



Silvyia Stuchi Maria

“Estudo citoquímico, imunocitoquímico e de análise de imagem de células fibroblásticas em proliferação e apoptose na ausência e presença de colágeno tipo I hiperpolimerizado”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a)
<i>Silvyia Stuchi Maria</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora
<i>15/10/98</i>

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, para obtenção de título de Doutor em Ciências, área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

Campinas, 1998

9823187

M337e

35888/BC



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
V.	Ex.
TOMBO BC/	35888
PROC.	395/98
C	D ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	19/11/98
N.º CPD	

CM-00118794-6

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Maria, Silvy Stuchi
M337e Estudo citoquímico, imunocitoquímico e de análise de
imagem de células fibroblásticas em proliferação e apoptose
na ausência e presença de colágeno tipo I hiperpolimerizado/
Silvy Stuchi Maria. -- Campinas, SP: [s.n.], 1998.
75f.:ilus

Orientador: Benedito de Campos Vidal
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Apoptose. 2. Colágeno. 3. Fibroblasto. I. Vidal, Benedito
de Campos. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Local e Data: Campinas, 15 de outubro de 1998.

Banca examinadora:

Titulares:

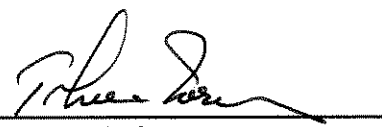
**Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal
(Orientador)**


Assinatura

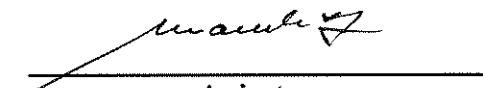
Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello


Assinatura

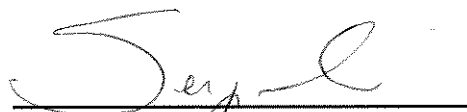
Profa. Dra. Telma Maria Tenório Zorn


Assinatura

Profa. Dra. Nora Marcela Haun Quirós


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line


Assinatura

Suplentes:

Prof. Dr. Sérgio Marangoni


Assinatura

**Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio
Bonafé**


Assinatura

Agradecimentos

Ao caríssimo Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal por seu exemplar trabalho de Orientador e Cientista, e por toda dedicação, compreensão e incentivo dispensados a mim durante este frutífero período.

À Profa. Dra. Maria Luiza S. Mello pela grande contribuição a este trabalho e à minha formação e juntamente com Dr. Vidal, por toda delicadeza no trato para comigo.

À Profa. Dra. Marcela Haun, pela gentileza de ceder as instalações de seu laboratório de Cultura Celular, para realização de experimentos desta tese e por sua amizade.

Aos Professores Doutores Telma M. T. Zorn, Sérgio R. P. Line, Hiroshi Ayoama, Sérgio Marangoni e Carlos F. S. Bonafé por participarem da Banca examinadora e com isto engrandecendo este trabalho.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Bioquímica e de Biologia Celular do IB/UNICAMP por todo auxílio prestado.

A Lílían e Mário, funcionários do Depto de Biologia Celular, a Marina, Mírian, Andréia e Neto, funcionários do Depto de Bioquímica por toda gentileza e colaboração.

A todos os meus queridos amigos que souberam me compreender, apoiar e incentivar ao longo da realização deste trabalho. Especialmente à Daniela, Gabriela, Adriana, Patrícia Melo, Patrícia Vilamaior e Águeda por todo carinho.

À CAPES e FAEP-UNICAMP pelo auxílio financeiro.

Abreviaturas

MEC- matriz extracelular

TNF- α - fator tumoral de necrose

DMEM- meio essencial mínimo modificado por Dulbecco

TdT- terminal desoxinucleotidil transferase

IOD- densidade óptica integrada

OD- densidade óptica

S (μm^2)- área nuclear

CaCl₂- cloreto de cálcio

HCl- ácido clorídrico

AT-CEC- azul de toluidina- concentração crítica de eletrólitos

Con A- concanavalina A

BHK 21- baby hamster kidney

Índice

I- Introdução

I.1. A respeito das interações célula-matriz extracelular.....	01
I.2. Morte celular.....	09
I.3. Interação célula-MEC e apoptose.....	16
I. 4. Objetivos	18

II- Material e métodos

II.1. Preparo do substrato.....	19
II.2. Manutenção da cultura.....	19
II.3. Cultivo celular sobre substrato colagênico e sobre lamínulas.....	20
II.4. Processamento do material para técnicas citoquímicas e fixação.....	21
II.5. Colorações citoquímicas.....	21
II.6. Métodos de imunocitoquímica.....	22
II.7. Análise de imagem.....	24
II.8. Curva de crescimento.....	24

III. Resultados

III.1. Análise citoquímica e de conteúdo de DNA de células BHK 21 em apoptose.....	28
III.2. Fragmentação e perda de conteúdo de DNA em células fibroblásticas V79 estudadas por Reação de Feulgen e análise de imagem.....	32
III.3. Análise de ocorrência de apoptose em células V79 quando cultivadas em gel de colágeno tipo I hiperpolimerizado.....	36
III.4. Cultivo de longo período de células V79 em gel de colágeno tipo I hiperpolimerizado.....	43

IV. Discussão

IV.1. Análise citoquímica e de conteúdo de DNA de células BHK 21 em apoptose. IV.2. Fragmentação e perda de conteúdo de DNA em células fibroblásticas V79 estudadas por reação de Feulgen e análise de imagem.....	43
IV.3. Análise de ocorrência de apoptose em células V79 quando cultivadas em gel de colágeno tipo I hiperpolimerizado	48

V. Conclusões.....	60
--------------------	----

VI. Referências Bibliográficas	61
--------------------------------------	----

Resumo

O presente trabalho é composto de dois estudos, o primeiro que trata a respeito da análise da morte celular por apoptose em células fibroblásticas em culturas confluentes e o segundo, sobre a influência do substrato à base de colágeno tipo I hiperpolimerizado no crescimento e apoptose de células fibroblásticas cultivadas por longo período.

As células BHK21 em apoptose, submetidas à reação de Feulgen e a seguir à análise de imagem, demonstraram menor conteúdo de DNA, representado pela diminuição dos valores de IOD (densidade óptica integrada). Após a reação de Concanavalina A (Con A), os núcleos apoptóticos exibiram uma maior positividade de reação que os núcleos normais, o que demonstra a presença de glicoproteínas, possivelmente da matriz nuclear, rearranjadas e complexadas ao DNA do núcleo apoptótico. O arranjo ordenado da complexação de glicoproteínas ao DNA foi confirmado através de coloração com AT-CEC (azul de toluidina-concentração crítica de eletrólitos), a qual diferencia DNA de RNA, seguida por observação em microscopia de polarização.

Células fibroblásticas V79, submetidas à reação de Feulgen e estudadas por análise de imagem, mostraram em culturas confluentes três fenótipos diferentes classificados como normal, suspeito de apoptose e apoptótico. Tal classificação foi feita aliando análise morfológica e avaliação de parâmetros como conteúdo de DNA (IOD), condensação cromatínica em termos de densidade óptica e medidas de área nuclear. Nossos resultados revelaram que a condensação cromatínica aumentou quando comparados os três fenótipos entre si. Foi observado decréscimo nos valores Feulgen-DNA em células apoptóticas e em células suspeitas de apoptose, revelando-se perda de DNA. Em conclusão, destacou-se a importância do método utilizado para caracterizar fases iniciais do processo apoptótico e a possibilidade de diagnóstico inequívoco de apoptose, ao utilizar esta metodologia, desde que associada a outras, quer citoquímicas, imunocitoquímicas ou bioquímicas.

No último estudo, células fibroblásticas V79 foram cultivadas em substrato de colágeno tipo I hiperpolimerizado. Este substrato apresenta características especiais de auto-agregação e é uma estrutura ordenada que mimetiza a estrutura apresentada pelos tendões *in vivo*. O cultivo celular de longa duração sobre este substrato foi caracterizado por análise de proliferação, diferenciação e morte celular por apoptose, comparado ao crescimento das células sobre lamínulas. A reação de Feulgen, associada à análise de imagem demonstrou que as células apresentaram um aumento no conteúdo de DNA e da condensação cromatínica quando crescidas em substrato colagênico. A proliferação das células V79 sobre colágeno foi menor, refletindo uma fase de latência neste substrato e após o método de TUNEL, específico para detecção de apoptose, observou-se que a morte celular ocorria, porém em tempos de cultivo superiores aqueles observados para células que cresceram sobre lamínula. Demonstrou-se que o substrato colagênico altera o desenvolvimento proliferativo e metabólico dos fibroblastos, características que sugerem a diferenciação celular, e também atrasa, mas não previne o processo apoptótico.

Summary

This work can be divided in two studies, the first concerned on analysis of cell death by apoptosis in a confluent fibroblast culture and the other deals with the influence of hyperpolymerized type I collagen gel on the growth and apoptosis of fibroblast cells in a long-term culture.

BHK 21 cells in apoptosis submitted to Feulgen reaction and image analysis showed lower DNA content represented by decreasing of IOD values (integrated optical density). After Concanavalin A reaction (Con A) the apoptotic nuclei showed higher positive reaction than normal nuclei, demonstrating the presence of glycoproteins, possibly from the nuclear matrix which were disorganized and complexed to the DNA of apoptotic nuclei. The ordered arrangement of glycoproteins on the DNA was confirmed by TB-CEC (Toluidine blue-critical electrolyte concentration) which differentiates DNA from RNA after polarization microscopy analyses.

V79 fibroblast cells submitted to the Feulgen reaction and image analysis of confluent cultures showed three different nuclear phenotypes classified as normal, suspected of apoptosis and apoptotic. This classification were done using morphological analysis and consideration of parameters such as DNA content (IOD), chromatin condensation in terms of optical density (OD) and nuclear area. The results showed that chromatin condensation increased when the three phenotypes were compared. A decrease of Feulgen-DNA values was observed in apoptotic cells and in cells suspected of apoptosis, revealing loss of DNA. In conclusion, this pointed out the importance of this method to characterized early phases of an apoptotic process and the possibility of unequivocal apoptosis diagnosis using this methodology when associated with others, such as cytochemical, immunocytochemical or biochemical methods.

In the other approach, V79 fibroblastic cells were cultured on hyperpolymerized collagen type I substrates. The substrate showed special characteristics of self-assembly and is an ordered structure that mimics the *in vivo* tendon. The long-term cell culture on this substrate was characterized by proliferation, differentiation and cell death by apoptosis analysis when compared to cell growth on coverslips. The Feulgen reaction allied to image analysis demonstrated that there is an increase in DNA content and in chromatin condensation when the cells are grow on the collagen substrate. The proliferation of V79 cells on collagen was less than observed for cells grown on a coverslips, which reflects the latency of this substrate. After the apoptosis specific TUNEL method, cell death was found to occur after longer culture periods than for cells grown on coverslips. The collagen substrate alters fibroblast proliferation and morphological aspects, characteristics that suggest cellular differentiation and the delay of apoptosis but not prevent the prevention of the apoptotic process.

I-Introdução

I.1.- A respeito das interações célula-matriz extracelular

O desenvolvimento e funcionamento normal dos diferentes tipos celulares nos organismos dependem de interações entre moléculas. A maior classe de moléculas que regula o desenvolvimento e as funções celulares inclui fatores de crescimento, moléculas de adesão celular e componentes da matriz extracelular (MEC) (Reichardt, 1993).

A MEC foi originalmente conceituada com base em aspectos morfológicos e definida como um material estável que proveria suporte para células e tecidos. É composta de grandes classes de macromoléculas tais como colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, glicoproteínas estruturais e elastina, dentre outros. Os membros de cada classe e família de moléculas da MEC exibem níveis de distribuição tecido-específica implicando a MEC no desenvolvimento e função dos tecidos (Roskelley *et al.*, 1995).

As informações disponíveis detalhando os mecanismos por meio dos quais a MEC pode controlar esses complexos fenômenos são ainda escassas atualmente, entretanto, Vidal (1966 a), em estudo de periodonto, já propunha um modelo enfatizando que as alterações de natureza mecânica eram transformadas em mensagens bioquímicas e que os feixes de colágeno desempenhavam papel central nesta forma de transdução de sinal.

De acordo com Vidal (1966 b), dependendo da mudança do estímulo mecânico e bioquímico, transformações locais ocorreriam (mudanças metabólicas, mudança de concentrações de glicosaminoglicanos e precursores de colágeno), atuando num sistema de retro-alimentação. Tal sistema atingiria o fibroblasto, estabelecendo modificações que manteriam a homeostasia. Caso ocorresse estímulo que impedisse a homeostasia, como processo inflamatório e trauma, mudanças locais de natureza bioquímica e biofísica ocorreriam, de forma a recuperar a homeostasia.

Bissell *et al.* (1982) descreveram o modelo da reciprocidade dinâmica para interações entre célula-MEC. Neste modelo, a célula teria seu metabolismo alterado devido à ação da MEC, e esta apresentaria alteração em seu equilíbrio composicional devido a produtos secretados pela célula.

A MEC libera sinais que carregam informações para o núcleo provocando expressão gênica tecido-específica. De acordo com Lin & Bissell (1993), o mecanismo de regulação de expressão gênica e diferenciação iniciaria com a adesão da célula às moléculas da MEC, as quais se ligariam a receptores específicos da membrana plasmática, desencadeando mudanças no domínio citoplasmático dos receptores. Esse domínio, uma vez ativado, tornaria a causar uma associação apropriada nas proteínas de contato focal e multiplicaria a fosforilação de outros componentes intracelulares. Estas mudanças culminariam no rearranjo do citoesqueleto, o qual conectado com o núcleo desencadearia uma interação diferencial da cromatina com a matriz nuclear ou uma ativação diferencial dos fatores de transcrição.

Em suma, o modelo da reciprocidade dinâmica sugere que informações estruturais e bioquímicas promovem a interação entre o interior da célula e a MEC e que a transferência de informação bidirecional eventualmente resulta em funções teciduais e células diferenciadas como descrito por Vidal, 1967.

A morfogênese é regulada molecularmente pelo conjunto harmônico dos constituintes da MEC e fatores de transcrição, de crescimento e de diferenciação. Tais componentes associam-se formando uma malha que envolve e confere propriedades mecanofisiológicas aos tecidos (Vidal, 1989, 1993).

A expressão final de uma informação genética pode ser regulada portanto, por componentes da MEC, e a diferenciação específica do tecido é influenciada pelo substrato ao qual a célula está aderida (Kleinman *et al.*, 1981).

A MEC é responsável pela regulação do fenótipo diferenciado das células e este processo ocorre através de sítios de ligação celulares presentes em

glicoproteínas da MEC e por meio de receptores de superfície celular específicos para a MEC (Ruoslahti & Pierschbacher, 1987). A descoberta de proteínas de ligação à MEC, na superfície celular, foi a prova inicial para o reconhecimento do intercâmbio entre MEC e citoplasma.

A adesão das células à MEC é um passo básico para a proliferação *in vitro* de alguns tipos de células e este processo, como descrito anteriormente, envolve uma série de interações complexas entre os elementos do citoesqueleto e da matriz extracelular (Singer *et al.*, 1988), via receptores específicos, denominados *moléculas de adesão celular*, presentes na membrana celular (Lee, 1992).

O processo de adesão da célula à MEC regula uma plethora de atividades celulares. Está intimamente relacionado à migração celular, principalmente se forem considerados os processos de desenvolvimento, cicatrização e metástases tumorais. Segundo Ruoslahti & Obrink (1996), existem 2 tipos especiais de adesão: a adesão célula-célula, onde ligações físicas são formadas entre células adjacentes e a adesão célula-MEC, onde ligações ocorrem entre células e proteínas de adesão da MEC. Várias famílias de moléculas de adesão, algumas com um grande número de membros, têm sido descobertas e caracterizadas.

A adesão celular aos componentes da MEC depende de receptores transmembranosos, pertencentes à família das integrinas. As integrinas são heterodímeros de associação não-covalente entre as suas subunidades α e β e atuam como receptores de transdução de sinal para o interior da célula, que reorganiza o citoesqueleto, alterando a forma celular, modificando a transcrição, tradução e a secreção de proteínas (Carter, 1990).

Os receptores de adesão celular e seus ligantes também propiciam tração e estímulo para a migração celular. Este processo depende de um delicado balanço entre a capacidade de adesão e deslocamento celular. Em geral, a maioria das moléculas de adesão é capaz de mediar a migração celular e muitas células podem usá-las potencialmente para translocação.

Existem vários mecanismos que explicam o processo de motilidade direcional *in vitro*, embora não se saiba o quanto esses mecanismos sejam operantes *in vivo*. Entretanto, quando se considera a inter-relação entre colágeno, adesão e motilidade celular, deve-se citar os mecanismos de quimiotaxia, haptotaxia e contato direcional (Postlethwaite, 1978).

As células em processo migratório podem tomar contato com outras células e uma paralisação contato-mediado pode ocorrer, culminando num processo denominado *inibição por contato*. Nos fibroblastos migrantes, o contato celular resulta em uma rápida formação de feixes de filamentos de actina submembranosos nas regiões de contato focal (Klymkowsky & Parr, 1995). Portanto, todos os tipos de receptores de adesão podem engatilhar e inibir a migração. Uma dada célula, em uma dada situação, permanece estacionária ou migrará na dependência da cooperação e do intercâmbio entre os diferentes receptores de adesão.

Há muito vem sendo reconhecido que muitos tipos celulares normais requerem adesão ao substrato para então crescerem e esta dependência de ancoragem é reduzida em células malignas transformadas (Folkman & Moscona, 1978). Trabalhos recentes indicam que células dependentes de ancoragem que crescem em suspensão apresentam interrupção na fase G1 e sofrem uma falha na indução de ciclina A, o que pode ser responsável pela parada de crescimento (Guadagno *et al.*, 1993).

A maior limitação da técnica convencional de cultura de células é o fato de que, neste sistema, as células, diferentemente da situação *in vivo*, proliferam *in vitro* como uma coleção de células individuais sobre a placa de cultura. Porém, vários estudos *in vitro* demonstraram que o substrato sobre o qual as células são cultivadas podem alterar a forma celular e a resposta proliferativa a vários fatores mitogênicos, de maneira interrelacionada (Vlodavsky *et al.*, 1980).

Vários agentes como a polilisina, plasma e fibrinogênio, fibronectina e vários tipos de colágeno são utilizados como substrato e têm induzido diferentes efeitos, dependendo do tipo celular considerado (Vlodavsky *et al.*, 1980).

Para experimentos *in vitro*, o colágeno, dentre os constituintes da MEC, tem sido o mais utilizado como substrato para adesão e crescimento de células dependentes de ancoragem.

O colágeno é uma proteína da matriz extracelular presente em todos os animais multicelulares (Exposito *et al.*, 1991), sendo a mais abundante na natureza. Apresenta propriedades físico-químicas peculiares e por isso ocupa um papel central na MEC, onde freqüentemente participa da estrutura, formando um esqueleto, ao qual se associam outros componentes da MEC (Mc Carthy *et al.*, 1996).

O colágeno é a proteína que mais responde às forças de tensão nos diferentes tecidos e, devido às propriedades reológicas de suas fibras, atua complexando-se e interagindo com outras macromoléculas (glicosaminoglicanos e proteoglicanos) que exercem grande influência na MEC, em virtude da capacidade higroscópica. (Mc Carthy *et al.*, 1996). Alguns tipos de colágeno, além de facilitarem a adesão e migração celulares, formam estruturas tipo “andaime”, as quais mantêm as células em locais determinados nos tecidos, como por exemplo, nos tecidos conjuntivos dos diferentes órgãos.

Atualmente estão descritos 19 tipos de colágeno que são caracterizados por parâmetros bioquímicos e de distribuição em tecidos (Van Der Rest & Garrone, 1990; Exposito *et al.* 1991; Mayne *et al.*, 1993).

Para estudo da função da superfamília colagênica, diferentes enfoques podem ser dados. Em termos moleculares, os estudos da expressão colagênica em reparo de cicatrização e fraturas fornecem novas visões, no que diz respeito às funções desempenhadas pelo colágeno na formação tecidual e na remodelação (Reichenberger & Olsen, 1996).

Com outro enfoque, esses diferentes tipos de colágeno podem ser utilizados, para experimentos *in vitro*, como substratos que são constituídos de complexos supramoleculares desta proteína (Ehrmann & Gey, 1965; Elsdale & Bard, 1972; Klebe, 1975; Rubin *et al.*, 1978; Schor & Court, 1979; Schor, 1980; Wada & Vidal, 1991). Portanto, a natureza do substrato é particularmente importante e deve ser considerada nos estudos em que se utiliza esta proteína como substrato.

O reconhecimento celular ao colágeno é um processo complexo que envolve múltiplos receptores na superfície celular. Neste sentido, a adesão celular ao colágeno é semelhante ao princípio de adesão celular a outros componentes da MEC como a fibronectina, laminina, trombospondina, entre outros (McCarthy *et al.*, 1996).

Sabe-se que a adesão e o crescimento de células sobre ou no substrato colagênico podem afetar o fenótipo celular, incluindo forma e polaridade (Gospodarowicz *et al.*, 1978; Madri *et al.*, 1988; Zuk *et al.*, 1989; Norris *et al.*, 1990), bem como a morfogênese e a diferenciação celular (Chambard *et al.*, 1981; Andujar *et al.*, 1992).

Alguns tipos celulares apresentam pronunciada especificidade a cada tipo de colágeno, e suas características de adesão e diferenciação ficam comprometidas pela forma na qual o colágeno está organizado molecularmente para formar o substrato (Grinnell & Minter, 1978; Murray *et al.*, 1979; Schor & Court, 1979).

O colágeno na forma de gel tridimensional foi extensivamente estudado e atualmente é bastante utilizado. A valorização deste tipo de substrato é devido ao fato de que géis 3D proporcionam um ambiente similar às condições *in vivo*, comparado às placas convencionais de cultura (Grinnell, 1994; Middelkoop *et al.*, 1995).

O colágeno ocorre naturalmente como um biopolímero que apresenta propriedades que são ditadas por sua estrutura secundária e terciária. A

possibilidade de regular a associação do colágeno em substratos 3D permite uma oportunidade única de avaliação da influência deste substrato na forma e fenótipo celular (Mc Carthy *et al.*, 1996)

Schor & Court (1979), verificaram respostas celulares diferentes ao substrato formado de colágeno nativo e desnaturado. Neste experimento, células cultivadas sobre colágeno nativo aderem-se a ele e têm um crescimento melhor, na ausência e na presença de soro fetal bovino, quando comparado ao uso de colágeno desnaturado como substrato, sendo que a presença do soro fetal bovino é fundamental para adesão ao substrato.

