

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/6807
IB/80424

DOUTORADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1985

MARIA LÚCIA FURLAN WADA

Alterações fenotípicas induzidas por matriz
óssea desmineralizada (MOD), em cultura de
células de uma linhagem celular estabelecida

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do
título de Doutor em Ciências, área
de Genética.

Orientador: Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

Campinas, 1985

T/UNICAMP

W117_a

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Classif.	T
Autor	W/17a
V.	Ex.
Tombo BC/	6807-IB
	656

14/80424
BY 6807

Este exemplar corresponde
a marca final. deferida pelo
aluno Alvaro Luis Furlan Wode
e aprovada pelo comissário
Julgadora.

R. D. Dido

A

Carolina,

Eduardo e

Ronaldo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Benedicto Campos Vidal, pela orientação e constante estímulo na realização deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Regina Pisani, por ter me dado as primeiras noções sobre a manutenção de células "in vitro", participando com sua experiência para minha formação científica, pelas sugestões e interesse que dispensou a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel pela realização da análise eletroforética.

Aos Profs. Drs. Christine Hackel, Ignez Koseki, Maria Luiza Silveira Mello, Yoko Bomura Rosato e Rolf Dieter Illg pela atenção que dispensaram a leitura deste trabalho durante a análise prévia, bem como pelas sugestões apresentadas.

Ao Depto. de Biologia Celular e ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Receptores Hormonais os quais forneceram equipamentos e reagentes para a realização deste trabalho.

À Sr.^a Ana Gagliardi, bibliotecária chefe do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pela dedicação e valiosa colaboração prestada na correção das referências bibliográficas.

À Sr.^a Helena Fredo Villaverde, funcionária do Laboratório de Cultura de Tecidos e Receptores Hormonais, pela dedicação com que mantém todo o material utilizado em cultura.

À Sr.^a Tereza Hatayama Wada, minha sogra, pelo carinho, compreensão e estímulo e também pelos cuidados dispensa-

dos ao Eduardo e a Carolina, dando-me a tranqüilidade necessária para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Biologia Celular da Universidade Estadual de Campinas, pela amizade e colaboração.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
1 - Introdução.....	01
2 - Material e Métodos.....	16
2.1. Manutenção das células em cultura.....	16
2.2. Obtenção da matriz óssea desmineralizada (MOD)...	17
2.3. Fixação do material.....	18
2.4. Citoquímica.....	19
2.4.1. Azul de toluidina pH 4,0.....	19
2.4.2. Complexação com ConA Peroxidase.....	19
2.4.3. Fosfatase ácida.....	19
2.5. Índice mitótico.....	20
2.6. Cariometria.....	20
2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	21
2.8. Microscopia de polarização.....	21
3 - Resultados.....	22
3.1. Aspectos gerais da cultura.....	22
3.1.1. Culturas celulares em ausência de MOD...	22
3.1.2. Culturas celulares em presença de MOD...	22
3.2. Cariometria.....	26
3.2.1. Culturas celulares em ausência de MOD...	26
3.2.2. Culturas celulares em presença de MOD...	26
3.3. Reação com azul de toluidina a pH 4,0.....	28
3.3.1. Culturas celulares em ausência de MOD...	28
3.3.2. Culturas celulares em presença de MOD...	28

3.4. Complexação com a Concanavalina A.....	34
3.4.1. Culturas celulares em ausência de MOD...	34
3.4.2. Culturas celulares em presença de MOD...	34
3.5. Fosfatase ácida.....	39
3.5.1. Culturas celulares em ausência de MOD...	39
3.5.2. Culturas celulares em presença de MOD...	39
3.6. Índice mitótico.....	42
3.6.1. Culturas celulares em ausência de MOD...	42
3.6.2. Culturas celulares em presença de MOD...	42
3.7. Eletroforese.....	45
3.7.1. Culturas celulares em ausência de MOD...	45
3.7.2. Culturas celulares em presença de MOD...	47
3.8. Microscopia de polarização.....	47
 4 - Discussão.....	 50
 5 - Conclusões.....	 71
 6 - Resumo.....	 73
Abstract	74
 7 - Referências Bibliográficas.....	 75

1 - INTRODUÇÃO

O processo pelo qual os descendentes de uma única célula, o ovo fertilizado, divergem para formar tecidos ou órgãos com funções especializadas é denominado de diferenciação e, com os avanços da biologia molecular e a descoberta do papel do DNA na síntese de RNA e proteínas, tem sido amplamente aceito que as características morfológicas e fisiológicas da célula são resultantes da ação gênica e, portanto, as diferenças observadas entre tipos celulares seriam o resultado da ação diferencial dos genes (BROWN & JONES, 1974). Deste modo é atribuído ao controle da expressão gênica papel central nos processos de desenvolvimento e diferenciação (BROWN, 1981; BIRD, 1984; DI BERNARDINO et alii, 1984).

Nos últimos anos, em muitos campos da ciência, tem-se estudado o quanto da informação contida na célula é codificado pela seqüência primária dos genes e quanto do ambiente influencia esta expressão gênica para que o indivíduo possa desenvolver várias células e/ou tecidos com funções especializadas (BISSEL et alii, 1982).

Um dos primeiros cientistas a formular o conceito de que populações celulares divergentes, mas associadas pela topografia poderiam desempenhar papel essencial na organogênese foi PEEBLES em 1911, através de estudos de transplantes realizados em embrião de galinha. GROBSTEIN, em 1955, denominou de indução embrionária, que é sinônimo de interações teciduais a influência que populações celulares exercem umas sobre as outras na geração de novos tipos celulares (BISSEL et

alii, 1982).

Desde então, têm sido demonstrado por diversos autores que as interações mesênquimas-epitélio desempenham papel primordial na orientação do processo de diferenciação (COHEN & HAY, 1971; BELSKY et alii, 1980; HAY, 1980, 1981); GREENBERG et alii, 1981; CHIQUET et alii, 1981; LORING et alii, 1982; BISSEL et alii, 1982; LANDER et alii, 1982; SANES, 1983; NAKANISHI, 1983; RUNYAN & MARKWALD, 1983; ITO & TAKEUCHI, 1984; BERNFIELD et alii, 1984; TREJDOSIEWICZ et alii, 1985) e, GROBSTEIN, (1955) sugeriu que a interação tecidual ou indução embrionária poderia ser mediada pela matriz extracelular. Ele observou que durante as interações mesênquima-epitélio "in vitro" havia secreção de matriz extracelular pelo tecido indutor, a qual era detectável histoquimicamente.

O conceito de que a expressão final de uma informação genética possa ser regulada por componentes da matriz extracelular, tem ganho suporte de diversas fontes e tem permitido considerar que a diferenciação específica do tecido, pode ser influenciada pelo substrato ao qual a célula está aderida (KLEINMAN et alii, 1981; YANG & NANDI, 1983). A maioria destes estudos foram realizados com células mantidas em cultura, pois estas quando retiradas do organismo e cultivadas "in vitro" podem sofrer alterações drásticas na sua expressão fenotípica, ainda que as funções perdidas possam ser recuperadas se as células forem cultivadas sobre matriz extracelular íntegra ou sobre superfícies cobertas com os componentes isolados da mesma.

Um dos sistemas que tem se mostrado mais apropriado

para este tipo de estudo é o que utiliza células epiteliais mamárias, pois estas, de acordo com o que foi demonstrado por EMERMAN e colaboradores (EMERMAN et alii, 1977, 1978, 1979; EMERMAN & PITELKA, 1977), expressam morfologia e fisiologia diferentes dependendo do substrato no qual foram cultivadas.

Estes autores demonstraram que células epiteliais dissociadas provenientes de glândula mamária de camundongo em fase gestacional perdiam seu estado diferenciado quando cultivadas sobre uma superfície de plástico ou vidro, mas mantinham suas características morfológicas e bioquímicas quando o substrato utilizado para o cultivo era constituído por um gel de colágeno, em um meio hormonal apropriado (EMERMAN & PITELKA, 1977; EMERMAN et alii, 1977, 1979). No primeiro caso, as células epiteliais cultivadas em monocamadas confluentes eram finas, achatadas e perdiam a diferenciação específica de células mamárias, mas preservavam as características de células epiteliais. Quando cultivadas sobre gel de colágeno, o espalhamento era menor, mas as células ainda se mantinham achatadas. Entretanto, quando mantidas em gel de colágeno flutuante, sua forma passava a ser cuboidal ou colunar, caracterizando-se pela abundância de retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi bem desenvolvido e numerosas vesículas secretoras contendo micelas de caseína (EMERMAN et alii, 1979).

As células mamárias epiteliais em fase lactogênica, quando cultivadas sobre gel de colágeno ou em gel de colágeno flutuante retiveram considerável grau de diferenciação, tanto morfológica quanto bioquímica, embora, apenas as cultivadas no gel flutuante fossem colunares e conseguissem manter o seu conteúdo de lactose (BURWEN & PITELKA, 1980).

Resultados semelhantes a estes foram descritos para células mamárias bovinas em diferentes fases de desenvolvimento por MACKENZIE et alii, (1982, 1985). Estas células cultivadas sobre gel de colágeno aderido apresentavam morfologia idêntica a de células epiteliais, eram polarizadas e formavam membrana basal. Apresentavam figuras mitóticas, indicando a ocorrência de divisão celular. Uma vez que o gel tivesse sido deslocado, tornando-se um substrato flutuante no meio da cultura, as colônias não mais aumentavam de tamanho, alteravam sua morfologia, sendo as diferenças observadas, semelhantes as descritas anteriormente por EMERMAN et alii, (1979).

Não apenas as superfícies bidimensionais rígidas ou flexíveis, mas também as tridimensionais, interferem na manutenção do estado diferenciado da célula. HAEUPTLE et alii, (1983), estudando células epiteliais mamárias de coelhas virgens, mantidas em culturas primárias, observaram que as células que se desenvolveram sobre o colágeno aderido eram de um único tipo morfológico e formavam uma monocamada achatada, separada do gel de colágeno por uma lâmina basal. Sobre este substrato bidimensional rígido, as células mamárias sintetizaram DNA e proliferaram até a confluência. Estas células foram incapazes de expressar seu programa genético específico o que se refletia na ausência de secreção de caseína e de secreção e acúmulo de gordura. Quando o gel de colágeno era despreendido da superfície, formando o gel flutuante, isto é, uma superfície bidimensional flexível, as células se diferenciaram formando camadas compostas por dois tipos celulares diferentes, ou seja: uma de células secretoras em contato direto com o meio e outra de células semelhantes às mioepiteliais,

situadas entre as primeiras e o gel de colágeno, mas separada deste por uma estrutura semelhante à da lâmina basal. Esta alteração na forma celular, induzida pelo substrato, resultou no término da síntese de DNA e na indução da expressão do gene para a síntese de caseína do leite. Quando estas células foram imersas em uma estrutura tridimensional de colágeno, elas cresceram formando estruturas semelhantes as dos ductos, os quais irradiavam-se nas três dimensões, penetrando a matriz de colágeno circunvizinha e terminando, freqüentemente, por pequenos alvéolos. A proliferação celular e a produção de leite foram simultaneamente expressas nestas condições e gotas de gordura e de proteína do leite acumularam-se no lumen destas estruturas. A proteína do leite não era detectada na matriz, indicando, desta maneira, que a célula havia adquirido uma polaridade funcional. Estruturas semelhantes as dos ductos, desenvolvidas no interior de uma matriz colagenosa foram observadas também por BENNETT et alii, (1981), a partir de células mamárias em cultura, desde que fossem cultivadas juntas no frasco dois tipos de clones de células mamárias: as cuboidais secretoras e as alongadas semelhantes as mioepiteliais. LEE et alii (1984 a), observaram que as células da glândula mamária quando cultivadas sobre vidro ou plástico não secretavam os cinco tipos de caseína presentes no leite e nem lactalbumina, mas secretavam outras proteínas com peso molecular de 80.000, 67.000 e 140.000 daltons. Quando cultivadas sobre gel de colágeno aderido, as células produziam a maioria das proteínas secretadas pelas células aderidas ao plástico e secretavam também α e β caseínas em pequenas quantidades. Quando cultivadas em gel de colágeno flutuante

produziam α_1 , α_2 , β e γ caseínas em quantidades consideráveis. Estes mesmos autores estudando a cinética da síntese e secreção de caseína por estas células encontraram que a primeira era proporcional à quantidade de RNA_m, contudo a secreção e a degradação das caseínas variavam consideravelmente, sendo mais lábeis em culturas que utilizavam plástico como substrato (LEE et alii, 1984 b). Concluíram, deste modo, que o efeito do substrato colagenoso se manifestava não apenas a níveis transcrpcionais mas também a níveis pós-traducionais.

Substratos tridimensionais de colágeno foram utilizados também para a obtenção de clones de células hematopoiéticas (LANOTTE, 1984) e para o estabelecimento e manutenção da polaridade funcional das células epiteliais da tiróide, pois estas células, no referido substrato, se organizam em estruturas tridimensionais semelhantes a folículos (CHAMBARD et alii, 1981, 1984).

Não apenas a presença ou ausência de matriz extracelular tem sido importante para o processo de citodiferenciação, mas também a sua composição interfere na manifestação fenotípica celular. WICHA et alii (1979), demonstraram que quando células ductais e alveolares de glândula mamária de ratas virgens eram colocadas em placas de cultura, menos de 10% das células aderiram e se espalharam para formar colônias. Contudo, quando era utilizada uma superfície de colágeno insolúvel, a adesão e o crescimento celulares variaram dependendo do tipo de colágeno utilizado. Em colágeno tipo IV após 15 horas de cultivo, 55% das células estavam aderidas; enquanto que no colágeno tipo I, apenas 20%. As colônias que se desenvolveram no primeiro caso eram mais achatadas, espalhavam-se mais e as

divisões celulares ocorreram aleatoriamente em toda a população, enquanto que no segundo caso, as células formavam colônias mais compactas e as divisões celulares concentravam-se na periferia das colônias, onde as células encontravam-se mais achatadas. Alterações fisiológicas, também, foram detectadas por BLUM & WICHA (1984). Estes autores cultivando células mamárias de ratas virgens em plástico, colágeno e sobre uma matriz extracelular complexa extraída de glândulas mamárias de ratas grávidas, observaram que a secreção de α lactoalbumina era maior quando o último substrato era utilizado. Para separar o efeito que a forma celular e os componentes bioquímicos da matriz extracelular exerciam neste processo, as células mamárias foram cultivadas em matriz extraída de glândula mamária de rata grávida, que permaneceu aderida e sobre esta mesma matriz, previamente depositadas sobre gel de colágeno flutuante. Neste último substrato a célula assumiu a forma arredondada e aumentou a produção de α lactoalbumina em cerca de duas vezes mais do que em matriz da glândula mamária aderida e dez vezes mais do que em plástico ou gel de colágeno. Desta forma ficou demonstrado que tanto a geometria quanto a composição da matriz são importantes na estimulação da diferenciação das células epiteliais mamárias.

Além das células epiteliais mamárias, os hepatócitos, também, têm sido muito estudados. MICHALOPOULOS & PITOT, (1975), cultivando hepatócitos em filme de colágeno observaram que eles se mantinham epitelióides e achatados no centro dos grumos, enquanto que as células periféricas mostravam projeções citoplasmáticas com contornos irregulares. Os agrupamentos não aumentavam de diâmetro e eram formados por agrega-

ções e não por divisões celulares. Apresentavam estabilidade de 6 a 8 dias e a enzima aminoacil Tirosina Transferase não era induzida após a adição de corticosteróide ao meio de cultivo. Os hepatócitos mantidos em colágeno flutuante, formavam cordões estreitos de células epiteliais e na periferia dos agregados não eram observadas projeções citoplasmáticas com as porções finais pregueadas. As células apresentavam-se cúbicas ou poligonais, com diâmetro menor e os agregados eram estáveis por 30 dias, sendo que a enzima acima referida podia ser ativada durante todo este período. Variações morfológicas e fisiológicas foram observadas, também, a partir de linhagem celular de células hepáticas, as quais cultivadas sobre plástico apresentavam-se achatadas, com núcleos pleomórficos, eram incapazes de sobreviver em meio de cultura sem a adição de soro e requeriam a presença de hormônios e de fatores de crescimento. Quando cultivadas sobre colágeno, apresentavam-se cuboidais e sobreviviam sem soro e sem a adição de qualquer suplemento nutritivo ao meio de cultivo (GATMAITAN et alii, 1983). A utilização de uma biomatriz extraída de fígado de ratos normais contendo colágeno tipo I, tipo III e IV associados com proteínas não colagênicas, incluindo fibronectina e pequenas quantidades de glicosaminoglicanas, mostrou ser um substrato mais adequado para a manutenção de hepatócitos em culturas de longa duração (ROJKIND et alii, 1980). Os hepatócitos nestas condições puderam ser mantidos por mais de cinco meses, conservando algumas de suas funções específicas, embora não demonstrassem atividade proliferativa. Esta foi demonstrada por MARCEAU et alii (1982), os quais cultivaram hepatócitos de ratos recém nascidos e de animais adultos sobre um

substrato recoberto por fibronectina em meio nutritivo apropriado. A atividade proliferativa estava associada com alterações no grau de ploidia dos hepatócitos. Nestas condições de cultivo, a atividade das enzimas aminoacil tirosina transferase e lactato desidrogenase foram bem preservadas juntamente com a produção de albumina. A análise à microscopia eletrônica demonstrou que estes hepatócitos apresentavam "in vitro" o mesmo arranjo de fibrilas, que constituem o citoesqueleto presentes nas células "in situ" ou seja, arranjos em forma de anel ao redor dos espaços intercelulares que correspondem "in situ" aos canalículos biliares e, longos feixes na superfície celular em contato com o meio, o qual é encontrado ao longo das porções sinusoidais da membrana "in situ". A migração destas células "in vitro" também é influenciada pelo substrato, sendo que o colágeno tipo IV não interfere nessa migração, a laminina tem efeito estimulatório sobre ela e a fibronectina a inibe (BADE & NITZGEN, 1985).

Em relação às células epiteliais da córnea, SUGRUE & HAY (1981 a), observaram ao microscópio eletrônico, que "in vivo", as células da camada basal adjacentes a uma região não fibrilar rica em proteoglicanas e fibronectina apresentavam a superfície basal plana e o citoesqueleto formando uma camada densa, consistindo de numerosos microfilamentos, que se dispunham paralelamente à membrana. O epitélio, isolado por tratamento enzimático, exibia a superfície basal altamente pregueada e os microfilamentos parcial ou totalmente dispersos. As projeções persistiam indefinidamente, com as mesmas características, quando o epitélio removido era colocado "in vitro" sobre filtros "millipore", vidro ou plástico mas,

quando foi utilizado um substrato sólido de colágeno as projeções desapareceram e os microfilamentos se organizaram à mesma maneira das células "in situ". Utilizando-se colágeno solúvel dos tipos I, II, IV e as cadeias purificadas do colágeno tipo I obtinha-se resultados similares, o mesmo acontecendo com o emprego de fibronectina e laminina. Mas, quando se utilizava ácido hialurônico, condroitina sulfato, heparan sulfato e heparina não se obtinha este efeito. Foi demonstrado também, que o colágeno, a laminina e a fibronectina, nas mesmas concentrações em que restauravam a organização da superfície celular, estimulavam a síntese de colágeno (SUGRUE & HAY, 1981 b) e de laminina (SUGRUE & HAY, 1982) nestas células. A síntese de fibronectina (MATTEY & GARROD, 1984 a) e a capacidade para reorganizar fisicamente a fibronectina exógena (MATTEY & GARROD, 1984 b) foram detectadas nas células do epitélio corneal associado com a presença de elementos da matriz extracelular.

Desta maneira, as células epiteliais corneais quando cultivadas "in vitro" sobre substratos adequados são capazes de produzir uma matriz extracelular, a qual, por sua vez, pode ser utilizada como substrato para o desenvolvimento de outros tipos celulares. Foi observado que as interações desta matriz ou de seus componentes, com as células epiteliais do cristalino, restringia o espalhamento excessivo das células e restaurava o fenótipo polarizado original observado "in vivo" (TASSIN et alii, 1983); a síntese de colágeno tipo IV era restaurada nestas condições (KERN et alii, 1983), ao mesmo tempo em que foram observadas variações na síntese de glicoproteínas e glicosaminoglicanas (MOCZAR et alii, 1983).

Os componentes da matriz extracelular têm sido muito usados para a manutenção de células nervosas "in vitro". Em células nervosas, provenientes de embrião de galinha, a adesão, o crescimento e a orientação deste crescimento variam de acordo com o substrato utilizado (LETORNEAU, 1975 a, b). Em células da crista neural, observou-se que a adesão ao colágeno de tipos I a V é mediada pela fibronectina, a qual, também, influencia a direção da migração e a síntese de catecolaminas "in vitro" (LORING et alii, 1982). A importância do colágeno e da fibronectina para a expressão fenotípica de neurônios "in vitro" foi demonstrada também por CARBONETO et alii (1982), em cultura primária de células retiradas de embrião de galinha e por MAHÖNEN & RAUVALA (1985) em linhagens celulares de neuroblastoma.

Nos últimos anos uma variedade enorme de células puderam ser cultivadas "in vitro", mantendo as características morfológicas e fisiológicas típicas apresentadas "in vivo", desde que substratos adequados fossem utilizados. Entre elas podemos citar a manutenção de células alveolares tipo II (GEPPERT et alii, 1980), de condrócitos (PENNYPACKER et alii, 1979; WEST et alii, 1979; BENYA & SHAFFER, 1982), de fibroblastos (TOMASEK et alii, 1982; MACIEIRA-COELHO et alii, 1984; WOODS et alii, 1984; ADAMS, 1985), de células endoteliais (BENSCH et alii, 1983; PRATT et alii, 1984; SCHOR et alii, 1984), de células musculares cardíacas (ZALIN, 1979; TERRACIO et alii, 1984; DAMSKY et alii, 1984), esqueléticas (FESTOFF & RAO, 1984) e lisas (HOLDERBAUM & EHRHART, 1984; TOSELI, et alii, 1984; VÖLKER et alii, 1985 a, b), de células granulosas de folículos ovarianos (AMSTERDAM et alii, 1984), de células acina

res de pâncreas normais (OLIVER et alii, 1984) e cancerosas (REDDY et alii, 1984), de células de Sertoli (HADLEY et alii, 1984), de células derivadas da retina (CRAWFORD, 1983; DOCHERTY & LACKIE, 1985), além de vários trabalhos realizados com linhagens celulares estabelecidas provenientes de células normais ou cancerosas (SCHOR & COURT, 1979; SCHOR, 1980; RICHARDS et alii, 1983; LAWLER et alii, 1983; FAIRMAN & JOCOBSON, 1983; BURKE et alii, 1983; Mc CARTHY & FURCHT, 1984; BOECK et alii, 1985; TREJDOSIEWICZ et alii, 1985).

Os trabalhos citados anteriormente evidenciam que os componentes isolados da matriz extracelular como o colágeno, glicoproteínas e glicosaminoglicanas podem estar diretamente envolvidos no processo de diferenciação e manutenção do estado diferenciado de vários tipos celulares.

Entretanto, resultados importantes foram observados também a partir de trabalhos que utilizaram a matriz extracelular íntegra como indutora da diferenciação.

O poder de indução de diferenciação, "in vivo", pela matriz íntegra, foi descrito por URIST em 1965, que utilizando fragmentos de ossos desmineralizados, para implantes alogênicos intramusculares, observou a transformação de fibroblastos em condrócitos, os quais, posteriormente, sofriam calcificação e ossificação, simulando um processo de ossificação endocondral que se completava 24 a 26 dias após o implante. Posteriormente, REDDI e colaboradores realizaram transplantes alogênicos subcutâneos, observando a mesma seqüência temporal descrita por URIST, a qual foi bem caracterizada por eles a nível de microscopia óptica e eletrônica (REDDI & HUGGINS, 1972; REDDI & ANDERSON, 1976). Esses autores também observa-

ram que apenas a matriz óssea e a dentinária eram indutoras, enquanto a matriz colagenosa obtida de tendão, pele e cartilagem eram inativas. Associadas às variações morfológicas das células foram descritas variações fisiológicas como o aumento da atividade de fosfatase alcalina (REDDI & ANDERSON, 1976), aumento da incorporação de Ca^{2+} (REDDI & ANDERSON, 1976), variações na síntese de proteoglicanas (REDDI et alii, 1978) e de fibronectina (WEISS & REDDI, 1981), além de alterações a nível de organização molecular da matriz óssea desmineralizada (M.O.D.) e dos elementos de matriz neoformados (VIDAL, 1983; VIDAL & WADA, 1985) observados em implantes heterólogos de MOD, em tecidos musculares, através da diminuição da birrefringência da matriz implantada e de aumento da organização das substâncias extracelulares neoformadas.

