



ARNALDO RODRIGUES DOS SANTOS JR.

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SORO FETAL BOVINO E DO DEXAMETASONA NO CRESCIMENTO E INFILTRAÇÃO DE CÉLULAS VERO SOBRE GÉIS DE COLÁGENO TIPO I

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr. e aprovada pela Comissão Julgadora. 28/8/96 Wada

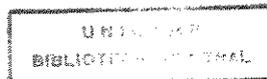
Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular.

ORIENTADORA - PROFA. DRA. MARIA LÚCIA FURLAN, WADA

UNICAMP

1996

TC8707801



CIDADE	BC
CHAMADA:	Unicamp
da	Sa59e
Ex.	
MEDIO BU/	30.943
OC.	28/197
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
RECO	R\$11,00
DATA	02/07/97
* 6PD	

CM-00098945-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Sa59e

Santos Júnior, Arnaldo Rodrigues dos
Efeito da concentração de soro fetal bovino e do
dexametasona no crescimento e infiltração de células
Vero sobre géis de colágeno tipo I / Arnaldo Rodrigues
dos Santos Júnior. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Maria Lúcia Furlan Wada.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia.

1. Glicocorticóides.* 2. Colágeno.* 3. Células -
Diferenciação.* 4. *Soro fetal.* I. Wada, Maria Lúcia Furlan.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

Local e data: Campinas, 28 de agosto de 1996

Banca examinadora:

Titulares:

Profa. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada
(Orientadora)



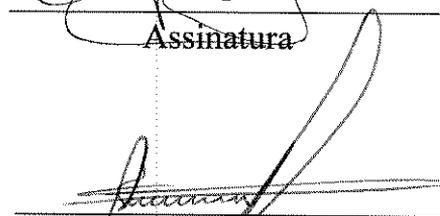
Assinatura

Prof. Dr. Gilberto Goissis



Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel



Assinatura

Suplente:

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Assinatura

Esse trabalho é dedicado a *Arnaldo* e *Nilva*, meus pais, que não mediram esforços e sacrifícios para que eu pudesse chegar ao ponto de concluir esse trabalho.

Dedico também a *Neubi*, por todo o amor, carinho e paciência a mim dedicados, mesmo nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

A professora Dra. Maria Lúcia Furlan Wada pelo carinho, orientação, apoio e também pela grande amizade que firmamos durante a convivência que resultou no desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Dr. Romário de Araujo Mello, do departamento de Ciências Morfológicas do ICB-PUCCAMP, que sempre me estimulou e me fez ver o quanto é importante a pesquisa científica.

Ao professor Dr. Gilberto Goisses, do IQSC-USP, pelas muitas sugestões e esclarecimentos, todos muito pertinentes, feitos durante a avaliação prévia desse trabalho.

Aos professores do departamento de Biologia Celular Dr. Edson Rosa Pimentel e Dr. Hernandes Faustino de Carvalho, pela análise prévia desse manuscrito, e por muitas outras ocasiões onde me ajudaram com explicações, sugestões ou mesmo críticas.

Ao Instituto de Química pela utilização do microscópio eletrônico de varredura.

A profa. Dra. Mary Anne Heide Dolder, pelo precioso auxílio durante as análises que envolveram microscopia eletrônica de varredura. Agradeço também pela revisão de meu *abstract*.

A professora Miralva Aparecida de Jesus Silva, do departameto de Ciências Morfológicas do ICB-PUCCAMP, que me fez ver, mais do que nunca, o quanto é gratificante a função do professor.

A Selma Candelária Genari, pelos inúmeras vezes que me ofereceu ajuda, me esclareceu dúvidas e também pelas muitas idéias que trocamos sobre diversas pesquisas, nossos e de outros autores.

Aos demais professores do departamento de Biologia Celular, que em um momento ou outro me ofereceram seu precioso auxílio.

Ao amigos de pós-graduação: Alexandre, Marcelo, Marco, Nazário, Paula, Selma, Luiz Fernando, Luciana, Fernando, Estela e Maurício. Agradeço pelas muitas risadas que demos durante o tempo em que estivemos juntos.

Um agradecimento especial pela constante ajuda, paciência e companheirismo a mim oferecidas por Cidinha, D. Irma, Klélia, Liliam, e Sidney, todos funcionários do departamento de Biologia Celular.

Ao CNPq pelo apoio financeiro utilizado durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

E finalmente a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a concluir mais essa etapa na minha vida.

Abreviaturas usadas

AT - azul de toluidina

COL - colágeno

CHO - linhagem derivada de células de ovário de hamster

CV - cresil violeta

DAB - diaminobenzidina

DEX- dexametasona

E - resíduo de ácido glutâmico

EDTA - ácido etileno diamino tetracético

EGF - fator de crescimento epitelial

FGF - fator de crescimento dos fibroblastos

FN - fibronectina

H - resíduo de histidina

HE - hematoxilina e eosina

LN - laminina

MCF-7: linhagem estabelecida de células tumorais de epitélio de glândula mamária

MDCK - linhagem estabelecida derivada de células de rim de cachorro

MEC - matriz extracelular

MEM - meio mínimo de Eagle

MEV - microscopia eletrônica de varredura

Mr - massa molecular

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo de tetrazolium

PBS - tampão fosfato salino

RPM - rotações por minuto.

SFB - soro fetal bovino

SPARC - proteína secretada ácida rica em cisteína

TGF- β - fator de crescimento transformado β

TIMP - inibidores teciduais para metaloproteases

TPA - 13-acetato-12-o-tetra-decanoilforbol

UWOV - linhagem estabelecida de células de tumores de ovário

v/v - volume por volume

XP - xilidina ponceau

3D - tridimensional

α_2 -M - α_2 -macroglobulina

Resumo

Células Vero foram cultivadas sobre géis 3D de colágeno tipo I ou em lamínulas de vidro por 48h com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após este tempo de cultivo as células passaram a ser mantidas em meio sem SFB, com 10 % de SFB, com 10 % de SFB mais dexametasona (DEX) e com 20 % de SFB. Amostras foram fixadas após 48h, 120h e 240h de cultivo. Os géis foram incluídos em paraplast e cortados com 7µm de espessura. As amostras foram coradas com hematoxilina-eosina (HE), cresil violeta (CV), azul de toluidina (AT) e xylydine ponceau (XP). Foi realizado também imunocitoquímica para colágeno IV (COL IV) e para fibronectina (FN). Com as células cultivadas sobre lamínulas foram obtidos os índices mitóticos e as curvas de crescimento da cultura. Células cultivadas em colágeno por 24h, foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Um ensaio em microplacas para a adesão celular com 24h de cultivo também foi realizado. As células que foram cultivadas sobre lamínulas e coradas com CV, em todos os casos analisados, mostravam morfologia irregular e com alguns prolongamentos, exceto nas regiões confluentes onde encontramos apenas células com formas poliédricas. Encontramos também a formação de grumos celulares nas amostras tratadas com DEX. Material bem corado com XP foi evidenciado tanto com 120h quanto com 240h de cultivo. Os grumos celulares nas amostras tratadas com DEX foram os pontos onde encontramos coloração mais intensa. O AT mostrou nas primeiras 48h células com citoplasma, núcleo e nucléolo metacromáticos. Com 120h de cultivo foram detectadas células com núcleos ortocromáticos, nucléolo basófilos e citoplasma levemente metacromático em quase todas as amostras, exceto nas tratadas com DEX, onde encontramos citoplasma intensamente metacromático. Com 240h de cultura encontramos células com citoplasma, núcleo e nucléolos metacromáticos (S/SFB e 10% SFB) e células com núcleos ortocromáticos, nucléolos e citoplasma metacromáticos (10% SFB+DEX e com 20% SFB). A imunocitoquímica mostrou a presença de COL IV nas amostras mantidas S/SFB, com 10% SFB e com 20% SFB, mas não nas células cultivadas com DEX. Encontramos a presença de FN em todos os casos, porém foi encontrado um arranjo mais homogêneo nas células que cresceram na presença de 10% SFB+DEX e 20% SFB. Dados citoquímicos e imunocitoquímicos mostraram que o DEX interfere no padrão de crescimento de células sobre lamínulas. A MEV mostrou um grande espalhamento celular e deposição de material fibrilar, cuja deposição é estimulada pela variação da concentração dos componentes do SFB. O ensaio com microplacas mostrou que a adesão das

células ao substrato também é estimulada pelo SFB. A análise morfológica feita com HE mostrou nos géis nas primeiras 48h uma monocamada de células achatadas, embora em alguns pontos as mesmas mostravam-se com duas ou três camadas de células arredondadas. Ambos os casos mostraram-se bem evidenciados pelo XP e as células apresentavam também metacromasia quando corado com AT. Com 120h e 240h em meio S/SFB ou com 10% de SFB, coradas com HE, foram observadas células formando um estrato com várias camadas arredondadas além de vários pontos de infiltração para o interior do substrato. Estas células apresentavam núcleos e citoplasma metacromáticos, quando corados com AT. Também encontramos granulações metacromáticas ao redor das células no interior do gel. Nesses experimentos o XP mostrou células bem coradas tanto no citoplasma como no núcleo. O gel também foi levemente corado pelo XP. As granulações presentes na matriz colagênica junto as células infiltradas também foram coradas pelo XP. A análise imunocitoquímica mostrou deposição de FN mas não de COL IV. Concluímos que nessas condições experimentais, S/SFB ou com 10% de SFB, as células cultivadas nos géis de colágeno, organizam uma estrutura semelhante a um tecido conjuntivo frouxo. Por outro lado, a HE mostrou que as células que foram tratadas com DEX (um inibidor da síntese de colagenases) e com 20% de SFB (que contém α_2 -macroglobulina, um inibidor de atuação de colagenases) não invadiram a matriz colagênica, permanecendo com muitas camadas celulares, com forma arredondada na camada basal e achatada nas superiores. O AT mostrou células com núcleos e citoplasma metacromáticos, além de evidenciar uma camada acelular entre as células e o substrato. Todas as camadas celulares também foram bem coradas pelo XP. A imunocitoquímica mostrou que quando a infiltração foi bloqueada as células não produziram FN mas sim uma camada de COL IV. Os dados citoquímicos e imunocitoquímicos nos demonstraram que quando usamos inibidores de colagenases, as células Vero formam um tecido com características epiteliais e produzem uma estrutura semelhante à membrana basal.

Abstract

The Vero cells were cultured on a collagen I gel or a glass coverslip with 10% fetal calf serum (FCS) for 48hs. After this incubation time, samples were cultured without FCS, or with 10% FCS, 10% FCS plus dexamethasone (DEX) or 20% of FCS. Samples were harvested after 48hs, 120hs, and 240hs and fixed. The gels were embedded in paraplast and 7 μ m thick sections were obtained. The samples were stained with hematoxylin-eosin (HE), cresil violet (CV), toluidine blue (TB) and xylydine ponceau (XP). Immunocytochemical tests were carried out for collagen IV (COL IV) and fibronectin (FN). The mitotic index and the growth curve were obtained for cells cultured on coverslip. The cells cultured on collagen gels for 24hs were studied with scanning electron microscopy (SEM). An assay for cellular adhesion during 24hs was also performed on 96 wells microplate. The cells cultured on coverslips, stained by CV, showed an irregular morphology with cellular processes, and a poliedric form on the confluent areas in all the cells studied. We also found the formation of many cellular aggregates in the samples treated with DEX. All samples were stained with XP, after 120hs or 240hs of culture. The cellular aggregates induced by DEX were stained by XP. The TB staining showed cells with metachromatic cytoplasm, nuclei and nucleoli in the first 48hs. With 120hs of culture we found cells with ortochromatic nuclei and light metachromasy in nucleoli and cytoplasm. With 240hs we found cells with metachromatic nuclei, nucleoli and cytoplasm (without FCS and with 10% FCS) and cells with ortochromatic nuclei, metachromatic nucleoli and cytoplasm (with 10% FCS + DEX or 20% FCS). The immunocytochemical experiment showed that COL IV was present in the samples cultured without FCS or with 10% FCS and 20% FCS, but it was not found in the cells cultured with DEX. FN was present in all samples but in the cells cultured with 10% FCS + DEX or 20% FCS we found a more homogeneous arrangement. Cytochemical and immunocytochemical data showed that DEX modifies the growth of Vero cells cultured on a coverslip. The SEM showed that cellular spreading and the synthesis of fibrillar material was stimulated by FCS. The microplate assay showed that cellular adhesion to the substratum is also stimulated by changes in concentration of the serum component. The morphological study of cells cultured on a collagen substratum was made with HE. In the first 48hs of culture we found a monolayer of flattened cells on the collagen substratum. We observed also the same cells with a round morphology growing in 2-3 layers. These cellular layers were stained with XP and showed metachromatic cytoplasm when stained with TB. Cells

cultured during 120hs or 240hs without FCS or with 10% of FCS formed many layers of rounded cells capable of invading the collagen substratum. These cells showed a metachromatic cytoplasm and basophilic nuclei and nucleoli when stained with TB. We could see some metachromatic granulations surrounding the cells in the collagen gel. In these experiments XP staining showed cells with stained cytoplasm and nuclei. The collagen gel was also stained with XP. The granulations present in the matrix surrounding infiltrated cells stained with XP. The immunocytochemical tests showed the production of FN but not COL IV. We concluded that in these cases, the cells form a loose connective tissue like structure. On the other hand, cells cultured with 10% FCS + DEX, a collagenase synthesis inhibitor, or with 20% FCS, which contains α_2 -macroglobulin, a collagenase activity inhibitor, did not invade the collagen matrix and formed a multiple cell layers, where round cells occur on the basal layers and flattened cells on higher layers. All cells of these extracts were stained with XP. TB staining showed cells with cytoplasmatic metachromasy and basophilic nuclei and nucleoli. We could see also an acellular layer stained with TB between the cell and the substratum and with a immunocytochemical method we identified in the same areas a COL IV rich region. FN was not found. These cytochemical and immunocytochemical data showed that when we use collagenase inhibitors the Vero cells form a epithelial like tissue and produce a structure similar to a basement membrane.

Índice

Agradecimentos	i
Abreviaturas usadas	iii
Resumo	v
Abstract	vii
I. Introdução	1
I.1. A importância da matriz extracelular na diferenciação	2
I.1.1. A influência do colágeno	5
I.2. A participação das metaloproteases	10
I.2.1. As metaloproteases na invasão tumoral	13
I.3. Objetivos	14
II. Material e métodos	16
II.1. Manutenção das células em cultura	17
II.2. Inibidores de collagenases	17
II.3. Preparação do gel 3D de colágeno tipo I	18
II.4. Cultivo das células sobre o gel 3D de colágeno	19
II.5. Fixação, inclusão e corte de material cultivado sobre o gel de colágeno	19
II.6. Cultivo de células sobre lamínulas	20
II.6.1. Para análise citoquímica e imunocitoquímica	20
II.6.2. Para cálculo de índice mitótico	20
II.6.3. Para construção da curva de crescimento	21
II.7. Análise morfológica e citoquímica	21
II.8. Imunocitoquímica	22
II.9. Microscopia eletrônica de varredura	23

II.10. Adesão celular	23
II.11. Monitoramento das culturas celulares, análise de lâminas e preparo de micrografias	24
III.Resultados	25
III.1. Avaliação do crescimento celular	26
III.2. Observações morfológicas	27
III.3. Análise citoquímica	31
III.3.1. Coloração com azul de toluidina pH 4,0	31
III.3.2. Coloração com xylydine ponceau pH 2,5	34
III.4. Imunocitoquímica	36
III.4.1. Para colágeno IV	36
III.4.2. Para fibronectina	38
III.5. Índice mitótico	76
III.6. Curva de crescimento	76
III.7. Crescimento das células em gel de colágeno tipo I	77
III.8. Adesão celular	78
III.9. Microscopia eletrônica de varredura	79
IV Discussão	89
V. Conclusões	123
VI. Referências bibliográficas	125

I. Introdução

Durante o desenvolvimento de embriões dos vertebrados, um único ovo fertilizado dá origem a um organismo multicelular com cerca de 200 tipos celulares diferentes. A transição do ovo para um organismo maduro envolve três processos: divisão celular, para o aumento do número de células; morfogênese, onde ocorre a organização das células em regiões espaciais precisas e a diferenciação, processo pelo qual novos tipos celulares são formados (WATT, 1991). No início, acreditava-se que, após a célula ter se diferenciado, o estado fenotípico demonstrado por ela era irreversível. Nas últimas décadas contudo, numerosas evidências vem demonstrando que a diferenciação requer uma contínua e ativa regulação, em vista do vasto número de genes envolvidos no desenvolvimento de um organismo multicelular (BLAUL, 1992).

I.1. A importância da matriz extracelular na diferenciação

Nos últimos anos, inúmeros trabalhos vem mostrando a importância da matriz extracelular (MEC) no processo de diferenciação celular e embriogênese (TRELSTAD, 1984; HAY, 1993; LIN & BISSEL, 1993; HATA, 1996). A matriz extracelular é uma intrincada rede de macromoléculas composta de fibras proteicas, proteoglicanos, proteínas não colagênicas e ácido hialurônico, que são secretadas pela célula e formam uma malha que dá ao tecido suas propriedades mecânicas e fisiológicas, as quais variam de acordo com a presença e concentração de cada componente (HAY, 1981; PIEZ & REDDI, 1984; ALBERTS et al., 1994). Inicialmente vista como uma estrutura meramente de suporte, hoje sabe-se que ela influencia, e muito, o comportamento celular. Como a diferenciação celular, em última análise, é o resultado da ativação e/ou repressão diferencial de genes,

(BLAUL, 1992), então a MEC, de alguma forma ainda não totalmente esclarecida, pode ativar e/ou reprimir esses genes.

O microambiente que rodeia as células apresenta uma grande variação de um tecido para outro (HAY, 1981; PIEZ & REDDI, 1984), mas como esse microambiente estaria influenciando a atividade nuclear da célula ainda não está totalmente esclarecido. Uma possível via de acesso de sinais do meio extracelular para o núcleo é o citoesqueleto. O contato da célula com a MEC é capaz de reorganizar o citoesqueleto a partir da zona de contato focal, que é a superfície de contato entre células em cultura com o substrato¹ (ALBERTS et al., 1994). O contato dos receptores da superfície celular com diferentes proteínas da matriz, faz com que as células mantidas em cultura alterem sua morfologia, adesão e proliferação de forma diferenciada. Muitas das proteínas da MEC, tais como a fibronectina, a condronectina e a osteonectina, são comumente chamadas de *fatores de adesão*, não apenas devido a sua grande importância para o comportamento de células em cultura, mas também pelo fato destas proteínas serem encontradas no soro fetal, um componente de grande importância usado rotineiramente em cultura celular (BARNES, 1984).

Vários trabalhos mostram que a MEC modula a ancoragem e a migração celular, bem como a síntese, de novos componentes de matriz, de receptores para esses componentes e de outras moléculas de adesão celular (LIN & BISSEL, 1993; JULIANO & HASKILL, 1993; HATA, 1996). Estes trabalhos propõem modelos de resposta celular a partir do contato com a MEC. Para LIN & BISSEL (1993) o processo inicia-se com a adesão celular às moléculas da MEC através de receptores específicos presentes na membrana plasmática. Essa ligação receptor-

¹ O termo substrato será utilizado nesse trabalho como superfície de apoio para o crescimento celular *in vitro*.

MEC desencadeia mudanças nos domínios citoplasmáticos desses receptores, causando uma associação apropriada das proteínas de contato focal, induzindo a fosforilação de outros componentes intracelulares. Essas mudanças culminam no rearranjo do citoesqueleto, o qual está ligado ao núcleo, e desencadeia uma interação diferencial da cromatina com a matriz nuclear ou com diferentes fatores de transcrição (LIN & BISSEL, 1993). Modelo similar, porém mais completo é apresentado por HATA (1996). Esse autor mostra como a interação dos componentes de MEC com receptores de membrana plasmática, a ativação de quinases de adesão focal que por sua vez formam uma cascata de fosforilações que culminam em alterações dos filamentos de actina, a participação de produtos de oncogênes e os níveis citoplasmáticos de Ca^{+2} podem participar do processo de internalização de sinais do meio extracelular para o núcleo, através de vias de sinalização autônomas ou integradas (HATA, 1996).

Existem hoje vários relatos da participação de proteoglicanos na diferenciação celular. Por exemplo, o sindecam, um proteoglicano rico em cadeias de heparam sulfato, mostrou-se necessário para que as células epiteliais demonstrem o seu fenótipo característico (RAPRAEGER, 1993). Um proteoglicano rico em heparam sulfato também é necessário para a diferenciação das células mesodérmicas nos primeiros estágios embrionários de *Xenopus* (ITOH & SOKOL, 1994), além de outras numerosas evidências da participação de glicosaminoglicanos na diferenciação celular e durante a morfogênese (TOOLE, 1981). Embora já se saiba da grande importância dos proteoglicanos e do ácido hialurônico, na diferenciação celular, é o colágeno o componente da MEC mais intensamente estudado.

O colágeno é o componente mais abundante da MEC. São conhecidos hoje dezoito tipos diferentes dessa proteína, existindo evidências da existência de pelo menos mais um tipo (MAYNE & BIRMINGHAM, 1993). O colágeno é inicialmente detectado nos embriões de vertebrados por volta do estágio de gástrula, exatamente quando terminam as clivagens e se inicia a diferenciação dos três folhetos embrionários, o ectoderma, o mesoderma e o endoderma, sendo que o primeiro colágeno fibrilar é produzido pela notocorda e permanece ao redor da mesma (HAY, 1981).

I.1.1. A influência do colágeno

YANG & NANDI (1983) mostraram, em trabalho de revisão, a utilização do colágeno como substrato para crescimento celular desde a sua primeira utilização, em 1932, até a década de oitenta. Outras evidências *in vitro* da influência do colágeno na diferenciação celular foram dadas por células epiteliais de córnea quando cultivadas em substratos colagênicos e não colagênicos. A superfície basal do epitélio em contato com o colágeno foi alterada com apenas seis horas de cultivo, e com 24h a produção de um novo estroma foi detectada morfológicamente. Também pôde ser determinado bioquimicamente que as células produzem mais colágeno, se cultivadas sobre géis flutuantes de colágeno do que em substratos não colagênicos (HAY, 1984). Com exceção de linfócitos, reticulócitos e outras células da medula vermelha dos ossos, células essas que aliás não dependem de ancoragem para o seu crescimento, a maioria das células em cultura sintetiza colágeno. Além disso, tem sido mostrado que células em cultura podem realizar todas as reações necessárias para formar as ligações cruzadas da

fibra colagênica (KLEINMAN et al., 1981). Apesar disso a biossíntese de colágeno em células cultivadas não parece ser um processo muito eficiente pois, no meio de cultura condicionado é observado cerca de 90% do procolágeno formado (KLEINMAN et al., 1981). Células musculares lisas de artéria de coelho quando cultivadas em colágeno tipo I, também apresentam síntese e secreção aumentadas, além de terem o seu fenótipo de célula contráctil alterado drasticamente para o de uma célula secretora (YAMOTO et al., 1993).

O colágeno, quando comparado com outros substratos tais como plástico ou vidro, tem se mostrado um indutor potente não apenas da diferenciação mas também da adesão e da capacidade de migração de muitos tipos celulares mantidos em cultura (KLEINMAN et al., 1981). Em muitas destas células, incluindo fibroblastos, mioblastos, hepatócitos, condrócitos e certas células epiteliais, a interação entre as células e substratos colagênicos assim como a superfícies de vidro ou plástico de placas e frascos de cultura, pode ocorrer de forma indireta, com a participação de glicoproteínas extracelulares. Dentre elas a mais estudada é a fibronectina, embora muitas outras, tais como a condronectina e a laminina, desempenhem funções semelhantes (KLEINMAN et al., 1981). No que diz respeito a adesão celular ao colágeno, parece que a célula responde diferentemente ao colágeno nativo e ao desnaturado. Isso pode ser verificado pois se cultivadas sobre colágeno nativo as células aderem-se muito bem a ele, tanto na presença como na ausência de soro fetal bovino (SFB), enquanto que no caso do colágeno desnaturado a presença de SFB é fundamental para a adesão celular ao substrato (SCHOR & COURT, 1979). O porquê de tal comportamento ainda necessita ser esclarecido.

Quando as células são cultivadas em géis tridimensionais (3D) de colágeno, após algum tempo de cultura, elas são capazes de contrair o mesmo, isso é, as células podem diminuir o diâmetro e/ou a altura iniciais do gel colagênico através da reorganização das fibras deste (BELL et al., 1979; ALLEN & SCHOR, 1983; GUIDRY & GRINNELL, 1985; REED et al., 1994). Esse fenômeno até hoje não é bem compreendido, mas sabe-se que essa contração do gel de colágeno está intimamente relacionada à atividade funcional do citoesqueleto das células que são cultivadas sobre ele (BELL et al., 1979). Sabe-se também que a contração é estimulada pelo soro fetal bovino e/ou por produtos secretados pela célula na presença de soro (GUIDRY & GRINNELL, 1985) e independe da idade do doador do qual as células foram retiradas, pelo menos em resposta ao TGF- β (REED et al., 1994).

Para HAY (1993), vários tecidos embrionários como a notocorda, brotos de ectoderma e epitélio da córnea, deixam a morfologia epitelial e assumem forma de células semelhantes às do mesênquima e são capazes de invadir a matriz, quando são cultivados em gel 3D de colágeno. Essa propriedade porém, não é exclusiva de células embrionárias, pois comportamento semelhante foi observado em células retiradas de córnea humana de adulto (GREENBURG & HAY, 1982). Essas observações chamaram a atenção para a possibilidade do estudo *in vitro* de um fenômeno que ocorre durante o desenvolvimento embrionário: a transformação epitélio-mesenquimal. Uma das características dos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário é a dicotomia da organização tecidual, onde as células podem ser agrupadas em duas classes: a epitelial e a mesenquimal (HAY, 1981). As células epiteliais são caracterizadas pela presença de junções celulares, formando assim camadas celulares contínuas, com polaridade ápico-basal, sempre

permanecendo apoiadas a uma MEC na forma de uma lâmina basal, exceto quando se compõe como estratos celulares. Nesse caso apenas a camada de células basais interage com a lâmina basal. Essas células muitas vezes apresentam a sua face apical contendo especializações, como microvilosidades e/ou um revestimento de glicoproteínas. As células epiteliais também não invadem a matriz extracelular quando mantidas em cultura. Já as células mesenquimais apresentam morfologia semelhante a de fibroblastos, ou seja, alongada e com prolongamentos celulares. Apresentam também retículo endoplasmático abundante e, ao contrário das células epiteliais, são capazes de invadir a matriz extracelular *in vitro* (HAY, 1981,1993).

Para HAY (1990), em géis 3D de colágeno tipo I, as células epiteliais apresentam receptores em sua superfície basal e estes fazem contato com a MEC. Já as células mesenquimais fazem contato com a matriz através dos mesmos receptores, os quais rodeiam toda a sua superfície celular. Esses receptores são conectados ao citoesqueleto através de um cortex de actina que permanece apenas na superfície basal nas células epiteliais e por toda a extensão nas células mesenquimais. É justamente este cortex de actina, mais os receptores para MEC que promovem a migração das células dentro de um gel 3D de colágeno (HAY, 1990). A MEC pode induzir a transformação epitélio-mesenquimal. Isso pôde ser demonstrado cultivando somitos de ave em gel 3D de colágeno tipo I, onde os somitos deram origem a células mesenquimais, que por sua vez originaram o tecido conjuntivo e muscular (HAY, 1993). Experimento semelhante foi feito com a notocorda, extraída pelo mesmo método enzimático usado no isolamento dos somitos. A notocorda quando cultivada sobre géis 3D de colágeno, permaneceu como um epitélio estável em suas características, com luz central, células cubóides com polaridade ápico-basal, junções celulares, moléculas de adesão celular e com

uma membrana basal. Se no entanto sobre esse mesmo gel 3D de colágeno, a notocorda for cultivada sem essa membrana basal, as células presentes abandonam a programação epitelial, se transformam em células com características mesenquimais e morfologia semelhante a de fibroblastos (HAY, 1993). Na verdade hoje há pouca ou mesmo nenhuma dúvida de que a MEC dos embriões de vertebrados é um forte ativador da diferenciação epitelial, agindo também na manutenção da mesma (HAY, 1993).

Outras células podem ser induzidas à transformação epitélio-mesenquimal além das células embrionárias, mesmo epitélios altamente diferenciados, como aquele da glândula tireóide. GREENBURG & HAY (1988) demonstraram que as células do epitélio da glândula tireóide, quando cultivadas no interior de géis 3D de colágeno tipo I, sofreram alterações na composição do seu citoesqueleto, inicialmente constituído de queratina, característicos de células epiteliais, para um composto de vimentina, típico de células fibroblastóides. Além disso, essas células diminuíram a expressão de tireoglobulina, uma proteína marcadora da glândula tireóide. No entanto isso não ocorreu quando as mesmas células do epitélio da tireóide foram cultivadas sobre o mesmo gel 3D de colágeno. Neste caso, teve-se inibida a transformação epitélio-mesenquimal e houve a manutenção das características diferenciadas das células da glândula tireóide (GREENBURG & HAY, 1988).

Alterações fenotípicas também foram conseguidas com o cultivo de células Vero, em esponjas de colágeno tipo I liofilizado (WADA & VIDAL, 1991). Foi observado que estas células sofreram alterações morfológicas, passando de uma forma poligonal para uma alongada, com vários prolongamentos. Foi observado também que as células alteravam a matriz colagênica na qual eram cultivadas,

provavelmente através da secreção de colagenases (WADA & VIDAL, 1991). Esses mesmos autores descreveram que as células Vero crescem e formam arranjos tridimensionais que, segundo eles, demonstraria a tendência das células à reconstituição do tecido do qual se originaram, apesar destas células, como uma linhagem estabelecida, terem sido mantidas e manipuladas em cultura por mais de vinte anos.

Essas mesmas células foram cultivadas sobre um gel 3D de colágeno por MARIA (1994). Foi observado que, no primeiro dia de cultivo, essas células apresentavam-se como uma monocamada sobre o substrato. Já com 5 dias de cultivo, as células de aspecto fibroblastóide, mostravam pontos de estratificação devido à proliferação celular, e pontos de migração para o interior do gel. A mesma autora observou ainda que com 10 dias de cultura, as células que se encontravam na superfície do gel continuavam demonstrando um aspecto fibroblastóide, enquanto que as células que se infiltraram para o interior do mesmo assumiam formas arredondadas, citoplasma vacuolizado e núcleos irregulares. MARIA (1994) mostrou que a migração celular para o interior do gel aumentava com o tempo de cultivo e que as fibras colagênicas assumiam uma orientação diferenciada em relação a orientação das fibras do gel original.

I.2. A participação das metaloproteases.

MAUCH e colaboradores (1989) relataram que fibroblastos cultivados em contato com substrato de colágeno passam a produzir colagenases. GUIDRY & GRINNELL (1985) mostraram proteólise de colágeno na contração do gel, muito embora a degradação encontrada fosse pequena. WADA & VIDAL (1991)

sugeriram que as células Vero estariam alterando o substrato colagênico através de colagenases e MARIA (1994) também sugeriu a produção de colagenases na migração das células Vero para o interior de um gel de colágeno tipo I. As colagenases também estão relacionadas com a transformação epitélio-mesenquimal (BIRCHMEIR & BIRCHMEIR, 1993), com a invasão tumoral e com a formação de metástases (LIOTTA et al., 1983), e assim como as demais metaloproteases, também participam no reparo e remodelamento tecidual, migração de leucócitos e macrófagos, implantação trofoblástica, involução uterina pós-parto, implantação do blastocisto e na própria embriogênese (WOESSNER Jr, 1991; KLEINER Jr & STETLER-STEVENSON, 1993).

As colagenases pertencem a família das metaloproteases da matriz extracelular, um grupo de metaloenzimas que apresentam átomos de Zn^{+2} em seu sítio ativo (WOESSNER Jr, 1991; KLEINER Jr & STETLER-STEVENSON, 1993), sendo que em todos os membros dessa família, é encontrada a sequência HEXXH no sítio ativo, e o resíduo de ácido glutâmico (E) age como principal aminoácido do sítio catalítico da enzima (WOESSNER Jr, 1994; KRANE, 1994). Ainda segundo WOESSNER Jr (1994) existem hoje relacionadas os seguintes membros desta família: Colagenase, gelatinases A, estromelisina 1, matrilisina, colagenase dos polimorfonucleares, gelatinases B, estromelisina 2, estromelisina 3 e elastase dos macrófagos. Essas enzimas têm sido isoladas de diversos tipos celulares mantidos em cultura, tais como fibroblastos (GOLDBERG et al., 1986), células do epitélio bronquial humano (COLLIER et al., 1988), células tumorais (KARELINA et al., 1993; SATO, 1994), neutrófilos (HIBBS et al., 1985) e células satélites de músculo esquelético humano (GUÉRIN & HOLLAND, 1995).

Vários fatores externos podem exercer influência sobre a ação das colagenases, assim como nas demais metaloproteases. O colágeno e a concanavalina A, ambos agindo através de interações não totalmente esclarecidas com a superfície celular, parecem estimular a liberação de colagenases. Outros agentes químicos como o AMPc, a colchicina e ésteres de forbol, como o TPA (13-acetato-12-o-tetra-decanoilforbol), também mostraram-se capazes de estimular a secreção de colagenases. Efeito semelhante pôde ser obtido com o uso da radiação ultra-violeta, embora não se saiba por qual mecanismo. Citocinas e fatores de crescimento, entre eles o EGF, o FGF, o TGF- β , os interferons α , β , γ , e algumas interleucinas também mostraram-se eficazes em estimular a síntese de metaloproteases em geral, inclusive as colagenases. Dentre os fatores que podem inibir ou reprimir a ação das metaloproteases estão o ácido retinóico, os hormônios esteróides como o estrógenos, a progesterona além de glicocorticóides como o cortisol, os TIMPs e a α_2 -macroglobulina (WOESSNER Jr, 1991).

Os TIMPs, inibidores teciduais de metaloproteases, são proteínas secretadas pelas células que apresentam a propriedade de inibir a atividade das metaloproteases. O mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não está bem estabelecido mas já se conhecem três formas destes inibidores, os TIMPs 1, 2 e 3, que apresentam em comum doze resíduos de cisteína em seis pontes dissulfeto em sua composição (KLEINER Jr & STETLER-STEVENSON, 1993). A α_2 -macroglobulina é uma proteína sérica que exerce cerca de 95% da atividade anticolagenolítica no soro mas, devido ao seu grande tamanho e alto peso molecular, ela não se difunde em condições normais para fora do espaço vascular exercendo assim sua atividade apenas em nível plasmático (LIOTTA et al., 1983).

I.2.1. As metaloproteases na invasão tumoral

Como foi dito anteriormente, a MEC, como uma estrutura tridimensional definida e organizada, envolve, preenche e separa os compartimentos teciduais, mediando as interações celulares e influenciando o próprio fenótipo celular (HAY, 1981; PIEZ & REDDI, 1984). Na verdade a MEC apresenta densidade tal que é capaz de excluir proteínas de peso molecular maior que 100.000, agindo como um filtro molecular (PEARCE & LAURENT, 1977). Desta forma a MEC não apresenta espaços para a migração celular e esta só ocorre em situações específicas como processos inflamatórios, lesões e/ou remodelamento tecidual, além de neoplasias (LIOTTA, 1986). Nessas condições a produção de metaloproteases é induzida (WOESSNER Jr, 1991; KLEINER Jr & STETLER-STEVENSON, 1993). Podemos então concluir que a migração celular *in vivo* através da MEC, só ocorre através da degradação, ainda que parcial, dos componentes da matriz.

A migração celular através da MEC, pode ser observada na invasão tumoral e na formação de metástases. Em revisão recente STETLER-STEVENSON e colaboradores (1993) mostraram a íntima relação entre as metaloproteases e a invasão tumoral. Existe hoje uma teoria de três passos que poderia explicar como esta a invasão ocorre: (1) A célula se liga e interage com a MEC por meio de seus receptores presentes na membrana plasmática; (2) a célula secreta enzimas, as metaloproteases, que promovem a degradação dos componentes da MEC e (3) finalmente a célula locomove-se para as regiões da matriz que foram modificadas por ela (LIOTTA et al., 1983; LIOTTA, 1986; STETLER-STEVENSON et al., 1993).

Uma forma dos vertebrados protegerem-se da ação descontrolada das metaloproteases, em doenças como artrites e no próprio câncer, nos diversos compartimentos teciduais, é a presença de inibidores naturais para essas enzimas. Dentre eles destacam-se as TIMPs e a α_2 -macroglobulina (WOESSNER Jr, 1991) já mencionados anteriormente. Existem relatos de que inibidores naturais de collagenases podem bloquear a invasão tumoral *in vitro* e *in vivo* (BROWN, 1994; DE CLERCK et al., 1994; RAY & STETLER-STEVENSON, 1994). Todavia, devido ao baixo número de trabalhos publicados nessa área até essa data, esse campo de estudo ainda precisa ser melhor explorado.

I.3. Objetivos

Se as células Vero são mesmo capazes de produzir collagenases para modificar substratos colagênicos, como sugerem WADA & VIDAL (1991), é plausível que o mesmo fenômeno ocorra durante a infiltração de células Vero em géis 3D de colágeno, como descrito por MARIA (1994) mesmo embora a desidade e o espaçamento das fibras de colágeno em um gel 3D possam ser diferentes do encontrado *in vivo*. Essa capacidade invasiva apresentada pelas células cultivadas em géis 3D de colágeno pode ser utilizada no futuro no aperfeiçoamento de um método de estudo *in vitro* não apenas da diferenciação celular induzida pelo substrato, mas também de um modelo experimental para o estudo da invasão tumoral.

Dessa forma o objetivo geral desse trabalho é determinar se a infiltração das células Vero em gel 3D de colágeno tipo I se deve a ação de collagenases, ou a um rearranjo das fibras colagênicas do gel, ou ambos. Para atingirmos este objetivo

utilizamos inibidores de collagenases presentes no próprio soro fetal bovino, como a α_2 -macroglobulina, ou adicionado no meio de cultura, como a dexametasona.

Os objetivos específicos são:

- 1) Comparar os efeitos destes dois tipos de inibidores no processo de infiltração das células Vero no gel de colágeno tipo I.
- 2) Verificar os possíveis efeitos destas substâncias em células cultivadas sobre lamínulas e sobre o gel de colágeno através de análise morfológica, citoquímica e imunocitoquímica.
- 3) Verificar se a presença destes inibidores afeta a adesão e o crescimento das células cultivadas em lamínulas e sobre gel de colágeno.