Fibroblastos cultivados sobre colágeno tipo I rapidamente migram para o interior do gel e se tornam alongados, enquanto células epiteliais permanecem no topo e se tornam polarizadas morfo-funcionalmente, demonstrando que a MEC causa profundos efeitos na morfologia celular (Schor, 1980).

O colágeno mostrou-se modulador da expressão celular fenotípica de vários tipos celulares já diferenciados. Por exemplo, as células mamárias epiteliais de ductos reorganizam-se em tubos semelhantes a ductos (Montesano *et al.*, 1983). Células endoteliais reconstroem vasos sangüíneos na presença de colágeno como substrato (Ormerod & Rudland, 1988), condrócitos desagregados proliferam em géis de colágeno 3D, formando condróide (Mc Clure *et al.*, 1988), e células musculares esqueléticas de aves formam miotubos altamente contrácteis em um sistema de cultura com colágeno como substrato (Vandenberg *et al.*, 1988).

Culturas celulares musculares esqueléticas de longa duração sobre o substrato de matrigel apresentam viabilidade aumentada devido à maior adesão e também iniciação espontânea de atividade celular (O'Malley *et al.*, 1996).

Maria & Wada (1997), descreveram a formação de uma estrutura semelhante a um tecido conjuntivo frouxo *in vitro* resultante dos processos de adesão, proliferação e migração de células fibroásticas Vero em substrato colagênico tipo I hidratado. Foi observado também o processo de contração nesta

cultura de longa duração, o qual mimetizou uma estrutura semelhante à derme. Estes fatos são relevantes devido à possibilidade de utilização de substratos colagênicos contraídos por fibroblastos em transplantes e destes terem sido reintegrados com sucesso com equivalentes dérmicos (Xu *et al.*, 1998).

Materiais à base de colágeno são promissores neste sentido. Um importante critério a ser respeitado é o da biocompatibilidade do material, uma vez que deveria evitar a produção de sérias reações citotóxicas ou imunológicas em implantes. Materiais colagênicos produzem resultados satisfatórios em implantes e substitutos dérmicos também são capazes de guiar as células para a área de reparo e funcionam como substrato para fibroblastos, os quais podem sintetizar outros elementos de MEC (Middelkoop *et al.*, 1995).

Outra importante característica dos géis de colágeno é que eles podem ser reorganizados por fibroblastos. Este processo de remodelação do substrato resulta na contração do gel e tem sido comparado ao processo *in vivo* de contração na cicatrização (Elsdale & Bard, 1972). Embora o mecanismo de contração não tenha sido completamente elucidado ainda, sabe-se que a eficiência do processo depende do tipo celular e da integridade do citoesqueleto, mas não da degradação colagênica. O soro suplementado ao meio de cultura é também um fator otimizador do processo e a contração é proporcional à concentração de soro (Andujar *et al.*, 1992; Maria, 1994). O fenômeno de contração reflete processos fisiologicamente relevantes, tais como cicatrização e erupção dentária (Bellows *et al.*, 1981).

O estudo das interações células-MEC, mais especificamente, fibroblastos e colágeno tipo I é um modelo de pesquisa que faz alusão aos processos de desenvolvimento do tecido conjuntivo, cicatrização, fibrose e metástases tumorais. Revela também a importância das pesquisas sobre a influência que a geometria, a supraorganização e a ordem molecular das fibras possam ter sobre as respostas celulares. Dentre os vários comportamentos celulares resultantes dessas interações,

a morte celular programada, como influenciada pela presença de colágeno, merece ainda ser melhor investigada, razão pela qual é objeto de estudo do presente trabalho.

1.2. Morte Celular

Apoptose é um tipo de morte celular que ocorre através de um processo fisiológico em oposição à morte celular por necrose, que é também chamada de morte celular accidental, a qual é associada à injúria celular ou tecidual. Apoptose e morte celular programada se referem a fenômenos distintos e não sinônimos, embora muitos autores o façam indiscriminadamente (Martin, 1993).

A morte celular programada refere-se a um evento funcional que descreve a morte da célula tal como ocorre em processos de embriogênese, metamorfose, involução de tecidos e órgãos hormônio-dependente. Por outro lado, segundo Kerr e colaboradores (1972), apoptose é um termo que descreve um tipo de morte celular que apresenta características morfológicas estereotipadas.

Em algumas instâncias, apoptose representa realmente morte celular programada, porém a recíproca não se aplica, isto é, que morte celular programada seja apoptose. Por exemplo, a morte celular que apresenta características morfológicas e bioquímicas de apoptose pode ser induzida por uma ampla variedade de drogas citotóxicas e também por estímulos físicos. Esses exemplos são claramente não programados, pois o tipo de morte desencadeado representa uma resposta celular às mudanças ambientais (Martin *et al.*, 1994).

Diferentemente, a necrose é causada por uma falha geral da regulação homeostática após injúria. A necrose e a apoptose podem ser distinguidas segundo critérios morfológicos e bioquímicos (Kerr *et al.*, 1972; Kerr *et al.*, 1994; Kerr *et al.*, 1995), os quais serão descritos mais adiante.

Ocorrência

Além de ocorrer promovendo a homeostasia, a morte celular por apoptose têm sido mostrada como resultante de diferentes estímulos, os quais numa lista parcial, incluem exposição a agentes físicos (radiação ionizante, hipertermia) e tóxicos (azidas, peróxido de hidrogênio) e infecções virais (Arends *et al.*, 1990). Vários desses fatores têm em comum a propriedade de alterar o ciclo celular (Ucker, 1991).

A morte celular programada ocorre em circunstâncias como da modelação embrionária e do tecido fetal, desde a fase de blastocisto e da formação do sistema nervoso central; na metamorfose de insetos e também na regressão da cauda dos girinos e na renovação celular nos diferentes tecidos; na ontogenia do sistema imune, onde ocorre morte de clones de células T autoreativas durante a maturação do timo e em células B, em centros de ausência de seleção positiva antígeno-dirigida; em células reconhecidas pelos linfócitos T citotóxicos e em células *natural killer* (NK). A morte celular hormônio-dependente é vista em mama, em processo de lactação; na próstata, após castração; no útero, após o parto; e nos ovários, após ovulação. Na cinética de crescimento tumoral também se observa a apoptose influenciando a taxa de expansão do tumor por um balanço entre perda e ganho de células (Wyllie *et al.*, 1980).

Parte do programa apoptótico tem sido conservado evolutivamente entre diversos organismos, tais como vermes, insetos, vertebrados e plantas, não existindo detalhes que diferenciem o processo nestes diferentes organismos (Havel & Durzan, 1996).

A ocorrência da necrose está invariavelmente associada à mudanças bruscas e severas das condições fisiológicas, como por exemplo, após ocorrer ausência de oxigenação (hipóxia), falta de suprimento sanguíneo (isquemia) e grandes mudanças de temperatura (hipo e hipertermia) (Contran *et al.*, 1994).

Morfologia e bioquímica

Kerr *et al.* (1972), em trabalho pioneiro definiram e distinguiram apoptose de necrose com base em alterações estruturais celulares.

Apoptose é uma forma estereotipada de morte celular ativa, que é caracterizada morfológicamente pela contração da célula, dramática reorganização nuclear e pela fragmentação celular (Wyllie *et al.*, 1980).

Os eventos nucleares da apoptose se iniciam com o colapso da cromatina que se deposita na periferia nuclear. A cromatina pode apresentar-se progressivamente mais condensada, eventualmente adotando várias características morfológicas. Em alguns casos, o núcleo condensa-se em corpúsculos densos, enquanto, em outros, formam-se grupos cromatínicos que se depositam no envelope nuclear. Ainda em outros casos, a distribuição da cromatina adota uma forma falciforme e condensa-se em apenas uma região do núcleo. Qualquer que seja o padrão adotado, o nível final de condensação é dramático, aparentemente excedendo qualquer padrão observado na mitose, ou em qualquer outra fase do ciclo celular (Kerr *et al.*, 1972).

As modificações morfológicas iniciais podem ser observadas à microscopia de luz e estão correlacionadas com a fragmentação cromatínica em sítios internucleossomais, como resultado de ativação de endonucleases (Wyllie *et al.*, 1980; Arends *et al.*, 1990). Os grandes fragmentos, de 300 a 50 kilobases, são primeiro produzidos por degradação endonucleolítica da supra organização cromatínica. Os pequenos fragmentos, quando submetidos à eletroforese, apresentam um típico padrão de bandas de 200 pares de base, que são correspondentes ao DNA com fragmentos internucleossomais (Brown *et al.*, 1993; Walker & Siroška, 1994).

As organelas citoplasmáticas se tornam compactas, o retículo endoplasmático liso se dilata e então suas cisternas fundem-se com a membrana plasmática, dando a aparência de formação de bolhas na superfície celular. Os filamentos do citoesqueleto se rearrajam e as partículas ribossomais se agrupam em formações semi-cristalinas, mas, por outro lado, todas as organelas permanecem intactas (Wyllie *et al.*, 1980).

Os poros nucleares redistribuem-se pela superfície dos domínios de cromatina condensada e acumulam-se entre eles (Wyllie *et al.*, 1980; Lazenbnik *et al.*, 1993). Esse movimento dos poros sugere que estes não estejam restringidos pela associação com a lâmina nuclear. De fato, a lâmina nuclear dissocia-se durante a apoptose (Lazenbnik *et al.*, 1993; Ucker *et al.*, 1992), porém o envelope nuclear permanece intacto, de modo diferente do que acontece na mitose. Na mitose, a dissociação da lâmina nuclear ocorre por fosforilação das subunidades de lâminas, enquanto na apoptose, a dissociação ocorre por proteólise (Kaufmann, 1989; Ucker *et al.*, 1992).

Núcleo e citoplasma tornam-se fragmentos de vários tamanhos, ovais ou circulares, tipicamente chamados de *corpos apoptóticos*, os quais vão se desprendendo da célula. Os corpos apoptóticos são reconhecidos por apresentarem frequentemente fragmentos cromatínicos, organelas e citoplasma envolvidos por membrana plasmática íntegra. A integridade da membrana plasmática, após o brotamento do corpo apoptótico, é assegurada por fusão. Os corpos apoptóticos expressam marcadores de superfície, que fazem o rápido reconhecimento para a fagocitose por células vizinhas e macrófagos. O resultado deste processo é o desaparecimento das células sem liberação do conteúdo citoplasmático para o espaço intercelular. Este processo evita a inflamação e a auto-imunização do tecido (Earnshaw, 1995).

Os corpos apoptóticos são visíveis à microscopia de luz e eletrônica e se mostram densos, podendo refletir o acúmulo de proteínas desnaturadas. A

desnaturação protéica tem sido relacionado ao aumento de Ca^{+2} intracelular, uma vez que, em alguns casos de apoptose, evidenciou-se o aumento de Ca^{+2} (Kerr *et al.*, 1994).

Algumas células, tais como timócitos, apresentam somente um corpo apoptótico com restrito brotamento celular e nuclear. Em tecidos, corpos apoptóticos são rapidamente reconhecidos por células vizinhas, fagocitados e digeridos em seus lisossomos. Células epiteliais, bem como células do sistema mononuclear fagocitário, participam deste processo de remoção residual. Em células em cultura, entretanto, corpos apoptóticos não são fagocitados e assim entram rapidamente em processo de degeneração, que se assemelha a necrose (Kerr *et al.*, 1995).

A morte celular por necrose apresenta características morfológicas e bioquímicas bastante diversas das apresentadas para apoptose. Na necrose, o volume citoplasmático e nuclear aumentam, ocorre perda da integridade de membranas tanto plasmática, quanto de outras organelas, culminando com a lise celular. A cromatina é fragmentada aleatoriamente, e não em regiões internucleossomais como no processo apoptótico, apresentando um padrão floculento, quando observado à microscopia de luz. O DNA submetido à eletroforese apresenta um padrão característico de arraste, isto é, não formando bandas eletroforéticas que representam o DNA fragmentado aleatoriamente. Devido à liberação de enzimas lisossomais para o meio extracelular, uma resposta inflamatória significativa é observada e a fagocitose é feita em sua totalidade por macrófagos (Kerr *et al.*, 1995). Necrose sempre ocorre em grupos celulares, enquanto apoptose geralmente ocorre em células isoladas.

O ciclo celular envolve uma complexa série de passos que são coordenados precisamente e que permitem que a mitose seja corretamente completada. A presença dos pontos de checagem no ciclo asseguram que cada fase seja finalizada antes que a próxima fase se inicie (Murray, 1994). Vários autores sugeriram que

uma interrupção no ciclo celular possa causar a morte em células normais e transformadas (Ucker, 1991) pela expressão inapropriada de componentes do ciclo celular, que formam genericamente um conjunto de defeitos letais.

Gerschenson & Rotello (1992) propuseram que a apoptose seja um estágio final de diferenciação que requer expressão de receptores para estímulos que induzem apoptose. Neste modelo, estímulos suaves desencadeariam o processo apoptótico por ativação desses receptores.

A apoptose ocorreria em 2 estágios fisiológicos: o primeiro seguindo um sinal, o qual pode ser intrínseco ou extrínseco à célula e esta entraria em uma fase denominada de *condenação* (latente), que é finalizada por um mecanismo de transição autônomo da célula para a fase final, denominada de *execução* (ativa); o outro estado fisiológico inclui todas as características morfológicas mencionadas, porém é breve (tipicamente 15-60 minutos), mas decisivo. A fase de condenação é grandemente variável em tempo de duração. Com isto, é impossibilitado o isolamento de populações sincronizadas de células em apoptose, o que também dificulta a caracterização bioquímica de células apoptóticas em fase de transição (Earnshaw, 1995).

Atualmente, a grande contribuição para o entendimento do processo apoptótico vem dos estudos genéticos, e a análise molecular do programa de morte celular demonstra uma série de genes associados.

Existe uma diversidade de fatores internos e externos que podem iniciar a apoptose, e alguns passos irreversíveis podem ser acionados nos pontos de checagem do ciclo celular. Vários genes associados ao ciclo celular também apresentam relação com a apoptose, como o gene p53, o qual é supressor de tumor, e o c-myc, que sugere a íntima relação entre ciclo celular e apoptose (Evan *et al.*, 1992).

No processo apoptótico, ocorre a clivagem de proteínas vitais intracelulares. As proteases responsáveis por este processo são denominadas caspases (*cytosolic aspartate-specific cysteine proteases*) (Rudel & Bokock, 1997).

As caspases são inativas até que um sinal de ativação seja dado, iniciando uma cascata de eventos onde outras caspases são proteolicamente ativadas. Este sinal, como dito anteriormente, pode ser de natureza física, química, hormonal ou ser dado por agentes patogênicos (Majno & Joris, 1995). O sinal de indução para ativação de caspases pode ser regulado por uma série de citocinas (TNF- α ; FAS/APO-1 ligante; TRAIL/APO-2 ligante) (Patel *et al.*, 1996).

Os sinais de supressão do processo apoptótico parecem regular a função mitocondrial de canais iônicos ou de água (Petit *et al.*, 1996). Com a perda do sinal supressor, quando citocinas antiapoptóticas não estão disponíveis na célula, ocorre a falha da manutenção de canais homeostáticos controladores do potencial iônico através da membrana mitocondrial interna. BCL_x e BCL₂ são proteínas que formam canais responsáveis pela manutenção da fisiologia mitocondrial e que, embora sejam características de mitocôndrias, podem também estar presentes no envoltório nuclear e retículo endoplasmático. A regulação da apoptose está centrada na atividade dessas proteínas, que são codificadas pelo gene bcl-2.

A inibição da atividade de BCL₂ leva a alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial, resultando em liberação do citocromo *c* no citosol. No citosol, o citocromo *c* é ligado por uma proteína, Apaf-1, (acrônimo para fator de ativação de proteases apoptótica), a qual se liga a uma determinada caspase (caspase 9), que ativará outra caspase, otimizando o processo (Mello *et al.*, 1998 revisão).

A inibição do funcionamento mitocondrial normal causa o aumento de volume mitocondrial, com ruptura e liberação do citocromo *c*. O aumento de volume na matriz mitocondrial, faz com que a membrana interna se expanda e se

fragmente, liberando o citocromo *c* do espaço intermembrana e depois para o citosol (Petit *et al.*, 1996).

A expansão dos estudos na área molecular mostra que a iniciação do processo apoptótico parece ser dependente de passos de ativação e inibição gênica, com efeito em cascata, que resulta no balanço intracelular entre os fatores letais e os de sobrevivência. A existência de mecanismos que inibem, bem como aqueles que ativam apoptose, sugere que possivelmente todas as células possuam uma capacidade intrínseca para apoptose. Portanto, se componentes do processo apoptótico são comuns a todas as células, o determinante crítico que condiciona se as células devem morrer ou proliferar depende de mecanismos regulatórios que determinam se genes devem ser ativos ou repressos (Lewin, 1997).

A ativação inapropriada de apoptose pode causar ou contribuir para uma variedade de doenças, incluindo a AIDS e as doenças degenerativas e/ou proliferativas, como o câncer.

1.3. Interação célula-MEC e apoptose

Como dito anteriormente, as interações célula-MEC são importantes determinantes do crescimento, diferenciação, desenvolvimento e tumorigênese. Muitos trabalhos demonstram que esta interação é responsável pelo desenvolvimento celular, principalmente em relação à regulação de fenótipos de células diferenciadas (Watt, 1986; Adams & Watt, 1993) e também apresentando um efeito aparente no aumento do ciclo de vida de fibroblastos sobre colágeno *in vitro* (Maria & Wada, 1997).

Segundo Boudreau et al (1995), está claro o papel da MEC como responsável pelo controle da expressão gênica, influenciando na morfologia, desenvolvimento e também no programa apoptótico.

Na ausência de contato apropriado com a MEC, as células entram em apoptose (Meredith *et al.*, 1993), que resulta de perda de ancoragem,

demonstrando o papel de sinalização mediado por integrina como controlador deste fenômeno (Frisch & Francis, 1994; Ruoslahti & Reed, 1994; Ruoslahti, 1997).

Quando células V79 são cultivadas em laminulas, elas apresentam um tempo de vida de cerca de 12 dias, sem que seja efetivado o subcultivo e mantendo-se as condições ótimas de cultivo. Quando cultivadas sobre colágeno, apresentam uma sobrevida de até 30 dias.

O colágeno tipo I hiperpolimerizado foi desenvolvido por Vidal e tem sido amplamente utilizados em implantes em humanos por Vidal e equipe (Vidal, 1990; Palma *et al.*, 1996; Ricetto, 1997). Este gel de colágeno hiperpolimerizado apresenta propriedades reológicas e fibras com ordem molecular que refletem a autoagregação ordenada dos tendões (Vidal, 1995b). Este substrato especial possui ainda características físicoquímicas que fornecem às células sinais para reconhecimento e adesão. Foi descrito que as fibras de colágeno apresentam uma orientação formando estruturas helicoidais denominadas de crimpes que são arranjos helicoidais observados em tendão, derme, pericário e cordão tendinoso (Vidal, 1995b). Após o processo de extração de colágeno, o qual é feito por solubilizações e precipitações em ácido e sais respectivamente, foi provado que feixes de colágeno se orientam em grupos, paralelos ao longo eixo do fio de colágeno quando extrudados, mas exibindo vários graus de inclinação com respeito ao eixo principal do fio, isto é, apresentando distribuição helicoidal como em tendão e na verdade, mimetizando a estrutura fibrilar do tendão. Este fenômeno de auto-agregação apresenta um padrão de birrefringência característico que coincide exatamente com aquele descrito para a fibra tendinosa (Vidal, 1995b).

I.4. Objetivos

1. Caracterizar o processo apoptótico através de métodos citoquímicos, imunocitoquímicos e de análise de imagem em cultura de células fibroblásticas V79 e BHK21.
2. Avaliar o efeito da matriz colagênica, obtida na forma de gel de colágeno tipo I hiperpolimerizado, em células V79 quanto à proliferação, à diferenciação e à morte celular por apoptose em culturas de longa duração.

II- Material e Métodos

II.1.- Preparo do substrato

O substrato colagênico, em forma de fios hidratados de colágeno hiperpolimerizado, foi obtido através de extração de tendões bovinos e processado de acordo com o método proposto por Vidal (1995b). Resumidamente, o colágeno tipo I, na forma de gel, é obtido através de extração de tendões bovinos, tratado através de técnica de alta purificação, com a finalidade de serem eliminadas as porções imunogênicas telopeptídicas.

O processo de solubilização do preparado de colágeno consiste na refrigeração, por período de 24 horas, dos tendões dissecados e imersos em solução aquosa com ácido acético 10%, contendo 0,01% de ácido clorídrico e 1 mg de pepsina (Sigma) por grama de tecido. O colágeno solubilizado obtido era então reconstituído por meio da adição de NaCl 10%, até a concentração final de 5%. A seguir, esta solução era dialisada prolongada em água destilada, por períodos de 5-7 dias.

O objetivo deste procedimento foi obter um gel de colágeno com características reológicas específicas, importante para o delicado processo de implante em cobaias, para testes laboratoriais (Ricetto, 1997) ou em pacientes (Palma *et al.*, 1996).

Para avaliação *in vitro* deste substrato, o gel de colágeno foi reconstituído na forma de fios e foi obtido através de sua extrusão em agulha de 30 x 8 21G, o que proporciona uma definida orientação das fibrilas obtida devido à força mecânica aplicada na seringa (Vidal, 1995). Os fios foram extrudados paralelamente sobre a lamínula e então tratados com meio de cultura acrescido de soro fetal bovino, até que o indicador de pH do meio indicasse estabilidade em pH neutro.

A microscopia de polarização revela que o gel de colágeno tipo I hiperpolimerizado utilizado apresenta uma organização fibrilar com padrão de

organização helicoidal, muito semelhante aquele apresentado nos tendões, o qual foi denominado de crimpe por Vidal (1995a) (Figura 1).

II.2.- Manutenção da cultura

A linhagem celular V79-clone M8 é oriunda de pulmão de hamster chinês e foi obtida junto ao Laboratório de Cultura Celular, (Prof. Dra Marcela Haun, Departamento de Bioquímica, IB-UNICAMP). A linhagem foi mantida em garrafas de cultura com meio DMEM (meio essencial mínimo modificado por Dulbecco), acrescido com 10% de soro fetal bovino e na presença de antibiótico (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina) até atingirem a confluência. A partir daí foi efetivado o subcultivo utilizando-se solução de tripsina (0,25%) e novas culturas foram lançadas a partir da original, para manutenção de estoque.