A observação de que tratamento com RNAase e DNAase não afetavam a atividade biológica da MOD "in vivo", enquanto que os tratamentos com collagenase, tripsina ou papaína inibiam esta atividade indutora, (REDDI & ANDERSON, 1976) levou à suposição de que a substância osteogênica teria caráter proteico. Através de extrações dissociativas e reconstituição biológica dos componentes da matriz, SAMPATH & REDDI (1981) observaram que o tratamento da MOD com guanidina-HCL 4M a levava à perda do poder indutor de diferenciação. Estes autores mostraram também que as proteínas osteoindutivas teriam peso molecular menor do que 50.000 daltons. Este extrato proteico, quando inoculado "in vitro", induziu a proliferação celular em culturas de fibroblastos (SAMPATH et alii, 1982) e a síntese de proteoglicanas específicas de cartilagem e colágeno tipo II pelas células musculares embrionárias, as quais mostra-

ram também alterações morfológicas (SEYEDIN et alii, 1983). Mas "in vivo", SAMPATH & REDDI (1984) mostraram que a presença da fração osteoindutiva por si só, não era suficiente para desencadear o processo de diferenciação, sendo necessária a presença de partículas de MOD maiores de 74 μ m para que o fenômeno ocorresse.

A validade da utilização de MOD "in vitro" como substrato para a adesão, crescimento e diferenciação celular foi demonstrada em cultura de órgão realizada com músculo esquelético retirado no estágio embrionário e, neste caso, a MOD induziu a formação de cartilagem hialina (NOGAMI & URIST, 1970, 1974). Foi demonstrado por NATHANSON et alii (1978) que, além de explantes, as culturas primárias de músculo esquelético, também formavam cartilagem na presença da MOD, da mesma maneira que os tecidos conjuntivos extraídos da cápsula da tiróide e do pulmão e de clones de fibroblastos e de células musculares.

O fato da MOD aliciar a condrogênese "in vitro", a partir de células não condrogênicas adiciona peso à hipótese de que fatores ambientais estão envolvidos na manifestação do fenótipo celular das células em cultura o qual se manifesta a nível ultraestrutural e no tipo e quantidade de glicosaminoglicanas sulfatadas sintetizadas por estas células durante sua transformação (NATHANSON & HAY, 1980 a, b).

Do que pode ser observado por este breve apanhado, a matriz extracelular desempenha papel fundamental nos processos que levam à diferenciação celular, isto é, está diretamente relacionada com a manifestação da expressão gênica tanto

"in vivo" quanto "in vitro". Isto foi demonstrado não apenas pela utilização dos componentes isolados da matriz como colágeno, fibronectina, proteoglicanas e glicosaminoglicanas, mas também com a utilização de matriz extracelular íntegra como é o caso da MOD. Em relação a este último, pudemos constatar pelas referências por nós levantadas, que sua utilização "in vitro" se restringe às culturas de órgãos e culturas primárias, sendo que sua atuação sobre linhagens celulares estabelecidas não foi ainda observada. Além disso, supõem-se que os fatores presentes na MOD com potencial osteoindutivo sejam protéicos, mas a maneira como atuam a nível celular ainda é motivo de controvérsias. De acordo com estes fatos nos propusemos a desenvolver os objetivos abaixo relacionados:

1. Estudar a ação da MOD em células de linhagem estabelecida, mantida a vários anos em cultura.
2. Estabelecer um sistema em que pudessemos analisar a ação direta e indireta da MOD nas células em cultura.
3. Detectar através de análises citoquímicas e morfométricas as possíveis alterações induzidas pela MOD a nível de estrutura cromatínica, da morfologia e fisiologia celulares e alterações a nível de membrana das células por nós cultivadas.
4. Detectar através da análise eletroforética, citoquímica e de microscopia de polarização as possíveis alterações sofridas pela MOD durante o processo indutivo.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Manutenção das células em cultura

As células Vero, uma linhagem celular estabelecida, originada a partir de células epiteliais renais de macaco verde africano, foram obtidas no Instituto Adolf Lutz na passagem 198 e cultivadas em nosso laboratório até a passagem 204.

O cultivo foi levado a efeito empregando-se o meio Eagle suplementado com 10% de soro de vitelo inativado e 50 µg/ml de garamicina. Os repiques foram realizados com a utilização de tripsina a 0,2% em solução de Hanks livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Na passagem 204 as células de vários frascos de cultura foram misturadas e amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, no meio já descrito anteriormente, acrescido de 10% de glicerina p.a. da Merck. Sempre que necessário, as ampolas foram descongeladas em banho-maria a 37°C, sendo seu conteúdo centrifugado a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, as células foram res-suspensas em meio e inoculadas em frascos tipo xarope com 20 ml do meio de incubação.

Após a formação de um lençol celular as células foram tripsinizadas e repicadas para os tubos de Leighton. Portanto, todas as análises foram efetuadas com células Vero na passagem 206.

O número de células inoculadas, determinado por contagem em hemocitômetro, variou de 1,4 a $1,7 \times 10^5$ células/ml

de meio, sendo as amostras retiradas com 48 e 120 horas de cultura, correspondente à fase de crescimento logarítmico e à fase estacionária, respectivamente. Estes valores foram estabelecidos a partir de um teste previamente realizado, em que as amostras foram coletadas a cada 24 horas, durante 8 dias, nas condições de cultivo relatadas anteriormente, sendo considerado fase estacionária aquela em que toda a superfície da lamínula estivesse ocupado por uma monocamada celular e fase de crescimento logarítmico aquela compreendida entre 24 horas de cultivo até a formação do tapete celular.

As células foram cultivadas utilizando como substrato para a adesão e crescimento, fragmentos de matriz óssea desmineralizada (MOD) e, como controle, empregou-se o crescimento das células sobre lamínula. O meio de cultura foi trocado diariamente a fim de se evitar possíveis deficiências nutricionais que pudessem interferir com a análise dos resultados.

2.2. Obtenção da matriz óssea desmineralizada (MOD)

Fragmentos da diáfise de fêmur de boi com tamanho aproximado de 1,5 cm foram desmineralizados com ácido clorídrico a 5%, segundo a técnica descrita por HAUSCKA & REDDI, (1980). Após a desmineralização o material foi lavado com água destilada estéril, cortado em histiocriótomo com 30 µm de espessura, sendo recolhido em água destilada estéril. Os cortes assim obtidos foram conservados a 5°C em água bidestilada estéril contendo 100 µg/ml de garamicina.

Todas as etapas descritas a seguir foram efetuadas empregando-se materiais e soluções estéreis, no interior de uma capela de fluxo laminar.

O corte de MOD para ser utilizado como substrato para a adesão e crescimento celular, foi colocado em uma das extremidades de um fragmento de lâminula de 24 x 8 mm, utilizando-se a técnica de pescaria, com auxílio de um bastão de vidro e seco ao ar. Isto feito, a lâminula foi inserida em tubo de Leighton e foi lavada várias vezes com solução de Hanks durante 24 h a 5°C e a seguir, os tubos foram submetidos a teste de esterilidade, durante 24 h a 37°C, substituindo-se a solução de Hanks pelo meio de Eagle.

Após este procedimento, o meio utilizado no teste de esterilidade foi retirado, sendo adicionado a cada tubo 1 ml do meio de Eagle com 10% de soro de vitelo e 50 µg/ml de garamicina, estando desta maneira, preparado para receber o inóculo celular.

2.3. Fixação do material

As células foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,2M pH 7,4 por 30 minutos quando foram submetidas à reação com azul de toluidina pH 4,0 e por 2 h para a realização da complexação com Concanavalina A (Con A) peroxidase de rábano (HRP).

Para o cálculo do índice mitótico e para a cariometria o material foi fixado com etanol/ácido acético na proporção de 3:1 durante 15 minutos e submetido à reação de Feulgen.

2.4. Citoquímica

As reações descritas a seguir foram realizadas no mínimo em 3 séries de cultivo, sendo sempre efetuadas em duplicata.

2.4.1. Azul de Toluidina pH 4,0 (At pH 4,0)

Para os estudos de basofilia e metacromasia celulares, utilizou-se uma solução de azul de toluidina a 0,025% em tampão de Mac Ilvaine pH 4,0 (LISON, 1960), segundo Vidal (MELLO & VIDAL, 1980).

2.4.2. Complexação com concanavalina A mais peroxidase (Con A - HRP)

A diferenciação histoquímica de carboidratos, com glicose ou manose terminais, foi efetuada de acordo com o método descrito por KATSUYAMA & SPICER (1978).

As amostras foram encubadas inicialmente em uma solução de Con A na concentração de 1 mg/ml, a seguir em HRP na concentração de 1 mg/25 ml e finalmente com diaminobenzidina (DAB) na concentração de 5 mg/10 ml, todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato 0,06 M pH 7,2.

Como controle suprimiu-se a encubação com Con A, sendo a mesma efetuada com a solução tampão.

2.4.3. Fosfatase ácida

A técnica utilizada foi a de Gomori, modificada por AZEREDO-OLIVEIRA (1982) onde se utiliza uma solução de β -gli

cero fosfato de sódio e nitrato de chumbo em tampão acetato 0,05 M, pH 5,0 como substrato para a ação enzimática.

Esta é evidenciada pela formação de um precipitado pardo escuro, quando, após o período de incubação neste meio, o material é lavado e mergulhado em sulfeto de amônia a 1%. Como controle utilizou-se amostras incubadas em tampão acetato 0,05 M, pH 5,0 na ausência do substrato.

A reação para fosfatase ácida foi realizada em material não fixado.

2.5. Índice Mitótico

O número de células em divisão em cada mil células contadas, constitui o índice mitótico (DEITCH & SAWICHI, 1979).

Para estabelecer este índice contamos 3×10^3 células/cultura em monocamada. Esta contagem foi efetuada em material previamente fixado o qual foi submetido a reação de Feulgen após 1 hora de hidrólise com HCl a 4N à temperatura ambiente.

2.6. Cariometria

As células por nós cultivadas não apresentavam limite citoplasmático regular mas, pudemos observar que o tamanho do núcleo era aparentemente proporcional ao tamanho da célula. Assim, analisamos variação morfológica através do cálculo da área nuclear (S) em amostras submetidas a reação de Feulgen. Os dados foram colhidos com ocular milimetrada adapta-

da a microscópio Zeiss, biocular, com objetiva 40/0,25. Os valores obtidos para o eixo maior (A) e o eixo menor (B), perpendiculares entre si, de cada um dos núcleos, foram aplica-dos na fórmula

$$S = \pi \left(\frac{A + B}{4} \right)^2$$

Em cada uma das condições experimentais foram medi-dos 50 núcleos.

2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese foi realizada com o meio recolhido dos tubos que continham as células crescendo sobre lamínula e sobre MOD, segundo a metodologia descrita por PANYIM & CHALK-LEY (1969). As proteínas do meio foram dissolvidas em ácido acético 0,9N, sendo a amostra aplicada de 20 µl. A concentra-ção do gel empregado foi inicialmente de 15% e posteriormente, utilizou-se um gel a 5% os quais foram corados com "Coomassie brilliant blue 250 R".

2.8. Microscopia de polarização

O material foi observado ao microscópio de polariza-ção Zeiss, com objetiva Plan 40/0,65, com analisador e polari-zador cruzados e compensador Sénarmont, para a detecção quali-tativa da birrefringência na matriz em regiões com células aderidas e regiões sem células, não muito distantes das primeiras.

3 - RESULTADOS

3.1. Aspectos Gerais da Cultura

3.1.1. Culturas celulares em ausência de MOD

As células com 48 h de cultivo na ausência de MOD cresceram aleatoriamente, sendo que em algumas regiões se encontravam mais agrupadas. A forma das células não se manteve constante sendo algumas alongadas, outras com prolongamentos e, nos locais de maior concentração, poligonais (Fig. 1). Além desta variação na forma, observou-se também diferenças em relação ao tamanho celular, pois foram encontradas algumas células com até 20 vezes o tamanho apresentado pela maioria (Fig. 3).

Após 120 h de incubação a lamínula, se encontrava totalmente recoberta por células formando um tapete confluyente (Fig. 5), constituído por células poligonais e com a mesma variação de tamanho observada nas preparações com 48 h de cultivo (Fig. 3).

3.1.2. Culturas celulares em presença de MOD

De acordo com o que foi descrito no tópico correspondente a obtenção da MOD no capítulo Material e Métodos e ao seu preparo para posterior utilização como substrato para a adesão e crescimento celulares, obtivemos em um mesmo fragmento de lamínula células que cresceram diretamente sobre a MOD, a qual ocupava aproximadamente 1/3 da lamínula e células

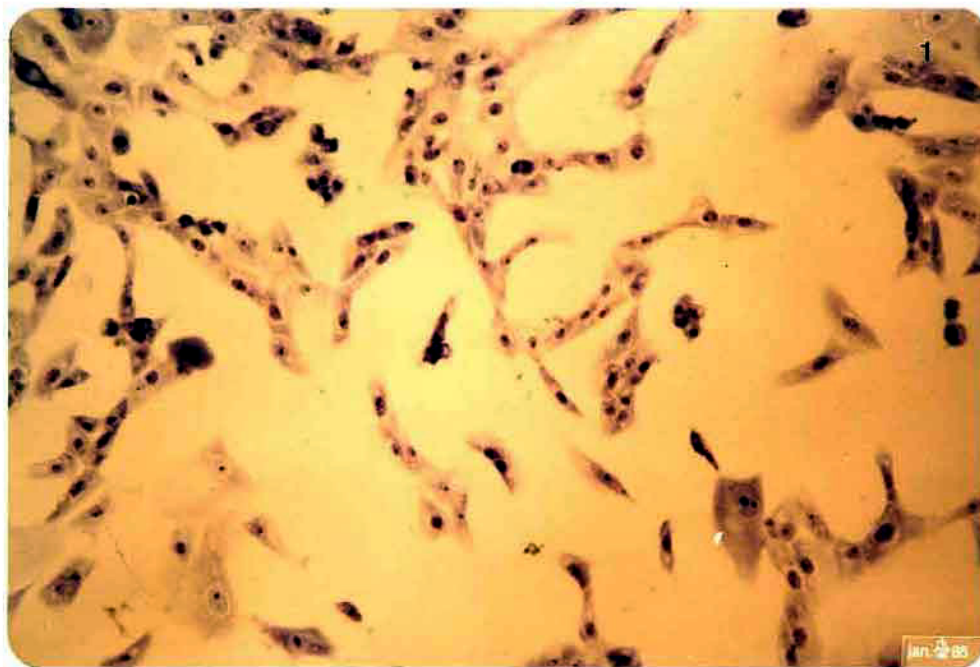


Fig. 1 - Células Vero com 48 h de cultura sobre lamínula. Observar a variação na distribuição das células sobre o substrato e as diferenças em relação a morfologia e ao tamanho das células. Aumento de 150 x.

que cresceram nos 2/3 restantes, em contato direto com o vidro (Fig. 2). Desta maneira passaremos a descrever as células nas condições acima citadas, ou seja, células cultivadas sobre MOD e células que cresceram sobre a lamínula nos tubos com MOD, em regiões próximas e afastadas dessa matriz.

As células desenvolveram-se com êxito sobre a matriz. Após 48 h de cultivo observaram-se regiões não ocupadas por células e locais onde estas se encontravam mais agrupadas (Fig. 2). O seu crescimento acompanhou a orientação das lamelas de colágeno, com células mais alongadas (Fig. 6) e maior uniformidade na dispersão dos valores de área nucleares (Fig. 3). As células que cresceram circundando os canais de Havers da MOD apresentavam morfologia semelhante a células endoteliais (Fig. 6).

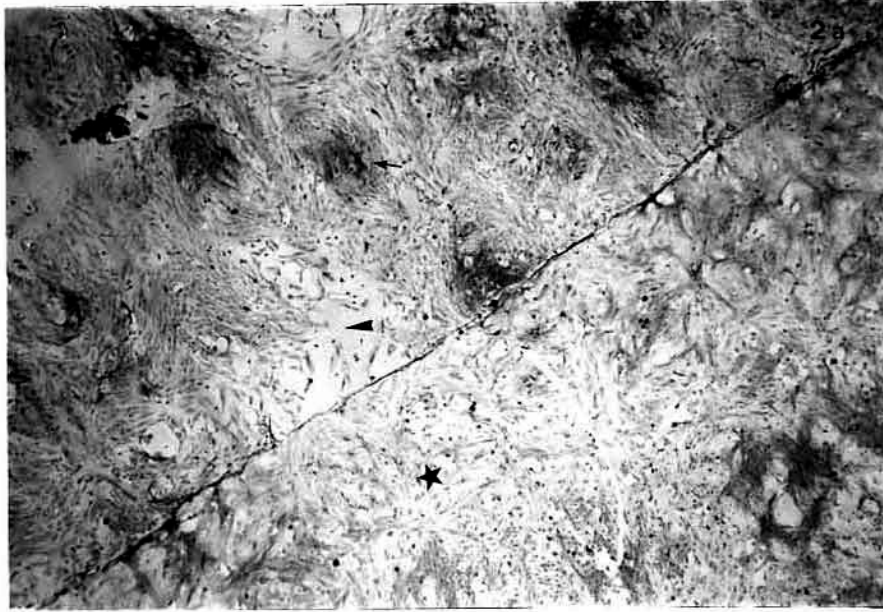
Após 120 h de cultivo o aspecto observado era semelhante ao período de 48 h de incubação descrito acima.

Depois de 48 h de cultivo as células localizadas próximas a MOD eram alongadas, apresentando tamanho uniforme (Fig. 8 e 16a). Entretanto, mostravam uma alteração gradativa de forma e tamanho, assemelhando-se as de 48 h de cultivo na ausência de matriz, a medida que se situavam mais distantes da MOD (Fig. 16 b).

Com o aumento do período de incubação para 120 h as células próximas a MOD apresentavam forma variada, notando-se a presença de pequenos grupos constituídos por células com aspecto mais arredondado (Fig. 9 e 10). A medida que se afastavam da MOD as células adquiriam as características típicas daquelas com 120 h de cultivo na ausência de matriz apresentando, contudo, um tamanho mais uniforme (Fig. 3).

Fig. 2 - Células Vero com 48 h de cultivo com MOD.

- a) Aspecto geral da cultura. Na porção da lamínula ocupada pela MOD observa-se locais ainda sem células (▲) e regiões onde elas se encontram agrupadas (▲). As células se dispõem acompanhando a direção dos feixes de colágeno da matriz. Nas células sobre lamínula (★), observa-se o crescimento aleatório das células. Aumento 36 x.
- b) Mesmo campo mostrado na figura a, só que visto ao microscópio de polarização. O brilho contra o fundo escuro é dado pela birrefringência dos feixes de colágeno e identifica plenamente a área ocupada pela MOD e a direção, nesta, dos feixes de colágeno. Aumento 36 x.



3.2. Cariometria

3.2.1. Culturas celulares em ausência de MOD

A área nuclear obtida de células Vero, na ausência de matriz, com 48 h de cultivo, mostrou valores que variavam até $1500 \mu\text{m}^2$, sendo que a maioria dos núcleos estava incluída na classe de 30 a $60 \mu\text{m}^2$ (Fig. 3).

Nestas mesmas condições de cultivo, após 120 h de incubação, a dispersão dos valores da área nuclear foi semelhante a apresentada pelas células com 48 h de incubação sendo a maioria dos valores encontrados no intervalo de 30-150 μm^2 (Fig. 3).

3.2.2. Culturas celulares na presença de MOD

Nas células cultivadas sobre MOD, tanto nas culturas com 48 h quanto com 120 h de incubação, a distribuição dos valores da área nuclear foi mais restrita, ficando compreendida até a faixa dos $240 \mu\text{m}^2$, demonstrando assim, um tamanho mais uniforme dos núcleos e consequentemente das células (Fig. 3).

As preparações obtidas das culturas após 48 e 120 h de incubação que se desenvolveram sobre a lâmina, nos tubos com MOD, mostraram padrão de dispersão dos valores da área semelhante a aqueles obtidos das células que cresceram sobre a MOD, para as células adjacentes a matriz, embora, nas células situadas distantes da matriz com 48 h de cultivo, núcleos com área superior a $300 \mu\text{m}^2$ foram encontrados (Fig. 3).

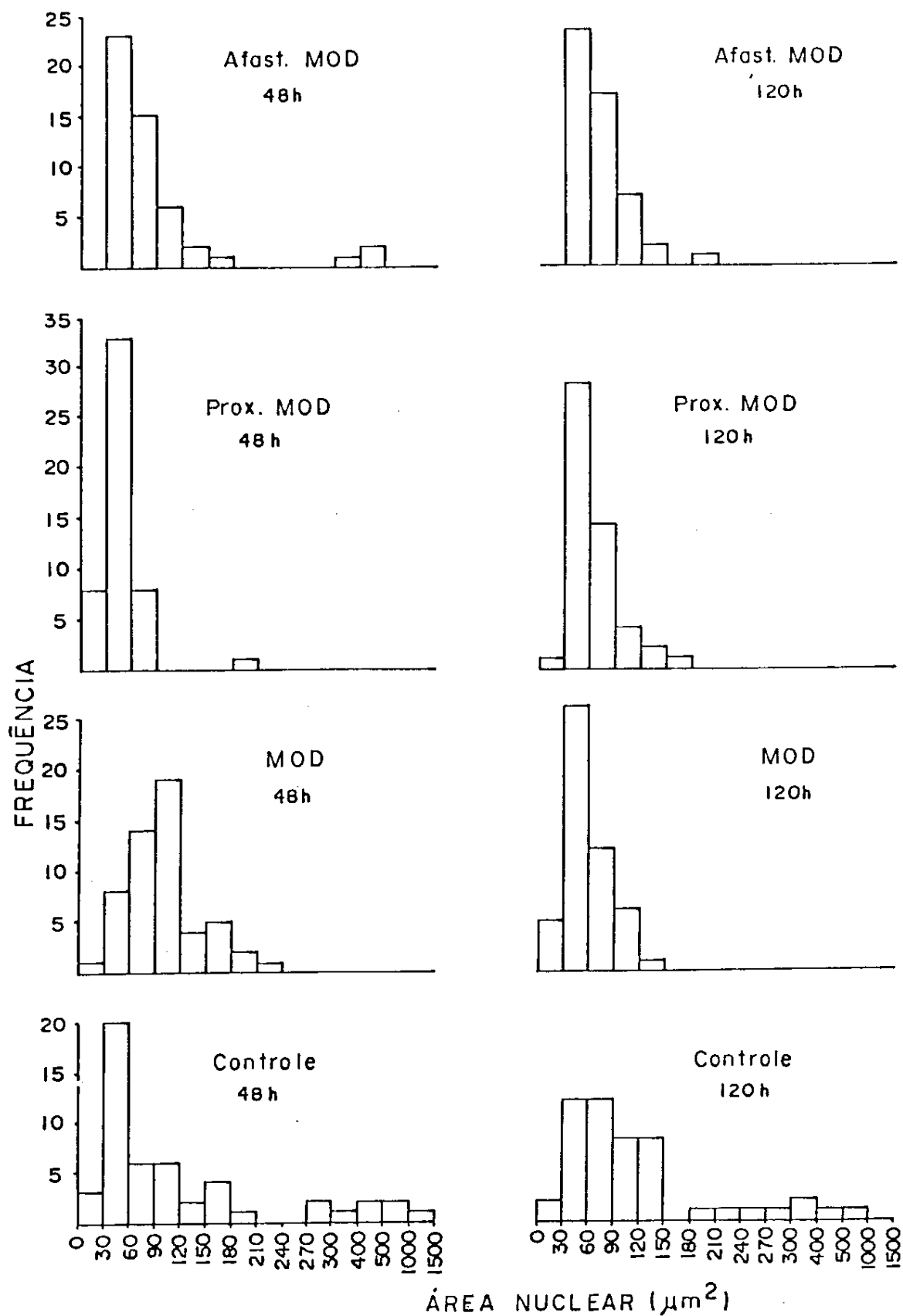


Fig. 3 - Histograma relativo a área nuclear das células Vero cultivadas na ausência e presença de matriz óssea desmineralizada (MOD).

3.3. Reação com azul de toluidina a pH 4,0

3.3.1. Culturas celulares em ausência de MOD

Quando submetidas a reação com At pH 4,0, tanto as células com 48 h quanto as com 120 h de cultivo na ausência de MOD apresentavam citoplasma basófilo, finamente granular e um halo perinuclear não corado. Os núcleos também eram basófilos, redondos ou ovalados, com tamanho variado, apresentando um ou mais nucléolos. Na maioria desses núcleos a cromatina apresentava aspecto granular, sendo estas granulações metacromáticas, mas, em alguns deles, principalmente nos maiores, mostrava-se homogênea e corada em azul (Fig. 4 e 5).

3.3.2. Culturas celulares em presença de MOD

Nas preparações celulares obtidas de culturas em presença de matriz após 48 h de incubação e submetidas à reação com At pH 4,0, as células sobre a MOD mostraram citoplasma basófilo, metacromático com muitas regiões não coradas que corresponderiam a vacúolos, e um halo perinuclear onde a basofilia era menor.

