- mas
P1	-+	+/**	**/**	**	***/**	**/**
P2	-/-+	+	**/**	**	***/**	**/**
P3	-+	+	**	+	***	**/**
P4	0	0	+/**	-+	**	***
P5	-	+	+	**/**	***/**	***
P6	-	-	**	+/**	***	**
P7	-	**	+/**	+/**	***	**/**
P8	-	-	-+	-+	+/**	+
P9	-/-+	**/**	***	**	***/**	**/**
P10	-	-	**/**	**	****	**/**
P11	-+	+	**/**	**	***/**	***
P12	-	-	**	+/**	***	***
P13	-	***	***	**/**	****	***/**
P14	-	-	+	-+	**	+
P15	-	+	**	+/**	**/**	+/**

LEGENDA:

- não corada
- + coloração extremamente fraca
- + coloração fraca
- ** coloração média
- *** coloração intensa
- **** coloração muito intensa
- 0 não observado

2.1.2. Tratamento por Cloretos

Tanto no grupo tratado pelo Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) isoladamente (P2), quanto no grupo submetido à ação sequencial dos cloretos de magnésio e cálcio (P3), as fibras pericondriais sofreram severa desorganização. Ao nível do subpericondrio de tais cortes, a ação dos cloretos foi evidente, uma vez que as células fusiformes características da região apresentaram formas mais arredondadas, não sendo observado o acúmulo de material pericelular normalmente visualizado em tal região.

Nos dois grupos em apreço (P2 e P3), os halos claros, envolvendo cada um dos condrocitos foram novamente observados, sendo que nos citoplasmas dos condrocitos, não se observaram alterações de coloração ou morfologia.

2.1.3. Tratamento pelo Ácido Tricloroacético

Após o tratamento pelo TCA à quente, os fragmentos de cartilagem hialina sofreram redução em tamanho que atingiu valores entre 40 e 70% de suas dimensões originais. As porções mais externas dos fragmentos de cartilagem foram progressivamente solubilizadas durante o tratamento, o que impediu a visualização das regiões pericondrial e subpericondrial.

A porção interterritorial da cartilagem endocondrial apresentou variações de resposta ao teste citoquímico em questão, sendo que a intensidade de coloração variou, sem padrão específico, ao longo dos cortes. Na região territorial do endocôndrio, foram observados halos claros envolvendo os condrocitos, e na porção pericelular ocorreu um acúmulo de grânulos me

tacromáticos junto à membrana plasmática dos condrocitos. Aliás, os referidos condrocitos exibiram contornos pouco regulares, e citoplasmas (quando não colapsados) contendo granulações metacromáticas.

2.1.4. Tratamento pelo método de Miller

No material submetido ao método descrito por Miller (1972) para solubilização de colágeno, observaram-se intensidades de coloração conforme sumarizado na tabela 7. O pericôndrio não se corou em absoluto, enquanto que o subpericôndrio teve sua morfologia alterada, exibindo aspecto fibrilar.

A granulação metacromática da matriz interterritorial do endocôndrio sofreu redução, em comparação com o material absolutamente não tratado (P1). Os citoplasmas dos condrocitos responderam diferentemente ao teste citoquímico, de acordo com sua localização no corte, o que sugeriu a idéia de que o tratamento foi mais eficaz nas porções mais periféricas dos fragmentos.

2.1.5. Tratamento pela Hialuronidase Testicular

O tratamento pela hialuronidase testicular (P6) aparentemente afetou principalmente as porções mais periféricas dos fragmentos de cartilagem, em especial as regiões do pericôndrio e subpericôndrio. Em comparação com o material controle (P7), apenas nas regiões citadas é possível perceber claramente a ação da enzima. Nos demais pontos de estudo os resultados são confusos (tab. 7), ora indicando que a hialuronidase aumentou a coloração (interterritório da cartilagem endocondrial), que a enzima

diminuiu a coloração (citoplasma), e ainda, que a enzima não interferiu com a capacidade de ligação do corante (território da cartilagem endocondrial).

Contrariando as observações realizadas sobre os cortes obtidos por microtomia de congelação, as granulações metacromáticas da matriz interterritorial da cartilagem endocondrial, bem como as dos citoplasmas dos condrôcitos, não foram aparentemente afetadas pelo tratamento em discussão.

2.1.6. Tratamento pela Colagenase Bacteriana

O tratamento pela colagenase bacteriana (P8), provocou a diminuição, e por vezes o desaparecimento, da coloração em todas as regiões de estudo, em comparação com o observado no material controle para tal digestão (P9).

Morfologicamente, observou-se que na região interterritorial da cartilagem endocondrial dos cortes controle, os grânulos metacromáticos apresentaram distribuição em grumos, que às vezes lembravam visualmente uma parede de tijolos. Os dois tratamentos em discussão (P8 e P9) afetaram os citoplasmas dos condrôcitos, que apresentaram certo grau de colapso. Mesmo assim, em certas porções foi possível perceber discreta granulação no interior dos mesmos.

2.1.7. Tratamento pela mistura Hialuronidase/Colagenase

O tratamento pela mistura de enzimas hialuronidase/colagenase (P10) parece ter atuado sobremaneira nas regiões

pericondrial e subpericondrial, onde ocorreu a supressão da coloração. Para as demais regiões de estudo, o material enzimaticamente digerido apresentou resultados muito semelhantes ao material controle (P11), que por sua vez não diferiu muito do observado nos cortes absolutamente não tratados (P1).

A periferia dos fragmentos de cartilagem tratados pela mistura de enzimas em aprêço, não se corou em absoluto, o que sugere uma ação preferencial destas enzimas sobre as porções mais externas dos referidos fragmentos. Em vista do acima exposto, não foram observadas alterações morfológicas de grande monta nos dois materiais em discussão, verificando-se, praticamente, uma repetição do descrito nos cortes não tratados (P1).

2.1.8. Tratamento pela Papaína

A digestão pela papaína (P12) provocou a diminuição, e em alguns casos até a eliminação, da coloração verificada em todas as regiões de estudo (tab. 7), comparando-se com o observado no material controle para tal digestão (P13). O referido controle (P13) apresentou intensidades de coloração menores que aquelas registradas no material não tratado em absoluto (P1).

Em concordância com o observado nos cortes obtidos por congelamento, o subpericôndrio dos cortes controle apresentou, ao nível do interterritório, uma distribuição filamentar dos grânulos metacromáticos.

A enzima em questão diminuiu a granulação metacromática do interterritório endocondrial, em comparação com o

controle. Aliás, no controle parece ter havido certa acumulação dos grânulos da região em questão, uma vez que neste caso o interterritório mostrou-se com granulação maior do que o usualmente observado, contradizendo o observado nos cortes obtidos por microtomia de congelação (item 1.1.4.).

2.1.9. Tratamento pela Alfa-Amilase bruta

Em comparação com o observado no material controle (P15), o tratamento pela alfa-amilase bruta (P14) provocou a diminuição e/ou eliminação da coloração registrada nas diferentes regiões de estudo.

Por outro lado, com exceção do pericôndrio, o cita do controle apresentou intensidade de coloração superior à registrada no material não tratado (P1). Tal aumento na intensidade de coloração, aparentemente causado pelo tampão PBS, não ficou tão evidenciado nos cortes obtidos por congelação (item 1.1.5.).

Nos dois materiais em discussão, ao nível da cartilagem endocondrial, o território (em especial, o domínio) corou-se menos intensamente que o interterritório. O tratamento enzimático aparentemente aumentou o grau de colapso verificado nos citoplasmas dos condrôcitos.

2.2. Coloração pelo Azul de Alcian pH 1,0

Com a finalidade de se detectarem as GAGA sulfatadas, lâminas representando os diversos tratamentos, bem como não submetidas a qualquer tratamento, foram simultaneamente coradas pelo AA pH 1,0. A coloração seguiu-se a análise qualitativa, cu

jos resultados encontram-se sumarizados na tab. 8.

2.2.1. Cortes não tratados

As diferentes regiões de estudo dos cortes absolutamente não tratados (P1), apresentaram intensidades de coloração conforme demonstrado na tab. 8. Foi observado certo grau de desorganização na região subpericondrial, que apresentou variação de resposta ao teste citoquímico em questão. A granulação da matriz na região foi bastante evidente, tendo sido também visualizadas figuras muito similares as "projeções digitiformes" observadas nos cortes obtidos por congelação (Ítens 1.1.3. e 1.5.4.).

A região limítrofe entre o subpericôndrio e a cartilagem endocondrial apresentou grande número de grânulos alcianófilos, com dimensões variadas. Os citoplasmas dos condrocitos exibiram granulações muito finas, mas bastante evidentes.

2.2.2. Tratamento por Cloretos

Tanto no material tratado pelo $MgCl_2$ isoladamente, quanto no material tratado seqüencialmente pelo $MgCl_2$ e $CaCl_2$ (P3), foi observada uma sensível variação de resposta ao teste citoquímico em aprêço. Comparando-se os dois tratamentos entre si (tab. 8), percebe-se que eles não afetaram a intensidade de coloração do pericôndrio, interterritório e citoplasma dos condrocitos. Já o tratamento seqüencial pelo $MgCl_2$ e $CaCl_2$ diminuiu a capacidade de ligação das moléculas do corante com o substrato no subpericôndrio e pericelular.

TABELA 8

Intensidades de coloração observadas em cortes de material incluído em parafina, após o teste pelo Azul de Alcian pH 1,0

Regiões Tratamen- tos	Pericôndrio	Subperi- côndrio	Interterritório endo- condrial	Território endocon- drial (Domínio)	Território endocon- drial (Pe- ricelular)	Citoplas- mas
P1	+	+/**	-+	-/-+	****	***
P2	+	**	***	***	****	**/**
P3	+	+/**	***	***	***/**	**/**
P4	0	0	+	+	**	+/**
P5	+	+/**	**/**	+	***	**/**
P6	-	-	**/**	**/**	***	**
P7	-+	-+/**	**/**	**/**	***	**
P8	-+	-+	-+/**	-+/**	+/**	-+/**
P9	-+	+	**	-+	***/**	***
P10	-	-	***	***	***/**	**/**
P11	-+/**	+	**/**	***	***/**	**/**
P12	-/-+	-/-+	-+	-+	-+/**	-+/**
P13	-+	-+/**	**/**	***	***/**	**/**
P14	-+/**	-+/**	-+/**	-+/**	+	-+/**
P15	-+	+	**	***	***	***

LEGENDA:

- não corado
- + coloração extremamente fraca
- + coloração fraca
- ** coloração média
- *** coloração intensa
- **** coloração muito intensa
- 0 não observado

Por outro lado, a comparação individual de qualquer dos dois grupos em discussão (P2 e P3), com o grupo absolutamente não tratado (P1), torna ainda maior a citada variação. Tomando-se por exemplo o grupo tratado pelo $MgCl_2$ e $CaCl_2$ seqüencialmente (P3), nota-se que o tratamento não afetou a coloração do pericôndrio e subpericôndrio, aumentou a coloração do interterritório e do domínio, e diminuiu a coloração pericelular e dos citoplasmas dos condrôcitos.

Foram também observadas severas alterações morfológicas, como remoção de porções do pericôndrio e subpericôndrio. Além disso, visualizaram-se muitas lacunas vazias, indicando que os citoplasmas dos condrôcitos foram removidos durante os tratamentos em questão.