Os experimentos iniciais deste trabalho foram feitos utilizando-se a linhagem celular BHK-21, fornecida pelo Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, e foram mantidas em laboratório sob as mesmas condições descritas acima. Esta linhagem celular estabelecida de células fibroblásticas é oriunda de rim de hamsters sírios jovens.

As culturas foram mantidas em estufa de cultura em atmosfera de 5% CO₂ e a 37°C.

II.3.- Cultivo celular sobre substrato colagênico e sobre lamínulas

Alíquotas de aproximadamente 100.000 células foram subcultivadas sobre lamínulas dispostas em placas de Petri de 90 mm e coletadas nos tempos de 3, 6 e 12 dias de cultivo.

O mesmo número de células foi subcultivado sobre o substrato colagênico, na forma de fios arranjados paralelamente e previamente preparados e estabilizados com meio de cultivo, sobre as lamínulas dispostas nas placas de Petri de 90 mm. O material foi também coletado em 3, 6 e 12 dias de cultivo.

Para análise citoquímica do material em longo cultivo, amostras foram coletadas até 30 dias de cultivo.

Para o experimento de curva de crescimento e viabilidade celular, placas *Corning* estéreis de 35x10 mm (modelo 25000) tiveram toda sua superfície coberta de colágeno e uma alíquota de 58.000 células/placa foi cultivada.

Ambos experimentos foram feitos em triplicata e mantidos com trocas diárias de meio de cultura.

II.4.- Processamento do material para técnicas citoquímicas e fixação

As lamínulas foram coletadas e fixadas com etanol-ácido acético (3:1 v/v) por 1-5 minutos, transferidos para álcool 70% e secado ao ar.

Foi utilizada a fixação com formalina tamponada por 30 minutos, seguida por lavagem em água destilada, para o material que foi submetido ao “kit-Apoptag” (Catalog. #: s7100-Kit, edition 1; setembro de 1995) e para o método de TUNEL.

II.5. - Colorações citoquímicas

II.5.1. Reação de Feulgen (Mello, 1997).

O material foi submetido a hidrólise em HCl 4N à temperatura de 25°C por 90 min. Após esse processo, as lamínulas foram passadas rapidamente em HCl 0,1N a frio para interromper a hidrólise ácida e, então, colocadas em câmara úmida e protegidas da luz. O reativo de Schiff (Merck) foi então gotejado sobre as lamínulas e aí permanecendo por 40 min. A seguir as lamínulas foram lavadas em 3 banhos de água sulfurosa (HCl 1N, metabissulfito de sódio 10% e água destilada, 1:1:18 v/v/v), 5 min cada. Em seguida, foram lavadas rapidamente em água destilada, secadas à temperatura ambiente, diafanizadas em xilol por 15 min, e montadas em bálsamo do Canadá ($n_D=1.54$). Esta reação permite coloração específica de DNA.

II.5.2. Coloração com azul de toluidina pH 4,0 e método variante de CEC para identificação de núcleos apoptóticos (AT-CEC) (Mello & Vidal, 1980, Vidal *et al.*, 1996)

As laminulas foram coradas em solução de azul de toluidina 0,025% em tampão Mc Ilvaine pH 4,0 durante 15 min, lavadas rapidamente em água destilada, secadas ao ar, diafanizadas em xilol durante 15 min, e montadas em bálsamo do Canadá ($n_D=1,54$).

Este tipo de coloração é utilizado para detecção de radicais sulfatos, fostatos e carboxilados presentes no material.

A detecção de células apoptóticas foi feita utilizando-se uma técnica variante de CEC (concentração crítica de eletrólitos), anteriormente descrita para diferenciação de RNA e DNA (MELLO *et al.*, 1993). A cromatina, em diferentes estados de condensação e distribuição, em núcleos apoptóticos, foi observada corar-se em verde intenso por ter o DNA atingido seu valor de CEC, enquanto a maior parte dos corpos apoptóticos corava-se em violeta devido à presença de RNA (VIDAL *et al.*, 1996). Desta forma, a identificação do fenótipo celular apoptótico é facilitada.

II.6.- Métodos de imunocitoquímica-molecular

II.6.1.- Apoptag *in situ* apoptosis detection kit, de fabricação OncorTM.

Princípio do Método

A incorporação dos nucleotídeos formam um heteropolímero aleatório de digoxigenina-11-dUTP e dATP, numa razão otimizada para a ligação do anticorpo anti-digoxigenina. O fragmento do anticorpo antidigoxigenina carrega uma enzima conjugada (peroxidase) para o sítio de reação. A peroxidase gera cataliticamente um intenso sinal nos substratos cromogênicos que são revelados pela diaminobenzidina.

O sistema imunocitoquímico-molecular é sensível e específico para altas concentrações de regiões terminais 3'-OH, que são localizadas em corpos apoptóticos.

II.6.2. TUNEL (*TdT-mediated nick end-labeling technique*), segundo Gravieli *et al.* (1992); Rehen *et al.* (1996).

Trata-se de um método para identificação de células individuais que estejam no processo de apoptose.

Fragmentos 3'OH terminais de DNA são expostos a tratamento proteolítico, durante 15 minutos, em tampão fosfato 0,1 M contendo proteinase K (20 mg/ml), e lavados em seguida com tampão fosfato. Para inativação das peroxidases endógenas, o material foi incubado, durante 15 minutos, em peróxido de hidrogênio 3% em PBS e lavado em seguida com PBS. O material é pré-incubado em tampão TdT (deoxinucleotidil terminal transferase), em temperatura ambiente, por 30 minutos. O material é incubado em solução de TdT, dATP e biotina-14-dATP (0,5 U/ml; 0,2 nmol/ml e 0,013 nmol/ μ l, respectivamente). A enzima TdT é responsável pela incorporação do nucleotídeo dATP-biotinilado na região de fragmentação 3'OH terminal, o qual será detectado por estreptoavidina-HRP (horseradish peroxidase). Após a lavagem com PBS, o material pode ser incubado com peroxidase ABC (Vector) e revelados com DAB (5mg/ml) e então contra-corado em tampão acetato de sódio 0,1M contendo verde de metila (0.5%). Alternativamente, o material pode ser incubado com uma solução de 1:100 estreptoavidina-Texas Red (Amershan), por 20 minutos à 37°C e, então lavado em PBS e montado com glicerina para análise em microscopia de fluorescência.

Observação- De acordo com a repetitividade dos resultados, elegemos o método de TUNEL para a detecção de células apoptóticas.

II.8. - Análise de Imagem (Vidal, 1997).

A análise de imagem tem por objetivo detectar, diagnosticar e descrever características texturais e geométricas das imagens obtidas através de técnicas de microscopias. Neste estudo, foram investigadas imagens obtidas com o método citoquímico de reação de Feulgen para obtenção de dados do material nuclear.

A análise de imagem compreende várias etapas. A captura da imagem, feita por uma câmara CCD, que produz sinais analógicos de voltagem que são proporcionais e correspondentes aos níveis de brilho e de cinza, em diferentes partes do núcleo celular. Esses sinais são convertidos em informações digitais, portanto numéricas, por um processador denominado “frame grabber”. Os valores numéricos correspondentes variam entre 0 (preto) e 255 (branco).

A conversão de píxeis a μm foi feita usando-se uma lâmina micrométrica como padrão. A conversão de níveis de cinza à absorbância ou transmitância foi possível através de cálculos, usando os programas *Origin* e *Minitab* para os estudos estatísticos.

Os níveis de cinza foram convertidos a absorbâncias médias, isto é, em densidade óptica (OD), e os valores de nível de cinza total foram convertidos a absorbância óptica integrada (IOD, valores Feulgen-DNA). Dados sobre área nuclear e fator forma também foram escolhidos para análise entre os vários descritores disponíveis do software.

O equipamento utilizado foi o Global Lab Image, Data Translation, Inc. System acoplado a um fotomicroscópio Zeiss, usando-se uma objetiva Pol-Neofluar 25/0.60, optovar 1,25, condensador 1,4 e $\lambda = 546 \text{ nm}$ e, uma lâmpada de 12v e 60w conectada ao estabilizador.

II.8.- Curva de crescimento

Para análise quantitativa do crescimento foram utilizados dois métodos. Para ambos os experimentos, as células cultivadas sobre lamínulas foram descoladas

com tripsina. As células cultivadas sobre colágeno sofreram ação enzimática de uma mistura de collagenase 1mg/ml e tripsina, em meio DMEM sem soro fetal bovino, e então, solubilizou-se o gel de colágeno por 2h com agitação lenta a 37°C. Posteriormente, o material foi centrifugado à 500g por 10 min e as células foram ressuspensas em meio de cultura para contagem.

II.8.1. Método de exclusão com corante Azul de tripan

Para o desenvolvimento do método de Azul de tripan, que permite a contagem celular através da exclusão das células mortas coradas, um volume igual deste corante em solução (0,1% m/v) foi adicionado a uma alíquota de células e homogeneizado com micropipeta. As células foram colocadas em hemocítmetro e células não coradas foram contadas. Contaram-se 4 quadrantes e utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de células contadas}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times 2 \times 10000 = \text{n}^\circ \text{ de células/ml}$$

onde: 2= fator de diluição, e 10000= fator de correção da câmara de Neubauer.

II.8.2. Método de coloração com Vermelho Neutro

Este método foi usado para estimativa do número de células viáveis através da incorporação lisossomal do corante em células vivas.

O meio de cultura foi removido e substituído por outro contendo 50 µg/ml de corante vermelho neutro em meio de cultura, pré-incubado durante 12h à 37°C e filtrado, em membrana Millipore (0,22 µm), antes do uso. Após 4 horas de incubação as células foram lavadas com PBS-Ca²⁺ à 37°C para retirada do excesso de corante não incorporado pelos lisossomos. O material foi lavado em 1 ml de fixador (1% de formaldeído v/v e 1% Ca Cl₂ m/v). A cada placa foi adicionado 1 ml da solução aquosa contendo ácido acético glacial (1%) e etanol (50%) para fixar as células e

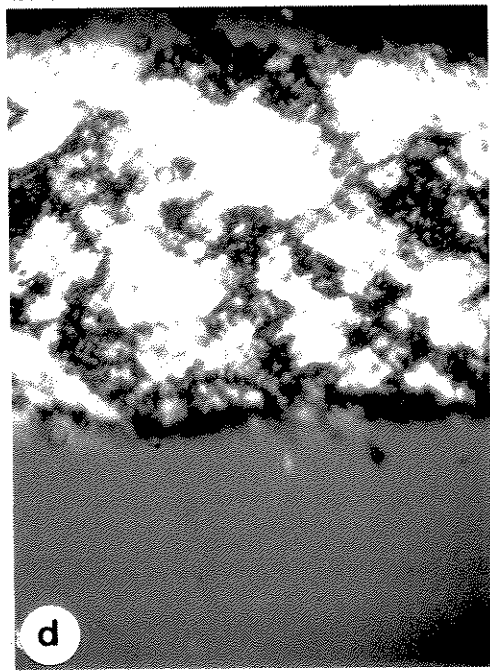
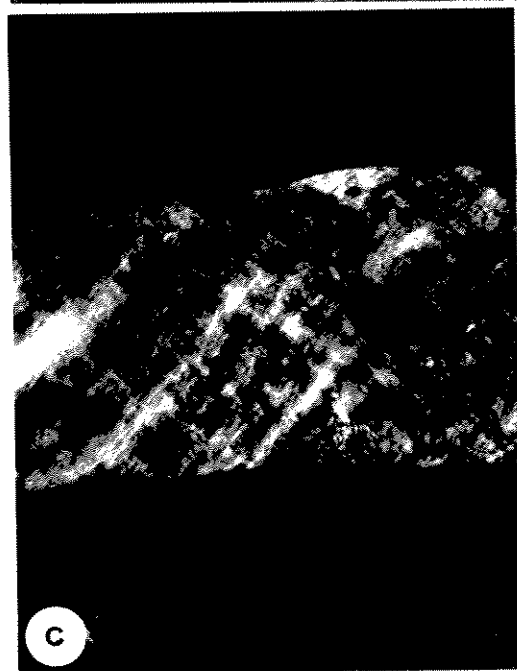
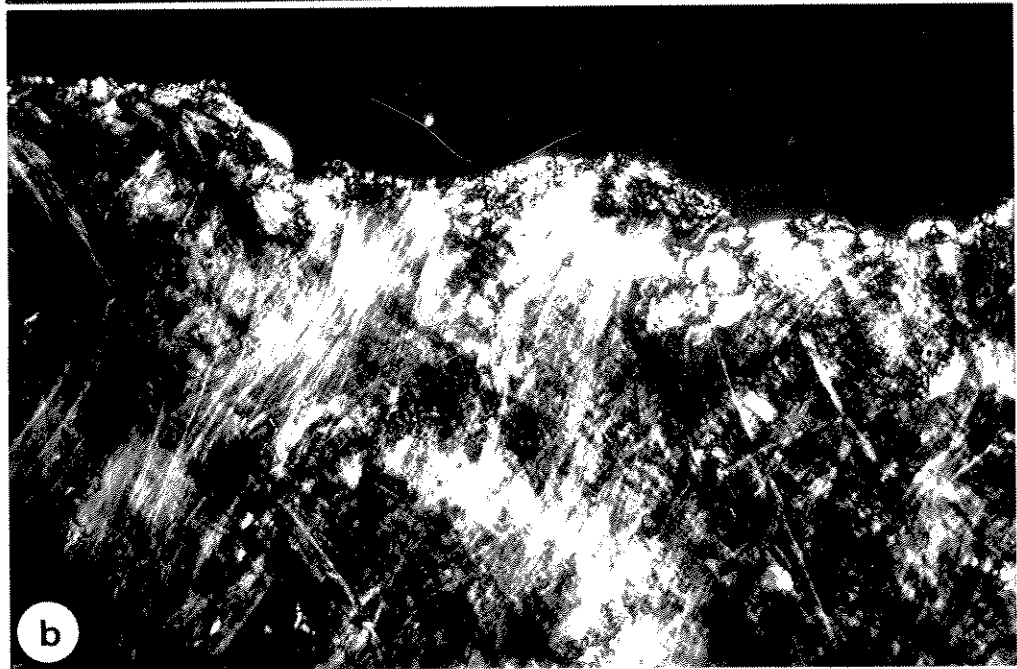
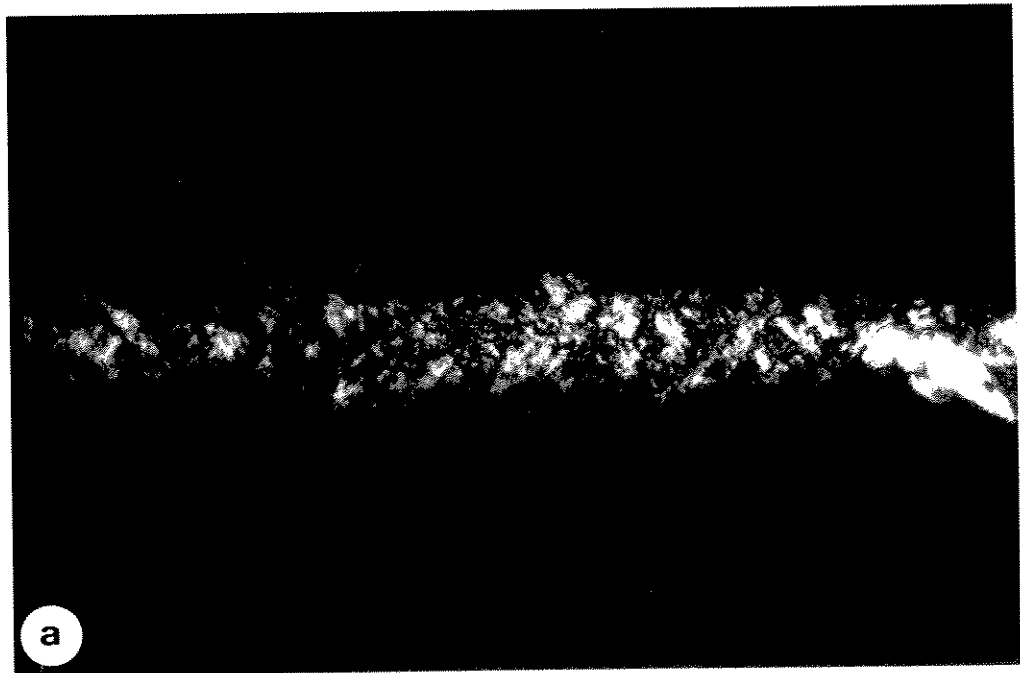
extrair o vermelho neutro incorporado nos lisossomos. As placas foram agitadas por 20 min e as absorbâncias das soluções foram lidas em 540 nm (Forsby *et al.*, 1991).

II.8.3. Tratamento estatístico

Para comparação dos dados morfométricos obtidos, primeiramente foi feita uma análise exploratória dos dados com o objetivo de verificar o tipo de distribuição de dados, como por exemplo: normalidade, homogeneidade ou presença de dados discrepantes.

Os valores obtidos através de análise de imagem de fenótipos nucleares foram submetidos a testes estatísticos de análise de variância (ANOVA) ou testes não paramétricos de Kruskal-Wallis, adotando-se o valor de $p < 0.001$ como nível de significância em ambos os casos. Os programas estatísticos utilizados foram *Minitab* e *Statistica*.

Figura 1. Fio de colágeno tipo I hiperpolimerizado com 5 dias de diálise e após extrusão em agulha, observado à microscopia de polarização. A birrefringência das fibrilas de colágeno aparecem organizadas em feixes com padrão de orientação preferencial. (a) O longo eixo do fio está orientado paralelo ao azimute do analisador e polarizador. A birrefringência deve-se a orientação fibrilar predominantemente paralela ao principal eixo do fio. 64x. (b) Notar a textura fibrilar birrefringente do gel em maior aumento. 420x. (c) O longo eixo do fio é orientado paralelamente ao azimute. As fibras que estão paralelas ou perpendiculares apresentam a birrefringência extinta. Fibras que estão a 45° são birrefringentes. 100x (d) Em verde, observamos cores de interferência que refletem a orientação tridimensional das fibras. 160x. (Esta figura apresenta informações publicadas por Vidal, 1995b).



III-Resultados

III.1. Análise citoquímica e de conteúdo de DNA de células BHK 21 em apoptose

A cultura de células fibroblásticas BHK 21 mostrou células apoptóticas logo após a confluência celular ter sido atingida aos 5 dias de cultivo. Foram observados 3 fenótipos celulares diferenciados, os quais foram caracterizados de acordo com o grau de condensação cromatínica apresentado.

Núcleos normais, suspeitos de apoptose e em apoptose foram caracterizados morfológicamente através dos métodos citoquímicos de reação de Feulgen, AT-CEC e Concanavalina-A.

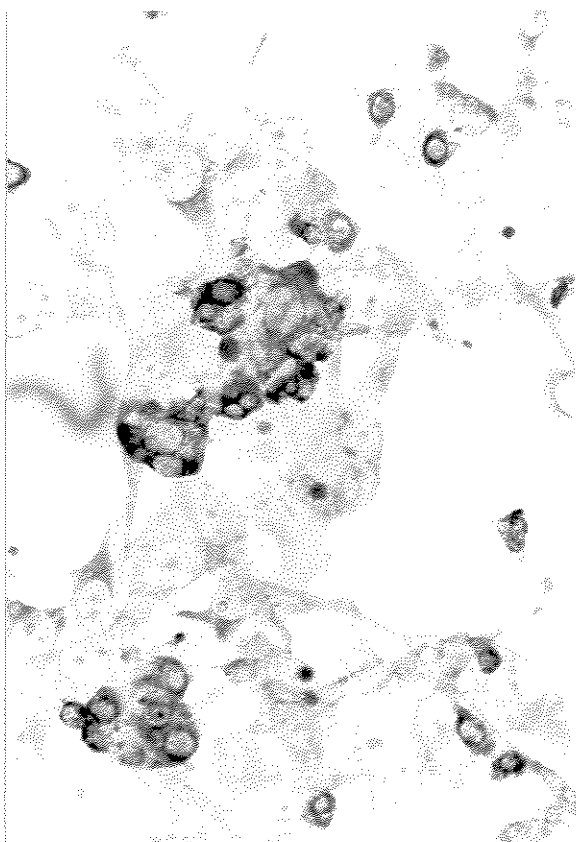
Aspectos morfológicos clássicos de apoptose foram encontrados e destacados por meio da reação de Feulgen, quais sejam: núcleos com grande e homogênea condensação cromatínica, ou cromatina grandemente compactada e fragmentada disposta às margens do envoltório nuclear ou ainda núcleos com cromatina compactada e de aspecto picnótico (Fig. 2 a-e).

A positividade à Concanavalina-A foi detectada na superfície celular e na cromatina condensada das células BHK 21 (Fig. 2 f). A ligação da Con-A na estrutura nuclear revela a presença de glicoproteínas ricas em resíduos de manose e glicose, as quais provavelmente ocupam lugar na matriz nuclear.

A reação de CEC-AT revelou o DNA condensado corado em verde e circundado por RNA metacromático, o qual aparece em preto na figura indicada (Fig. 3 a). A cromatina nos núcleos apoptóticos mostrou-se birrefringente quando submetida à microscopia de polarização (Fig. 3 b).

Os dados de análise de imagem demonstram deslocamento dos dados de IOD para menores valores nos núcleos apoptóticos (Fig 4B) quando comparado aos núcleos normais (Fig.4A).

Figura 2 (a-e). Células BHK 21 submetidas à reação de Feulgen. Diferentes fenótipos nucleares podem ser observados. Vários aspectos característicos de apoptose podem ser vistos (setas). Prófases e metáfases podem ser evidenciadas (estrelas). Aumento 480x. **(f).** Núcleos apoptóticos demonstrando forte ligação de Con-A à cromatina condensada. 170x.