Os núcleos eram ortocromáticos corando-se em azul esverdeado e com aspecto homogêneo, possuindo um ou mais nucléolos detectados por sua coloração mais intensa e azul (Fig. 6).

Nas células com 120 h de cultura situadas sobre a MOD a reatividade frente ao At pH 4,0 foi a mesma observada e já descrita para as localizadas na mesma região após 48 h de cultivo observando-se, entretanto, células isoladas ou grupos.

Fig. 4 - Células Vero com 48 h de cultivo sobre lamínula coradas com At pH 4,0. Notar o citoplasma basófilo com granulações finas (▲) e a presença de um halo perinuclear não corado (↑). O núcleo apresenta-se com 1 ou mais nucléolos (▲) sendo que em alguns a cromatina tem aspecto homogêneo (☆) mas a maioria apresenta granulações metacromáticas (*). Aumento de 375 x.

Fig. 5 - Células Vero com 120 h de cultivo sobre lamínula. Células poligonais, com tamanho variável, citoplasma basófilo com granulações finas (▲) e um halo ou região perinuclear não corada (↑). Os núcleos são basófilos, com 1 ou mais nucléolos (▲) sendo alguns com aspecto homogêneo () e outros apresentando granulações metacromáticas (*). Aumento de 375 x.

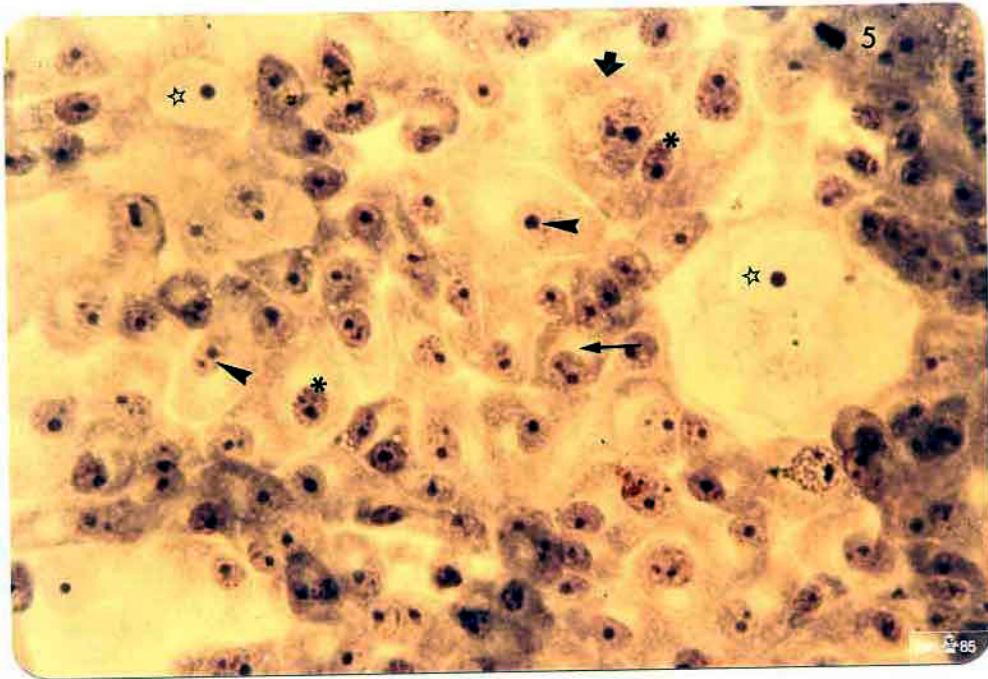
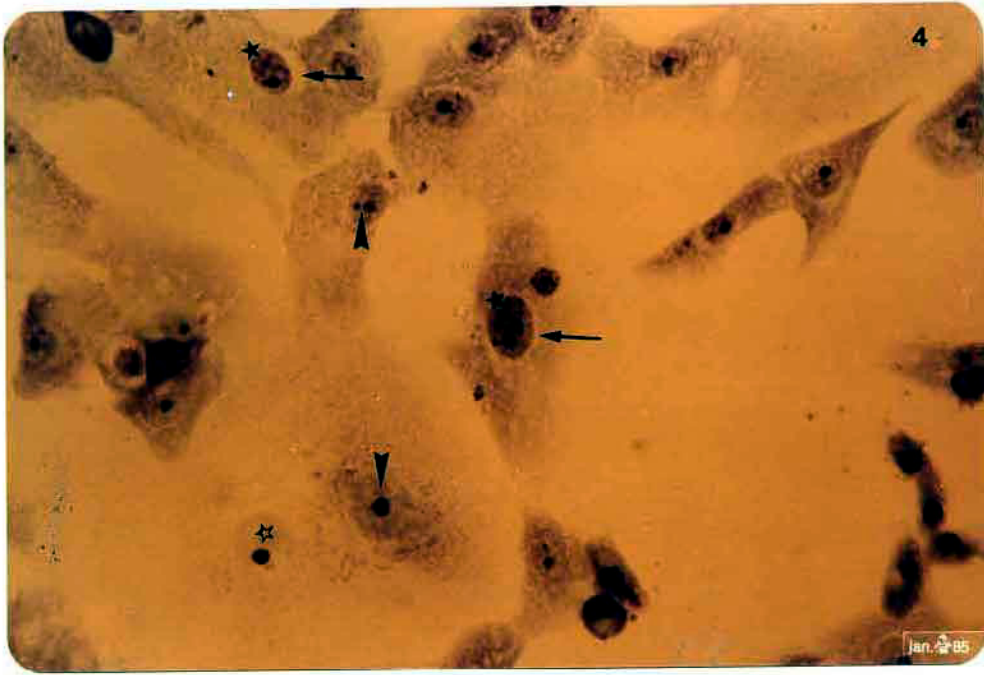
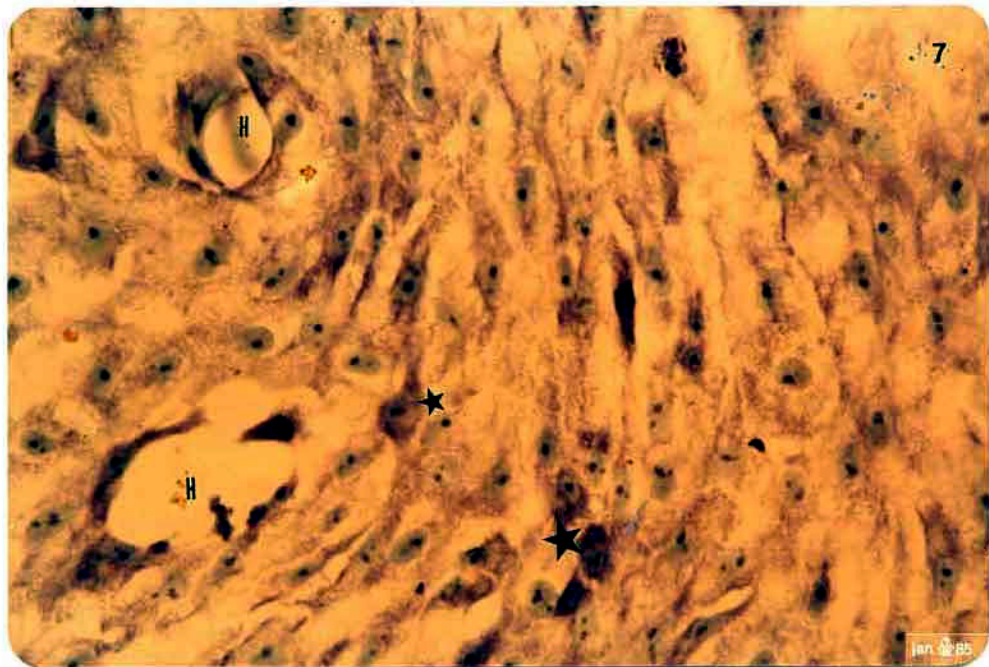
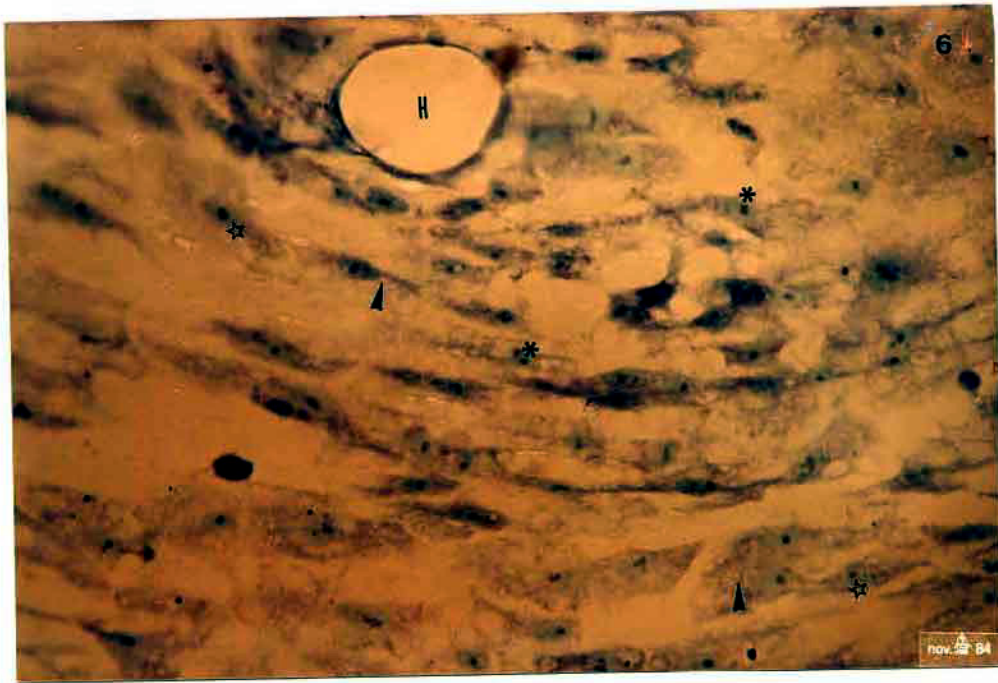


Fig. 6 - Células Vero com 48 h de cultura sobre MOD coradas com At pH 4,0. As células se desenvolveram acompanhando as lamelas do colágeno, eram alongadas, apresentando tamanho uniforme, o citoplasma é metacromático, com aspecto mais grosseiro, apresentando regiões não coradas (▲). Os núcleos ovalados são ortocromáticos, apresentando cromatina com aspecto homogêneo (☆) e contém 1 ou mais nucléolos (*) H. de canal de Havers. Aumento de 375 x.

Fig. 7 - Células Vero com 120 h de cultivo sobre MOD, coradas com At pH 4,0. Apresentam citoplasma basófilo com granulações grosseiras, núcleo ortocromático com 1 ou 2 nucléolos, forma alongada acompanhando a disposição das fibras colágenas, inclusive ao redor do canal de Havers (H). Observa-se grupos de células ou células isoladas com basofilia citoplasmática mais acentuada e metacromasia (★). Aumento de 375 x.



com o citoplasma mais basófilo e metacromático (Fig. 7).

A análise das células que após 48 h de cultivo cresceram sobre lamínula nas regiões adjacentes a MOD, revelou uma coloração semelhante a das células que se desenvolveram sobre MOD depois do mesmo período de incubação apresentando, inclusive, núcleo ortocromático e cromatina com aspecto homogêneo (Fig. 8).

A medida que as células se situavam mais afastadas dessa região, alguns núcleos já se apresentavam basófilos, com granulações metacromáticas, e na região mais distante da matriz, todas as células tinham o aspecto característico das células com 48 h de cultivo na ausência de matriz.

O citoplasma das células com 120 h de cultivo, localizadas próximas a MOD mostrou basofilia e intensa metacromasia, a qual foi gradualmente diminuindo na medida que a célula analisada se situava mais distante da MOD (Fig. 9). Os núcleos apresentavam-se ortocromáticos, e apenas em algumas células na região mais distal da lamínula estes eram basófilos com granulações metacromáticas, características das células que utilizaram o vidro como substrato para a adesão e crescimento na ausência de matriz.

Além dessas células os grupos de células arredondadas próximas a MOD reagiram intensamente ao At mostrando metacromasia (Fig. 10) e apresentando no citoplasma regiões não coradas correspondente a vacúolos, os quais observados na microscopia de polarização demonstraram birrefringência (Fig. 11).

Fig. 8 - Células Vero com 48 h de cultivo que cresceram sobre lamínula, próximas a MOD, coradas com At pH 4,0. Notar as células com tamanho uniforme, citoplasma metacromático e o núcleo ortocromático com cromatina de aspecto homogêneo. Aumento de 375 x.

Fig. 9 - Células Vero com 120 h de cultura sobre lamínula próximas a MOD, coradas com At pH 4,0. As células apresentam forma variada, sendo algumas arredondadas, tamanho uniforme, citoplasma basófilo, metacromático com regiões não coradas que correspondem a vacúolos (▲), os núcleos são ortocromáticos, a cromatina é homogênea e apresentam 1 ou mais nucléolos (*). Aumento de 375 x.

Fig. 10 - Grupo de células próximas a MOD com 120 h de cultura, coradas com At pH 4,0. Células arredondadas, citoplasma basófilo, metacromático apresentando vacúolos não corados (▲) e uma região perinuclear com basofilia menor (▲). Aumento de 940 x.

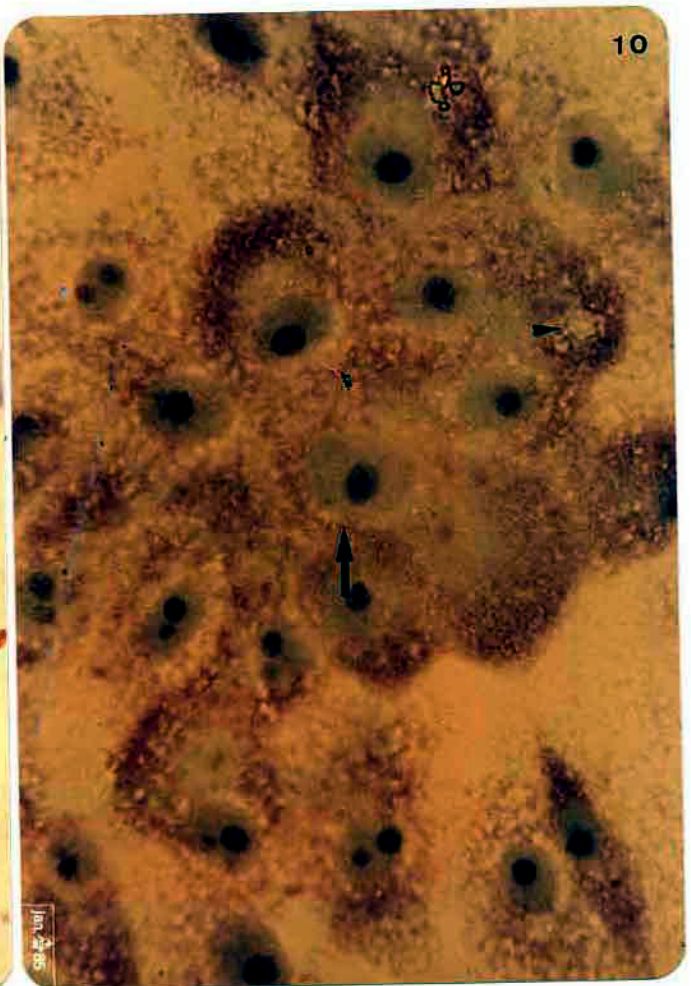
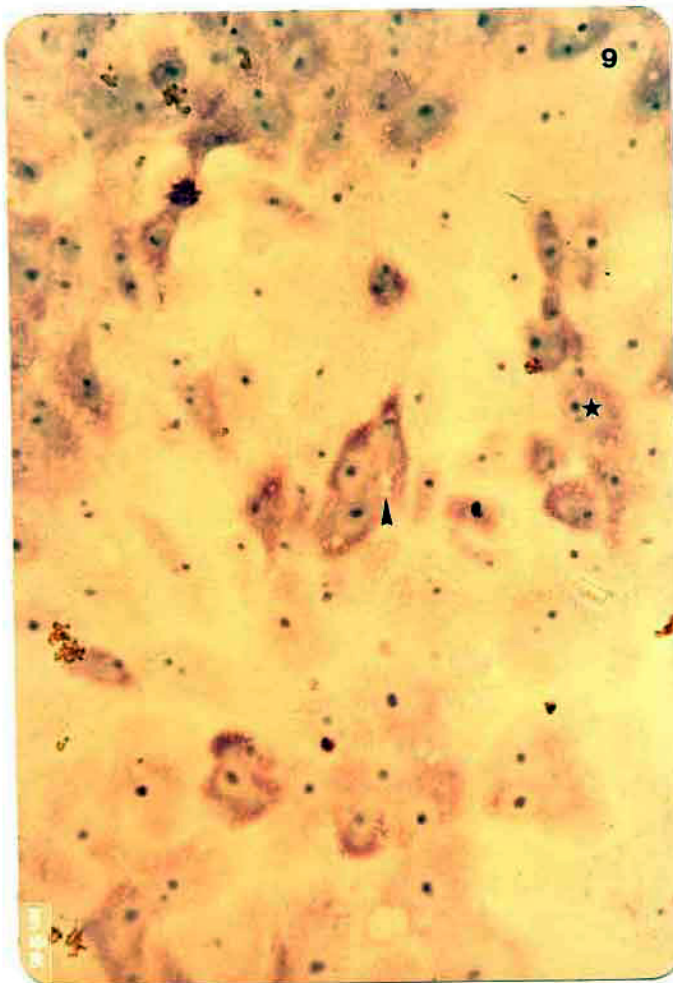
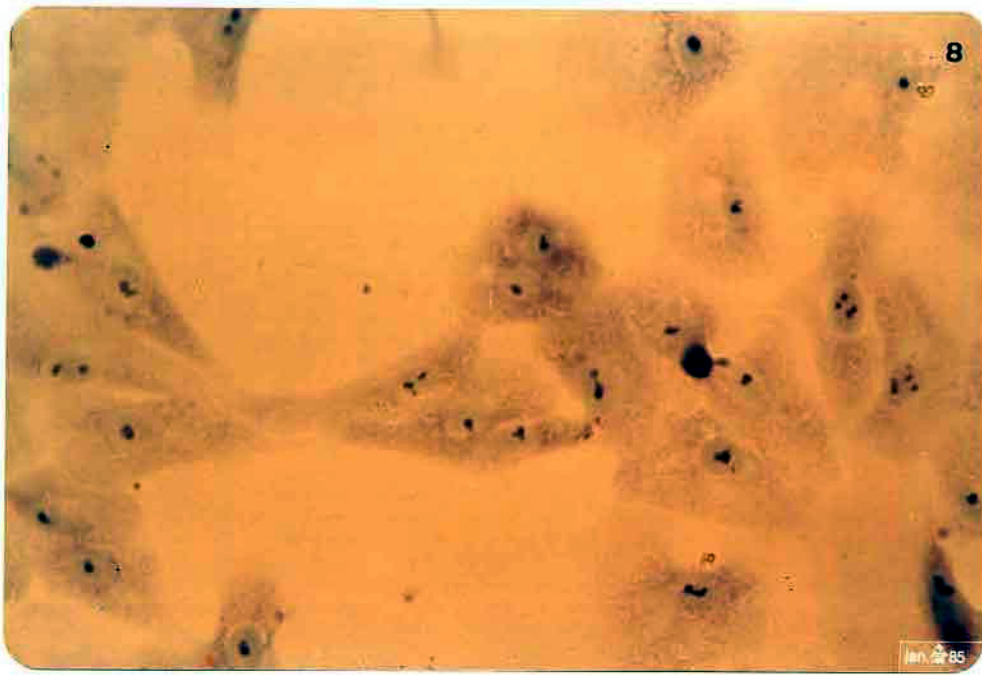
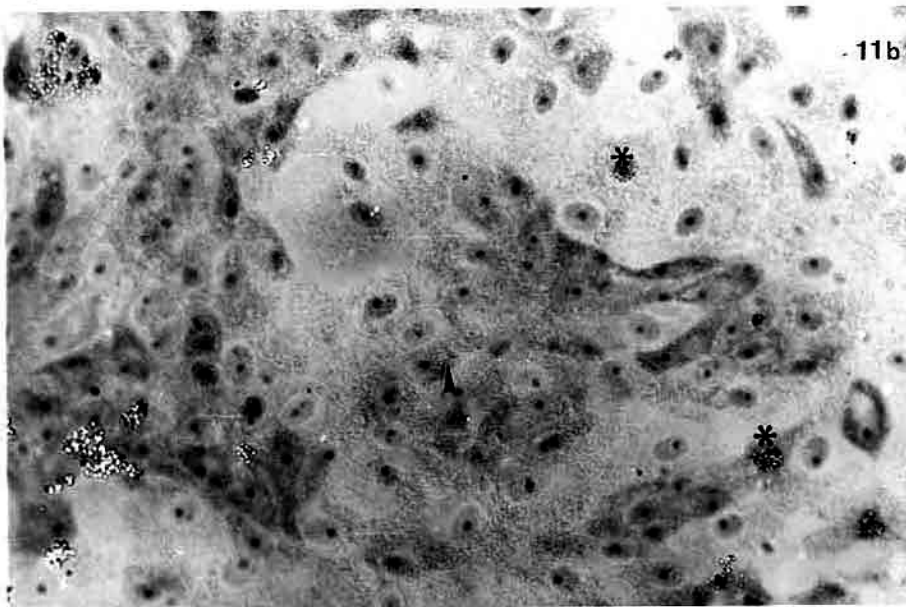
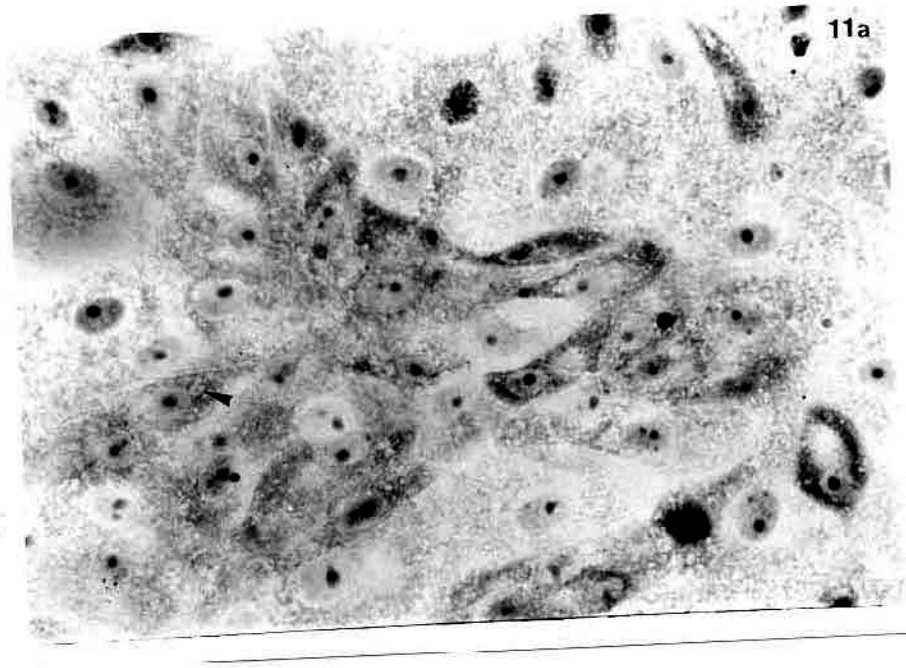


Fig. 11 - Células Vero com 120 h de cultura sobre lamínula, próximas a MOD.

- a) Grupos de células basófilas, apresentando cromatina homogênea, citoplasma com granulações grosseiras que correspondem a vacúolos (▲). Aumento de 450 x.
- b) Mesmo campo da fotografia a, mas visto com microscópio de polarização. Os vacúolos (▲) contêm material que é birrefringente. Observa-se também a birrefringência dos cromossomos em células que estão se dividindo (*). Aumento de 380 x.



3.4. Complexação com a Concanavalina A

3.4.1. Culturas celulares em ausência de MOD

A incubação das preparações celulares provenientes dos tubos com 48 h de cultivo com ConA-HRP, revelou presença de grânulos acastanhados que se distribuíam por todo o citoplasma celular os quais foram detectados em maior número na região perinuclear (Fig. 12), não se detectando reação no nucléolo.

Esta reação evidenciou também os prolongamentos celulares que mantêm as células unidas entre si e ao substrato (Fig. 13).

Notou-se ainda a presença de um produto extracelular ao qual as células estavam aderidas e que reagiu positivamente a incubação com ConA-HRP (Fig. 13). Nas preparações controle, cuja reação foi ^{obtida} na ausência de ConA, os resultados observados foram completamente negativos.