II. Material e métodos

II.1. Manutenção das células em cultura

Neste trabalho foram usadas células Vero, uma linhagem celular estabelecida a partir de células de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) que foram adquiridas do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, na passagem número 206 e mantidas em meio Ham F-10 (Nutricell) com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) a 37°C. As trocas de meio foram efetuadas sempre que houve acidificação do mesmo, acidificação essa evidenciado por indicadores de pH. Os repiques foram efetuados sempre que a confluência do tapete celular fosse atingida.

II.2. Inibidores de collagenases

Foram escolhidos dois inibidores de collagenases. O primeiro foi α_2 -macroglobulina (α_2 -M), uma proteína de peso molecular elevado, e conhecida como tendo atividade inibidora de várias proteases, séricas ou não, incluindo as metaloproteases. A α_2 -M, ou proteínas homólogas a ela, encontram-se presentes no soro de vários vertebrados, entre eles o homem (BARRET, 1981; NAGASE et al., 1994). Nos humanos a concentração normal da α_2 -M no plasma é de 10-100 $\mu\text{g/ml}$. Desta forma em um dos experimentos, dobrou-se a concentração de SFB usado rotineiramente no meio de cultura, e conseqüentemente a concentração do inibidor presente nele; e no outro lote retirou-se a suplementação de SFB completamente, retirando-se assim a α_2 -macroglobulina. Em cada caso foi observado o comportamento das células no gel e sobre lamínulas tendo como controle as células mantidas com 10% de SFB. O segundo inibidor escolhido foi o

dexametasona (9α -fluoro- 16α -metil-prednisolona), um glicocorticóide sintético análogo ao cortisol - hormônio produzido na glândula supra-renal, também chamado de hidrocortisona (JONAT et al., 1990; BERNE & LEVY, 1990). Ele foi adicionado ao meio de cultura em concentração final $2,0 \mu\text{M}$.

II.3. Preparação de gel 3D de colágeno tipo I

Para a extração do colágeno foram usados tendões de caudas de ratos Wistar machos com 2 meses de idade. As caudas foram dissecadas e os tendões colocados em álcool 70% por 24h para esterilização. Feito isso, seguiu-se o seguinte protocolo (uma modificação do método de SCHOR, 1980): os tendões, após esterilizados, foram postos em ácido acético 0,5N a 4°C por 48h para solubilização. A solução resultante foi centrifugada a 18.000 RPM a 4°C por 90 minutos em uma centrífuga de marca BECKMAN J2-21 (rotor JA-20). O sobrenadante foi recolhido e misturado a igual volume de NaCl 20%. A solução foi então centrifugada a 18.000 RPM a 4°C por 90 minutos. O precipitado foi recolhido e redissolvido em 100 ml de ácido acético 0,5N por aproximadamente 1h a 4°C . Todo o material foi dialisado em água destilada estéril, 10 vezes o volume, por 48h, sendo feitas duas trocas diárias de água. Feito isso, a amostra foi novamente centrifugada a 18.000 RPM por 90 minutos a 4°C . O sobrenadante foi então estocado a 4°C . Todo o material utilizado na extração, como material cirúrgico, frascos, água, etc, foram previamente esterilizados. Todo o manuseio foi efetuado em capela de fluxo laminar para manter a esterilidade do material utilizado bem como do colágeno extraído. A dosagem de colágeno na solução estoque extraída (SCHOR, 1980) apresentou concentração de 4,5 mg/ml.

Para geleificação do substrato, foram misturados rapidamente em um frasco de vidro tipo penicilina: 1,8 ml de solução estoque de colágeno tipo I, 0,1ml de meio mínimo de Eagle (MEM) 10 vezes concentrado e 0,1ml de solução de bicarbonato de sódio 4,4%. O frasco foi então incubado a 37°C por pelo menos uma hora. Depois de pronto o gel apresentava coloração rósea, indicando pH próximo da neutralidade (SCHOR, 1980).

II.4. Cultivo das células sobre o gel 3D de colágeno

1 ml de uma suspensão celular contendo $1,9 \times 10^5$ células foi inoculada nos frascos com gel 3D de colágeno tipo I. Inicialmente os tubos foram mantidos em meio Ham F-10 com 10% de SFB. Com 48h de cultivo, algumas amostras foram coletadas. Também com 48h de cultivo, o restante dos tubos recebeu meios de cultivo diferentes, sendo os frascos divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: grupo 1- foi lavado com solução salina de Hanks e então recebeu meio Ham F-10 sem suplementação de SFB; grupo 2- foi mantido em meio Ham F-10 com 10% de SFB; grupo 3- foi mantido em meio Ham F-10 com 10% de SFB mais 2,0 μ M de dexametasona; grupo 4- recebeu meio Ham F-10 com 20% de SFB. De todos os lotes, amostras foram colhidas e fixadas com 120h e 240h de cultivo. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

II.5. Fixação, inclusão e corte do material cultivado sobre o gel de colágeno

Os géis de colágeno foram fixados pelo método de KARNOVSKY (1965) em paraformaldeído/glutaraldeído em tampão fosfato 0,2M a pH 7,4 por 24h.

Após a fixação, o material foi lavado com água corrente por 24h e então mantido em álcool 70% por 18h. O material foi desidratado em banhos de 1h, em concentrações crescentes de etanol, diafanizado em xilol e finalmente incluídos em Paraplast. Após inclusão, as amostras foram cortadas em micrótomo (R. Jung-Heidelberg), tendo os cortes 7 μ m de espessura.

II.6. Cultura de células sobre lamínulas

II.6.1. Para análise citoquímica e imunocitoquímica

Foram inoculadas $1,9 \times 10^5$ células/ml de meio sobre lamínulas de vidro em tubos de Leighton. As células foram cultivadas em meio Ham F-10 com 10% de SFB nas primeiras 48h, amostras foram fixadas e o restante foi separado em lotes que receberam meio sem SFB, com 10% de SFB, com 10% de SFB mais 2,0 μ M de DEX e com 20% de SFB. Amostras de cada um dos grupos foram fixadas após 120h e 240h de cultivo em etanol/ácido acético 3:1 (v/v) e em paraformaldeído/glutaraldeído. As lamínulas foram lavadas, secas ao ar e guardadas a temperatura ambiente. O objetivo deste experimento foi verificar o efeito das diferentes concentrações de SFB, e do dexametasona nas células livres da influência do colágeno.

II.6.2. Para cálculo de índice mitótico

Foram inoculadas $1,9 \times 10^5$ células/ml de meio em lamínulas de vidro em tubos de Leighton. Este material foi cultivado em meio Ham F-10 com 10% de SFB nas primeiras 48h. Amostras foram fixadas e o restante foi separado em lotes

sem SFB, com 10% de SFB, com 10% de SFB mais 2,0 μM de DEX e com 20% de SFB. Amostras de cada grupo foram fixadas em etanol/ácido acético 3:1 (v/v) após 120h e 240h de cultivo, coradas com azul de toluidina pH 4,0, lavadas, secas ao ar e montadas em Entelam (Merk). O índice mitótico foi calculado após a contagem de 1500 células por tempo de cultivo, de acordo a com a fórmula descrita abaixo:

$$\text{I.M.(\%)} = (\text{n}^\circ. \text{células em divisão} \div \text{n}^\circ. \text{de células contadas}) \times 100$$

II.6.3. Para construção da curva de crescimento

A curva de crescimento das células Vero foi efetuada para as diferentes condições de cultivo já citadas (sem SFB, com 10% de SFB, com 10% de SFB mais 2,0 μM de DEX e com 20% de SFB). Foi inoculada uma suspensão de $1,9 \times 10^5$ células/ml de meio em tubos de Leighton sem lamínulas. Após 48h, 96h, 144h, 192h e 240h de cultivo, as células foram descoladas com solução de tripsina/EDTA (Nutricell) e contadas em hemocítômetro pelo método de exclusão com azul tripam. As contagens foram efetuadas em triplicata e os resultados representam a média das contagens. A montagem e apresentação gráfica foi feita em programa *Origin 3.5*.

II.7. Análise morfológica e citoquímica

Para análise da morfologia das células e para conhecermos a natureza dos elementos presentes em seu citoplasma e/ou no meio extracelular, cortes de material cultivado sobre gel de colágeno e células cultivadas sobre lamínulas

foram submetidas às seguintes colorações: (1) hematoxilina e eosina (HE) e cresil violeta (CV), ambos para análise morfológica (BEHMER et al., 1976); (2) azul de toluidina em pH 4,0 (AT); xilidine ponceau pH 2,5 (XP), para a análise citoquímica de grupos aniônicos e catiônicos respectivamente (MELLO & VIDAL, 1980)

II.8. Imunocitoquímica

Amostras de células cultivadas sobre lamínulas nas condições experimentais já descritas e retiradas nos diferentes tempos de incubação foram lavadas em PBS, a 37°C, e fixadas em paraformaldeído/glutaraldeído por 15 minutos. O material foi lavado em PBS 37°C e as peroxidases endógenas foram inativadas com peróxido de hidrogênio 0,3% em metanol (absoluto) por 10 minutos à temperatura ambiente, sendo então o material lavado novamente em PBS a 37°C. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com BSA 1% em PBS, sendo o material após isso submetido a lavagem suave em PBS 37°C. O material foi tratado com 100µl dos anticorpos monoclonais primários anti-fibronectina celular, obtido a partir de líquido ascítico de camundongo (Sigma: clone FN-3E2, diluição 1:400) e anti-colágeno tipo IV, obtido também a partir de líquido ascítico de camundongo (Sigma: clone COL-94, diluição 1:500) e incubado por 18h a 4°C. As lamínulas foram bem lavadas e nas mesmas foram adicionados 100µl dos anticorpos secundários de coelho anti-IGg de camundongo (Sigma, diluição 1:200) conjugados com peroxidase e incubadas por 1h em temperatura ambiente. As amostras foram então lavadas novamente em PBS a 37°C, sendo então adicionada solução de diaminobenzidina (DAB mais 5µl de H₂O₂ 30% em tampão fosfato 0,06M pH 7,2). A reação foi interrompida com água e as lamínulas foram lavadas, secas ao ar, diafanizadas em xilol e montadas

em Entelam (Merck). Todo esse procedimento acima citado foi feito em câmara húmida para impedir o ressecamento do material. Nos cortes do géis de colágeno foi adotado o mesmo procedimento, após a prévia remoção do Paraplast e hidratação do material.

II.9. Microscopia eletrônica de varredura.

Usamos aqui uma variação do método descrito em GRINNELL & BENNETT (1981). As células Vero foram mantidas em meio Ham F-10 com 10% de SFB, até o momento do repique celular. Após a tripsinização, $4,5 \times 10^5$ células/ml foram inoculadas sobre 1,0ml de gel de colágeno e mantidas em quatro grupos experimentais: meio Ham F-10 sem SFB, com 10% de SFB, com 10% de SFB mais 2 μ M de dexametasona e com 20% de SFB. Como controle foi utilizado um gel mantido em meio Ham F-10 sem SFB e livre de células. Após 24h de cultivo, os géis foram fixados em glutaraldeído 3% por 2h à 4° C, pós-fixado com tetróxido de ósmio 1% por 15 minutos também à 4°C, desidratados em etanol em concentrações crescentes, secos em ponto crítico e submetidos a vaporização com ouro. As observações foram feitas em microscópio eletrônico de varredura JEOL 300. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

II.10. Adesão celular

Para verificar o efeito da variação das concentrações de SFB e do DEX na adesão celular foi utilizada uma modificação do método descrito por MOSMANN (1983). 50 μ l de gel de colágeno foram inoculados em placas com 96 poços de forma alternada, de modo a ficar ao final, uma linha com gel de colágeno e outra

sem, que serviu como controle para cada experimento. A placa foi incubada por 24h a 37°C. 100µl de uma suspensão celular com cerca de $2,9 \times 10^5$ células/ml, foram inoculadas nos poços, tendo eles recebido colágeno ou não, em meio sem SFB, com 10% de SFB, 10% de SFB mais 2µM de DEX e 20% SFB. Como branco foi utilizado a primeira coluna da microplaca que consistia do meio sem soro ou com a concentração de soro, de 10% ou 20%, com presença ou não de dexametasona na ausência de células. A placa foi incubada por 24h a 37°C. Após esse período de cultivo, os poços foram lavados duas vezes com PBS, e foi adicionados em cada um deles 100µl de meio sem soro e 10µl de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil brometo de tetrazolium). Após 4h de incubação, foram adicionados 100µl de isopropanol ácido (HCl 0,04N em isopropanol) nos poços, que foram então homogeneizados. A absorbância a 540 nm foi efetuada em um leitor de microplacas Dynatech MR 580. Das leituras obtidas foram realizados testes-T com nível de significância de 0,05. Os dados coletados foram analisados em programa *Origin 3.5*, onde foram efetuadas todas as funções gráficas e análises estatísticas.

II.11. Monitoramento das culturas celulares, análise de lâminas e preparo de micrografias.

As culturas celulares foram monitoradas diariamente, em microscópio invertido Zeiss. As lâminas foram fotografadas em microscópio Zeiss, acoplado a sistema fotográfico automático. Os filmes utilizados para documentação foram de marca Kodak Gold-100 135 mm, para microscopia óptica e Neopan 120 SS, para microscopia eletrônica de varredura.

III. Resultados

III.1. Avaliação do crescimento celular

A avaliação do crescimento celular foi efetuada pelo monitoramento diário das células cultivadas sobre lamínulas nas diferentes condições experimentais. As amostras cultivadas em meio sem SFB, apresentaram uma grande diminuição no número de células após a retirada de soro, sendo abundantes as células que descolaram do substrato, principalmente até as 96h de cultivo. Células descoladas foram observadas, ainda que em quantidades muito menores, até o final do experimento, após 240h. Muitas regiões das lamínulas apresentavam espaço para crescimento, mesmo em tempos bastantes avançados de cultivo. O padrão de crescimento celular observado foi normal, homogêneo, com crescimento em monocamada e presença de inibição por contato. A metabolização do meio de cultura pelas células foi baixa.

As células mantidas com 10% de SFB apresentaram também um crescimento homogêneo sobre a lamínula, sendo que na região central, o tapete celular se apresentava bastante denso e encontrando áreas para o crescimento apenas nas bordas.

As culturas mantidas em meio com 10 % de SFB mais DEX mostraram um crescimento diferenciado em relação a cultura sem esse glicocorticóide. Com 120h de cultura, já foi possível visualizar pequenos grumos celulares, em todos os tubos. Com o decorrer do tempo de cultivo observamos um aumento do tamanho dos grumos e do número deles. O dexamentasona também diminuiu discretamente o metabolismo das células Vero. Isso pôde ser averiguado visualmente pela metabolização mais lenta do meio de cultura em comparação com as culturas mantidas com a mesma concentração de SFB sem DEX.

Com 20% de soro fetal bovino a proliferação celular foi mais intensa, sendo que o tapete celular confluiu mais rapidamente. O crescimento celular foi contínuo, porém o tapete celular estratificou-se em poucas regiões. Dos vários tubos mantidos, doze no total para essas amostras, apenas em um deles se deu o aparecimento de um grumo celular. Quanto a metabolização do meio de cultura, essa foi mais intensa que as demais.

III.2. Observações morfológicas

Nas células cultivadas sobre lamínulas, com 48h de cultivo todas as amostras, até então mantidas em 10% de SFB, apresentaram morfologia levemente alongada, com poucas expansões celulares, ou de formato irregular, algumas células estreladas, outras com muitos prolongamentos, sendo que esses formatos irregulares eram mais comuns nas bordas da lamínula, onde havia espaço para crescimento e expansão celular (Figura 1a). Embora a maior parte das células encontradas eram mononucleadas, mas um número bastante grande de células binucleadas também estavam presentes. Células em degeneração com núcleo fragmentado e citoplasma vacuolizado foram encontradas em pequena quantidade na monocamada (Figura 1a).

Com 120h de cultivo sobre as lamínulas, as células mantidas sem SFB já mostravam um espaçamento mais reduzido entre as células, sendo encontradas células mono ou binucleadas, com um ou dois nucléolos bem evidentes. As células, no geral, apresentavam forma poliédrica, sem prolongamentos celulares, em sua maioria, enquanto algumas eram levemente alongadas. Também estavam presentes células com núcleos picnóticos e/ou fragmentados. Muitas células encontradas apresentavam vacuolização citoplasmática (Figura 1b).

As células mantidas nas lamínulas em meio com 10% de SFB, com 120h de cultura mostravam pouco espaçamento celular, morfologia padronizada em células poliédricas no centro do tapete e levemente alongadas nas bordas, núcleos com um ou dois nucléolos evidentes. Poucas células encontradas no tapete apresentavam vacuolização, além disso encontramos núcleos fragmentados em baixa quantidade (Figura 1c). A análise morfológica das células mantidas com 10% de SFB mais dexametasona mostraram uma morfologia distinta, com células bem alongadas, com núcleos também alongados e um ou dois nucléolos evidentes. Células mono ou binucleadas foram encontradas assim como também células com mais de três núcleos. Observamos também um grande número de células que sofreram um drástico aumento no volume nuclear que espalhavam-se por todo o tapete. As células que faziam parte dos grumos celulares eram pequenas. Em muitos casos, esses grumos eram separados uns dos outros por células bem alongadas ou por células com núcleo de tamanho muito aumentado (Figura 1d). Também estavam presentes células em divisão, assim como em degeneração. Também com 120h de cultura, as células mantidas em 20% de SFB mostravam morfologia poliédrica no centro, levemente alongada nas bordas da lamínula, mono ou binucleadas com um ou dois nucléolos, mas menos evidenciados que nos demais casos (Figura 1e). Outras células com núcleos fragmentados ou vacuolizados e citoplasma vacuolizado mostravam-se em degeneração.

Com 240h sobre as lamínulas, as culturas mantidas sem SFB mostravam forma com predominância poliédrica, algumas delas com prolongamentos estrelados. Os nucléolos eram menos evidenciados além de muitas células apresentarem núcleo condensado (Figura 2a). Para as células que receberam soro fetal, com 240h, a análise morfológica foi difícil, pois estando a maior parte do

tapete confluyente, não pudemos indentificar com clareza os limites celulares. Sendo assim, nossa análise baseou-se na forma e integridade nuclear. Assim, células mantidas em 10% de SFB, com 240h de cultivo mostravam os núcleos arredondados, com nucléolos evidentes, sendo rara a presença de núcleos fragmentados ou vacuolizados no tapete celular (Figura 2b). Com 240h as células cultivadas na presença de DEX apresentavam núcleos arredondados ou alongados, com nucléolos evidentes, células com núcleos em fragmentação, além de grumos celulares (Figura 2c). Já as células mantidas com 20% de SFB exibiam núcleos arredondados, com nucléolos pouco evidentes (Figura 2d). Muitas células apresentavam núcleos condensados ou em fragmentação.

As células mantidas sobre os géis de colágeno por 48h de cultivo com 10% de SFB, podiam ser vistas como uma monocamada, na maior parte do substrato, mas em várias regiões também pudemos ver a formação de estratos celulares. No primeiro caso as células apresentavam morfologia levemente achatada, lembrando um epitélio pavimentoso simples (Figura 3a). Nas regiões de estratificação, as células mostravam formas arredondadas e/ou poliédricas, sendo que as células da última camada do estrato eram normalmente achatadas. Nas regiões onde se formaram estratos, houve uma variação de 2 a 3 camadas de células sobre o gel. Pudemos verificar também, já com esse tempo de cultivo, alguns pontos onde as células já haviam iniciado a infiltração para o interior do substrato, muito embora esses pontos não fossem muito comuns (Figura 3a). Com 120h de cultivo, também sobre os géis, as células cultivadas sem SFB apresentavam um certo aumento na estratificação anteriormente observada. Não houve modificações na morfologia das células em relação a descrição feita após as 48h iniciais de cultivo. Também encontramos alguns pontos de infiltração em algumas regiões do gel (Figura 3b).

Já com a adição de 10% SFB notamos um aumento na estratificação, quando comparado com as células mantidas sem soro. Houveram alterações no número de pontos de infiltração que são encontrados com maior frequência, porém ainda encontramos várias regiões onde os estratos celulares estavam restritos à superfície do gel de colágeno (Figura 3c). Nas células mantidas com SFB mais DEX observamos estratos celulares com poucos pontos de infiltração para o interior do substrato (Figura 3d). Já com 20 % de SFB observamos uma camada celular mais espessa sobre o gel de colágeno. Observamos também poucas regiões de infiltração para o interior do gel (Figura 3e).

Com 240h de cultivo sobre os géis de colágeno, as células mantidas sem SFB mostravam ainda poucos pontos de infiltração para o interior do substrato. A morfologia celular não se alterou desde as descrições anteriores (Figura 4a). Ao contrário, encontramos nas culturas mantidas com 10 % de SFB uma infiltração pronunciada em toda a extensão do substrato (Figura 4b). As amostras que foram suplementadas com DEX mostravam poucos pontos com infiltração e várias regiões onde ela não ocorreu, permanecendo as células como uma estrutura que lembra um epitélio estratificado pavimentoso (Figura 4c). Com 20 % de SFB não foi encontrada infiltração como os demais casos acima citados, sendo novamente vista uma organização que lembra um epitélio estratificado pavimentoso (Figura 4d). Nessas amostras também pudemos encontrar, em alguns pontos, uma camada basal levemente corada abaixo das células desse estrato.

Nas regiões onde as células penetraram no substrato colagênico, em todos os lotes experimentais e em todos os tempos de cultivo analisados, notamos uma modificação do gel original com a deposição de granulações no interior do mesmo, sendo esses grânulos depositados na medida em que as células penetravam para o

interior do gel. Também notamos que no interior do gel colagênico as células apresentavam sempre formato arredondado, independente da concentração do SFB no meio de cultura ou da presença ou não de dexametasona (Figuras 3 e 4).

III.3. Análise citoquímica

III.3.1. Coloração com o azul de toluidina pH 4,0

Nas lamínulas, as células coradas pelo azul de toluidina mostraram, com 10% de SFB em 48h de cultivo, basofilia nuclear metacromática, com um ou dois nucléolos evidentes, também metacromáticos (Figura 5a). Alguns núcleos ortocromáticos também foram encontrados no tapete celular. Além disso, as células mostravam metacromasia citoplasmática (Figura 5a). Com 120h de cultivo, também sobre as lamínulas, nas amostras que cresceram na ausência de soro, foram encontrados células com núcleos mostrando basofilia ortocromática, nucléolos e citoplasma levemente metacromáticos, algumas vezes com vacúolos não corados pelo AT (Figura 5b). Com o mesmo tempo de cultivo as células que receberam 10% de SFB mostravam núcleos predominantemente ortocromáticos, com um ou dois nucléolos levemente metacromáticos. Embora raros, encontramos também alguns casos de vacuolização nuclear. O citoplasma dessas células era levemente metacromático, algumas vezes também vacuolizado (Figura 5c). As células que receberam suplementação de DEX, além do SFB, apresentavam núcleos predominantemente ortocromáticos, com um ou dois nucléolos metacromáticos. Também encontramos alguns casos de vacuolização nuclear. O citoplasma, mostrava intensa metacromasia (Figura 5d). As células com volume aumentado mostravam basofilia ortocromática, tanto nuclear quanto citoplasmática. Com 20% de SFB as células mostravam núcleos em sua grande maioria ortocromáticos, sem

vacuolizações, com 1 ou 2 nucléolos e intensamente basófilos. O citoplasma mostrava-se levemente metacromático, em alguns casos também mostrando alguma vacuolização (Figura 5e).

Com 240h de cultivo nas lamínulas, as células cultivadas sem SFB apresentavam núcleos e nucléolos metacromáticos, sendo esse último pouco evidenciado (Figura 6a). Em algumas células o citoplasma apresentava-se fracamente corado pelo AT. Com 10% de SFB, as células mostravam núcleos, no geral, ortocromáticos, com nucléolos e citoplasma mostrando leve metacromasia. Também foram encontradas algumas células cujos núcleos mostravam-se levemente metacromáticos, com citoplasma ortocromático ou levemente metacromático, com vacúolos citoplasmáticos não corados pelo AT (Figura 6b). Com 10% de SFB mais DEX, após 240h de cultivo, apresentavam núcleos ortocromáticos, com nucléolos e citoplasma levemente metacromáticos. Nos grumos celulares, tanto os núcleos quanto o citoplasma celular eram intensamente metacromáticos (Figura 6c). Com 20% de SFB foram encontrados apenas núcleos ortocromáticos com nucléolos levemente metacromáticos. O citoplasma dessas células mostrava intensa metacromasia (Figura 6d).

As células que foram cultivadas sobre os géis de colágeno por 48h com 10% de SFB mostravam-se predominantemente como uma monocamada de células com núcleos ortocromáticos, nucléolos e citoplasma levemente metacromático, todos evidenciados pelo AT (Figura 7a). Nas regiões de 2 ou 3 camadas celulares, ou de infiltração, o padrão de coloração das células pelo AT se manteve similar à observada na monocamada. O gel de colágeno não se mostrava corado (Figura 7a). Com 120h de cultivo sobre os géis, as células cultivadas sem SFB apresentavam-se com núcleos ortocromáticos, nucléolo e citoplasma levemente metacromáticos,

além disso encontramos ao redor das células em processo de infiltração no gel um material com aspecto granular, também corado pelo azul de toluidina (Figura 7b). Resultados quase idênticos foram encontrados nas amostras cultivadas com 10% de SFB, onde observamos células com núcleo e citoplasma metacromáticos, ainda que levemente, e deposição de material no interior do substrato (Figura 7c). Nas amostras cultivadas com 10% de SFB mais DEX, pudemos observar um estrato celular formado por células com núcleo e citoplasma metacromáticos. Não encontramos coloração difusa ou granular no gel, mas pudemos observar uma banda, bastante tênue, logo abaixo das células da camada basal do estrato formado (Figura 7d). Esses mesmos resultados foram vistos para as células mantidas em cultivo com 20% de SFB (Figura 7e).

Com 240h de cultivo sobre os géis de colágeno em meio sem SFB encontramos células com núcleo e citoplasma metacromáticos bastante infiltradas no interior do gel de colágeno. Foi observado também um material metacromático depositado ao redor dessas células (Figura 8a). Esses resultados se repetiram nas células mantidas com 10% de SFB, sendo intensificado apenas o número de células infiltradas no substrato e a quantidade de material depositado no gel de colágeno (Figura 8b). Nas células que foram cultivadas com 10% de SFB mais DEX observamos células com núcleos e citoplasma metacromáticos dispostas ainda como um estrato. Em muitos pontos observamos ainda uma banda localizada abaixo das células levemente evidenciada pelo AT (Figura 8c). Com 20% de SFB foram encontrados resultados bastante similares com um estrato celular bem espesso e uma faixa levemente evidenciada pelo AT sobre as células. As células do estrato formado não apresentavam coloração homogênea sendo encontrados

muitos campos onde eram vistas células com núcleos metacromáticos ou ortocromáticos, além de citoplasma metacromático, sobre o substrato (Figura 8d).

III.3.2. Coloração com xylidine ponceau pH 2,5

Com 48h de cultivo, as células Vero, cultivadas em lamínulas, mostraram-se levemente coradas, sendo que a sua porção nuclear foi um pouco mais evidenciada pelo corante. Foram encontradas algumas células com a coloração mais intensa exibindo um grande número de prolongamentos e expansões celulares. Os nucléolo, de forma geral, foram pouco evidenciado (Figura 9a). Com 120h de cultivo, também sobre lamínulas, as amostras mantidas sem SFB apresentaram citoplasma fracamente corado, núcleo destacado com um pouco mais de coloração e com nucléolos fracamente evidenciados. As vacuolização citoplasmática não se coraram pelo XP (Figura 9b). Com o mesmo tempo de cultivo as células mantidas com 10% de SFB apresentavam um padrão de coloração mais intenso, tanto no citoplasma como no núcleo, sendo o nucléolo fortemente evidenciado. As células com núcleos de tamanho aumentado apresentavam-se intessamente coradas (Figura 9c). As células cultivadas na presença de DEX apresentavam padrão de coloração muito próximo daquele exibido pelas células cultivadas sem esse hormônio e com a mesma concentração de SFB (Figura 9d), exceto pelo presença bastante comum de vacúolos citoplasmáticos não corados e um aumento das células com tamanho nuclear acima da média, essas últimas também levemente coradas. Com 20% de SFB as células tinham coloração predominantemente nuclear, com nucléolo pouco evidenciado (Figura 9e). Nesse lote experimental também encontramos algumas células com vacuolização citoplasmática não corada.

Com 240h de cultura sobre as lamínulas, as células sem SFB mostravam-se, no geral, pouco coradas pelo XP. A porção mais evidenciada era a nuclear, embora o citoplasma mostrava muitos prolongamentos e expansões celulares também bastante evidenciados. Também encontramos vacuolização citoplasmática não corada em células dispersas por todo o tapete celular (Figura 10a). As amostras com 10% de SFB mostraram o tapete celular intensamente corado, de difícil definição entre as porções citoplasmáticas e nucleares das células e, na grande maioria dos casos, os nucléolos não são vistos com clareza (Figura 10b). Nesse mesmo tempo de cultivo as células cultivadas com 10% de SFB na presença de DEX apresentavam novamente vacúolos citoplasmáticos não corados pelo XP, além de grumos celulares os quais foram também intensamente evidenciados (Figura 10c). Já com 20% de SFB as células foram intensamente coradas, sendo difícil distinguir as regiões citoplasmáticas e nucleares das mesmas. A vacuolização citoplasmática foi também encontrada mas com frequência bem menor. Novamente os nucléolos foram fracamente corados (figura 10d).

Nos géis de colágeno, nas células que cresceram com 10% de SFB por 48h, notamos que houve um padrão de coloração ligeiramente mais denso próximo a superfície do gel na qual se encontravam as células dispostas como uma monocamada. Nos pontos onde não se deu a infiltração, não houve deposição de material granular por parte das células (Figura 11a). Nas regiões de infiltração porém tivemos modificação do gel com deposição de material ao redor das células que nele penetravam. No geral, as células sobre o gel de colágeno mostravam-se mais coradas que as células cultivadas sobre lamínulas (Figura 11a). Com 120h de cultivo sobre os géis, as amostras sem SFB apresentavam as células bem coradas, além de regiões destacadas pelo XP abaixo do estrato celular. Nos pontos onde

houve infiltração tivemos também evidenciada intensa granulação (Figura 11b). Com o mesmo tempo de cultura, notamos resultados semelhantes para as células mantidas com 10% de SFB (Figura 11c). Nas amostras cultivadas com 10% de SFB mais DEX o estrato celular estava intensamente corado, enquanto que o gel mostrava-se levemente corado e com aspecto homogêneo (Figura 11d). Com 20% de SFB esses mesmos resultados se repetiram e encontramos discreta coloração no gel na base do estrato celular (Figura 11e).

Com 240h, apesar do aumento do tempo de cultivo, não encontramos nas células cultivadas sobre os géis de colágeno resultados com alterações significativas em relação aos já descritos para as diversas amostras após 120h. Novamente, onde houve infiltração no gel tivemos deposição de material granular evidenciado pelo XP (Figuras 12a e 12b). Nos pontos onde não houve infiltração sobretudo nas amostras com 20% de SFB, encontramos uma região levemente corada na base dos pontos onde as células permaneceram como um estrato, isso é, elas não migraram para o interior do gel (Figuras 12c e 12d).

III.4. Imunocitoquímica

III.4.1. Para colágeno IV

As células cultivadas sobre as lamínulas apresentaram reatividade ao anti-COL IV nas amostras mantidas em 10% de SFB com 48h de cultivo (Figura 13a). Em alguns campos encontramos um material fibrilar irregular, algumas vezes levemente reticulado. Esse material fibrilar não foi encontrado, porém, nas amostras mantidas por 120h em meio sem SFB, que apresentou apenas uma coloração difusa muito semelhante aos controles negativos (Figura 13b). Ao contrário, nas células cultivadas por 120h, mas mantidas em meio com 10% de

SFB, encontramos novamente um material levemente reticulado abaixo do tapete celular, sendo que essas fibrilas evidenciadas pela imunoperoxidase foram encontradas em campos muito mais numerosos que os descritos anteriormente com 48h (Figura 13c). Inversamente, as células cultivadas com DEX mostraram poucas regiões onde material fibrilar foi encontrado, embora estivesse presente (Figura 13d). As culturas mantidas com 20% de SFB, também com 120h apresentavam aglomeração fibrilar evidenciada pela imunoperoxidase em maior número que nos casos anteriores (Figuras 13e).

Com 240h de cultivo, também sobre as lamínulas, os resultados encontrados para as células cultivadas sem soro e com 10% de SFB não se alteraram (Figuras 14a e 14b, respectivamente). Nesse último, entretanto, um maior número de campos apresentando material fibrilar foi encontrado em relação as amostras observadas às 120h. Nas culturas mantidas com DEX quase não foram encontradas regiões com a presença de material fibrilar, e nas poucas regiões onde isso ocorreu, as fibrilas mostravam-se muito mais finas que nas células cultivadas com a mesma concentração de soro mas sem o dexametasona (Figura 14c). Já com 20% de SFB encontramos o maior número de campos com presença de fibrilas evidenciadas pela imunoperoxidase (Figura 14d).

Os resultados obtidos com a imunocitoquímica para o colágeno tipo IV, nas células cultivadas nos géis de COL I, revelaram que, com 48h de cultivo, nos pontos onde as células organizam-se como uma camada unicelular achatada, ocorre em algumas células a presença de uma região evidenciada abaixo da superfície basal celular (Figura 15a). Essa marcação não é encontrada nas regiões onde a a infiltração no gel já se iniciou. A reação da peroxidase mostrou-se negativa também nas amostras cultivadas sem SFB (Figura 15b) e 10% de SFB

(Figura 15c), ambas mantidas em cultura até 240h. Nas células que foram cultivadas com DEX (Figura 15d) ou com 20% de SFB (Figura 15e), até 240h, encontramos reação positiva com o anticorpo anti-COL IV, abaixo do estrato celular, na superfície do gel. Nas regiões onde as células encontravam-se infiltradas no gel, nas amostras tratadas com DEX, a reação foi também negativa.

III.4.2. Para fibronectina

As células mantidas em cultivo sobre lamínulas mostravam com 48h de cultura intensa reatividade a anti-FN. Nessas células, a peroxidase revelou uma distribuição difusa, pontual e não fibrilar (Figura 16a). Encontramos também, reatividade citoplasmática para a anti-FN. Já nas amostras mantidas em cultura por 120h em meio sem SFB uma reatividade bastante diminuída a anti-FN foi encontrada na superfície celular, muito embora, no citoplasma, as células mostravam-se tão reativas à FN como nas células colhidas com 48h (Figura 16b). Nas amostras cultivadas com 10% de SFB colhidas com 120h constatamos uma discreta redução de FN, porém bem menos intensa que nas células cultivadas sem soro (Figura 16c). Novamente no citoplasma não foi encontrada essa redução, seja em comparação as amostras cultivadas sem soro (com 120h) ou com as amostras colhidas com 48h. Resultados diferentes foram encontrados nas amostras cultivadas com 10% de SFB mais DEX, onde não encontramos uma redução de FN extracelular, porém essa estava quase ausente no citoplasma dessas células (Figura 16d). As células cultivadas com 20% de SFB mostraram reatividade extracelular ao anti-FN mais intensa que as demais amostras colhidas com 120h. Nessas células não encontramos redução na reatividade intracelular, ao contrário, ela nos pareceu um pouco mais intensa (Figura 16e).

Com 240h de cultivo nas lamínulas, em todos os casos, encontramos redução marcante nos níveis de FN no interior das células. Porém a quantidade extracelular de FN evidenciada pareceu aumentar em relação as amostras colhidas com 120h. Encontramos pouca FN nas amostras mantidas sem SFB (Figura 17a), em termos quantitativos aparentemente não encontramos diferenças nas amostras cultivadas com 10% de SFB com ou sem DEX (Figuras 17b e 17c). As células cultivadas com 20% de soro permaneceram com uma quantidade de FN um pouco maior que nos casos anteriores (Figura 17d). Algumas alterações foram encontrados nas amostras tratadas com DEX. A disposição de FN extracelular pareceu-nos menos desorganizada que nos demais casos, embora não tenhamos encontrado um arranjo fibrilar definido. Além disso os grumos celulares induzidos pelo DEX mostraram-se intensamente marcados pela peroxidase (Figura 17c).

Nas amostras mantidas em cultura sobre géis de COL I até 48h, baixa ou nenhuma reatividade a anti-FN foi encontrada, tanto nas regiões onde as células organizavam-se formando um monocamada, quanto nas regiões onde as células formavam estratos com até 3 camadas (Figura 18a). Com 240h de cultivo, encontramos nas células cultivadas sem SFB, reação positiva ao anti-FN no citoplasma dessas células e em granulações ao redor das mesmas depositadas na matriz colagênica ao redor das células infiltradas (Figura 18b). Com 10% de SFB as células cultivadas com as mesmas 240h, mostravam resultados quase idênticos aos descritos para as células cultivadas sem soro, embora a reatividade encontrada tenha sido um pouco menor (Figura 18c). Nos experimentos onde as células entraram em contato com o DEX, encontramos resultados negativos à presença de FN (Figura 18d). Resultados negativos foram também encontrados nas células cultivadas por 240h com 20% de SFB (Figura 18e).

Firara 1: Aspectos gerais das células Vero cultivadas sobre lamínulas em tubos de Leighton. Coloração com cresil violeta. Aumento: 420X.

- A. Células cultivadas por 48h, com 10% de SFB. Células com morfologia irregular ou levemente alongadas.
- B. Células com 120h de cultivo sem SFB. Observar células com cromatina frouxa (➡), nucléolos evidentes (→) e vacuolização citoplasmática (→).
- C. Células com 120h de cultivo com 10% de SFB. Região de tapete celular fechado com células com cromatina frouxa (➡) e nucléolo evidente (→).
- D. Células cultivada com 10% de SFB mais dexametasona por 120h. Observar células de tamanho normal (➡) e células hipertrófica (→➤).
- E. Células cultivadas com 20% de SFB por 120h. Note em região de tapete celular fechado, células poliplóides em divisão (➡).