2.2.3. Tratamento pelo Ácido Tricloroacético

Tanto a região pericondrial, quanto a região subpericondrial dos cortes tratados pelo TCA a quente (P4), não foram visualizadas. Tal fato se deu em virtude das razões mencionadas anteriormente (Ítem 2.1.3.). As demais regiões de estudo apresentaram intensidades de coloração conforme exposto na tabela 8.

O interterritório e o domínio da cartilagem endocondrial mostraram-se visualmente homogêneos, e indistinguíveis em termos de intensidade de coloração. Nas duas regiões em questão, o tratamento pelo TCA parece ter aumentado a capacidade de ligação com o corante, em comparação com o material não tratado (P1).

A porção pericelular teve sua extensão aparentemente reduzida, em comparação com o material não tratado. A grande maioria dos condrôcitos sofreu colapso, porém aqueles que preser-

varam sua morfologia apresentaram citoplasmas menos corados que o observado no material não tratado (tab. 7).

2.2.4. Tratamento pelo método de MILLER

O material tratado segundo o método de Miller (1972) para solubilização de colágeno (P5) apresentou intensidades de coloração nas diversas regiões de estudo, conforme registrado na tab. 8.

Ao nível do interterritório da cartilagem endocondrial, foi possível perceber que os grânulos da matriz extracelular apresentaram diâmetros diversos. Nem sempre a porção pericelular foi observada como região distinta, e os citoplasmas dos condrocitos mostraram-se frequentemente colapsados.

A porção mais central dos cortes respondeu ao teste citoquímico de forma extremamente parecida com o observado no material não tratado (P1), sugerindo que o tratamento em questão agiu preferencialmente nas porções mais periféricas dos fragmentos de cartilagem.

2.2.5. Tratamento pela Hialuronidase Testicular

Exceto pelas regiões do pericôndrio e subpericôndrio (onde a ação da hialuronidase testicular resultou na supressão da coloração), não foram observadas diferenças significativas de coloração entre o material tratado enzimaticamente e seu respectivo controle (tab. 8).

Morfologicamente, após a digestão enzimática, verificou-se a ausência da granulação característica da matriz do

interterritório da cartilagem endocondrial. Tal fato concorda com o observado nos cortes obtidos por microtomia de congelação, onde os grânulos em questão mostraram-se hialuronidase-sensíveis.

2.2.6. Tratamento pela Colagenase Bacteriana

A digestão pela colagenase bacteriana (P8) provocou a diminuição da intensidade de coloração de todas as regiões de estudo (exceto o pericôndrio e o domínio), em comparação com os valores registrados nos cortes controle (P9) (tab. 8).

O tratamento enzimático em questão (P8), tornou in distintos o domínio e o interterritório, ambos da cartilagem endo condrial. A diferença de coloração entre as duas regiões foi fa cilmente observada, tanto no material controle, quanto no mate rial não tratado (tab. 8).

Aparentemente, a enzima não alterou a granulação da matriz extracelular, porém, o tratamento controle causou altera ções nos referidos granulos, principalmente no que concerne às dimensões e distribuição dos mesmos. A colagenase tornou os con drocitos visualmente mais homogêneos que no controle, posto que ocorreu acentuada redução da granulação intracitoplasmática.

2.2.7. Tratamento pela mistura Hialuronidase/Colagenase

A ação da mistura de enzimas hialuronidase/colagena se (P10) causou a total eliminação da coloração das regiões peri condrial e subpericondrial, enquanto que nas demais regiões de es tudo a coloração situou-se muito próxima daquela registrada para o material controle (P11) (tab. 8).

Em ambos os tratamentos aqui em discussão, observaram-se discretas alterações no interterritório da cartilagem endocondrial. No material submetido à ação das enzimas, a citada região apresentou-se visualmente homogênea, enquanto que no material controle (P11), os grânulos do interterritório pareceram maiores em tamanho e também mais agrupados do que o observado no material não tratado (P1).

A exemplo do que foi assinalado anteriormente, a mistura hialuronidase/colagenase parece ter agido preferencialmente nas porções mais periféricas dos fragmentos de cartilagem, o que se evidenciou pela ausência de coloração nas porções perimetrais dos cortes.

2.2.8. Tratamento pela Papaína

Exceto pelo pericôndrio, a digestão pela papaína (P12) provocou um hipocromismo, em comparação com o tratamento controle (P13), em todas as regiões de estudo.

A granulação da matriz interterritorial da cartilagem endocondrial foi menor no material enzimaticamente digerido (P12), do que no material controle (P13), onde foram observados grânulos com dimensões variadas, similares aos descritos no item 2.1.8. Mais ainda, não foram visualizados os "grânulos em filamentos" descritos após coloração pelo AT pH 3,4.

2.2.9. Tratamento pela Alfa-Amilase Bruta

A digestão pela alfa-amilase bruta (P14) diminuiu a intensidade de coloração, em comparação com o material contro-

le (P15), em todas as regiões de estudo. O interterritório da cartilagem endocondrial teve sua granulação característica aparentemente reduzida em função da digestão enzimática. Ao nível dos citoplasmas dos condrocitos, a alfa-amilase bruta não só eliminou a granulação intracitoplasmática, como também alterou os contornos celulares, causando acentuado grau de colapso.

2.3. Coloração pelo Azul de Alcian pH 2,5

Os resultados da análise qualitativa, expressos em termos de intensidade de coloração, realizada sobre as diferentes regiões de estudo dos cortes corados pelo AA 2,5, estão sumarizados na tabela 9.

2.3.1. Cortes não tratados

Nos cortes absolutamente não tratados (P1), verificou-se a ausência de coloração no interterritório e no domínio da cartilagem endocondrial. As demais regiões de estudo coraram-se como exposto na tabela 9.

A porção de cartilagem endocondrial, situada imediatamente abaixo do subpericôndrio, apresentou grânulos intensamente alcianófilos, maiores que os grânulos usualmente observados. Os citados grânulos alcianófilos com dimensões alteradas são análogos àqueles descritos no item 2.2.1., uma vez que apresentam a mesma morfologia e ocorrem na mesma região.

Foi registrada a presença de granulações no subpericôndrio e também no interior dos citoplasmas dos condrocitos, sendo que em ambos os casos não se observaram alterações

TABELA 9

Intensidades de coloração observadas em cortes de material incluído em parafina, após o teste pelo Azul de Alcian pH 2,5

Regiões Tratamentos	Pericôndrio	Subperi- côndio	Interteri- tório endo- condrial	Território endocon- drial (Domínio)	Território endocon- drial (Pe- ricelular)	Citoplas- mas
P1	+	+++	-	-	+++	++/+++
P2	+	+/++	+/++	+	++/+++	+++
P3	+	++/+++	-+	-+	++/+++	++/+++
P4	0	0	-+	-+	++	++/+++
P5	-+	+++	-+/+	-+	+++/>++++	+++/>++++
P6	-+	-+	++/+++	++/+++	+++	++/+++
P7	-+/+	+	+++	+++	++++	+++/>++++
P8	-+	-+	+/++	+/++	+++	+++
P9	+	+++	++/+++	++/+++	+++	++/+++
P10	-+	-	+++	+++	+++/>++++	+++
P11	-+	+	+++	+++	++++	+++
P12	-+	-+	+/++	+/++	++/+++	++/+++
P13	-+	+	+++	+++	+++/>++++	+++/>++++
P14	-+	+	++	+/++	++/+++	++/+++
P15	-+	++/+++	+++/>++++	+++/>++++	++++	+++

LEGENDA:

- não corados
- + coloração extremamente fraca
- + coloração fraca
- ++ coloração média
- +++ coloração intensa
- ++++ coloração muito intensa
- 0 não observado

na morfologia, dimensões ou distribuição das citadas granulações.

2.3.2. Tratamento por Cloretos

Tanto o tratamento pelo $MgCl_2$ isolado (P2), quanto o tratamento seqüencial pelo $MgCl_2$ e $CaCl_2$ (P3), alteraram a coloração nas diferentes regiões de estudo, em comparação com os valores registrados para o material não tratado em absoluto (P1).

Comparando-se as colorações registradas em cada uma das regiões de estudo, percebe-se que ora os tratamentos em questão aumentaram a coloração, ora diminuíram-na, o que dificulta uma conclusão. Por outro lado, em ambos os tratamentos aqui em discussão (P2 e P3) os condrôcitos foram afetados, sendo muito comum a observação de lacunas e também restos de citoplasmas colapsados.

2.3.3. Tratamento pelo Ácido Tricloroacético

Pelas mesmas razões citadas anteriormente, as regiões do pericôndrio e subpericôndrio dos cortes tratados pelo TCA a quente (P4), não puderam ser visualizadas. O tratamento foi também responsável pela eliminação da granulação alcianofila normalmente observada ao nível do interterritório da cartilagem endocondrial.

Não foi possível distinguir o domínio do interterritório vizinho, em virtude da coloração apresentada pelas duas regiões. Quanto aos citoplasmas dos condrôcitos, a gran

de maioria deles apresentou sinais variados de colapso, sendo que não se observaram granulações no interior dos mesmos.

2.3.4. Tratamento pelo método de MILLER

As intensidades de coloração observadas nas seis regiões de estudo, após o tratamento pelo método de Miller (1972) para solubilização de colágeno (P5), estão expostas na tabela 9. As principais alterações detectadas foram: maior desorganização das fibras pericondriais em função do tratamento; certo grau de variação na resposta ao teste citoquímico, principalmente a nível do interterritório da cartilagem não subpericondrial; e ainda, grande acúmulo de material fortemente alcianófilo a nível da porção pericelular do território da cartilagem endocondrial.

2.3.5. Tratamento pela Hialuronidase Testicular

A digestão pela hialuronidase testicular (P6) provocou um hipocrismo generalizado em todas as regiões de estudo, em comparação com o observado no material controle (P7) (tab. 9). A enzima foi também responsável pelo desaparecimento dos grânulos da matriz interterritorial da cartilagem do endocôndrio, o que vem a confirmar que tais grânulos parecem ser hialuronidase-sensíveis (itens 2.1.5. e 2.2.5). Para as demais regiões de estudo, o que diferenciou os dois grupos em discussão foi, principalmente, a intensidade de coloração, posto que não se detectaram alterações de cunho morfológico.

2.3.6. Tratamento pela Colagenase Bacteriana

As diversas regiões de estudo dos cortes digeridos pela colagenase bacteriana (P8), apresentaram intensidades de coloração no máximo iguais, e frequentemente inferiores (exceção para os citoplasmas) àquelas registradas nos cortes submetidos ao tratamento controle.

O tratamento enzimático (P8), provocou severa desorganização nas fibras pericondriais, bem como o desaparecimento dos grânulos da matriz extracelular do interterritório da cartilagem endocondrial. Tais grânulos, no material controle (P9), apresentaram dimensões e distribuição similares aos grânulos presentes no material não tratado em absoluto.

2.3.7. Tratamento pela mistura Hialuronidase/Colagenase

Tanto o tratamento pela mistura de enzimas hialuronidase/colagenase (P10), quanto seu respectivo controle (P11), parecem ter agido preferencialmente nas porções pericondrial e subpericondrial dos fragmentos de cartilagem. No material enzimaticamente tratado (P10) observou-se uma severa desorganização das fibras pericondriais, a eliminação da coloração do subpericôndrio, e também certo grau de remoção dos grânulos alcianofílicos da matriz do interterritório endocondrial, em comparação com o material cujo tratamento incluiu tão somente a solução tampão (P11).