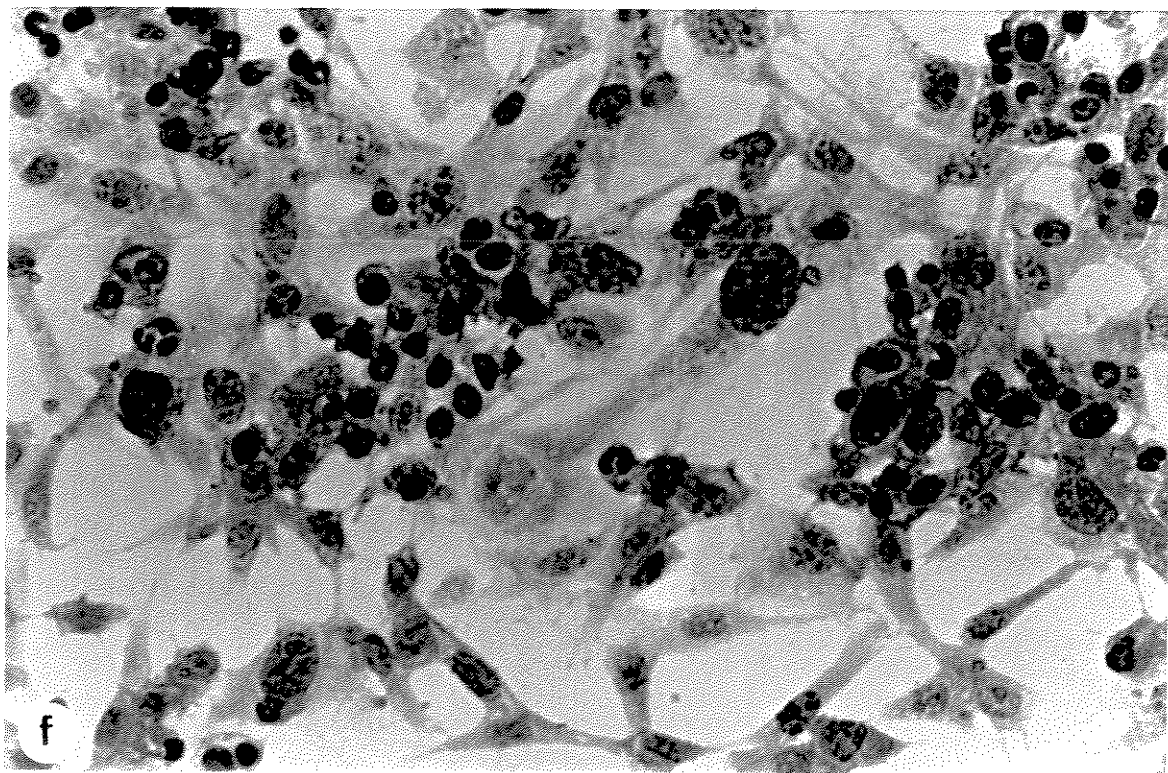
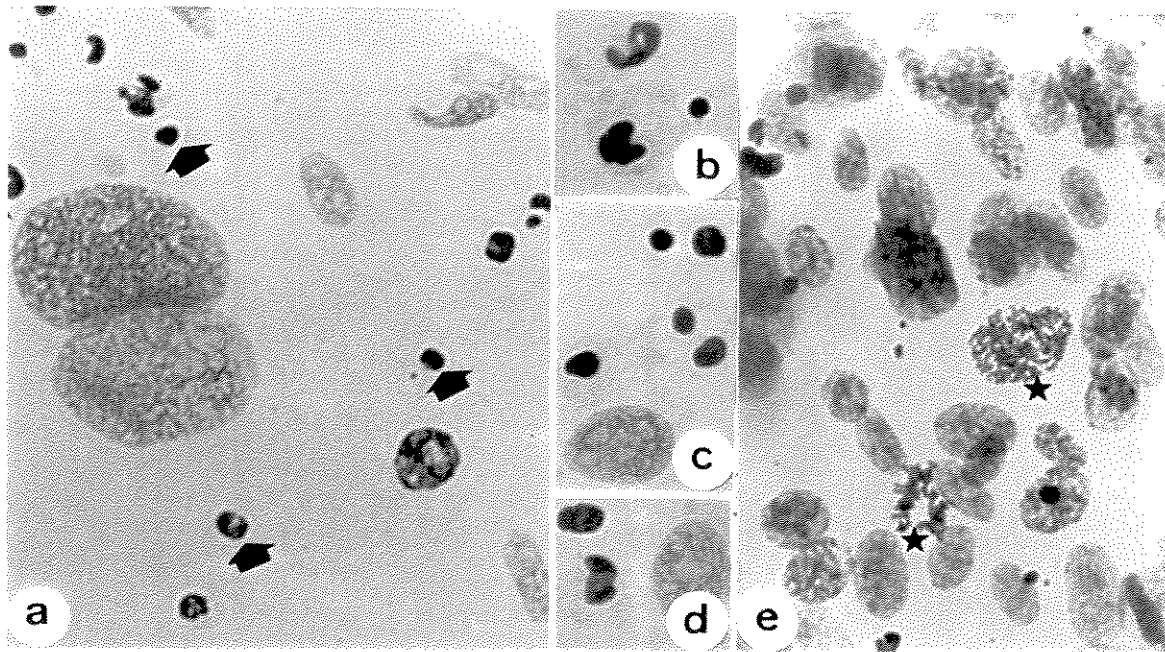


Figura 3. (a e b). a. Células BHK 21 submetidas ao método de CEC. RNA corado metacromaticamente, aparece aqui em preto. A cromatina condensada apresenta coloração esverdeada devido a pouca ligação ao AT. (b). Aqui apresenta-se o mesmo campo da figura (a) visto com microscopia de polarização. A birrefringência do DNA aparece aumentada graças à organização orientada do corante AT ligado aos grupos fosfatos do DNA. Destaca-se o arranjo ordenado da cromatina condensada no processo apoptótico, devido ao grau de ordem molecular, cristalinidade. 160x.

A			B		
IOD	F		IOD	F	
40.6100	(0)		40.6100	(1)	*
43.5300	(0)		43.5300	(1)	*
46.6500	(1)	*	46.6500	(1)	*
50.0000	(5)	*****	50.0000	(0)	
53.5900	(8)	*****	53.5900	(2)	**
57.4400	(17)	*****	57.4400	(0)	
61.5600	(9)	*****	61.5600	(1)	*
65.9800	(7)	*****	65.9800	(1)	*
70.7100	(3)	***	70.7100	(1)	*
75.7900	(2)	**	75.7900	(3)	***
81.2300	(0)		81.2300	(6)	*****
87.0600	(5)	*****	87.0600	(8)	*****
93.3100	(4)	****	93.3100	(2)	**
100.0000	(4)	****	100.0000	(2)	**
107.1800	(4)	****	107.1800	(6)	*****
114.8800	(8)	*****	114.8800	(2)	**
123.1200	(11)	*****	123.1200	(1)	*
131.9600	(4)	****	131.9600	(3)	***
141.4200	(3)	***	141.4200	(2)	**
151.5800	(3)	***	151.5800	(1)	*
162.4600	(0)		162.4600	(1)	*
174.1200	(1)	*	174.1200	(0)	
186.6200	(0)		186.6200	(2)	**
200.0000	(0)		200.0000	(2)	**
214.3600	(0)		214.3600	(1)	*
229.7600	(1)	*	229.7600	(1)	*
246.2400	(0)		246.2400	(0)	
263.9200	(1)	*	263.9200	(1)	*
282.8400	(0)		282.8400	(0)	
303.1600	(0)				
324.9200	(1)	*			
348.2400	(0)				
373.2400	(0)				
400.0000	(0)				
428.7200	(0)				
459.5200	(0)				
492.480	(0)				
527.8400	(1)	*			

*frequência

Figura 4. Histograma de frequência dos valores Feulgen-DNA refletidos pela densidade óptica integrada (IOD) para núcleos normais (A) e apoptóticos (B).

III.2. Fragmentação e perda de DNA em células fibroblásticas V79 estudadas por reação de Feulgen e análise de imagem

As células V79 cresceram exponencialmente e se tornaram confluentes após 3 dias de cultivo em lamínulas. O descolamento destas células confluentes iniciou-se aos 6 dias de cultivo e, nesta fase, em regiões de contato célula-célula. Após a confluência, observaram-se as células apoptóticas, que foram bem destacadas morfológicamente pela reação de Feulgen (Fig. 5 a-g). A morte celular por apoptose foi comprovada pelo método imunocitoquímico de TUNEL (Figura 5h).

Foram observados 3 fenótipos interfásicos em 3(I, II e III) e 6 (I', II' e III') dias de cultivo, os quais diferenciam-se no estado de compactação cromatínica e na distribuição intranuclear. O primeiro fenótipo (I e I') foi caracterizado por poucos e pequenos grânulos de cromatina condensada entre a cromatina finamente distribuída por todo o núcleo. Este fenótipo (controle) foi predominantemente encontrado após 3 dias de cultivo (Fig. 5 a, e). Outro fenótipo (II e II'), designado por nós de suspeito de apoptose, exibia grandes áreas cobertas com cromatina condensada e redução na área nuclear quando comparado com o núcleo tipo I (Figura 5 b, e).

O terceiro fenótipo (III e III') mostrou aspectos morfológicos de estados de compactação cromatínica típico de apoptose (Figura 5 c, d e g). Grumos de cromatina condensada apareceram distribuídos na periferia nuclear. Núcleos inteiros, picnóticos, freqüentemente condensados em corpúsculos únicos ou então associados em grupos (Figura 5 c,d,f e g), também foram observados.

Os dados de análise de imagem revelaram que os núcleos de tipo III exibiam valores Feulgen-DNA (IOD) menores, quando comparados aos núcleos tipo I e II. Os valores Feulgen-DNA, para os núcleos em 6 dias de cultivo, apresentaram-se bastante heterogêneos. Não existiu um decréscimo gradual para os

valores Feulgen-DNA, sendo que os núcleos tipo II apresentaram os menores valores (Tabela I).

Quando a densidade óptica (OD) foi comparada entre os vários núcleos em 3 e 6 dias de cultivo, um aumento gradual foi verificado para cada tipo de núcleo com o avanço da cultura. Concomitante com o aumento de OD, havia um decréscimo nas áreas nucleares (Tabela I).

Uma vez que ocorreu um aumento dos valores Feulgen-DNA nas células controle (I) em 3 dias para as células controle I', com o avanço da cultura, foi assumido ter ocorrido poliploidia nas células V79 nestas condições de cultura.

As diferenças entre os fenótipos nucleares, para os parâmetros estudados foram demonstradas estatisticamente (Tabela I) por análise não paramétrica, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis com nível significância de 0.001.

Figura 5. (a-g). Aspectos nucleares de células V79 submetidas à reação de Feulgen. a-d, h, 3 dias de cultivo; e-g, 6 dias de cultivo. Diferentes níveis de condensação cromatínica podem ser observados em núcleos tipo I (I') controle, II (II') suspeitos de apoptose e III (III') apoptóticos. (h) Método de TUNEL para identificação de núcleos apoptóticos em 6 dias de cultivo de células V79. Barra=10 μ m.

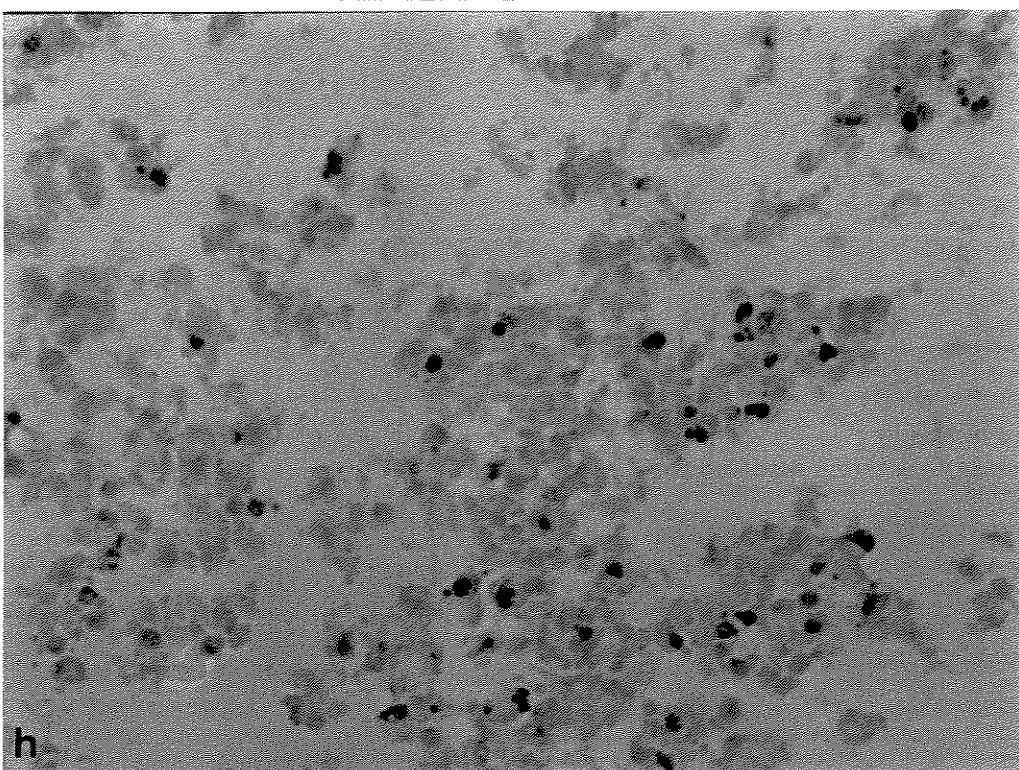
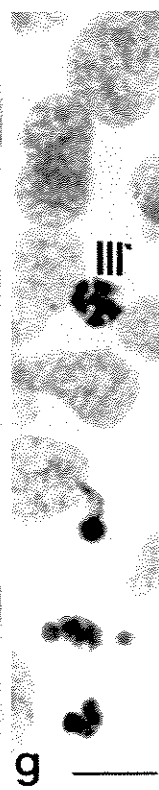
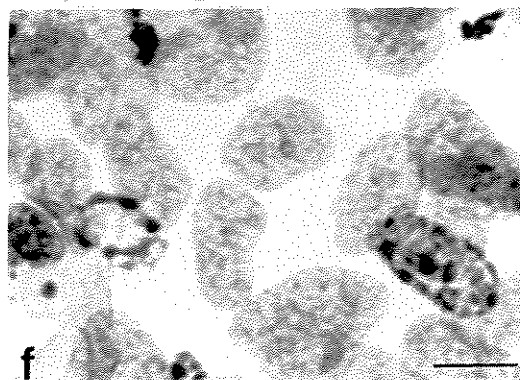
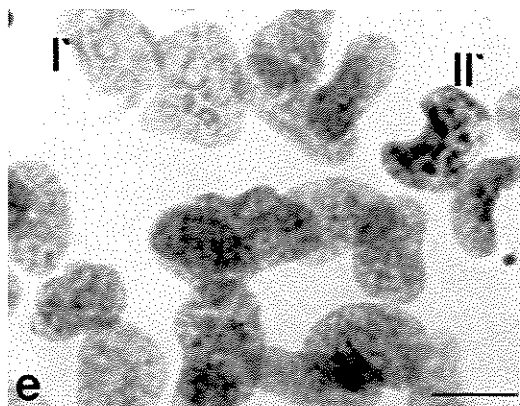
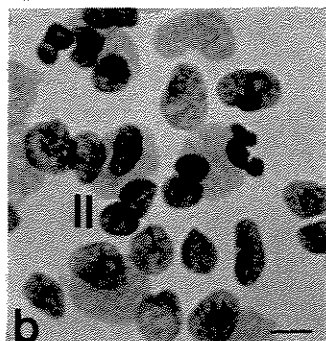
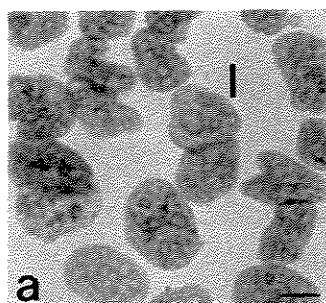


Tabela I- Dados obtidos para células V79 cultivadas por 3 (I, II e III) e 6 dias (I', II' e III') através de análise de imagem para os descritores analisados.

Fenótipo nuclear	IOD			OD			S μm^2		
	X	SD	η	X	SD	η	X	SD	η
I(n, 452)	26.20	12.78	23.30	0.20	0.05	0.20	132.78	56.25	118.98
II(n, 81)	23.01	17.65	14.60	0.24	0.06	0.22	90.38	50.69	70.60
III(n, 52)	16.58	7.57	15.37	0.30	0.09	0.29	63.92	44.42	46.95
I'(n, 452)	36.80	18.54	31.76	0.32	0.07	0.32	115.39	52.32	102.48
II'(n, 11)	21.83	5.96	22.52	0.49	0.05	0.63	45.76	13.41	51.45
III'(n, 45)	34.46	16.20	34.23	0.68	0.19	0.48	56.31	33.05	48.72

Densidade óptica (OD); densidade óptica integrada (IOD); e área nuclear (S μm^2); X, média; SD, desvio padrão; e η , mediana. De acordo com método de Kruskal-Wallis, todos os valores apresentam diferenças significativas ($p < 0.001$).

III.3. Análise da ocorrência de apoptose em células V79, quando cultivadas em gel de colágeno tipo I hiperpolimerizado

Os fibroblastos que cresceram aderidos às lamínulas apresentavam inicialmente um formato arredondado e se tornaram poligonais após 8-10h do início da cultura. Quando em substrato colagênico, a mudança morfológica das células V79, de arredondada para alongada, foi marcadamente retardada e apenas observada apenas 24h após o início da cultura.

As células V79 cultivadas sobre substrato colagênico mostraram morfologia tipo fibroblasto apenas após 24 horas do início da cultura, enquanto as células sobre lamínula se mantiveram com esta morfologia desde o início até atingirem a confluência, a qual se iniciou aos 3 dias de cultivo e se completou aos 6 dias.

As características da cinética de crescimento das células V79 em lamínulas e sobre o gel de colágeno estão apresentadas na Figura 6. As curvas de crescimento, obtidas através dos métodos de incorporação de corante azul tripan por células mortas e incorporação lisossomal do corante vermelho neutro, demonstram que as células cultivadas em lamínulas proliferam ativamente, enquanto fibroblastos cultivados sobre o substrato colagênico apresentaram um crescimento mais lento e atingiram a confluência somente em 12 dias de cultivo, enquanto algumas células sobre lamínulas continuavam a proliferar, mas a maioria já estava em processo de morte.

A morte celular por apoptose iniciou-se após 3 dias nas células sobre lamínulas e a apoptose, neste caso, mostrou-se claramente associada ao processo de inibição por contato observado quando as células estavam confluentes.

As células que cresceram sobre lamínulas e aquelas cultivadas em colágeno apresentaram diferenças marcantes de crescimento, principalmente após 6 dias (Fig. 7 a,b) e 12 dias (Fig. 7 c,d). Estas diferenças foram relativas ao descolamento celular ou então sobreposição de células ocorrida em regiões de confluência, para cultivo em lamínulas. A partir do 12º dia em diante, as células em lamínulas já

havia descolado e a cultura não progrediu, provavelmente devido ao processo de inibição por contato que células fibroblásticas dependentes de ancoragem sofrem, sendo que a confluência e a inibição por contato só ocorreram na periferia e na superfície dos fios de colágeno (Fig. 7 d, f).

A apoptose ocorreu em células junto aos fios de colágeno apenas após 12 dias de cultura, principalmente na periferia do gel. Em outras regiões do gel, as células V79 mostraram proliferação, geralmente formando grupos celulares espalhados por toda a superfície do substrato.

Aos 12 dias de cultivo, o fenótipo nuclear das células controle era caracterizado por picnose ou cromatina fragmentada localizada próximo ao envelope nuclear, apresentando uma clássica morfologia de apoptose. Esta observação foi possível após a reação de Feulgen (Fig. 7c), a qual destacou tal morfologia, comprovada como sendo apoptótica, devido à sua positividade ao método imunocitoquímico TUNEL (Fig. 7 e).

No substrato colagênico, muitas células não entraram em apoptose (Fig 7 b, d), em contraste com as células cultivadas em lamínulas. Entretanto, a apoptose pôde ser observada em regiões de ausência de colágeno, porém próximas a este na lamínula.

Aos 12 dias de cultivo, as células apresentaram um formato fusiforme nuclear e estavam destacadamente mais espalhadas, quando cultivadas em colágeno (7 b,d). Escolhemos este tempo de cultivo celular, tanto na ausência como na presença do colágeno, para realizarmos estudos de análise de imagem dos fenótipos nucleares.

Os resultados de análise de imagem estão apresentados na Tabela II. Deve ser enfatizado que mudanças fenotípicas celulares no substrato colagênico refletem os dados obtidos onde o conteúdo de DNA era maior e distribuído numa área nuclear menor e, portanto, OD e IOD são maiores, quando comparados aos valores apresentados para as células em lamínulas (Figs. 8 a, b).

Os valores de fator forma foram maiores em células V79 na ausência de colágeno e as células cultivadas em colágeno apresentaram um menor valor de fator forma (Tabela II).

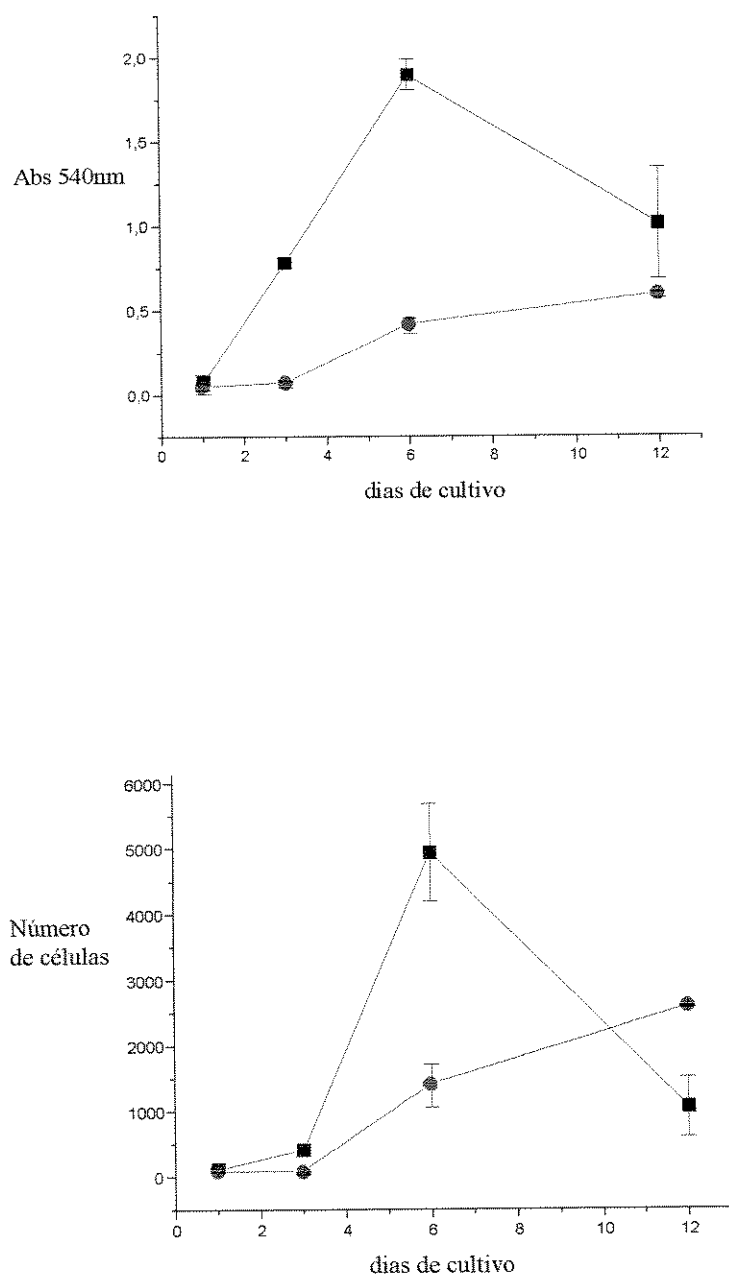


Figura 6. Curva de atividade lisossomal e curva de crescimento ($\times 10^3$) de células V79 cultivadas sobre lamínula (■) e cultivadas sobre substrato colagênico (●).