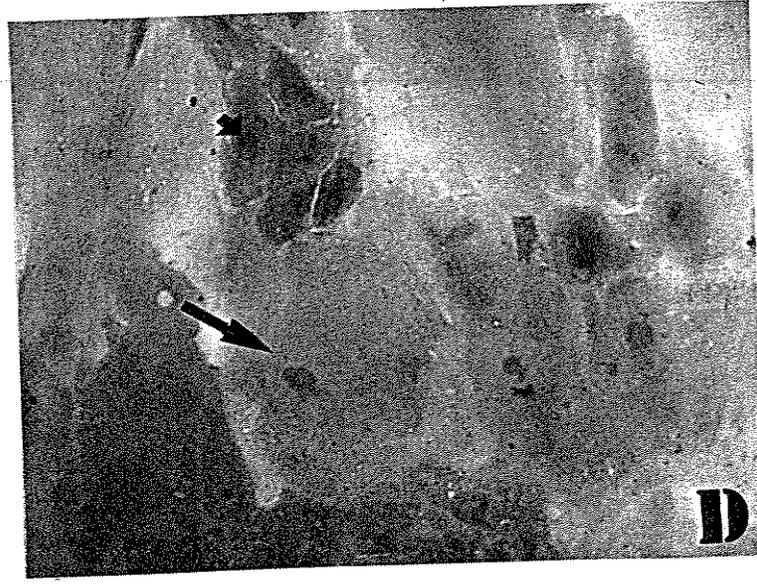
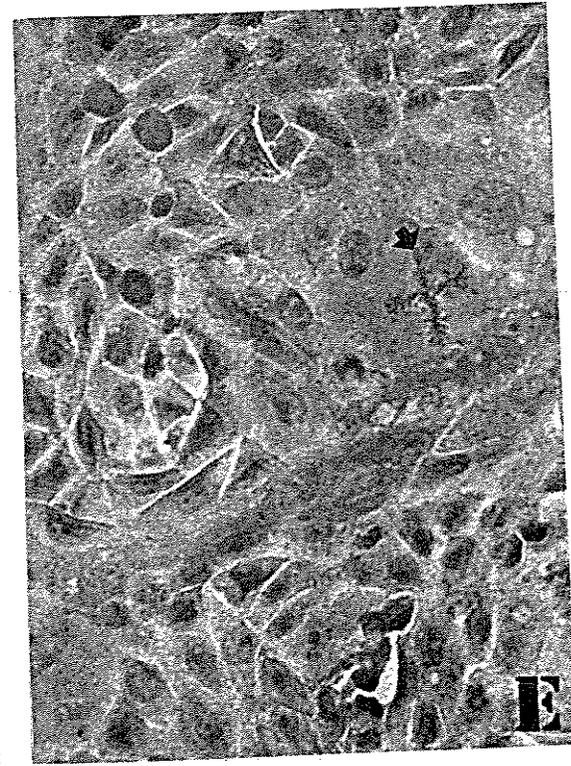
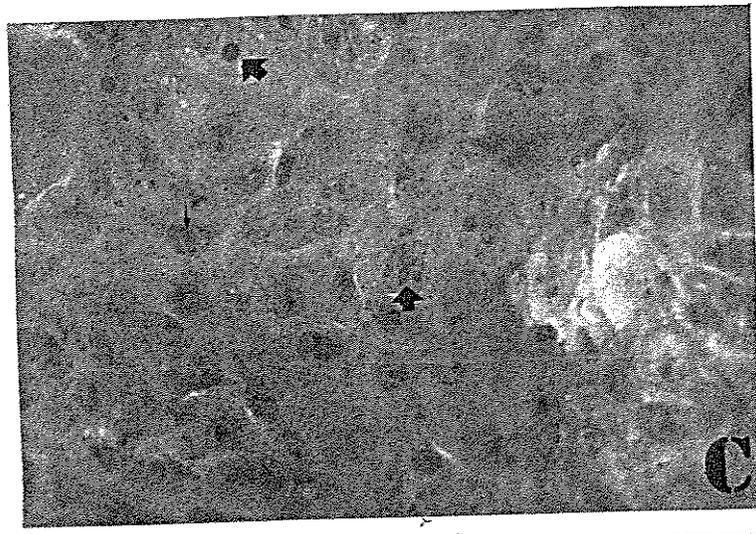
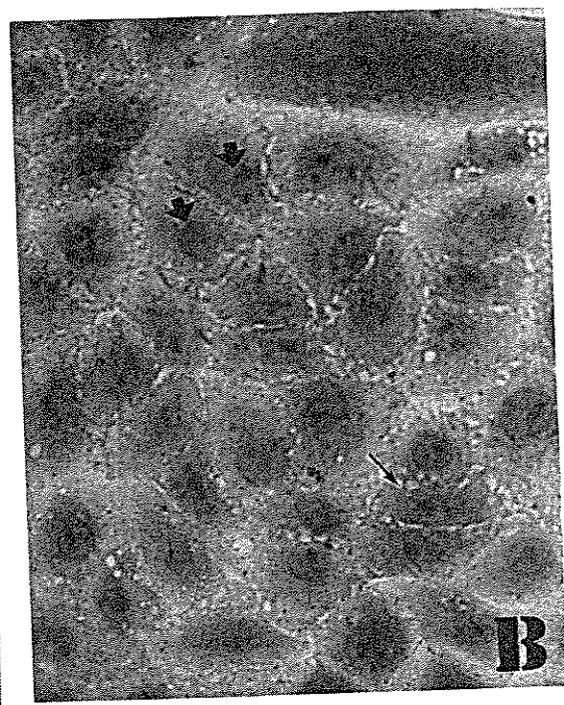


Figura 2: Aspectos gerais das células Vero cultivadas sobre lamínulas em tubos de Leighton com 240h. Coloração com cresil violeta. Aumento: 420X

- A. Células cultivadas sem SFB. Observar células com vacuolização citoplasmática abundante (→).
- B. Células cultivadas com a 10% de SFB. Região de tapete celular confluyente.
- C. Células cultivadas com 10% de SFB mais dexametasona. Observar grumo celular (⇒), células com vacuolização (→), e granulações citoplasmáticas (→).
- D. Células cultivadas com 20% de SFB. Observar o tapete celular confluyente e algumas células com leve vacuolização citoplasmática (→).

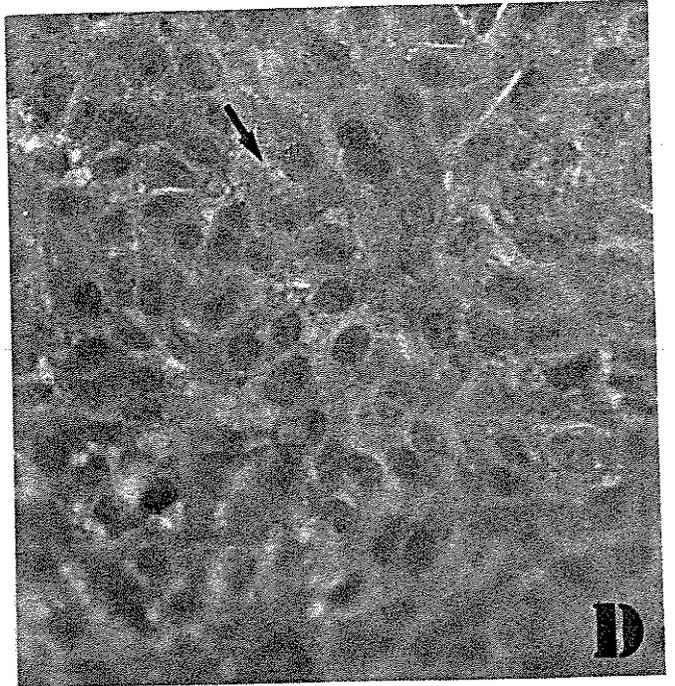
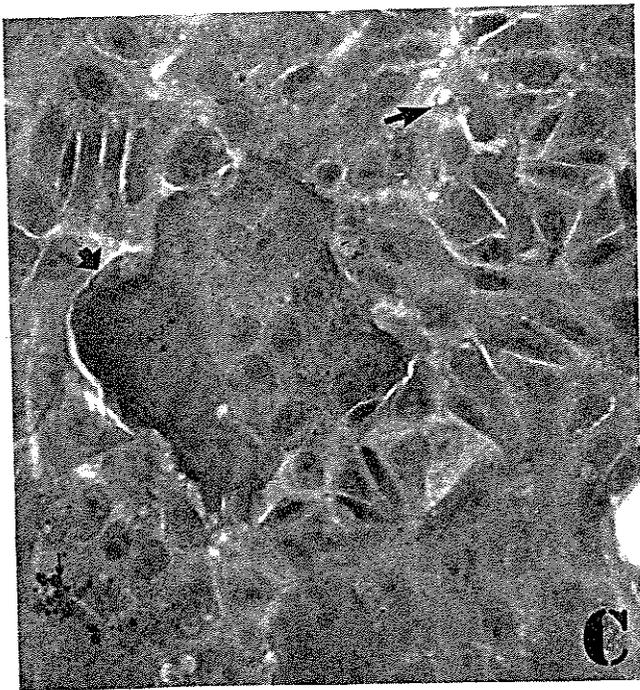
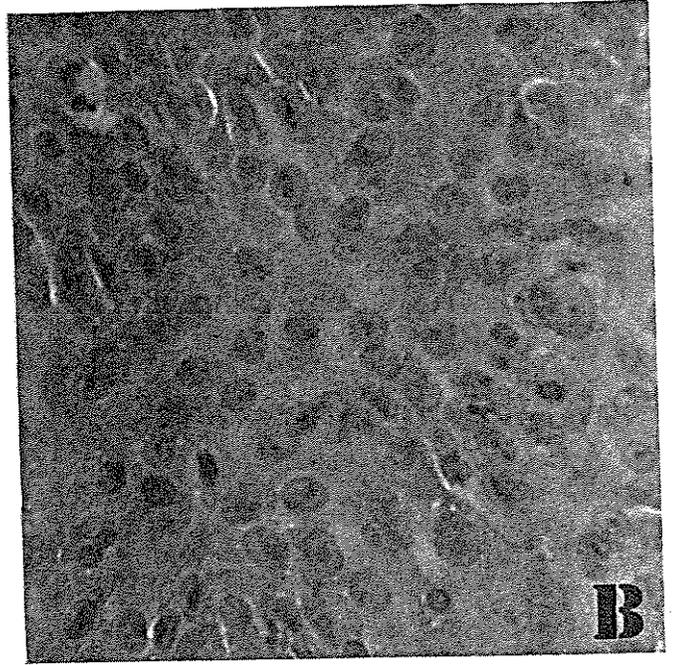
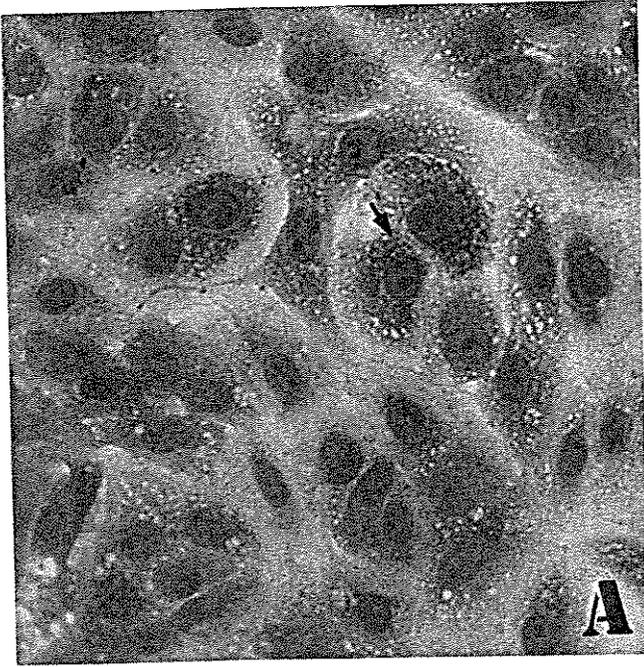


Figura 3: Células Vero cultivadas sobre gel de colágeno tipo I e coradas com hematoxilina e eosina. Aumento: 420X.

O gel de colágeno em todas as micrografias está representado por (*).

- A. Células cultivadas por 48h com 10% de SFB. Observar células achatadas sobre o substrato colagênico. Notamos também células em início de infiltração no gel (➡).
- B. Células cultivadas sem SFB e colhidas com 120h. Observar células arredondadas, em múltiplas camadas, e pontos de infiltração com células no interior do substrato colagênico.
- C. Células cultivadas por 120h com 10% de SFB. Notar a formação de estrato celular com células arredondadas sobre o substrato colagênico.
- D. Células cultivadas com 10% de SFB mais DEX e colhidas com 120h. Encontramos aqui células arredondadas nas camadas basais, em contato com o substrato, e a presença de células achatadas nas porções superficiais do estrato.
- E. Células cultivadas com 20% de SFB e analisadas com 120h. Observamos também nesse caso células arredondadas nas camadas basais, em contato com o substrato, e células achatadas nas porções superficiais do estrato.

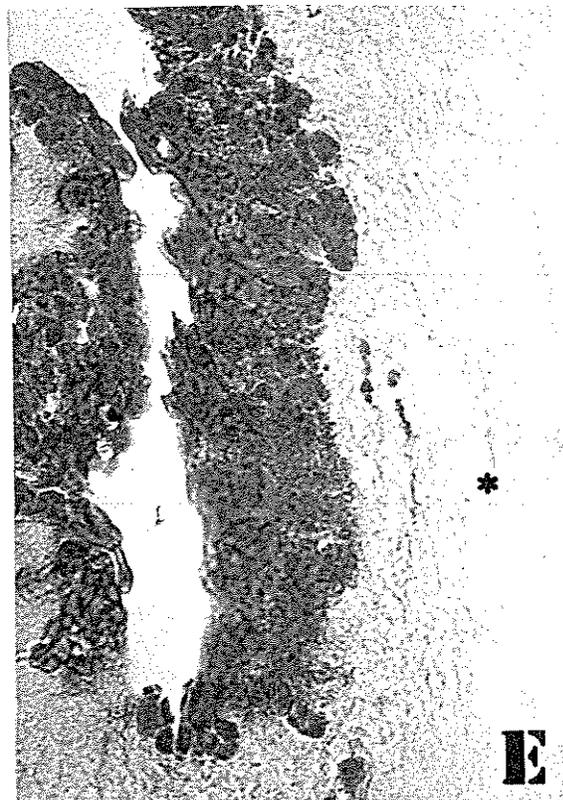
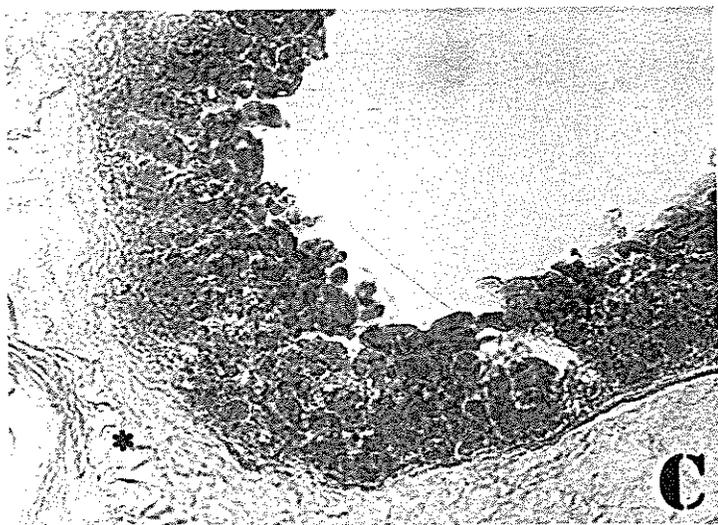
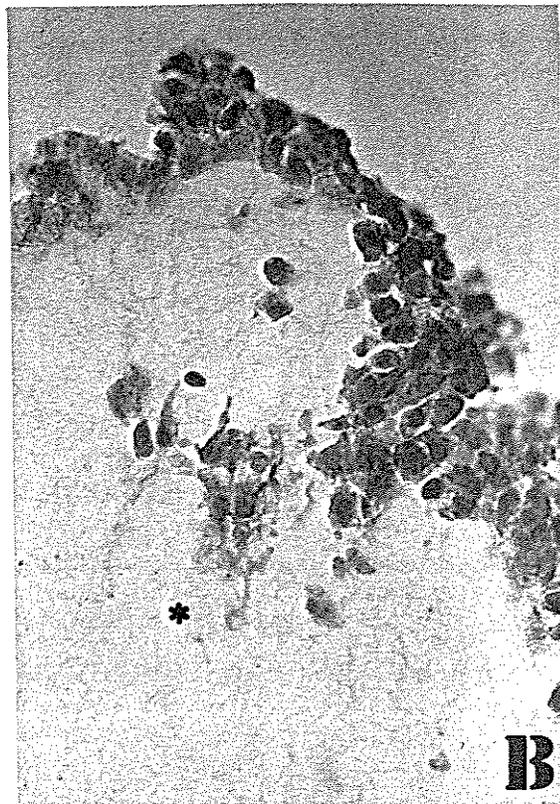
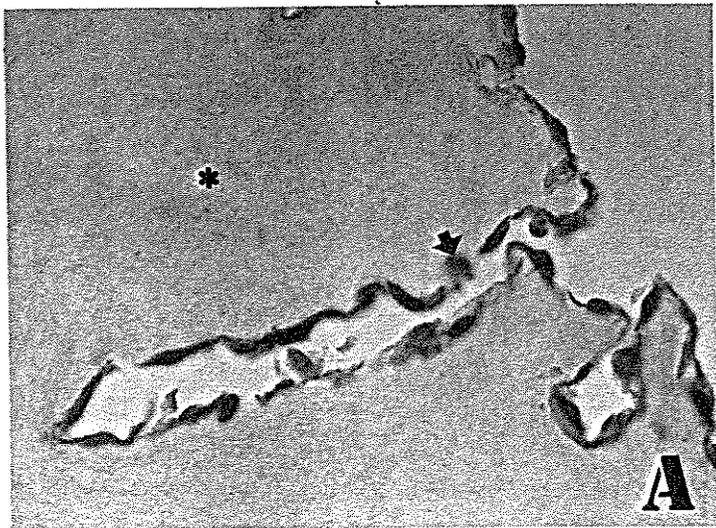


Figura 4: Células Vero cultivadas sobre gel de colágeno tipo I por 240h e coradas com hematoxilina e eosina. Aumento: 420X.

O gel de colágeno em todas as micrografias está representado por (*).

- A. Células cultivadas sem SFB. Encontramos o depósito de material granular (➡) concomitante à infiltração de células para o interior do substrato colagênico.
- B. Células cultivadas com 10% de SFB. Notar a intensa infiltração para o interior do gel de colágeno, além de grande deposição de material ao redor das células (➡).
- C. Células cultivadas com 10% de SFB mais DEX. Notamos aqui a manutenção do estrato celular e a não ocorrência de infiltração para o interior do substrato.
- D. Células cultivadas com 20% de SFB. Observamos também nesse caso a manutenção do estrato celular e a não ocorrência de infiltração para o interior do substrato.

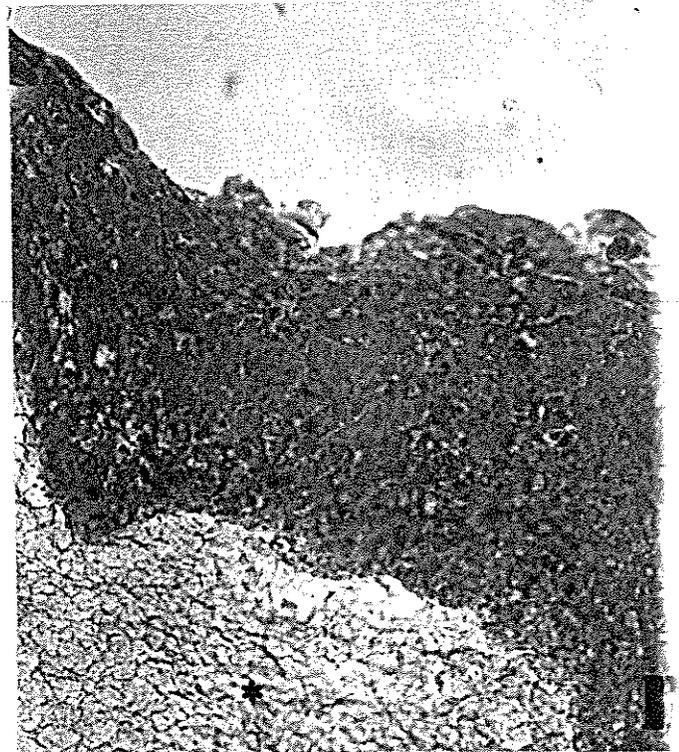
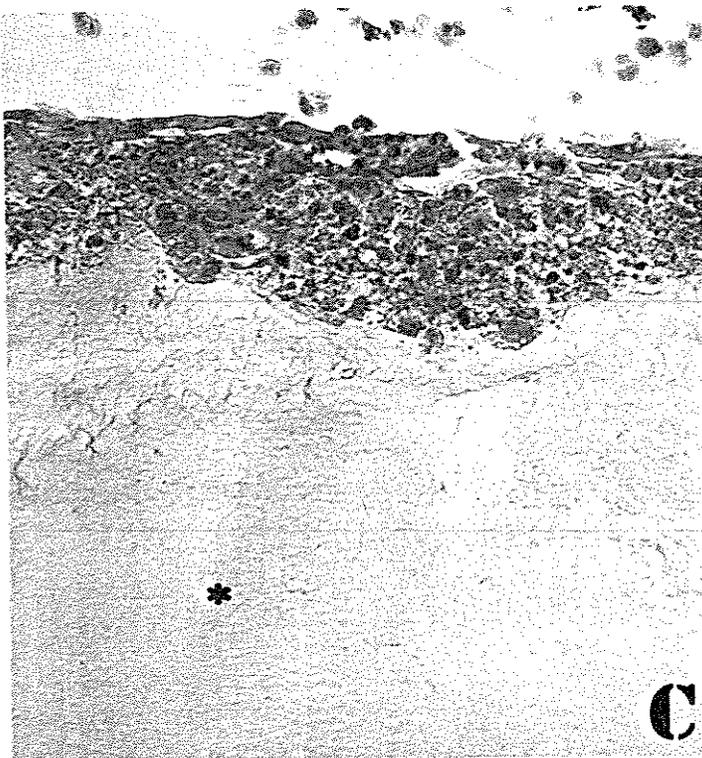
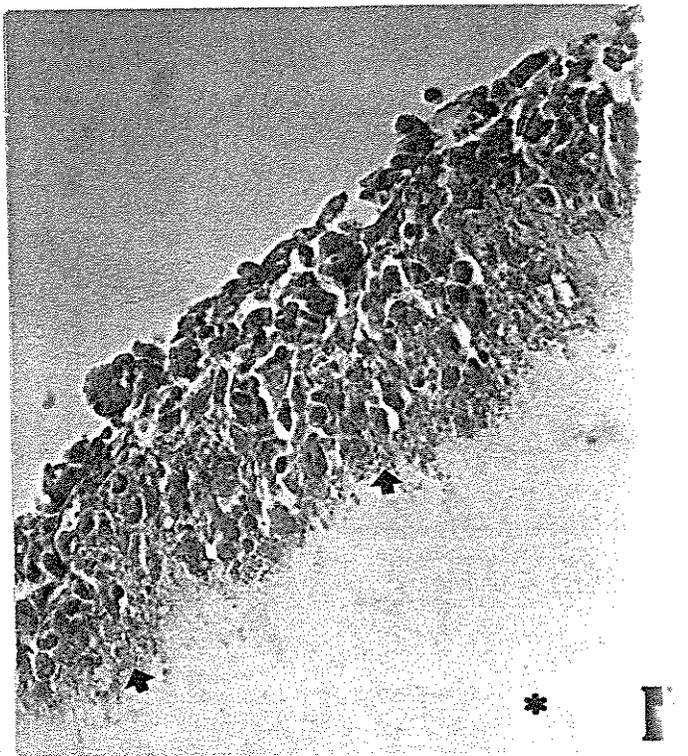
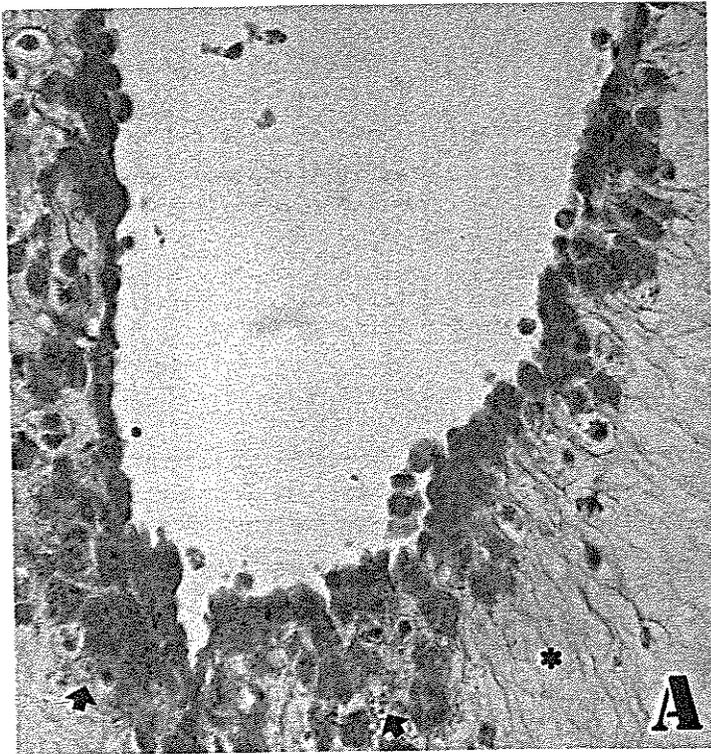


Figura 5: Células Vero cultivadas sobre lamínulas em tubos de Leighton e coradas com azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 420X.

- A. Células cultivadas por 48h, com 10% de SFB. Observar células levemente alongadas com núcleo (→), nucléolo (→) e citoplasma (➡) metacromáticos.
- B. Células com 120h de cultivo sem SFB. Observar células com núcleo ortocromático (➡), nucléolo (→) e citoplasma (→) levemente metacromáticos.
- C. Células com 120h de cultivo com 10% de SFB. Região de tapete celular fechado com células com núcleo ortocromático (➡), nucléolo (→) e citoplasma metacromático (→).
- D. Células cultivadas com 10% de SFB mais dexametasona por 120h. Observar células com núcleo ortocromático (➡), nucléolos (→) e citoplasma com alto grau de metacromasia (→).
- E. Células cultivadas com 20% de SFB por 120h. Note células com núcleo ortocromático (→), nucléolo (→) e citoplasma (➡) levemente metacromáticos.

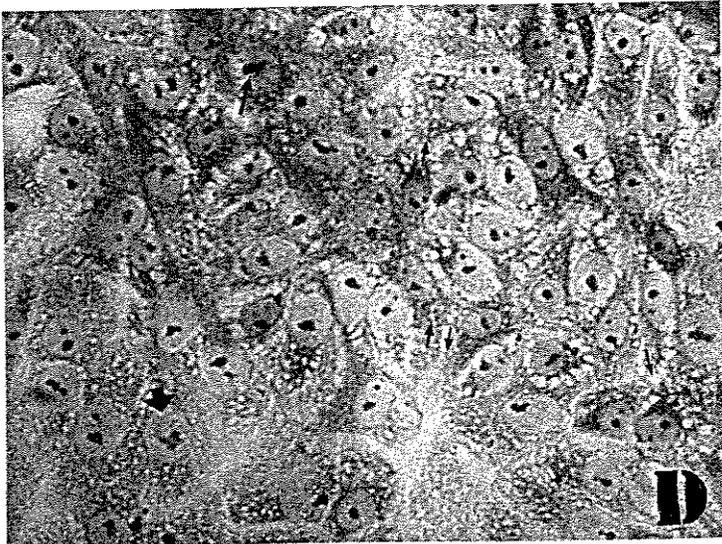
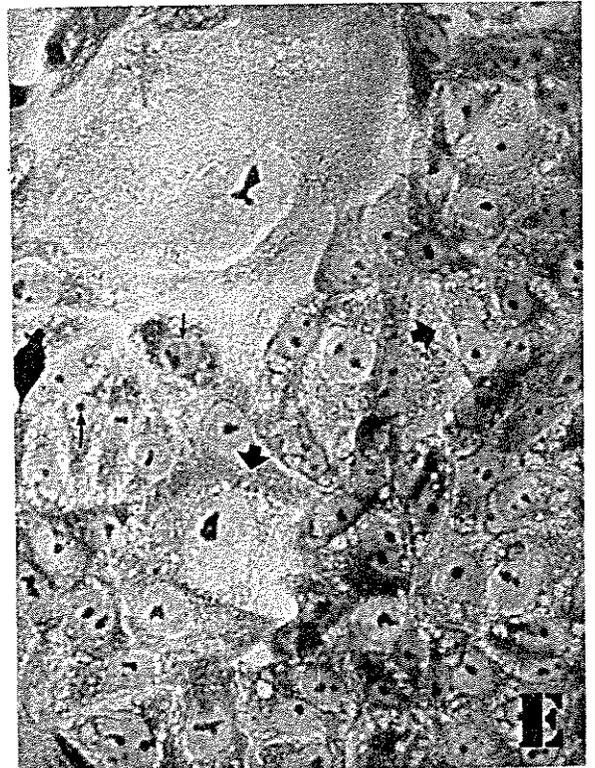
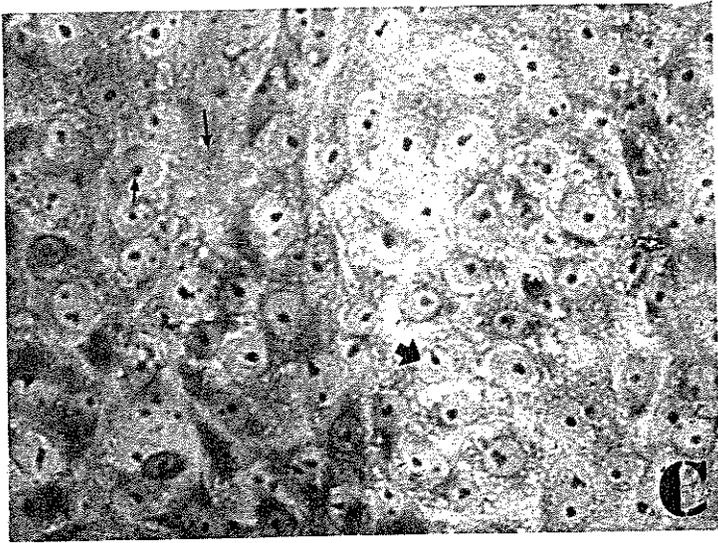
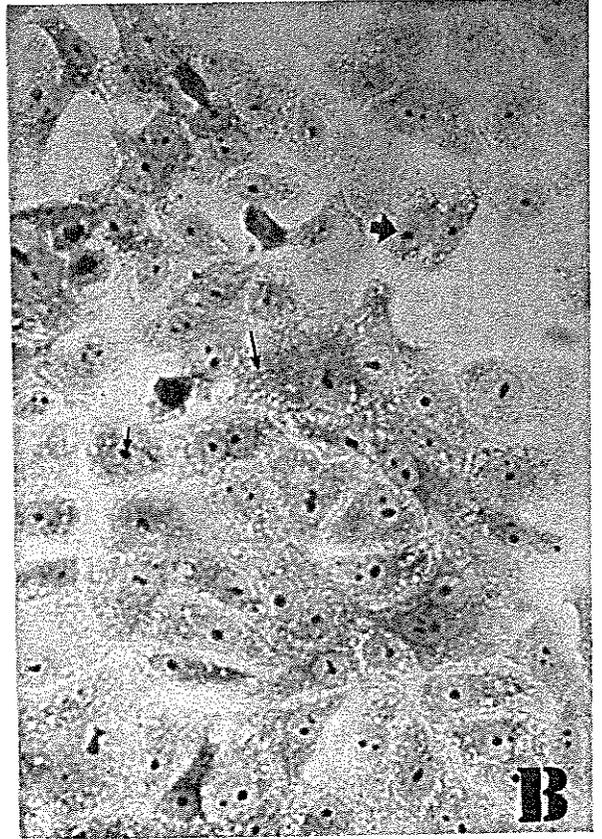
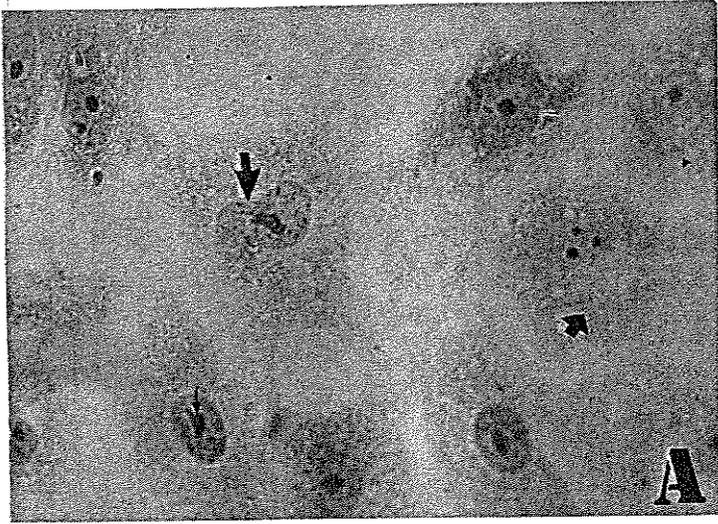


Figura 6: Células Vero cultivadas sobre lamínulas em tubos de Leighton por 240h e coradas com azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 420X.

- A. Células cultivadas sem SFB. Observar núcleo e nucléolo levemente metacromáticos. Citoplasma pouco evidenciado (→). Presença de células com cromatina mais condensada e nucléolo não evidente (➡).
- B. Células cultivadas com 10% de SFB. Observar células com núcleo ortocromático (→), nucléolo (➡) e citoplasma (→) com basofilia metacromática. Observar também vacúolos no citoplasma não corados (➤).
- C. Células cultivadas com 10% de SFB mais dexametasona. Observar células com núcleos com ortocromasia intensa (➡) e suave (➤), nucléolo (→) e citoplasma exibindo leve metacromasia (→). Notar também grumo celular intensamente metacromático (◆).
- D. Células cultivadas com 20% de SFB. Note células com núcleo ortocromático (→), nucléolo (→) e citoplasma metacromáticos (➡).

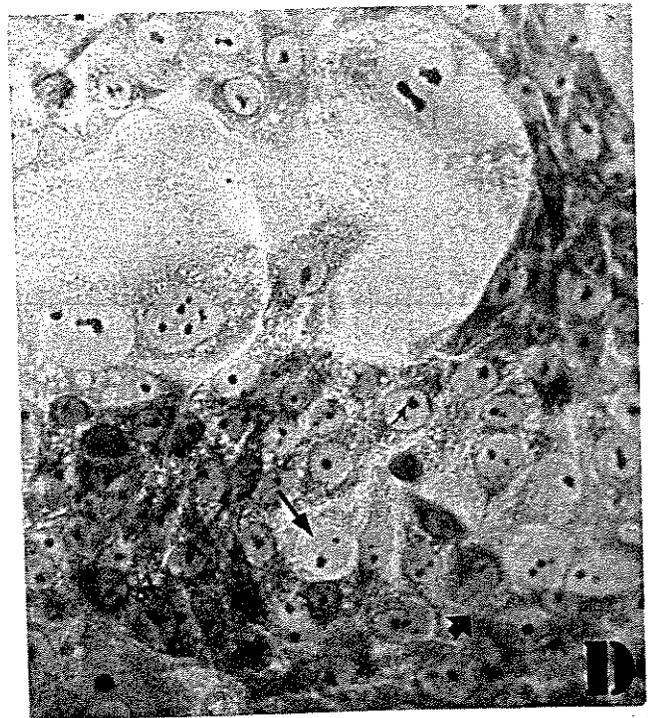
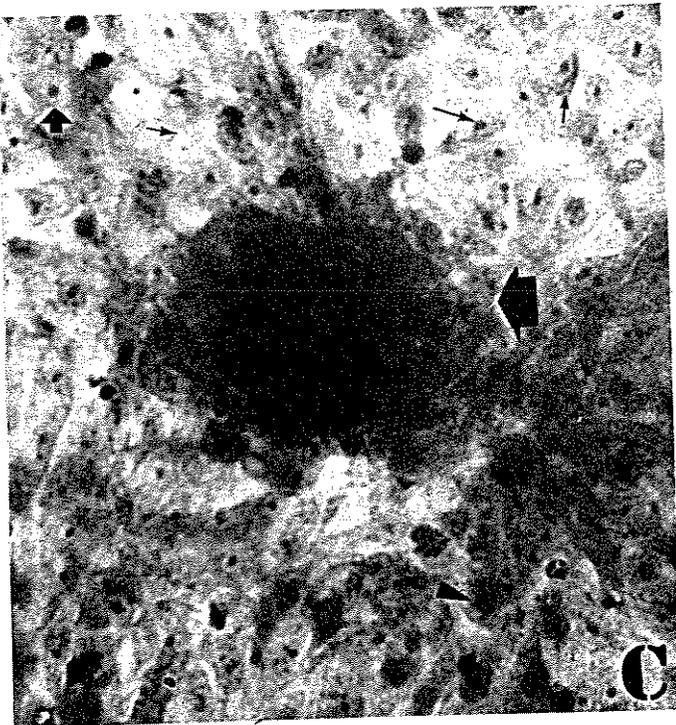
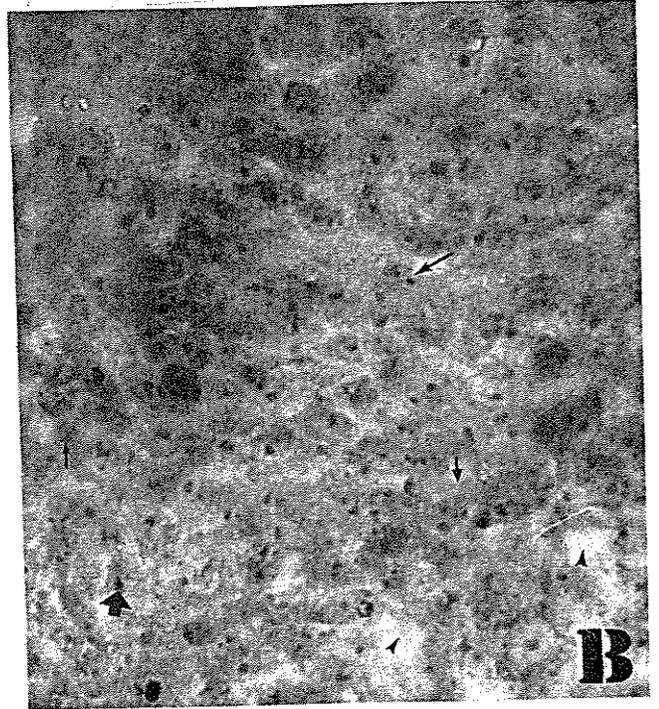
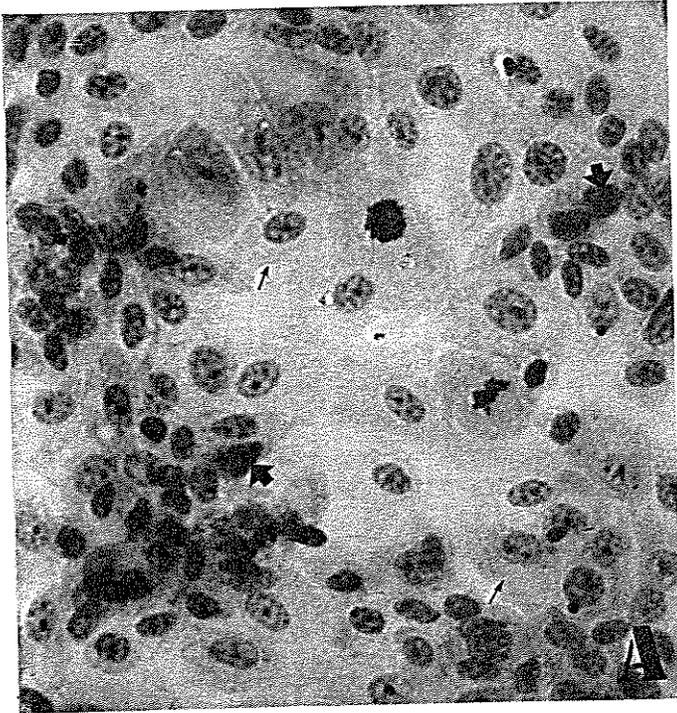


Figura 7: Células Vero cultivadas sobre gel de colágeno tipo I e coradas com azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 420X.