Quanto às demais regiões de estudo, não foram observadas diferenças morfológicas perceptíveis. No que tange

ã coloração, a análise da tabela 9 revela que entre as citadas regiões de estudo não foi observada qualquer diferença na intensidade de coloração.

2.3.8. Tratamento pela Papaína

O tratamento pela papaína (P12) provocou um hipocromismo nas diversas regiões de estudo (exceto pericôndrio), em comparação com os valores registrados no material controle.

No material submetido à ação enzimática, os aspectos morfológicos mais evidentes foram, a severa desorganização das fibras pericondriais e a eliminação da granulação do interterritório da cartilagem endocondrial. Aliás, acrescente se que tal diminuição da granulação do interterritório, coincide com achados anteriores (itens 2.1.8. e 2.2.8.) que indicam serem os referidos grânulos papaína-sensíveis. Os citoplasmas dos condrocitos apresentaram-se finamente granulados, porém, a digestão pela papaína aumentou o grau de colapso das células em comparação com o material controle para a citada digestão (P13).

2.3.9. Tratamento pela Alfa-Amilase Bruta

A digestão pela Alfa-amilase bruta (P14) provocou a diminuição da intensidade de coloração de todas as regiões de estudo (exceto pericôndrio), em comparação com o observado no material tratado somente pela solução tampão (P15).

A desorganização das fibras pericondriais, bem como a impossibilidade de caracterização morfológica do subpericôndrio em vista da fraca intensidade de coloração exibida, foram características comuns aos dois materiais em discussão.

Mesmo ao exame visual, percebe-se que a enzima agiu preferencialmente nas porções mais externas dos fragmentos de cartilagem, como já mencionado anteriormente. Mais ainda, nem sempre foi possível perceber a presença das granulações alcianófilas no interior dos citoplasmas dos condrôcitos.

2.4. Coloração pelo Xilidine Ponceau pH 1,7

Após a coloração pelo XP 1,7, realizou-se a análise qualitativa dos diversos cortes corados, sendo que os resultados de tal análise (em termos de intensidade de coloração observada), encontram-se sumarizados na tabela 10.

2.4.1. Cortes não tratados

Os cortes absolutamente não tratados (P1) apresentaram o pericôndrio com coloração muito intensa, apesar da relativa desorganização das fibras pericondriais. Ao nível do subpericôndrio observou-se uma certa gradação na coloração, posto que as porções mais próximas do pericôndrio apresentaram-se mais intensamente coradas que as porções mais afastadas. A granulação do interterritório subpericondrial foi facilmente observada, sendo que ocorreu acúmulo de tal material na porção periférica das células fusiformes da região.

TABELA 10

Intensidades de coloração observadas em cortes de material incluído em parafina, após o teste pelo Xilidine Ponceau pH 1,7

Regiões Tratamentos	Pericôndrio	Subperi- côndrio	Interterri- tório endo- condrial	Território endoton- drial (Domínio)	Território endocon- drial (Pe- ricelular)	Citoplas- mas
P1	++++	++/+++	++	++	++	+++
P2	+++	++	-+	-+	-+	+ / ++
P3	+++	++	-+	-+	-+	++
P4	0	0	-+	-+	+ / ++	++ / +++
P5	++ / +++	+ / ++	- / -+	- / -+	- / -+	++ / +++
P6	+++	++ / +++	-+	- / -+	- / -+	+++
P7	+++	++ / +++	-+ / +	-+ / +	-+ / +	+++
P8	++	+	-+	+	+	+++
P9	++ / +++	++	- / -+	-+	-+	+++
P10	+++	++ / +++	-+	-+	+	++ / +++
P11	+++	++	- / -+	- / -+	- / -+	++ / +++
P12	+++	+++	+	+ / ++	+ / ++	++ / +++
P13	++ / +++	++ / +++	-+	-+	-+	+++ / ++++
P14	+++ / ++++	+++	++ / +++	++ / +++	+++	+++ / ++++
P15	+++	++ / +++	+	- / -+	- / -+	++ / +++

LEGENDA: - não corado
 -+ coloração extremamente fraca
 + coloração fraca
 ++ coloração média
 +++ coloração intensa
 ++++ coloração muito intensa
 0 não observados

Ao nível da cartilagem endocondrial observou-se que o interterritório, o domínio e o pericelular apresentaram a mesma intensidade de coloração (tab. 10), o que tornou as três regiões citadas visualmente indistintas umas das outras. Mesmo assim, foi possível perceber a presença da granulação na matriz extracelular.

Os condrócitos, de uma forma geral, apareceram bem corados em toda a extensão do corte, de tal sorte que o núcleo e uma fina granulação intracitoplasmática foram normalmente observados.

2.4.2. Tratamento por Cloretos

Tanto o tratamento pelo $MgCl_2$ isoladamente, quanto o tratamento seqüencial pelo $MgCl_2$ e $CaCl_2$ (P3), provocaram um hipocromismo em comparação com o material não tratado em absoluto (P1), para todas as regiões de estudo (tab. 10). Entretanto, não se verificou tal diferença quando se compararam os dois tratamentos entre si.

O desarranjo das fibras pericondriais, bem como o colapso das células fusiformes do subpericôndrio, foram alterações morfológicas comuns aos dois tratamentos em questão. Foi observada também a presença de grânulos mais intensamente corados no subpericôndrio e interterritório da cartilagem endocondrial, sendo que tal granulação não pareceu ter sido afetada por qualquer dos tratamentos citados. Nos citoplasmas dos condrócitos observou-se que o tratamento seqüencial pelo $MgCl_2$ e $CaCl_2$ (P3) provocou um maior grau de colapso que o tratamento pelo $MgCl_2$ isolado.

2.4.3. Tratamento pelo ácido Tricloroacético

Conforme dito anteriormente (Ítem 2.1.3.), o tratamento pelo TCA aquecido (P4) provocou tal grau de desorganização nos fragmentos de cartilagem, que impossibilitou a visualização das regiões pericondrial e subpericondrial. Quanto às demais regiões de estudo, observou-se que todas elas exibiram intensidades de coloração inferiores àquelas assinaladas para o material absolutamente não tratado (P1).

Ao nível do interterritório da cartilagem endocondrial foi observada a presença de discreta granulação da matriz. A porção pericelular, por seu turno, parece ter sofrido redução em extensão, enquanto que uma grande parte dos condrocitos apresentaram-se com citoplasmas colapsados.

2.4.4. Tratamento pelo método de MILLER

Nos cortes submetidos ao método de Miller (1972) para a solubilização de colágeno (P5), observaram-se intensidades de coloração inferiores àquelas registradas no material não tratado em absoluto (P1), em todas as regiões de estudo.

As fibras pericondriais desorganizaram-se em função do tratamento. O subpericôndrio pareceu mais intensamente corado nas porções mais próximas do pericôndrio, porém permitindo a observação da granulação da matriz. Ao nível do interterritório da cartilagem endocondrial, foi possível perceber uma granulação muito similar àquela descrita para o subpericôndrio.

A grande maioria dos condrocitos observados apresentou-se com citoplasma colapsado, e frequentemente deslocado

da lacuna condrocitária (o que se percebeu pela sobreposição parcial de material citoplasmático na matriz). A variação de resposta ao teste citoquímico sugere que o tratamento foi mais eficaz nas porções mais periféricas dos fragmentos de cartilagem.

2.4.5. Tratamento pela Hialuronidase Testicular

Após a digestão pela hialuronidase testicular (P6) as diversas regiões de estudo apresentaram intensidades de coloração no máximo iguais, e geralmente inferiores às aquelas registradas no material tratado na ausência da dita enzima (P7). Mesmo o material controle (P7) corou-se menos intensamente que o material não tratado em absoluto (P1).

Morfologicamente, observou-se que o tratamento enzimático (P6) foi responsável pela diminuição da granulação da matriz, principalmente a nível do interterritório da cartilagem endocondrial. Mais ainda, o tratamento provocou também um aumento aparente no número de condrocitos com citoplasmas colapsados.

2.4.6. Tratamento pela Colagenase Bacteriana

A colagenase bacteriana (P8) provocou a diminuição de intensidade de coloração observada em todas as regiões de estudo (exceto citoplasmas dos condrocitos), em comparação com o material controle (P9).

A enzima em questão (P8) provocou um acentuado desarranjo no pericôndrio, alterando a disposição das fibras pericôndriais. No material enzimaticamente tratado não foram observados os "grânulos em filamento" na matriz do subpericôndrio, que

foram normalmente visualizados no material submetido ao tratamento controle. O interterritório da cartilagem endocondrial respondeu de forma variada ao tratamento enzimático, o que sugere que a enzima agiu diferentemente ao longo do corte.

2.4.7. Tratamento pela mistura Hialuronidase/Colagenase

O tratamento pela mistura de enzimas hialuronidase/colagenase (P10), assim como seu respectivo controle (P11), provocaram respostas ao teste citoquímico em aprêço conforme demonstrado na tabela 9. Os fragmentos de cartilagem submetidos ao tratamento enzimático exibiram suas porções periféricas bem mais afetadas que o restante, indicando dificuldade na penetração da solução enzimática, o que acarretou resultados bastante confusos e difíceis de serem analisados. Mesmo assim, foi possível perceber que a granulação da matriz não desapareceu por completo após o tratamento enzimático (P11) no subpericôndrio, interterritório endocondrial e citoplasma dos condrôcitos.

2.4.8. Tratamento pela Papaína

O tratamento pela papaína (P12) provocou um aumento na intensidade de coloração exibida por todas as regiões de estudo, em comparação com os valores observados no material controle (P13). Entretanto, após a digestão enzimática as intensidades de coloração observadas nas diferentes regiões de estudo apresentaram-se muito próximas daquelas observadas no material não tratado (P1). O tratamento enzimático em questão parece ter agido preferencialmente nas porções periféricas dos fragmentos de

cartilagem, o que foi visualmente evidenciável por uma faixa nítida que acompanhou o contorno dos ditos fragmentos.

2.4.9. Tratamento pela Alfa-Amilase Bruta

A digestão pela alfa-amilase bruta (P14) provocou um hipercromismo em todas as regiões de estudo (exceto citoplasma dos condrócitos), em comparação com os valores registrados para o material controle (P15).

Em ambos os tratamentos em discussão o pericôndrio e o subpericôndrio exibiram a mesma intensidade de coloração (tab. 10). Este mesmo fato também foi verificado para as duas porções do território endocondrial.

A região próxima do subpericôndrio foi a que apresentou sinais mais evidentes de variação de resposta à ação enzimática, novamente sugerindo que a enzima não agiu de modo uniforme sobre toda a extensão do corte.

2.5. Coloração segundo a técnica de PAS

Os resultados da análise qualitativa, expressos em termos de intensidade de coloração observada nas seis regiões de estudo dos diversos cortes, estão sumarizados na tabela 11.