As células com 120 h de cultivo em ausência de MOD, incubadas com ConA-HRP, apresentavam menor quantidade de grânulos citoplasmáticos corados os quais se distribuíam de maneira mais homogênea do que nas células com 48 h de cultivo nas mesmas condições (Fig. 14).

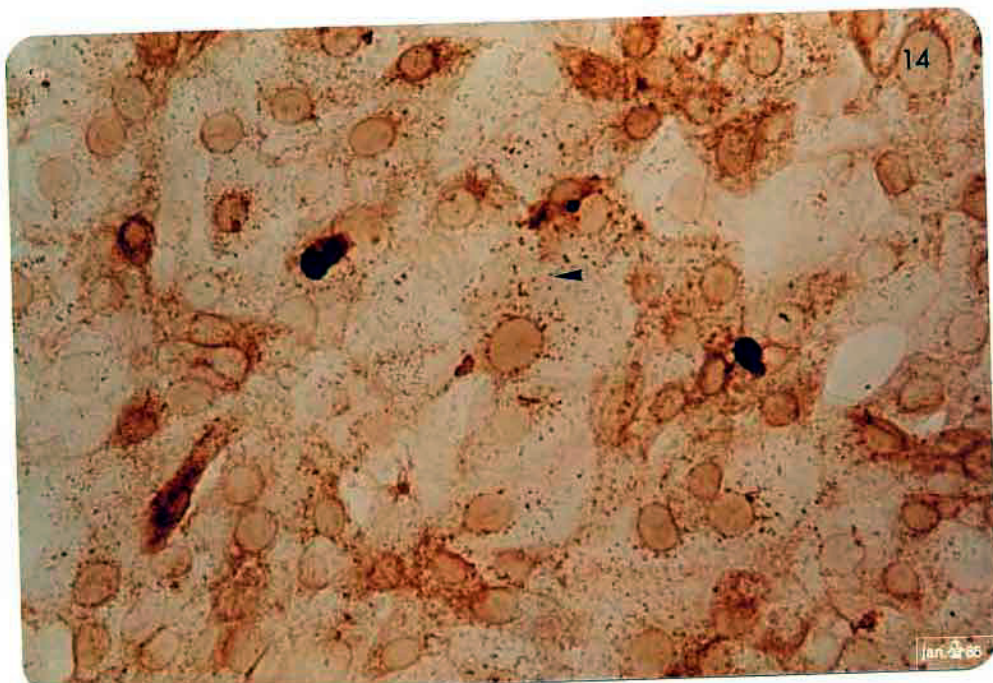
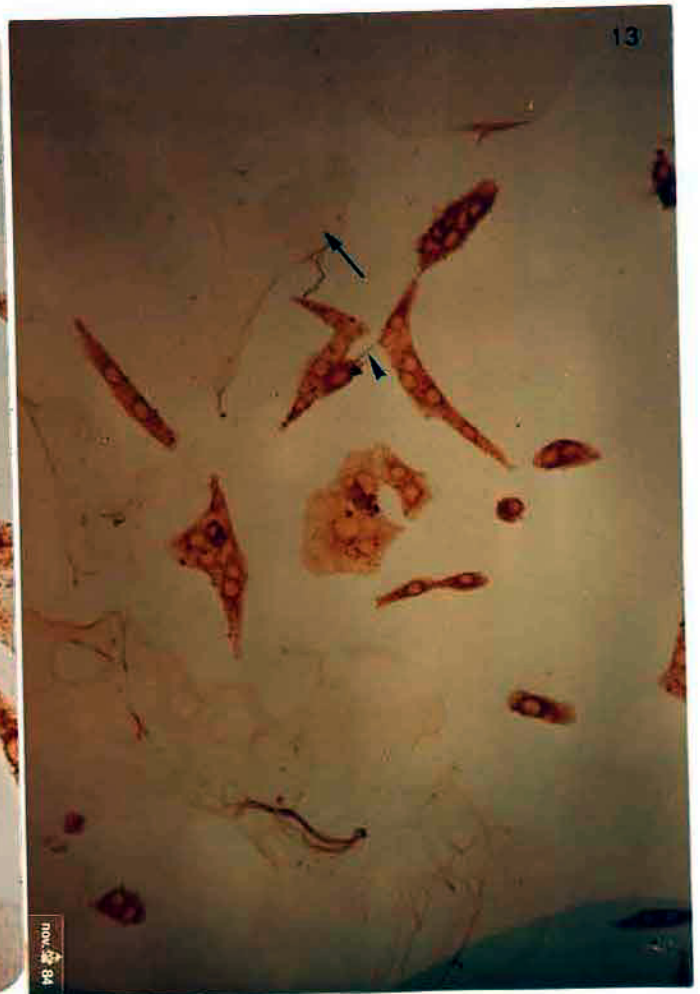
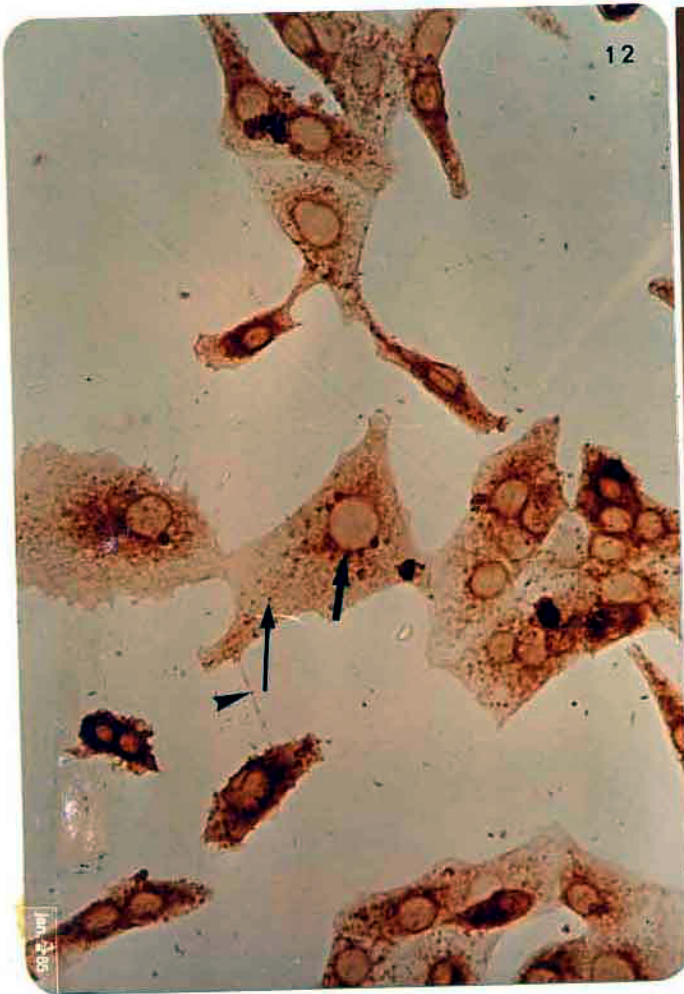
3.4.2. Culturas celulares em presença de MOD

As células cultivadas sobre a MOD mostravam, após 48 h, uma complexação mais intensa do que as células sobre a la mínula durante o mesmo período. Essa maior intensidade de reação pode ser constatada pelo aumento de quantidade de grânulos.

Fig. 12- Células Vero com 48 h de cultivo sobre lamínula submetidas a reação com ConA-HRP. Presença de grânulos acastanhados distribuídos pelo citoplasma (↑) e em maior concentração ao redor do núcleo (▲). Notar os prolongamentos celulares que unem as células entre si (▲). Aumento de 300 x.

Fig.13 - Células Vero com 48 h de cultura sobre lamínula, submetidas a reação com ConA-HRP. Notar os prolongamentos citoplasmáticos que unem as células entre si (▲) e a presença de uma película extracelular na qual as células estão aderidas (↑). Aumento de 150 x.

Fig. 14 - Células Vero com 120 h de cultivo sobre lamínula submetidas a reação com ConA-HRP. Apresentam poucos grânulos corados (▲). Aumento de 300 x.



los distribuídos por todo o citoplasma e por uma concentração maior deles ao redor do núcleo. Além disso, em algumas células o nucléolo pode ser visualizado pela reação positiva a ConA-HRP (Fig. 15).

Nas células com 120 h de cultivo sobre a MOD, embora a quantidade de grânulos fosse menor do que a observada no período anterior de incubação era ainda maior do que aquela apresentada pelas células com igual tempo de cultivo sobre a lamínula, mostrando também coloração de nucléolo.

Essa mesma reação mostrou que, após 48 h de cultivo as células próximas a MOD reagiram mais intensamente a ConA-HRP do que as que se situavam mais distantes da matriz (Fig. 16a) sempre obedecendo a um gradiente de intensidade, de tal modo que as células da parte distal da lamínula tinham aspecto semelhante ao das preparações controle (Fig. 16 b). Nas células próximas à matriz novamente se evidenciou a presença de nucléolos em algumas delas.

Entretanto, nas preparações celulares com 120 h de cultivo, todas as células próximas a MOD apresentavam o nucléolo corado (Fig. 17 a).

Nessas preparações os grupos de células arredondadas, semelhantes as que quando coradas com At pH 4,0 eram intensamente metacromáticas, mostraram, além da presença de grânulos citoplasmáticos, pela complexação com a ConA-HRP, uma coloração difusa por toda a célula. Porém, a quantidade de grânulos aqui observada era menor do que a das células com 48 h de cultivo nestas mesmas condições (Fig. 17 a).

Existia também um gradiente decrescente com relação a presença de nucléolos corados que obedecia o sentido matriz-

Fig. 15 - Células Vero com 48 h de cultivo sobre MOD incubadas com ConA-HRP. Células apresentam um maior número de grânulos em todo o citoplasma, sendo mais concentrados ao redor do núcleo (*). Algumas células apresentam nucléolo corado (▲). Aumento de 300 x.

Fig. 16 - Células Vero com 48 h de cultura que cresceram sobre lamínula nos tubos com MOD, incubados com ConA-HRP.

- a) Células próximas a MOD. Células com aspecto mais alongado, tamanho uniforme e intensa reação principalmente na região perinuclear (▲). Algumas células apresentam nucléolo corado (▲). Aumento de 300 x.
- b) Células afastadas da MOD. A maioria das células são poligonais, com tamanho variável, incluindo no centro uma célula grande (▲). Apresentam número menor de grânulos corados (▲). Aumento de 300 x.

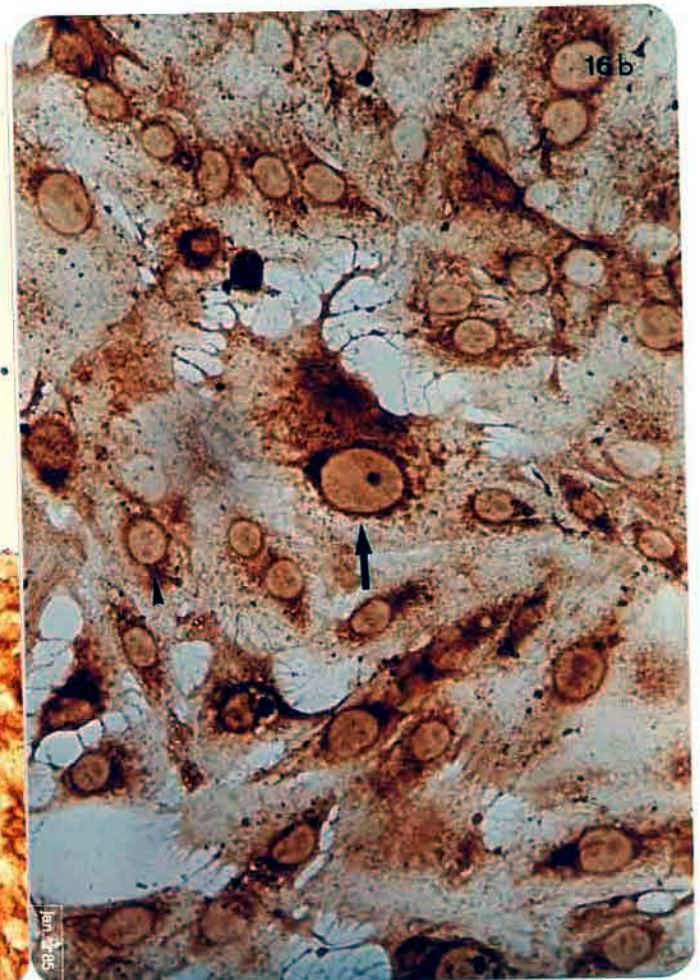
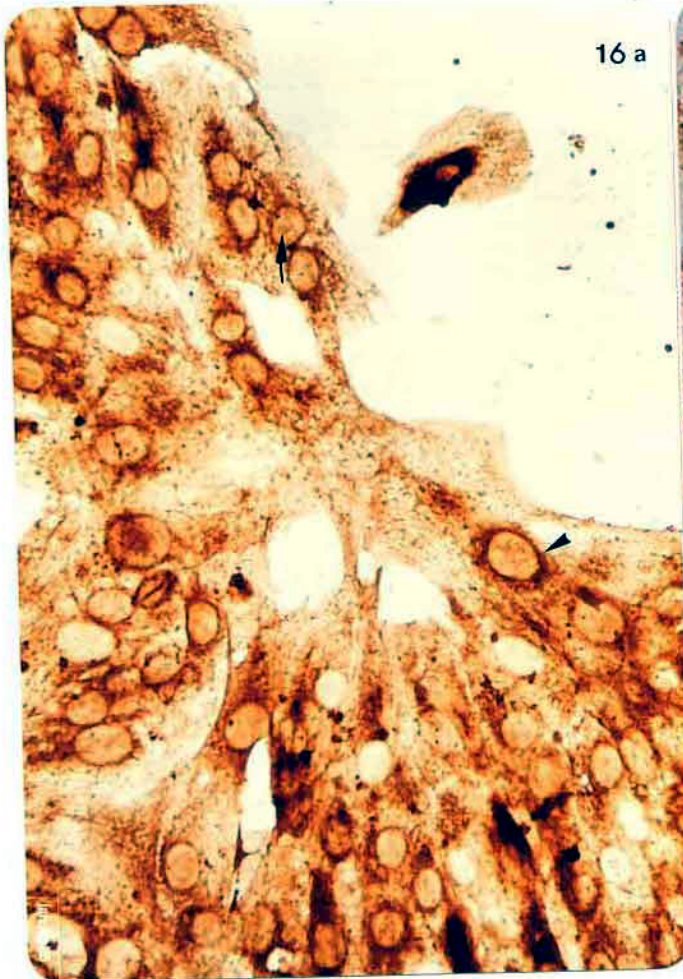
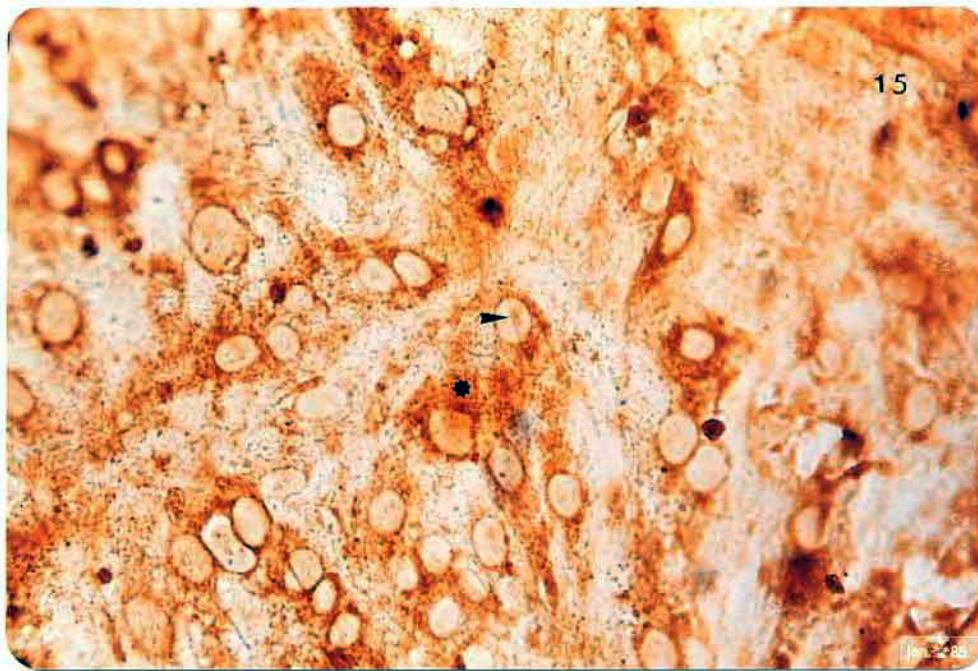
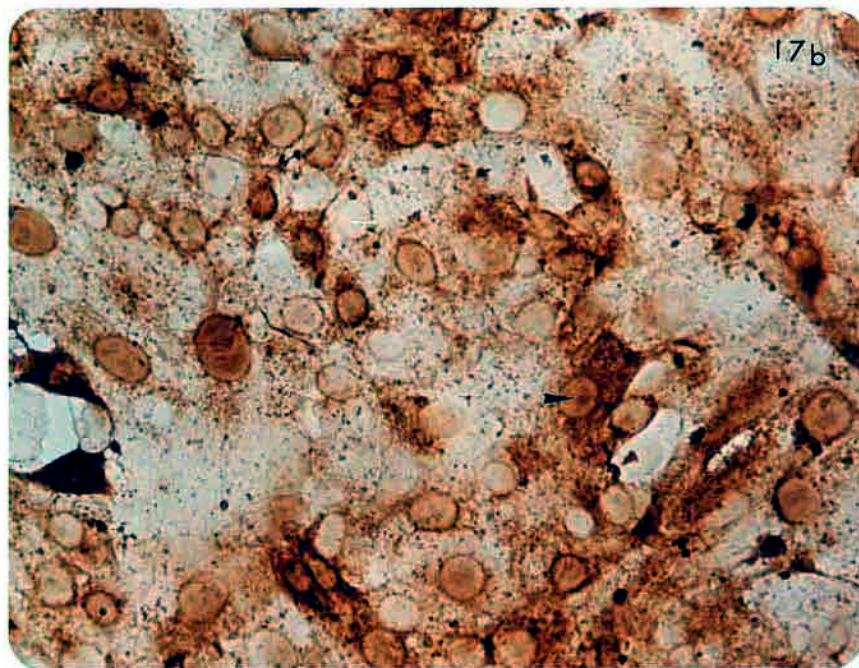
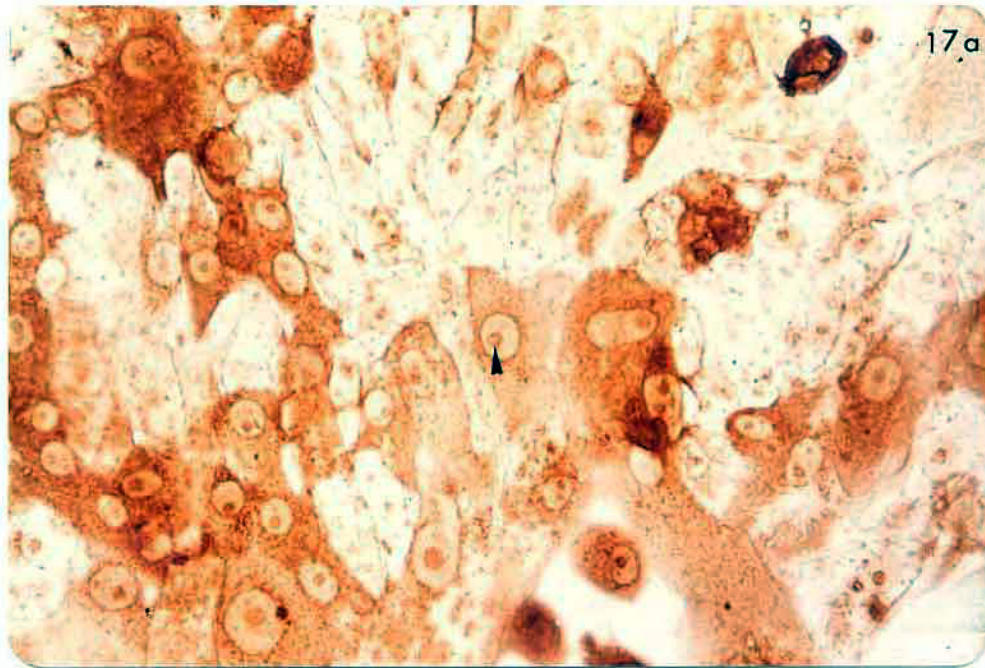


Fig. 17 - Células que cresceram sobre lamínulas nos frascos com MOD por 120 h, submetidas a reação com ConA-HRP.

- a) Células próximas a MOD todas as células apresentam nucléolo corado (▲) e grupos de células apresentando além dos grânulos citoplasmáticos, uma coloração mais homogênea. Aumento de 300 x.
- b) Células afastadas da MOD. Algumas células apresentam nucléolo corado (▲), mas a maioria não. Apresentam grânulos distribuídos pelo citoplasma e uma maior quantidade ao redor do núcleo. Aumento de 300 x.



-região distal da lamínula, sendo que as células situadas nessa área distal tinham o mesmo aspecto das com 120 h de cultivo sobre lamínula (Fig. 17 b).

3.5. Fosfatase Ácida

3.5.1. Culturas celulares em ausência de MOD

As células com 48 h de cultivo sobre lamínula submetidas a reação para fosfatase ácida, mostraram grânulos que se distribuíam na periferia citoplasmática, sendo a reação detectada também no nucléolo (Fig. 18). O controle desta reação, realizado sem o substrato de Gomori foi totalmente negativo.

Em relação a reação para fosfatase ácida, esta foi menos intensa nas células com 120 h de cultivo sobre lamínula do que naquelas com 48 h de cultivo mantidas nas mesmas condições, sendo que em algumas células a reação foi detectada no interior do citoplasma (Fig. 19).

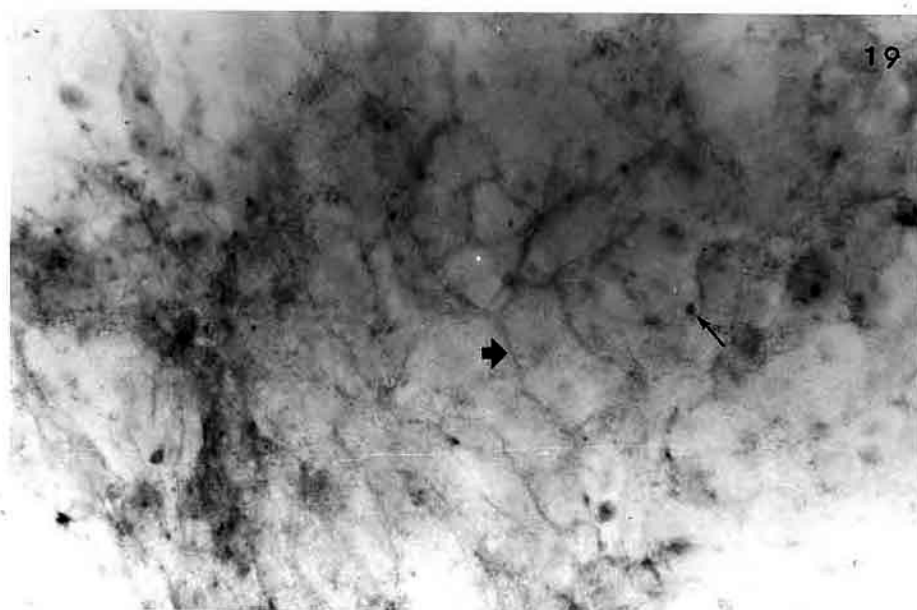
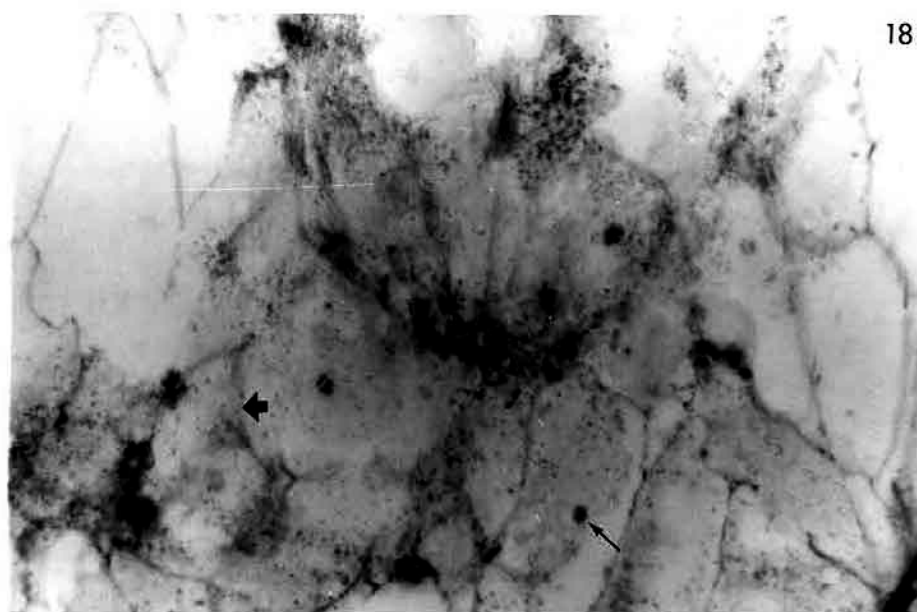
3.5.2. Culturas celulares na presença de MOD

Quanto a reatividade das células cultivadas por 48h sobre MOD frente a reação para fosfatase ácida, constatou-se ser ela de intensidade maior do que a observada nas células 48 h sobre lamínula, mas localizada especialmente na periferia citoplasmática (Fig. 20 a).