O gel de colágeno em todas as micrografias está representado por (*).

- A. Células cultivadas por 48h com 10% de SFB. Observar células com núcleo ortocromático, nucléolo e citoplasma levemente metacromáticos. O gel de colágeno não mostrou-se corado pelo AT.
- B. Células cultivadas sem SFB e colhidas com 120h. Encontramos nessa figura uma estratificação de células com núcleos ortocromáticos e citoplasma levemente metacromático. Obsevamos também que, com infiltração de células para o interior do substrato colagênico, ocorreu a deposição de material metacromático (➡) ao redor das mesmas.
- C. Células cultivadas por 120h com 10% de SFB. Encontramos aqui intensa infiltração e deposição de material metacromático (➡) ao redor das células no interior do gel de colágeno tipo I.
- D. Células cultivadas com 10% de SFB mais DEX e analisadas com 120h. A figura mostra um estrato formado por células com núcleos e citoplasma levemente metacromáticos. Não foi observada a infiltração celular para o interior do gel colagênico. Notar um região acelular levemente evidenciada pelo AT entre as células e o substrato (➡).
- E. Células cultivadas com 20% de SFB e colhidas com 120h. Células com núcleos e citoplasma metacromáticos compondo um espesso estrato celular. Não foi encontrado pontos de infiltração para o interior do gel de colágeno. Observa-se também região acelular difusa evidenciada pelo AT (➡).

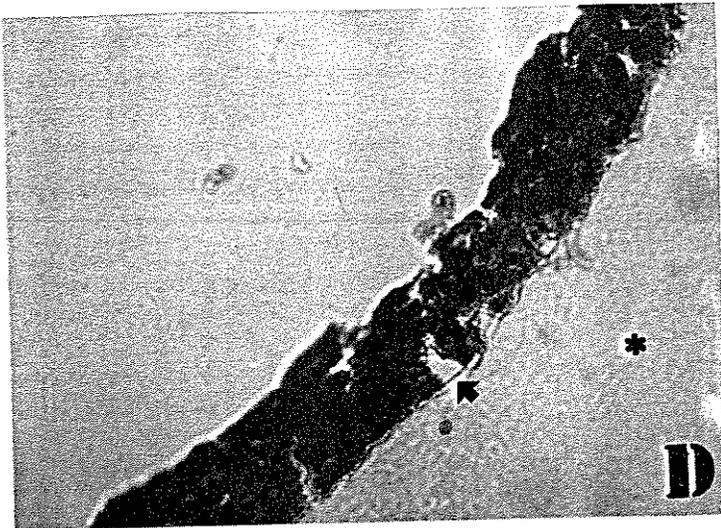
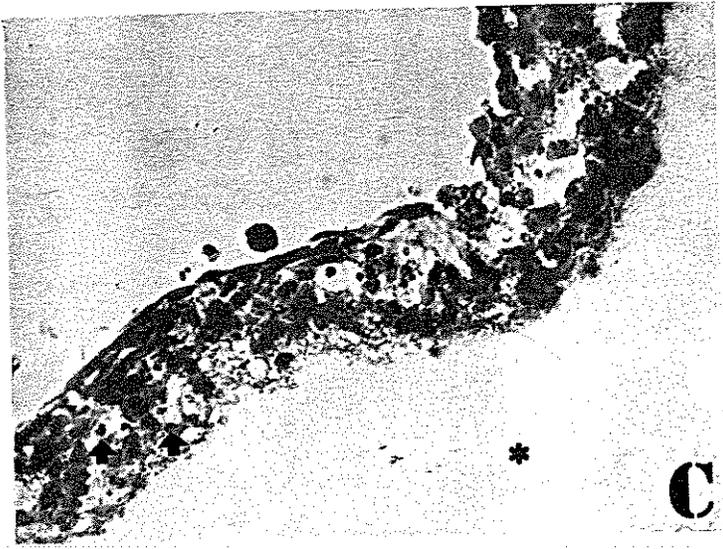
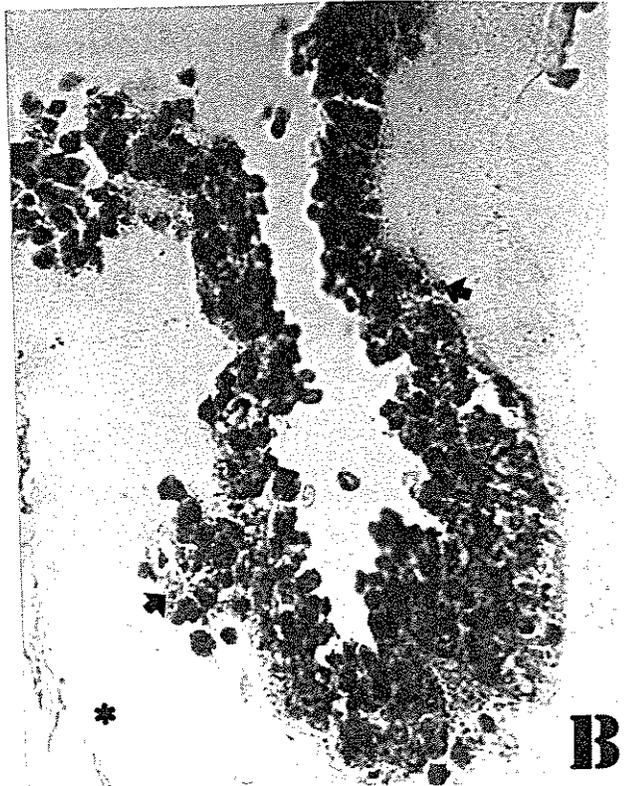
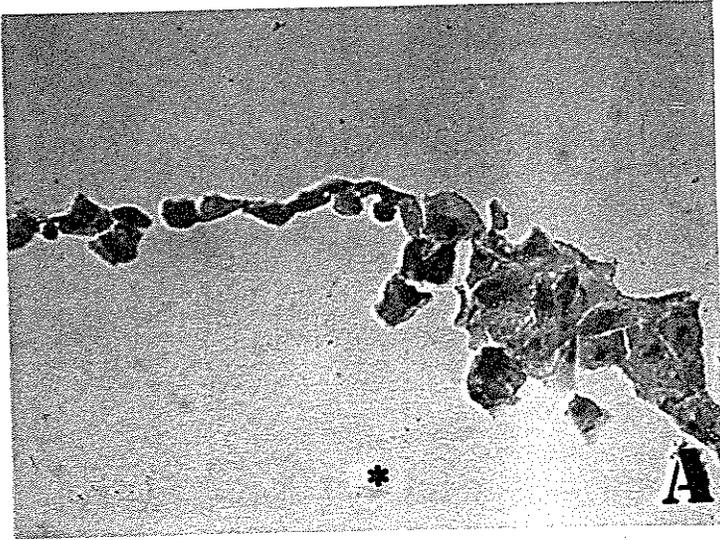


Figura 8: Células Vero cultivadas sobre gel de colágeno tipo I por 240h e coradas com azul de toluidina pH 4,0. Aumento: 420X

O gel de colágeno em todas as micrografias está representado por (*).

- A. Células cultivadas sem SFB. Notar a infiltração de células com núcleos e citoplasma metacromáticos, além da deposição de material granular também metacromático (➡) no interior do substrato colagênico.
- B. Células cultivadas com 10% de SFB. Observamos intensa infiltração de células com núcleos e citoplasma metacromáticos. Foi observado também a deposição de material granular metacromático (➡) no interior do gel de colágeno.
- C. Células cultivadas com 10% de SFB mais DEX. A figura mostra um estrato de células com núcleos e citoplasma metacromáticos, sem pontos de infiltração para interior do substrato colagênico. Alguns núcleos ortocromáticos também podem ser vistos.
- D. Células cultivadas com 20% de SFB. A figura mostra um estrato com células de núcleos metacromáticos e ortocromáticas, além de citoplasma metacromático. Não encontramos migração para o interior do gel de colágeno. Observamos também uma região acelular bem definida evidenciada pelo AT (➡).

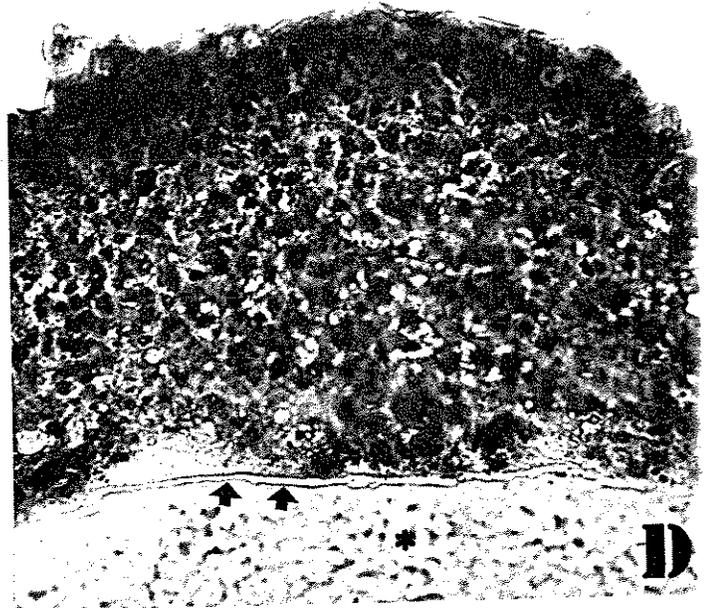
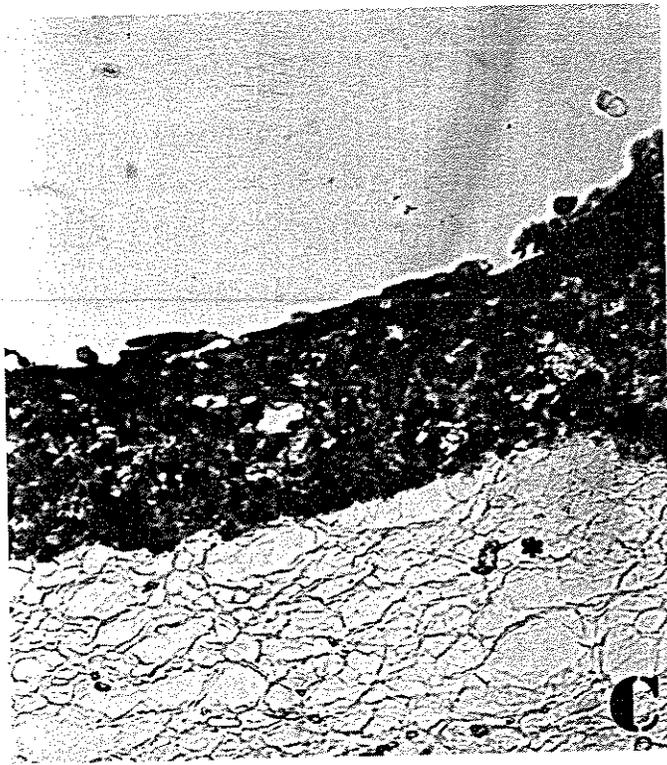
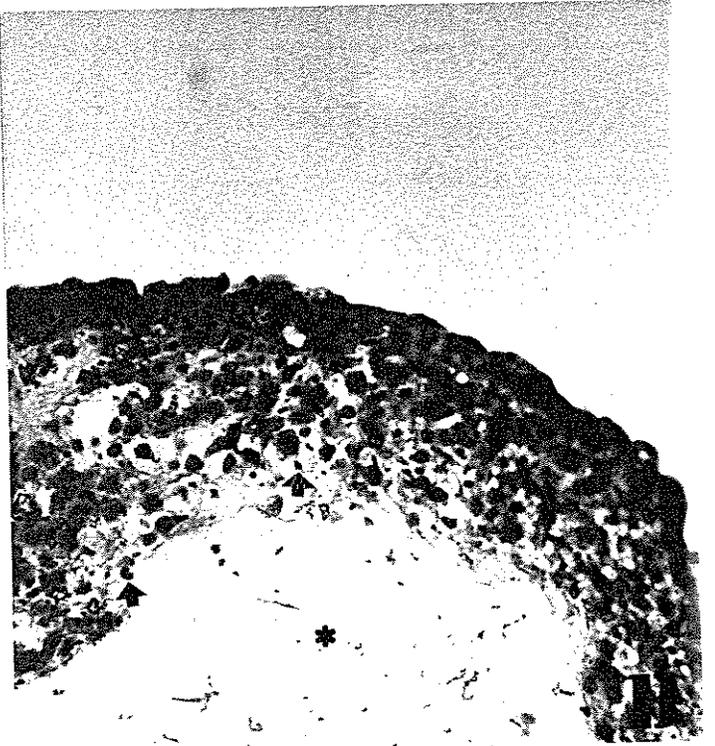
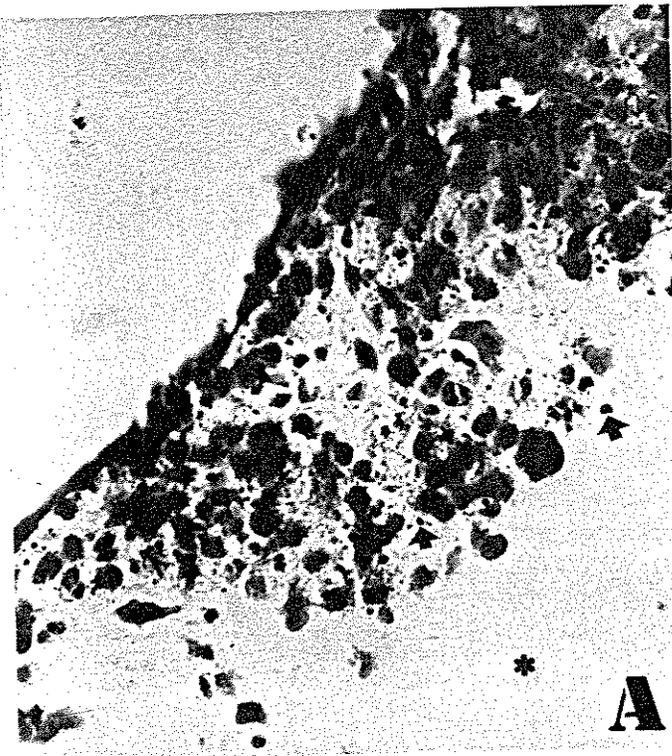


Figura 9: Células Vero cultivadas sobre lamínulas em tubos de Leighton e coradas com xylidine ponceau pH 2,5. Aumento: 420X

- A. Células com 48h de cultivo mantidas com 10% de SFB. Citoplasma levemente corado, com alguma vacuolização (→). Núcleo (→) e nucléolo (➡) melhor evidenciados.
- B. Células cultivadas por 120h sem SFB. Células com citoplasma fracamente corado e núcleo mais evidente. Nucléolo pouco corado. Ver também vacuolização citoplasmática não corada (→).
- C. Células cultivadas com 10% de SFB por 120h. É mostrado uma região de tapete celular fechado com células ricamente coradas nas porções citoplasmáticas e nucleares, e nucléolo bem evidenciado.
- D. Células mantidas em cultura por 120h com 10% de SFB mais dexametasona. Observar grumo celular em formação intensamente corado (➡) e células com alguma vacuolização citoplasmática (→).
- E. Células cultivadas com 20% de SFB por 120h. Região de tapete celular confluyente mostrando células bem coradas pelo XP.

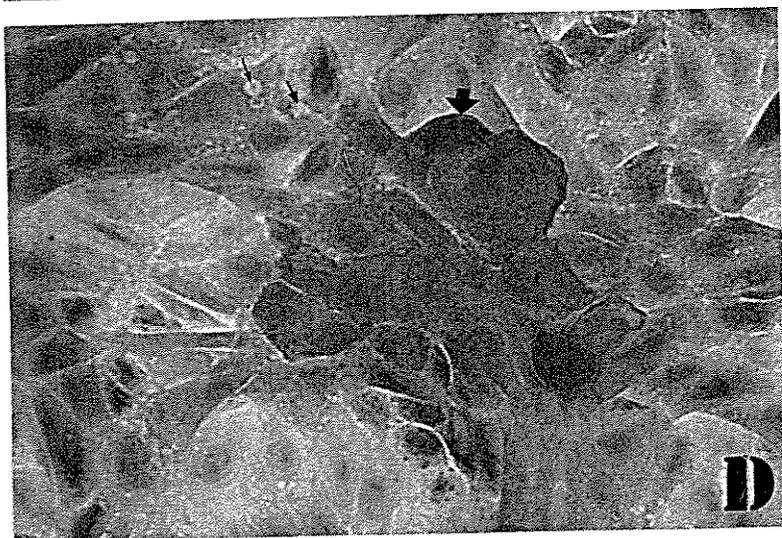
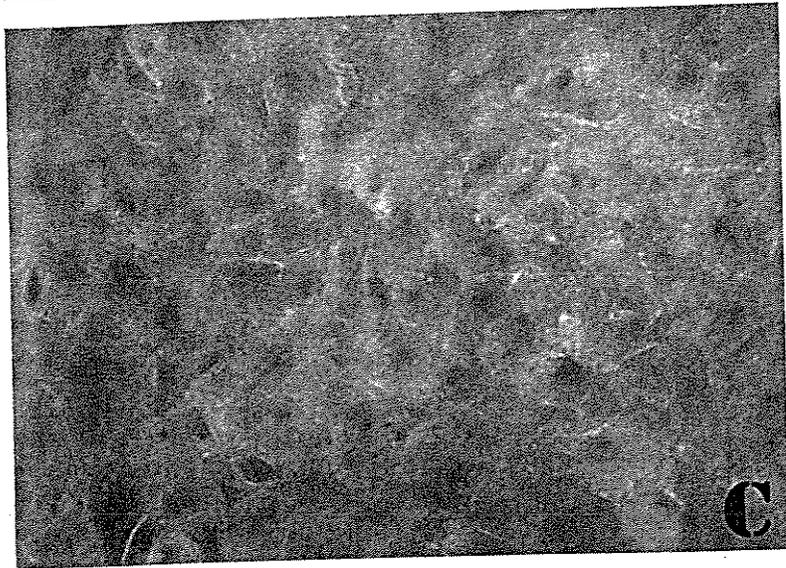
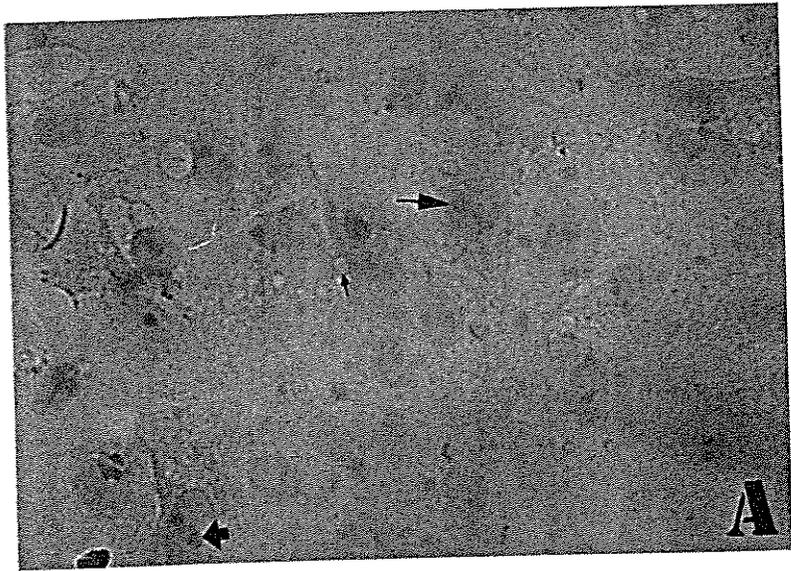


Figura 10: Células Vero cultivadas sobre lamínulas em tubos de Leighton por 240h e coradas com xylidine ponceau pH 2,5. Aumento: 420X

- A. Células cultivadas sem SFB. Ver células vacuolizadas (→) e células de formato irregular (⇒) com prolongamentos.
- B. Células cultivadas com 10% de SFB. Região de tapete celular confluyente com células intensamente coradas.
- C. Células mantidas em cultura com 10% de SFB mais dexametasona. Observar grumo celular intensamente corado (⇒) e células com leve vacuolização citoplasmática (→).
- D. Células cultivadas com 20% de SFB. Observar região no tapete celular com pontos de estratificação (⇒).

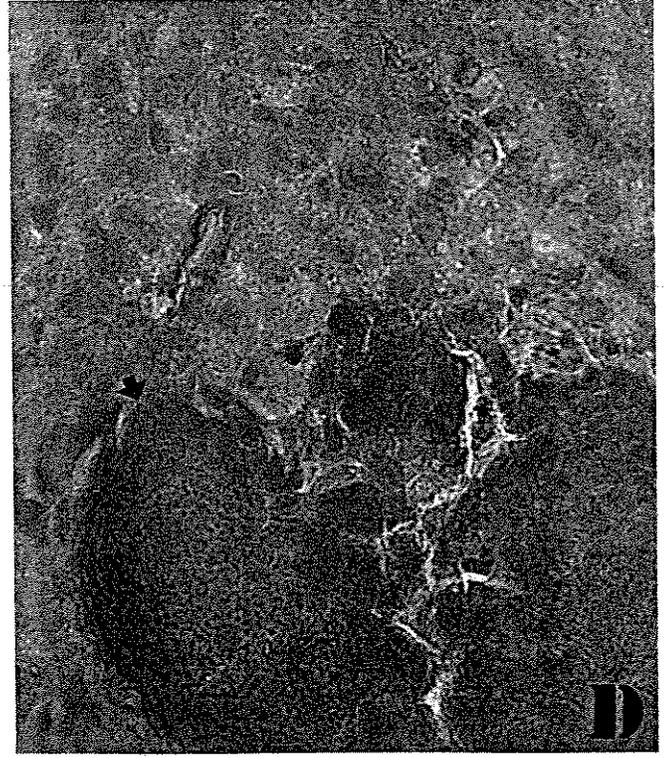
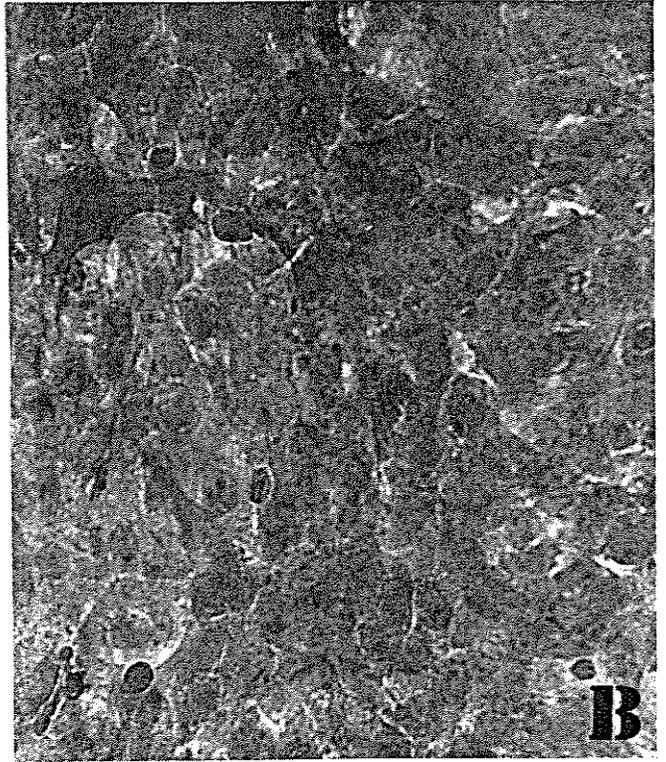
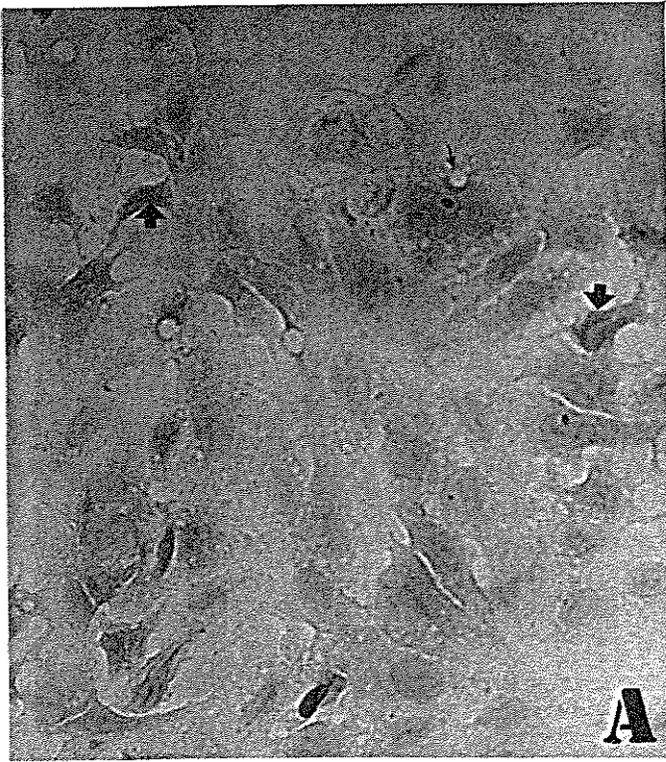


Figura 11: Células Vero cultivadas sobre gel de colágeno tipo I e coradas com xylidine ponceau pH 2,5. Aumento: 420X

O gel de colágeno em todas as micrografias está representado por (*).

- A. Células cultivadas por 48h com 10% de SFB. Notamos células bem coradas sobre o gel. Encontramos o substrato levemente evidenciado pelo XP.
- B. Células colhidas com 120h e cultivadas sem SFB. Encontramos nessa figura células bem coradas juntamente com o depósito de material granular no gel (→). O substrato colagênico mostrou-se levemente corado pelo XP.
- C. Células cultivadas por 120h com 10% de SFB. A figura mostra estrato celular intensamente corado. Não pode ser observada aqui infiltração bem definida. Encontramos também deposição de material (→) no interior do gel de colágeno.
- D. Células cultivadas com 10% de SFB mais DEX e analisadas com 120h. Pode ser observado nessa figura estrato celular intensamente corado. O gel não mostrou-se modificado pelas células.
- E. Células cultivadas com 20% de SFB e colhidas com 120h.. Pode ser observado nessa figura também um estrato celular intensamente corado. Novamente o gel não foi modificado pelas células.

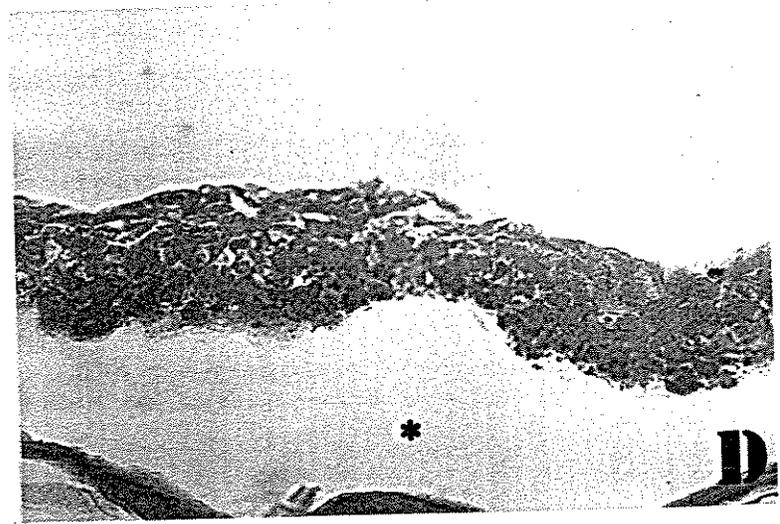
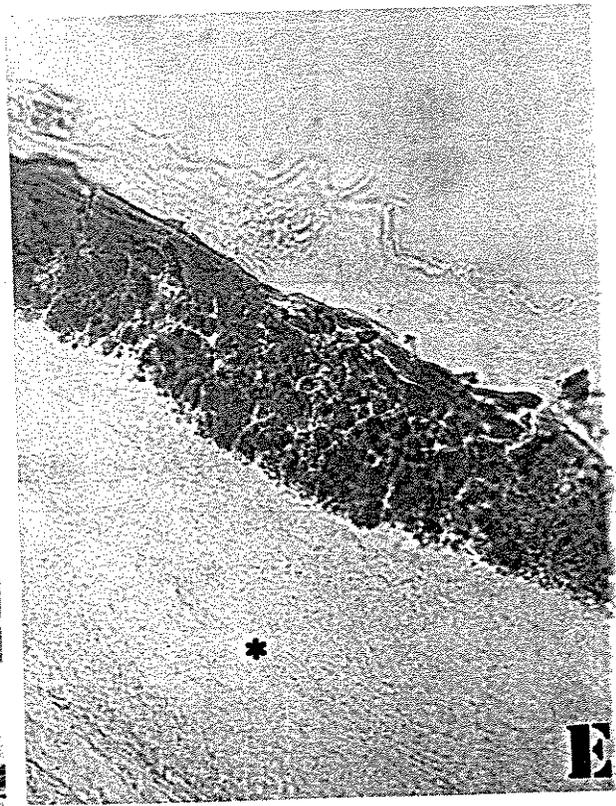
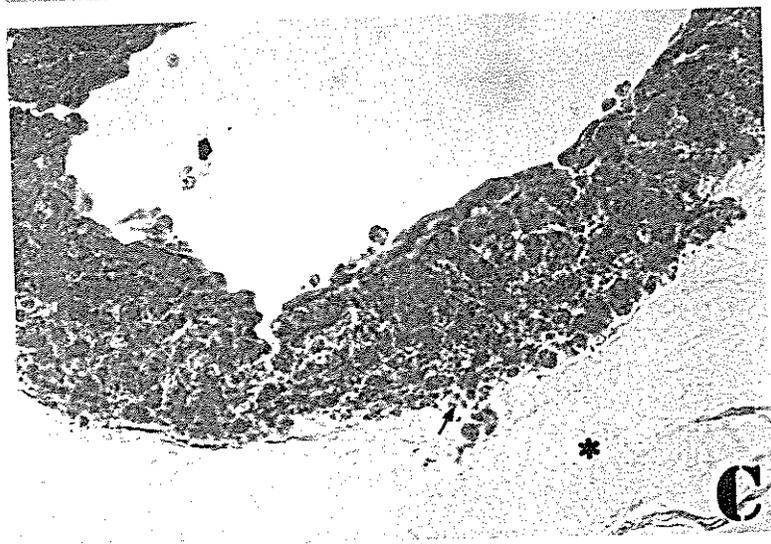
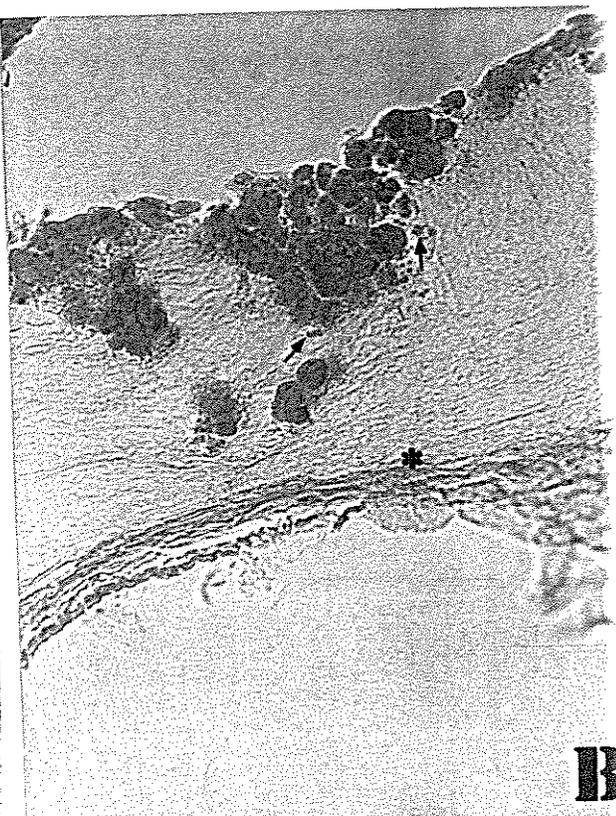
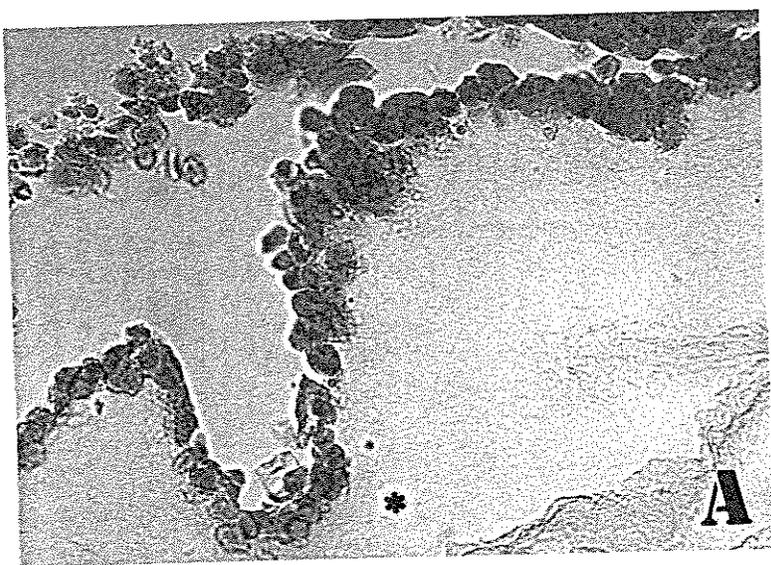


Figura 12: Células Vero cultivadas sobre gel de colágeno tipo I por 240h e coradas com xylydine ponceau pH 2,5. Aumento: 420X

O gel de colágeno em todas as micrografias está representado por (*).

- A. Células cultivadas sem SFB. Encontramos nessa figura células bem coradas, além de material granular depositado (→) ambos no interior do gel. O substrato colagênico, no geral, mostrou-se levemente corado pelo XP.
- B. Células cultivadas com 10% de SFB. É vista aqui intensa infiltração de células bem coradas pelo XP, sendo encontrado ao redor delas material granular depositado (→) no interior do substrato.
- C. Células mantidas com 10% de SFB mais DEX. Observamos estrato celular intensamente corado, sendo esse apoiado no gel colagênico. Aumento de 420 X.
- D. Células mantidas com 20% de SFB. Pode ser observado nessa figura novamente estrato celular intensamente corado, sendo esse apoiado no gel colagênico.