Figura 7 . Fenótipos de células V79 submetidas à reação de Feulgen e ao método de TUNEL. (a, c) Células em apoptose apresentando clássica morfologia, com grande condensação e fragmentação cromatínica. (b, d) Células sobre o substrato (seta), mostrando drástica mudança de fenótipo quando comparadas às células que cresceram na ausência de colágeno. a e b, células após 6 dias de cultivo. c e d, células após 12 dias de cultivo. e e f representam distribuição de células V79, após 12 dias de cultivo, com positividade ao método de TUNEL no controle (e) e sobre colágeno (f). Em f, distribuição de células V79 TUNEL positivas, principalmente na periferia do gel de colágeno. Aumento: a, 570x; b, c, d, 350x; e, 850x e f, 350x.

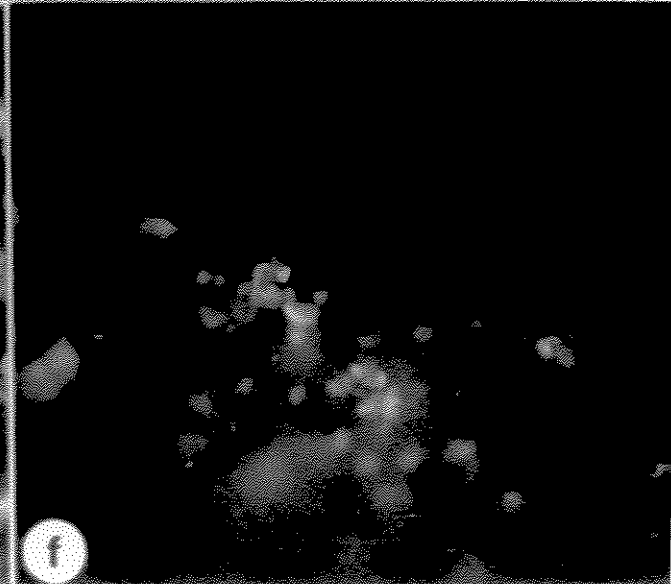
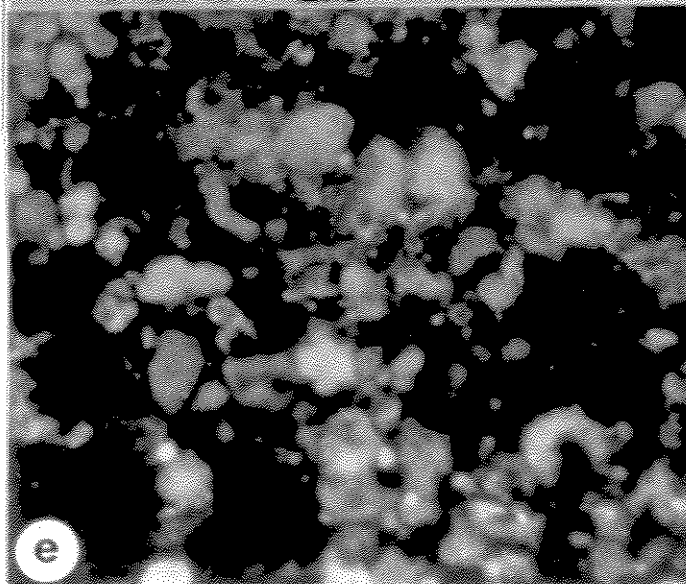
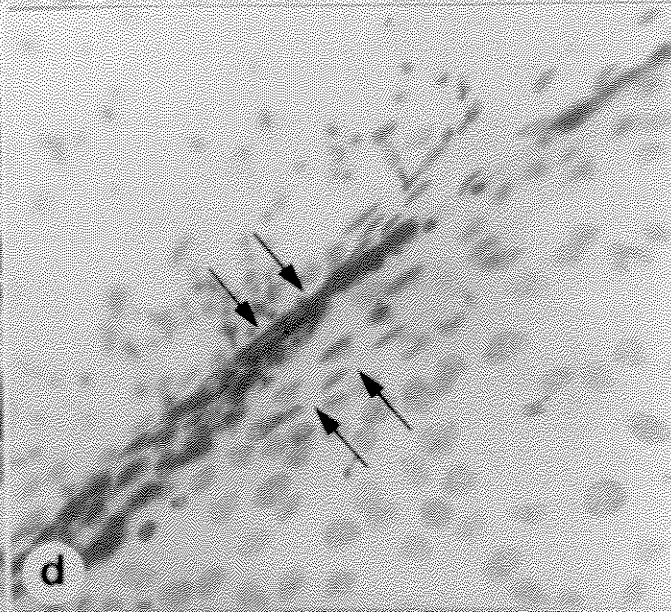
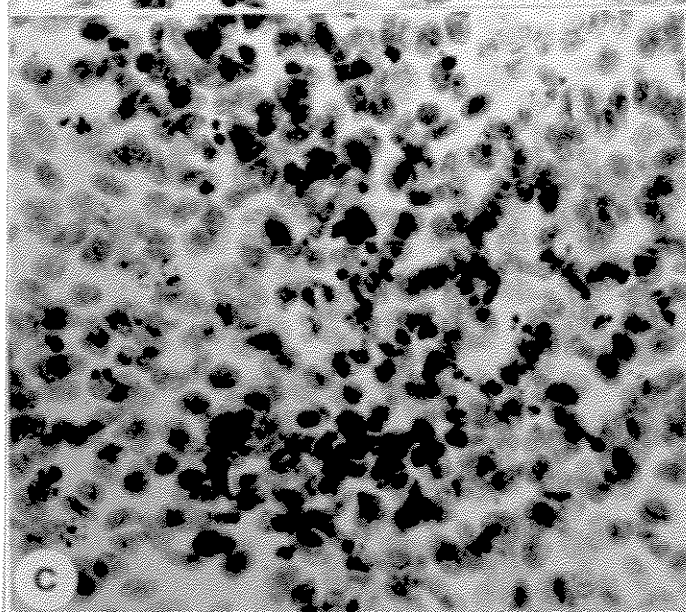
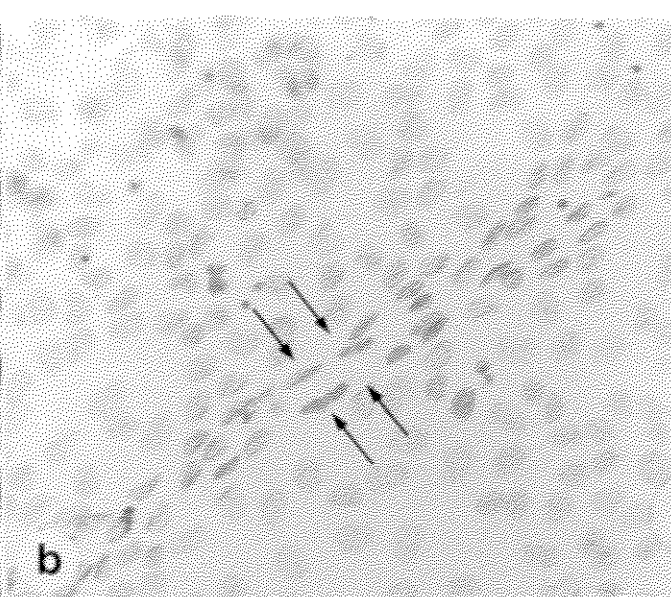
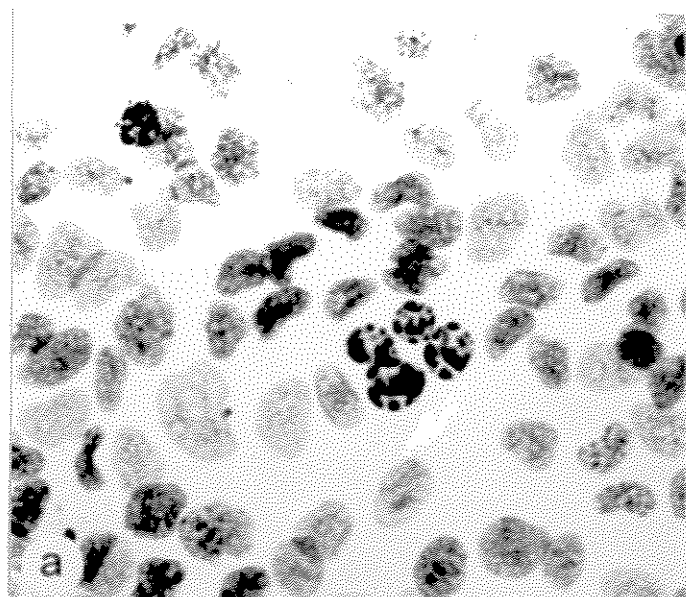
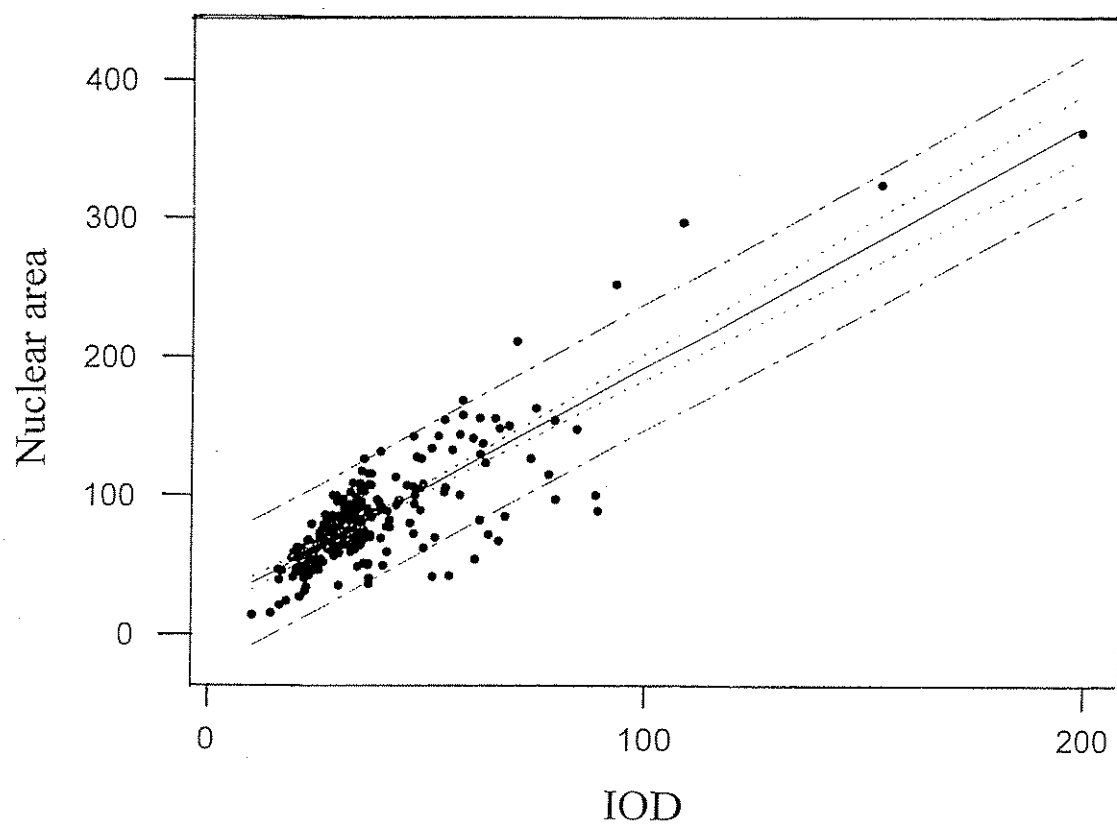
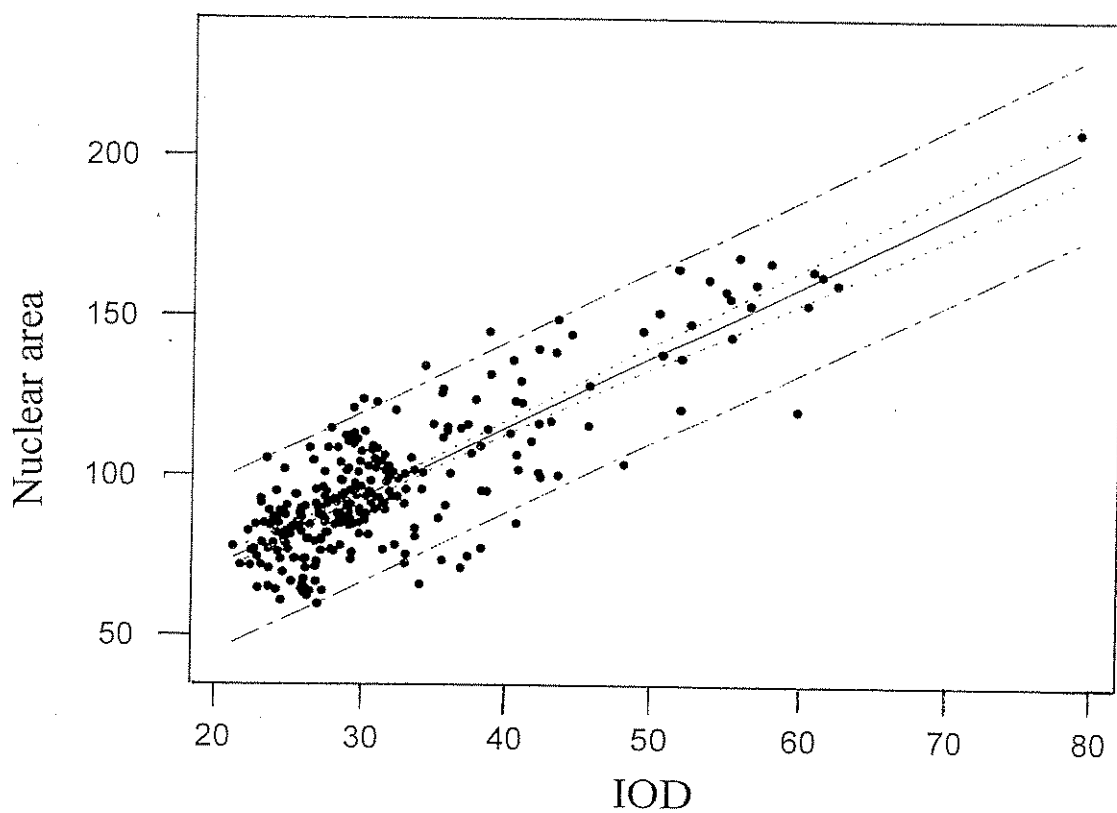


Tabela II. Parâmetros de análise de imagem obtidos a partir de células V79 submetidas à reação de Feulgen, quando cultivadas na ausência e presença de substrato de colágeno hiperpolimerizado (n, 263).

Colágeno como substrato	IOD		OD		S(μm^2)		Fator forma	
	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD
ausente	32.02	9.07	0.33	0.05	98.03	24.17	0.85	0.07
presente	36.52	19.51	0.46	0.15	82.65	40.85	0.75	0.12

IOD, (densidade óptica integrada/conteúdo de DNA); OD, densidade óptica; S (μm^2), área nuclea; X, média, SD, desvio padrão. Dados analisados por ANOVA, mostrando que todos os valores apresentam diferenças significativas ($p < 0.001$).

Figura 8. Diagrama de dispersão demonstrando relacionamento entre os valores Feulgen-DNA (IOD) e áreas nucleares de células V79 na ausência de colágeno (a) e na presença de colágeno (b).



III.4. Cultivo celular de longo período de células V79 em gel de colágeno tipo I hiperpolimerizado

Aos 15 dias de cultivo, toda a superfície do colágeno estava coberta por células e figuras mitóticas, demonstrando a franca proliferação celular, foram observadas através da reação de Feulgen. As células V79 também migraram para o interior do gel de colágeno. Nas Figs. 9 (a-d) através de reação de Feulgen pode-se ter uma visão geral do substrato colagênico preenchido pelas células V79 como resultado dos processos de migração e infiltração celulares. Foi possível observar, através de microscopia de polarização, núcleos fusiformes em fios que se irradiavam do substrato Figs. 9 (c, d).

Aos 25 dias de cultivo o crescimento celular por toda a superfície colagênica ainda pôde ser observado. Ao analisarmos o material submetido à coloração com AT, foi possível perceber que as células V79 apresentavam-se com morfologia tipicamente fibroblástica, com destaque para os nucléolos e figuras de mitose corados metacromaticamente (Figs. 10 a-d). Próximo ao fio de colágeno observou-se a proliferação celular que possivelmente ocorresse por haver elementos de MEC sendo produzidos pelos fibroblastos. Na Fig. 10 d, em material submetido à coloração de AT, é possível observar as células em arranjo semelhante a um endotélio, na ausência do substrato colagênico.

Aos 30 dias de cultivo, foi observada a proliferação celular ativa sobre o substrato colagênico e também foram observados alguns grupos celulares que se irradiavam do substrato de colágeno. Estas células que cresceram na ausência de colágeno, possivelmente ainda estivessem em proliferação pela proximidade ao substrato colagênico. Porém, a maioria das células que cresceu sobre lamínula descolou-se neste tempo de cultivo (Fig. 10 e, f).

O método de TUNEL destacou células em apoptose, principalmente na região periférica do fio de colágeno aos 30 dias de cultivo. Aos 15 dias cultivo,

células sobre a lamínula se mostraram em apoptose e células sobre o substrato colagênico não apresentaram positividade ao método de TUNEL (Fig.11).

Figura 9. Células V79 cultivadas em substrato colagênico, submetidas à reação de Feulgen, aos 15 dias de cultivo, demonstrando células sobre a superfície e infiltrando-se para o interior celular (a, b) a, 64x; b, 100x. Podem ser observados fios de colágeno se irradiando da periferia do substrato colagênico destacado pela microscopia de polarização (c, d) c e d, 64x . Os núcleos com morfologia mais alongada podem ser observados nestes fios que se irradiam do cordão de colágeno (setas) (c, d).

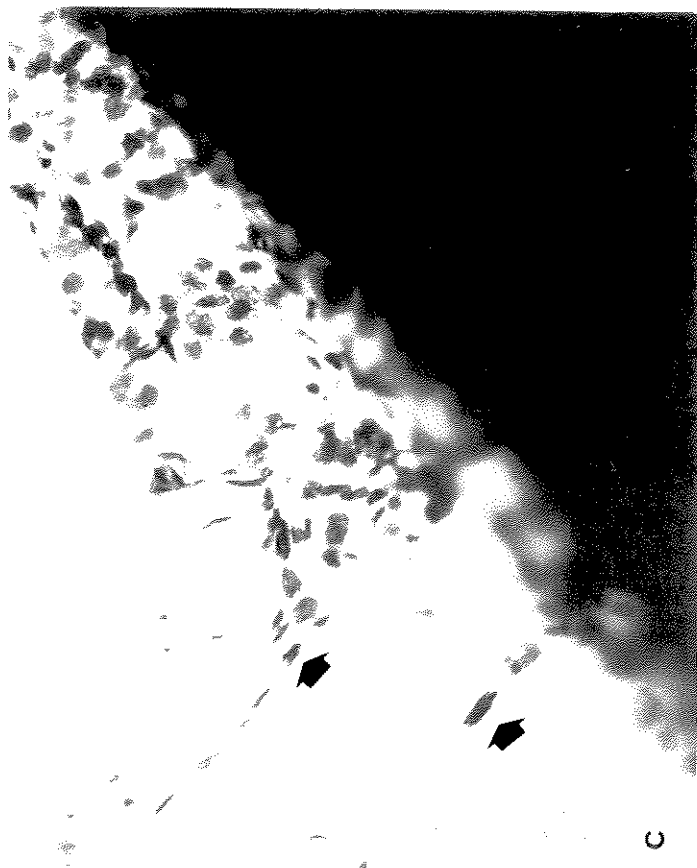
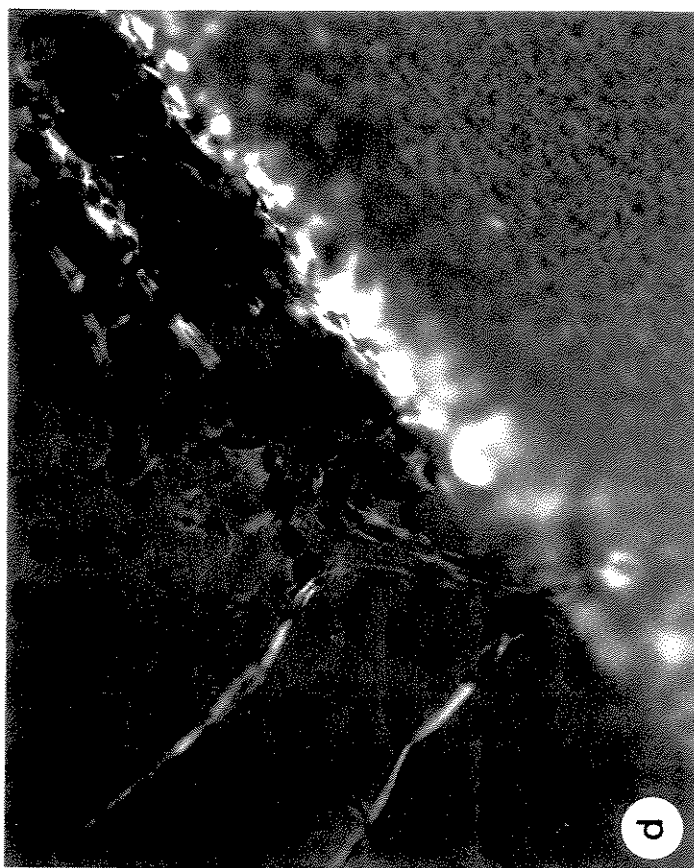
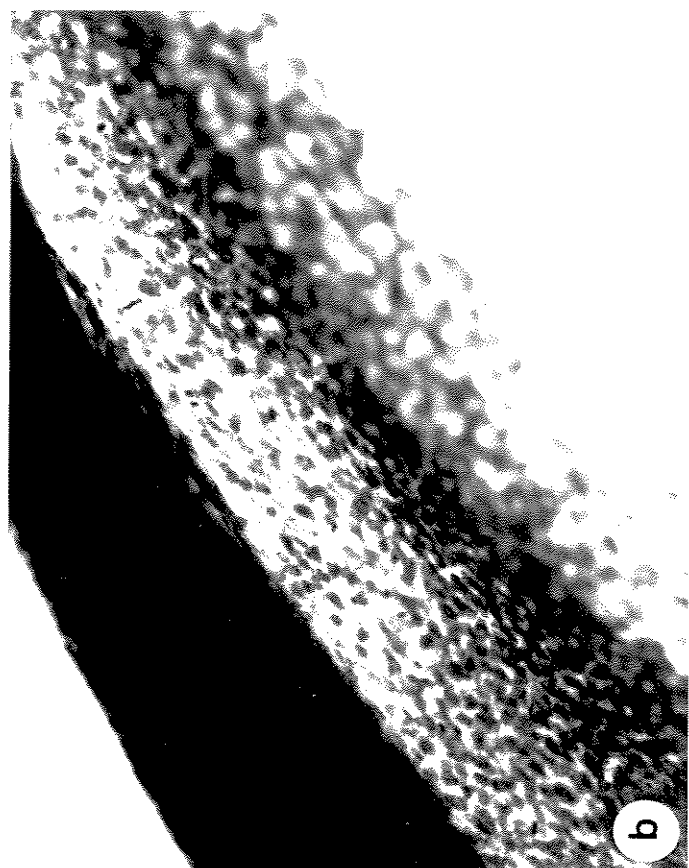


Figura 10. Células V79 cultivadas sobre colágeno hiperpolimerizado em longo cultivo, submetidas à coloração de AT. Cultivo de 25 (a, b, c e d) e 30 dias (e, f), demonstrando morfologia tipicamente fibroblástica neste substrato (a, b) a, 64; b, 100x. Em (c, d) podem ser observados grupos celulares se irradiando da periferia do fio de colágeno com formação semelhante a um endotélio c, 64; d, 160x. Células em apoptose e em divisão podem ser observadas (setas). e e f, 100x.