2.5.1. Cortes não tratados

No material absolutamente não tratado (P1), tanto a região pericondrial, quanto a região subpericondrial, apresen-

TABELA 11

Intensidades de coloração observadas em cortes de material incluído em parafina, após o teste pela reação de PAS

Regiões Tratamen- tos	Pericôndrio	Subperi- côndrio	Interterri- tório endo- condrial	Território endocon- drial (Domínio)	Território endocon- drial (Pe- ricelular)	Citoplas- mas
P1	++/+++	++/+++	+++	+++	+++	++++
P2	+ / ++	++	+++	+++	+++ / +++++	++++
P3	+ / ++	++	++ / +++	++ / +++	+++	++++
P4	0	0	+++	++ / +++	+++ / +++++	+++
P5	+ / ++	+++	+++	++ / +++	++ / +++	++++
P6	-+ / +	-+	+ / ++	-+	-+	+++
P7	+ / ++	++	++ / +++	+	+	++++
P8	-+ / +	-+ / +	-+	-+	-+ / +	+++
P9	+ / ++	++	++	+	+ / ++	+++ / +++++
P10	+	+	+ / ++	+ / ++	+ / ++	+++ / +++++
P11	+ / ++	+ / ++	++	+ / ++	+ / ++	+++ / +++++
P12	-+	-+ / +	+ / ++	+ / ++	+ / ++	+ / ++
P13	+ / ++	++	++ / +++	++	++	+++
P14	-+	+ / ++	++	++ / +++	+++	+++ / +++++
P15	+ / ++	++	++ / +++	+ / ++	+ / ++	+++ / +++++

LEGENDA: - não corado
 -+ coloração extremamente fraca
 + coloração fraca
 ++ coloração média
 +++ coloração intensa
 ++++ coloração muito intensa
 0 não observado

taram-se visualmente homogêneas, e com a mesma intensidade de coloração. No subpericôndrio, não foi observada a granulação característica.

A matriz do interterritório da cartilagem endocondrial apresentou-se com aspecto uniforme, embora possuísse uma granulação muito fina, difícil de ser visualizada. Não houve qualquer coloração preferencial do interterritório ou do território da cartilagem endocondrial. Os citoplasmas dos condrocitos apresentaram-se com granulações intensamente PAS-positivas, cujas dimensões e distribuição foram bastante variadas.

2.5.2. Tratamento por Cloretos

Tanto o material tratado pelo $MgCl_2$ isoladamente (P2), quanto o material tratado pelo $MgCl_2$ e $CaCl_2$ (P3), apresentaram um generalizado hipocromismo nas diferentes regiões de estudo, em comparação com os valores registrados no material não tratado (P1). A desorganização das fibras pericondriais foi uma característica comum aos dois materiais em discussão.

No material tratado pelo $MgCl_2$ isoladamente, na região de transição entre o subpericôndrio e a cartilagem não subpericondrial (endocôndrio), foi observada a presença de sérios artefatos; as lacunas condrocitárias pareceram dilatadas, como que "rasgando" a matriz envolvente. Note-se que a região acima referida é a mesma onde foram observados os grânulos alcianófilos com dimensões superiores às usuais, descritos ao longo dos itens 2.2. e 2.3.

Artefatos similares puderam também ser observados ao nível do interterritório endocondrial do material tratado pe

lo $MgCl_2$ isoladamente. O mesmo interterritório apresentou-se fi
namente granulado, nos dois materiais em discussão. Os cito
plasmas dos condrocitos, independentemente do tratamento efetuado, sofreram elevado grau de colapso. Após o tratamento seqüencial pelo $MgCl_2$ e o $CaCl_2$, foi observado um grande número de lacunas condrocitárias, desprovidas de qualquer conteúdo celular.

2.5.3. Tratamento pelo Ácido Tricloroacético

Conforme explicado anteriormente, o tratamento pelo TCA a quente (P4) impossibilitou a observação das regiões do pericôndrio e subpericôndrio.

O interterritório endocondrial apresentou-se repleto de grânulos PAS-positivos. A granulação da matriz tornou-se ainda mais nítida ao nível do território endocondrial, mais especificamente no domínio. Os citoplasmas dos condrocitos foram bastante afetados pelo tratamento em aprêço, sendo difícil distinguir os aspectos morfológicos dos mesmos. Ainda assim, em alguns casos percebeu-se a presença de granulações similares aque
las descritas no material não tratado (P1).

2.5.4. Tratamento pelo método de MILLER

O tratamento pelo método de Miller (P5) introduziu alterações perceptíveis principalmente ao nível do pericôndrio, onde verificou-se uma diminuição da intensidade de coloração e um aumento do grau de desorganização das fibras pericondriais ambos em comparação com o observado no material não tratado em absoluto (P1).

Quanto aos condrôcitos observou-se que somente aqueles situados nas porções mais externas dos cortes apresentaram sinais de alterações (principalmente quanto à forma celular), enquanto que os situados mais internamente mostraram-se com o mesmo aspecto descrito no material não tratado (P1). Tal fato é mais um indicador de que o tratamento em questão não agiu homogeneamente em toda a extensão dos cortes.

2.5.5. Tratamento pela Hialuronidase Testicular

A digestão pela hialuronidase testicular (P6), provocou um hipocromismo, em comparação com o observado após o tratamento controle (P7) (tab. 11). A granulação da matriz interterritorial do subpericôndrio e da cartilagem endocondrial, também sofreram redução em função da ação enzimática.

Em ambos os tratamentos em discussão o território endocondrial como um todo corou-se menos intensamente que o interterritório vizinho, o que tornou os halos claros que envolvem os condrôcitos muito mais contrastantes com o citoplasmas fortemente corados (tab. 11).

2.5.6. Tratamento pela Colagenase Bacteriana

A digestão pela colagenase bacteriana (P8) provocou um hipocromismo em todas as regiões de estudo, em comparação com o observado no material controle (P9). Mais ainda, a citada enzima causou severíssimas alterações no pericôndrio, cujas fibras chegaram a ser removidas do restante do corte em diversos pontos.

A colagenase parece ter agido também sobre os citoplasmas dos condrôcitos, uma vez que nos cortes por ela digeridos (P8), foi muito difícil observar um citoplasma intacto. Entretanto, quando visualizados, tais citoplasmas exibiram granulações PAS-positivas, sem distribuição específica.

2.5.7. Tratamento pela mistura Hialuronidase/Colagenase

O tratamento pela mistura de enzimas hialuronidase/colagenase (P10) provocou hipocromismo, em comparação com o material controle (P11), somente nas regiões de estudo mais externas dos cortes (tab. 11). Tal fato, mais uma vez sugere que a dita mistura enzimática não atuou de forma homogênea ao longo de toda a extensão dos cortes.

Morfologicamente, a característica que mais chamarou a atenção foi o desaparecimento da granulação subpericondrial, após a digestão pelas enzimas em aprêço, e também o fato de que os citoplasmas dos condrôcitos não pareceram ter sido afetados pelos tratamentos citados (P10 e P11).

2.5.8. Tratamento pela Papaína

As intensidades de coloração registradas nas diferentes regiões de estudo após a digestão pela papaína (P12), ou após o tratamento controle para tal digestão (P13), estão sumarizadas na tabela 11.

Somente ao nível das regiões de estudo com localização mais externa nos fragmentos de cartilagem, a ação da papa

paína provocou uma diminuição da coloração observada. Assim sendo, tem-se a impressão de que o tratamento enzimático em aprêço não foi homogêneo ao longo do corte. Aliás, a nível morfológico tal impressão tornou-se ainda mais evidente, uma vez que a granulação da matriz extracelular não foi alterada pela enzima, contrariando assim os achados anteriormente descritos neste trabalho.

2.5.9. Tratamento pela Alfa-Amilase Bruta

A digestão pela alfa-amilase bruta (P14), provocou a diminuição da intensidade de coloração observada em todas as regiões de estudo, em comparação com o material controle (P15), conforme exposto na tabela 11.

A solução enzimática não parece ter sido muito eficaz na remoção dos grânulos PAS-positivos da matriz. Ao nível do subpericôndrio e do interterritório endocondrial, quer dos cortes digeridos pela enzima (P14), quer dos cortes tratados somente pela solução tampão (P15), os citados grânulos foram normalmente observados.

DISCUSSÃO

A planificação geral dos experimentos realizados no presente trabalho, baseada em procedimentos de extração química ou enzimática, demandou a necessidade de tratamentos controle, que permitissem estimar o grau de alteração provocado pelo agente químico ou enzimático. Uma vez que a detecção dos componentes macromoleculares da matriz se fez por técnicas citológicas, mesmo discretas variações de coloração podem ter significado, na medida em que podem revelar alterações no conteúdo de um determinado componente.

Entretanto, cortes não tratados, (fixados ou não pelo paraformaldeído), não representam controles confiáveis, uma vez que não possibilitam determinar a ação de fatores inespecíficos, inerentes à própria incubação. Tais fatores são representados, principalmente, pela imersão relativamente prolongada em meio aquoso, além da temperatura, sendo que a capacidade dos referidos fatores de alterar a ultra-estrutura da cartilagem hialina já foi demonstrada (THYBERG et al. 1973). Assim, cada tratamento enzimático possui um tratamento controle, que via de regra consistiu de incubação em solução tampão desprovida da respectiva enzima, realizada simultaneamente com o tratamento enzimático.

As digestões enzimáticas em bloco não agiram da mesma forma sobre todas as regiões de estudo citadas, o mesmo ocorrendo com os tratamentos químicos dissociativos. Excetuando-se as porções mais externas dos fragmentos de cartilagem tratados, não foi possível detectar qualquer ação dos tratamentos

nas porções da cartilagem endocondrial (interterritório, domínio e pericelular).

Isto ocorreu por dificuldades inerentes à penetração das soluções utilizadas, e à técnica histológica subsequente às incubações. Observe-se que de um fragmento de cartilagem de forma cúbica, devidamente tratado e incluído em parafina, somente a região perimetral esteve realmente submetida a ação do tratamento. Tal região foi removida pelos primeiros cortes histológicos (os mais superficiais), e a partir de então, os cortes obtidos apresentaram somente suas porções mais externas efetivamente tratadas. Ocorre que tais porções mais externas dos cortes não foram consideradas durante a análise realizada, por apresentarem alterações de caráter mecânico, introduzidas quando da fragmentação do material.

Considerando-se que as dimensões médias dos fragmentos de cartilagem aqui utilizados não são significativamente diferentes daquelas registradas na literatura, e ainda, considerando-se que nosso objetivo foi a repetição o mais fiel possível de tratamentos anteriormente descritos, fica evidente que tais relatos são passíveis de crítica no que tange à eficiência dos métodos propostos para remoção de PG, em especial no rendimento total esperado dos mesmos.

Pelos motivos citados, os resultados obtidos sobre cortes por congelamento serão discutidos separadamente daqueles obtidos após tratamentos em bloco.

PERICÔNDRIO. O pericôndrio da cartilagem hialina é constituído por células alongadas (fibroblastos), densamente aranjadas em meio a fibras colagênicas especialmente ricas em co

lãgeno tipo I. Associada às fibras de colãgeno ocorre pequena quantidade de material proteoglicãnico, sintetizado e secretado pelos prãprios fibroblastos (WEISS & GREEP, 1977), bem como gli coproteĩnas estruturais não colagãnicas (GPEs). Tanto as PG quanto as GPEs desempenham comprovado papel estabilizador nos feixes de colãgeno (VIDAL, 1980b; YAMADA, 1983).

Nos materiais absolutamente não tratados (C1 e C2), os testes citoquĩmicos para detecção da basofilia pelo Azul de Toluidina (AT), produziram respostas pouco intensas, em virtude da pequena quantidade de radicais negativos disponĩveis no pericãndrio. Os testes pelo Azul de Alcian (AA) pH 1,0 e 2,5 indicam que os mencionados radicais negativos, evidenciados pelo AT são principalmente GAGA sulfatadas. Analogamente, a intensa resposta alĩ observada apãs coloração pelo Xilidine Ponceau (XP) e PAS, deveu-se no primeiro caso ao elevado teor colagãnico da região (VIDAL, 1980a), e no segundo caso ao carãter glicoprotẽico das prãprias molẽculas de colãgeno I (ANDERSON, 1976; WEISS & GREEP, 1977).