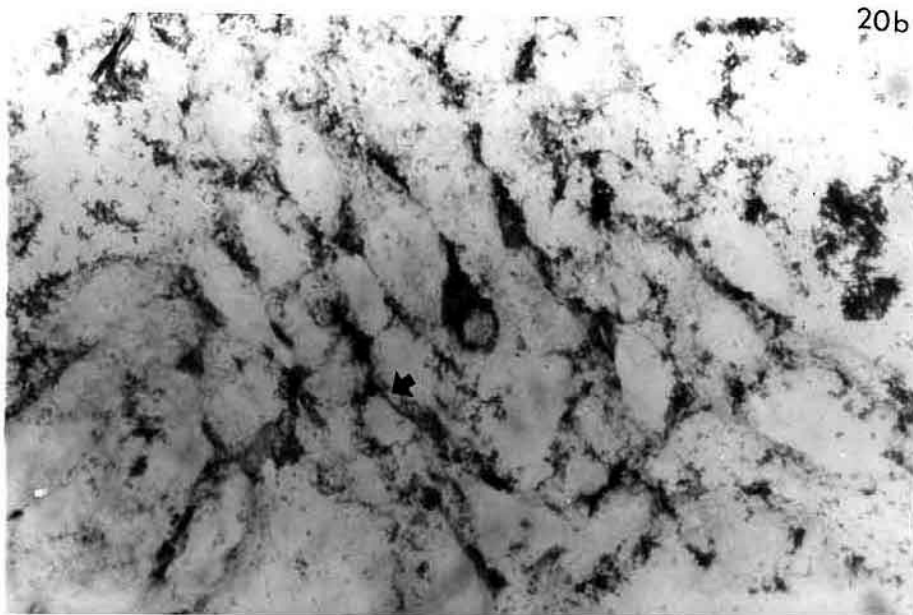
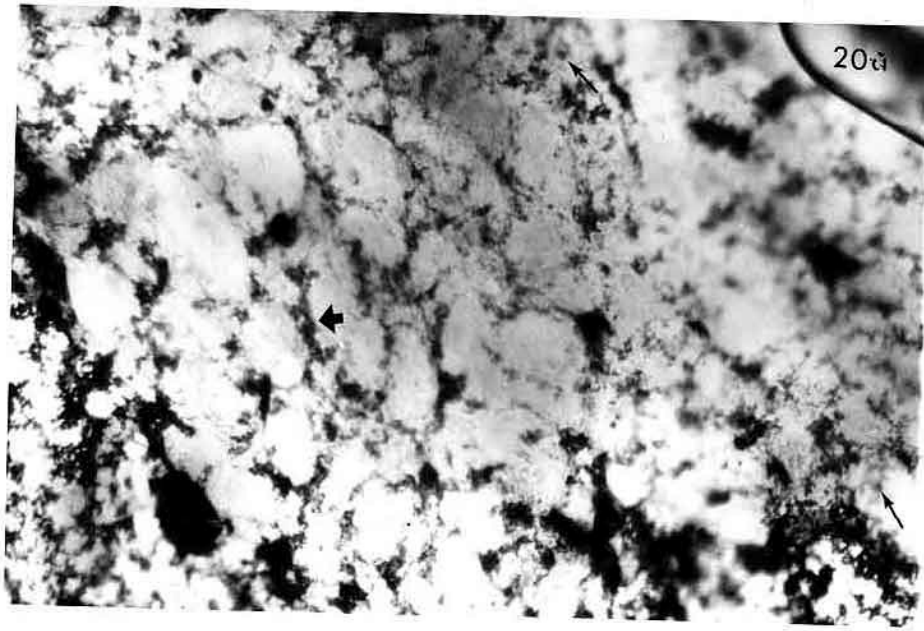
O nucléolo, ao contrário das culturas controle com o mesmo tempo de incubação, apareceu corado apenas em algumas células.

Fig.18 - Células Vero com 48 h de cultura sobre lamínula, submetidas a reação para fosfatase ácida. A reação é mais intensa na periferia da célula (⬆) e no nucléolo (⬆). Os grânulos presentes na micrografia correspondem a precipitado inespecífico de sulfeto de chumbo. Aumento de 940 x.

Fig. 19 - Células Verô com 120 h de cultura sobre lamínula, submetidas à reação para fosfatase ácida. A reação é menos intensa e continua predominantemente periférica (⬆). Algumas células apresentam o nucléolo levemente corado (⬆). Aumento de 375 x.



- Fig. 20 - Células Vero cultivadas sobre MOD, submetidas a reação para fosfatase ácida. Aumento 375 x.
- a) 48 h de cultivo. A reação foi mais intensa na periferia da célula (↗). Algumas células apresentavam nucléolo corado (↑).
 - b) 120 h de cultivo. A reação também foi periférica (↗) embora um pouco menos intensa do que com 48 h de cultivo nestas mesmas condições. Os nucléolos não apareceram corados.



A reação detectada nas células com 120 h de cultura sobre MOD foi menos intensa do que a observada naquelas com 48 h de cultura sobre MOD, mas foi um pouco mais forte do que a detectada nas com 120 h de cultivo na ausência de matriz (Fig. 20 b).

Nas preparações celulares provenientes de cultivos em presença de matriz, as células próximas a MOD, tanto com 48 h quanto com 120 h, mostraram aspecto semelhante aos seus respectivos controles.

3.6. Índice Mitótico

3.6.1. Culturas celulares em ausência de MOD

Nas culturas com 48 h de incubação sem matriz, observou-se um número elevado de células em divisão e o índice mitótico calculado para estas células resultou no valor de 5,15% (Tabela 1).

O número de células observadas que se apresentavam em alguma fase da divisão celular, nas células com 120 h de cultivo nas mesmas condições, foi menor que o observado naquelas com 48 h, o que foi confirmado pelo índice mitótico obtido de 1,61% (Tabela 1).

3.6.2. Culturas celulares em presença de MOD

Com 48 h de cultivo sobre matriz o número observado de células em divisão foi menor do que o do controle sendo o índice mitótico nessa região das preparações celulares de

Tabela 1 - Índice mitótico (em %) das células cultivadas sobre lamínula sobre matriz óssea desmineralizada (MOD), próximas a MOD (prox MOD) e afastadas da MOD (afast MOD), após 48 e 120 h de cultivo.

Substrato	Índice Mitótico (%)*	
	48 h	120 h
Lamínula	5,15	1,61
MOD	1,48	1,14
Prox. MOD	0,67	0,75
Afast. MOD	1,31	0,36

*Calculado a partir da contagem de 3×10^3 células/cultura em monocamada.

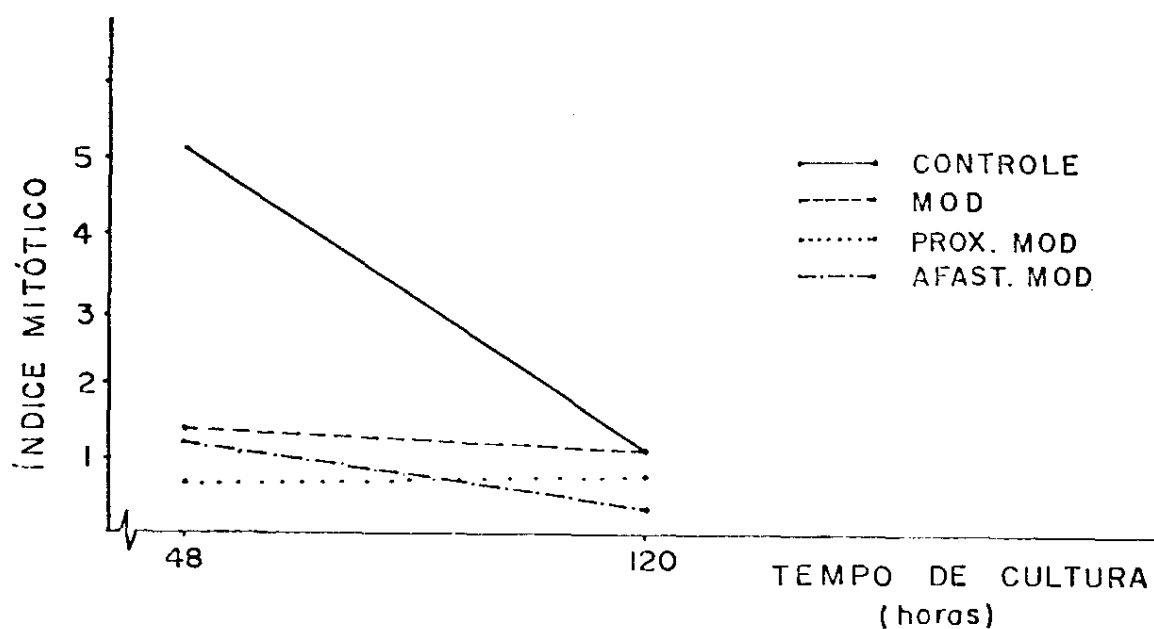


Fig. 21 - Índice mitótico apresentado pelas células Vero que se desenvolveram sobre lamínula nos tubos controle (—), sobre a matriz óssea desmineralizada (---), próximas (...) e afastadas (-.-.) dela, após 48 e 120 horas de cultivo.

1,48% (Tabela 1).

Esse índice nas culturas com 120 h de incubação foi de 1,14% e de 0,67% e 0,75% nas regiões próximas a MOD com 48h e 120 h de incubação, respectivamente (Tabela 1).

Nas áreas afastadas da matriz o índice mitótico observado foi de 1,31% para 48 h e de 0,36% para 120 h de cultivo.

Os valores do índice mitótico para as células cultivadas na presença e ausência de MOD, em função do tempo, podem ser melhor visualizados no gráfico apresentado na figura 21.

3.7. Eletroforese

3.7.1. Culturas celulares em ausência de MOD

Nos estudos eletroforéticos foram utilizados como controles o meio de cultivo completo antes e depois de ser incubado com fragmentos de MOD.

Os padrões eletroforéticos encontrados nesses controles foram idênticos, apresentando faixas com largura e intensidade de coloração variadas, numeradas de 1 a 15 (Fig. 22, S01 e S02).

A análise do meio nutritivo proveniente de culturas celulares com 48 h de incubação na ausência de matriz revelou um padrão de faixas diferente dos controles: desaparecimento das bandas 4, 6 e 15; maior nitidez da banda 5; estreitamento e menor coloração das bandas 8 e 14; diminuição da banda 9; aumento da espessura nas bandas 11 e 13 e aparecimento de duas

Fig.22 - Eletroforese em Poliacrilamida dos meios de cultivo de células Vero com 48 e 120 h de cultura, as quais se desenvolveram utilizando como substrato a lamínula e a MOD.

a) Fotografia dos tubos de eletroforese.

b) Esquema realizado a partir da observação dos tubos.

S-01 - Meio

S-02 - Meio + MOD

S-03 - MOD + Células, 48 h

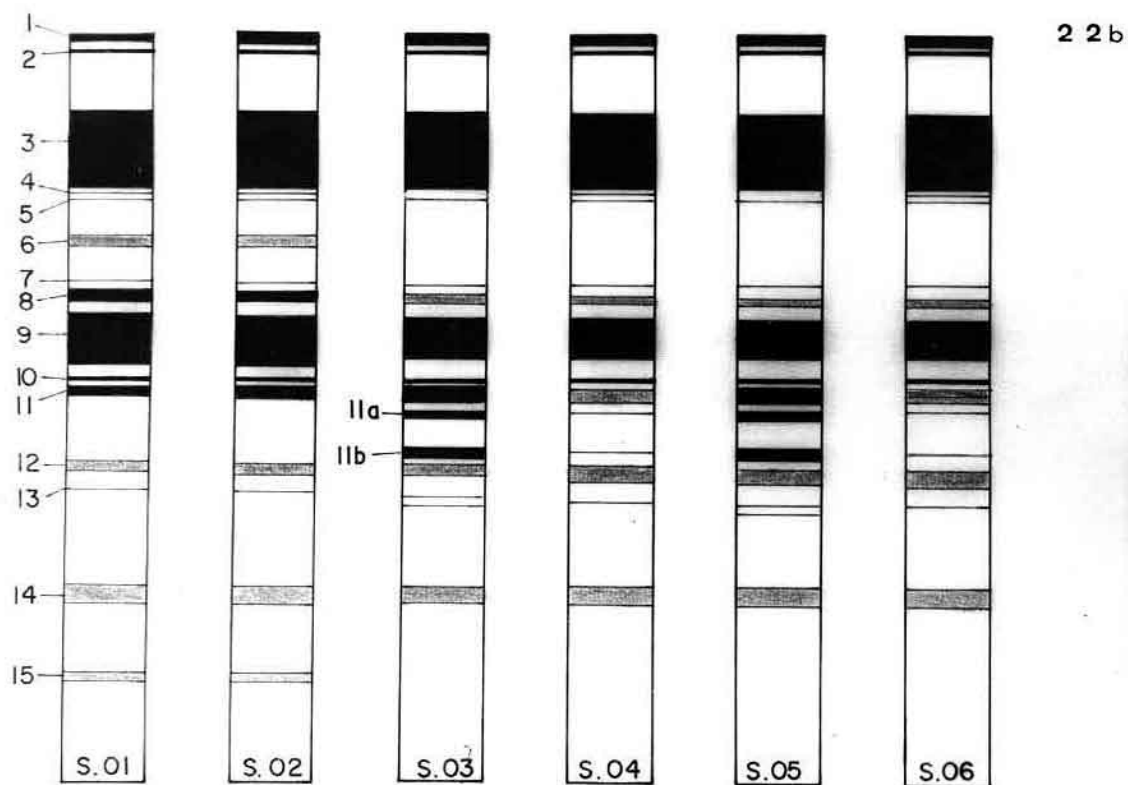
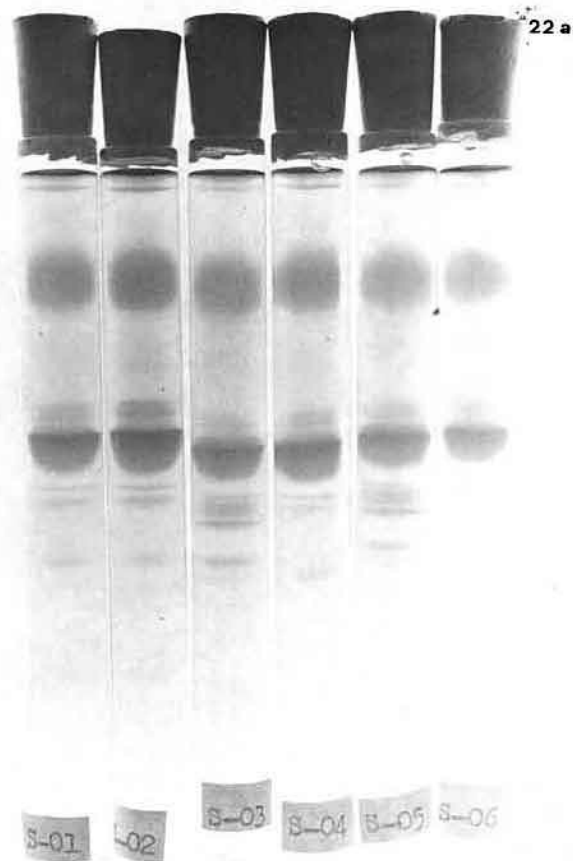
S-04 - MOD + Células, 120 h

S-05 - Células 48 h

S-06 - Células 120 h

Concentração do gel: 5%

Volume da amostra: 20 µl



novas faixas entre as de número 11 e 12, as quais foram denominadas de 11 a e 11 b, apresentando-se relativamente largas e bem coradas (Fig. 22 - S-05).

Os procedimentos com gel de poliacrilamida na concentração de 15% não permitiram uma separação nítida das faixas e, portanto, seus resultados não foram levados em consideração.

A eletroforese do meio retirado das culturas com 120 h de incubação na ausência de matriz, apresentou um padrão de faixas ligeiramente diferente daquele de 48 h de cultivo (Fig. 22 S-06) sendo as diferenças mais evidentes o reaparecimento da banda 4 e a diminuição acentuada das bandas 11, 11a, 11b e 13.

3.7.2. Culturas celulares em presença de MOD

A análise eletroforética dos meios nutritivos, obtidos a partir das culturas mantidas por 48 h em presença ou ausência de MOD, mostrou o mesmo padrão de faixas.

Da mesma forma, não se constatarem diferenças quando foram comparados as bandas correspondentes à eletroforese dos meios retirados de culturas após 120 h de incubação na presença ou ausência de matriz.

3.8. Microscopia de Polarização

Com a análise qualitativa da MOD ao microscópio de polarização detectamos variações em relação a locais próximos

das células com 48 e 120 h de cultivo.

Nossas observações mostraram que a birrefringência apresentada pela região afastada das células era maior do que a de regiões próximas a esta. Esta diferença era mais nítida na matriz, utilizada como substrato para o crescimento celular, após 120 h de cultivo.

Para melhor visualização, os resultados por nós obtidos foram sumarizados e apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Resumo dos resultados apresentados

Substrato	Tempo de cultivo	Área Nuclear (µm²)	Aspecto da cromatina	Reatividade ao At		Reação ao ConA-NRP			Posf. Ácida		Índice Mitótico %
				Núcleo	Cit	Cit.	Nucl.	Membr.	Cit.	Nucl.	
Laminula	48 h	150,81	31,37	granular*	Basófilo com grânulações metacromáticas	+++	-	+	++	++	5,15
	120 h	128,60	20,09	granular*	basófilo com grânulações metacromáticas	+	-	+	+	+	1,16
MOD	48 h	105,65	5,89	homogênea	ortocromático	+++	Alguns +	+	+++	-	1,41
	120 h	57,11	3,21	homogênea	ortocromático	++	++	+++ ⁽¹⁾	++	-	1,14
Prox. MOD	48 h	48,98	3,57	homogênea	ortocromático	+++	Alguns +	+	++	++	0,67
	120 h	63,56	3,71	homogênea	ortocromático	++	++	+++ ⁽¹⁾	+	+	0,75
Afast. MOD	48 h	88,82	12,69	granular*	basófilos c/ gr. metacromáticos	+++	-	+	++	++	1,31
	120 h	69,32	4,32	granular e homogênea	ortocromáticos e basófilos c/ metacromáticos	++	Alguns ++ > parte -	+	+	+	0,36

* Os dados se referem a maioria dos núcleos. Alguns, os maiores, apresentavam cromatina homogênea.

- Reação negativa

+ Reação fraca

++ Reação média

+++ Reação intensa

++++ Reação muito intensa

(1) Dados referentes a grupos de células, ou células isoladas.

4 - DISCUSSÃO

O sistema por nós estudado, isto é, a utilização da MOD aderida à apenas 1/3 do fragmento de lamínula, permitiu que, no mesmo tubo de cultura, as células crescessem sobre a matriz, próximas e afastadas desta, o que nos possibilitou verificar que a diferenciação se manifestava em um gradiente e não apenas nas células que se desenvolveram sobre a matriz óssea desmineralizada (MOD).

Neste sistema as alterações induzidas pela MOD, por nós detectadas foram relacionadas com tamanho, forma, organização da cromatina, estrutura de membrana e aspectos fisiológicos das células.

Em relação ao tamanho constatamos que as células que se desenvolveram sobre a matriz eram menores e com tamanho mais uniforme do que o controle, o mesmo acontecendo com as células que cresceram próximas à MOD (Fig. 3). Além do tamanho mais homogêneo, as células sobre a matriz apresentaram um crescimento ordenado, acompanhando a orientação das fibras colagênicas (Fig. 6), comportamento este semelhante ao observado por vários autores os quais constataram que os elementos da matriz extracelular orientavam o crescimento e a migração de células tanto "in vitro" ^{quanto "in vivo"} (COHEN & HAY, 1971; HAY, 1980, 1981; LORING et alii, 1982; LANDER et alii, 1982; SANES, 1983; RUNYAN & MARKWALD, 1983).

Quanto a forma celular, observamos que as células cultivadas sobre e próximas a MOD, após 48 h de cultura, apre

sentavam aspecto alongado, semelhante a fibroblastos (Fig. 6, 8), diferente da forma poligonal apresentada pelo controle (Fig. 4). Com 120 h de cultivo, além das células fibroblásticas, detectamos a presença de grupos celulares, ou de células isoladas, com aspecto arredondado (Fig. 7, 9, 10) tanto sobre a MOD quanto próxima a ela, enquanto que nas células cultivadas sobre lamínula a forma poligonal foi mantida confirmando que a indução de células morfológicamente diferentes pode variar segundo o substrato empregado, semelhantes às constatações de outros autores. Em alguns tipos celulares, a forma da célula desempenha papel importante na expressão celular. Assim, alterações morfológicas induzidas pela matriz extracelular em células epiteliais mamárias, hepatócitos, condrócitos e células nervosas, entre outras, puderam ser associadas com a expressão fenotípica característica de cada tipo celular (FOLKMAN & GREENSPAN, 1975; FOLKMAN & MOSCONA, 1978; EMERMAN et alii, 1979; NATHANSON et alii, 1978; NATHANSON & HAY, 1978, 1980 a, b; KLEINMAN et alii, 1981; HAY, 1981; BISSEL et alii, 1982; AGGELER et alii, 1982, 1984 a, b; GLOWACKI et alii, 1983; YANG & NANDI, 1983; LAWLER et alii, 1983; MACGREGOR & SWAN, 1984; WOLFFE & TATA, 1984; LEE et alii, 1984 a).

Outros autores, entretanto, observaram que em vez do emprego da matriz extracelular íntegra, ou de seus componentes isolados, várias outras substâncias como o polihidroxiethylmetacrilato (poly [HEMA]), a trifluoroperazina (TFP) e a 12 - O - tetradecanoilforbol - 13 - acetato (TPA), quando utilizadas no meio de cultivo, causam alterações celulares.

Contudo GLOWACKI et alii (1983), mostraram que de-

pendendo da concentração de poly [HEMA] empregada para recobrir as placas para o cultivo de condrócitos humanos, as células aderidas a este substrato adquiriam morfologia achatada e incorporavam quantidades elevadas de timidina marcada (^3HT) em concentração de 10^{-3} ou menores e adquiriam configuração arredondada, incorporando quantidade maior de $^{35}\text{SO}_4$ em glicosaminoglicanas e diminuindo a incorporação de ^3HT , em concentrações oito vezes maiores.

Por outro lado a adição de TPA a culturas de fibroblastos sinoviais, também induziu alteração na expressão gênica destas células demonstrada pela síntese de proteínas neutras e de collagenase, sempre acompanhada de alterações na morfologia celular (AGGELER et alii, 1982), cujo grau de arredondamento estava relacionado com o aumento de pró-collagenase, a forma inativa da collagenase, e com a redução da síntese de colágeno tipo I e tipo III. Além disso essas células arredondadas quando observadas ao microscópio eletrônico apresentavam citoesqueleto diferente, sendo a perda de feixes de actina a maior alteração constatada. Em trabalhos posteriores AGGELER et alii (1984 a, b) demonstraram que além do TPA, a citocalasina B, proteinases, poly (HEMA) e a trifluoroperazina (TFP) induziam alterações morfológicas em fibroblastos sinoviais sendo estas correlacionadas com a indução de fenótipo secretor específico. Entretanto, quando se empregavam substâncias como a monensina, a colchicina e a vinblastina, que não alteravam a forma da célula, não ocorria indução de síntese de collagenase.

Além dos constituintes da matriz extracelular e de

substâncias como o poly HEMA e o TPA, foi demonstrado por GERBER et alii (1984), que também a concentração hidrogeniônica do meio em que as células estão sendo cultivadas podem afetar a forma das células.