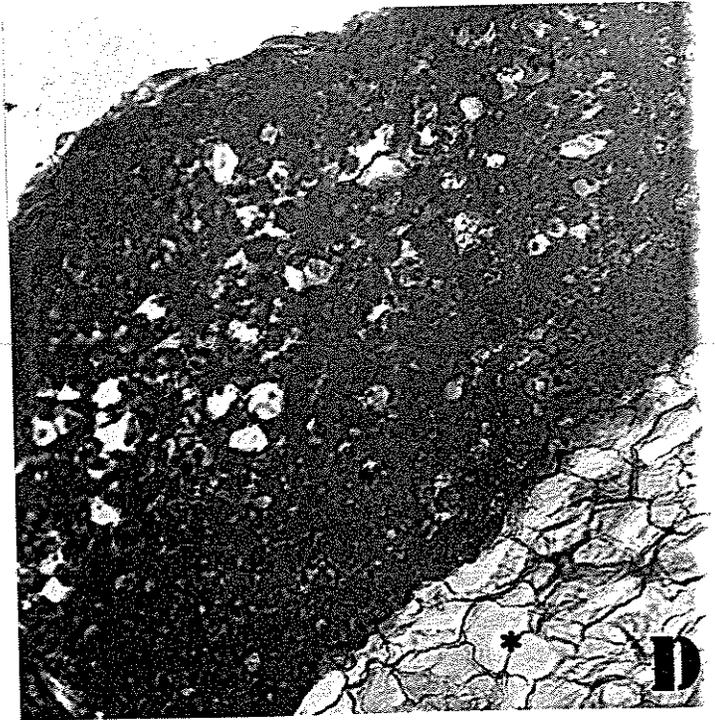
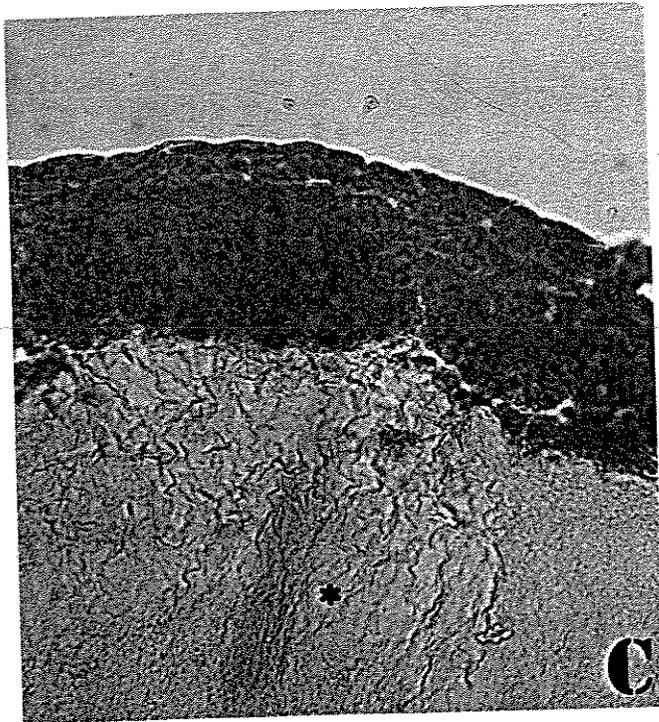
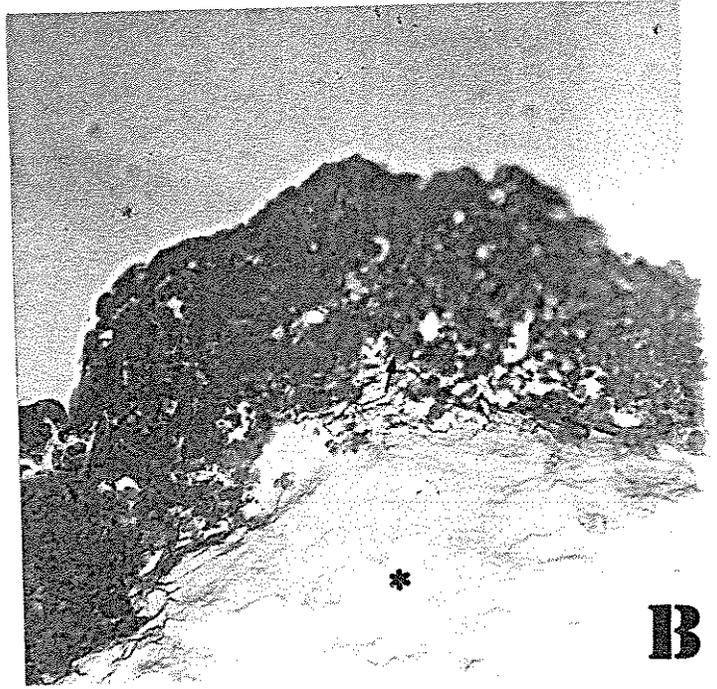
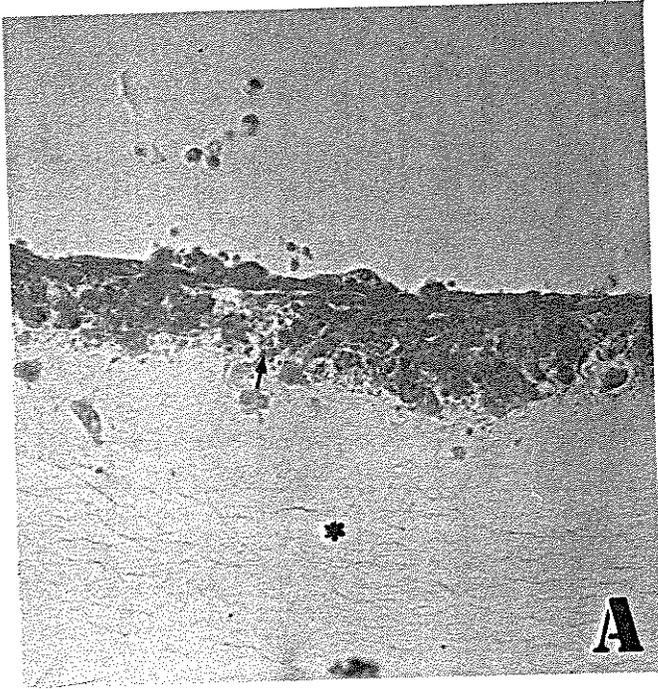


Figura 13: Células Vero cultivadas sobre lamínulas em tubos de Leighton. Imunocitoquímica para colágeno tipo IV. Aumento: 420X

- A. Aqui vemos células cultivadas por 48h com 10% de SFB. Podemos observar a presença de material fibrilar (→) abaixo das células.
- B. Células cultivadas sem SFB e analisadas com 120h. Podemos observar a presença de material fibrilar (→) em quantidades muito pequenas.
- C. Células cultivadas com 10% de SFB por 120h. A figura mostra grande quantidade de fibrilas (→) abaixo das células.
- D. Células cultivadas com 10% de SFB mais DEX e colhidas com 120h. Observamos apenas uma coloração de fundo, sem a presença de fibrilas.
- E. Amostras cultivadas com 20% de SFB e analisadas com 120h. Encontramos também a presença de material fibrilar (→) junto ao tapete celular.

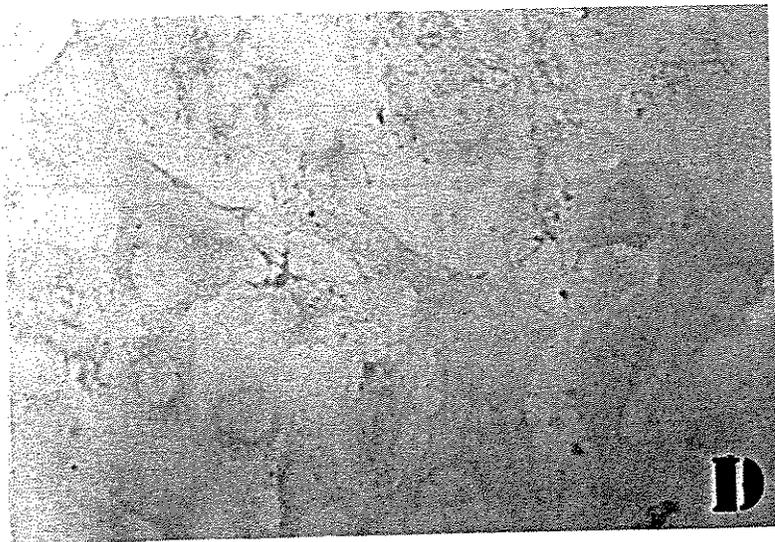
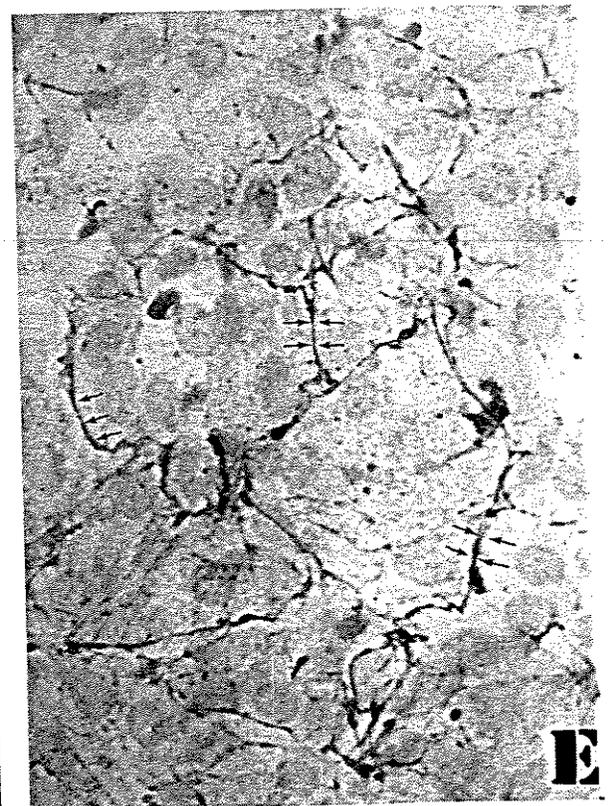
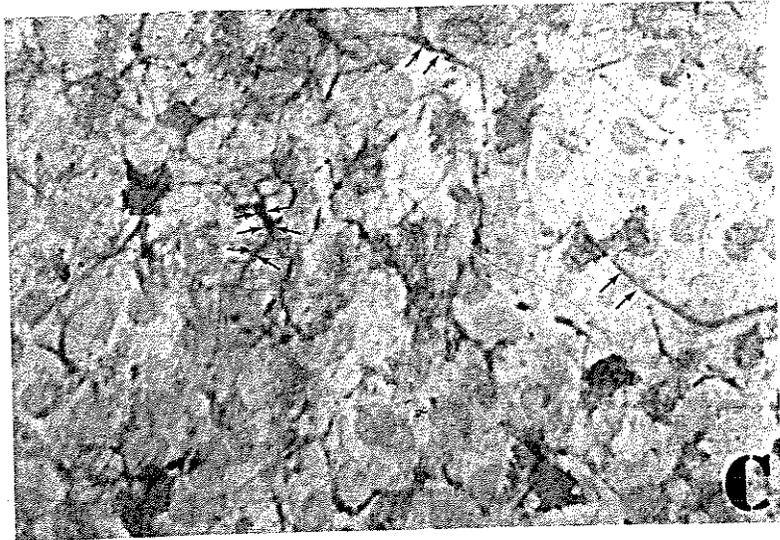
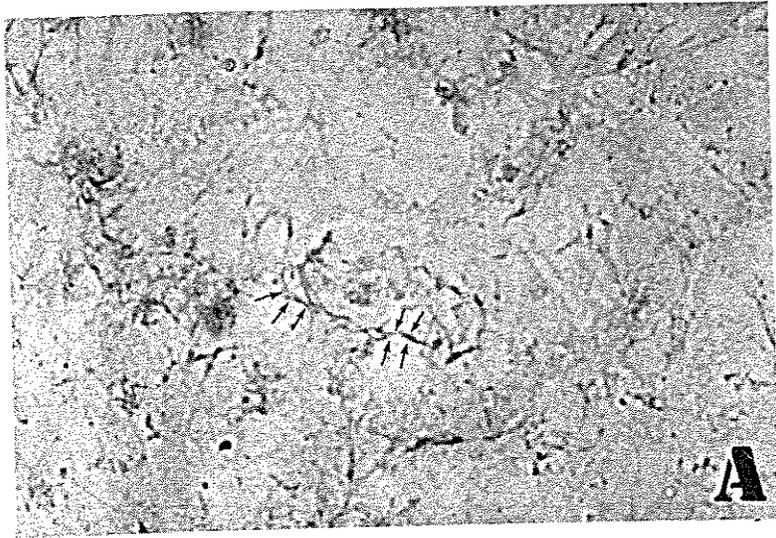


Figura 14: Células Vero cultivadas sobre lamínulas em tubos de Leighton por 240h. Imunocitoquímica para colágeno tipo IV. Aumento: 420X

- A. Células mantidas sem SFB. Não encontramos material fibrilar nessas condições de cultura.
- B. Células cultivadas na presença de 10% de SFB. A figura mostra várias fibrilas (→), abaixo do tapete celular.
- C. Amostras mantidas com 10% de SFB mais DEX. Encontramos uma quantidade menor de fibrilas (→) junto ao tapete celular.
- D. Células cultivadas com 20% de SFB. Podemos observar material fibrilar reticular (→) junto as células.

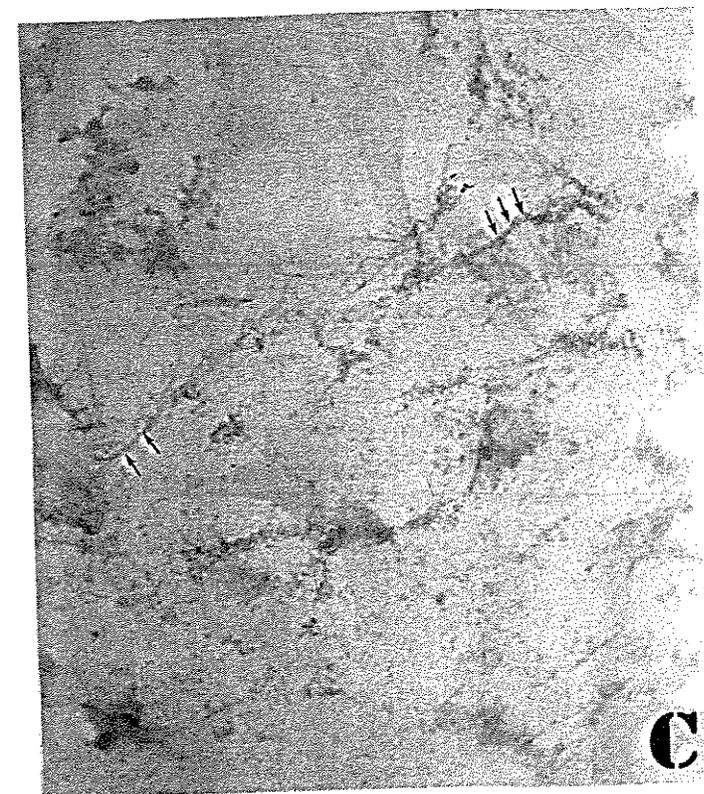
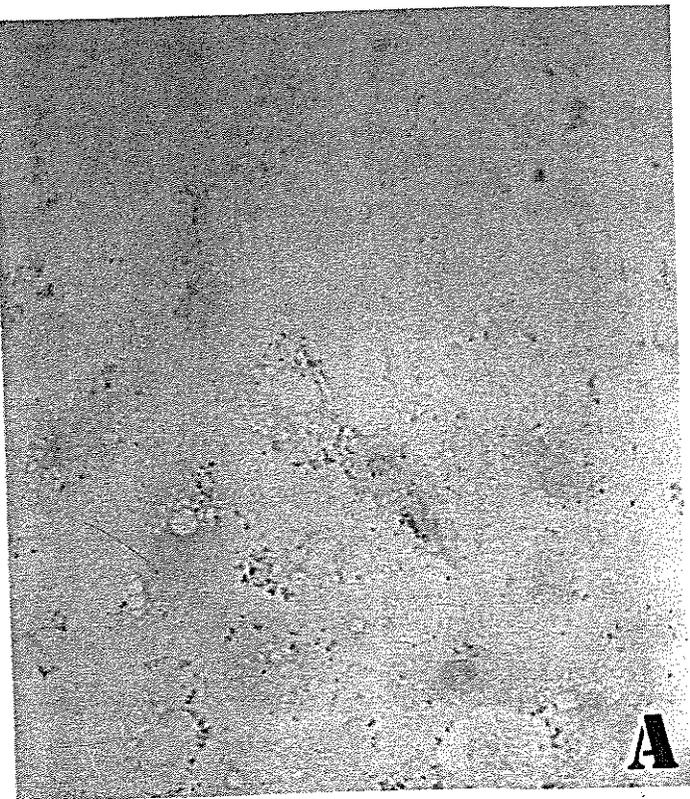


Figura 15: Células Vero cultivadas sobre gel de colágeno tipo I. Imunocitoquímica para colágeno tipo IV. Aumento: 420X

O gel de colágeno em todas as micrografias está representado por (*).

- A. Células cultivadas por 48h com 10% de SFB. Observamos monocamada celular com a presença de colágeno tipo IV (→) entre as células e o substrato, entretanto a reação é interrompida em alguns pontos.
- B. Células cultivadas sem SFB e colhidas com 240h. Vemos aqui a não evidenciação de colágeno tipo IV no gel colagênio.
- C. Células cultivadas por 240h com 10% de SFB. É visto aqui intensa infiltração de células não sendo encontrado colágeno IV no interior do substrato.
- D. Células analisadas com 240h de cultivo e mantidas com 10% de SFB mais DEX. Observamos entre o estrato celular e o gel uma camada de colágeno tipo IV (→).
- E. Células mantidas com 20% de SFB e colhidas com 240h. Também pode ser observado nessa figura a presença de uma camada de colágeno tipo IV (→), entre o gel de colágeno tipo I e o estrato celular.

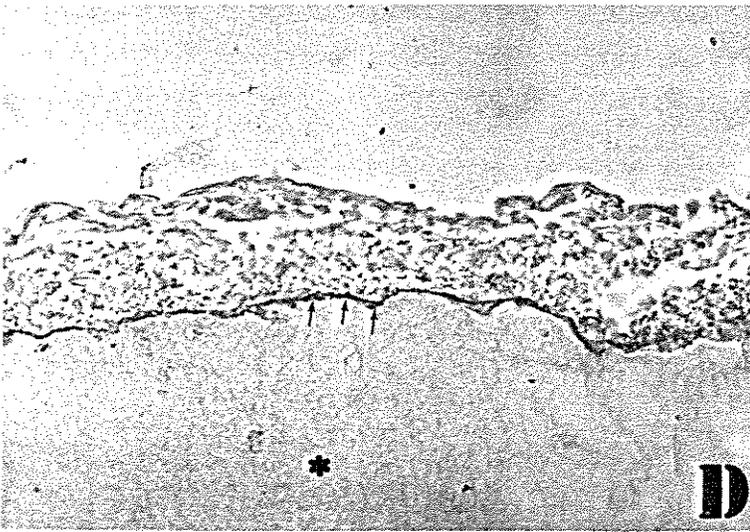
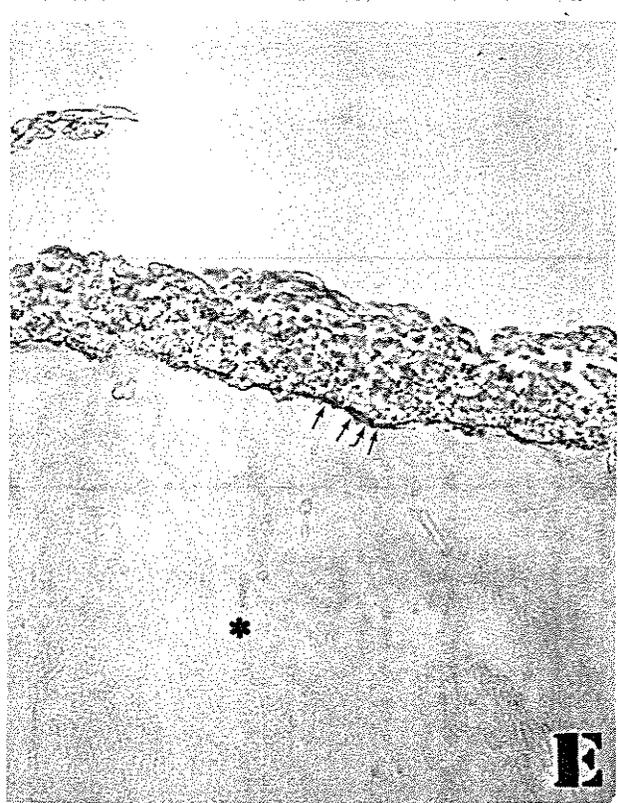
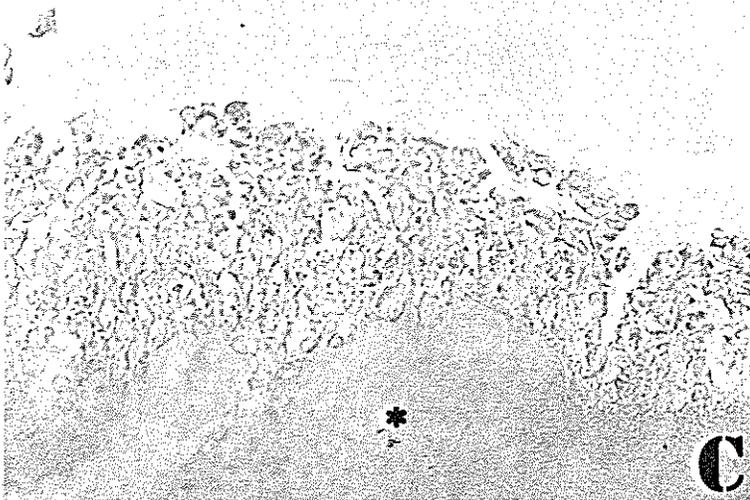
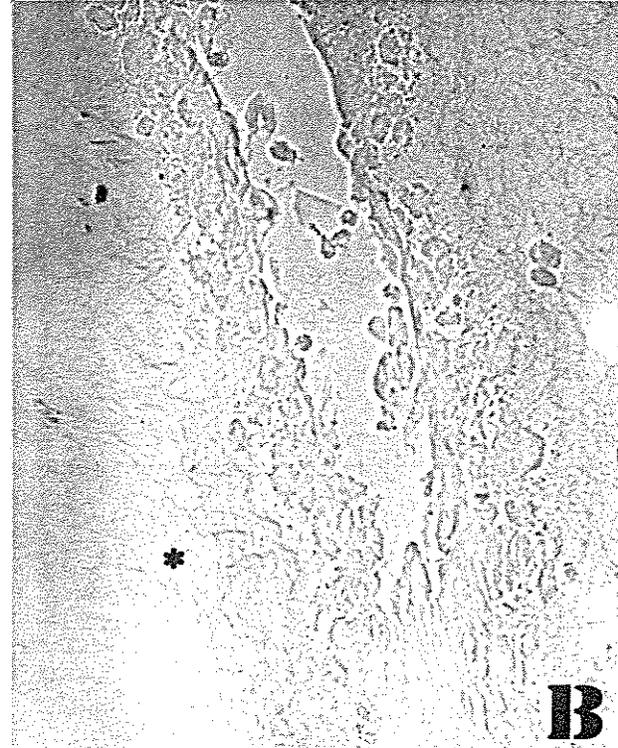
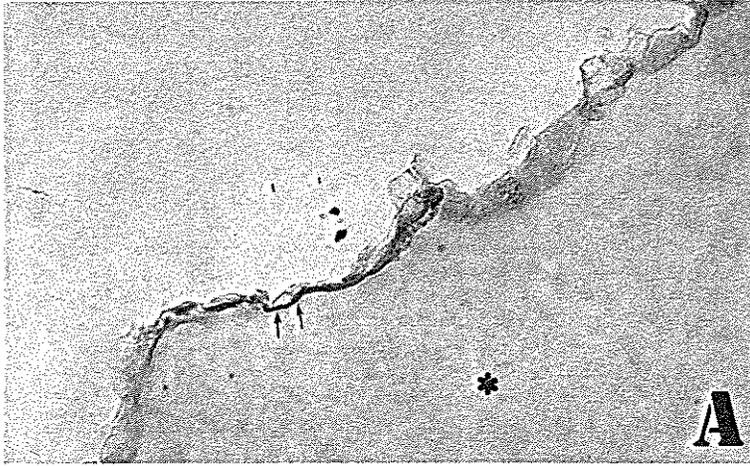


Figura 16: Células Vero cultivadas sobre lamínulas em tubos de Leighton. Imunocitoquímica para fibronectina. Aumento: 420X

- A. Células cultivadas por 48h, com 10% de SFB. Células com morfologia irregular ou levemente alongadas. Observamos a presença de fibronectina (→), distribuída pontualmente, sobre o tapete celular. Podemos verificar também a presença de FN no citoplasma, uma vez que encontramos imagens negativas de núcleos.
- B. Células cultivadas sem SFB e colhidas 120h de cultivo. Encontramos aqui células com menor quantidade de fibronectina na superfície celular (→), embora ainda esteja presente também no citoplasma das células.
- C. Células com 120h de cultivo com 10% de SFB. Pode ser observado aqui um discreto aumento de fibronectina (→) em relação as células mantidas sem SFB, mas ainda abaixo das amostras colhidas nas 48h iniciais.
- D. Células cultivadas com 10% de SFB mais dexametasona analisadas com 120h. Observamos redução na fibronectina citoplasmática, embora não no ambiente extracelular (→).
- E. Células cultivadas com 20% de SFB por 120h. Amostra onde encontramos a maior quantidade de fibronectina extracelular (→), essa com distribuição pontual. Podemos observar a mesma também no interior das células, novamente pela imagem negativa do núcleo.

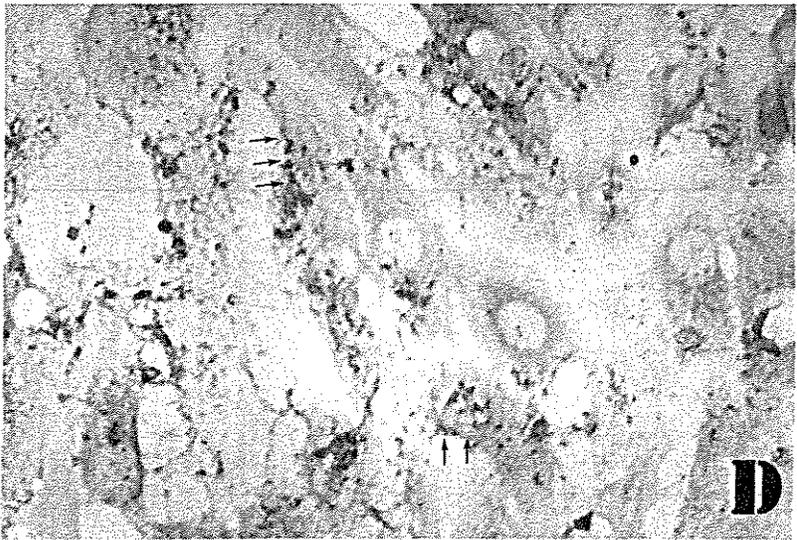
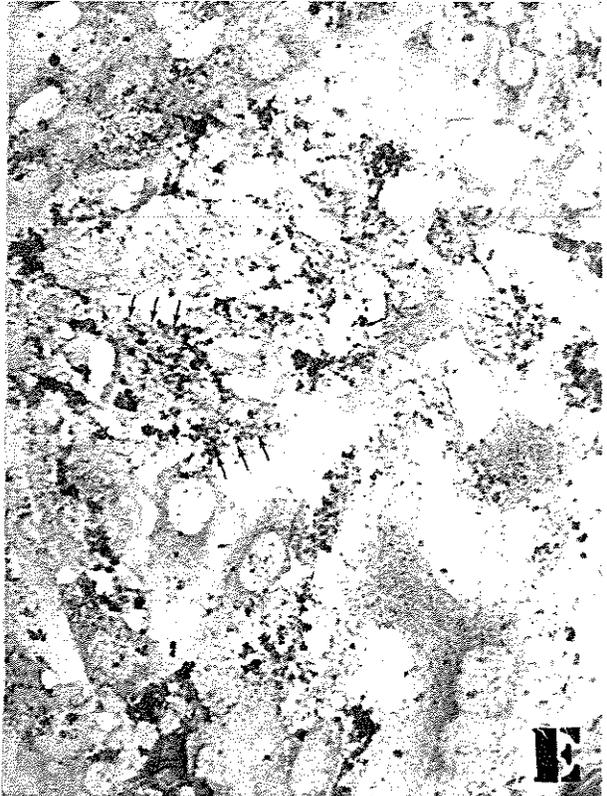
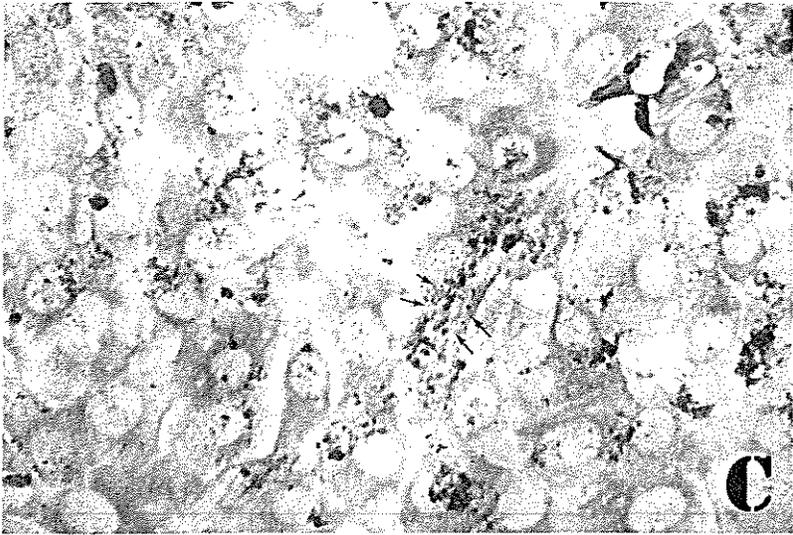
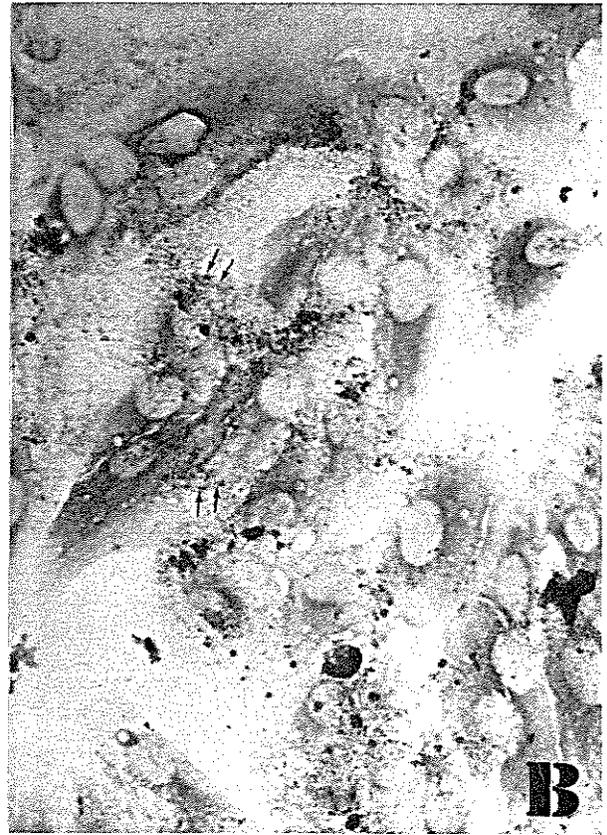
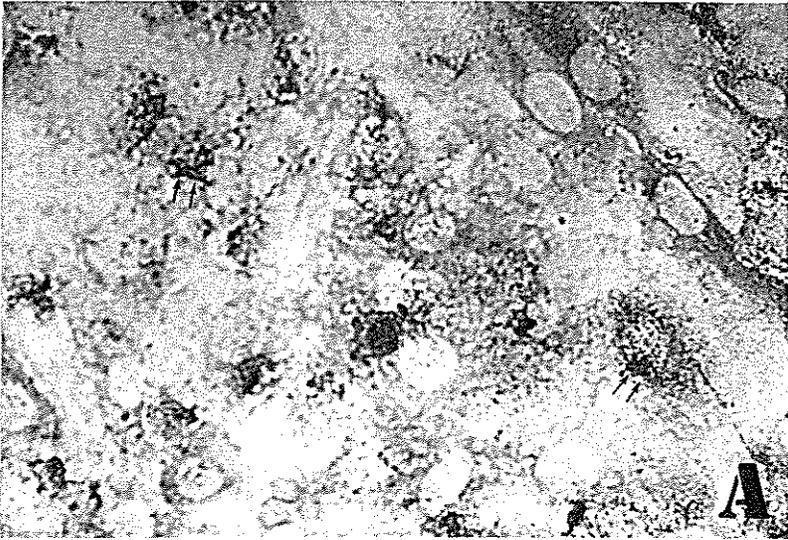


Figura 17: Células Vero cultivadas sobre lamínulas em tubos de Leighton por 240h. Imunocitoquímica para fibronectina. Aumento: 420X

- A. Células cultivadas sem SFB. A figura mostra células com pequena quantidade de fibronectina (→).
- B. Células mantidas com 10% de SFB. Podemos observar arranjo pontual não homogêneo de fibronectina (→) sobre as células.
- C. Células cultivadas com 10% de SFB mais dexametasona. Encontramos uma distribuição mais homogênea da fibronectina (→) sobre as células. Podemos notar também que os grumos celulares ricos em FN (⇒).
- D. Células cultivada com 20% de SFB. Temos aqui maior quantidade de fibronectina sendo essa distribuição em geral amorfa (⇒). Em alguns pontos encontramos algumas fibrilas sobre as células (→).

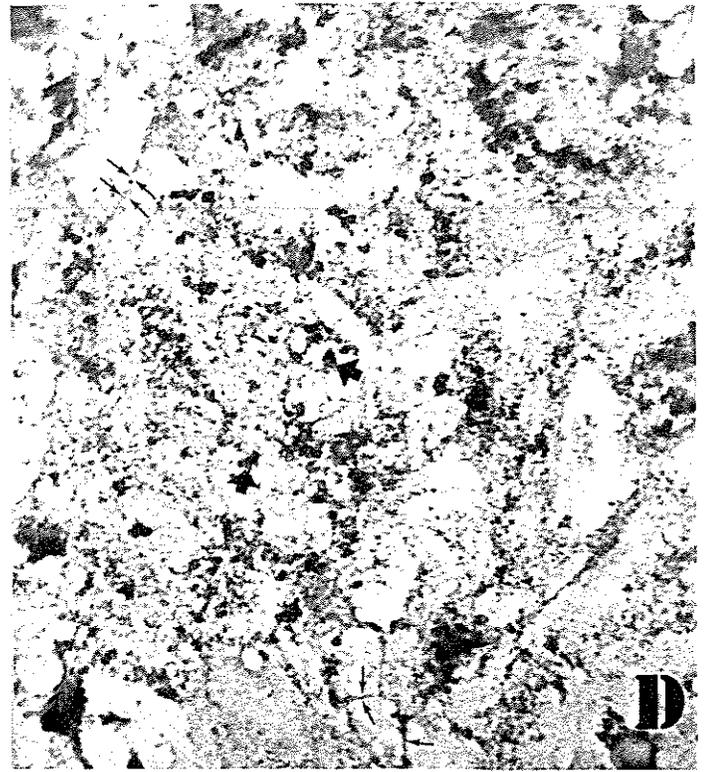
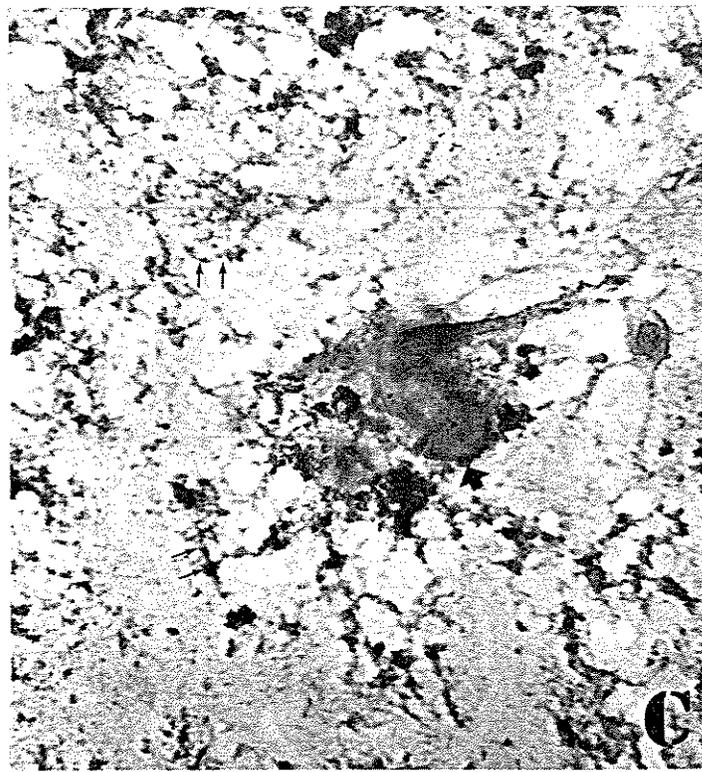
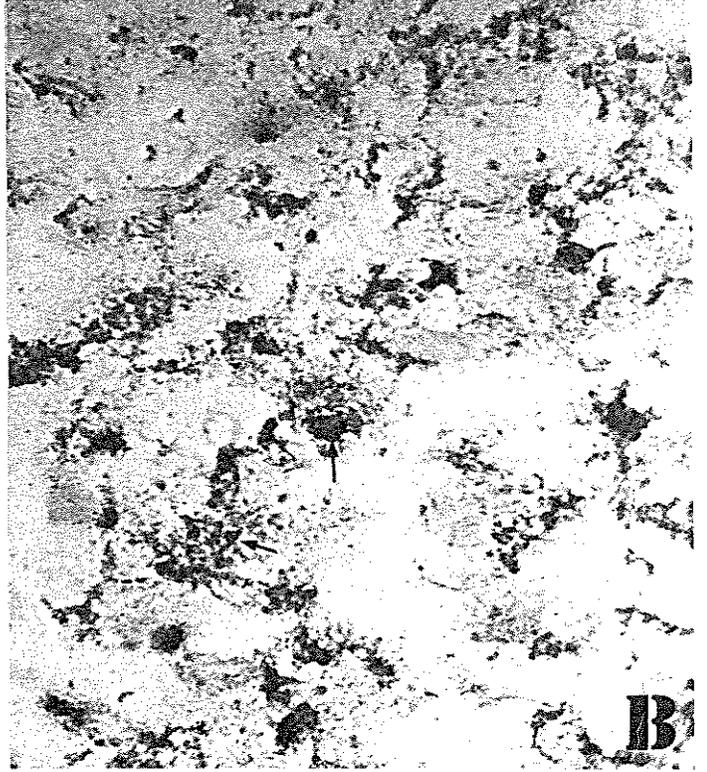
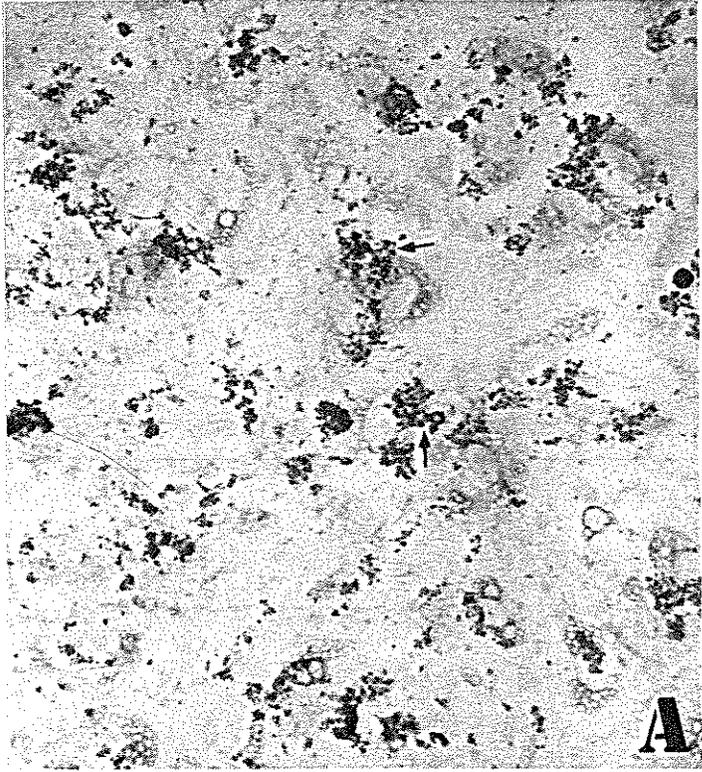
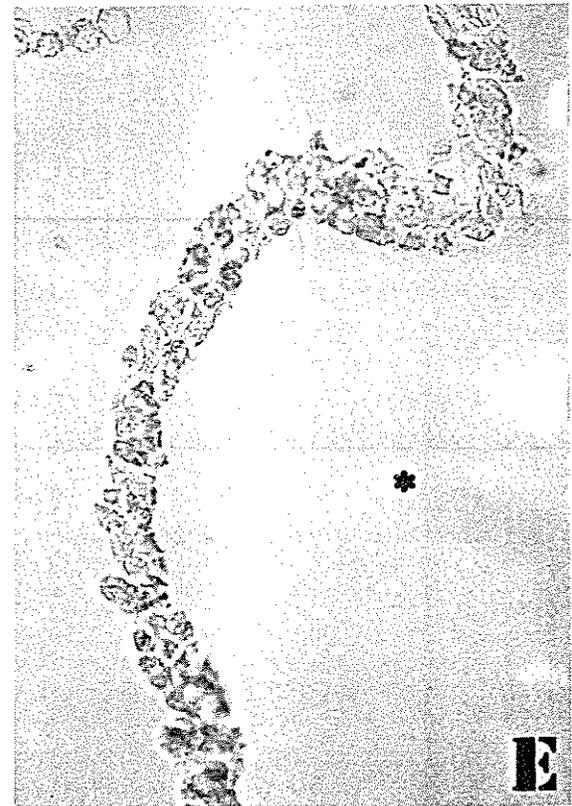
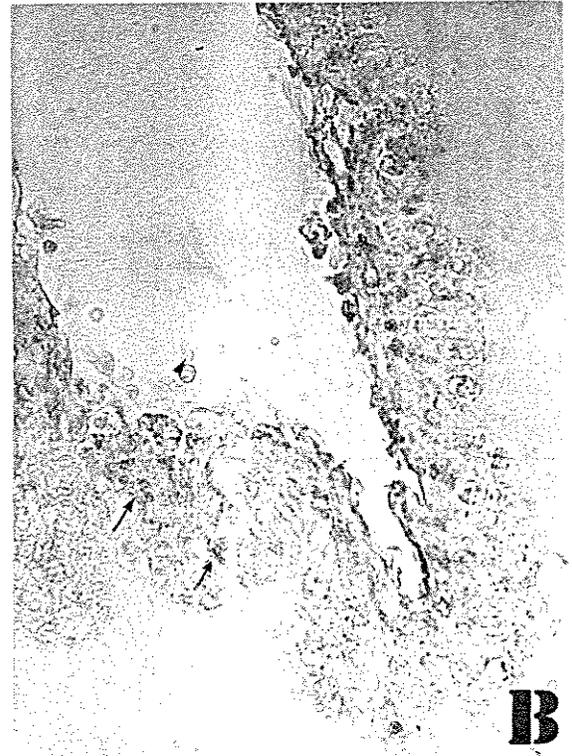
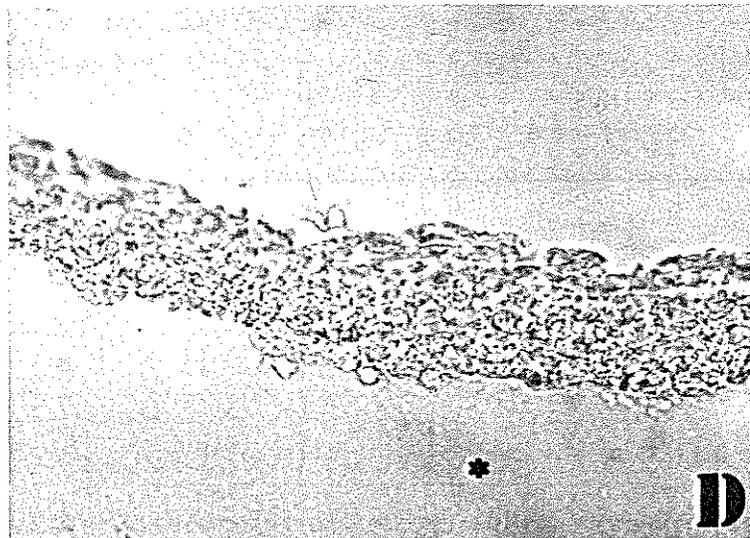
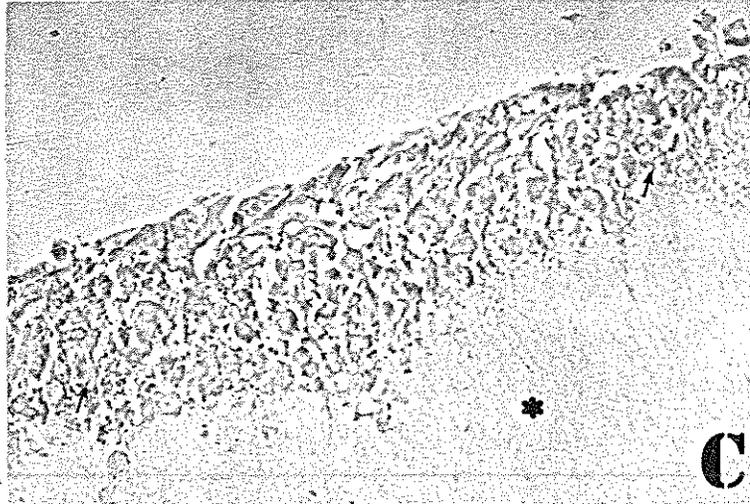
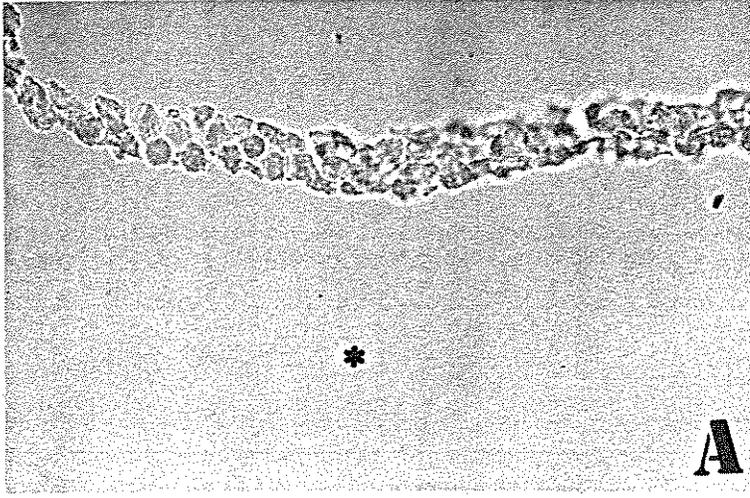