A birrefringẽncia do pericãndrio dos cortes não tratados (figs. 02 e 03), permite concluir que a orientação da grande maioria das molẽculas de colãgeno alĩ presentes ẽ paralela ao longo eixo do corte. Entretanto, a observação de birrefringẽncia no pericãndrio, quando este encontrava-se com seu eixo longitudinal paralelo ao polarizador (fig. 03), revela a existẽncia de fibras e feixes orientados a 45º do referido eixo longitudinal do pericãndrio. Tais fatos permitem-nos propor que os componentes fibrilares do pericãndrio apresentam-se dispostos como numa rãde, cujos fios se entrecruzam em trẽs direções principais.

A hialuronidase testicular degrada o AcH e os CS-4 e CS-6, rompendo as ligações glicosídicas e produzindo principalmente tetrassacarídeos, embora dissacarídeos e uns poucos oligossacarídeos maiores possam ser formados, todos eles com caráter redutor (LISON, 1960c; PEARSE, 1972). No pericôndrio, a digestão pela hialuronidase testicular (C3) removeu totalmente as PG ali existentes, eliminando completamente a basofilia. Mais ainda, tal remoção promoveu a exposição dos radicais das moléculas de colágeno que interagem com as moléculas de PG extraídas, o que se traduziu em intensa coloração após XP e PAS.

A colagenase bacteriana atua sobre as moléculas de colágeno de cortes obtidos por congelamento (LISON, 1960b), liberando peptídeos contendo hidroxiprolina (PEARSE, 1972). O tratamento pela mistura de enzimas hialuronidase testicular/colagenase bacteriana (C5), provocou não só a remoção das PG do pericôndrio (principalmente pela ação de hialuronidase), como também a solubilização parcial das moléculas de colágeno ali presentes, que na ausência das PG envolvidas na sua estabilização, foram facilmente removidas pela colagenase (mesmo nas reduzidas concentrações de enzima utilizadas). Os resultados observados após os testes citoquímicos para a detecção da basofilia, comprovam a remoção do material proteoglicânico, enquanto que a redução da coloração pelo XP e PAS indica a queda do teor colagênico.

A enzima proteolítica papaína (C7), nas condições em que foi utilizada (THYBERG et al. 1973), ataca o "core" protéico das PG, liberando fragmentos constituídos de curtas

seqüências peptídicas, às quais permanece ligada uma única cadeia de Condroitin-Sulfato (MATHEWS, 1971). Uma vez que o tratamento removeu material proteoglicânico, são condizentes os resultados observados no pericôndrio, em especial a supressão da basofilia e o aumento da coloração pelo XP (devida à exposição de radicais colagênicos anteriormente comprometidos com as PG). A redução da coloração pela técnica de PAS indica que o tratamento provocou certa remoção de material glicoprotéico. Considerando-se que a enzima não agiu sobre as moléculas de colágeno, em vista da resposta à coloração pelo XP, só nos resta pensar que o material glicoprotéico removido seja constituído por glicoproteínas não colagênicas (talvez mesmo estruturais), que tornaram-se lábeis após a remoção das PG.

A alfa-amilase bruta frequentemente apresenta elevado grau de contaminação por ribonucleases não específicas (PEARSE, 1972). Embora em nosso trabalho não tenha sido feito qualquer teste de pureza, é muito provável que a enzima aqui utilizada também apresente tal contaminação, uma vez que ela foi capaz de remover a maior parte da metacromasia dos citoplasmas (tabs. 1, 2 e 3).

Independentemente da mencionada ação ribonucleásica, a alfa-amilase bruta (C9) age sobre os radicais glicídicos das GPEs e do colágeno, propiciando a desestabilização e até mesmo remoção de glicoproteínas não colagênicas (ANDERSON, 1976). Ao nível do pericôndrio, tal ação da enzima pôde ser comprovada pelo discreto aumento na coloração pelo XP, devido à maior exposição de moléculas de colágeno, e também pela discreta queda na coloração pela técnica de PAS, em virtude da diminuição do conteúdo glicoprotéico (não colagênico) na região.

No pericôndrio não foram percebidas, de uma forma geral, grandes diferenças (morfológicas ou de intensidade de coloração após os testes citoquímicos realizados) entre o material não tratado e os materiais submetidos aos diversos tratamentos controle. Tal fato deve ser interpretado não como um reflexo da não ocorrência de quaisquer alterações em função dos tratamentos controle, mas sim, porque as prováveis alterações ocorridas não atingiram magnitude suficiente para serem detectadas ao nível qualitativo.

SUBPERICÔNDRIO. Conforme já dito antes, o subpericôndrio é entendido como uma região situada imediatamente abaixo do pericôndrio, constituída por uma camada de 6 a 8 células fusiformes. Tais células apresentam o citoplasma visualmente mais denso, e núcleos mais evidentes que os condrocitos da cartilagem endocondrial. A matriz que as envolve difere daquela do endocôndrio, uma vez que as fibras colagênicas pericondriais inserem-se de forma mais ou menos difusa no subpericôndrio (MINNS & STEVEN, 1977; ZAMBRANO et al. 1982). Qualitativamente, a composição básica do subpericôndrio engloba colágenos do tipo I e II, PG e glicoproteínas não colagênicas. O colágeno I está representado justamente pelas porções de fibras pericondriais que adentram o subpericôndrio, enquanto que o colágeno II é produto de síntese dos condrocitos subpericondriais.

Proporcionalmente à área, o subpericôndrio parece apresentar maior quantidade de PG, AA e AT-positivas, do que o endocôndrio subjacente. O acúmulo de material intensamente metacromático após reação com o AT, na matriz que envolve os condrocitos do subpericôndrio, e, a metacromasia dos cito

plasmas, que é bem mais intensa no subpericôndrio do que no endocôndrio, parecem revelar um maior teor proteoglicânico nas células da primeira região. Tal fato está em concordância com os achados de QUINTARELLI & DELLOVO (1966), que afirmam serem os condrocitos do subpericôndrio (em animais adultos) os principais responsáveis pela síntese de Condroitin-Sulfato (CS), componente obrigatório das PG da cartilagem hialina.

Um aspecto morfológico característico do subpericôndrio foi a presença dos chamados "grânulos em filamentos", no interterritório de tal região. Tais grânulos, como já dito, são basófilos metacromáticos, dicrômicos, XP e PAS-positivos. O aspecto filamentar com que os mesmos foram observados, sugere uma "estratificação" do material glicosaminoglicânico das PG, que se daria paralelamente ao longo eixo das fibras colágenicas presentes na região. Tal idéia é perfeitamente concordante com os achados de VIDAL (1963, 1977), que descreveu e deu a orientação das cadeias glicânicas em tendões e na ossificação endocondral. O referido autor demonstrou também, ao nível da microscopia eletrônica, que as fibras de colágeno II (mais finas que as de colágeno I), encontram-se "mergulhadas em uma quantidade grande de uma rede grânulo-filamentar de proteoglicanas orientadas" (VIDAL, 1983).

Quanto ao arranjo fibrilar e macromolecular do subpericôndrio, foi novamente observado um aspecto de rede, onde os feixes de colágeno alinhados com o material proteoglicânico e glicoprotéico, se entrecruzam em três direções principais (fig. 03), o que configura um arranjo muito similar ao descrito para o pericôndrio.

A digestão pela hialuronidase testicular (C3) foi plenamente eficaz na remoção de GAGA das PG do subpericôndrio. A ação da enzima caracterizou-se não só pela abolição total da basofilia do interterritório da região, como também pelo aumento na coloração de colágeno causada pela remoção de material proteoglicânico. A sensibilidade dos grânulos do interterritório subpericondrial à digestão pela hialuronidase testicular, sugere a presença de GAGA na composição dos mesmos.

A digestão pela mistura de enzimas hialuronidase/colagenase (C5), basicamente causou a repetição dos resultados observados após a digestão pela hialuronidase isolada (C3), exceto pelo fato de que a remoção de moléculas de colágeno quando do primeiro tratamento, resultou na diminuição da resposta aos testes citoquímicos pelo XP e PAS.

O tratamento controle para a digestão pela hialuronidase/colagenase (C6), conforme já dito, também provocou remoção de material proteoglicânico. Analisando-se as micrografias da chamada "rede de projeções digitiformes", percebe-se que as ditas "projeções" não se sobrepõem aos condrócitos presentes na região, mas sim desviam-se junto à periferia celular (domínio) dos mesmos. Tal aspecto sugere que as PG removidas situavam-se principalmente na porção pericelular dos referidos condrócitos. A presença de PG na referida porção pericelular já foi demonstrada pela microscopia de polarização (VIDAL, 1977) e eletrônica (VIDAL, DOLDER, 1978). Para explicar esta aparentemente pequena estabilidade físico-química das PG da porção pericelular, deve-se considerar o baixo teor de colágeno existente na região (SHEPARD & MITCHELL, 1976), o que leva a pressupor uma diminuição da ocorrência de intera

ções GAGA-colágeno,

A constatação de que as PG da região pericelular são facilmente dissociadas e removidas pela incubação em soluções tampão parece um contrasenso, uma vez que a referida região pericelular foi, comparativamente, a região de estudo menos afetada pelas diversas digestões enzimáticas realizadas. Cumpre salientar, entretanto, que a remoção em discussão ocorreu nas porções mais externas do subpericôndrio (mais próximas portanto do pericôndrio), enquanto que a grande estabilidade dos componentes do pericelular foi observada na cartilagem endocondrial. Em outras palavras, é muito provável que a diferença de estabilidade físico-química entre as PG da porção pericelular do subpericôndrio e cartilagem endocondrial, seja devida sobretudo a causas relacionadas com a própria maturação tecidual.

A digestão pela papaína segundo a técnica utilizada (THYBERG et al. 1973), atuou através do mecanismo já discutido, removendo PG do subpericôndrio. A não redução da coloração após XP, indica que a enzima não foi capaz de remover o colágeno da região. O tratamento controle para a digestão pela papaína (C8) provocou, após coloração por PAS, a visualização de figuras similares às "projeções digitiformes" já descritas. Muito provavelmente, o mecanismo que levou à formação de tais figuras é muito parecido com aquele discutido, e corrobora a idéia de que as PG situadas na região pericondrocitária do subpericôndrio são menos estáveis (do ponto de vista físico-químico) que aquelas situadas no interterritório do endocôndrio.

A alfa-amilase bruta (C9) mostrou-se tão eficaz ao nível subpericôndrio, quanto o foi na região pericondrocitária. A ação da enzima suprimiu a basofilia interterritorial, aumentou

a coloração pelo XP e reduziu discretamente a coloração pelo PAS. Analisados em conjunto, os três eventos citados indicam a remoção de material glicoprotéico não colagênico, concordando com as observações anteriores.

INTERTERRITÓRIO. O interterritório da cartilagem endocondrial é aqui entendido como sendo a porção da matriz extracelular que se situa entre os condrócitos isolados, ou entre grupos de condrócitos isogênicos, e que mantem relações diretas com as citadas células.