Entretanto, não somente as alterações morfológicas induzidas por substratos estavam associadas às alterações da expressão gênica, mas, também, aquelas que ocorriam espontaneamente durante o cultivo "in vitro". SPIEGELMAN & GREEN (1980) descreveram que as células da linhagem 3T3, normalmente de aspecto fibroblástico, em estado de repouso, sofrem uma conversão para células adiposas caracterizada por alterações morfológicas e enzimáticas. As células perdem sua aparência fibroblástica e tornam-se aproximadamente esféricas. Simultaneamente, elas aumentam a atividade das enzimas responsáveis pela síntese de ácidos graxos e de triglicerídeos, bem como a sensibilidade para certos hormônios conhecidos como capazes de afetar as células adiposas, tais como insulina, adrenalina e glicocorticóides (KARLSSON et alii, 1979). RAMAEKERS et alii (1984), descreveram que células epiteliais do cristalino, quando cultivadas "in vitro", durante as primeiras passagens, mantinham uma forma poligonal, mostrando uma fina matriz fibrilar tanto na superfície da monocamada quanto nos espaços intercelulares, porém após a décima quinta passagem, as células alongavam-se gradualmente e as análises eletroforéticas demonstraram que esta alteração de forma estava associada com alterações no padrão de síntese da célula, ocorrendo diminuição da síntese de tubulina e na incorporação de glicosaminoglicanas marcadas.

Uma vez que a forma da célula é mantida por seu citoesqueleto, qualquer alteração morfológica está diretamente relacionada com alterações qualitativas e/ou quantitativas das estruturas e substâncias que constituem este arcabouço. Assim, SPIELGELMAN & GREEN (1980), demonstraram que a mudança da forma fibroblástica para esférica, durante a conversão espontânea das células da linhagem 3T3 para células adiposas foi acompanhada por uma diminuição da actina extraída destas células.

SUGRUE & HAY (1981 a), descreveram alterações do citroesqueleto de células epiteliais da córnea cultivadas sobre substratos diferentes. Estas células, na presença de elementos solúveis da matriz extracelular como o colágeno, a fibronectina e a laminina, apresentaram o citoesqueleto basal composto de filamentos de actina que se dispunham paralelamente à membrana celular, enquanto na presença de heparina, condroitina sulfato e albumina, este arranjo não era mantido, sendo substituído por uma rede desorganizada desses filamentos.

Além desses trabalhos, alterações no citoesqueleto associadas a modificações fenotípicas das células foram descritas em fibroblastos (AGGELER et alii, 1982, 1984 a, b), em células endoteliais (BENSCH et alii, 1983) e em células musculares lisas (TOSELLI et alii, 1984).

Tem sido proposto por vários autores que os componentes do citoesqueleto interagem com constituintes da superfície celular, geralmente glicoproteínas, sendo estas importantes em vários fenômenos mediados pela membrana como o reconhecimento celular, controle de crescimento e adesão a substratos (JACOBSON, 1983; RAMAEKERS et alii, 1984; FRIEDMAN et

alii, 1984; RANSCHT et alii, 1984; KOTELIANSKY et alii, 1985).

A parte do citoesqueleto que se liga à membrana é constituída por uma rede de filamentos com tamanhos diferentes, cujo aspecto morfológico varia de acordo com o tipo celular (ROOS et alii, 1985) e constitui a fração celular insolúvel em células tratadas com detergentes não iônicos (LENK et alii, 1977; LENK & PENMAN, 1979; BEN-ZE'EV et alii, 1979), pois, permanecem ligados à essa rede, ao lado das proteínas de membrana (BEN-ZE'EV et alii, 1979), outros componentes celulares como o núcleo (FRIEDMAN et alii, 1984), o retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi (BEN-ZE'EV ^{8 ABULAFIA} et alii, 1983). Vários elementos envolvidos na biossíntese de proteínas, como o RNA_m polirribossomal (LENK et alii, 1977; LENK & PENMAN, 1979; CERVERA et alii, 1981; VENROOIJ et alii, 1981; JEFFERY, 1982), os fatores de iniciação (HOWE & HERSHEY, 1984), a proteína M_r 50 KD cap binding (ZUMBÉ et alii, 1982), a metionil - tRNA sintetase (DANG et alii, 1983), o complexo aminoacil - tRNA sintetase e a fenilalanil - tRNA sintetase (MIRANDE et alii, 1985), também permanecem aderidos a essa parte do citoesqueleto. Além disso, o estado de agregação dos microfilamentos está relacionado com o início da síntese de DNA (THYBERG, 1984) mostrando que além de suporte para a estrutura celular, o citoesqueleto pode desempenhar papel importante na regulação do processo de tradução (CERVERA et alii, 1981).

Os componentes da membrana podem interagir com os constituintes do meio extracelular, de maneira semelhante a que se relacionam com os elementos do citoesqueleto.

Essa interação das células com os elementos da ma-

triz extracelular pode ser direta, através de sítios de ligação presentes na membrana plasmática ou indireta, com o auxílio da fibronectina, laminina, condronectina e de vários fatores presentes no soro (YAMADA, 1983). Foram caracterizados em diversos tipos celulares receptores plasmáticos para laminina, colágeno e fibronectina classificados como glicolípidos, glicoproteínas ou proteoglicanas (YAMADA, 1983; BURKE et alii, 1983; RAUVALA, 1984; BERNFIELD et alii, 1984; RAPAEGER & BERNFIELD, 1984; TERRACIO et alii, 1984; BROWN & JULIANO, 1984; VÖLKER et alii, 1985 a, b; BLANQUET, 1985).

O elevado número de trabalhos recentes que relacionaram os constituintes de membranas com os elementos intra e extracelulares permite que se obtenha um melhor entendimento dos mecanismos pelos quais as moléculas extracelulares poderiam alterar a organização do citoesqueleto e os padrões biossintéticos das células. Dessa forma fica fácil verificar que o contato com um agente indutor causa alterações morfológicas e fisiológicas profundas, mesmo em situações onde este agente não é conhecido, como é o caso das transformações espontâneas que ocorrem "in vitro". Este contato é efetuado através da superfície da célula que de algum modo transfere a informação recebida do meio extracelular para o meio intracelular, o qual irá responder com alterações na organização dos elementos do seu citoesqueleto. Assim considerando que o que foi dito até aqui sugerindo que as modificações morfológicas induzidas pela MOD, nas células Vero em cultura, provavelmente envolveram alterações qualitativas e quantitativas de seu citoesqueleto, via receptores presentes a nível de membrana plasmática, embora não tenhamos utilizado métodos específicos para a investi-

gação dessas modificações.

Afora as alterações de forma e tamanho, outra diferença por nós detectada nas células Vero em cultura, na presença de MOD, foi a organização da cromatina nuclear evidenciada pelo tratamento com azul de toluidina (AT).

Nas células que se desenvolveram sobre a lamínula, os núcleos eram basófilos com granulações metacromáticas (Fig. 4, 5), enquanto que nas células cultivadas sobre MOD, os núcleos eram homogêneos ortocromáticos, isto é, com coloração verde pálido (Fig. 6, 7).

Essa basofilia metacromática apresentada pela cromatina corada com soluções de AT, nas condições do presente trabalho, deve-se à ligação das moléculas do corante com os grupos fosfatos disponíveis no DNA e RNA, não ligados às proteínas (MIURA & OHBA, 1967), sendo caracterizada por um deslocamento do pico de absorção originalmente posicionado à comprimento de onda ao redor de 630 nm, para comprimento de ondas menores (LISON, 1960; MIURA & OHBA, 1967), fenômeno este associado com a proximidade das moléculas de corante ligadas ao substrato corado. Conseqüentemente, diferenças na localização dos picos de absorção, nas curvas de basofilia, são esperados para diferentes complexos DNA - Proteínas (DNP) como já demonstradas em cromatina de gafanhoto (MELLO & VIDAL, 1977) e de rato (VIDAL et alii, 1978) durante a espermatogênese, em cromossomos politênicos de Rhynchosciara americana (VIDAL, 1975; MELLO & VIDAL, 1979), em heterocromatina de Triatoma infestans (MELLO, 1980), em cromatinas submetidas à tratamentos com hycanthone (MELLO et alii, 1978) e clupeína (VIDAL,

1979), bem como em espermatozoides de touro onde estas alterações foram detectadas e associadas com a infertilidade (MELLO, 1982).

Assim, considerando-se que a basofilia metacromática presente nos núcleos das células controle foi substituída pela ortocromasia do núcleo das células cultivadas sobre e próximas a MOD, podemos dizer que a diferenciação celular induzida pela MOD sugere o envolvimento de alterações no complexo DNP, evidenciadas pela coloração verde pálida observada nos núcleos, resultante do número menor de radicais fosfatos do DNA, disponíveis para a ligação com as moléculas do corante. Estas alterações poderiam estar relacionadas com o processo de regulação gênica, resultando na expressão de um novo fenótipo nas células cultivadas em contato com a MOD.

Esta nova expressão fenotípica caracterizada por alterações na forma e no tamanho, discutidas anteriormente pode ser caracterizada também por modificações no padrão de síntese das células evidenciado a nível do citoplasma e da membrana plasmática.

A nível citoplasmático observamos nas células cultivadas sobre lamínula e sobre MOD uma região perinuclear e vacúolos, distribuídos por toda a célula que não se coravam com At pH 4,0 e mostravam reação positiva à incubação com Concanavalina A e peroxidase (ConA-HRP) (Fig. 12), observando-se uma maior concentração de grânulos nas células com 48 h de cultivo sobre lamínula. Uma vez que a região perinuclear corresponde a localização do complexo de Golgi (LEE & ENGELHARDT, 1977) e os vacúolos correspondem a grânulos de secreção, a ativida-

de sintética aumentada nas células com 48 h de cultivo sobre lamínula observada em nossos experimentos está de acordo com os resultados apresentados por LEE & ENGELHARDT (1977, 1978). Estes autores constataram que a síntese protéica, nas células Vero, variava de acordo com as fases do desenvolvimento da cultura, sendo maior na fase correspondente ao período exponencial de crescimento. Nas células cultivadas sobre MOD constatamos que estas diferenças eram mantidas, isto é, a síntese era maior nas fases iniciais da cultura, embora, quando comparados com os controles, tanto as células com 48 h quanto as com 120 h de cultivo sobre MOD apresentassem mais grânulos corados do que as células cultivadas sobre lamínula.

As análises eletroforéticas dos meios nutritivos retirados das células confirmaram os resultados de LEE & ENGELHARDT (1978), pois mostraram que ocorria modulação da expressão gênica durante os vários estágios de crescimento das células Vero que levava ao aparecimento e desaparecimento de peptídeos celulares secretados pelas células. Porém, por este método, não conseguimos detectar nenhuma alteração, quantitativa, que pudesse ser relacionada a MOD, talvez porque o produto induzido pela MOD apresentasse o mesmo peso molecular e carga elétrica dos produtos normalmente elaborados pela célula e, portanto, estaria ocupando a mesma faixa nos tubos de eletroforese ou, talvez, porque este produto não seria eliminado da célula, sendo armazenado no interior dos grânulos. A utilização de métodos mais refinados como a análise eletroforética bidimensional e a eletroforese de extratos celulares poderiam auxiliar na elucidação destes problemas.

O fato da região perinuclear e dos grânulos reagirem positivamente à incubação com ConA-HRP demonstra que estas regiões apresentavam substâncias com radicais terminais de -D-glicopirranose, aos quais a Con A se liga (LIS & SHARON, 1973). Estudos recentes têm sugerido que manose, N-acetilglicosamina e glicose se ligam aos peptídeos que estão sendo sintetizados no interior das vesículas do retículo endoplasmático rugoso, sendo os resíduos glicosil processados no aparelho de Golgi, onde a glicosilação é finalizada (VIRTANEN et alii, 1980). Os glicoconjugados maduros permanecem como constituintes das membranas intracelulares, ou são direcionados para a superfície celular e secretados (MORRÉ et alii, 1979). Desta forma, a coloração obtida com a Con A, é devida a marcação de resíduos glicosil das membranas intracelulares do retículo endoplasmático, do Golgi e dos grânulos, bem como do produto de secreção presente no seu interior (HIRANO et alii, 1972; BOULAN et alii, 1978; VIRTANEN et alii, 1980; TARTAKOFF & VASSALLI, 1983; PAVELKA & ELLINGER, 1985).

As células que se desenvolveram sobre ou próximas à MOD, apresentaram também o nucléolo com reação positiva à Con A. Isto demonstra que alterações nucleares, associadas com glicoproteínas ou glicosaminoglicanas ocorram a nível nuclear por indução da MOD. O núcleo, em relação aos carboidratos, apresenta alguns aspectos característicos como a alta densidade destes por unidade de área na membrana nuclear, a presença de glicosaminoglicanas na matriz e membrana nucleares, a presença de glicoproteínas entre as proteínas não histônicas e a ausência de glicolípidos, componentes estes que variam de um tipo celular para outro e dentro do mesmo tipo

celular em relação a estados fisiológicos e/ou patológicos diferentes (STODDART, 1979). KURTH et alii (1979), demonstraram que a Con A se liga aos anéis de Balbiani, na região b e c do cromossomo número IV das células de glândula salivar de Chironomus thummi, sendo esta ligação proporcional ao tamanho do "puff" e relacionada com o estágio de desenvolvimento do organismo. Este fato evidencia o importante papel dos carboidratos nucleares na transcrição do DNA e sustenta as descobertas anteriores de RIZZO & BUSTIN (1977), os quais isolaram 3 proteínas não histônicas glicosiladas da cromatina de fígado de rato, que podiam se ligar a Con A.

Embora não tenhamos localizado nenhum relato na literatura por nós consultada, a respeito da presença de carboidratos no nucléolo, entre as estruturas não membranosas, é fato conhecido a glicosilação de ribossomos e microtúbulos (STODDART, 1979). Assim, poderíamos, talvez, justificar a incorporação de Con A no nucléolo, das células cultivadas sobre ou próximas a MOD, como decorrente da formação de ribossomos com componentes glicosilados.

A reação com a Con A evidenciou também que os grupos de células arredondadas presentes sobre ou próximas à MOD, corados metacromaticamente com azul de toluidina, reagiram intensamente, a nível de membrana plasmática, à incubação com esta lectina, sugerindo que o processo de diferenciação induzida pela matriz atuou a nível de composição da membrana, aumentando seu conteúdo glicoprotéico. Estes dados estão de acordo com inúmeros relatos existentes na literatura que demonstraram variações na membrana plasmática, durante o crescimento, reconhecimento e adesão celulares, assim como na di-

ferenciação celular e no estabelecimento de condições neoplásicas (BURGER, 1973; NICOLSON, 1974; HAKOMORI, 1975; TEMMINK et alii, 1975; HYNES, 1976; FISHMAN & BRADY, 1976; HOOK & SANDERS, 1977; STODDART, 1979; WRIGHT et alii, 1980; MAYLIÉ - PFENNINGER & JAMIESOM, 1981; LIEBERMAN et alii, 1981; BOUILLANT & GREIG, 1981; DODD et alii, 1982).

As características das células Vero, cultivadas sobre MOD no que se refere ao aspecto morfológico, à coloração frente ao azul de toluidina e à Con A, são muito semelhantes as apresentadas por condrócitos. Estas células, para manifestarem seu fenótipo característico precisam manter a configuração arredondada (GLOWACKI et alii, 1983) e quando coradas com azul de toluidina mostram núcleo ortocromático e granulações intracitoplasmáticas que poderiam corresponder a porções do retículo endoplasmático, do complexo de Golgi e de vesículas de secreção propriamente ditas contendo glicosaminoglicanas, proteínas e glicoproteínas em vias de secreção (ANDRADE FILHO, 1984). Nas preparações provenientes de células cultivadas sobre MOD observadas ao microscópio de polarização, constatamos a birrefringência do conteúdo dos grânulos, encontrados nessas células, o que nos permite dizer que este material tem um certo grau de organização, constituindo-se provavelmente de elementos que poderiam fazer parte de uma matriz extracelular, à semelhança do que ocorre no tecido cartilaginoso "in vivo". Além disso, vários trabalhos na literatura mostram a formação de condrócitos a partir de culturas primárias desenvolvidas sobre a MOD (NOGAMI & URIST, 1979, 1974; NATHANSON et alii, 1978; NATHANSON & HAY, 1980 a, b).

Desta forma parece que a MOD mesmo quando utilizada como substrato para crescimento de células de uma linhagem já estabelecida, e não primária, como é o caso das células Vero, induz um processo de diferenciação que leva a formação de células semelhantes a condrócitos a partir de células epitelióides. A utilização de técnicas como a imonofluorescência, para detecção de colágeno tipo II e de diferentes tipos de proteoglicanas características dos condrócitos, poderiam nos auxiliar na caracterização definitiva do tipo celular induzido pela MOD, o que será objeto de futuras investigações.

Em relação a atividade fosfatásica ácida, constatamos que esta era maior nas células em contato direto com a matriz e nestas, maior a nível de membrana. A reação positiva para fosfatase ácida pode representar formas extralisossomais desta enzima, uma vez que poucos lisossomos são detectados nas células Vero em cultura (FLEMING & KISTLER, 1977). Detecção de atividade fosfatásica ácida, a nível de membrana, foi efetuada por vários autores, em diferentes sistemas celulares como em células de placenta humana (HOFFMAN & DI PIETRO, 1972), em células de túbulos renais de rato (MIYAYAMA et alii, 1975) em Candida albicans (TRONCHIN et alii, 1980), em leveduras (CAMPOS - AASEN & YARZÁBAL, 1981), em células de raiz de milho (DELTOUR et alii, 1981), e em túbulos de Malphigi de Triatoma infestans (AZEREDO - OLIVEIRA, 1982). FRANZI et alii (1980) descrevem que durante a transformação de monócitos em macrófagos, haveria um aumento significativo na taxa de renovação da membrana plasmática, pela internalização da mesma como constituinte de pinossomos e fagossomos, sendo estes fenômenos avaliados pela medida da atividade da fosfatase ácida nos

lisossomos e na membrana plasmática. Como nossos resultados mostraram aumento de atividade apenas nas células cultivadas sobre a MOD, poderíamos sugerir que este aumento da atividade da enzima se deva ao fato das células estarem lisando ou fagocitando a matriz.

Observamos também que as células Vero, após 48 h de cultivo sobre lamínula e submetidas a esta reação, apresentavam nucléolo com reação positiva a qual não era mais evidenciada nas células aderidas à MOD tanto com 48 h como com 120 h de cultivo e nem em células com 120 h de cultivo sobre lamínula. A atividade fosfatásica ácida em nucléolos foi detectada em outros tipos celulares como em células humanas (SORIANO & LOVE, 1971), em células de Allium cepa (SANCHES-PINA et alii, 1978), em células de raiz de milho (DELTOUR et alii, 1981) e em células de túbulos de Malpighi (AZEREDO-OLIVEIRA, 1982).

DELTOUR et alii (1981), correlacionaram a atividade fosfatásica ácida nucleolar com a razão de transcrição nuclear. Segundo estes autores a transcrição nuclear resulta na liberação de pirofosfato o qual sofreria ação enzimática, liberando fosfato inorgânico que seria importante para o funcionamento do nucléolo. O aumento da reatividade do nucléolo associado com o aumento do metabolismo foi detectado também por AZEREDO-OLIVEIRA (1982). Uma vez que as células com 48 h de cultivo sobre lamínula apresentam intensa atividade de crescimento é de se esperar que a taxa de transcrição seja elevada, o que estaria de acordo com a presença da reação positiva para fosfatase ácida no nucléolo. Já nas células com 120 h de cultivo sobre lamínula, isto é, na fase de crescimento esta-

cionária, onde ocorre diminuição da síntese protéica (LEE & ENGELHARDT, 1977, 1978), esta atividade estaria reduzida, o que implicaria na ausência de coloração do nucléolo frente à reação para fosfatase ácida, o mesmo acontecendo nas células cultivadas sobre a MOD. Numa fase anterior, ou seja, já após 48 h de cultivo.

A análise qualitativa da MOD ao microscópio de polarização revelou uma birrefringência menor da matriz nas regiões em contato com as células e com maior tempo de cultivo, do que nas regiões não adjacentes às células. Esta análise, efetuada em regiões bem próximas a fim de se evitar que possíveis variações na espessura da MOD influenciassem a birrefringência, fala a favor de uma possível atividade lítica das células sobre a MOD, caracterizada tanto pelo aumento da atividade fosfatásica ácida, quanto pela diminuição da birrefringência apresentada pela MOD. A lise da MOD, com alterações no seu padrão de organização molecular foi sugerido por Vidal, (1983) através de estudo com microscopia de polarização de implantes heterólogos de MOD em ratos.

Com referência ao índice mitótico, observamos que a MOD induziu uma diminuição da proliferação celular, tanto nas células que se desenvolveram sobre ela quanto nas que cresceram próximas a ela. Este resultado contribui ainda mais para justificarmos o poder indutor de diferenciação da MOD pois, como tem sido afirmado por vários autores, a síntese de DNA é inversamente proporcional ao estado diferenciado da célula (MICHALOPOULOS & PITOT, 1975; FOLKMAN & MOSCONA, 1978; ZALIN, 1979; EMERMAN et alii, 1979; WICHA et alii, 1979; SCHOR, 1980;

BURWEN & PITELKA, 1980; MACKENZIE et alii, 1982; GLOWACKI et alii, 1983; HAEUPTLE et alii, 1983; CRAWFORD, 1983; NAG & CHENG, 1983; JOUSIMAA et alii, 1984; MECHAM et alii, 1984], embora esta relação não tenha sido observada em alguns tipos celulares (FANTONI et alii, 1975; MECHAM et alii, 1984).

De acordo com os resultados obtidos e tudo o que foi dito até aqui sobre os aspectos morfológicos, citoquímicos e os relacionados com a atividade proliferativa, parece que em nossos experimentos, a MOD foi capaz de induzir alteração na expressão gênica das células Vero em cultura, sendo esta dependente do tempo de cultivo.

Contudo, o que nos chamou a atenção foi o fato de que esta diferenciação não ocorreu apenas nas células que estavam em contato direto com a MOD, mas também naquelas que se encontravam em sua proximidade. As análises das características morfológicas e fisiológicas das células cultivadas sobre, próximas ou afastadas da MOD, demonstraram que o processo de diferenciação ocorreu em um gradiente e que, de algum modo, a informação foi transmitida para as células que encontravam-se distanciadas da matriz, sendo esta passagem de informação dependente do tempo, pois pudemos observar que nos tubos com MOD após 48 h de cultivo apenas as células que se desenvolveram próximas e sobre a matriz apresentavam alterações fenotípicas enquanto que nas células com 120 h de cultivo, estas alterações puderam ser observadas inclusive nas regiões mais afastadas da MOD.

A constatação deste gradiente constitui uma evidência de que o fator indutor de diferenciação, presente na MOD

não seria solúvel no meio de cultivo pois, se o fosse, todas as células cultivadas por 48 h no frasco com MOD deveriam apresentar alterações e não apenas aquelas localizadas próximas a MOD. Este fator fortemente ligado à matriz extracelular, quando liberado por meio de extrações dissociativas, é capaz de estimular a condrogênese de células musculares embrionárias "in vitro" e esta, seguida de osteogênese, "in vivo" (SEYEDIN et alii, 1983).

Deste modo, podemos afirmar que a MOD promoveu alterações fenotípicas nas células que cresceram em íntimo contato com ela e que o sinal para esta alteração foi transferido de uma célula à outra.

A comunicação e a transferência de sinais específicos entre as células é uma descoberta recente, mas amplamente documentada (MICHALKE & LOEWENSTEIN, 1971; PITTS & SIMMS, 1977; LEDBETTER & LUBIN, 1979, 1980; LOEWENSTEIN, 1979, 1981; FLAGG-NEWTON et alii, 1981; FLAGG-NEWTON & LOEWENSTEIN, 1981; AZARNIA et alii, 1981; SPRAY et alii, 1982; LARSON & SHERIDAN, 1982; GUGUEN-GUILLOUZO et alii, 1983; MURRAY & FLETCHER, 1984; DELINASSIOS & KOTTARIDIS, 1984; SCHULTZ, 1985; CAVENEY, 1985; SHERIDAN & ATKINSON, 1985; HERTZBERG, 1985; SPRAY & BENNETT, 1985).

As células, através de suas funções podem trocar partes de seu conteúdo molecular, sendo esta troca efetuada por meio de canais presentes nas membranas, através dos quais moléculas hidrofílicas fluem diretamente do interior de uma célula para outra (LOEWENSTEIN, 1981). Estes canais intercelulares foram identificados morfolologicamente como junções comu-

nicantes ou "gap" (PITTS & SIMMS, 1977; LOEWENSTEIN, 1979, 1981; SPRAY & BENNETT, 1985; CAVENEY, 1985; SHERIDAN & ATKINSON, 1985), sendo suficientemente largos para possibilitarem o fluxo de íons inorgânicos, metabólitos, nucleotídeos, inclusive os cíclicos e os com ligação fosfato de alta energia, vitaminas e pequenos hormônios esteróides (LOEWENSTEIN, 1981). A observação de que células não comunicantes, analisadas ultraestruturalmente, não apresentavam estas estruturas, as quais reapareciam com o restabelecimento da competência para a comunicação celular constitui um indício importante de que a comunicação intracelular se efetua através de "gap" (FLAGG-NEWTON et alii, 1981).