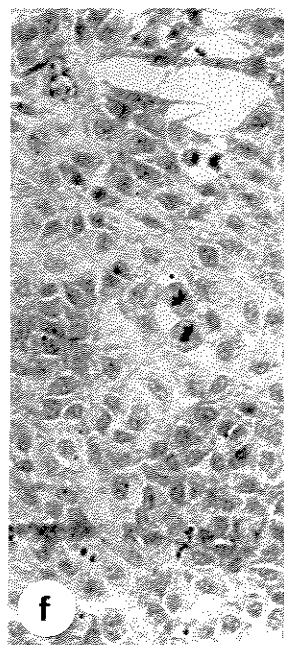
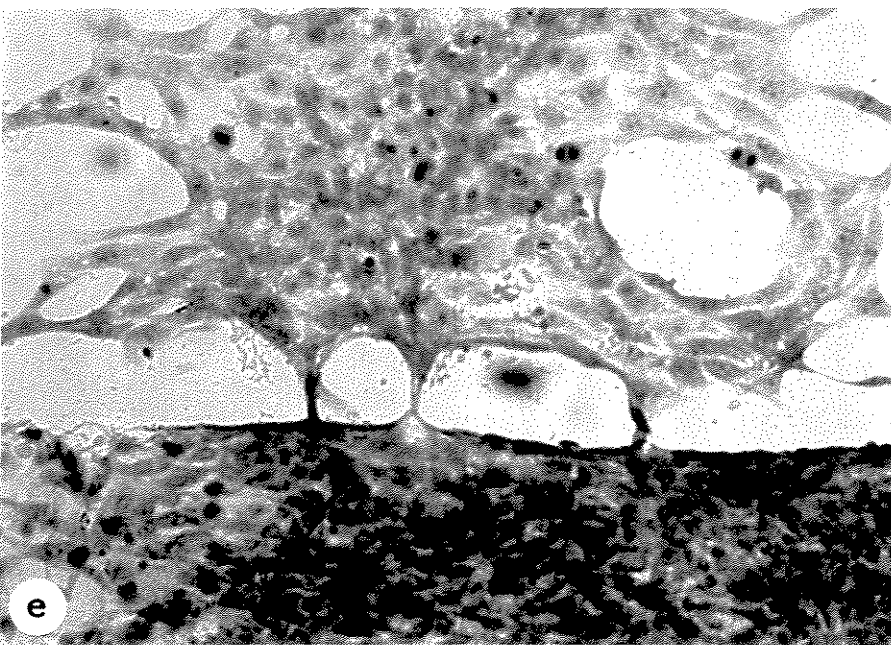
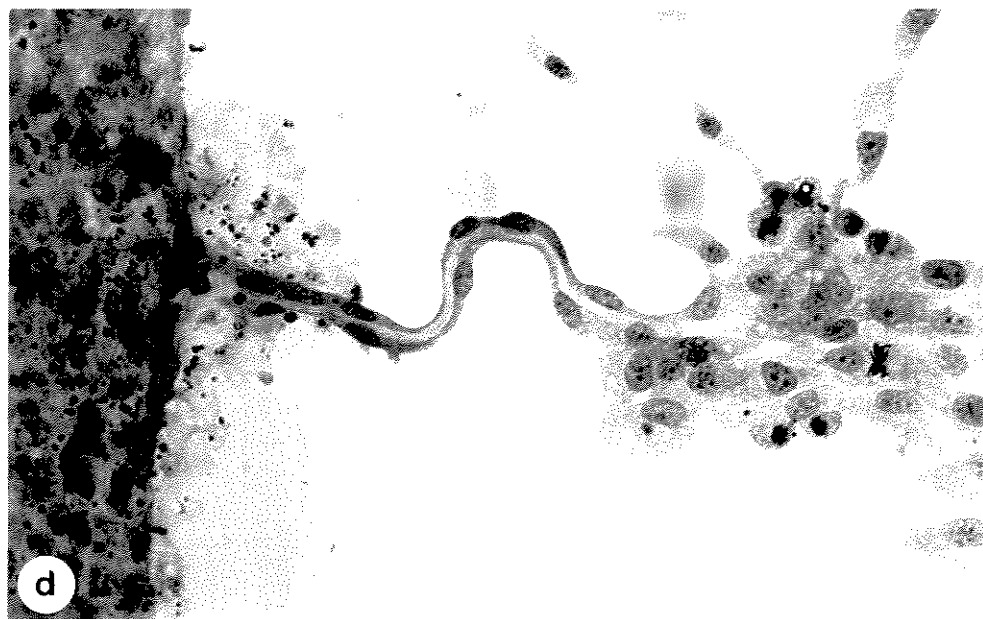
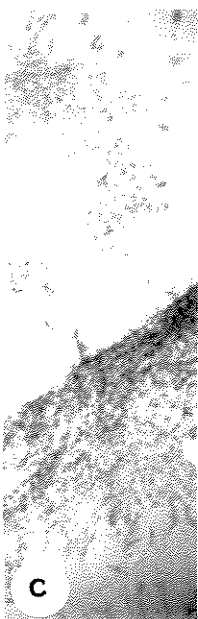
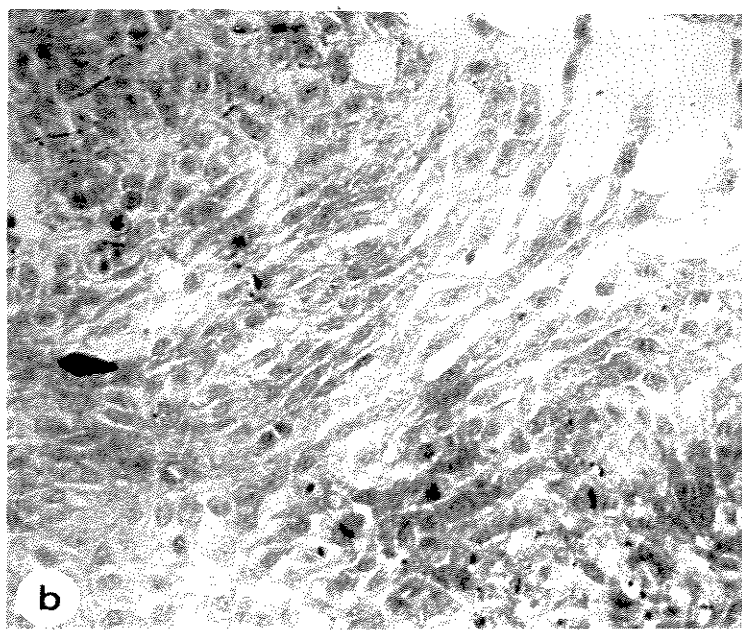
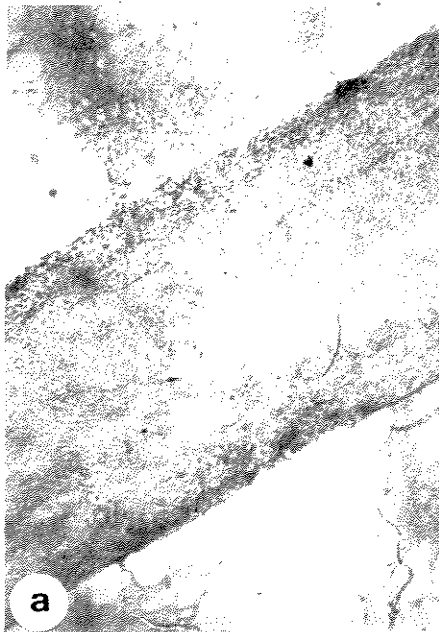
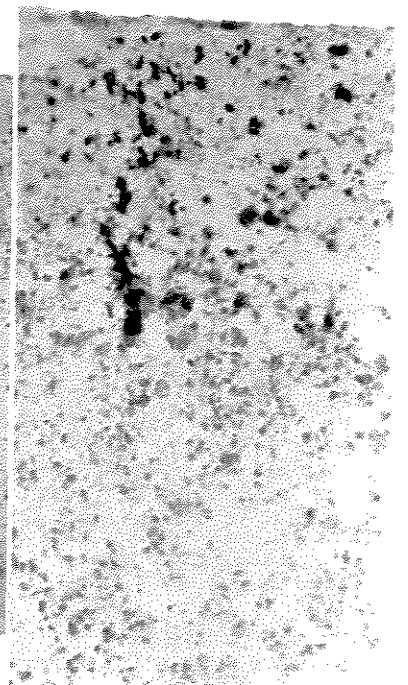
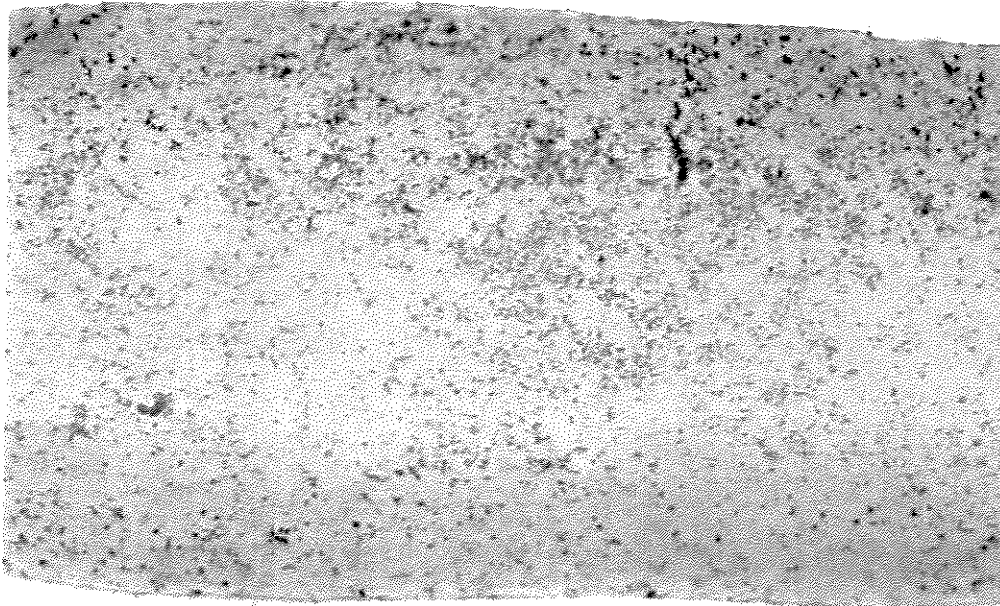
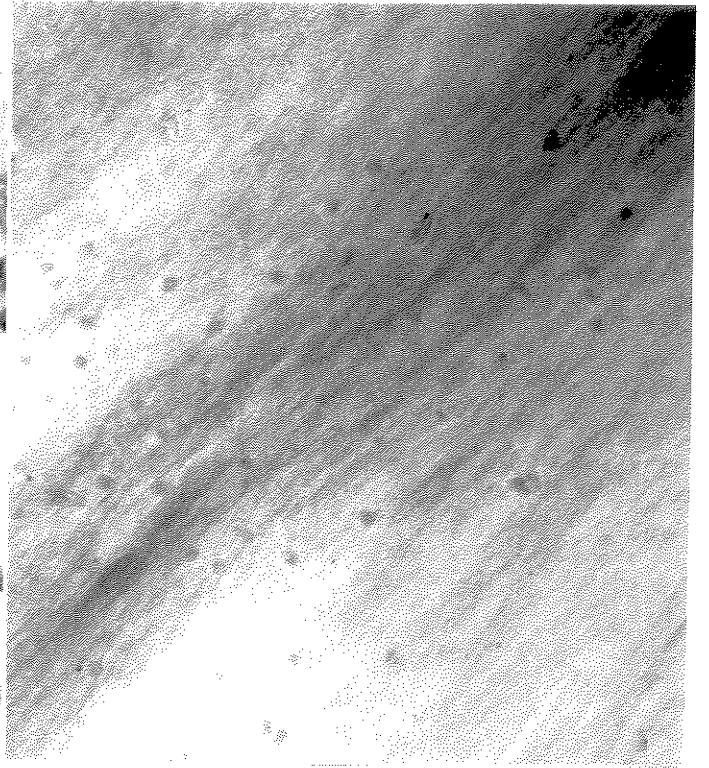
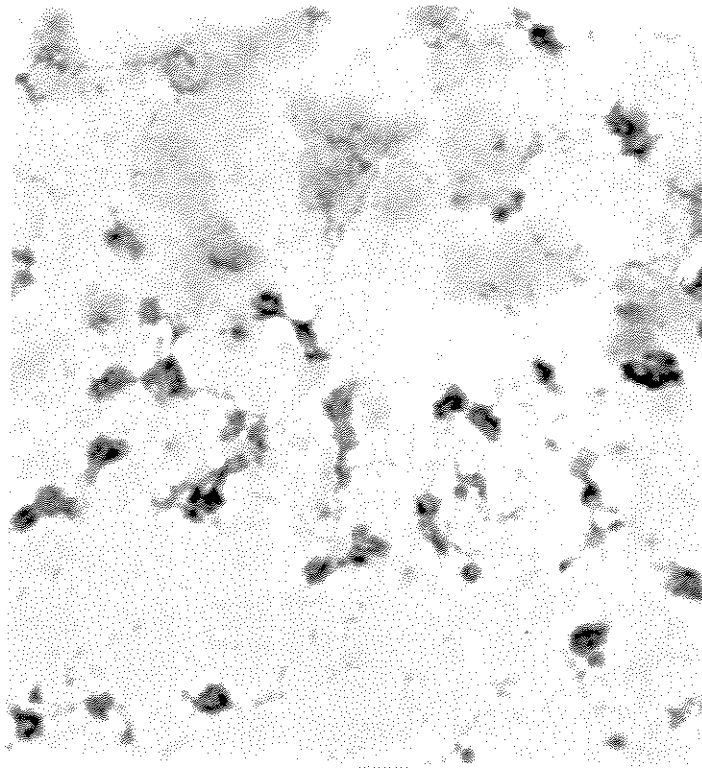


Figura 11. Células V79 aos 15 dias de cultivo na ausência de colágeno, exibindo positividade ao método de TUNEL (a) e sobre o substrato colagênico, não exibindo positividade ao método de TUNEL (b) a, 480x; b, 160x. Aos 30 dias de cultivo, as células V79 podem ser observadas em apoptose, principalmente na periferia do gel de colágeno (c, d) c, 100; d, 160x.



IV- Discussão

IV.1. Análise citoquímica e de conteúdo de DNA de células BHK 21 em apoptose. IV.2. Fragmentação e perda de conteúdo de DNA em células fibroblásticas V79 estudadas por reação de Feulgen e análise de imagem

A reação de Feulgen foi capaz de destacar fenótipos apoptóticos típicos e também núcleos considerados suspeitos de apoptose em células fibroblásticas V79 e BHK 21. A análise de imagem confirmou a discriminação visual, distinguiu os núcleos em diferentes níveis de condensação cromatínica, durante o processo apoptótico, e demonstrou o decréscimo da quantidade Feulgen-DNA nos núcleos de células V79.

Deve-se ressaltar que a reação de Feulgen além de possibilitar a quantificação de DNA permite também a avaliação das mudanças na textura cromatínica em diferentes materiais, especialmente quando associada a procedimentos de análise de imagem (Mello, 1989; Mello & Russo, 1990; Mello *et al.*, 1995 a, b). Esses métodos têm sido muito utilizados para quantificar índices mitóticos e apoptóticos (Camby *et al.*, 1995) e estabelecer relações entre ciclo celular e apoptose (Wallet *et al.*, 1996).

O decréscimo no conteúdo de DNA parece resultar de uma perda intrínseca ao processo de fragmentação durante a apoptose ou então ser resultado de mudanças na estabilidade físico-química do DNA frente à hidrólise ácida durante a reação de Feulgen (Mello & Vidal, 1978; Mello, 1997). A hipótese mais razoável parece ser a primeira, uma vez que núcleos apoptóticos demonstram perda de conteúdo de DNA, mesmo quando quantificados por procedimentos que não envolvam hidrólise ácida, como ocorre especialmente na citometria de fluxo, a qual é amplamente utilizada para quantificação de DNA. A perda de DNA, portanto, ocorre em resposta a fatores inerentes ao processo de apoptose, como a ação de endonucleases fragmentando o DNA.

A presença de DNA fragmentado por ação de endonucleases poderia tornar este DNA mais suscetível à ação da hidrólise ácida, porém tal efeito não se aplica ao material analisado no presente trabalho. Sabe-se ainda que os núcleos apoptóticos apresentaram o DNA muitas vezes complexado com proteínas pertencentes à matriz nuclear, o que proporcionaria mascaramento das regiões de fragmentação do DNA pelas proteínas.

Torna-se então elucidativo discutirmos a respeito de fragmentação do DNA durante o processo apoptótico, uma vez que, baseando-se neste evento, foram criados métodos de identificação que são amplamente utilizados, como o método imunocitoquímico TUNEL, descrito por Gravieli *et al.* (1992) ou métodos bioquímicos de identificação de DNA fragmentado em gel de agarose (Wyllie *et al.*, 1980).

A detecção dos fragmentos internucleossomais de DNA tem sido considerada uma característica do processo apoptótico e freqüentemente tem sido utilizada como sólido critério para sua detecção (Arends *et al.*, 1990; Cohen *et al.*, 1991; Raff, 1992). Entretanto, não há evidências claras apresentadas para se afirmar que a degradação do DNA desempenhe um papel principal na morte celular por apoptose (Schulze-Osthoff *et al.*, 1994).

Corroborando este fato temos os dados apresentados por Fournel *et al.* (1995) que detectaram a condensação nuclear durante o processo apoptótico sem fragmentação e também sem decréscimo de conteúdo de DNA. Na realidade, vários artigos atuais tratam da descrição de morte celular por apoptose induzida na ausência de detectável fragmentação do DNA (Cohen *et al.*, 1991; Falcieri *et al.*, 1993; Oberhamer *et al.*, 1993; Zamai *et al.*, 1996).

A existência de um grande número de indutores de apoptose e expressões de efeito as quais também podem variar de acordo com o tipo celular considerado, têm forçado a reconsideração dos aspectos morfológicos para detecção da apoptose.

Sabe-se ainda que, mesmo nos estudos que utilizam métodos imunocitoquímicos específicos para detecção de fragmentação, lança-se mão da consideração da morfologia apoptótica característica do evento para diagnóstico final.

O processo apoptótico foi reconhecido por Kerr (1972), mas sabe-se também que, anteriormente a esta data já se fazia referência a este tipo especial de morte por apoptose (Hockenbery, 1995). Como este assunto só foi efetivamente estudado no final da década de 80, a incerteza quanto a um diagnóstico definitivo deve-se ao fato de que o estudo da morte por apoptose ainda atualmente é incipiente, embora muito progressivo.

Atualmente, procuram-se utilizar vários métodos discriminatórios e de quantificação, tais como os citoquímicos descritos por Vidal *et al.* (1996), imunocitoquímicos (Gravieli *et al.*, 1992), bioquímicos (Wyllie *et al.*, 1980; Wyllie *et al.*, 1984; Walker & Siroksa, 1994), métodos de quantificação por citometria de fluxo (Ferline *et al.*, 1996) e análise de imagem. Utilizá-los conjuntamente poderá proporcionar resultados mais fidedignos.

Citoquimicamente, os núcleos apoptóticos de células BHK 21 revelaram, após a reação de AT-CEC, que o RNA metacromático envolvia o DNA condensado e que o DNA, nestes núcleos, apresentava birrefringência, a qual é resultado de um arranjo molecular ordenado e do grau de cristalinidade do DNA no processo de morte.