A coloração da região em aprêço, independentemente do teste citoquímico realizado e na ausência de qualquer tratamento, teve como característica básica a presença de grânulos mais intensamente corados, visualmente destacados com relação à matriz, mais homogênea. Não foi possível detectar qualquer padrão de distribuição definido para tais grânulos. Após PAS, os mesmos apresentaram-se com dimensões aparentemente menores que as usuais, o que pode indicar a existência de pequeno conteúdo glicoprotéico no interior dos ditos grânulos.

Na região do endocôndrio situada imediatamente abaixo do subpericôndrio, foi observada a presença de grânulos intensamente alcianófilos, cujas dimensões pareceram muito maiores do que as observadas no interterritório situado mais profundamente no endocôndrio. Tal fato deve ser entendido como concentrações locais de GAGA sulfatadas (muito provavelmente CS), sintetizadas predominantemente no subpericôndrio (QUINTARELLI & DELLOVO, 1966), e que se deslocariam de seu sítio de síntese para o interterritório do endocôndrio, difundindo-se através da matriz.

O interterritório da cartilagem endocondrial mostrou-se sensível a todas as digestões enzimáticas realizadas, sendo que as principais alterações observadas relacionaram-se com os padrões de coloração registrados após os diversos testes citoquímicos. As modificações nos citados padrões de coloração decorreram da remoção de um ou mais componentes da matriz, em função do tratamento realizado. Mais explicitamente, a queda no conteúdo de GAGA e PG (pela hialuronidase e papaína), a remoção parcial do colágeno II (pela colagenase) e glicoproteínas não colagênicas (pela alfa-amilase), através dos mecanismos já discutidos, característicos de cada solução enzimática utilizada.

Saliente-se que, sem exceção, as digestões enzimáticas em questão provocaram uma queda acentuada, ou mesmo o desaparecimento total dos grânulos da matriz interterritorial do endocôndrio. Associando-se esta observação ao fato de que os ditos grânulos são positivos a todos os testes citoquímicos realizados, tornam-se evidentes certas características químicas dos mesmos.

A presença de GAGA nos grânulos foi detectada pela reação com o Azul de Alcian. Como não houve diferença entre as respostas observadas após AA pH 1,0 e AA pH 2,5, deduz-se que a maioria das GAGA presentes nos grânulos são sulfatadas. Em vista da metacromasia observada após AT pH 3,4, supõe-se que tais GAGA sulfatadas apresentem seus radicais aniônicos ordenadamente dispostos. Sendo os grânulos XP positivos, conclui-se que os mesmos apresentam proteínas em sua composição. Uma vez que a hialuronidase testicular (C3) e a papaína (C7) removeram os grânulos, e considerando-se a ação proteolítica da segunda enzima, pode-se imaginar que as GAGA sulfata-

das mencionadas estejam associadas a seqüências peptídicas, constituindo portanto proteoglicanas.

A possibilidade de que a resposta positiva ao teste XP por parte dos grânulos em questão, fosse devida a presença de material colagênico foi descartada. Isto se deveu à observação de que a colagenase associada a hialuronidase (C5), não afetou diferentemente a morfologia ou coloração dos grânulos, em comparação com o observado após a digestão pela hialuronidase isolada (C3).

Finalmente, a presença de glicoproteínas no interior dos grânulos foi demonstrada pela reação de PAS, e confirmada pela sensibilidade ao tratamento pela alfa-amilase bruta (C9). Como foi excluída a possibilidade da presença de colágeno nos grânulos, a resposta PAS-positiva observada deve ser atribuída a glicoproteínas não colagênicas.

Tendo em vista os argumentos mencionados, no que tange à composição química os grânulos da matriz interterritorial, aqui discutidos, são muito similares aos grânulos de PG fartamente mencionados na literatura (ANDERSON & SAJDERA, 1971, THYBERG et al. 1973; SHEPARD & MITCHELL, 1976a; HASCALL, 1980).

TERRITÓRIO. A região territorial da cartilagem endocondrial foi subdividida em duas outras regiões: a pericelular, constituída por uma delgada faixa de matriz situada na vizinhança imediata da membrana plasmática dos condrocitos; e o domínio, representado pela porção de matriz que se estende desde o pericelular até o interterritório. Geralmente, a porção mais afastada no domínio apresentou acentuada coloração (sob a forma de acúmulos locais de grânulos), o que facilitou a delimitação visual das regiões territorial e interterritorial.

Os tratamentos enzimáticos realizados causaram redução ou mesmo erradicação da granulação da matriz territorial. Não obstante o fato de que cada tratamento enzimático possui um mecanismo de ação, característico da enzima utilizada, os resultados obtidos indicam que a nível qualitativo os grânulos da região territorial não diferem daqueles presentes no interterritório do endocôndrio, pelo menos quanto à sua estabilidade frente à digestões enzimáticas.

A extração de material proteoglicânico, ocorrida após tratamentos controle para as digestões enzimáticas, não compromete os resultados observados após as mesmas. Muito provavelmente, tal extração ocorreu numa fração de PG que não se encontra suficientemente estabilizada na matriz quando do tratamento, sendo provavelmente constituída por uma população de moléculas recém sintetizadas.

A incapacidade dos tratamentos controle em remover os grânulos da matriz, e, as observações anteriormente mencionadas referentes à natureza química dos citados grânulos, sugerem que os mesmos representam estruturas análogas aos agregados de PG descritos por ROSENBERG et al. (1975). Segundo os autores citados, os monômeros de PG (ou seja, as GAGA perpendicularmente ligadas à proteína "core") ligam-se também perpendicularmente ao Ach, de tal sorte que tais monômeros radiam-se em todas as direções à partir de um filamento central de Ach, exatamente como os pelos de uma escova para limpeza de tubos de ensaio ("bottlebrush").

Considerando-se que tais agregados de PG apresentam em sua estrutura pelo menos dois tipos de glicoproteínas de ligação (HASCALL, 1977, BAKER & CATERSON, 1979), e, considerando-se ainda que durante a fixação as PG da cartilagem sofrem conden

sação (ANDERSON & SAJDERA, 1971) é nossa opinião que os grânulos da matriz aqui observados representam grandes agregados de PG com morfologia alterada. Em outras palavras, tais agregados macromoleculares não se apresentaram "estendidos" como se admite que estariam no microambiente fisiológico da cartilagem hialina íntegra, mas sim teriam sua estrutura tridimensional achatada num plano único, provocando um enovelamento ou sobreposição das moléculas constituintes, nomeadamente, GAGA (ACh, CS-4, CS-6 e KS), proteínas "core" e glicoproteínas de ligação "a" e "b".

Evidências citoquímicas favorecem a hipótese acima levantada. Em primeiro lugar, a sensibilidade dos grânulos à digestão pela hialuronidase testicular, sugere a presença de ACh, CS-4 e CS-6 no interior dos mesmos. A intensa metacromasia dos grânulos após coloração pelo AT pH 3,4, indica a existência de elevadas concentrações de radicais negativos ordenadamente dispostos nos mesmos, o que coincide com o caráter polianiónico das GAGA, em especial o CS-4 e o CS-6. Mais ainda, a resposta positiva ao XP indica a existência de radicais NH_3 , provavelmente aqueles pertencentes às proteínas "core" e às porções protéicas das glicoproteínas não colagênicas. Finalmente, a resposta PAS-positiva, pode perfeitamente ser atribuída à presença das glicoproteínas de ligação "a" e "b".

CITOPLASMAS. As observações concernentes aos citoplasmas dos condrocitos devem ser consideradas com certa reserva, em vista do grande número de fatores que podem influir na morfologia celular característica. Dentre estes fatores, destacam-se aqueles: a) relacionados com problemas técnicos de caráter histológico, como por exemplo os variados graus

de alterações ocorridas nos condrôcitos em função da fixação ou demais etapas do processamento, ou ainda, os artefatos de tração ocasionados quando da obtenção dos cortes; b) relacionados com os efeitos secundários dos tratamentos, ou seja, a ação da temperatura ou da imersão em meios aquosos com diferentes concentrações de sais, no decorrer dos diversos tratamentos enzimáticos; c) inerentes às próprias células, como por exemplo o estado fisiológico e mesmo a variação natural de célula para célula.

Obyiamente, diante de tal quadro de possibilidades distintas, convencionar um "condrôcito-padrão", cujo citoplasma sirva como parâmetro para comparações acuradas é tarefa extremamente difícil. Não obstante, uma característica frequentemente observada no interior dos citoplasmas foi a presença de granulações intensamente coradas, sem padrão de distribuição específico.

Independentemente do teste citoquímico realizado, as granulações intracitoplasmáticas foram constantemente observadas no material não tratado, o que as torna pelo menos com relação à resposta aos diferentes testes, similares aos grãnulos da matriz. Embora não tenham sido efetuadas medidas, a impressão visual é que as granulações intracitoplasmáticas são menores que os grânulos da matriz.

Muito provavelmente em função das citadas alterações ocorridas durante a preparação, foi comum a observação de "grumos" no interior dos citoplasmas. Tais estruturas pareceram ser o resultado da maior proximidade entre as granulações intracitoplasmáticas que terminaram por concentrar-se em pontos isolados do citoplasma.

Analisar de forma inequívoca a ação dos diversos tratamentos sobre os citoplasmas foi bastante difícil, justamente em função da variabilidade morfológica. Entretanto, notou-se que as granulações intracitoplasmáticas foram reduzidas em número ou mesmo totalmente eliminadas, após as incubações pela hialuronidase testicular (C3), hialuronidase testicular acrescida de collagenase bacteriana (C5), papaína (C7) e alfa-amilase bruta (C10), o que torna tais granulações ainda mais similares aos grânulos da matriz aqui estudados.

Os componentes glicosaminoglicânicos dos agregados de proteoglicanas são sintetizados pelos condrócitos em diferentes compartimentos celulares (MITCHELL & HARDINGHAM, 1982). Porém, todos os componentes dos agregados são exportados para o meio extracelular separadamente, e somente fora do condrócito é que se verificam as alterações conformacionais nas moléculas secretadas, ocorrendo então a agregação (GLANT et al. 1977).

Considerando-se a estabilidade das granulações intracitoplasmáticas frente às digestões enzimáticas realizadas, bem como as respostas observadas após os testes citoquímicos, é nossa opinião que tais granulações representam concentrações intracitoplasmáticas de componentes dos agregados macromoleculares de PG (nomeadamente, GAGAs, proteínas "core" e glicoproteínas de ligação "a" e "b"). Tais concentrações provavelmente devem ser vesículas citoplasmáticas em vias de secreção, e/ou porções dilatadas do Retículo Endoplasmático rugoso (RER) ou complexo de Golgi (CG), todas elas com o conteúdo mencionado.

TRATAMENTOS EM BLOCO. Conforme mencionado previamente, os tratamentos realizados em bloco não tiveram uma ação homogênea sobre as diferentes regiões da cartilagem hiali-

na estudadas. Uma vez que as digestões enzimáticas foram realizadas tanto sobre cortes obtidos por microtomia de congelação, quanto sobre os fragmentos de cartilagem em bloco, a comparação entre os resultados obtidos nas duas condições de trabalho em questão permite concluir que a ineficiência das digestões enzimáticas em bloco é devida à inacessibilidade ao substrato, e não à inatividade da(s) enzima(s) utilizada(s).

Considerando-se que os mecanismos de ação das diversas soluções enzimáticas utilizadas já foram aqui discutidos, torna-se desnecessária a discussão dos resultados obtidos após as digestões enzimáticas em bloco.