Os principais papéis fisiológicos atribuídos às junções comunicantes seriam o envolvimento na troca de nutrientes, a manutenção da homeostase do tecido, a regulação do crescimento e da diferenciação e a transmissão de sinais moleculares intracelulares (SHERIDAN & ATKINSON, 1985; SCHULTZ, 1985). Uma das mais intrigantes funções sugeridas para as junções permeáveis, é a transmissão de sinais moleculares de célula a célula.

Um mediador intracelular bem conhecido, o AMP cíclico, também conhecido como mensageiro secundário, apresenta tamanho e carga similares às moléculas conhecidas que se transferem de uma célula para outra, via junções comunicantes. Desta forma, foi sugerido que o AMPc poderia ser o sinal transmitido juncionalmente (SHERIDAN & ATKINSON, 1985). Vários trabalhos têm demonstrado que o AMPc poderia passar de uma célula para outra (FLETCHER & BYUS, 1982; BYUS & FLETCHER, 1982;

MURRAY & FLETCHER, 1984) participando também na formação de junções de células em cultura (AZARNIA et alii, 1981; FLAGG-NEWTON et alii, 1981; FLAGG-NEWTON & LOEWENSTEIN, 1981). Estes autores demonstraram que vários tratamentos que aumentavam o nível intracelular de AMPc, estavam diretamente relacionados com o aumento da permeabilidade e com a elevação do número de junções comunicantes presentes entre as células.

Deste modo, podemos concluir em relação a MOD que esta induz alterações na expressão gênica das células Vero em cultura pelo contato direto com a matriz segundo o modelo de "reciprocidade dinâmica" proposto por Bissel e colaboradores (1982), mas podemos concluir também que a informação recebida por estas células foi transferida a outras.

Pelo modelo da reciprocidade dinâmica é postulado que a matriz extracelular exerceria influências físicas e químicas na geometria e bioquímica da célula, via receptores transmembrana, os quais alterariam o padrão da expressão gênica, modificando a associação do citoesqueleto com RNA_m e a interação da cromatina com a matriz nuclear. Alterações a nível nuclear fariam com que a célula alterasse seu padrão de síntese, modificando a matriz extracelular, a qual afetaria a célula e assim sucessivamente.

Este modelo pode ser perfeitamente aplicado às células que cresceram diretamente sobre a matriz, mas não àquelas que sofreram o seu efeito a distância. Estas células, de alguma maneira, receberam o sinal informacional e, como tem sido constatado por vários autores que a comunicação célula a célula se faz através de junções comunicantes e que o AMPc está

envolvido neste processo propomos uma hipótese para justificarmos os resultados por nós obtidos.

De acordo com a nossa interpretação, a MOD induziria alterações de membrana, que além de afetarem o citoesqueleto da célula, alterando a forma e a expressão de certos genes, atuaria aumentando o nível de AMPc intracelular. Este, por sua vez, aumentaria a permeabilidade celular, via junções comunicantes, de tal modo que o próprio AMPc ou pequenas moléculas hidrofílicas resultantes do metabolismo celular ou da lise da MOD passariam de uma célula para outra, permitindo que se estabelecesse um gradiente de diferenciação.

A favor desta hipótese temos, afora os trabalhos descritos anteriormente, o fato de que o aumento do AMPc está diretamente relacionado com a organização de microfilamentos e com a inibição da síntese de DNA (THYBERG, 1984) fatos estes também documentados por nós nas células que cresceram sobre, próximas e afastadas da MOD, além de termos detectado também aumento da atividade fosfatásica ácida nas células cultivadas sobre a MOD e a diminuição da birrefringência desta matriz quando utilizada como substrato.

5 - CONCLUSÕES

Com os dados obtidos no presente trabalho podemos concluir que:

1) A matriz óssea desmineralizada (MOD) induz um processo de diferenciação, em células Vero em cultura, que se caracteriza inicialmente por alteração na forma e no tamanho das células.

2) A MOD causa alterações no complexo DNP, a qual é evidenciada pela ortocromasia apresentada pelos núcleos da célula que utilizaram esta matriz como substrato.

3) A MOD promove aumento da atividade de síntese da célula durante a fase exponencial de crescimento de cultura sendo esta constatada pelo aumento de grânulos intracitoplasmáticos.

4) O produto da síntese induzida pela MOD deve permanecer armazenado no interior de grânulos ou então apresenta as mesmas características de produtos sintetizados normalmente pelas células em cultura, uma vez que não detectamos alterações no conteúdo do meio de cultivo, quando este foi submetido a eletroforese.

5) O produto de secreção induzida pela MOD apresenta radicais livres de -D-manopirranose e -D-glicopirranose uma vez que apresentam reação positiva após a incubação com a Concanavalina A (Con A).

6) A MOD induz alterações na composição do nucléolo, uma vez que este passa a responder positivamente a Con A, indicando alterações no seu conteúdo de carboidratos.

7) A MOD causa alterações que se refletem à nível de composição das membranas plasmáticas, as quais puderam ser detectadas pela incubação com a Con A.

8) A MOD induz células epitelióides a se diferenciarem em células com características morfológicas e fisiológicas semelhantes a dos condrócitos.

9) As células Vero, induzem modificações na MOD que pode ser detectada pela redução da birrefringência, provavelmente por atividade lítica das células sobre a MOD, pois estas apresentaram reatividade maior a fosfatase ácida.

10) A MOD inibe a proliferação celular o que pode ser detectado pela redução do índice mitótico apresentado pelas células que se desenvolveram neste substrato ou próximo a ele.

11) O processo de diferenciação induzido pela MOD ocorre formando um gradiente, sendo o sinal informacional contido na MOD transmitido de célula a célula.

6 - RESUMO

É amplamente aceito que as características morfológicas e fisiológicas da célula são resultantes da interação genoma + meio ambiente e, portanto, as diferenças observadas entre tipos celulares seriam o resultado da ação diferencial de genes. Nos últimos anos tem-se estudado o quanto da informação contida na célula é codificada pela seqüência primária dos genes e quanto do ambiente influencia esta expressão gênica. O papel da matriz extracelular íntegra, ou de seus componentes isolados, na regulação da expressão final de uma informação genética tem sido constatada por vários autores tanto "in vivo" quanto "in vitro". Estes trabalhos evidenciam que a matriz extracelular está envolvida nos processo de diferenciação. No nosso trabalho utilizamos uma matriz óssea desmineralizada (MOD) como substrato para a adesão e crescimento de células Vero, uma linhagem celular estabelecida a partir de células renais de macaco. Com os resultados obtidos através de análises citoquímicas, do índice mitótico, de eletroforese e de microscopia de polarização pudemos concluir que a MOD induz um processo de diferenciação que se caracteriza por alterações na forma e no tamanho das células, por alterações no complexo DNP, por aumento de grânulos de secreção contendo substâncias com radicais livres de D. manopiranose e D. glicopiranose, por alterações de constituição do nucléolo e da membrana plasmática. Desta forma, a utilização de MOD, em cultura de células Vero, as quais normalmente apresentam características epitelióides, induz alteração a nível da expressão gênica

das mesmas, que se manifestam através de características morfológicas e fisiológicas, fazendo com que estas se assemelhem à condrócitos. Este processo de diferenciação induzido pela MOD, ocorre formando um gradiente, sendo o sinal informacional contido na MOD, transmitido de célula a célula, e, provavelmente, o fato indutor de diferenciação presente na MOD não deve ser solúvel no meio de cultivo.

ABSTRACT

We studied the demineralized bone matrix, in vitro, used as a substrate for cell adesion and cell growth. The cells used were Vero cells, which are a cell line developed from monkey kidney tissue. From the results obtained through cytochemical analysis, mitotic index, eletroforesis, and polarization microscopy we concluded that demineralized bone matrix induces a differentiation process which modifies the size and shape of the cells. Modifications may be encontered of the DNP complex, the nucleolus, the plasma membrane, as well as an increase in the number of the secretion granules containing substances with free radicals of α -D. manno-pyranosyl and α -D. glucopyranosyl. In Vero cells cultures, which normally are epithelial, the use of demineralized bone matrix alter their level of gene expression, change their morphological and physiological characteristics to the point that the cells appear to be chondrocytes. This differentiation process induced by the demineralized bone matrix is gradually intensified since the informacional signal is contained in this matrix and is transmitted from cell to cell. The diferenciation inducing factor of demineralized bone matrix is probably not soluble in the culture medium.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, L.W. Collagen lattice cultures of human skin fibroblasts. Eur. J. Cell Biol., 36(suppl 8): 5, 1985.
- AGGELER, J.; FRISCH, S. & WERB, Z. Procollagenase gene expression is correlated with cell shape change. J. Cell Biol., 95: 400 a, 1982.
- , FRISCH, S.M. & WERB, Z. Collagenase is a major gene product of induced rabbit synovial fibroblasts. J. Cell Biol., 98: 1656-61, 1984 a.
- , FRISCH, S.M. & WERB, Z. Changes in cell shape correlate with collagenase gene expression in rabbit synovial fibroblasts. J. Cell Biol., 98 : 1662-71, 1984 b.
- AMSTERDAN, A.; AZRAD, A.; GORDON, S. & FURMAN, A. Effect of extracellular matrix (ECM) on maintenance of granulosa cell differentiation in vitro. J. Cell Biol., 99 : 159 a, 1984.
- ANDRADE FILHO, J.B.F. Cartilagem hialina: Extractibilidade e estado de agregação de seus componentes. Campinas, 1984. 118 p. Tese (mestrado). Unicamp, Instituto de Biologia.
- AZARNIA, R.; DAHL, G. & LOEWENSTEIN, W.R. Cell junction and cyclic AMP. III. Promotion of junctional membrane permeability and junctional membrane particles in a junction deficient cell type. J. Membr. Biol., 63: 133-46, 1981.

- AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Estudo citoenzimológico em túbulos de Malpighi de Triatoma infestans Klug. Campinas, 1982. 175 p. Tese (mestrado). Unicamp, Instituto de Biologia.
- BADE, E.G. & NITZGEN, B. Control of liver epithelial cell migration by growth factors and extracellular matrix. Eur. Cell Biol., 36(suppl 7), 5, 1985.
- BELSKY, E.; VASAN, N.S. & LASH, J.W. Extracellular matrix components and somite chondrogenesis: a microscopic analysis. Devl. Biol., 79: 159-80, 1980.
- BENNETT, D.C.; ARMSTRONG, B.C. & OKADA, S.M. Reconstitution of branching tubules from two cloned mammary cell types in culture. Devl. Biol., 87: 193-9, 1981.
- BENSCH, K.G.; DAVISON, P.M. & KARASEK, M.A. Factors controlling the in vitro growth pattern of human microvascular endothelial cells. J. Ultrastruct. Res., 82: 76-89, 1983.
- BENYA, P.D. & SHAFFER, J.D. Dedifferentiated chondrocytes re-express the differentiated phenotype when cultured in agarose. Cell, 20: 215-24, 1982.
- BEN-ZE'EV, A.; DUERR, A.; SALOMON, F. & PENMAN, S. The outer boundary of the cytoskeleton: a lamina derived from plasma membrane proteins. Cell, 17: 859-65, 1979.
- , & ABULAFIA, R. Association of glycoconjugates with the cytoskeletal framework. Mol. Cell Biol., 3 : 684-92, 1983.

- BERNFELD, M.; BANERJEE, S.; JALKANEN, M.; KODA, J.; NGUYEN, H. & RAPRAEGER, A. Extracellular matrix regulation of epithelial behaviour in morphogenesis. J. Embryol. exp. Morph., 82(suppl) 1-3. 1984.
- BIRD, A. P. DNA methylation versus gene expression. J. Embryol. exp. Morph., 83(supl) 31-40, 1984.
- BISSEL, M.J.; HALL, H.G. & PARRY, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? J. Theor. Biol., 99: 31-68, 1982.
- BLANQUET, P.R. Detection of a prominent 150.000 Mr glycoprotein at contact sites of fibronectin-attached hepatocytes. Cell. Mol. Biol., 31 : 33-9, 1985.
- BLUM, J.L. & WICHA, M.S. Role of extracellular matrix in mammary growth and differentiation. J. Cell Biol., 99 : 159 a, 1984.
- BOECK, H. de; DAVID, G.; VAN DER SCHUEREN, B. & CASSIMAN, J.-J. Modulated adhesive behavior of retinoblastoma cells : effects on morphology and on heparan sulfate proteoglycans. Eur. J. Cell Biol., 36 (supl 7): 9, 1985.
- BOUILLANT, A.M.P. & GREIG, A.S. Concanavalin A agglutination assays in the multistage transformation of a pig cell line. Expl. Cell Biol., 49: 154-61, 1981.
- BOULAN, E.R.; KREIBICH, G. & SABATINI, D.D. Spatial orientation of glycoproteins in membranes of rat liver rough mi-

crossomes. I. localization of lectin-binding sites in microsome membranes. J. Cell Biol., 78: 874-93, 1978.

BROWN, D.D. Gene expression in Eukaryotes. Science, 211: 667-74, 1981.

BROWN, J.E. & JONES, K.W. Basic concepts of differentiation and growth of cells. In GOLDSPIK, ed. Differentiation and growth of cells in vertebrate tissues. London. Chapman & Hall, 1974, p. 1-51.

BROWN, P.J. & JULIANO, R.L. Admodulin: A cell surface glycoprotein specifically involved in fibronectin mediated adhesion. J. Cell Biol., 99 : 161 a, 1984.

BURGER, M.M. Surface changes in transformed cells detected by lectins. Fedn. Proc., 32 : 91-101, 1973.

BURKE, D.; BROWN, M.J. & JACOBSON, B.S. Hela cell adhesion to microcarriers in high shear conditions: evidence for membrane receptors for collagen but not laminin or fibronectin. Tissue & Cell., 15: 181-91, 1983.

BURWEN, S.J. & PITEKKA, D. Secretory function of lactating mouse mammary epithelial cells cultured on collagen gels. Expl. Cell Res., 126: 240-62, 1980.

BYUS, C.V. & FLETCHER, W.H. Direct cytochemical localization of catalytic subunits dissociated from c. AMP - dependent protein kinase in Reuber H-35 hepatoma cells. II Temporal and spatial kinetics. J. Cell Biol., 93: 727-34, 1982.

- CAMPO-AASEN, I. & YARZABAL, L. Acid phosphatase observed in the intramembranous system of the yeast-like phase of Paracoccidioides brasiliensis. Mycopathologia, 74: 87-8, 1981.
- CARBONETTO, S.T., GRUVER, M.M. & TURNER, D.C. Nerve fiber growth on defined hydrogel substrates. Science, 216: 897-9, 1982.
- CAVENEY, S. The role of gap functions in development. Rev. Physiol., 47: 319-35, 1985.
- CERVERA, M.; DREYFUSS, G. & PENMAN, S. Messenger RNA is translated when associated with the cytoskeletal framework in normal and USU-infected Hela cells. Cell, 23: 113-20, 1981.
- CHAMBARD, M.; GABRION, J. & MAUCHAMP, J. Influence of collagen gel on the orientation of epithelial cell polarity: Follicle formation from isolated thyroid cells and from preformed monolayers. J. Cell Biol., 91: 157-66, 1981.
- ; VERRIER, B.; GABRION, J. & MAUCHAMP, J. Polarity reserval of inside out thyroid follicles cultured within collagen gel: reexpression of specific functions. Biol. Cell., 51: 315-26, 1984.
- CHIQUET, M.; EPPENBERGER, H.M. & TURNER, D.C. Muscle morphogenesis: Evidence for an organizing function of exogenous fibronectin. Devl. Biol., 88: 220-35, 1981.

COHEN, A.M. & HAY, E.D. Secretion of collagen by embryonic neuroepithelium at the time of spinal cord somite interaction. Devl. Biol., 26: 578-605, 1971.

CRAWFORD, B.J. Some factors controlling cell polarity in chick retinal pigment epithelial cells in clonal culture. Tissue & Cell, 15: 993-1005, 1983.

DAMSKY, C.H.; TARRONE, G.; BUCK, C.; HORWITZ, A.F. 120 - 160 Kd membrane glycoproteins can promote cell substratum adhesion by a mechanism that does not require focal contacts. J. Cell Biol., 99: 235 a, 1984.

DANG, C.V.; YANG, D.C.H. & POLLARD, T.D. Association of methionyl - RNA synthetase with detergent - insoluble components of the rough endoplasmic reticulum. J. Cell Biol., 96: 1138-47, 1983.

DEITCH, A.D. & SAWICKI, S.G. Effects of cordycepin on microtubules of cultures mammalian cells. Expl. Cell Res., 118: 1-13, 1979.

DELINASSIOS, J.G. & KOTTARIDIS, S.D. Interactions between human fibroblasts and Hela cells "in vitro". Biol. Cell, 50: 9-16, 1984.

DELTOUR, R.; FRANSOLET, S. & LOPPES, R. Inorganic phosphate accumulation and phosphatase activity in the nucleus of maize embryo root cells. J. Cell Sci., 47: 77-89, 1981.

Di BERARDINO, M.A.; HOFFNER, N.J. & ETKIN, L.D. Activation of dormant genes in specialized cells. Science, 224: 946-52, 1984.

DOCHERTY, R.J., LACKIE, J.M. Collagen gels as model systems in which to investigate the behaviour of retinally derived cells. Eur. J. Cell Biol., 36(supl 8): 10, 1985.

DOOD, N.J.F.; SCHOR, S.L. & RUSHTON, G. The effects of a collagenous extracellular matrix on fibroblast membrane organization. An ESR spin label study. Expl. Cell Res., 141: 421-31, 1982.

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

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

—————; BURWEN, S.J. & PITELKA, D.R. Substrate influence on shape and differentiation of cultured mammary epithelial cells. Anat. Rec., 190: 390, 1978.

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

FAIRMAN, K. & JACOBSON, B.S. Unique morphology of Hela cell attachment, spreading and detachment from microcarrier beads covalently coated with a specific and non-specific substratum. Tissue & Cell, 15: 167-180, 1983.

FANTONI, A., LUNADEI, M. & ULLU, E. Control of gene expression during terminal differentiation of erythroid cells. Cur. Top. Dev. Biol., 9: 15-38, 1975.

FESTOFF, B.W.; RAO, J.S. Extracellular matrix (ECM) synthesis in muscle cell cultures: Quantitative and qualitative studies during myogenesis. J. Cell Biol., 99 : 403 a, 1984.

FISHMAN, P.H. & BRADY, R.O. Biosynthesis and function of gangliosides. Science, 194: 906-15, 1976.

FLAGG-NEWTON, J.L.; DAHL, A. & LOEWENSTEIN, W.R. Cell function and cyclic AMP: I. Upregulation of functional membrane particles by administration of cyclic nucleotide or phosphodiesterase inhibition. J. Membr. Biol., 63: 105-21, 1981.

———— & LOEWENSTEIN, W.R. Cell function and cyclic AMP. II. Modulations of functional membrane permeability, dependent on serum and cell density. J. Membr. Biol., 63: 123-31, 1981.

FLEMING, N. & KISTLER, G.S. Morphology, histochemistry and isozymes of monkey kidney cells during long-term exposure to cigarette smoke. Acta Histochem., 60 : 132-45, 1977.

- FLETCHER, W.H. & BYUS, C.V. Direct cytochemical localization of catalytic subunits dissociated from c. AMP - dependent protein kinase in Reuber H-35 hepatoma cells. I. Development and validation of fluorescinated inhibitor. J. Cell Biol., 93: 719-26, 1982.
- FOLKMAN, J. & GREENSPAN, H.P. Influence of geometry on control of cell growth. Biochem. biophys. Acta, 417: 211-36, 1975.
- & MOSCONA, A. Role of cell shape in growth control. Nature, 273: 345-9, 1978.
- FRANZI, A.T.; LEPRINI, A.; CADONI, A.; ZICCA, A.; GHIGLIOTTI, C. & GROSSI, C.E. Functional studies on adherent cells from human peripheral blood in short term cultures. Release of acid hydrolases and plasma membrane turnover. J. Submicrosc. Cytol., 12 : 533-45, 1980.
- FRIEDMAN, S.J.; GALUSZKA, D.; GEDEON, I.; DEWAR, C.L.; SKEHAN, P. & HECKMAN, C.A. Changes in cell-substratum adhesion and nuclear cytoskeletal anchorage during cytodifferentiation of BEWO choriocarcinoma cells. Expl. Cell Res., 154: 386-93, 1984.
- GATMAITAN, Z.; JEFFERSON, D.M.; RUIZ-OPAZO, N.; BIEMPICA, L.; ARIAS, I.M.; DUDAS, G.; LEINWAND, L.A. & REID, L.M. Regulation of growth and differentiation of a rat hepatoma cell line by the synergistic interactions of hormones and collagenous substrata. J. Cell Biol., 97: 1179-90, 1983.

GEPPERT, E.F.; WILLIAMS, M.C. & MASON, R.J. Primary culture of rat alveolar type II cells on floating collagen membranes. Morphological and biochemical observations. Expl. Cell Res., 128: 363-74, 1980.

GERBER, H.; HOERLER, J.; HOCH, H. & VESELY, T. The effect of pH, serum and fresh medium supply on embryonic rat chondrocytes. Biol. Cell, 52(1/part B): 21 a, 1984.

GLOWACKI, J.; TREPMAN, E. & FOLKMAN, J. Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 172: 93-8, 1983.

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

GROBSTEIN, C. In: RUDNIK, D. ed. Aspects of Synthesis and Order in Growth. Princeton; Princeton Univ. Pr., 1955, p. 233-256. Apud BISSEL, M.J.; HALL, H.G. & PARRY, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? J. Theor. Biol., 99: 31-68, 1982.

GUGUEN-GUILLOUZO, C.; CLEMENT, B.; BAFFET, G.; BEAUMONT, C.; MOREL-CHANY, E.; GLAISE, D. & GUILLOUZO, A. Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. Expl. Cell Res., 144: 47-54, 1983.

HADLEY, M.A.; BYERS, S.W.; DYM, M. Sertoli cell response to substratum. J. Cell Biol., 99 : 171 a, 1984.

HAEUPTLE, M.T.; SUARD, Y.L.M.; BOGENMANN, E.; REGGIO, H.; RACINE, L. & KRAEHENBUHL, J.P. Effect of cell shape change on the function and differentiation of rabbit mammary cells in culture. J. Cell Biol., 96: 1425-34, 1983.

HAKOMORI, S.I. Structures and organization of surface glycolipids dependency on cell growth and malignant transformation. Biochem. biophys. Acta, 417: 55-89, 1975.

HAUSCHKA, P.V. & REDDI, A.H. Correlation of the appearance of carboxyglutamic acid with the onset of mineralization in developing endochondral bone. Bioch. biophys. Res. Commun., 92: 1037-41, 1980.

HAY, E.D. Development of the vertebrate cornea. Int. Rev. Cytol., 63: 263-322, 1980.

———. Extracellular matrix. J. Cell Biol., 91(3 pt 2): 205s-23s, 1981.

HERTZBERG, E.L. Antibody probes in the study of gap junctional communication. Rev. Physiol., 47: 305-18, 1985.

HIRANO, H.; PARKHOUSE, B.; NICOLSON, G.L.; LENNOX, E.S. & SINGER, S.J. Distribution of saccharide residues on membrane fragments from a mieloma - cell homogenate: its implications for membrane biogenesis. Proc. natl. Acad. Sci., 69: 2945-9, 1972.

HOFFMAN, L.H. & DI PIETRO, D.L. Subcellular localization of human placental acide phosphatases. Am. J. Obstet. Gynec.,

114: 1087-96, 1972.

HOLDERBAUNN, D. & EHRHART, L.A. Substratum influence on extra cellular matrix biosynthesis by cultured arterial smooth muscle. J. Cell Biol., 99 : 403 a, 1984.

HOOK, S.L. & SANDERS, E.J. Concanavalin A - Binding by cells of the early chick embryo. J. Cell Physiol., 93: 57 - 68, 1977.

HOWE, J.G. & HERSHEY, J.W.B. Translational initiation factor and ribosome association with the cytoskeletal framework fraction from Hela cells. Cell, 37 : 85-93, 1984.

HYNES, R.O. Cell surface proteins and malignant transformation. Biochim. biophys. Acta, 458: 73-107, 1976.

ITO, K. & TAKEUCHI, T. The differentiation in vitro of the neural crest cells of the mouse embryo. J. Embryol. exp. Morph., 84: 49-62, 1984.

JACOBSON, B.S. Interaction of the plasma membrane with the cytoskeleton: an overview. Tissue & Cell, 15: 829-52, 1983.

JEFFERY, W.R. Messenger RNA in the cytoskeletal framework : analysis by in situ hibridization. J. Cell Biol., 95: 1-7, 1982.

JOUSIMAA, J.; MERENMIES, J. & RAUVALA, H. Neurite outgrowth of neuroblastoma cells induced by proteins covalently coupled to glass coveslips. Eur. J. Cell Biol., 35: 55-61, 1984.