Figura 18: Células Vero cultivadas sobre gel de colágeno tipo I. Imunocitoquímica para fibronectina. Aumento: 420X

O gel de colágeno em todas as micrografias está representado por (*).

- A. Células cultivadas por 48h com 10% de SFB. Células crescendo em duas ou três camadas sobre o gel colagênico. Não observamos fibronectina nesse pequeno estrato celular.
- B. Células cultivadas sem SFB e analisadas com 240h. Observamos concomitante a infiltração celular intensa deposição de fibronectina (→) no interior do substrato.
- C. Células mantidas em cultura por 240h com 10% de SFB. É vista aqui intensa infiltração de células para o interior do substrato colagênico, sendo encontrado fibronectina como um material granular evidenciado pela inumoperoxidase (→).
- D. Células mantidas com 10% de SFB mais DEX e obsevasdas com 240h de cultivo. Observamos o estrato celular sem a presença de fibronectina, sobre o gel colagênico.
- E. Células cultivadas com 20% de SFB e colhidas com 240h. A figura mostra o estrato celular com ausência de fibronectina, crescendo sobre o gel de colágeno.



III.5. Índice mitótico

Os resultados obtidos com o índice mitótico para todas as condições experimentais podem ser vistos na tabela 1, logo abaixo.

Tabela 1: Índice mitótico apresentado pelas células Vero cultivadas sobre lamínulas nas diferentes condições experimentais.

Meio de cultivo	48h	120h	240h
S/ SFB	-	1,1%	0,5%
10% SFB	2,5%	2,3%	1,3%
10% SFB + DEX	-	1,6%	1,1%
20% SFB	-	1,5%	0,6%

III.6. Curva de crescimento

Os resultados obtidos com a curva de crescimento referentes as células cultivadas sobre lamínulas estão apresentados na tabela 2 e na figura 19, mostrados a seguir.

Tabela 2: Número de células obtidos após diferentes períodos de cultivo sobre lamínulas nas diferentes condições experimentais utilizadas.

	48h	96h	144h	192h	240h
S/ SFB	-	3,3 X 10 ⁵ ± 1,2 X 10 ⁵	7,0 X 10 ⁵ ± 1,4 X 10 ⁵	4,2 X 10 ⁵ ± 2,7 X 10 ⁵	6,3 X 10 ⁵ ± 1,6 X 10 ⁵
10% SFB	3,6 X 10 ⁵ ± 1,9 X 10 ⁴	1,2 X 10 ⁶ ± 1,6 X 10 ⁴	1,4 X 10 ⁶ ± 6,2 X 10 ⁴	1,4 X 10 ⁶ ± 6,6 X 10 ⁴	1,8 X 10 ⁶ ± 1,6 X 10 ⁴
10% SFB+DEX	-	9,5 X 10 ⁵ ± 1,5 X 10 ⁵	1,4 X 10 ⁶ ± 5,1 X 10 ⁵	1,5 X 10 ⁶ ± 7,8 X 10 ⁵	1,9 X 10 ⁶ ± 3,5 X 10 ⁵
20% SFB	-	1,5 X 10 ⁶ ± 1,3 X 10 ⁵	1,7 X 10 ⁶ ± 1,3 X 10 ⁵	2,3 X 10 ⁶ ± 1,4 X 10 ⁵	2,2 X 10 ⁶ ± 1,9 X 10 ⁵

Obs: Os valores são apresentados em número de células/ml de meio de cultura.

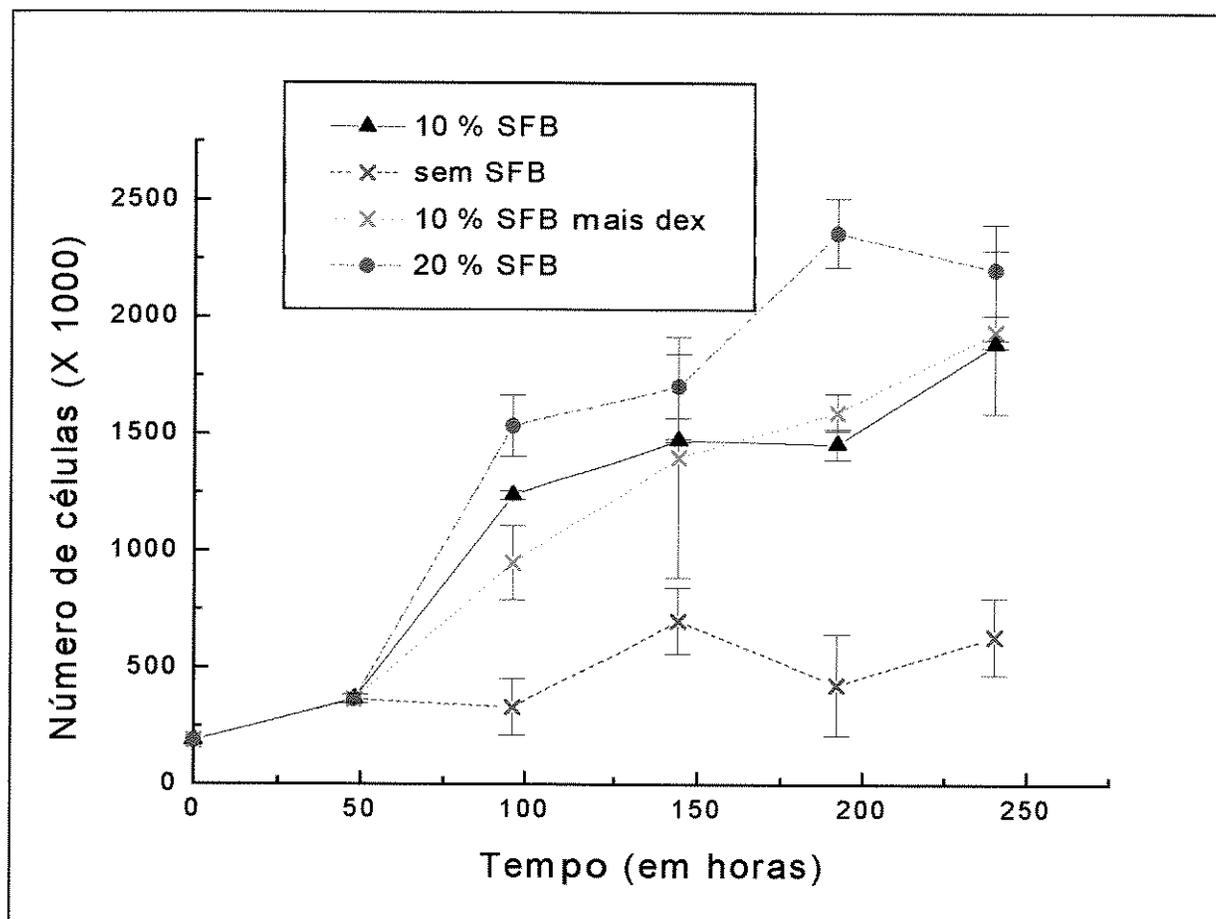


Figura 19: Curva de crescimento das células Vero cultivadas sobre lamínulas após diferentes períodos de cultivo nas diferentes condições experimentais utilizadas (SFB, soro fetal bovino; DEX, dexametasona).

III.7. Crescimento das células em gel de colágeno tipo I.

As células Vero mostraram-se capazes de contrair os géis de colágeno presentes nos frascos de vidro. Já com 48h de cultivo, 75% dos tubos os quais receberam géis de colágeno e células, apresentavam início do processo de contração do gel. A contração do gel será definida aqui como diminuição do diâmetro do mesmo e/ou diminuição da altura do gel. O termo contração parcial será usado para nos referirmos quando a contração do gel se der em apenas uma

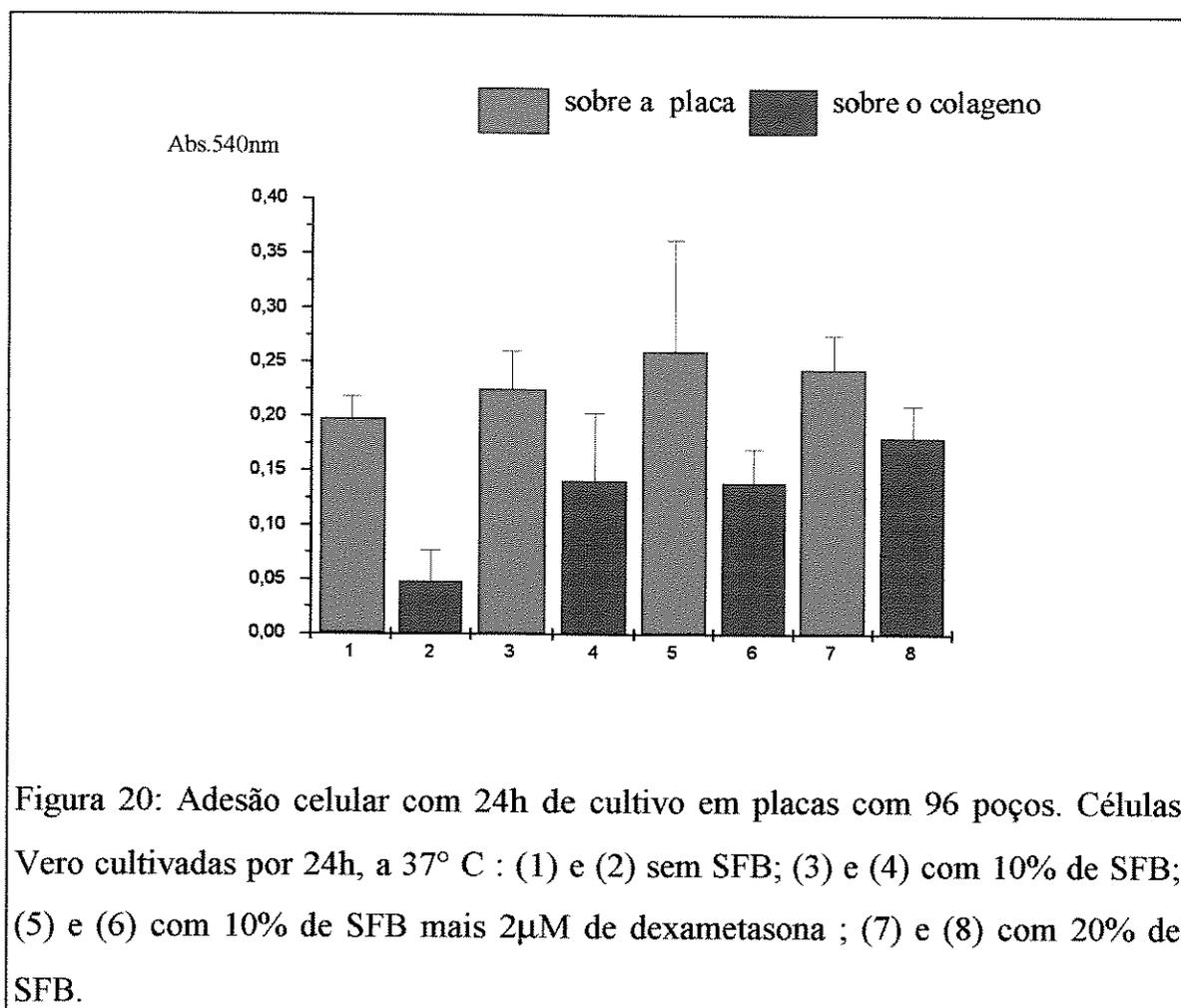
região do mesmo. Será usado também o termo contração total quando nos referirmos a total liberação do gel ao substrato.

Com 96h de cultivo 100% das amostras mantidas sem SFB mostravam-se contraídas totalmente, isto é, o gel foi totalmente liberado da parede do frasco de cultura assumindo a condição de *gel flutuante*. O mesmo ocorreu com 84% das amostras mantidas em meio suplementado com 10% de SFB, sendo que os 16% restantes permaneceram na condição de contração parcial. Das células cultivadas sobre gel de colágeno em meio suplementado com DEX 66% apresentavam contração total e 34% parcial. As amostras mantidas com 20% de SFB mostravam contração total em 50% dos tubos, sendo que os 50% restantes se mantiveram em estado de contração parcial. Como pode-se notar pelos dados acima, todos os géis, em todas as condições experimentais, sofreram contração.

Com 120h de cultura não houve alterações nesses resultados exceto as células cultivadas com DEX atingiram a taxa de 100% de contração total. O mesmo ocorreu com as células mantidas em 10% de SFB sem esse glicocorticóide. Com esse tempo de cultura, foram fixadas ao acaso três amostras de cada um dos lotes experimentais descritos anteriormente. Somente ao final do experimento, próximo às 240h de cultivo, as células cultivadas com 20% de SFB atingiram 100% de contração total. Obtivemos portanto, somente com 240h de cultura, 100% de contração total dos géis em todas as condições experimentais de cultura realizadas.

III.8. Adesão celular

Os dados do ensaio para a adesão celular são sumarizados na figura 20. Todos os resultados das leituras das amostras cultivadas sobre géis de colágeno foram considerados significativamente diferentes dos seus respectivos controles (amostras sem os géis de colágeno e com condições de cultura similares).



III.9. Microscopia eletrônica de varredura

O gel de colágeno livre de células, usado como controle, apresenta a superfície irregular, enrugada e com microfibrilas (Figura 21a). Os géis que receberam células sem SFB mostram uma superfície menos irregular. Sem SFB as células demonstram morfologia arredondada, com alguns prolongamentos celulares e pontos de adesão (Figuras 21b). Também foram encontradas células achatadas, onde a adesão já se encontrava bastante adiantada (Figuras 21c). O tapete celular não se mostrou confluyente e foi encontrado também algum material fibrilar

próximo as células (Figuras 21d). Também foram observados microvilosidades nas células, sobretudo onde o espalhamento ainda não se completou.

Com meio suplementado com 10% de SFB, a quantidade de células aderidas foi bem maior, chegando próximo à confluência em muitas áreas (Figura 22a). Encontradas pouco ou nenhum depósito de material, vesicular ou fibrilar, sobre o gel em regiões não confluentes (Figura 22b). Nas bordas do tapete, onde havia espaço entre as células, foram encontradas células com microvilosidades, prolongamentos e algum material fibrilar (Figura 22c). Poucas células arredondadas, em final de divisão celular, foram observadas também nas bordas do tapete celular (Figura 22d).

As células mantidas em meio com 10% de SFB mais DEX apresentavam morfologia diferenciada em relação aos demais casos, com uma forma mais irregular e alongada (Figura 23a). Em muitos casos as células assumiam uma forma curva, lembrando uma meia lua (Figuras 23b e 23d). Foram encontradas processos de adesão celular e também microvilosidades, mas somente em áreas onde o tapete celular atingiu a confluência. Não foi encontrado material fibrilar depositado entre as células (Figuras 23b e 23d). Foram encontradas também, em alguns pontos, células crescendo sobre o tapete confluyente (Figura 23c).

Em meio com 20% de SFB as células apresentavam grande número de microvilosidades. Várias áreas com muito material fibrilar foram encontradas e as células nestas áreas mostravam muitos processos como filopódios e lamelopódios (Figuras 24a e 24b). Em muitas regiões o material fibrilar encontrado organizava-se na forma de redes ao redor das células (Figuras 24c e 24d). Também foram encontradas um grande número de vesículas arredondadas ao redor das células ou mesmo sobre elas (Figura 24e).

Figura 21: Células Vero cultivadas sobre gel de colágeno por 24h sem SFB e analisadas por microscopia eletrônica de varredura.

- A. Gel de colágeno tipo I livre de células. Observe um material amorfo e densamente enrugado. Aumento: 3500 X.
- B. Células espalhadas sobre o gel de colágeno I. Notar a presença de microvilosidade (➡). Aumento: 2500 X
- C. São mostradas células com microvilosidades espalhadas sobre o substrato (➡), além de células em processo de tensionamento do gel de colágeno (→). Aumento: 2500 X
- D. Células Vero bem espalhadas na superfície do gel de colágeno I. Observar a presença de vesículas sobre as células (➡). Aumento: 2500 X

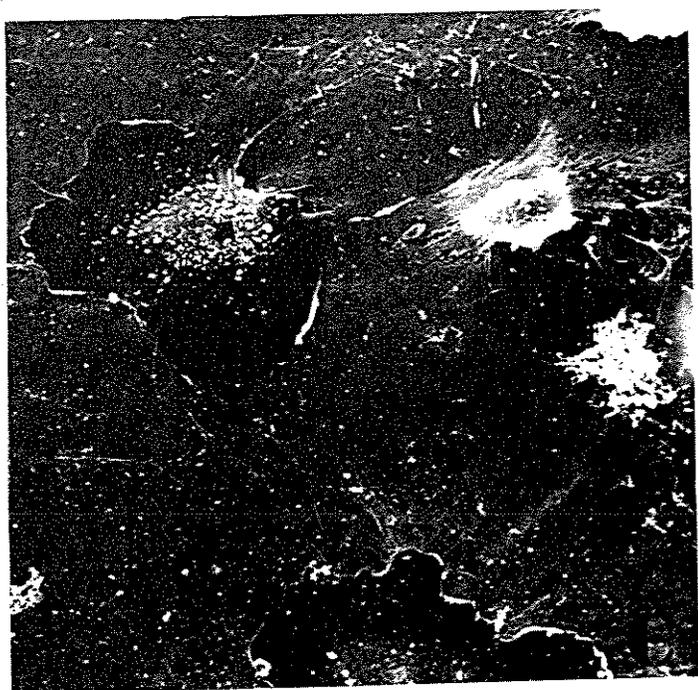
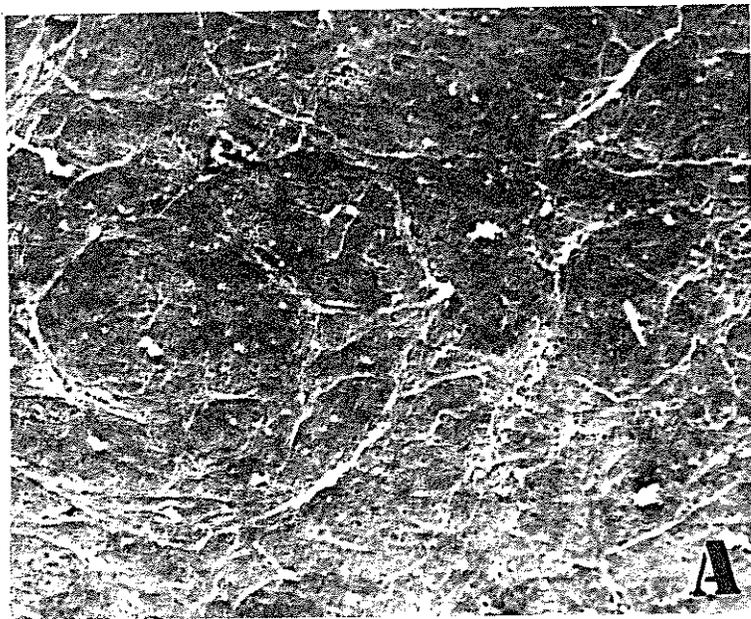


Figura 22: Células Vero cultivadas sobre gel de colágeno por 24h com 10% de SFB e analisadas por microscopia eletrônica de varredura.

- A. Visão geral do tapete celular sobre o gel de colágeno tipo I. Notar células arredondadas com processos de adesão (\rightarrow), ao lado de células bem espalhadas no substrato (*) em região próxima à confluência. Aumento: 350 X.
- B. Células espalhadas sobre o gel em região de tapete celular não confluyente. Notar a ausência de material fibrilar depositado no gel (★). Aumento: 3000 X.
- C. Bordas de uma região de tapete celular confluyente. Observar a presença de processos fibrilares (◆) entre as células da monocamada. Aumento: 2500 X.
- D. Células arredondadas em processo final de divisão. Aumento: 4000 X.

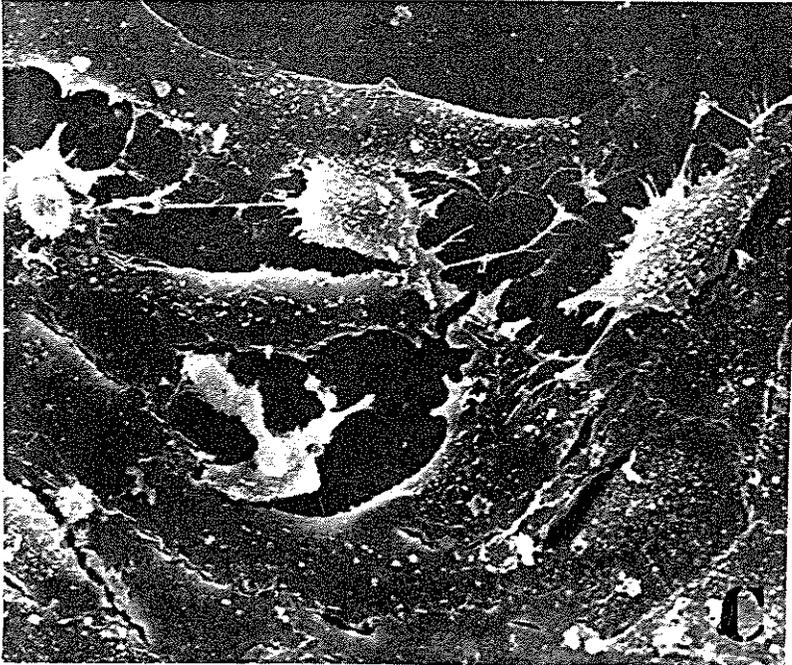
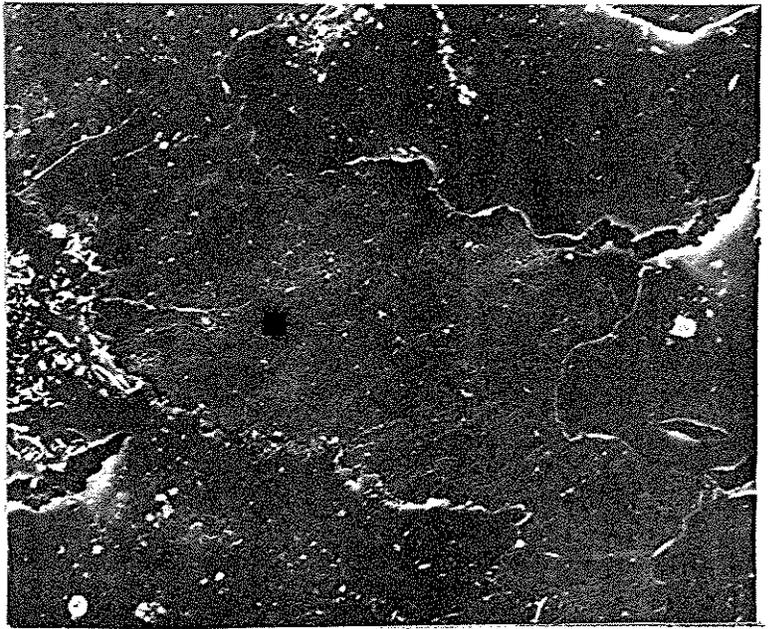


Figura 23: Células Vero cultivadas sobre gel de colágeno por 24h com 10% de SFB mais dexametasona e analisadas por microscopia eletrônica de varredura.

- A. Visão geral do tapete celular. Observar células com morfologia irregular sobre o gel de colágeno. Aumento: 350 X.
- B Células bem espalhadas na superfície do substrato colagênico. Podemos observar também células com formas irregulares. Aumento: 2500 X.
- C. Célula em crescimento sobre uma região confluenta. Observar a grande quantidade de microvilosidades na superfície das células da monocamada (⇒) e os processos celulares de adesão da célula acima das mesmas. Observe também célula crescendo sobre uma região de tapete confluenta (*). Aumento: 4000 X.
- D. Células com morfologia irregular e alongada. Notar a ausência de material fibrilar no gel. Aumento: 2000X.

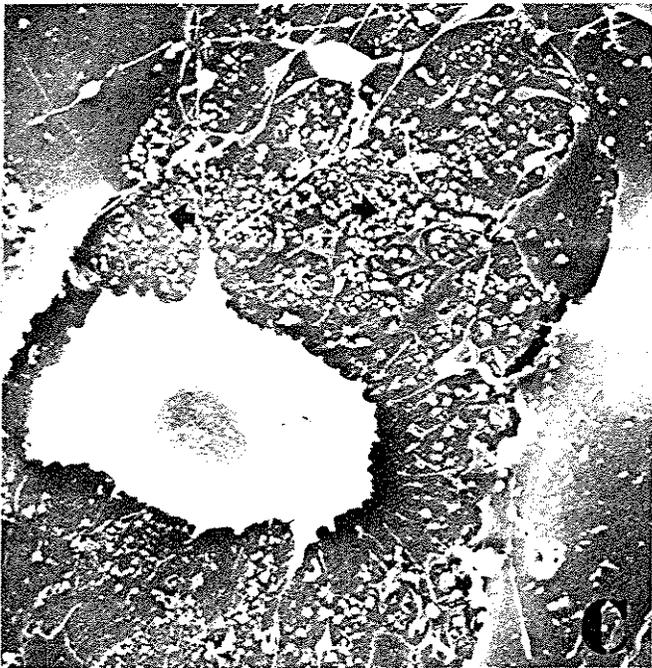
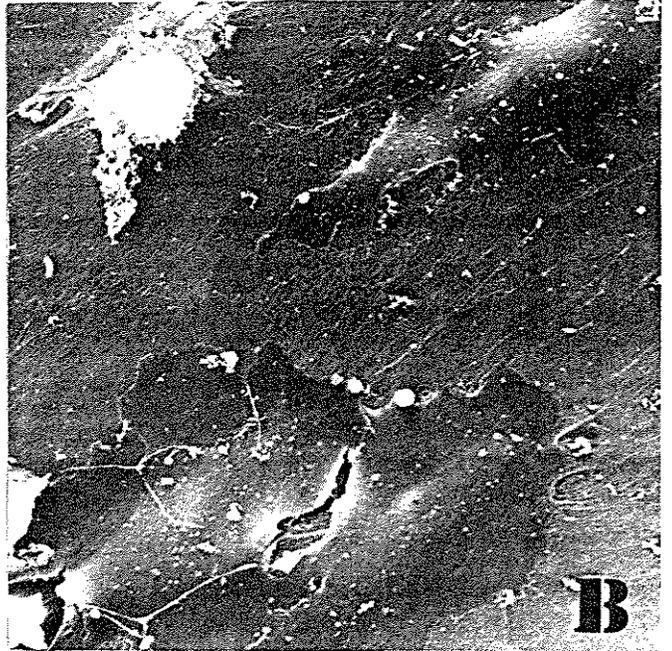
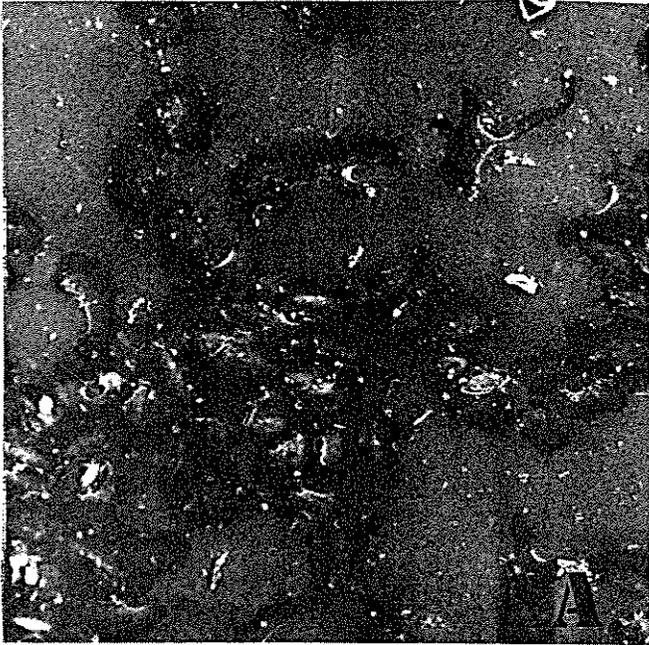
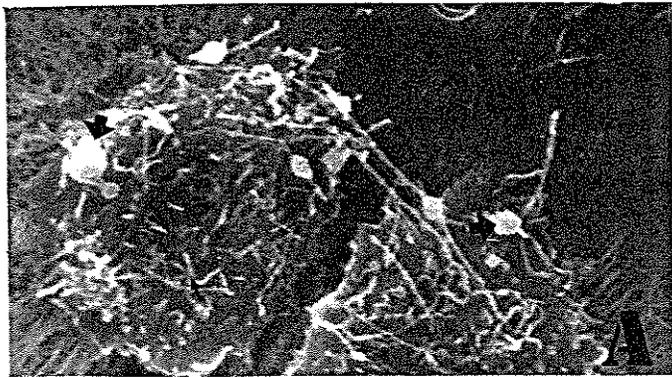


Figura 24: Células Vero cultivadas sobre gel de colágeno por 24h com 20% de SFB e analisadas por microscopia eletrônica de varredura.

- A Células espalhadas sobre o gel. Observar o grande número de microvilosidades (→) e vesículas (➡), além de material fibrilar. Aumento: 2000 X.
- B. Células bem espalhadas sobre o substrato colagênico. Observar novamente a presença de vesículas na superfície celular (➡) ao lado de microvilosidades (→). Aumento: 4000 X.
- C. Célula espalhada sobre o substrato colagênico na presença de material fibrilar reticulado. Aumento: 4000 X.
- D. Célula em processo de espalhamento no substrato. Observar a presença de fibrilas formando uma rede ao redor da célula. Aumento: 4000 X.
- E. Células arredondadas com grande quantidade de material vesicular. Aumento: 4000 X.



IV. Discussão

A análise da curva de crescimento mostra resultados distintos para quase todos os casos pesquisados. As amostras cultivadas sem SFB sofreram uma pequena diminuição no número de células na sua primeira contagem. Essa diminuição no número celular se deve provavelmente a privação das células de SFB. O soro fetal é uma mistura heterogênea que além de apresentar fatores que estimulam a proliferação celular, tais como hormônios e fatores de crescimento (PLEDGER et al., 1984), apresenta também substâncias que promovem a adesão e o espalhamento das células no substrato (BARNES, 1984). Privados destes fatores de adesão e de proliferação celular é provável que ocorra o descolamento de algumas células da população cultivada, as quais entrariam então em um quadro degenerativo. Esse menor número de células coincide com a redução na quantidade de FN presente nas células cultivadas sem soro, conforme identificamos com a imunocitoquímica. Concomitantemente, temos uma seleção das células mais resistentes e adaptadas às novas condições de cultura. Isso pôde ser confirmado pelo crescimento que a cultura passou a exibir a partir de então. Como era esperado, as células que receberam soro tiveram um crescimento muito mais acentuado. Esses dados são coerentes com os valores do índice mitótico obtidos, pois nas culturas mantidas sem soro, a porcentagem de células em divisão foi menor que nos demais casos pesquisados. O padrão de crescimento dessas células em cultura obedeceu ao padrão de células normais, sem a ocorrência de descolamento do tapete, o que indicaria degeneração celular, ou crescimento em múltiplas camadas, o que demonstraria comportamento neoplásico (FRESHNEY, 1991).

Para as células mantidas em meio com 10% de SFB houve um crescimento celular contínuo em todos os tempos pesquisados, como mostrou a curva de

crescimento. A porcentagem de células em divisão foi alta, se compararmos com as amostras mantidas em meio sem soro. A diminuição do índice mitótico observada nos tempos de cultura mais avançados se deve provavelmente ao fato das células Vero apresentarem inibição por contato quando o seu crescimento é normal (FLEMING & KLITLER, 1977; MARIA, 1994; GENARI & WADA, 1995). Sendo assim, uma vez que o tapete celular se aproximou da confluência, sobretudo nas regiões centrais das lamínulas, houve progressivamente um menor espaço disponível para as células se multiplicarem. Isso se refletiu na curva de crescimento nos últimos pontos anotados, os quais mostraram um crescimento celular menos vigoroso. Não foi observada a formação de grumos celulares o que também indicou um padrão de crescimento celular normal. Durante todo o período de cultura, 240h no total, não houve descolamento celular, o que mostra uma coerência com os resultados obtidos por MARIA (1994) que observou descolamento de células Vero somente em tempos superiores a 240h.