Conjuntamente, obtivemos uma maior ligação de Con-A em estruturas nucleares em apoptose em células BHK 21, o que revela a presença de glicoproteínas ricas em resíduos de glicose e manose, os quais provavelmente são pertencentes à matriz nuclear (Vidal *et al.*, 1997).

Concernente a isto, Sodja *et al.* (1997) explicaram que o relacionamento entre a dissociação da matriz nuclear e o colapso da cromatina no processo apoptótico não foram ainda completamente estudados. Os autores hipotetizaram

que a dissociação da matriz nuclear e da cromatina possivelmente ocorra em uma seqüência ordenada espacialmente e temporalmente durante a apoptose, refletindo a organização original do núcleo.

Possivelmente por este fato, os núcleos de células BHK 21 apresentem tais glicoproteínas associadas ao DNA no processo apoptótico, diferentemente do que ocorre em núcleos normais. Essas glicoproteínas estão altamente concentradas na cromatina condensada nos núcleos apoptóticos. Pode ser inferido também que a cristalinidade apresentada pelo DNA de núcleos apoptóticos resulte do fato de que fragmentos de pequenos solenóides facilmente formem complexos com glicoproteínas estruturais na matriz nuclear, as quais também estão aderidas à superfície interna do envelope nuclear.

De acordo com Vidal *et al.* (1997), a ligação de Con-A a glicoproteínas na heterocromatina, telômeros e cromatina condensada pode representar uma distribuição física preferencialmente destas proteínas, a qual seria necessária para desempenho de propriedades biomecânicas (elasticidade e torsão), que são também relevantes para ação de polimerase e condensação cromossômica (Strick *et al.*, 1996).

A condensação do DNA em núcleos apoptóticos é tal que resulta em um complexo cristalino comparado ao de núcleos altamente compactados como ocorre espermatozóides. O estado cristalino de núcleos de espermatozóides foi descrito por Mello & Vidal, (1973, 1977) e por Mello & Falco (1996) e Mello (1987, 1997).

Outra questão bastante estudada atualmente é a identificação e quantificação de células que estão em fase inicial de apoptose. Com base em estudos de citometria de fluxo, foi proposto que a textura cromatínica seja alterada em fases iniciais de apoptose (Ferline *et al.*, 1996). Entretanto, a citometria de fluxo apresenta algumas limitações no que diz respeito à preservação da topografia celular e a necessidade de corantes fluorescentes, os quais variam em relação a

afinidade ao DNA, e também, o uso de uma amostra grande de células (Wallet *et al.*, 1996). Acreditamos que a análise de imagem se mostre vantajosa no que diz respeito à preservação da topografia celular, uma vez que é possível escolher a célula a ser quantificada, evitando que corpos apoptóticos sejam considerados como um núcleo íntegro.

Adicionalmente, a análise de imagem é associada a resultados obtidos após reação de Feulgen, procedimento *in situ* altamente estequiométrico e específico para DNA e também discriminatório para morfologias específicas dos núcleos apoptóticos. Entretanto, é necessário ressaltar que, para materiais que se apresentem em confluência celular, como os dados aqui obtidos, possivelmente poderá haver prejuízo do espaço amostral disponível devido à sobreposição celular e, portanto, dificuldade de isolamento dos núcleos escolhidos para as medidas. Por este fato, o número de células V79 escolhido para análise foi variável e, talvez, esta seja a resposta para a variação dos valores de IOD para os núcleos tipo II'.

Os resultados de análise de imagem apresentados aqui demonstram um aumento de OD nos núcleos suspeitos de apoptose concomitante ao decréscimo de sua área, favorecendo a idéia de que a condensação cromatínica já seja detectada em núcleos supostamente em fases iniciais de apoptose, considerados aqui como suspeitos (núcleo tipo II).

O processo apoptótico descrito para células V79 e BHK 21 foi induzido por inibição por contato celular em confluência. Considerando-se os dados de Dini e coautores (1996) existem diferenças ultraestruturais na morfologia apoptótica dependente do estímulo, o que significa que, se drogas fossem administradas no presente estudo, a morfologia nuclear e a textura cromatínica, bem como outros dados referentes aos descritores utilizados para análise de imagem, poderiam ser diferentes.

IV. 3. Análise da ocorrência de apoptose em células V79 quando cultivadas em gel de colágeno tipo I hiperpolimerizado. IV.4. Cultivo celular de longo período de células V79 em gel de colágeno tipo I hiperpolimerizado.

Fibroblastos V79 cultivados por longo período sobre as placas de cultivo não apresentam progressão de crescimento e morrem por apoptose. Entretanto, na presença de substrato colagênico, a dinâmica de crescimento celular é particularmente diferente e as células morreram por apoptose somente em regiões onde a confluência ocorreu, sendo que o tempo de vida é aparentemente prolongado. Nossos resultados também demonstraram que o gel de colágeno hiperpolimerizado induz diferenciação celular apresentada por evidente mudança morfológica, aumento de conteúdo de DNA, aumento no grau de condensação cromatínica e atraso do processo apoptótico.

No presente estudo, deve-se ressaltar que a morte celular por apoptose foi atribuída ao processo de inibição por contato, isto é, sem a indução química ou física de morte, justamente com o intuito de analisar o crescimento natural em cultivo de longa duração. Para isso comparamos as células que cresceram em lamínulas com as células que cresceram em colágeno hiperpolimerizado.

Sabe-se que, após a confluência, as células se descolam do substrato, prevenindo a proliferação de células não transformadas, um processo denominado *inibição por contato dependente de ancoragem* (Zoller *et al.*, 1997). Neste e em outros sistemas, a apoptose oferece um caminho fisiológico para limitar o número de células, remover células que tenham completado uma dada função, ou eliminar células pré-malignas (Werb *et al.*, 1996).

O contato célula-célula afeta o metabolismo. Por exemplo, contatos entre célula e substrato são pré-requisitos para a proliferação e então sobrevivência celular. Quando este contato com o substrato é inibido, as células não recebem os mesmos sinais e então, ocorre morte celular por apoptose (Bates *et al.*, 1994).

Por outro lado, vários experimentos demonstraram a eficiência dos elementos de MEC quando utilizados como substrato evitando a morte por apoptose. Montgomery *et al.* (1994) relataram que a sobrevivência e crescimento de células transformadas podem ser regulados pelo substrato, o qual era composto de colágeno dérmico tridimensional. Neste substrato, células de melanoma foram resgatadas do processo apoptótico. Esta resposta de sobrevivência foi relacionada à atuação da integrina $\alpha_2\beta_1$ no processo de adesão e espalhamento destas células cultivadas em colágeno dérmico.

Pullan *et al.* (1996) demonstraram que a membrana basal estimula de sobrevivência para células epiteliais *in vivo* e a perda desta interação causaria apoptose. Também sugeriram que a combinação de sinais provenientes das interações de adesão célula-MEC e/ou célula-célula são necessariamente requeridas, de forma a prevenir o irreversível endereçamento para a morte celular. Esses autores observaram que as células epiteliais mamárias aderem e espalham-se na MEC, tal como o colágeno tipo I, mas subsequente morrem por apoptose. A incapacidade do colágeno tipo I de prevenir apoptose nestas células é devido a ausência de outros elementos da MEC, como, por exemplo, uma membrana basal íntegra, uma vez que esta tem um importante papel como fator de sobrevivência para a morfogênese glandular.

Por outro lado, se durante a morfogênese, células migrarem para outros locais diferentes daquele domínio glandular, estas podem entrar em processo de morte por apoptose, garantindo a homeostasia durante a vida adulta. Falhas no processo de reconhecimento de adesão podem levar a ocorrência de carcinomas mamários. Neste sentido, um mecanismo molecular que pode contribuir para o carcinoma mamário e metástase, por exemplo, poderia ser a falha no requerimento da adesão celular à membrana basal e supressão de apoptose (Howlett *et al.*, 1995).

De acordo com Boudreau et al. (1996), ao estudar o modelo de células epiteliais mamárias cultivadas em membrana basal, existem questões intrigantes que permanecem a respeito da sensibilidade de células normais frente a sinais de crescimento inapropriados, durante o cultivo de células sobre as placas convencionais de cultura e, subseqüentemente, como são ativados genes responsáveis pela maquinaria apoptótica e, de que forma a MEC influenciaria na ativação gênica.

Embora exista muito ainda a ser aprendido a respeito de como um microambiente regula esses processos fisiológicos de diferenciação e apoptose, foi possível mostrar que a MEC dirige mudanças na expressão gênica por vias bioquímicas e biomecânicas de sinalização (Weaver *et al.*, 1996).

Sabe-se que elementos da MEC são indutores de diferenciação celular, reguladores do processo de apoptose. As vias intracelulares que protegem contra apoptose são diferentes daquelas que sinalizam para proliferação (Pullan *et al.*, 1996). O modelo melhor entendido atualmente é o que envolve o controle de apoptose mediado pelo gene BCL-2 e suas proteínas relativas, o qual promove a sobrevivência celular (Oltvai & Korsmeyer, 1994).

Células epiteliais mamárias entram em apoptose na ausência de membrana basal, assim como sugerido por Boudreau *et al.* (1995). A morte neste sistema ocorre por ação coordenada de enzima de conversão interleucina-1 β (ICE), a qual pode atuar paralelamente com Bcl2/Bax em pontos de checagem (Oltvai & Korsmeyer, 1994). O BCL-2 está presente em culturas epiteliais mamárias, entretanto, células que sobrevivem em membrana basal somente expressam baixos níveis de BCL-2 quando comparados às células cultivadas em monocamadas sobre colágeno tipo I ou plástico.

Esses eventos são controlados por modulação da ligação da célula à MEC através de sinalização via integrina que controla apoptose dependente de adesão.

Vários estudos têm demonstrado que integrinas, semelhantemente aos fatores de crescimento, possuem capacidade de transdução de sinal, além de ser um mecanismo através do qual a MEC pode influenciar o fenótipo celular e, possivelmente, a sobrevivência. Somente a adesão mediada por integrinas evita *anoikis* (Frisch & Francis, 1994). O fenômeno de *anoikis* implica que as integrinas regulam a sinalização de críticos componentes da maquinaria apoptótica, uma vez que as integrinas são os maiores receptores *in vivo* da MEC (Frisch & Ruoslahti, 1994).

As células epiteliais e endoteliais, quando perdem a adesão à MEC, entram em apoptose e este processo então passou-se a ser chamado de *anoikis* (apoptose que ocorre por perda de adesão celular a elementos de MEC). A *anoikis in vivo* pode prevenir células não aderidas de se aderirem a outras matrizes e de crescerem displasicamente, o que sugere um importante artifício de proteção do organismo. Em células neoplásicas, alterações em moléculas de adesão, nas integrinas ou nos reguladores de apoptose podem levar à resistência à *anoikis*, facilitando o crescimento independente de ancoragem. Fibroblastos dissociados de sua MEC entram em reversível parada de crescimento, revelando sua dependência de ancoragem (Folkman & Moscona, 1978). A apoptose dependente de ancoragem foi experimentalmente comprovada e apresenta morfologia celular e nuclear clássica, fragmentação internucleossomal e clivagem das lamínas nucleares, o que claramente indica apoptose ao invés de necrose. Também, a super expressão de proteína bcl-2 mostrou atuar de forma protetora de morte em células MDCK (Frisch & Francis, 1994). Estas informações trouxeram novas luzes ao entendimento de morte celular e, a partir disso, este tipo de apoptose poderia ser induzido por vários métodos de dissociação e também sugeriu que células endereçadas à morte poderiam ter o processo revertido por replaqueamento destas após um curto espaço de tempo de suspensão em cultura (Frisch & Ruoslahti, 1997).

O processo de reconhecimento celular às fibras de colágeno é acompanhado por uma reprogramação fundamental da morfologia e fisiologia do fibroblasto (Langholz, 1995). A ligação celular ao colágeno tipo I envolve principalmente as integrinas $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$ (Kirchhofer *et al.*, 1990; Elices & Hemler, 1989). A integrina $\alpha_2\beta_1$ é uma proteína receptora de colágeno em fibroblastos e também receptora de laminina em células epiteliais e endoteliais (Elices & Hemler, 1989; Languino *et al.*, 1989).

A expressão da integrina $\alpha_2\beta_1$ é um processo celular regulado. Xu & Clark (1997) apresentaram evidências de que segundos mensageiros são desencadeados pelo colágeno 3D. Esses segundos mensageiros envolvem proteínas quinases que podem mediar a expressão de mRNA da integrina. Koyama *et al.* (1996) registraram que outros segundos mensageiros protéicos são modulados por colágeno 3D, tais como o supressor de quinases p70S 6 e níveis elevados de p27^{kip1} e p21^{cip1/waf1}, inibidores de ciclinas dependentes de quinase 2 (cdk2).

Em fibroblastos, descolamento do substrato causa a parada do crescimento. O bloqueio na fase G1 é aparentemente causado por perda de atividade dos complexos ciclina E/cdk2 e então estas células entram em apoptose (Fang *et al.*, 1996). O início da apoptose tem sido correlacionado, em vários tipos celulares, com a regulação aberrante do ciclo celular e da proliferação. A análise de uma variedade de células em cultura, tem mostrado que as ciclinas são induzidas à atividade, quando vias regulatórias normais para a proliferação estão ausentes. O tempo de indução da expressão das ciclinas está intimamente associado ao endereçamento celular à apoptose (Shi *et al.*, 1994; Meikrantz *et al.*, 1994). A inibição de atividade das ciclinas ou ativação de outras quinases associadas, suprime o processo apoptótico. A supressão de apoptose por estabilidade da superexpressão do Bcl-2 previne a resposta apropriada ou a ativação das moléculas regulatórias do ciclo celular, isto é, a atividade das ciclinas (Boudreau *et al.*, 1996).

Deve ser enfatizado que a natureza do substrato colagênico é particularmente importante e deve ser considerada cuidadosamente. Os diferentes tipos de colágeno podem ser usados para formar um substrato que consiste de complexos supramoleculares de colágeno (Schor, 1980) e esta estrutura pode variar em função, por exemplo, de pH e de força iônica, resultando em um diferente estado macromolecular.

Nossos resultados de análise de imagem demonstraram que houve aumento de conteúdo de DNA e que os valores dos descritores analisados, tais como fator forma e área nuclear, apresentam diferentes valores em comparação às células cultivadas sobre lamínula. Esses resultados indicam que o colágeno tipo I hiperpolimerizado foi capaz de induzir um fenótipo diferenciado em células V79.

O desenvolvimento de fibroblastos cultivados em substratos tridimensionais de colágeno é grandemente diferente do crescimento em culturas de monocamadas (Bell *et al.*, 1979; Guidry & Grinnell, 1985). Esse substrato colagênico oferece condições fisiológicas semelhantes comparado a derme (Bell *et al.*, 1979). A característica mais surpreendente de células cultivadas neste substrato é o estado quiescente observado. As células param de se dividir ou o fazem vagarosamente (Nishiyama *et al.*, 1990). Elas exibem uma baixa resposta a fatores de crescimento (Nakagawa *et al.*, 1989, Nishiyama *et al.*, 1990) e então sintetizam menos proteínas e principalmente, colágeno, quando comparado à atividade de secreção de fibroblastos em monocamadas (Nishiyama *et al.*, 1990). Está demonstrado que a inibição da síntese de colágeno observada neste sistema de cultivo depende na totalidade ou em grande parte da inibição da transcrição (Mauch *et al.*, 1988).

Vários artigos sugerem que adesão celular envolve não somente ligação a receptores, mas também que interações físicas ocorrem. As células respondem a forças exercidas provenientes do fluido circundante ou substrato (Pelhan Jr & Wang, 1997). Portanto, forças mecânicas podem desempenhar respostas ao processo de adesão e propriedades físicas e químicas do substrato podem

profundamente afetar a locomoção, crescimento e diferenciação frente a propriedades mecânicas do substrato.

Pelhan Jr. & Wang (1997) demonstram a capacidade de células em cultura de detectarem a flexibilidade do meio circundante e de regularem a adesão e motilidade. Em substratos flexíveis, fibroblastos migram rapidamente e células epiteliais mostram elevadas atividades de protusão e retração lamelipodial. Essas respostas podem resultar de adesão desestabilizada ou serem respostas a sinais provenientes de integrina. Os contatos mediados via integrina geram mudanças morfológicas e a força de resistência geradas pelo citoesqueleto frente a rígidos substratos podem aumentar a tensão em estruturas de adesão através de complexos enzimáticos sensíveis à força. Ainda, tais resultados sugerem fortemente que comunicações entre sinais físicos possam ocorrer através de mensageiros químicos. As propriedades mecânicas celulares podem ser moduladas por síntese/degradação de proteínas da MEC, por movimentos celulares e até mesmo por pressão do fluxo sanguíneo (Juliano & Haskill, 1993).

Diante dos dados apresentados, o processo de diferenciação e morte são modulados pelo substrato colagênico hiperpolimerizado. Mesmo embora os dados aqui apresentados não tenham sido analisados molecularmente, é possível sugerir fortemente que as integrinas sejam responsáveis pelo reconhecimento celular ao substrato e que estas desencadeiem respostas de sobrevivência e morte às células V79.

O colágeno tipo I hiperpolimerizado utilizado como substrato garante o atraso do processo apoptótico, uma vez que a células V79 apresentam períodos de latência proliferativa neste substrato, aberrante mudança morfológica e também aumento de conteúdo de DNA, refletindo o processo de diferenciação celular.

V- Conclusões

A reação de Feulgen associada ao procedimento de análise de imagem se mostra uma ferramenta metodológica efetiva para a caracterização de células apoptóticas.

O mesmo procedimento também é capaz de caracterizar núcleos suspeitos de apoptose os quais podem representar fases iniciais do processo apoptótico.

O substrato colagênico em sua forma hiperpolimerizada induz diferenciação celular caracterizada alteração morfológica, aumento de conteúdo de DNA, diminuição de área nuclear e indução de fase de latência no crescimento de células V79.

O processo apoptótico é atrasado, porém não evitado, pelo substrato colagênio em células V79.

Apoptose ocorre em células V79 em condições de confluência celular, provavelmente induzida pela perda de substrato para adesão e por conseguinte proliferação.

VI- Referências Bibliográficas

- Adams, J.C. & Watt, F.M.** (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117: 1183-1198.
- Andujar, M.B., Melin, M., Guerret, S. & Grimaud, J.A.** (1992). Cell migration influences collagen gel contraction. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 24 (2): 145-154.
- Arends, M.J., Morris, R.G. & Wyllie, A.H.** (1990). Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136 (3): 593-608.
- Bates, R.C., Buret, A., van Helden, D.F., Norton, M.A. & Burns, G.F.** (1994). Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact. *J. Cell Biol.* 125 (2): 403-415.
- Bell, E., Ivarsson, B. & Merrill, C.** (1979). Production of tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1274-1278.
- Bellows, C.G., Melcher, A.H. & Aubin, J.E.** (1981). Contraction and organization of collagen gels by cells cultured from periodontal ligament, gingiva and bone suggest functional differences between cells. *J. Cell Sci.* 50: 299-314.
- Bissell, M.J., Hall, H.G. & Parry, G.** (1982). How does the extracellular matrix direct gene expression? *J. Theor. Biol.* 99: 31-68.
- Boudreau, N., Simpson, C.J., Werb, Z. & Bissell, M.J.** (1995). Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 267: 891-893.
- Boudreau, N., Werb, Z. & Bissell, M.J.** (1996). Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3509-3513.
- Brown, D.G.; Sun, X.M. & Cohen, G.M.** (1993). Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J. Biol. Chem.* 268: 3037-3039.

- Camby, I., Salmon, I., Dauguy, A., Pasteels, J.L., Kiss, R.** (1995). The use of the digital cell image analysis of feulgen-stained nuclei to detect apoptosis. *Histochem. Cell Biol.* 104: 407-414.
- Carter, W. G.** (1990). The role of integrin $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_3\beta_1$ in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells. *J. Cell Biol* 110: 1387-1404.
- Chambard, M., Gabrion, J. & Mauchamp, J.** (1981). Influence of collagen gel on the orientation of epithelial cell polaraty: Follicle formation from isolated thyroid cells and from preformed monolayers. *J. Cell Biol.* 91: 157-166.
- Chen, C.S., Mirksick, M., Huang, S., Whitesides, G.M. & Ingber, D.E.** (1997). Geometric control of cell life and death *Science* 276: 1425-1428.
- Cohen, G. M., Sum, X.M., Snowden, R.T., Densdale, D. & Skellter, D.N.** (1991) Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA degradation. *Biochem. J.* 286 (2): 331-334.
- Contran, R.S., Kumar, V. & Robbins, S.L.** (1994). *Pathology basis of disease.* W. B. Sanbers Com., NY.
- Dejana, E., Colella, G., Conforti, M. Abbadini, M., Gaboli, M. & Marchisio, P.C.** (1988). Fibronectin and vitronectin regulate the organization of their respective Arg-Gly-Asp adhesion receptors in cultured human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 107: 1215-1223.
- Dini, L., Coppola, S., Ruzittu, M.T. & Ghibelli, L.** (1996). Multiple pathways for apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res.* 223: 340-347.
- Earnshaw, W.C.** (1995). Nuclear changes in apoptosis *Curr. Opin Cell Biol*, 7: 337-343.
- Ehrmann, R.L. & Gey, G.O.** (1965). The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat tail collagen. *J. Natn. Cancer Inst.* 16: 1375-1390.
- Elsdale, T. & Bard, J.** (1972). Collagen substrata for studies on cell behavior. *J. Cell Biol.* 54: 626-637.
- Elices, M.J. & Hemler, M.E.** (1989). The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9906-9910.

- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.L., Littlewood, T., Land, H., Brooks, M., Watsrs, C.M., Peun, L.Z. & Hancock, C.L.** (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69: 119-128.
- Exposito, J. Y.; Le Guellec, D.; Lu, Q. & Garrone, R.** (1991). Short chain collagens in sponges are encoded by closely related genes. *J. Biol. Chem.* 266 (32): 21923-21928.
- Falcieri, E., Martelli, A.M., Bareggi, R., Cataldi, A. & Cocco, L.** (1993). The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in Molt-4 cells without concomitant DNA fragmentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193: 19-25.
- Fang, F., Orend, G., Watanabe, N., Hunter, T. & Ruoslahti, E.** (1996). Dependence of cyclin E-cdk2 kinase activity on cell anchorage. *Science* 271: 499-502.
- Ferline, C., Cesare, S.D., Rainaldi, G., Malorni, W., Samoggia, P., Bisseli, R. & Fatorossi, A.** (1996). Flow citometry analysis of the early phases of apoptosis by cellular and nuclear techniques. *Cytometry* 24: 106-107.
- Frisch, S. M. & Francis, H.** (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 124 (4): 619-626.
- Frisch, S.M. & Ruoslahti, E.** (1997). Integrins and anoikis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 701-706.
- Folkman, J. & Moscona, A.** (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* 273: 345-349.
- Forsby, A., Andersson, M., Lewan, L. & Sterner, O.** (1991). The cytotoxicity of 222 sequiterpenoid unsaturated dialdehydes, as determined by neutral red absorption assay and by protein determination. *Toxicol. in vitro* 5: 9-14.
- Gerschenson, L.E. & Rotello, R.J.** (1992). Apoptosis: a different type of cell death. *Faseb J.* 6: 2450-2455.
- Gravieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A.** (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: 493-501.