- KATSUYAMA, T. & SPICER, S.S. Histochemical differentiation of a complex carbohydrates with variants of the concanavalin A - Horseradish peroxidase method. J. Histochem. Cytochem., 26: 233-50, 1978.
- KARLSSON, F.A.; GRUNFELD, C.; KAHN, R.C. & ROTH, J. Regulation of insulin receptors and insulin responsiveness in 3T3-L1 fatty fibroblasts. Endocrinology, 104: 1383-92, 1979.
- KERN, P.; LAURENT, M.; LIM, A.; REGNAUT, F. & COURTOIS, Y. Interaction of bovine epithelial lens (BEL) cells with extracellular matrix (ECM) and eye-derived growth factor (EDGF) II. Partial re-expression of the differentiated collagen distribution and phenotype. Expl. Cell Res., 149: 85-93, 1983.
- KLEINMAN, H.K.; KLEBE, R.J. & MARTIN, G.R. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. J. Cell Biol., 88 : 473-85, 1981.
- KOTELIANSKY, V.E.; GNEUSHEV, G.N. & BELKIN, A.M. Purification of a 175-KDa membrane protein, its localization in smooth and cardiac muscles. Interaction with cytoskeletal protein-vinculin. Febs Letters, 182 : 67-72, 1985.
- KURTH, P.D.; BUSTIM, M. & MOUDRIANAKIS, E.W. Concanavalin A binds to puffs in polytene chromossomes. Nature, 279: 448-50, 1979.

LANDER, A.D.; FUJII, D.K.; GOSPODAROWICZ, D. & REICHARDT, L.

F. Characterization of a factor that promotes neurite out growth: evidence linking activity to a heparan sulfate proteoglycan. J. Cell Biol., 94: 574-85, 1982.

LANOTTE, M. Terminal differentiation of hemopoietic cell clones cultured in tridimensional collagen matrix: In situ cell morphology and enzyme histochemistry analysis. Biol. Cell, 50 : 107-20, 1984.

LARSON, D.M. & SHERIDAN, J.D. Intercellular functions and transfer of small molecules in primary vascular endothelial cultures. J. Cell Biol., 92: 183-91, 1982.

LAWLER, E.M.; MILLER, F.R. & HEPPNER, G.H. Significance of three-dimensional growth patterns of mammary tissues in collagen gels. In Vitro, 19: 600-10, 1983.

LEDBETTER, M.L.S. & LUBIN, M. Transfer of Potassium. A new measure of cell-cell coupling. J. Cell Biol., 80:150-65, 1979.

LEDBETTER, M.L.S. & LUBIN, M. Interference of ouabain in cell-to-cell coupling. Expl. Cell Res., 129: 73-81, 1980.

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

—————; LEZ, W.H.; KAETZEL, C.S.; PARRY, G. & BISSEL, M.J.

Collagenous substrata regulate secretion of mouse milk pro

teins at both transcriptional and posttranslational level.
J. Cell Biol., 99 : 236 a, 1984.

———— & ENGELHARDT, D.L. Protein metabolism during growth
 of Vero cells. J. Cell Physiol., 92 : 293-302, 1977.

———— & ENGELHARDT, D.L. Fluctuations in the production
 of specific cellular peptides during the growth of animal
 cells. J. Cell Biol., 78 : R28-R35, 1978.

LENK, R.; RANSOM, L.; KAUFMANN, Y & PENMAN, S. A cytoskeletal
 structure with associated polyribosomes obtained from
 Hela cells. Cell, 10: 67-78, 1977.

———— & PENMAN, S. The cytoskeletal framework and poliovirus
 metabolism. Cell, 16: 289-301, 1979.

LETOURNEAU, P.C. Possible roles for cell to substratum adhesion
 in neuronal morphogenesis. Devl. Biol., 44: 77-91,
 1975 a.

————. Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal
 elongation. Devl. Biol., 44: 92-101, 1975 b.

LIEBERMAN, M.A.; RABEN, D. & GLASER, L. Cell surface associated
 growth inhibitory proteins. Expl. Cell Res., 133: 413-
 -19, 1981.

LIS, H. & SHARON, N. The biochemistry of plant lectins. (Phytohemagglutinins). A. Rev. Biochem., 42: 541-74, 1973.

LISON, L. Reaction de fonctions ou de radicaux aliphatiques.

In: ————. Histochemie et cytochemie animales. 3 ed.

Paris, Gauthier-Villars, 1960, V.1. p. 158-237.

LOEWENSTEIN, W.R. Junctional intercellular communication and the control of growth. Bioch. biophys. Acta, 560: 1-65, 1979.

———. Junctional intercellular communication: The cell-to-cell membrane channel. Physiol. Rev., 61 : 829-913; 1981.

LORING, J.; GLIMELIUS, B. & WESTON, J.A. Extracellular matrix materials influence quail neural crest cell differentiation "in vitro". Devl. Biol., 90: 165-74, 1982.

MACGREGOR, H. & SWAN, A.P. An introduction to programmes for development. J. Embryol. exp. Morph., 83(supl 1-6): 1-6, 1984.

MACIEIRA-COELHO, A.; WAHRMANN, J.P.; HIU, I.J. & AZZARONE, B. Changes in the cell phenotype through topological constraints induced by the substratum. Biol. Cell, 52(1/part B), 26 a, 1984.

MACCARTHY, J.B. & FURCHT, T. Laminin and fibronectin promote the haptotactic migration of B16 mouse melanoma cells in vitro. J. Cell Biol., 98 : 1474-80, 1984.

MACKENZIE, D.D.S.; FORSYTH, I.A.; BROOKER, B.E. & TURVEY, A. Culture of bovine mammary epithelial cells on collagen

gels. Tissue & Cell, 14: 231-41, 1982.

—————; BROOKER, B.E. & FORSYTH, I. Ultrastructural features of bovine mammary epithelial cells grown on collagen gels. Tissue & Cell, 17 : 39-51, 1985.

MAHONEN, Y. & RAUVALA, H. Adhesive membrane protein of rat brain enhances neurite outgrowth of neuroblastoma cells. Eur. J. Cell Biol., 36: 91-7, 1985.

MARCEAU, N.; NOEL, M. & DESCHENES, J. Growth and functional activities of neonatal and adult rat hepatocytes cultured on fibronectin coated substratum in serum-free medium. In Vitro, 18 : 1-11, 1982.

MATTEY, D.L. & GARROD, D.R. Organization of extracellular matrix by chick embryonic corneal epithelial cells in culture and the role of fibronectin in adhesion. J. Cell Sci., 67: 171-88, 1984 a.

————— & GARROD, D.R. Role of glycosaminoglycans and collagen in the development of a fibronectin-rich extracellular matrix in cultured embryonic corneal epithelial cells. J. Cell Sci., 67: 189-202, 1984 b.

MAYLIÉ-PFENNINGER, M.F. & JAMIESON, J.D. Effect of 5-bromo-deoxyuridine on appearance of cell-surface saccharides in organ cultures of embryonic pancreas. Devl. Biol., 87: 16-23, 1981.

- MECHAM, R.P.; MADARAS, J.G. & SENIOR, R.M. Extracellular matrix-specific induction of elastogenic differential ion and maintenance of phenotypic stability in bovin ligament fibroblasts. J. Cell Biol., 98 : 1804-12, 1984.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. Changes in anisotropic properties and nuclear stainability during spermatogenesis in the grasshopper, Staurorhectus longicornis Giglio-Tors. Adv. Invert. Reprod., 1: 75-83, 1977.
- ; RAYMUNDO, H.H. & PRETTI, M.C.M. Action of hycanthone methane-sulfonate on chromatin basophilia and anisotropy in onion meristems. Cytologia, 43: 397-404, 1978.
- & VIDAL, B.C. Padrões de basofilia em cromossomos politênicos de Rhynchosciara americana. Ciênc. Cult., 31: 604, 1979.
- & VIDAL, B.C. Práticas de Biologia Celular. S. Paulo, Edgar Blucher, Campinas, S.P., Fundação de desenvolvimento da Unicamp, 1980.
- . Toluidine blue binding capacity of heterochromatin and euchromatin of Triatoma infestans Klug. Histochemistry, 69: 181-7, 1980.
- . Induced metachromasia in bull spermatozoa. Histochemistry, 74: 387-92, 1982.
- MICHALKE, W. & LOEWENSTEIN, W.R. Communication between cells of different type. Nature, 232: 121-2, 1971.
- MICHALOPOULOS, G. & PITOT, H.C. Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations. Expl. Cell Res., 94: 70 - 8 , 1975.

- MIURA, A. & OHBA, Y. Structure of nucleohistone. III. Interaction with toluidine blue. Biochem. biophys. Acta, 145: 436-45, 1967.
- MIYAYAMA, H.; SOLOMON, R.; SASAKI, M.; KIN, C.W. & FISHMAN, W.H. Demonstration of lysosomal and extralysosomal sites for acid phosphatase in mouse kidney tubule cells with p nitrophenyl phosphate lead salt technique. J. Histochem. Cytochem., 23: 439-51, 1975.
- MOCZAR, E.; TASSIN, J. & COURTOIS, Y. Interaction of bovine epithelial lens (BEL) cells with extracellular matrix (ECM) and eye-derived growth factor (EDGF). III. Control of glycoprotein and proteoglycan synthesis. Expl. Cell Res., 149: 95-104, 1983.
- MORRÉ, D.; KARTENBECK, J. & FRANKE, W.W. Membrane flow and interconversions among endomembranes. Biochem. biophys. Acta, 559: 71-152, 1979.
- MIRANDE, M.; CORRE, D. LE; LOUVARD, D.; REGGIO, H.; PAILLIEZ, J.P. & WALLER, J.P. Association of an aminoacyl-TRNA synthetase complex and of phenylalanyl-TRNA synthetase with the cytoskeletal framework fraction from mammalian cells. Expl. Cell Res., 156: 91-102, 1985.
- MURRAY, S.A. & FLETCHER, W.H. Hormone induced intercellular signal transfer dissociates cyclic AMP-dependent protein kinase. J. Cell Biol., 98: 1710-9, 1984.

NAG, A.C. & CHENG, M. DNA synthesis in mammalian heart cells: Comparative studies of monolayer and aggregate cultures. Cel. Mol. Biol., 29: 451-459, 1983.

NAKAGAWA, M. & URIST, M.R. Chondrogenesis in tissue cultures of muscle under the influence of a diffusible component of bone matrix. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 154: 568 - 72, 1977.

NAKANISHI, S. Extracellular matrix during laminar pattern formation of neocortex in normal and reeler mutant mice. Devl. Biol., 95: 305-16, 1983.

NATHANSON, M.A.; HILFER, S.R. & SEARLS, R.L. Formation of cartilage by non-chondrogenic cell types. Devl. Biol., 64: 99-117, 1978.

———— & HAY, E.D. Analysis of cartilage differentiation from skeletal muscle grown on bone matrix. I. Ultrastructural aspects. Devl. Biol., 78: 301-38, 1980 a.

———— & HAY, E.D. Analysis of cartilage differentiation from skeletal muscle grown on bone matrix. II. Chondroitin sulfate synthesis and reaction to exogeneous glycosaminoglycans. Devl. Biol., 78: 332-51, 1980 b.

NICOLSON, G.L. The interactions of lectins with animal cell surfaces. Int. Rev. Cytol., 39: 89-190, 1974.

NOGAMI, H. & URIST, M.R. A substratum of bone matrix for differentiation of mesenchymal cells into chondro-osseous tissue.

sues "in vitro". Expl. Cell Res., 63: 404-10, 1970.

_____ & URIST, M.R. Substrata prepared from bone matrix for chondrogenesis in tissue culture. J. Cell Biol., 62: 510-19, 1974.

OLIVER, C.; KLEINMAN, H.K. & BETHESDA, N.I.H. Growth of exocrine acinar cells on a reconstituted basement membrane substratum. J. Cell Biol., 99 : 159 a, 1984.

PANYIM, S. & CHALKLEY, R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. Archs. Biochem. Biophys., 130 : 337-46, 1969.

PAVELKA, M. & ELLINGER, A. Localization of lectin binding sites in the Golgi complex. Em. J. Cell Biol., 36(supl 7), 49, 1985.

PEEBLES, F. On the interchange of the limbs of the chick by transplantation. Biol. Bull., 20: 14-8, 1911.

PENNYPACKER, J.P.; HASSEL, J.R.; YAMADA, K.M. & PRATT, R.M.
The influence of an adhesive cell surface protein on chondrogenic expression in vitro. Expl. Cell Res., 121: 411-15, 1979.

PITTS, J.D. & SIMMS, J.W. Permeability of junctions between animal cells. Intracellular transfer of nucleotides but not of macromolecules. Expl. Cell Res., 104: 153-63, 1977.

PRATT, B.M.; HARRIS, A.S.; MORROW, J.S. & MADRI, J.A. In

vitro substratum modulation of the aortic endothelial cell cytoskeletal component spectrin. J. Cell Biol., 99: 235 a, 1984.

RAMAEKERS, F.C.S.; HUKKELHOVEN, M.W.A.C.; GROENEVELD, A. & BLOEMENDAL, H. Changing protein patterns during lens cell aging in vitro. Biochem. biophys. Acta, 799: 211-9, 1984.

RANSCHT, B.; MOSS, D.J. & THOMAS, C. A neuronal surgace glyco protein associated with the cytoskeleton. J. Cell Biol., 99: 1803-13, 1984.

RAPAEGER, A. & BERNFIELD, M. Cross-linking ligands promote association of a cell surface proteoglycan with the cytoskeleton. J. Cell Biol., 99: 235 a, 1984.

RAUVALA, H. Neurite outgrowth of neuroblastoma cells: dependence on adhesion surface-cell surface interactions. J. Cell Biol., 98: 1010-6, 1984.

REDDI, A.H. & HUGGINS, C. Biochemical sequences in the trans formation of normal fibroblasts in adolescent rats. Proc. natl. Acad. Sci., 69: 1601-5, 1972.

———— & ANDERSON, W.A. Collagenous bone matrix induced endochondral ossification and hemopoiesis. J. Cell Biol., 69: 557-72, 1976.

————; HASCALL, V.C. & HASCALL, G.K. Changes in proteoglycan types during matrix-induced cartilage and bone development. J. biol. Chem., 253: 2429-36, 1978.

REDDY, J.K.; KANWAR, Y.S.; RAO, M.S.; WATANABE, T.K.; HANSEN, L.J. & TAFURI, S. Role of basement membrane in the organization of neoplastic acinar carcinoma cells in vitro. J. Cell Biol., 99: 159, 1984.

RICHARDS, J.; PASCO, D.; YANG, J.; GUZMAN, R. & NANDI, S. Comparison of the growth of normal and neoplastic mouse mammary cells on plastic, on collagen gels and in collagen gels. Expl. Cell Res., 146: 1-14, 1983.

RIZZO, W.B. & BUSTIN, M. Lectins as probes of chromosome structure. Binding of concanavalin A to purified rat liver chromatin. J. biol. Chem., 252: 7062-7, 1977.

ROJKIND, M.; GATMAITAN, Z.; MACKENSEN, S.; GIAMBRONE, M.A.; PONCE, P. & REID, L. Connective tissue biomatrix: Its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. J. Cell Biol., 87: 255-65, 1980.

ROOS, E.; FELTKAMP, C.A.; MESLAND, D.A.M. & SPIELE, H. The plasma membrane-bound cytoskeletal network and its relation to cell surface lectin receptors. Eur. J. Cell Biol., 36 (supl 7): 54, 1985.

RUNYAN, R.B. & MARKWALD, R.R. Invasion of mesenchyme into three dimensional collagen gels: A regional and temporal analysis of interaction in embryonic heart tissue. Devl. Biol., 95: 108-14, 1983.

SAMPATH, T.K. & REDDI, A.H. Dissociative extraction and re-

constitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. Proc. natl. Acad. Sci., 78: 7499-603, 1981.

SAMPATH, T.K.; DeSIMONE, D.P. & REDDI, A.H. Extracellular bone matrix derived growth factor. Expl. Cell Res., 142: 460-4, 1982.

——— & REDDI, A.H. Importance of geometry of the extracellular matrix in endochondral bone differentiation. J. Cell Biol., 98 : 2192-7, 1984.

SANCHES-PINA, A.; RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.; RISUEÑO, M. C. & FERNANDEZ GOMEZ, M.Z. Localization of the acid phosphatase activity in plant cell nucleoli. Revta. Microsc. Eletronic., 5 : 282-3, 1978.

SANES, J.R. Roles of extracellular matrix in neural development. Rev. Physiol., 45: 581-600, 1983.

SCHOR, M.; SCHOR, S.L. & ALLEN, T.D. The synthesis of sub-endothelial matrix by bovine aortic endothelial cells in culture. Tissue & Cell, 16 : 677-91, 1984.

SCHOR, S.L. & COURT, J. Different mechanisms in the attachment of cells to native and denatured collagen. J. Cell Sci., 38: 267-81, 1979.

———. Cell proliferation and migration on collagen substrata "in vitro". J. Cell Sci., 41: 159-75, 1980.

SCHULTZ, R.M. Roles of cell-to-cell communication in development. Biol. Reprod., 32: 27-42, 1985.

SEYEDIN, S.M.; THOMPSON, A.Y.; ROSEN, D.M. & PIEZ, K.A. In vitro induction of cartilage-specific macromolecules by a bone extract. J. Cell Biol., 97: 1950-3, 1983.

SHERIDAN, J.D. & ATKINSON, M.M. Physiological roles of permeable junctions: some possibilities. A. Rev. Physiol., 47: 337-53, 1985.

SORIANO, R.Z. & LOVE, R. Electron microscopic demonstration of acid phosphatase in nucleoli and nucleoplasm. Expl. Cell Res., 65: 467-70, 1971.

SPIEGELMAN, B.M. & GREEN, H. Control of specific protein biosynthesis during the adipose conversion of 3T3 cells. J. Biol. Chem., 255 : 8811-8, 1980.

SPRAY, D.C.; STERN, J.H.; HARRIS, A.L. & BENNETT, M.V.L. Gap junctional conductance: comparison of sensitivities to H and Ca ions. Proc. natl. Acad. Sci., 79: 441-5, 1982.

——— & BENNETT, M.V.L. Physiology and pharmacology of gap junctions. A. Rev. Physiol., 47: 281-303, 1985.

STODDART, R.W. Nuclear glycoconjugates and their relation to malignancy. Biol. Rev., 54: 199-235, 1979.

SUGRUE, S. & HAY, E.D. Response of basal epithelial cell surface and cytoskeleton to solubilized extracellular ma-

trix molecules. J. Cell Biol., 91: 45-54, 1981 a.

———— & HAY, E.D. Effect of fibronectin, laminin and collagen on the differentiation of embryonic corneal epithelium "in vitro". J. Cell Biol., 91: 159 a, 1981 b.

———— & HAY, E.D. Interaction of embryonic corneal epithelium with exogenous collagen, laminin and fibronectin: role of endogenous protein synthesis. Devl. Biol., 92: 97-106, 1982.

TARTAKOFF, A.M. & VASSALLI, P. Lectin-binding sites as markers of Golgi subcompartments. Proximal-to-distal maturation of oligosaccharides. J. Cell Biol., 97: 1243-8, 1983.

TASSIN, J.; JACQUEMIN, E. & COURTOIS, Y. Interaction of bovine epithelial lens (BEL) cells with extracellular matrix (ECM) and eye-derived growth factor (EDGF). I. Effects on short-term adhesiveness and on long-term organization of the culture. Expl. Cell Res., 149: 69-84, 1983.

TEMMINK, J.H.M.; COLLARD, J.G.; SPITS, H. & ROOS, E. A comparative study of four cytochemical detection methods of concanavalin A binding sites on the cell membrane. Expl. Cell Res., 92: 307-22, 1975.

TERRACIO, L.; LUNDGREN, E. & BORG, T.K. Adhesion of cardiac myocytes to extracellular matrix components. J. Cell Biol., 99 : 162 a, 1984.

- THYBERG, J. The microtubular cytoskeleton and the initiation of DNA synthesis. Expl. Cell Res., 155: 1-8, 1984.
- TOMASEK, J.J.; HAY, E.D. & FUJIWARA, K. Collagen modulates cell shape and cytoskeleton of embryonic corneal and fibroblast fibroblasts: distribution of actin, α -actinin and myosin. Devl. Biol., 92: 107-22, 1982.
- TOSELLI, P.; FARIS, B.; OLIVER, P. & FRANZBAU, C. Ultrastructural studies of attachment site formation in aortic smooth muscle cells cultured on collagen - Hydroxyethylmethacrylate Hydrogels. J. Ultrastruct. Res., 86: 252-61, 1984.
- TREJDOSIEWICZ, L.K.; SOUTHGATE, J.; HODGES, G.M. & GOODMAN, S. L. Micro-heterogenous expression of peanut-agglutinin - binding sites in the extracellular matrix of cultured cells. Expl. Cell Res., 156: 153-63, 1985.
- TRONCHIN, G.; POULAIN, D. & BIGUET, J. Localisation ultrastructurale de l'activité phosphatasique acide chez Candida albicans. Biol. Cell, 38: 147-52, 1980.
- URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. Science, 150: 893-9, 1965.
- VENROOIJ, W.J.; SILLEKENS, P.T.G.; EEKELEN, C.A.G. & REINDERS, R.J. The association of mRNA with the cytoskeleton in uninfected and adenovirus-infected human KB cells. Expl. Cell Res., 135: 79-91, 1981.

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

———; MELLO, M.L.S. & ZANARDI, V.A. Alterações nos padrões de basofilia e anisotropia de complexos DNP durante a espermatogênese do rato. Ciênc. Cult., 30: 434-5, 1978.

———. The effect of clupein on anisotropy and basophilia of polytene chromosomes. Histochemistry, 60: 309-16, 1979.

———. Ossificação endocondral e ectópica: aspectos estruturais e ordem molecular. Ciênc. Cult., S. Paulo: 35 : 1799-816, 1983.

——— & WADA, M.L.F. Respostas teciduais aos implantes de matriz óssea desmineralizada. 9^a Reunião Científica de Férias de Verão do Depto. de Biologia Celular. UNICAMP 28/02/85.

VIRTANEN, I.; EKBLOM, P. & LAVRILA, P. Subcellular compartmentalization of saccharide moieties in cultured normal and malignant cells. J. Cell Biol., 85: 429-34, 1980.

VÖLKER, W.; SCHMIDT, A.; BUDDECKE, E.; THEMANN, H. & ROBENEK, H. Binding and degradation of proteoglycans by cultured arterial smooth muscle cells. II. Binding sites of proteoglycans on the cell surface. Eur. J. Cell Biol., 36: 58-65, 1985 a.

- ; THEMANN, H.; ROBENEK, H.; SCHMIDT, A.; BUDDECKE, E.
Proteoglycans on the cell surface and in the extracellular
matrix of cultured arterial smooth muscle cells. Eur. J.
Cell Biol., 36(supl 7): 69, 1985 b.
- WEISS, R.E. & REDDI, A.H. Appearance of fibronectin during
the differentiation of cartilage, bone and bone marrow.
J. Cell Biol., 88: 630-6, 1981.
- WEST, C.M.; LANZA, R.; AUDALOVIC, N.; ROSENBLOOM, J.; LOWE, M.
& HOLTZER, H. Fibronectin alters the phenotypic properties
of cultured chick embryo chondroblasts. Cell, 17: 491-
-501, 1979.
- WICHA, M.S.; LIOTTA, L.A.; GARBISA, S. & KIDWELL, W.R. Base-
ment membrane collagen requirements for attachment and
growth of mammary epithelium. Expl. Cell Res., 124: 181-
-90, 1979.
- WOLFFE, A.P. & TATA, J.R. Primary culture, cellular stress
and differentiated function. Febs Letters, 176 : 8-15 ,
1984.
- WOODS, A.; HOOK, M.; KJELLEN, L.; SMITH, C.G. Relationship
of heparan sulfate proteoglycans to the cytoskeleton and
extracellular matrix of cultured fibroblasts. J. Cell Biol.,
99: 1743-53, 1984.
- WRIGHT, J.A.; LEWIS, W.H. & PARFETT, C.L.J. Somatic cells
genetics: A review of drug resistance, lectin resistance
and gene transfer in mammalian cells in culture. Can. J.

Genet. Cytol., 22: 443-496, 1980.

YAMADA, K.M. Cell surface interactions with extracellular materials. A. Rev. Biochem., 52: 761-99, 1983.

YANG, J. & NANDI, S. Growth of cultured cells using collagen as substrate. Int. Rev. Cytol., 81: 249-86, 1983.

ZALIN, R. The Cell Cycle, Myoblast differentiation and prostaglandin as a developmental signal. Devl. Biol., 71: 274 - 288, 1979.

ZUMBÉ, A.; STAHLI, C. & TRACHSEL, H. Association of a M_r 50.000 cap-binding protein with the cytoskeleton in baby hamster kidney cells. Proc. natl. Acad. Sci., 79: 2927-31, 1982.