As células que cresceram em meio com 10% de SFB suplementado com DEX apresentaram um padrão de crescimento bastante distinto das células que cresceram em meio com concentração de soro similar, mas sem esse glicocorticóide. Os dados do índice mitótico revelam que a taxa de divisão celular é mais lenta. Porém, como encontramos a presença de vários grumos, é bem provável que no interior dessas massas celulares também existissem células em divisão, que não foram consideradas em nossa análise. Os dados da curva de crescimento mostram que a taxa de proliferação das células Vero é muito semelhante tanto na presença quanto na ausência de dexametasona. Vimos porém, que esse glicocorticóide altera alguns aspectos do comportamento celular. Isso pôde ser demonstrado pela formação dos grumos celulares nas culturas que

receberam esse glicocorticóide. O comportamento das células na presença de dexametasona parece ser o de uma célula tumoral, pois células Vero com padrão normal de crescimento não formam grumos, crescendo apenas em monocamadas. Já células Vero transformadas apresentam um padrão de crescimento diferenciado, com a perda da inibição por contato e formação de massas celulares (GENARI & WADA, 1995). Analisados em conjunto, esses dados demonstram que as células Vero na presença de dexametasona não sofrem alterações na sua taxa de proliferação, porém seu padrão de crescimento muda drasticamente.

O papel dos glicocorticóides no crescimento celular é controverso. De acordo com MAINWARING (1990), os glicocorticóides destroem linfócitos T, granulócitos e macrófagos, bem como tumores derivados destas células. Portanto esses hormônios seriam capazes de inibir a divisão celular. Mas o mesmo autor reconhece que os glicocorticóides são capazes de estimular o desenvolvimento de algumas leucemias e linfomas. RAW e colaboradores (1990) relatam que os glicocorticóides podem causar leucopenia e eosinopenia, mas causam em contrapartida um aumento na eritropoiese, a produção de eritrócitos pela medula óssea vermelha. A hidrocortisona também é relatada como um hormônio que estimula o crescimento *in vitro* de células MCF-7, uma linhagem de células tumorais originárias de epitélio mamário (HUG et al., 1986). Observou-se também a formação de massas celulares, denominadas *domes*, em células MDCK, uma linhagem derivada de células de rim de cachorro, quando elas são cultivadas em meio livre de soro fetal, mas suplementado com insulina, transferrina, T₃, prostaglandina E₁ ou hidrocortisona (TAUB, 1984). Nessas células foi observado um efeito sinérgico entre a prostaglandina E₁ e a hidrocortisona, induzindo o crescimento e a formação de *domes* (TAUB, 1984).

O dexametasona mostrou-se 30 vezes mais potente *in vivo* que seu análogo endógeno natural, o cortisol (BERNE & LEVY, 1990). Acredita-se que esse efeito potencializador se deva à presença de um átomo de fluor na posição 9 do anel esteróide da molécula, átomo esse que impediria a ligação do DEX com proteínas transportadoras, globulinas ligantes de corticóides no soro, e também conferiria à molécula uma resistência maior ao catabolismo dentro da célula (MAINWARING, 1990). O receptor para glicocorticóides, ao qual o dexametasona se liga, é citoplasmático. Uma vez que o receptor interage com o DEX esse complexo é translocado para o núcleo e passa a agir como um fator de transcrição, ligando-se diretamente a sequências de DNA sensíveis, conhecidas como elementos reguladores dos glicocorticóides (BERNE & LEVY, 1990), além de poder exercer modulação negativa em produtos de oncogenes, como c-jun e c-fos (YANG-YEN et al., 1990; SCHÜLE et al., 1990). Esses oncogenes codificam proteínas com localização nuclear, sendo que muitas delas são fatores de transcrição (ALBERTS et al., 1994; LEWIN, 1994). Sabe-se também que algumas proteínas codificadas por c-fos e c-jun são necessárias para que ocorra a progressão normal do ciclo celular em fibroblastos, isto é, para que ocorra à divisão celular (KOVARY et al., 1991). No entanto, pelo que se conhece do mecanismo dos oncogenes acima citados, se a célula for estimulada pelo dexametasona, c-fos e c-jun seriam reprimidos e teríamos então um estímulo negativo para a divisão celular. Mecanismo similar é observado na inibição da síntese de muitas proteínas que são reguladas pelo fator de transcrição AP-1, uma proteína oligomérica formado pelos produtos dos oncogenes c-fos e c-jun (YANG-YEN et al., 1990; SCHÜLE et al., 1990). Esse é o princípio pelo qual o dexametasona inibe a síntese de metaloproteases como a estromelisina e as colagenases (FRISCH & RULEY,

1987; YANG-YEN et al., 1990). Pelo descrito acima, o mecanismo de ação do dexametasona na proliferação celular deve ser distinto daquele envolvido com os oncogenes c-fos e c-jun.

Sabe-se que o dexametasona é capaz de manter a síntese de DNA em cultura primária de hepatócitos cultivados em meio suplementado com nicotinamida, sendo que na ausência desse glicocorticóide a síntese de DNA decai (BARRAUD et al., 1995). Há relatos na literatura de que alguns plasmídios, os quais trazem o oncogene c-ras ligado, apresentam um gene promotor que é ativado pelo dexametasona (FUKAZAWA et al., 1995). Há também indicações de que, enquanto a *imortalização* de células em cultura é conferida por ação de oncogenes nucleares, o crescimento *transformado* localizado, em forma de grumos, é conferido por oncogenes cujos produtos são citoplasmáticos (RAW et al., 1990). Como em muitos casos, os glicocorticóides parecem ter efeitos bastante relevantes na promoção tumoral, agindo como carcinógenos (MAINWARING, 1990; HUG et al., 1995), é possível que o dexametasona esteja agindo não apenas reprimindo as proteínas c-Jun e c-Fos, mas também alterando de alguma forma a expressão de algum, ou alguns, dos oncogenes cujos produtos são citoplasmáticos.

As culturas mantidas em meio com 20% de SFB mostraram também um comportamento bastante distinto das demais. As células cultivadas nessas condições foram as que tiveram a proliferação celular mais elevada, como vimos na curva de crescimento, sem que houvesse a formação de grumos celulares. É plausível que, em altas concentrações de soro, neste caso 20%, o aumento proporcional da concentração de hormônios e de fatores de crescimento tenha levado as células Vero a crescerem de forma diferenciada .

Apesar das alterações do padrão de crescimento por nós observadas nas diferentes condições experimentais, a morfologia das células mantiveram-se sem grandes variações. A análise morfológica das células cultivadas em lamínulas foi efetuada com resultados das observações do material corado com cresil violeta. Embora tenhamos feito colorações com hematoxilina e eosina os resultados conseguidos foram muito inferiores aos obtidos com cresil violeta, pois essa última coloração evidenciou melhor os limites celulares. Nas amostras com 48h de cultivo, as células até então mantidas com 10% de soro, apresentavam-se bem espalhadas com morfologia irregular sendo comum a presença de expansões celulares.

Ao serem privadas de SFB, com 120h de cultivo, as células não sofreram alterações morfológicas evidentes. Foram encontradas muitas células com forma poliédrica, mas essas localizavam-se nos locais onde a monocamada já se encontrava com uma densidade celular elevada, com células estabelecendo contatos entre si, diminuindo assim a área ocupada por cada uma delas. No entanto, nas regiões onde ainda havia espaço para o espalhamento celular, a morfologia das células era muito semelhante aquelas descrita com 48h. Com 120h, o mesmo padrão morfológico foi observado para as células mantidas com 10% e 20% de SFB. Um resultado um pouco diferenciado foi encontrado nas células mantidas com DEX. Como já foi dito anteriormente, essas amostras apresentaram um crescimento diferenciado, com formação de grumos celulares. A coloração com cresil violeta mostrou uma grande quantidade de células hipertróficas, com núcleos de tamanho bastante aumentados, além de citoplasma bem espalhado, presentes mesmo em áreas onde o tapete celular estava próximo a confluência. Nos pontos onde tivemos crescimento clonal as células centrais eram poliédricas e as

periféricas bem alongadas, sendo o mesmo resultado encontrado nos grumos celulares formados.

Não houve alteração na morfologia das células nos diferentes experimentos com 240h de cultivo. Com o aumento da densidade celular, tornou-se mais difícil a visualização dos limites celulares. Algo que nos chamou a atenção foi a vacuolização encontrada nas células mantidas na ausência de soro e nas células que receberam dexametasona. É provável que essa vacuolização represente acúmulo de material sintetizado ou a ser degradado pelas células. Os dados por nós obtidos para a morfologia são semelhantes aos descritos por MARIA (1994). Embora tenhamos encontrado células em degeneração, elas estavam presentes em quantidades bem reduzidas nesse tempo de cultivo.

A análise citoquímica das células cultivadas sobre lamínulas, coradas com AT pH 4,0 mostrou intensa metacromasia citoplasmática nas células cultivadas em meio com DEX, tanto com 120h quanto com 240h de cultivo. Além das células coradas, nas regiões de formação de grumos parece haver um acúmulo de material extracelular com característica aniônica acentuada, o que explicaria a intensa metacromasia observada nessas regiões.

O azul de toluidina é um corante catiônico que se liga a um substrato aniônico, fenômeno esse conhecido como basofilia. Em pH 4,0 ele pode ligar-se a grupos PO_4^{-3} , SO_4^{-2} e COO^- . O primeiro sendo encontrado nos ácidos nucleicos, DNA e RNA, e os demais em açúcares ácidos. O AT apresenta moléculas planas. Assim quanto mais próximas as moléculas estiverem entre si, em concentrações elevadas, haverá um aumento na interação entre os elétrons das mesmas, o que causa um deslocamento do pico da curva de absorção espectral do corante. Assim, de acordo com a concentração de suas moléculas, o AT pode exibir cores que

variam entre o verde-azulado, azul-arroxeadado, roxo e até mesmo tons rosáceos (VIDAL & MELLO, 1987). A basofilia que o corante mostra é um azul-arroxeadado. Quando temos uma mudança na cor para tons de verde-azulado, indicando diminuição nos ânions disponíveis, chamamos de basofilia ortocromática. Ao contrário, quando o corante passa a exibir cor roxa ou rósea, indicando um aumento na densidade dos sítios aniônicos, temos a chamada basofilia metacromática. É possível que as alterações por nós observadas com relação a coloração com AT estejam correlacionadas com os efeitos do DEX na atividade gênica e secreção celular descrita na literatura (WEINER et al., 1987; FRISCH & RULEY, 1987; YANG-YEN et al., 1990; SCHULE et al., 1990).

Quanto ao xylidine ponceau, podemos dizer que ele é um corante aniônico comumente utilizado para a evidenciação de grupos eletropositivos NH_3^+ . Nas células, esses grupos estão presentes nas proteínas e, em pH 2,5, tem-se a evidenciação de proteínas celulares totais (VIDAL & MELLO, 1987).

A análise de nosso material com 120h de cultivo, na presença de SFB, mostrou células ricamente coradas pelo XP, indicando-nos um efeito promotor da síntese proteica pelo soro. Não encontramos alterações nos padrões de colorações nas células com 10% de SFB com e sem dexametasona, o que indica que esse hormônio não interfere com a quantidade de proteínas totais sintetizadas pela célula. Esses dados estão de acordo com a literatura, pois embora o dexametasona possa inibir a síntese de proteínas como as metaloproteases (FRISCH & RULEY, 1987; YANG-YEN et al., 1990) e dos colágenos I e IV (WEINER et al., 1987), ele estimula a síntese de peptídeos como a α_1 -glicoproteína ácida, uma proteína sérica envolvida em processos inflamatórios (BAUMANN et al., 1983; GROSS et al., 1984). Também não encontramos diferenças de coloração entre as células que

receberam 10% e 20% de SFB, o que nos indica que os fatores promotores da síntese proteica presentes no soro devem atingir um patamar de estimulação com concentrações em torno dos 10%. Os mesmos resultados foram vistos com 240h de cultura. Nesse tempo de cultivo também encontramos vacuolização abundante em material não corado pelo XP, nas células mantidas sem SFB e com 10% de SFB mais DEX. Embora essa mesma vacuolização tenha sido encontrada também nos demais casos, ela estava presente em quantidades muito baixas e em poucas regiões do tapete celular.

Esses dados analisados em conjunto aos obtidos com a coloração com o AT, nos indicam que a vacuolização encontrada no citoplasma das células coradas com cresil violeta não é acúmulo de material proteico, nem de RNA ou açúcares ácidos. Eles nos indicam também que o DEX e a maior concentração de soro estimulam a síntese de um material extracelular de natureza proteica e também com características aniônicas. Encontramos células intensamente coradas pelo XP nos grumos celulares induzidos pelo DEX o que mostra também que essas massas celulares apresentam uma grande quantidade de proteínas.

A imunocitoquímica das células cultivadas sobre lamínulas mostraram já com 48h de cultivo que as células são capazes de secretar colágeno IV, desta forma construindo um ambiente mais favorável ao seu crescimento. Essa capacidade mostrou-se extremamente reduzida nas células que foram cultivadas sem SFB. As células que cresceram com 10% de SFB, com a progressão do tempo de cultura, mostraram uma intensificação do depósito de colágeno IV. Esses resultados nos levam a supor que, para que a deposição de colágeno IV ocorra *in vitro*, são necessários estímulos provenientes de fatores séricos. As amostras que foram cultivadas com a presença de DEX mostraram, ao contrário, raras regiões

onde o colágeno IV foi detectado, tanto com 120h como 240h de cultivo. Isso nos sugere que o DEX possa reprimir a síntese de colágeno IV em células cultivadas sobre lamínulas, o que não acontecendo quando as células foram cultivadas sobre o gel de colágeno tipo I. Resultados semelhantes foram descritos na literatura em células cultivadas em lamínulas para a síntese de outros tipos de colágeno. HÄMÄLÄINEN e colaboradores (1985) encontraram uma redução na síntese de RNAm para pró-COL I quando fibroblastos de pele foram tratados com cortisol. Os mesmos autores encontraram também um aumento na velocidade de degradação do mesmo RNAm (HÄMÄLÄINEN et al., 1985). Efeito semelhante foi obtido com o uso de dexametasona (RAGHOW et al., 1986). Há porém descrições de resultados opostos. FURCHT e colaboradores (1979) observaram que o DEX estimula a síntese e o depósito de colágeno *in vitro*. Cabe ressaltar porém, que nesses trabalhos, as células usadas apresentavam comportamento transformado (FURCHT et al., 1979). Com 20% de SFB observamos também intenso depósito de material extracelular com aspecto fibrilar evidenciado pela imunocitoquímica para colágeno IV. Isso corrobora nossa observação de que a secreção de colágeno é estimulada pelos fatores séricos.

Quanto a análise imunocitoquímica da fibronectina, embora presente no SFB, a forma plasmática difere em alguns aspectos da encontrada na superfície celular (HYNES, 1990). O anticorpo utilizado nesse trabalho reconhece apenas a chamada FN celular e não a forma solúvel encontrada no soro.

Encontramos nas células colhidas com 48h de cultivo, uma alta concentração de FN na superfície celular. Pudemos observar uma distribuição pontual e homogênea da FN nas células, além da presença intracitoplasmática da mesma. Nas células que foram colhidas com 120h, todas as amostras mostravam

redução na reação para FN, exceto as células que foram cultivadas com 20% de SFB. Nas amostras que cultivamos sem SFB ou mesmo com 10% de soro, encontramos ao final do cultivo uma distribuição amorfa, porém restrita a algumas regiões do tapete celular. As células que receberam soro mostravam um discreto aumento da quantidade de FN o que indica que a síntese da mesma é estimulada pelo SFB. Já as amostras tratadas com o DEX mostravam uma distribuição também desorganizada, porém com um aspecto mais homogêneo no tapete celular. Além disso nos grumos celulares presentes nas células tratadas com DEX, detectamos intenso acúmulo de FN, maior que em todas as demais amostras. Isso nos leva a supor que o DEX de alguma forma possa estar alterando a expressão de FN. A influência do dexametasona na síntese de fibronectina vem sendo avaliada nos últimos anos. RAGHOW e colaboradores (1986), não encontraram qualquer alteração na síntese de FN quando fibroblastos de rato foram tratados com DEX. Porém a maior parte dos relatos mostra que os glicocorticóides são capazes de aumentar os níveis de FN em vários sistemas celulares, entre eles fibroblastos de pele humana transformados pelo vírus SV-40, hepatócitos de rato, células endoteliais humanas, células de glioma de rato e células intestinais (HYNES, 1990). FURCHT e colaboradores (1979) mostraram que o DEX pode reestimular a síntese e levar ao acúmulo de FN em células transformadas, que a perderam como um dos primeiros sinais de transformação celular.

O mecanismo pelo qual os glicocorticoides regulariam a expressão de FN ainda é incerto. O gene promotor para a síntese de fibronectina está sobre influência de muitos reguladores de transcrição em potencial, entre eles os glicocorticóides. Uma vez que os hormônios esteróides atuam frequentemente via controle transcricional, é possível que a transcrição da FN seja regulada

diretamente pelos esteróides (HYNES, 1990). Dessa forma o DEX agiria diretamente no controle da transcrição gênica. Mais recentemente, outros autores, trabalhando com linhagens de fibrossarcomas, sugeriram a existência de um controle pós-transcricional da FN, devido a alteração na estabilidade do seu RNAm (EHRETSMANN et al., 1995). Cabe ressaltar que embora o DEX induza ao acúmulo da FN, perdida nos processos de transformação celular, ele não restaura o crescimento celular normal, sendo que as células continuam a expressar o seu comportamento transformado de crescimento (FURCHT et al., 1979).

Um arranjo semelhante às células tratadas com DEX foi observado nas culturas mantidas com 20% de SFB, onde encontramos uma distribuição pontual e homogênea. A quantidade de FN presente nesse caso era maior que nas amostras cultivadas S/SFB ou com 10% SFB, o que reforça nossa observação de que o soro estimula a síntese de fibronectina.

Na análise feita por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi encontrado um aumento no número de células em relação ao aumento da concentração de SFB no meio de cultivo. Isso já era esperado, pois como já mencionado, no soro fetal existem vários fatores que estimulam a proliferação celular, como fatores de crescimento e hormônios (PLEDGER et al., 1984; FRESHNEY, 1991). Isso foi demonstrado também nos resultados da curva de crescimento onde pudemos verificar que a proliferação celular é estimulada pela concentração crescente de SFB.

O soro fetal contém também elementos promotores da adesão celular (BARNES, 1984). Dentre eles o mais conhecido e estudado é a fibronectina. Esta glicoproteína é uma das responsáveis pela adesão de células ao colágeno, agindo como um elo de ligação entre este e as integrinas, que são proteínas integrais de

membrana plasmática. Neste trabalho demonstramos que as células Vero aderem ao colágeno mesmo na ausência de SFB. Isso sugere que estas células devam ter receptores diretos para o colágeno ou proteínas de superfície capazes de interagir com este elemento. Contudo como as células estão com atividade de síntese, não podemos excluir o fato de que a adesão das células ao gel de colágeno em meio sem soro seja mediada por fibronectina celular recém sintetizada. Foi mostrado também, através da MEV, que as células depositam algum material fibrilar sobre o gel mesmo na ausência de soro. A regulação pelo substrato da produção de componentes de MEC pelas células é um assunto bem descrito na literatura (HAY, 1984; MAUCH et al., 1988; STREULI & BISSEL, 1990; GRINNELL, 1994; GOLOMBICK et al., 1995). Em todos esses trabalhos o enfoque principal é o papel do substrato no estímulo à biossíntese de colágeno. HAY (1984) sugere que o colágeno é um dos primeiros componentes de MEC a ser secretado pelas células e GOLOMBICK e colaboradores (1995) mostraram que células de tumores de ovário são capazes de secretar colágeno IV mesmo na ausência de SFB.

O SFB mostrou ser um forte estímulo à adesão e ao espalhamento celular sobre o colágeno pois, como vimos, nas células mantidas com 10% de soro, a quantidade de células arredondadas é muito menor do que as encontradas na ausência de SFB. GRINNELL & BENNETT (1981) realizaram um experimento onde fibroblastos humanos aderem-se a géis de colágeno. Esses autores puderam verificar que a adição de fibronectina no meio de cultura proporciona um total espalhamento num intervalo de 30-60 minutos, ao passo que quando esses fibroblastos são cultivados em meio com soro livre de fibronectina, as mesmas células necessitaram de um tempo em torno de 2h para se espalharem totalmente sobre o substrato. Foi descrito também que na presença de fibronectina, o

espalhamento de células BHK em géis hidratados de colágeno é mais rápido que na ausência dessa proteína (GRINNELL & BENNETT 1981). A fibronectina estimula a adesão ao colágeno de células de ovário de hamster chinês (células CHO), além de influenciar em outros aspectos do comportamento celular, como a morfologia e a migração, sem entretanto interferir na taxa de proliferação celular (SCHOR et al., 1981).

Em nosso trabalho, não foi adicionado fibronectina ao meio de cultura. Porém, como cultivamos células na presença ou ausência de SFB, a fibronectina foi um dos muitos fatores que foram excluídos nessa última condição. Dessa forma, nossos resultados podem ser comparados aos dos autores acima citados (SCHOR et al., 1981; GRINNELL & BENNETT 1981), ainda que com um certo cuidado, pois na ausência de soro tem-se também a privação de vários fatores importantes para a fisiologia celular. Aqui a presença de soro estimulou o espalhamento celular sobre o gel de colágeno, mas não podemos afirmar que esse estímulo seja devido a fibronectina, pois o soro apresenta outras proteínas importantes para a adesão celular, tais como a condronectina e osteonectina (BARNES, 1984), essa última mais citada na literatura recente como SPARC, sigla inglesa para *proteína ácida secretada rica em cisteína* (SAGE & BORNSTEIN, 1991).

No que diz respeito às células cultivadas em meio com 10% de SFB mais DEX sobre o colágeno, parece não haver alterações significativas na adesão e no espalhamento celular. Ao contrário dos demais amostras pesquisadas, as células Vero na presença de dexametasona, com 24h de cultivo, não apresentavam material fibrilar ou vesicular depositado na superfície do gel, quando observado em MEV. Há na literatura referências que mostram que o cortisol diminui a síntese

e aumenta a degradação de RNAm para o colágeno (HÄMÄLÄINEN et al., 1985) e seu análogo sintético, o DEX, apresentou o mesmo efeito (RAGHOW et al., 1986). Esse autor sugere um mecanismo de influência pré-traducional para a inibição da síntese de colágeno pelo dexametasona. WEINER e colaboradores (1987) foram ainda mais longe, mostrando que o DEX inibe a expressão dos genes para os colágenos I e IV. Porém os resultados acima citados foram obtidos para células cultivadas em lamínulas e não em substratos colagênicos como em nosso trabalho.

Com 20% de SFB pudemos notar uma otimização da adesão celular. Há referências na literatura de que o aumento da concentração de SFB prejudica a adesão de células CHO (SCHOR et al., 1981). O mecanismo deste fenômeno ainda não é totalmente conhecido. Sabe-se que algumas proteínas da MEC, tais como a SPARC, trombospondina e tenascina, em alguns casos, podem agir como fatores anti-adesivos. Acredita-se que isso ocorra devido a um antagonismo dessas proteínas com a fibronectina (SAGE & BORNSTEIN, 1991). Resultados semelhantes não foram encontrados nesse trabalho. Também foi observado na análise por MEV, um aumento na quantidade de microvilosidades presentes na superfície celular. Essas microvilosidades encontradas podem ser uma forma da célula interagir com o meio extracelular e/ou meio de cultura, e sua ocorrência pareceu ser também estimulada por fatores presentes no soro fetal.

O que mais nos chamou a atenção nas amostras cultivadas com 20% de SFB, foi a intensa síntese de material fibrilar secretado sobre a superfície dos géis de colágeno. A análise por MEV mostrou que, em muitos pontos, esse material fibrilar chegou a assumir uma forma de rede localizando-se imediatamente abaixo das células. Quer nos parecer ainda que as células Vero estejam tentando organizar

uma estrutura semelhante a uma lâmina basal. A produção de componentes de lâmina basal em células em cultura é algo já descrito. Já foi demonstrado anteriormente que células tumorais de ovário produzem colágeno IV e laminina, mesmo se mantidas em meio de cultura definido e sem SFB (GOLOMBICK et al., 1995).

Os resultados obtidos pelo ensaio em microplacas para avaliação da adesão celular são perfeitamente coerentes com os da microscopia eletrônica de varredura, onde o soro fetal mostrou-se um agente promotor da adesão celular. Não houve também alterações significativas na adesão das células cultivadas em 10% de SFB com ou sem dexametasona. Algo que pode ser visto também nesse experimento é que na presença de colágeno as células diminuíram sua taxa de proliferação. Isso é lógico se considerarmos que substratos colagênicos induzem um certo grau de diferenciação celular e que quanto maior o grau de diferenciação de uma célula, menor a sua capacidade proliferativa.

Outro dado relevante mostrado pelo experimento é que, ao contrário do que revela curva de crescimento, nas células cultivadas diretamente sobre a placas, vemos o dexametasona como um agente estimulador do crescimento celular, pois a quantidade de células encontradas nesta condição experimental foi maior do que a encontrada nas células cultivadas na mesma concentração de soro, sem o referido esteróide, e na ausência de um substrato colagênico. Esses resultados mudam quando analisamos esses mesmos dois casos em um gel de colágeno, onde vemos um crescimento uniforme para ambos.

Observamos também em nosso material que as células cultivadas sobre o gel de colágeno induziam a contração deste substrato. A contração do gel de colágeno pelas células cultivadas no mesmo, é um dado amplamente descrito na

literatura (BELL et al., 1979; HARRIS et al., 1981; STOPAK & HARRIS, 1982; ALLEN & SCHOR, 1983; GUIDRY & GRINNELL, 1985; REED et al. 1994). De acordo com ALLEN and SCHOR (1983), que trabalharam com fibroblastos da derme, as interações célula-célula não contribuem significativamente para o processo de contração do gel, sugerindo que as células possam exercer tensão sobre as fibras colágenas que as rodeiam. GUIDRY & GRINNELL (1985) mostraram que durante a reorganização do gel, apenas 5% de colágeno foi degradado, embora o volume do gel tenha diminuído em 85%. Esses mesmos autores mostraram que o SFB ou fatores secretados pelas células no meio de cultura na presença de soro, promovem a contração do gel.

REED et al. (1994) mostraram que fibroblastos humanos extraídos de doadores de várias idades, de 26 a 92 anos de idade, são capazes de contrair um gel de colágeno na presença de TGF- β 1. Outro fator que parece estar envolvido na contração do substrato colagênico é a atividade funcional do citoesqueleto. Isso foi demonstrado por BELL e colaboradores (1979), que conseguiram a inibição da contração de um gel utilizando colchicina ou citocalasina B, o que demonstra o envolvimento dos microtúbulos e dos filamentos de actina, respectivamente, neste processo.

A contração de géis de colágeno vem sendo considerada como um evento análogo a retração tecidual que ocorre durante a regeneração de lesões (GRINNELL et al., 1987; TOMASEK et al., 1992; GRINNELL, 1994), mas outros autores a correlacionam também com o processo de morfogênese tecidual durante o desenvolvimento embrionário (HARRIS et al., 1981; STOPAK & HARRIS, 1982). Essa contração do gel é um evento que pode gerar tensões biomecânicas que, segundo se acredita, são mediadas pelas células, mesmo o mecanismo

envolvido no processo não esteja esclarecido. Para ALLEN & SCHOR (1983) existem hoje duas visões sobre a contração do gel. Uma delas diz que a forma celular pode ser diretamente responsável pela geração de tensão no gel, num processo análogo a contração muscular. Outra diz que as alterações do gel são passivas, e seriam uma consequência secundária do movimento centrípeto das fibras colagênicas por forças de tração geradas ao longo da membrana plasmática. Nessa última hipótese, proposta por HARRIS e colaboradores (1981), os autores sugerem que essas forças de tração sejam uma combinação de forças de motilidade e de contractibilidade que a célula exerce tangencialmente sobre a superfície do gel, ou seja, a contração do gel ocorrerá quando as células se espalham e se alongam, e não porque as células já alongadas se retraíam (HARRIS et al., 1981; STOPAK & HARRIS, 1982; GRINNELL, 1994).

Após a contração de um gel de colágeno o mesmo pode estar em duas situações distintas: (1) a de um *gel ancorado* ao seu respectivo substrato, ou (2) um *gel flutuante* no meio de cultura. Para GRINNELL (1994) em ambos os casos a contração se dá de forma similar, envolvendo além das integrinas vários fatores extracelulares. Mas uma diferença marcante encontra-se no resultado final, pois contrações de géis flutuantes resultam em tecidos mecanicamente relaxados, enquanto que géis ancorados formam tecidos mais estressados (GRINNELL, 1994). Como consequência da contração e tensionamento do gel, a célula passa a ser exposta a diferentes forças biomecânicas que podem trazer alterações no seu comportamento. GRINNELL (1994) relacionou essas forças e as consequências das mesmas com a fisiologia celular. Assim em um gel flutuante, a tensão exercida pelas fibras é distribuída isotropicamente, e em um gel ancorado a tensão é distribuída anisotropicamente. Quando um gel que estava inicialmente ancorado ao

substrato é liberado deste por processo de contração, toda a tensão que estivesse concentrada no gel é dissipada, num fenômeno muitas vezes chamado de *relaxamento de estresse*. Ainda, segundo esse mesmo autor, todas essas forças exercem influência na proliferação e na morfologia celular e no tipo de produtos secretados. Por exemplo, células cultivadas em géis ancorados apresentam um aumento na síntese de DNA e no número de células presentes no substrato. Já em células mantidas em géis flutuantes ocorre a redução destes parâmetros. Isso parece refletir uma diminuição da resposta celular aos fatores de crescimento (GRINNELL, 1994).

Vários relatos na literatura mostram que a contração de géis de colágeno está relacionada com a presença de soro fetal bovino (ALLEN & SCHOR, 1983; GUIDRY & GRINNELL, 1985; GILLERY et al., 1986; MARIA, 1994). Observamos aqui que, nos tubos mantidos sem soro e com 10% de SFB, com 120h de cultivo, existia 100% de contração e os substratos passaram de uma condição de géis ancorados para géis flutuantes. Uma explicação para o fato das amostras sem soro apresentarem o mesmo padrão de contração do substrato que as amostras mantidas com 10% de SFB, talvez tenha sido a própria metodologia empregada nesse trabalho, onde todas as células cultivadas nas 48h iniciais receberam complementação com soro fetal bovino. Nosso protocolo procurou eliminar esta possibilidade e, após esse tempo de cultivo, algumas amostras foram lavadas com solução salina de Hanks com o objetivo de eliminar do gel possíveis substâncias secretadas pelas células, ou mesmo produtos do seu metabolismo, os quais poderiam estimular a contração do gel de colágeno. Como já mencionado, substâncias com atividade na contração do gel presentes em meio de cultura condicionado foram demonstrados nos trabalhos de GUIDRY & GRINNELL

(1985). É possível que muitas destas substâncias não tenham sido eliminadas, pois elas podem ter se difundido e penetrado no interior do gel de colágeno, sendo necessária uma lavagem mais drástica para que sua remoção pudesse ocorrer. No entanto este procedimento poderia alterar o padrão de crescimento das células no gel, pois poderia comprometer a integridade e/ou a estrutura deste último. Um resultado inesperado foi o fato de que, com 120h de cultivo, nas amostras mantidas em meio suplementado com 20% de SFB, houve contração total dos géis em apenas 50% dos casos, bem abaixo de amostras com concentrações inferiores de SFB. Teoricamente baseando-se em resultados de outros autores (ALLEN & SCHOR, 1983; GRUIDRY & GRINNELL, 1985; GILLERY et al., 1986; MARIA, 1994), era esperado exatamente o contrário. Nossos resultados indicam que a contração do gel seria menos vigorosa em concentrações muito altas de soro fetal bovino. É possível que haja uma concentração ótima de soro para que a contração ocorra. Se isso realmente ocorrer essa concentração ótima de soro seria em torno dos 10%. Não se encontra na literatura dados que possam explicar esse comportamento, pois não foi avaliado até o momento o efeito comparativo de concentrações crescentes de SFB na contração de géis de colágeno. O fenômeno da contração do gel tem sido estudado apenas na ausência ou na presença de soro (ALLEN & SCHOR, 1983; GRUIDRY & GRINNELL, 1985; TOMASEK et al., 1992; REED et al., 1994; CHIQUET-EHRISMANN, et al., 1994; MARIA, 1994). A única referência de uma análise comparativa de concentrações crescentes de SFB no processo de contração de substratos 3D de colágeno foi encontrada no trabalho de GILLERY e colaboradores (1986), no entanto esses autores não usaram concentrações superiores a 10% de SFB em seus experimentos.

Com relação aos efeitos do dexametasona no processo de contração do gel de colágeno ainda não existem dados descritos na literatura. Ao que parece ele pode exercer influência sobre esse processo pois as células mantidas com dexametasona tiveram todos os seus géis contraídos mas com um ligeiro atraso em relação as células mantidas nas mesmas condições sem esse glicocorticóide. Como já foi dito, a contração é mediada não só por integrinas e pelo citoesqueleto (BELL, et al., 1979; ALLEN & SCHOR, 1983; GRINNELL et al, 1987) mas também por outros fatores extracelulares ainda não identificados mas presentes no meio de cultura condicionado por fibroblastos (GRUIDRY & GRINNELL, 1985; GRINNELL, 1994). Os glicocorticóides podem inibir a síntese de algumas proteínas que são comumente secretados pelas células no meio de cultura (YANG-YEN, et al., 1990; WOESSNER Jr, 1991; EKBLON et al, 1993). Assim o DEX poderia exercer uma regulação negativa no processo de contração de substratos colagênicos por inibir a síntese de fatores extracelulares que a estimulem. No entanto os resultados aqui apresentados não foram conclusivos o bastante para que possamos afirmar o real efeito do dexametasona no processo de contração de géis de colágeno tipo I.

Uma outra constatação interessante é que nas amostras onde observamos um retardamento da contração do gel, com 10% SFB mais DEX e com 20% de SFB, correspondem exatamente aos casos onde as células foram impedidas de migrarem para o interior do substrato. Cabe ressaltar que a natureza e a quantidade dos componentes depositados pelas células no gel é diferente nos casos onde a infiltração ocorre e onde ela é bloqueada. Nas amostras onde a contração é mais vigorosa , detectamos grandes quantidades de material aniônico, proteico, além de FN, enquanto que nos casos onde a contração é mais lenta detectamos material

aniônico, porém em menor quantidade, e COL IV. Isso nos faz sugerir que a reorganização das fibras colagênicas, a qual é atribuída o fenômeno de contração de géis de colágeno, pode ser modulada de alguma forma por (1) FN ou outras proteínas secretadas pela célula; (2) açúcares sulfatados e/ou carboxilados presentes na matriz colagênica; (3) cargas negativas depositados no gel de colágeno ou (4) uma interação dos vários fatores anteriores. Nossos resultados não nos permitem tirar conclusões sobre qual, ou quais destes fatores poderiam participar do processo de contração de géis de colágeno, mas nos dão indícios de que este fenômeno não seja apenas mediado por tensão mecânica exercida pelas células.

As células Vero cultivadas sobre os géis de colágeno tipo I mostraram um comportamento diferenciado em relação as que cresceram em lamínulas de vidro. Com 48h de cultivo encontramos regiões onde as células mostravam crescimento em monocamada e também algumas regiões onde obtivemos a formação de estratos celulares, com duas ou três camadas. Como o padrão normal de crescimento dessas células é em monocamadas (FLEMING & KISTHER, 1977; MARIA, 1994; GENERI & WADA, 1995) a estratificação encontrada já nos mostra um certo grau de diferenciação induzida pelo substrato. Além dessas alterações no padrão de crescimento celular, encontramos também variações na morfologia apresentada pelas células, sendo que nas regiões do substrato onde as células cresceram em monocamadas, essas mostravam formas bem achatadas enquanto que nos pontos de estratificação, as células das camadas mais baixas mostravam-se arredondadas ou poliédricas e nas camadas mais superficiais as células muitas vezes apresentavam forma achatadas. Essas características lembram muito as de um epitélio pavimentoso simples e as de um epitélio estratificado

pavimentoso, respectivamente (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990). Também com 48h de cultivo encontramos alguns pontos de infiltração para o interior do gel. Trabalho anterior relata a presença dos processo de infiltração com 120h de cultivo (MARIA, 1994), embora a autora não tenha colhido amostras com menor tempo de inoculação.

A migração de células para o interior de géis 3D de colágeno tipo I é um fenômeno ainda não totalmente esclarecido. LIOTTA e colaboradores (1983) dizem que a migração celular através da MEC *in vivo* só é possível com a produção de proteases. De fato, em eventos como a invasão tumoral, migração de leucócitos e nidação das células trofoblásticas no início do desenvolvimento embrionário, são fenômenos onde se observa a locomoção de células através da matriz extracelular e ocorre a produção de metaloproteases (WOESSNER Jr, 1991; KLEINER Jr & STETLER-STEVENSON 1993). Já existem relatos na literatura que sugerem a secreção dessas enzimas, como as collagenases, pelas células Vero quando essas são cultivadas em substratos de colágeno tipo I, como esponjas cristalizadas (WADA & VIDAL, 1991) e géis 3D (MARIA, 1994). No entanto, MARIA (1994) levantou a hipótese de que as células Vero possam ter migrado para o interior do gel através de um rearranjo das fibras colagênicas. Sabe-se que durante a contração de géis de colágeno I, apesar de haver uma diminuição bastante significativa do diâmetro e/ou altura do gel (ALLEN & SCHOR, 1983; GRUIDRY & GRINNELL, 1985; TOMASEK, 1992; REED et al., 1993; CHIQUET-EHRISMANN, et al., 1994; MARIA, 1994), pouca degradação do colágeno pôde ser registrada (GRUIDRY & GRINNELL, 1985). Sendo assim, seria plausível que, *in vitro*, a migração celular através de uma matriz colagênica pudesse ser consequência apenas de um rearranjo da mesma promovido pelas

células. *In vivo* porém, em fenômenos como a invasão tumoral e a migração leucocitária durante a resposta inflamatória, a parece que a degradação da MEC seja necessária para a migração celular.