- Grinnell, F. & Minter, D.** (1978). Attachment and spreading of baby hamster kidney cells to collagen substrata: effects of cell insoluble globulin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75: 4408- 4412.
- Grinnell, F.** (1994). Fibroblasts, myoblasts and wound contraction. *J. Cell Biol.* 124 (4): 401-404.
- Guadagno, T.M., Ohtsubo, M., Roberts, J. M. & Assoian, R.K.** (1993). A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science* 262: 1572-1575.
- Guidry, C. & Grinnell, F. J.** (1985). Studies on mechanisms of hydrated collagen gel reorganization by human skin fibroblasts. *J. Cell Sci.* 79: 67-81.
- Gospodarowicz, D.; Greenburg, G. & Birdwell, C.R.** (1978). Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. *Cancer Res.* 38: 4155-4171.
- Havel, L. & Durzan, D.J.** (1996). Apoptosis in plants. *Bot. Acta* 109: 268-277.
- Hockenberry, D.** (1995). Defining apoptosis. *Am. J Pathol.* 146: 16-19.
- Juliano, R.L. & Haskill, S.** (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 120: 577-585.
- Kaufmann, S.H.** (1989). Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: A cautionary note. *Cancer Res.* 49: 5870-5878.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. & Currie, A.R.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.
- Kerr, J.F.R. & Searle, J.** (1972). A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J.Pathol.* 107(1): 41-44.
- Kerr, J.F., Winterford, C.M., Harmon, B.V.** (1994). Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73(8): 2013-2126.
- Kerr, J.F., Gobe, G.C., Winterford, C.M. & Harmon, B.V.** (1995). Anatomical methods in cell death. *Meth. Cell Biol.* 46: 1-27.

- Kirchhofer, D., Languno, L.R., Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M.D.** (1990). $\alpha 2\beta 1$ integrins from different cell types show different binding specifications. *J Biol Chem.* 265: 615-618.
- Klebe, R. J.** (1975). Cell attachment to collagen: the requirement for energy. *J. Cell. Physiol.* 86: 231-236.
- Kleinman, H.K.; Klebe, R. J. & Martin, G.R.** (1981). Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell Biol.* 88: 473-485.
- Klymkowsky, M.W. & Parr, B.** (1995). The body language of cells: the intimate connection between cell adhesion and behavior. *Cell* 83(1): 5-8.
- Koyama, H., Raines, E.W., Bornfeldt, K.E., Roberts, J.M. & Ross, R.** (1996). Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of cdk2 inhibitors. *Cell* 87: 1069-1078.
- Langholz, O., Rockel, D., Mauch, C., Kozłowska, E., Bank, I., Krieg, T. & Eckes, B.** (1995). Collagen and collagenase gene expression in 3D collagen lattices are differentially regulated by $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins. *J. Cell Biol.* 131: 1903-1915.
- Languino, L.R., Gehlsen, K.R., Wayner, E., Carter, W.G., Engvall, E. Ruoslahti, E.** (1989). Endothelial cells use a $\alpha 2\beta 1$ integrin as a laminin receptor. *J. Cell Biol.* 109: 2455-2462.
- Lazebnik, Y.A., Cole, S., Cooke, C.A., Nelson, W.G. & Earnshaw, W.C.** (1993). Nuclear events of apoptosis *in vitro* in cell-free mitotic extracts: A model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J. Cell. Biol.* 123: 7-22.
- Lee, M.** (1992). Structure and functional significance of cell adhesion molecules. *Med. Sci. Res.* 20:539-542.
- Lewin, B.** (1997). *Genes VI In Cell cycle and growth regulation.* Oxford University Press, OX 2 6DP Oxford, NY, 1089-1122.
- Lin, C.Q. & Bissel, M.J** (1993). Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *Faseb J.* 7: 737-742.
- Madri, J.A., Pratt, B.M. & Tucker, A.M.** (1988). Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor b depends upon the

- composition and organization of the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 106: 1375-1384.
- Majno, G. & Joris, I.** (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 146: 3-15.
- Maria, S.S.** (1994). *Estudo comportamental da linhagem celular Vero quando cultivada em substrato de gel de colágeno tipo I*. Tese de Mestrado-UNICAMP.
- Maria, S.S. & Wada, M.L.F.** (1997). Cytochemical analysis of Vero cells on type I collagen gels in long-term culture. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Animal* 33: 748-750.
- Martin, S.J.** (1993). Apoptosis: suicide, execution or murder? *Trends Cell Biol.* 3: 141-144.
- Martin, S.J., Green, D.R. & Cotter, T.G.** (1994). Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery *TIBS* 19: 26-30.
- Mauch, C., Hatamochik, A., Scharffetter, K. & Krieg, T.** (1988). Regulation of collagen synthesis in fibroblast within a 3D collagen gel. *Exp. Cell Res.* 178: 493-503.
- Mayne, R., Brewton, R.G., Mayne, P.M. & Baker, J.R.** (1993). Isolation and characterization of the chains of type V/type XI collagen present in bovine vitreous. *J. Biol. Chem.* 268: 9381-9386.
- McCarthy, J.B., Vachhani, B. & Iida, J.** (1996). Cell adhesion to collagenous matrices. *Biopolymers (Peptide science)* 40: 371-381.
- Mc Clure, J., Bates, G.P., Rowston, H. & Grant, M.E.** (1988). A comparison of the morphological, histochemical and biochemical features of embryonic chick sternal chondrocytes in vivo with chondrocytes cultured in tridimensional collagen gels. *Bone Miner* 3: 235-247.
- Mello, M.L.S.** (1987). Nuclear cytochemistry and polarization microscopy of the spermatozoa of *Triatoma infestans* Klug. *Z. mikr. anat. Forsch* 101: 245-250.
- Mello, M.L.S.** (1997). Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. *Braz. J Genet* 20(2): 257-264.

- Mello, M.L.S. & Vidal, B.C.** (1973). Linear dichroism and anomalous dispersion of birefringence on bee sperm heads. *Acta Histochem.* 45: 109-114.
- Mello, M.L.S. & Vidal, B.C.** (1977). changes in anisotropic properties and nuclear stainability during spermatogenesis in the grasshopper *Staurorhectus longicornis* Giglio Toss. In: Adiyodi, K.G. & Adiyodi, R.G. (ed). *Advances in Invertebrate Reproduction*, Vol I. Kerala, Peralam-Kenoth, p.75-83.
- Mello, M.L.S & Vidal, B.C.** (1978). A reação de Feulgen. *Ciência e Cultura.* 30 (6): 665-676.
- Mello, M. L. S. & Vidal, B.C.** (1980). *Práticas de Biologia celular*. Ed. Edgard Blucher Ltda, São Paulo.
- Mello, M. L. S.** (1989). Nuclear fusion and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. *Rev. Bras. Genet.* 12: 485-498.
- Mello, M.L.S., Russo, J.** (1990). Image analysis of Feulgen-stained c-H-ras-transformed NIH/3T3 cells. *Biochem. Cell Biol.* 68: 1026-1031.
- Mello, M.L.S., Vidal, B.C., Dantas, M.M. & Monteiro, A.L.P.** (1993). Discrimination of the nucleolus by a critical electrolyte concentration method. *Acta Histochem. Cytochem.* 26: 1-3.
- Mello, M.L.S., Contente, S., Vidal, B.C., Planding, W., Schenck, U.** (1995a). Modulation of *ras* transformation affecting chromatin supraorganization as assessed by image analysis. *Exp. Cell Res.* 220: 374-382.
- Mello, M.L.S., Kubrusly, F.S., Randi, M.A. F., Rodrigues, V.L.C.C., Ferraz Filho, A.N.** (1995 b). Effect of heavy metals on chromatin supraorganization, nuclear phenotypes and survival of *Triatoma infestans*. *Entom. exp. appl.* 74: 209-218.
- Mello, M.L.S. & Falco, J.R.P.** (1996). Critical electrolyte concentration of DNA-protein complexes in spermatozoal and somatic cell nuclei of the honey bee *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 793-795.
- Mello, M.L.S., Vidal, B.C. & Maria, S.S.** (1998). *Morte celular*. Capítulo de livro em preparação.
- Meredith Jr., J.E., Fazeli, B. & Schwartz, M.A.** (1993). The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell.* 4: 953-961.

- Middelkoop, E., de Vries, H.J.C., Ruuls, I., Everts, V., Wildivuor, C. H.R. & westerhof, W.** (1995). Adherence, proliferation and collagen turnover by human seede into different types of collagen sponges. *Cell Tissue Res* 280: 447-453.
- Montgomery, A.M.P., Reisfeld, R.A. & Cheres, D.A.** (1994). Integrin $\alpha 5 \beta 3$ rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9: 8856-8860.
- Montesano, R., Orci, L., Vassalli, P.** (1983). In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J.Cell Biol.* 97: 1648-1652.
- Murray, J.C., Stingl, G., Kleinman, H.k., Martin, G.R. & Katz, S.I.** (1979). Epidermal cells adhere preferentially to type IV (basement membrane) collagen. *J. Cell. Biol.* 80, 197-202.
- Murray, D.** (1994). Cell cycle checkpoints. *Curr Opin. Cell Biol* 6 (6), 872-876.
- Nakagawa, S., Pawelek, P. & Grinnell, F.** (1989). Extracellular matrix organization modulates fibroblast growth and growth factor responsiveness. *Expt. Cell Res.* 182: 572-582.
- Nishiyama, T., Tsuninaga, M., Nakayama, Y., Adachi, E. & Hayashi, T.** (1989). Growth rate of human fibroblasts is repressed by the culture within reconstituted collagen matrix but not by the culture on the matrix. *Matrix* 9: 193-199.
- Nishiyama, T., Horii, I., Nakayama, Y., Ozawa, T. & Hayashi, T.** (1990). A distinct charaterisitic of the quiescent state of human dermal fibroblast in contracted collagen gel as revealed by no response to epidermal growth factor derme, but a positive growth response to a combination of the factor and saikosaponin b. *Matrix* 10: 412-419.
- Norris, W.D.; Steele, J.G.; Johson,G. & Underwood, P.A.** (1990). Serum enhancement of human endothelial cell attachment to and spreading on collagens I and IV does not require serum fibronectin or vitronectin. *J.Cell Sci.* 95, 255-262.

- O'Malley, J.P., Greenberg, I. & Salpeter, M.M.** (1996). The production of long-term rat muscle cell cultures on a matrigel substrate and the removal of fibroblast contamination by collagenase. *Methods in Cell Sci.* 18: 19-23.
- Oberhamer, F., Fritsch, G., Schmied, M. Pavelka, M. Printz, D., Purchio, D., Lassamann, H. & Schulte-Hermann.** (1993). Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. *J. Cell Sci.* 104: 317-326.
- Ormerod, E. J. & Rudland, P.S.** (1988). Mammary gland morphogenesis in vitro: extracellular requirements for the formation of tubules in collagen gels by a cloned rat mammary epithelial cell line. *In vitro* 24: 17-27.
- Otey, C.A & Burridge, K.** (1990). Patterning of the membrane cytoskeleton by the extracellular matrix. *Sem. Cell Biol.* 1: 391-399.
- Palma, P.C. R., Vidal, B.C; Ricetto, C.L.Z.; Herrman, V. & Netto Jr, N.R.** (1996). A propósito de um novo sling pubovaginal absorvível. Experiência inicial. *J. bras Ginec.* 106 (9) 335-339.
- Patel, T., Gores, J.G. & Kaufmann, S.H.** (1996) The role of proteases during apoptosis. *Faseb J.* 10: 587-597.
- Pelham Jr, R.J. & Wang, Y. L.** (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13661-13665.
- Petit, P.X., Susin, S.A., Zamzami, N., Mignotte, B. & Kroemer, G.** (1996). Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS L.* 396: 7-13.
- Postlethwaite, A. E.** (1978). Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II and III collagen-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75(2): 871-875.
- Pullan, S. Wilson, J. Metcalfe, A., Edwards, G.M., Goderdhan, N., Tilly, J. Hickman, J.A., Dive, C. & Streuli, C.H.** (1996). Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *J Cell Sci.* 109: 631-642.
- Raff, M. C.** (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400.

- Rehen, S.K., Varella, M.H., Freitas, F.G., Moraes, M.O. & Linden, R.** (1996). Contrasting effects of protein synthesis inhibition and of cyclic AMP on apoptosis in developing retina. *Development* 122: 1439-1448.
- Reichenberger, E. & Olsen, B.R.** (1996). Collagens as organizers of extracellular matrix morphogenesis. *Cell & Develop Biol* 7: 631-638.
- Reichardt, L.F.** (1993). Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins. Oxford University Press p. 3-11.
- Ricetto, C.L.Z.** Estudo anátomo-patológico de utilização experimental de colágeno bovino purificado na embolização da artéria renal. *Tese de Mestrado*. FCM UNICAMP, 1997.
- Roskelley, C. D., Subrow, A. & Bissell, M. J.** (1995). A hierarchy of ECM-mediated signalling regulates tissue-specific gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 (5): 736-747.
- Rubin, K., Oldberg, A., Hook, M. & Obrink, B.** (1978). Adhesion of rat hepatocytes to collagen. *Expl. Cell. Res.* 117: 165-177.
- Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M.D.** (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238: 491-497.
- Ruoslahti, E. & Reed, J.C.** (1994). Anchorage dependence, integrins and apoptosis. *Cell* 77: 477-478.
- Ruoslahti, E. & Obrink, B.** (1996). Common principles in cell adhesion. *Exp. Cell Res.* 227: 1-11.
- Ruoslahti, E.** (1997). Stretching is good for a cell.. *Science* 276: 1345-1346.
- Schor, S. L. & Court, M.** (1979). Different mechanisms in the attachment of cells to native and denatured collagen. *J. Cell Sci.* 38: 267-281.
- Schor, S. L.** (1980). Cell proliferation and migration on collagen substrata *in vitro*. *J. Cell Sci.* 41: 159-175.
- Schulze- Osthoff, K., Walczak, H., Droge, W. and Krammer, P.H.** (1994). Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol.* 127: 15-20.

- Singer, I.I.; Scott, S.; Kawka, D.W.; Kazazis, D.M.; Gailit, J. & Ruoslahti, E.** (1988). Cell surface distribution of fibronectin and vitronectin receptors depends on substrate composition and extracellular matrix accumulation. *J. Cell Biol.* 106: 2171-2182.
- Skinner, M.P., Raines, E.W. & Ross, R.** (1994). Dynamic expression of $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrin receptors by human vascular smooth muscle cells: $\alpha 2\beta 1$ integrins is required for chemotaxis across type I collagen-coated membranes. *Am. J. Pathol.* 145: 1070-1081.
- Strick, T.R., Allemand, J.-F., Bensimon, A & Croquette, V.** (1996). The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science* 27: 1835-1837.
- Sodja, C., Walker, P.R., Brown, D.L. & Chaly, N.** (1997). Unique behaviour of NuMa during heat-induced apoptosis of lymphocytes. *Biochem. cell Biol* 75: 399-414.
- Ucker, D. S.** (1991). Death by suicide: one way to go in mammalian cellular development. *New Biol.* 3: 103-109.
- Ucker, D.S., Obermiller, P.S., Eckhart, W., Apjar, J.R., Berger, N.A. & Meyers, J.** (1992). Genome digestion is a dispensible consequence of physiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 12: 3060-3069.
- Vanderburgh, H.H., Karlisch, P. & Parr, L.** (1988). Maintenance of highly contractile tissue-cultured avian skeletal myotubes in collagen gel *In Vitro* 24: 166-174.
- Van der Rest, M. & Garrone, R.** (1990). Collagens as multidomain protein. *Biochimie* 72: 473-484.
- Vidal, B. C.** (1966a). Periodontal biocybernetics. *R. Biol. Oral.* 4: 18-25.
- Vidal, B.C.** (1966 b). Macromolecular desorientation in dettached tendons. *Protoplasma Bd LXII/2-3*, 121-131.
- Vidal, B.C.** (1967). desorganização macromolecular dos feixes de colágeno sob a influência da histamina-estudo experimental. *Tese de Professor Titular.* Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

- Vidal, B.C.** (1989). Interações células- matriz extracelular: uma unidade estrutural e sistemática. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp I* (1), 33-40.
- Vidal, B.C.** (1990). Colágeno, uma proteína especial: medicina e biologia. Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins. 449-473.
- Vidal, B.C.** (1993). Cell and extracellular matrix interaction: a feedback theory based on molecular order recognition-adhesion events. *Revista Unicamp. IV*:1-11.
- Vidal, B.C.** (1995a). Crimp as part of a helical structure. *C.R Acad. Sci. Paris 318*: 173-178.
- Vidal, B.C.** (1995b). From collagen type I solution to fibers with a helical pattern a self-assembly phenomenon. *C. R. Acad. Sci. Paris 318*: 831-836.
- Vidal, B.C., Barbisan, L.F., Maria, S.S., Russo, J. & Mello, M.L.S.** (1996). Apoptosis: identification by a critical electrolyte concentration method *Apoptosis 1* :218-221.
- Vidal, B.C., Maria, S.S. & Klazco, L.B.** (1997). Concanavalin A-reactive nuclear matrix glycoprotein. *Braz J Genet. 20* (4): 631-638.
- Vidal, B.C.** (1997). Image analysis and definition of nuclear phenotypes. *Braz. J. Genet 20* (4): 749-754.
- Vlodavsky, I., Lui, G.M., Gospadowicz, D.** (1980). Morphological appearance, growth behavior and migratory activity of human tumor cells maintained on extracellular matrix versus plastic. *Cell 19*(3): 607-616.
- Wada, M.L.F. & Vidal, B.C.** (1991). Growth and differentiation of Vero cells cultivated in three dimensional type I collagen. *Cytobios 67*: 101-109.
- Watt, F.M.** (1986). The extracellular matrix and cell shape. *Tibs 11*, 482- 485.
- Wallet, F. Gérard, H., Martin, P.M., Dussert, C.** (1996). Toward a new method to in situ study of apoptosis and its relations with cell cycle. *Cytometry 25*: 263-270.
- Walker, P.R. & Siroska, M.** (1994). Endonuclease activities, chromatin structure and DNA degradation in apoptosis. *Biochem. Cell Biol. 72*: 615-623.

- Weaver, V. M., Fischer, A.H. & Bissell, M.J.** (1996). The importance of the microenvironment in breast cancer progression: recapitulation of mammary tumorigenesis using a unique human mammary epithelial cell model and a three-dimensional culture assay. *Biochem. Cell Biol* 74: 833-851.
- Werb, Z., Ashkenas, J., MacAuley, A. & Wiesen, J.F.** (1996). Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal epithelial interactions during mammary gland development, involution and carcinogenesis. *Braz. J. Med. Sci.* 29(9): 1087-1098.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R. & Currie, A.R.** (1980). Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-305.
- Wyllie, A., Morris, R., Smith, A. & Dunlop, D.** (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142: 67-77.
- Xu, J.; Zutter, M.M., Santoro, S.A. & Clark, R.A.F.** (1998). A three-dimensional collagen lattice activates NF- κ B in human fibroblasts: role in integrin α_2 gene expression and tissue remodeling. *J. Cell Biol.* 140 (3): 709-719.
- Xu, J. & Clark, R.A.F.** (1997). A 3D collagen lattice induces protein kinase C- ζ activity: role in α_2 integrin and collagenase mRNA expression. *J. Cell Biol.* 136: 473-483.
- Yang, J., Pitelka, D. & Nandi, S.** (1979). Sustained growth and 3D organization of primary mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gel *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3401-3405.
- Zamai, L., Falcieri, E., Marhefka, G., Vitale, M.** (1996). Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptotic cells in the absence of nucleosomal DNA fragmentation. *Cytometry* 23: 303-311.
- Zoller, J., Brandle, K. & Bereiter-Halm, J.** (1997). Cellular motility in vitro as revealed by scanning acoustic microscopy depends on cell-cell contact. *Cell Tissue Res.* 290: 403-415.
- Zuk, A.; Matlin, K. & Hay, E.D.** (1989). Type I collagen gel induces Madin-Darby canine kidney cells to become fusiform in shape and loose apical-basal polarity. *J. Cell Biol.* 108: 903-920.

Abaixo, encontram-se listados os trabalhos publicados e submetidos à publicação, realizados durante o período de Doutorado.

1. Apoptosis: identification by a critical electrolyte concentration method.
Vidal, B.C., Barbisan, L.F., **Maria, S.S.**, Russo, J. and Mello, M.L.S.
Apoptosis 1996; 1: 218-221.
2. Concanavalin A-reactive nuclear matrix protein
Vidal, B.C., **Maria, S.S.** and Klaczko, L.B.
Brazilian Journal of Genetics 1997; 20 (4): 631-638.
3. Cytochemistry and DNA amount determinations in BHK 21 cells under apoptosis.
Vidal, B.C. and **Maria, S.S.**
Celular and Molecular Genetics, junho de 1998. No prelo.
4. Critical electrolyte concentration of chicken erythrocyte chromatin
Falco, J. R. P., Mello, M. L. S., **Maria, S. S.** & Grazziotin, N.A.
Submetido à publicação
5. Delayed apoptosis in fibroblasts on hyperpolymerized collagen type I
Maria, S. S. and Vidal, B.C.
(manuscrito em preparação)
6. Image analysis of DNA fragmentation and losses in V79 cells under apoptosis.
Maria, S.S., Vidal, B.C. and Mello, M.L.S.
(manuscrito em preparação)
7. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 fibroblast cells.
Melo, P.S., **Maria, S.S.**, Vidal, B.C., Duran, N., Haun, M.
(manuscrito em preparação)
8. Capítulo de livro
Morte Celular
Mello, M.L.S., B.C. Vidal & **Maria, S.S.**
(em redação)