Com relação aos métodos químicos dissociativos, o tratamento pelo $MgCl_2$ 3 M (P2), modificado de SAJDERA & HASCALL (1969), tido como capaz de remover grande parte (até 85%) das PG presentes no tecido, não foi capaz de promover tal remoção, conforme demonstrado pelos testes citoquímicos realizados.

Em comparação com o material não tratado (P1), o tratamento pelo $MgCl_2$ só reduziu a basofilia após coloração pelo AT pH 3,4 nas regiões pericondrial e subpericondrial, não alterando em absoluto a coloração das demais regiões de estudo. Com relação à reação de PAS, a resposta observada praticamente repetiu os resultados verificados após AT. Mais ainda, a resposta ao teste pelo XP pH 1,7 também confirmou a ineficácia do tratamento em questão, uma vez que a remoção de PG promoveria (como já visto) uma maior exposição dos radicais colagênicos XP positivos, o que não ocorreu após o tratamento pelo $MgCl_2$.

HASCALL & SAJDERA (1969), demonstraram a eficiência do $CaCl_2$ na remoção das PG da cartilagem do septo nasal bovino. Opostamente, ANDERSON & SAJDERA (1971) afirmaram que o

CaCl_2 , quando utilizado em concentrações elevadas (4,0 M), atua como agente fixador das PG da mesma cartilagem. A utilização de uma solução pouco concentrada de CaCl_2 (0,1 M), após o tratamento pelo MgCl_2 , teoricamente promoveria a extração de outra(s) fração(ões) proteoglicânica(s), não extraível(eis) pela ação do MgCl_2 isoladamente.

Comparativamente ao material tratado somente pelo MgCl_2 , o tratamento seqüencial pelo MgCl_2 e CaCl_2 (P3) provocou uma discreta queda na coloração pelo AT pH 3,4, em todas as regiões de estudo, o que sugere a ocorrência de remoção de material proteoglicânico. Porém, os resultados dos testes pelo XP e PAS mostram que tal remoção não ocorreu realmente. Muito provavelmente, a menor intensidade de coloração pelo AT pH 3,4, observada após o tratamento P3 deveu-se mais a fatores inespecíficos, relacionados com as condições de tratamento (longa permanência em meio aquoso, temperatura, etc...), do que a uma ação dissociativa efetivamente desempenhada pelo CaCl_2 .

O efeito do tratamento pelo Ácido Tricloroacético (TCA) a quente (P4) sobre as diferentes regiões da cartilagem do septo nasal bovino, não pôde ser seguramente detectado pela citoquímica, em vista da severa desorganização morfológica que o dito tratamento introduziu no material. Os pequenos fragmentos submetidos ao TCA sofreram reduções em tamanho, oscilando entre 40 e 70% de suas dimensões originais. A ação ácida em conjugação com a temperatura elevada provocaram a solubilização progressiva das porções externas dos fragmentos, o que levou ao desaparecimento das regiões pericondrial e subpericondrial.

Mais especificamente, a acentuada redução em tamanho dos fragmentos de cartilagem tratados pelo TCA, deveu-se

principalmente a: perda de água de solvatação; solubilização das moléculas de colágeno; denaturação (e subsequente remoção) em graus variados de extensão das proteínas "core", assim como das porções protéicas das glicoproteínas não colagênicas.

A redução da intensidade de coloração após AT pH 3,4, em comparação com o material não tratado (P1), indica que o TCA removeu parte das PG presentes no tecido. Acrescente-se que o tratamento praticamente não alterou a resposta à reação de PAS, enquanto que o teste pelo XP pH 1,7 demonstrou a remoção de colágeno das porções da cartilagem endocondrial. Considerando-se a já discutida ação do TCA sobre os componentes da matriz extracelular da cartilagem hialina, fica evidente que a utilização do método em questão. (P4) em estudos citoquímicos como o presente é contraproducente, e até mesmo inadequada, em vista da falta de especificidade do mesmo.

O método descrito por MILLER (1972) consiste da extração (por solução salina e ácido acético) das PG da cartilagem, seguida da solubilização do colágeno pela ação proteolítica da tripsina. Em outras palavras, o método deveria remover os demais componentes da matriz, que não as glicoproteínas estruturais (GPEs).

A remoção das PG ocorreria de forma análoga ao princípio "dissociativo" de SAJDERA & HASCALL (1969). Por outro lado, a tripsina age principalmente sobre a região carboxi-terminal da molécula de colágeno da cartilagem, região esta que não participa do arranjo helicoidal da molécula como um todo (STARK et al. 1972).

A remoção de radicais AT e AA-positivos em função do tratamento em questão (P5), não diferiu grandemente do observado após os demais tratamentos químicos dissociativos discutidos. A solubilização das moléculas de colágeno (revelada pelo XP pH 1,7) foi inferior àquela verificada após os tratamentos por cloretos (P2 e P3), e os resultados observados após PAS praticamente repetiram aqueles descritos no material não tratado (P1). Assim, o método de MILLER (1972) não produziu os resultados citados pelo autor, e portanto a sua utilização em estudos de natureza citoquímica deve ser evitada.

Nenhum dos tratamentos químicos dissociativos aqui utilizados produziu os resultados esperados. Considerando-se que as pequenas modificações metodológicas aqui introduzidas objetivaram a otimização dos referidos tratamentos em função dos conhecimentos atualmente disponíveis na literatura, é nossa opinião que os mesmos são realmente ineficazes.

Especial destaque deve ser feito com relação ao tratamento pelo $MgCl_2$ (P2) e segundo o método de MILLER (P5). Os autores dos trabalhos de onde foram retiradas tais técnicas (respectivamente SAJDERA & HASCALL, 1969 e MILLER, 1972), afirmaram não são que as mesmas são capazes de remover componentes da matriz extracelular da cartilagem, como também forneceram dados quantitativos acerca do rendimento esperado. Em vista da não reprodutibilidade de tais resultados, fica evidente que os mesmos não apresentam confiabilidade.

Nos cortes transversais de septos nasais bovinos aqui estudados, os grânulos da matriz, por suas respostas a testes citoquímicos e susceptibilidade aos tratamentos enzimáticos realizados, parecem conter material de natureza proteoglicânica.

Nossos achados indicam que os citados grânulos são similares aos descritos por ROSENBERG et al. (1975), representando por tanto grandes complexos multiagregados de proteoglicanas.

Nossos resultados, sobretudo aqueles registrados em cortes obtidos por microtomia de congelação, corroboram trabalhos anteriores de VIDAL (1977, 1983) e de VIDAL & DOLDER (1978), que afirmam que na região pericelular dos condrôcitos, a ordem molecular e o estado de agregação das glicosaminoglicanas ácidas são maiores que o observado na região interterritorial.

É nossa opinião, entretanto, que na cartilagem subpericondrial a situação seja oposta, ficando o interterritório com estabilidade físico-química mais elevada que a porção territorial. Conforme já dito, tal fato parece relacionar-se principalmente com o processo de maturação da cartilagem hialina do septo nasal bovino.

CONCLUSÕES

- Os tratamentos em bloco, quer de natureza química, quer de natureza enzimática, não produziram resultados confiáveis a nível qualitativo, recomendando-se a utilização de cortes obtidos por microtomia de congelação. Note-se que mesmo medidas quantitativas podem ser realizadas sobre os ditos cortes, sendo necessária apenas a utilização de índices (como por exemplo o IM aqui mencionado), para prevenir erros decorrentes da variação de espessura, inerente à técnica de corte.

porque
sub
os

- Os grânulos da matriz extracelular observados em diversas regiões de estudo, representam complexos multiagregados de PG, análogos àqueles descritos por ROSENBERG et al. (1975).

- As granulações intracitoplasmáticas, relatadas ao longo deste trabalho, aparentemente representam concentrações localizadas de componentes da matriz extracelular (nomeadamente GAGA, proteínas "core", colágeno e glicoproteínas não colagênicas), em vias de secreção. Tais concentrações muito provavelmente constituem-se de porções do Retículo Endoplasmático, do Complexo de Golgi e de vesículas de secreção propriamente ditas.

- Em geral, na cartilagem endocondrial, a porção interterritorial mostrou-se menos susceptível aos inúmeros tratamentos realizados do que a porção territorial, o que sugere que a matriz extracelular da cartilagem hialina do septo nasal bovino apresenta-se mais estabilizada, quanto mais afastada morfologicamente, das células que secretaram seus diversos componentes.

- No septo nasal bovino, a maturação do tecido cartilaginoso parece ser crescente no sentido pericôndrio-cartilagem endocondrial. Isto pode ser comprovado pelo fato de que a porção pericelular dos condrocitos situados no subpericôndrio apresenta menor estabilidade físico-química frente aos tratamentos realizados, do que a mesma porção pericelular dos condrocitos da cartilagem endocondrial.

RESUMO

A ação de tratamentos químicos dissociativos e enzimáticos sobre a cartilagem hialina do septo nasal bovino, foi estudada através de técnicas citoquímicas.

As variações nas respostas aos referidos testes citoquímicos em função dos tratamentos realizados, foram utilizadas como uma forma de estimar o grau de estabilidade físico-química dos diferentes componentes macromoleculares da cartilagem hialina, bem como o estado de agregação e ordem molecular dos mesmos.

A utilização de procedimentos distintos (tratamentos realizados sobre cortes obtidos por microtomia de congelação e sobre fragmentos de cartilagem posteriormente incluídos em parafina), permitiu uma avaliação acerca da eficiência e acessibilidade dos diferentes agentes empregados, avaliação esta que demonstrou que os cortes obtidos por congelação produzem respostas mais evidentes a nível qualitativo.

Os tratamentos químicos dissociativos utilizados, mostraram-se inadequados a estudos de natureza citoquímica. Tal inadequação deveu-se, sobretudo, a não reprodutibilidade de tais métodos, em especial no tocante ao rendimento total esperado dos mesmos.

Na matriz extracelular da cartilagem do septo nasal bovino foi observada a presença de grânulos intensamente corados, após os diferentes testes citoquímicos. Considerando-se a sensibilidade de tais grânulos aos tratamentos químicos e enzimáticos realizados, concluiu-se que os mesmos representam complexos multiagregados de proteoglicanas, análogos aos descritos por ROSENBERG et al. (1975).

A presença de granulações no interior dos citoplasmas dos condrôcitos, apresentando estabilidade físico-química e respostas citoquímicas similares aos grânulos da matriz, foi interpretada como concentrações localizadas de componentes da matriz em vias de secreção. Tais componentes, muito provavelmente, são glicosaminoglicanas ácidas, proteínas "core" das proteoglicanas, colágeno e glicoproteínas não colagênicas, e sua acumulação deve ocorrer em porções do Retículo Endoplasmático, do Complexo de Golgi e vesículas de secreção.

A cartilagem hialina do septo nasal bovino apresenta a sua porção territorial mais susceptível aos tratamentos aqui realizados, do que a porção interterritorial. Tal fato indica que o grau de estabilização molecular aumenta à medida que nos afastamos morfológicamente das células que sintetizaram e secretaram tais macromoléculas.

A comparação entre os graus de estabilidade físico-química apresentados pelas porções pericelulares dos condrôcitos situados no subpericôndrio e na cartilagem endocondrial, sugere que a maturação da cartilagem do septo nasal bovino ocorre no sentido pericôndrio-cartilagem endocondrial.