Com 120h de cultivo, pudemos observar que, nas amostras que foram mantidas sem soro, houve um aumento do número de células nos estratos, sem que ocorrem alterações morfológicas nas mesmas. Nas amostras cultivadas com 10% de SFB o mesmo padrão foi observado, ocorrendo no entanto uma discreta intensificação no número de pontos de infiltração para o interior do gel. Nas culturas que receberam DEX ou 20% de SFB, não foi notado infiltração. Em todos os casos descritos acima, as células presentes no interior do gel apresentavam morfologia arredondada e granulações ao seu redor. Essas granulações foram evidenciadas não apenas pelo xylydine ponceau, o que indicou sua natureza proteica, mas também pelo azul de toluidina, o que nos informou a sua riqueza em grupos aniônicos COO^- e/ou SO_3^- que em pH 4,0 estão presentes apenas em açúcares ácidos. Esse material possivelmente corresponde a glicosaminoglicanos e/ou proteoglicanos ou outros elementos de MEC. Resultados semelhantes foram também obtidos por WADA & VIDAL (1991), em células Vero cultivadas em esponjas liofilizadas de colágeno tipo I, e por MARIA (1994) que cultivou as mesmas células em géis 3D de colágeno também do tipo I. Em ambos os casos os autores encontraram modificações nos substratos na forma de depósitos de material extracelular metacromático.

GOLOMBICK e colaboradores (1995) mostraram que células UWOV₂, uma linhagem estabelecida a partir de tumores de ovário, são capazes de produzir colágeno IV, laminina, glicoproteínas, proteoglicanos e ácido hialurônico. Fibroblastos embrionários de pele humana em cultura também se mostram capazes

de secretar não apenas glicosaminoglicanos livres, mas também proteoglicanos (COSTER et al., 1979). A importância da secreção desses componentes da MEC reside no fato de que, *in vivo*, os glicosaminoglicanos têm importante participação em interações célula-célula e célula-substrato, além de exercerem influência na proliferação celular e na própria estabilização do fenótipo celular (TOOLE, 1981).

Com 240h de cultivo para as células cultivadas sem soro fetal não observamos alterações tanto da morfologia celular quanto da migração para o interior do gel. As células que receberam 10% SFB mostraram ao contrário, intensa infiltração para o interior do substrato. Interessantemente, nos casos onde as células foram tratadas com DEX a infiltração foi bloqueada e as células Vero continuaram a manter características tipo epiteliais. Podemos supor que nesse sistema, moléculas do DEX difundiriam-se através das biomembranas a ligar-se-iam aos receptores para glicocorticóides, esse complexo seria então translocado para o núcleo onde reprimiria o fator de transcrição AP-1, o qual é codificado pelos oncogenes c-fos e c-jun, (YANG-YEN et al., 1990; JONAT et al., 1990; SCHÜLE et al., 1990). A repressão de AP-1 leva a diminuição na síntese das collagenases, além de várias outras proteases (JONAT et al., 1990). Sendo assim, o bloqueio da infiltração para o interior do substrato colagênico pelo DEX, corrobora a hipótese de que ela ocorra basicamente através de ação proteolítica.

Resultados semelhantes foram obtidos também nas amostras cultivadas com 20% de SFB. Um dos componentes presentes no soro é a α_2 -macroglobulina (α_2 -M). A α_2 -M é uma das maiores proteínas plasmáticas dos seres humanos, com Mr de 725.000, e que possui várias proteínas homólogas em todos os vertebrados (BARRETT, 1981). Essa proteína apresenta maior afinidade para as collagenases que o próprio substrato das mesmas, sendo os valores de seu K_{cat}/K_m ($M^{-1}.h^{-1} \times 10^4$)

para a α_2 -M é de 280 em comparação com números em torno de 0,1 a 11 para vários tipos de colágeno (WOESSNER Jr., 1991; NAGASE et al., 1994). A inibição de colagenases, assim como para outras enzimas, pela α_2 -M se deve a uma região do inibidor conhecido como região *bait*. A enzima se liga a essa região e a cliva, o que leva a alterações conformacionais no inibidor que então se liga covalentemente à enzima através de um rearranjo de ligações tioésteres. Nessa forma modificada, a enzima perde sua atividade, não podendo portanto clivar o seu substrato (WOESSNER Jr., 1991; NAGASE et al., 1994). O uso de 20% de SFB foi no intuito de simular um aumento na concentração de α_2 -M, um inibidor da atividade enzimática das colagenases. Nesse caso, a infiltração para o interior do substrato colagênico também foi bloqueada.

Apesar de termos bloqueado a infiltração das células onde esta não tinha se iniciado, tanto com 120h como com 240h de cultivo, encontramos regiões onde as células Vero já habitavam o interior dos géis, mesmo quando cultivadas na presença dos inibidores de colagenases. Atribuímos isso ao fato de que com 48h de cultivo já termos encontrado alguns pontos de infiltração. É interessante ressaltar que, mesmo na presença dos inibidores usados, o comportamento das células no interior do gel não se alterou, pois encontramos modificações no substrato na forma de granulações evidenciadas por HE, XP e AT, assim como aquelas encontradas nas células que foram cultivadas sem esses inibidores. Ao que parece, a síntese de metaloproteases, como as colagenases, é regulada por um mecanismo independente da secreção de proteínas e/ou glicosaminoglicanos, ao menos quando as células estão imersas na matriz colagênica.

Nossos dados não são conclusivos em avaliar a eficiência dos inibidores empregados. Porém podemos afirmar porém que a inibição pelo aumento das

concentrações de SFB, atribuída aqui a α_2 -macroglobulina, apresenta menor interferência no crescimento celular se comparado com o dexametasona, isso tomando como base os resultados obtidos com as células cultivadas sobre lamínulas, onde observamos a formação de grumos celulares induzidos pelo DEX em várias regiões do tapete celular. Cabe ainda resaltar que quando as células cresceram em substrato colagênico, essas alterações de comportamento celular desapareceram por completo.

Outro resultado que nos chamou a atenção foi, nas células cultivadas com 20% de SFB sobre os géis de colágeno e coradas com azul de toluidina, a presença uma região acelular levemente evidenciada pelo AT logo abaixo dos estratos celulares. Esses resultados, mais os da microscopia eletrônica de varredura onde encontramos um material fibrilar reticulado entre as células e o gel colagênico, fizeram-nos levantar a hipótese da formação de uma lâmina basal nas células que não infiltraram para o interior da matriz colagênica. Este resultado é compatível com o descrito por outros autores com relação a produção de componentes de membrana basal por células *in vitro* (STREULI & BISSIL 1990; GOLOMBICK et al., 1995). Os resultados da imunocitoquímica confirmaram essa hipótese. Obtivemos reação positiva para colágeno IV tanto nas amostras mantidas com DEX como nas cultivadas com 20% de SFB. Pudemos detectar a presença de colágeno IV já com 48h de cultivo, quando as células organizavam-se como uma monocamada sobre o gel, embora a deposição encontrada não tenha sido homogênea sobre o substrato. Analisando em conjunto esses dados, podemos constatar que as células Vero foram capazes de organizar um membrana basal rica em colágeno IV, mas também com a presença de glicosaminoglicanos. Assim nossos resultados dizem que as células Vero, ao serem cultivadas sobre géis 3D de

colágeno tipo I, nas primeiras horas de cultivo, tentam organizar uma membrana basal. Após um certo período de incubação, entre 48h e 120h, elas são capazes de se infiltrarem para o interior do substrato, permanecendo então imersas em uma matriz colagênica, devido a ação de colagenases. Esses resultados são compatíveis com os descritos anteriormente por MARIA (1994).

Observações semelhantes às nossas foram descritas também para outros tipos celulares. Fibroblastos quando cultivados em géis 3D de colágeno I invadem a matriz e adquirem forma alongada no interior da mesma (SCHOR, 1980), o mesmo se dando com células mesenquimais embrionárias (HAY, 1990) e células de ovário do hamster chinês (SCHOR et al., 1981) quando estas são cultivadas em condições similares. Comportamento semelhante não é restrito apenas a células fibroblastóides. GREENBURG & HAY (1982) trabalharam com vários epitélios embrionários como o da notocorda e do cristalino, além de células endoteliais. Esses autores observaram que, quando essas células foram cultivadas no interior de uma matriz 3D de colágeno I, o epitélio se desorganizava e adquiria características de células migratórias, com quantidades abundantes de organelas responsáveis pelos processos de síntese e secreção, perdiam da polaridade ápico-basal e assumia morfologia alongada. Todas essas características são típicas de células mesenquimais (GREENBURG & HAY, 1982). Esses autores obtiveram resultados semelhantes cultivando epitélios altamente diferenciados como o da glândula tireóide no interior de géis de colágeno I (GREENBURG & HAY, 1988). Nessas células foi observada a aquisição de morfologia alongada, com a presença de filopódios na superfície celular e retículo endoplasmático bastante desenvolvido, além de alterações na composição do citoesqueleto, com a perda gradual de citoqueratina e a substituição desta por vimentina, à medida em que as

células desprendiam-se dos folículos e migravam para o interior da matriz colagênica (GREENBURG & HAY, 1988). Em outro exemplo, células endoteliais do canal atrioventricular, uma estrutura transitória na embriogênese do coração, quando cultivadas em gel de colágeno, mostram-se capazes de migrar para o interior do substrato já com 12h de cultivo (MARKWALD et al., 1984).

Inversamente existem células epiteliais que, quando cultivadas apoiadas sobre o colágeno, não invadem o substrato e retêm as suas características epiteliais (GREENBURG & HAY, 1982,1988). Uma das características típicas de células epiteliais é a capacidade de produzir uma lâmina basal. A secreção de componentes de lâmina basal tem sido demonstrado *in vitro* e *in vivo* em vários sistemas com diferentes tipos de células epiteliais, como células embrionárias de cristalino, córnea e neuroepitélio, todos de galinha (KEFALIDES et al., 1979). A formação de lâmina basal foi demonstrada também para células humanas, dentre elas células de endotélio de veias do cordão umbilical, do epitélio glomerular renal e células presentes no líquido amniótico (KEFALIDES et al., 1979). Além disso, células epiteliais quando cultivadas sobre géis de colágeno normalmente são capazes de secretar componentes de membrana basal, tais como o colágeno IV e a laminina (STREULI & BISSELL, 1990). À exceção desse comportamento epitelial, estão as células epiteliais tumorais que, *in vivo*, apresentam capacidade de invadir a MEC. Essas células *in vitro* mantêm essas características, infiltrando-se para o interior de substratos colagênicos (LIOTTA et al., 1983; LIOTTA, 1986).

Como vimos acima, o comportamento celular sobre géis de colágeno pode ser classificado em fibroblastóide e epitelial. Basicamente, a principal variação entre ambos os casos reside na capacidade da célula em questão invadir a matriz colagênica. Essa capacidade aparentemente se dá, de acordo com nossos

resultados, a partir da ativação dos genes das colagenases, ou demais metaloproteases, as quais possibilitam a célula a invadir a matriz.

Os genes das colagenases são marcadamente ativados pelo contato da célula com uma matriz colagênica (MAUCH, et al., 1988). Com a eliminação dessas enzimas, seja na inibição de sua síntese através do DEX, ou em sua atividade, provavelmente devido a presença da α_2 -M, em concentrações elevadas de SFB, fomos capazes de impedir a infiltração para o interior do gel colagênico. Se fibroblastos quando cultivados em géis 3D de colágeno são capazes de formar estruturas que apresentam as características de um tecido conjuntivo, semelhante ao encontrado na derme (STOPAK & HARRIS, 1982), ou mesmo denso e modelado, como os tendões, variando apenas as condições de cultura empregadas (STOPAK & HARRIS, 1982), e se no interior de géis de colágeno as células Vero também são capazes de organizar uma estrutura que apresenta propriedades semelhantes as de um tecido conjuntivo frouxo (MARIA, 1994), neste trabalho nós mostramos que essa mesma célula pode ser induzida a apresentar comportamento semelhante a de um tecido epitelial, com estabelecimento de um estrato celular estável, com 5 a 7 camadas de células no geral, e com a formação de uma membrana basal rica em colágeno IV e com a presença de glicosaminoglicanos.

No que diz respeito ao comportamento da fibronectina nas células cultivadas sobre os géis de colágeno, encontramos variações de sua expressão nos casos onde se deu a infiltração no substrato e onde essa foi barrada. Nas amostras onde as células foram capazes de migrar para o interior do substrato, a imunocitoquímica revelou que as células secretam FN dentro do gel, sendo que essa deposição se dá preferencialmente ao redor das células, a medida que as células vão se infiltrando. Ao que nos parece, as células Vero condicionam o

substrato para que esse se torne um ambiente mais favorável para seu crescimento. A FN é uma proteína típica dos tecidos conjuntivos de uma forma geral. Além disso ela está relacionada intimamente a processos de migração celular tanto *in vitro* como *in vivo* (HYNES, 1990).

Existem relatos na literatura em que o contato de fibroblastos com substratos a base de colágeno tipo I ative a expressão de collagenases (MAUCH et al., 1988), mas esses autores não verificaram se proteínas extracelulares, tais como a FN, estavam presentes e se eram pré-requisitos ou não para a ativação dos genes para essas enzimas. Sabe-se que o contato de células com o colágeno pode mudar a forma das células e essa mudança se dá através da reorganização do citoesqueleto, sobretudo dos filamentos de actina, e a FN é um intermediário importante entre a matriz colagênica e as integrinas (ALBERTS et al., 1994). Sabemos também que os filamentos de actina estão intimamente relacionados à atividade das collagenases (HANSELL et al., 1995). É plausível portanto que a FN também seja um fator importante para a secreção de enzimas, como as collagenases, *in vivo* e *in vitro*.

Nos experimentos em que a infiltração de células no substrato foi bloqueada pela concentração de 20% de SFB ou pelo DEX, a FN apresentou aspectos diferenciados. Em primeiro lugar, não encontramos FN abaixo do estrato celular formado, o que nos leva a crer que a membrana basal formada é extremamente pobre ou mesmo não possui FN. *In vivo*, nos tecidos epiteliais, a FN é encontrada, ainda que em pequenas quantidades, nas camadas mais basais do estrato celular, próxima a lâmina basal, e a medida que as células “migram” para as camadas superficiais do estrato elas perdem esse revestimento (ADAMS & WATT, 1989). Concomitantemente, ocorre a diferenciação terminal dos queratinócitos, sua

posterior morte e transformação em escamas de queratina que integram a pele. Na verdade, a adição de FN a queratinócitos humanos é capaz de inibir a sua diferenciação terminal *in vitro* (ADAMS & WATT, 1989). A perda de FN está envolvida no desenvolvimento normal e na fisiologia do tecido e, ao que parece, está relacionada com a perda dos receptores celulares para essa proteína (ADAMS & WATT, 1990; CARROLL et al., 1995). É possível que a ausência completa de FN no estrato celular induzido aqui pela presença de DEX ou pela concentração de 20% de SFB represente assim um comportamento celular diferenciado e programado.

Em última análise, todas as células que assumiram um comportamento epitelial, assim o fizeram muito provavelmente devido a inibição das collagenases. Resultados de outros autores mostram também uma íntima relação entre as metaloproteases e a diferenciação celular e o desenvolvimento embrionário. Há relatos demonstrando que a formação de ramificações durante a morfogênese *in vitro* da glândula salivar de embriões de camundongo foi estimulada quando essa foi cultivada na presença de um inibidor de collagenase (NAKANISHI et al., 1986). Ao contrário, quando essa mesma glândula foi cultivada na presença de collagenases, foi observado uma inibição na formação destas ramificações (NAKANISHI et al., 1986). TALHOUK e colaboradores (1992) trabalhando com células de epitélio de glândula mamária, observaram que a expressão de enzimas que degradam a MEC e seus inibidores, regulam a organização da membrana basal, bem como a função específica do tecido em questão: a secreção de proteínas do leite. BIRCHMEIER e BIRCHMEIER (1993) também relatam a importância do balanço de proteases e seus inibidores nas interações mesênquimo-epiteliais durante o desenvolvimento embrionário. Vemos portanto, pelos resultados

descritos por outros autores e pelos nossos próprios, que o balanço entre as metaloproteases, seus inibidores e as interações entre as células e os componentes da MEC, apresentam íntima relação com a diferenciação celular e a morfogênese tecidual. Essas interações não são restritas a cultura primária de células e de tecidos adultos ou embrionários, mas ocorre também em linhagens celulares que como a Vero, já vem sendo mantidas e manipuladas *in vitro* por quase 30 anos.

V- Conclusões

1º) As células cultivadas sobre lamínulas e mantidas em altas concentrações de soro fetal bovino mostraram um padrão de crescimento e fisiologia celular menos alterado que as células mantidas com dexametasona.

2º) O dexametasona altera a fisiologia das células Vero cultivadas sobre lamínulas, modificando o seu comportamento e induzindo também a formação de grumos celulares. Estes grumos são ricos em um material proteico, glicosaminoglicanos e fibronectina.

3º) As células Vero quando cultivadas sobre lamínulas de vidro são capazes de secretar colágeno tipo IV mesmo na ausência de soro, porém essa deposição é estimulada por fatores séricos.

4º) O dexametasona reprime a formação de colágeno tipo IV quando células Vero são cultivadas em lamínulas de vidro. Efeito oposto é obtido quando essas mesmas células são cultivadas sobre géis de colágeno tipo I.

5º) As células Vero infiltram-se para o interior de substratos colagênicos basicamente através de ação proteolítica de collagenases.

6º) Quando a infiltração celular no substrato não é interrompida, as células no interior do gel colagênico formam uma estrutura semelhante a um tecido conjuntivo frouxo, com deposição de material proteico, glicosaminoglicanos e fibronectina. Isso ocorre mesmo na ausência de soro fetal bovino, embora seja estimulado por fatores séricos.

7º) Quando bloqueamos a infiltração das células Vero na matriz colagênica, seja com o dexametasona ou com concentrações elevadas de soro fetal bovino, induzimos as células a um comportamento com características de células epiteliais, inclusive com a formação de uma estrutura semelhante à membrana basal, composta de colágeno tipo IV e glicosaminoglicanos e sem fibronectina.

VI. Referências bibliográficas

- ADAMS, J.C. & WATT, F.M. Fibronectin inhibits the terminal differentiation of human keratinocytes, **Nature** **340**: 307-309, 1989.
- ADAMS, J.C. & WATT, F.M. Changes in keratinocytes adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes $\alpha_5\beta_1$ integrin loss from the cell surface, **Cell** **63**: 425-435, 1990.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, S.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J.D. **Molecular biology of the cell**, 3rd ed, Garland Publishing, New York-London, 1294 p, 1994.
- ALLEN, T.D. & SCHOR, S.L. Contraction of collagen matrices by dermal fibroblasts, **J. Ultrastruct. Res.** **83**: 205-219, 1983.
- BARRAUD, B.; BALAVOINE, S.; FELDMANN, G. & LARDEUX, B. Effects of nicotinamide on hepatocyte viability and secretion of albumin and α_1 -acid glycoprotein by adult rat hepatocytes in primoculture. comparison with dexamethasone and recombinant human interleukin-6, **Biol. Cell** **83**: 127-133, 1995.
- BARNES, D. Attachment factor in cell culture, *in* **Mammalian cell culture**, Ed by J. P. Mather, Plenum press, New York-London, pp 195-237, 1984
- BARRET, A.J. α_2 -Macroglobulin, **Meth. Enzymol.** **80**: 737-754, 1981

- BAUMANN, H.; FIRESTONE, G.L.; BURGESS, T.L.; GROSS, K.W.; YAMAMOTO, K.R. & HELD, W. Dexametasone regulation of α_1 -acid glycoprotein and other acute phase reactants in rat liver and hepatoma cells, **J. Biol. Chem.** 258: 563-570, 1983.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C. & FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**, EDART/EDUSP, 241p, 1976
- BELL, E.; IRVARSSON, B. & MERRILL, C. Production of tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76: 1274-1278, 1979.
- BERNE, R.M. & LEVY, M.N. **Fisiologia**, 2^o ed, Guanabara, pp 758-783, 1990
- BERNFELD, M.; HINKES, M.T.& GALLO, R.L. Developmental expression of the syndecans: possible function and regulation, **Development (Supplement)**: 205-212, 1993.
- BIRCHMEIER, C. & BIRCHMEIER, W. Molecular aspects of mesenchymal-epithelial interactions, **Annu. Rev. Cell Biol.** 9: 511-540, 1993.
- BLAU, H.M. Differentiation requires continuous active control, **Annu. Rev. Biochem.** 61: 1213-1230, 1992.
- BROWN, P. D. Clinical trials of a low molecular weight matrix metalloproteinase inhibitor in cancer, **Ann. New York Acad. Sci** 732: 217-221, 1994.

- CARROLL, J.M.; ROMERO, M.R. & WATT, F.M. Suprabasal integrin expression in the epidermis of transgenic mice results in developmental defects and a phenotype resembling psoriasis, *Cell* **83**: 957-968, 1995
- CHIQUET-EHRISMANN, R.; TANNHEIMER, M.; KOCH, M.; BRUNNER, A.; SPRING, J.; MARTIN, D.; BAUMGARTNER, S. CHIQUET, M. Tenascin-C expression by fibroblasts is elevated in stressed collagen gels, *J. Cell Biol.* **127**: 2093-2101, 1994.
- COLLIER, I.E.; WILHELM, S.M.; EISEN, A.Z.; MARMER, B.L.; GRANT, G.A.; SELTZER, J.L.; KRONBERGER, A.; HE, C.; BAUER, E.A. & GOLDBERG, G.I. H-ras oncogene transformed human bronchial epithelial cells (TRE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen, *J. Biol. Chem.* **263**: 6579-6587, 1988
- GOLOMBICK, T; DAJEE, D & BEZWODA, W.R. Extracellular matrix interactions I: production of extracellular matrix with attachment and growth-sustaining functions by UWOVS ovarian cancer cells growing in protein free conditions, *In Vitro Cell Dev. Biol.* **31**: 387-395, 1995.
- COSTER, L.; CARLSTED, I. & MALMSTROM, A. Isolation of S and H-labelled proteoglycans from cultures of human embryonic skin fibroblasts, *Biochem. J.* **183**: 669-681, 1979
- DE CLERCK, Y. A.; SHIMADA, H.; TAYLOR, S. M. & LANGLEY, K. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor progression, *Ann. New York Acad. Sci* **732**: 222-232, 1994.

DOZIN, B.; QUARTO R.; CAMPANILE, G. & CANCEDDA, R. *In vitro* differentiation of mouse embryo chondrocytes: requirement for ascorbic acid, **Eur. J. Cell Biol.** **58**: 390-394, 1992.

EKBLOM, M.R.; FASSLER, B.; TOMASINI-JOHANSSON, K.; NILSSON, K. & EKBLOM, P. Downregulation of tenascin expression by glucocorticoids in bone marrow stromal cells and in fibroblasts, **J. Cell Biol** **123**: 1037-1045, 1993.

EHRETSMANN, C. P.; CHANDLER, L. A. & BOURGEOIS, S. A nuclear post-transcriptional mechanism mediates the induction of fibronectin by glucocorticoids, **Mol. Cel. Endocrinol.** **110**: 185-194, 1995.

FLEMING, N & KISTLER, G.S. Morphology, histochemistry and isozymes of monkey kidney cells during long-term exposure to cigarette smoke, **Acta Histochem** **60**: 132-145, 1977.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells, a manual of basic techniques**, 2nd ed, Wiley Liss, 397p, 1991

FRISCH, S. M. & RULEY, H. E. Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone, **J. Biol. Chem.** **262**: 16300-16304, 1987

FUKAZAWA, H.; MIZUNO, S. & UEHARA, Y. A microplate assay for quantitation of anchorage-independent growth of transformed cells. *Anal. Biochem.* **228**: 83-90, 1995

FURCHT, L. T.; MOSHER, D. F.; WENDELSCHAFFER-CRABB, G.; WOODBRIDGE, P. A. & FOIDART, J. M. Dexamethasone induce accumulation of a fibronectin and collagen extracellular matrix in transformed human cells, *Nature* **277**: 393-395, 1979.

GENARI, S.C. & WADA, M.L.F. Behavioural differences and cytogenetic analysis of a transformed cellular population derived from a Vero cell line, *Cytobios* **81**: 17-25, 1995

GILLERY, P.; MAQUART, F.X. & BOREL, J.P. Fibronectin dependence of the contraction of collagen lattices by human skin fibroblasts, *Exp. Cell Res.* **167**: 29-37, 1986

GOLDBERG, G.I.; WILHELM, S.M.; KRONBERGER, A.; BAUER, E.A.; GRANT, G.A. & EISEN, A.Z. Human fibroblast collagenase, *J. Biol. Chem* **261**: 6600-6605, 1986

GREENBURG, G. & HAY, E.D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells, *J. Cell Biol.* **95**: 333-339, 1982.

- GREENBURG, G. & HAY, E.D. Cytoskeleton and thyroglobulin expression change during transformation of thyroid epithelium to mesenchyme-like cells, **Development** **102**: 605-622, 1988.
- GRINNELL, F. & BENNETT, M.H. Fibroblast adhesion on collagen substrata in the presence and absence of plasma fibronectin, **J. Cell Sci.** **48**: 19-34, 1981
- GRINNELL, F.; TODA, K.I. & TAKASHIMA, A. Activation of keratinocyte fibronectin receptor function during cutaneous wound healing, **J. Cell Sci (Suppl 8)**: 199-209, 1987.
- GRINNELL, F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction, **J. Cell Biol.** **124**: 401-404, 1994.
- GROSS, V.; ANDUS, T., TRAN-THI, T.; BAUER, J.; DECKER, K. & HEINRICH, P.C. Induction of acute phase proteins by dexamethasone in the rat hepatocyte primary cultures, **Exp. Cell Res.** **151**: 46-54, 1984
- GUÉRIN, G.W. & HOLLAND, P.C. Synthesis and secretion of matrix degrading metalloproteases by human skeletal satellite cells, **Dev. Dyn.** **202**: 91-99, 1995
- GUIDRY, C. & GRINNELL, F. Studies on the mechanism of hydrated collagen gel reorganization by human skin fibroblasts, **J. Cell Sci.** **79**: 67-81, 1985.

- HÄMÄLÄINEN, L.Ç; OIKARINEN, J & KIVIRIKKO, K.I. Synthesis and degradation of type I procollagen mRNA in cultured human skin fibroblasts and the effect of cortisol, **J. Biol. Chem** **260**: 720-725, 1985
- HARRIS, A.K.; STOPAK, D. & WILD, P. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis, **Nature** **290**: 249-251, 1981.
- HATA, R.Y. Where am I? How a cell recognizes its positional information during morphogenesis, **Cell Biol. Int.** **20**: 59-65, 1996
- HAY, E.D. Collagen and embryonic development. *In Cell biology of extracellular matrix*, Ed by E. D. Hay, Plenum Press, New York-London, pp 379-409, 1981.
- HAY, E.D. Cell-matrix interaction in the embryo: cell shape, cell surface, cell skeletons and their role in differentiation. *In The role of extracellular matrix in development*, Ed by R. L. Trelstad, Alan Liss, New York, pp 1-31, 1984.
- HAY, E.D. Role of cell-matrix in cell migration and epithelial-mesenchymal transformation, **Cell Diff. Dev.** **32**: 367-376, 1990.
- HAY, E.D. Extracellular matrix alters epithelial differentiation, **Cur. Opin. Cell Biol.** **5**: 1029-1035, 1993.
- HANSELL, E. J.; FRISCH, S. M; TREMBLE, P.; MURNANE, J. P. & WERB, Z. Simian virus 40 transformation alters the actin cytoskeleton, expression of

matrix metalloproteinases and inhibitors of metalloproteinases, and invasive behavior of normal and ataxiatelangiectasia human skin fibroblasts, **Biochem. Cell Biol.** **73**: 373-389, 1995

HIBBS, M.S.; HASTY, K.A.; SEYER, J.M.; KANG, A.H. & MAINARDI, C.L. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase, **J. Biol. Chem.** **260**: 2493-2500, 1985

HUG, V.; JOHNSTON, D.; FINDERS, M. & HORTOBAGYI, G. Use of growth-stimulatory hormones to improve the *in vitro* therapeutic index of doxorubicin for human breast tumors, **Cancer Res.** **46**: 147-152, 1986.

HYNES, R.O. **Fibronectins**, Springer-Verlag, New-York, 546 p, 1990.

ITOH, K. & SOKOL, S.Y. Heparan sulfate proteoglycans are required for mesoderm formation in *Xenopus* embryos, **Development** **120**: 2703-2711, 1994.

JONAT, C.; RAHMSDORF, H.J.; PARK, K.K., CATO, A.C.B.; GEBEL, S.; PONTA, H. & HERRLICH, P. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid, **Cell** **62**: 1189-1204, 1990.

JULIANO, R.L. & HASKILL, S. Signal transduction from the extracellular matrix, **J. Cell Biol.** **120**: 577-585, 1993.

JUNQUEIRA, L. C. U. & CARNEIRO, J. **Histologia básica**, 7^o ed, Guanabara, Rio de Janeiro, 388 p, 1990.

KARELINA, T.; HRUZA, G.J.; GOLDBERG, G.I. & EISEN, A.Z. Localization of 92 KDa type IV collagenase in human skin tumors: Comparision with normal human fetal and adult skin, **J. Invest. Dermatol.** **100**: 159-165, 1993.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy, **J. Cell Biol.** **27**: 136a, 1965.

KEFALIDES, N. A.; ALPER, R. & CLARK, C. C. Biochemistry and metabolism of basement membrane, **Int. Rev. Cytol.** **61**: 167-228, 1979.

KLEINER Jr, D.E. & STETLER-STEVENSON, W.G. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases, **Cur. Opin. Cell Biol.** **5**: 891-897, 1993.

KLEINMAN, H.K.; KLEBE , R.J. & MARTIN, G.R. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells, **J. Cell Biol.** **88**: 473-485, 1981.

KOVARY, K. & BRAVO, R. The Jun and Fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts, **Mol. and Cell Biol.** **11**: 4466-4472, 1991.

KRANE, S.M. Clirical importance of metalloproteinases and their inhibitors, **Ann. New York. Acad. Sci** **732**: 1-10, 1994.

LEWIN, B. **Genes V**, Oxford press, Oxford-New York-Tokyo, 1272 p, 1994.

LIN, C.Q. & BISSELL, M.J. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix, **FASEB. J.** 7: 737-743, 1993.

LIOTTA, L.A.; RAO, C.N. & BARSKY, S.H. Tumor invasion and the extracellular matrix, **Lab. Invest.** 49: 636-649, 1983.

LIOTTA, L.A. Tumor invasion and metastases - The role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture, **Cancer Res.** 46: 1-7, 1986

MAINWARING, W.I.P. Hormônios e câncer. *In* **Introdução a biologia celular e molecular do câncer**, Ed by L. M Franks, & N. Teich, ed. Rocca, São Paulo, pp 267-292, 1990.

MARIA, S.S. Estudo comportamental da linhagem celular Vero quando cultivada em substrato de gel de colágeno tipo I, Dissertação de mestrado, IB-Unicamp, Campinas, 1994

MARKWARD, R.R.; RUNYAN, R.B.; KITTEN, G.T.; FUNDERBURG, F.M.; BERNANKE, D.H. & BRAUER, P.R. Use of collagen gel culture to study heart development: proteoglycan and glycoprotein interations during the formation of endocardial cushion tissue. **The role of extracellular matrix in development**, Ed by R. L. Trelstad, Alan R. Liss, New York, pp323-350, 1984.

MAUCH, C; HATAUOCHI, A; SCHARFFETTER, K & KRIEG, T. Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three-dimensional collagen gel, **Exp. Cell Res.** 178: 493-503, 1988

MAUCH, C.; ADELMANN-GRILL, B.; HATAMOCHI, A. & KRIEG, T. Collagenase gene expression in fibroblasts is regulated by a three-dimensional contact with collagen, **FEBS Lett.** 250: 301-305, 1989.

MAYNE, R. & BIRMINGHAM, R.G. New members of collagen superfamily, **Cur. Opin. Cell Biol.** 5: 883-890, 1993.

MELLO, M. L. S. & VIDAL, B. C. **Práticas de biologia celular**, Edgard Blücher/FUNCAMP, SP, 69 p, 1980.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **J. Immunol. Meth.** 65: 55-63, 1983

NAGASE, H.; ITOH, Y. BINNER, S. Interaction of α_2 -macroglobulin with matrix metalloproteinases and its use for indentification of their active forms, **Ann. New York Acad. Sci** 732: 294-302, 1994.

NAKANISHI, Y.; SUGIURA, F., KISHI, J.I. & HAYAKAWA, T. Collagenase inhibitor stimulates cleft formation during early morphogenesis of mouse salivary gland, **Dev. Biol.** 113: 201-206, 1986.

- PEARCE, R.H. & LAURENT, T.C. Exclusion of dextrans by meshworks of collagenous fibres, **Biochem. J.** **163**: 617-625, 1977
- PIEZ, K.A. & REDDI, A.H. **Extracellular matrix biochemistry**, Elsevier, New York-Amsterdam-Oxford, 473 p, 1984.
- PLEDGER, W.F., ESTES, J.E., HOWE, R.H. & LEOF, E.B. Serum factor requirements for the initiation of cellular proliferation , *in Mammalian cell culture*, Ed by J. P. Mather, Plenum press, New York-London, pp 1-15, 1984.
- RAGHOW, R.; GOSSAGE, D. & KANG, A.H. Pretranslational regulation of type I collagen, fibronectin, and a 50 Kilodalton noncollagenous extracellular protein by dexamethasone in rats fibroblasts, **J. Biol. Chem** **261**: 4677-4684, 1986
- RAPRAEGER, A.C. The coordinated regulation of heparan sulfate syndecans and cell behavior, **Cur. Opin. Cell Biol.** **5**: 844-853, 1993.
- RAW, I.; BRENTANI, M. M.; BRENTANI, R & MENNUCCI, L. **Bases moleculares da medicina Vol III : câncer**, ed. Edusp/Atheneu, São Paulo, 124 p, 1990.
- RAY, J. M. & STETLER-STEVENSON, W. G. Timp-2 expression modulates human melanoma cell adhesion and motility, **Ann. New York. Acad. Sci** **732**: 233-247, 1994.

- REED, M.J.; VERNON, R.B.; ABRASS, I.B. & SAGE, E.H. TGF- β 1 induces of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors. *J. Cell Physiol.* **158**: 169-179, 1994.
- SAGE, E.H. & BORNSTEIN, P. Extracellular proteins that module cell-matrix interactions, *J. Biol. Chem.* **266**: 14831-14834, 1991.
- SATO, H.; TAKINO, T.; OKADA, Y.; CAO, J; SHINAGAWA, A.; YAMANO, E. & SELKL, M. A matrix metalloproteinase expressed on surface of invasive tumor cells, *Nature* **370**: 61-65, 1994
- SCHOR, S.L. & COURT, J. Different mechanisms in the attachment of cells to native and denatured collagen, *J. Cell Sci.* **38**: 267-281, 1979.
- SCHOR, S.L. Cell proliferation and migration on collagen substrata in vitro, *J. Cell Sci.* **41**: 159-175, 1980.
- SCHOR, S.L., SCHOR, A.M. & BAZILL, G.W. The effects of fibronectin on the adhesion and migration of chinese hamster ovary cells on the collagen substrata, *J. Cell Sci.* **49**: 299-310, 1981.
- SCHÜLE, R.; RANGARANJAN, P.; KLIEWER, S.; RANSONE, L.J.; BOLADO, J.; YANG, N.; VERMA, I.M. & EVANS, R.M. Functional antagonism between oncoproteins c-jun and the glucocorticoid receptor, *Cell* **62**: 1217-1226, 1990.

- STETLER-STEVENSON, W.G.; AZNAVOORIAN, S. & LIOTTA, L.A. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis, *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 541-573, 1993.
- STOPAK, D. & HARRIS, A. Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction, *Dev. Biol.* 90: 383-398, 1982
- STREULI, C.H. & BISSELL, M.J. Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum, *J. Cell Biol.* 110: 1405-1415, 1990.
- TALHOUK, R.S.; BISSEL, M.J. & WERB, Z. Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution, *J. Cell Biol.* 118: 1271-1282, 1992.
- TAUB, M. Kidney cell culture in hormonally defined serum-free medium. *In Mammalian cell culture*, Ed by J. P. Mather, Plenum Press, New York, pp 129-150, 1984.
- TOMASEK, J.J.; HAAKSMA, C.J.; EDDY, R.J. & VAUGHAN, M.B. Fibroblast contraction occurs on release of tension in attached collagen lattices: dependency on a organized actin cytoskeleton and serum, *Anat. Rec.* 232: 359-368, 1992.
- TOOLE, B.P. Glycosaminoglycans in morphogenesis, *in Cell biology of extracellular matrix*, Ed by E. D. Hay, Plenum Press, New York-London, pp 259-294, 1981.

TRELSTAD, R.L. **The role of extracellular matrix in development**, Alan R. Liss, New York, 643 p, 1984.

VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. **Biologia celular**, Atheneu, 347 p, 1987.

WADA, M.L.F. & VIDAL, B.C. Growth and differentiation of Vero cells cultivated in three-dimensional type I collagen, **Cytobios** 67: 101-109, 1991.

WATT, F.M. Cell culture models of differentiation, **FASEB. J.** 5: 287-294, 1991.

WEINER, F.R.; CZAJA, M.J.; JEFFERSON, D.M.; GIAMBRONE, M.; TURKASPA, R., REID, L.M. & ZER, M.A. The effects of dexamethasone on in vitro collagen gene expression, **J. Biol. Chem.** 262: 6955-6958, 1987.

WHITMAN, M. & MELTON, D.A. Growth factors in early embryogenesis, **Annu. Rev. Cell Biol.** 5; 93-117, 1989.

WOESSNER Jr, J.F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling, **FASEB. J.** 5: 2145-2154, 1991.

WOESSNER Jr, J.F. The family of matrix metalloproteinases, **Ann. New York Acad. Sci.** 723: 11-21, 1994.

YANG, J. & NANDI, S. Growth of cultured cells using collagen as substrate. **Int. Rev. Cytol.** 81: 249-286, 1983.

YANG-YEN, H.F.; CHAMBARD, J.C.; SUN, Y.L.; SMEAL, T.; SCHMIDT, T.J.; DROUIN, J. & KARIN, M. Transcriptional interference between c-jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction, *Cell* **62**: 1205-1215, 1990.

YAMAMOTO,M.; YAMAMOTTO,K. & NOUMURA,T. Type I collagen promotes modulation of cultured rabbit arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype, *Exp.Cell Res.* **204**: 121-129, 1993