ABSTRACT

The hyaline cartilage of the bovine nasal septum was cytochemically studied, with respect to the physicochemical stability, state of aggregation and molecular order of its macromolecular components.

Techniques based on the "dissociative" principle of SAJDERA & HASCALL (1969), and on enzymatic digestions were used as extraction methods.

The results showed that chemical-dissociative treatments are not indicated for cytochemical studies, particularly because of the nonreproducibility of such methods.

Dense granules were observed on the cartilage extracellular matrix. The physicochemical stability and the stainability of such granules, lead to the supposition that they represent a multiaggregated proteoglycan complex.

Similar granules were observed in the cytoplasm of chondrocytes, and their presence suggests that the macromolecular components of the hyaline cartilage (collagen, proteoglycans and noncollagenous glycoproteins), are being secreted.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, H.C. & SAJDERA, S.W. The fine structure of bovine nasal cartilage. Extraction as a technique to study proteoglycans and collagen in cartilage matrix. J. Cell Biol., 49:650-63, 1971.
- ANDERSON, J.C. Glycoproteins of the connective tissue matrix. Int. Rev. Connect. Tissue Res. 7:251-332, 1976.
- ANDRADE FÓ, J.B.F. & VIDAL, B.C. Hiperacromismo de colágeno II após remoção de glicosaminoglicanas (GAG) sulfatadas em cartilagem. In: Reunião anual da SBPC, 36., São Paulo, 1984. Resumos, p. 693.
- BAKER, J.R. & CATERSON, B. The isolation and characterization of the link proteins from proteoglycans aggregates of bovine nasal cartilage. J. Biol. Chem., 254(7):2387-93, 1979.
- BEHNKE, O. & ZELANDER, T. Preservation of intercellular substances by the cationic dye alcian blue in preparative procedures for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res., 31:424-38, 1970.
- BJORNSSON, S. & HEINEGARD, D. Assembly of proteoglycan aggregates in cultures of chondrocytes from bovine tracheal cartilage. Biochem. J., 199(1):17-29, 1981.
- BONNUCCI, E.; CUICCHIO, M. & DEARDEN, L.C. Investigations of ageing in costal and tracheal cartilage of rats. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 147:505-27, 1974.
- FELLINI, S.A.; KIMURA, J.H. & HASCALL, V.C. Polydispersity of proteoglycans synthesized by chondrocytes from the swarm rat chondrosarcoma. J. Biol. Chem., 256(15):7883-9, 1981.
- FITCH, S.M.; HARKNESS, M.L.R. & HARKNESS, R.D. Extraction of collagen from tissues. Nature, 176:163, 1955.
- FOLDES, I.; MODIS, L.; ANTALFFY, J. & ADAM, I. Ultrastructure of extracellular matrix of embryonic chick limb bud cartilage. Acta. biol. hung., 31(1-3):81-95, 1980.
- GLANT, T.; LEVAI, G. & HADHAZY, Cs. The localization of proteoglycans and glycoproteins in the hyaline cartilage. Histochemistry, 53(4):291-9, 1977.
- HASCALL, G.K. Cartilage proteoglycans: comparison of sectioned and spread whole molecules. J. Ultrastruct. Res., 70(3):369-75, 1980.
- HASCALL, V.C. Interaction of cartilage proteoglycans with hyaluronic acid. J. Supramol. Struct., 7:101-20, 1977.

- HASCALL, V.C. & HEINEGARD, D. Aggregation of cartilage proteoglycans. I - The role of hyaluronic acid. J. biol. Chem., 249(13):4232-41, 1974.
- HASCALL, V.C. & SAJDERA, S.W. Proteinpolysaccharide complex from bovine nasal cartilage. The function of glycoprotein in the formation of aggregates. J. biol. Chem., 244(9):2384-96, 1969.
- _____ & _____ Physical properties and polydispersity of proteoglycans from bovine nasal cartilage. J. biol. Chem. 245(19):4920-30, 1970.
- HEINEGARD, D. & HASCALL, V.C. Characteristics of the nonaggregating proteoglycans isolated from bovine nasal cartilage. J. biol. Chem., 254(3):927-34, 1979.
- KHAN, T.A. & OVERTON, J. Lanthanum staining of developing chick cartilage and reaggregating cartilage cells. J. Cell. Biol., 44:433-8, 1970.
- KLEINE, T. O. Biosynthesis of proteoglycans: An approach to locate it in different membrane systems. Int. Rev. Connect. Tissue, 9:27-97, 1981.
- LINDAHL, V. & HOOK, M. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. A.Rev. Biochem., 47:385-417, 1978.
- LISON, L. Reaction de fonctions ou de radicaux aliphatiques. In: Histochemie et cytochemie animales. 3 ed. Paris, Gauthier-Villars, 1960a, V.1, p. 158-237.
- _____ Proteines. 2 - Analyse par l'action des protéinases. In: Histochemie et cytochemie animales, 3 ed. Paris, Gauthier-Villars, 1960b, V.1, p. 335-9.
- _____ Glucides, glycoprotéines et mucoprotéines. 5 - Méthodes de digestion enzymatiques. In: Histochemie et cytochemie animales. 3 ed. Paris, Gauthier-Villars, 1960c, V. 2, p. 419-24.
- LUFT, J. H. Ruthenium red and violet. II - Fine structural localization in animal tissues. Anat. Rec., 171:369-416, 1971.
- MATHEWS, M. B. Comparative biochemistry of chondroitin sulphate-proteins of cartilage and notochord. Biochem. J., 125(1):37-46, 1971.
- MATUKAS, V.J.; PANNER, B.J. & ORBISON, J.L. Studies on ultrastructural identification and distribution of proteinpolysaccharide in cartilage matrix. J. Cell. Biol., 32(2):365-77, 1967.
- MILLER, J.E. Structural studies on cartilage collagen employing limited cleavage and solubilization with pepsin. Biochemistry, 11(26):4903-9, 1972.

- MINNS, R.J. & STEVEN, F.S. The collagen fibril organization in human articular cartilage. J. Anat., 123(2):437-57, 1977.
- MITCHELL, D. & HARDINGHAM, T. Monensin inhibits synthesis of proteoglycan, but not of hyaluronate, in chondrocytes. Biochem. J., 202(1):249-54, 1982.
- OEGEMA, T.R.; HASCALL, V.C. & DZIEWIATKOWSKI, D. Isolation and characterization of proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. J. biol. Chem., 250(15):6151-9, 1975.
- PARRY, D.A.; FLINT, M.A.; GILLARD, G. C. & CRAIG, A.S. A role for glycosaminoglycans in the development of collagen fibrils. FEBS letters. 149(1): 1-7, 1982.
- PEARSE, A.G.E. Carbohydrates and mucosubstances. In: Histochemistry; theoretical and applied. 3 ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1968, V. 1, pp. 294-380.
- Enzymes as histochemical reagents. In: Histochemistry; theoretical and applied. 3 ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1972, V. 2, p. 1016-49.
- POOLE, A.R.; PIDOUX, I.; REINER, A.; TANG, L.H.; CHOI, H. & ROSENBERG, L. Localization of proteoglycan monomer and link protein in the matrix of bovine articular cartilage: An immunohistochemical study. J. Histochem. Cytochem., 28(7):621-35, 1980.
- _____ & ROSENBERG, L. Role of proteoglycans in endochondral ossification: Immunofluorescent localization of link protein and proteoglycan monomer in bovine fetal epiphyseal growth plate. J. Cell Biol., 92(2):249-60, 1982.
- QUINTARELLI, G. & DELLOVO, M. C. Age changes in the localization and distribution of glycosaminoglycans in human hyaline cartilage. Histochemie, 7(2):141-67, 1966
- _____, IPPOLITO, E. & RODEN, L. Age-dependent changes on the state of aggregation of cartilage matrix. Lab. Invest. 32(1):111-23, 1975.
- ROSENBERG, L.; HELLMANN, W. & KLEINSCHMIDT, A.K. Electron microscopic studies of proteoglycan aggregates from bovine articular cartilage. J. biol. Chem., 250(5):1877-83, 1975.
- RUGGERI, A.; DELL'ORBO, C. & QUACCI, D. Electron microscopic visualization of proteoglycans with alcian blue. Histochem. J., 7:187-97, 1975.
- SAJDERA, S.W. & HASCALL, V.C. Proteinpolysaccharide complex from bovine nasal cartilage. A comparison of low and high shear extraction procedures. J. biol. Chem., 244(1):77-87, 1969.
- SHEPARD, N. & MITCHELL, N. Simultaneous localization of proteoglycan by light and electron microscopy using toluidine blue O. A study of epiphyseal cartilage. J. Histochem. Cytochem., 24(5):621-9, 1976a.

SHEPARD, N. & MITCHELL, N. The localization of proteoglycan by light and electron microscopy using safranin-O. A study of epiphyseal cartilage. J. Ultrastruct. Res., 54(3): 451-60, 1976b.

& Acridine orange stabilization of glycosaminoglycans in beginning endochondral ossification. A comparative light and electron microscopic study. Histochemistry, 70:107-14, 1981.

STARK, M.; MILLER, E.J. & KUHN, K. Comparative electron-microscope studies on the collagens extracted from cartilage, bone and skin. Eur. J. Biochem., 27(1):192-6, 1972.

TAKAGI, M.; PARMLEY, R.T.; TODA, Y. & AUSTIN, R. L. Ultrastructural cytochemistry and immunocytochemistry of sulphated glycosaminoglycans in epiphyseal cartilage. J. Histochem. Cytochem., 30(11):1179-85, 1982.

THYBERG, J.; LOHMANDER, S. & FRIBERG, V. Electron microscopic demonstration of proteoglycans in guinea pig epiphyseal cartilage. J. Ultrastruct. Res., 45(5-6):407-27, 1973.

VIDAL, B.C. Pleochroism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides. Protoplasma, 56(4):529-36, 1963.

The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of the collagen. Protoplasma, 59(3-4):472-9, 1964.

Dichroism in collagen bundles stained with xilidine ponceau 2R. Ann. Histochem., 15:289-96, 1970.

Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: Microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. Cell. Mol. Biol., 22:45-64, 1977.

Feixes de colágeno: Detecção e quantificação de ordem macromolecular. I - Dicroísmo com corantes azóicos sulfatados (orange G, xilidine ponceau e sirius red). Ciênc. Cult., S. Paulo, 32(5):603-11, 1980a.

The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. Cell. Mol. Biol., 26:415-21, 1980b.

Ossificação endocondral e ectópica: Aspectos estruturais e ordem molecular. Ciênc. Cult., S. Paulo, 35(12): 1799-81, 1983.

& DOLDER, M.A.H. Molecular organization of sulphated glycosaminoglycans (SGAG) in chondrocyte "capsules". Rev. Micr. Elect., 5(1):272-3, 1978.

& MELLO, M.L.S. Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. Cell. Mol. Biol., 30(3):195-204, 1984

WEISS, L. & GREEP, R.O. Histology. 4 ed. New York, McGraw-Hill, 1977, pp. 205-50.

YAMADA, A.T. Glicoproteínas estruturais associadas aos feixes de colágeno. Campinas, 1983. Universidade Estadual de Campinas (Tese de Mestrado).

ZAMBRANO, N.Z.; MONTES, G.S.; SHIGIHARA, K.M.; SANCHEZ, E.M. & JUNQUEIRA, L.C.U. Collagen arrangement in cartilages. Acta. anat., 113(1):26-38, 1982.