

Silvy Stuchi Maria

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

**Estudo comportamental da linhagem celular Vero quando
cultivada em substrato de gel de colágeno tipo I**

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

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Silvy Stuchi Maria
23
aprovada pela Comissão Julgadora. 09

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada

Campinas, 1994

*Dedico aos meus Pais,
Wilson e Vercy,
e a minha irmã Cris.*

Agradecimentos

A Profa. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada pela orientação e pelas críticas que de forma construtiva contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Edson Rosa Pimentel e Hernandes Faustino Carvalho pelas críticas e sugestões deste trabalho de tese e sobretudo por minha formação acadêmica.

A Profa. Dra. Christine Hackel pelas discussões e sugestões feitas na análise prévia deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Hernandes Faustino Carvalho e Mary Anne Heidi Dolder pela redação do Summary.

Ao Depto de Biologia Celular , ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Receptores Hormonais "Regina Pisani", ao Depto. de Histologia, ao Depto de Anatomia da Unicamp, pelo uso de equipamentos e drogas fornecidos para este trabalho.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos Profs. Drs. do Departamento de Biologia Celular, especialmente a Shirley Maria Recco Pimentel e Benedicto de Campos Vidal pelo incentivo à minha vida científica e pela forte amizade que criamos.

A todos os Profs. do IBILCE-UNESP, S.J.Rio Preto nas caríssimas pessoas dos Profs. Claudia Carareto e Sebastião Roberto Taboga por nossas discussões científicas que me fizeram enveredar por este caminho.

A Cidinha, Lilian, Klélia, Sidney, D. Irma , D. Maria, Mário, Chico e Sandra por todo o auxílio e pelo companheirismo.

Ao Marcelo D.L. Rossato pela ajuda na impressão à laser.

Aos queridos Pati e Marquinhos, Claudinha e Claudio Engler pelo uso do computador.

Aos amigos da Pós-graduação: Pati, Dani, Lu Bolsoni, Lino, Luís, Jeannie, Tatiana, Zé Ricardo, Flávia, Cris Bertachini, Cris Begnami, Fernando, Guido, Lucianne, Paula, Maria e Odair.

Aos "grandes": Dani, Pati, Lu, Ana Lúcia, Marquinhos, SebaKa, Márcio, Dri, Rô, Marcão, Ciro, Katita, Carla Andréa, Edson, Trolha, Fê, Zé Ricardo e Gustavo Maria por nossas melhores risadas que fazem da minha vida feliz.

Índice

Resumo	i
Summary	iii
Introdução.....	1
I- Material e métodos	10
I.1- Preparo do substrato	11
I.2- Manutenção das células em cultura.....	11
I.3- Coleta das amostras	12
I.4- Processamento do material.....	13
I.4.1-Fixação.....	13
I.4.2- Inclusão e corte.....	13
I.5-Colorações.....	13
I.5.1- Coloração com Hematoxilina-eosina.....	13
I.5.2- Coloração com azul de toluidina.....	14
I.5.3- Coloração com Xylidine ponceau	14
I.5.4- Coloração com P.A.S.....	14
I.6- Análise da contração do gel de colágeno tipo I pela linhagem celular Vero.....	15
I.7- Monitoramento das culturas, análise das lâminas e preparo de micrografias	15
II- Resultados.....	16
II.1- Aspectos do crescimento das células cultivadas sobre lamínulas.....	17
II.1.1- Análise morfológica do material corado com hematoxilina-eosina.....	17
II.1.2.- Análise citoquímica	18
II.1.2.1- Coloração com azul de toluidina pH 4,0	18
II.1.2.2- Coloração com Xylidine ponceau pH 2,5.....	19
II.1.2.3- Coloração com P.A.S.....	19

III.2- Aspectos do crescimento das células Vero cultivadas sobre gel de colágeno tipo I	20
III.2.1- Análise morfológica do material corado com Hematoxilina-eosina	20
III.2.2- Análise citoquímica	21
III.2.2.1- Coloração com Azul de toluidina pH 4,0	22
III.2.2.2- Coloração com Xylidine ponceau pH 2,5	23
III.2.2.3- Coloração com P.A.S.	24
III.3- Análise de contração do gel de colágeno tipo I pelas células Vero: efeito do soro fetal bovino	25
IV- Discussão	35
V- Conclusões	47
VI - Referências	48

RESUMO

O colágeno é amplamente utilizado como substrato para adesão e proliferação de células *in vitro*. Os substratos à base de colágeno podem ser preparados de formas variadas, podendo-se obter filmes secos de colágeno, gel flutuante ou estruturas tridimensionais. Diversos tipos celulares, quando cultivados em diferentes substratos de colágeno apresentam variações em suas características morfofisiológicas. Assim, não somente a presença de elementos da matriz extracelular mas também sua organização molecular são importantes para que as células expressem seu genótipo. Outro aspecto relevante sobre o comportamento das células durante a cultura é o fato de contraírem o gel de colágeno, tal como ocorre na derme em processos de cicatrização, fibroses e desenvolvimento do tecido conjuntivo. Em nosso trabalho, tivemos por objetivo estudar o padrão de crescimento e alterações morfofisiológicas de células Vero cultivadas sobre gel de colágeno tipo I. Amostras com 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de cultivo foram fixadas em Karnovsky e incluídas em Paraplast. Cortes de 5µm foram submetidos às colorações de Hematoxilina-eosina (HE), Azul de toluidina pH 4,0 (AT), Xilidine Ponceau (XP) e PAS. Num outro experimento, foram colhidas amostras com 1, 2, 3, 4 e 5 dias de cultura na ausência e presença de soro fetal bovino, tendo-se medido o diâmetro da face superior do gel, para quantificação da contração. Com 1 dia de cultivo, as células aderiram a superfície do gel e formaram uma monocamada, com morfologia inicialmente arredondada e posteriormente fibroblastóide, apresentando coloração nuclear intensa e citoplasma metacromático com AT, núcleo e citoplasma corados com XP e citoplasma corado com PAS. Após 5 dias de cultivo várias camadas de células fibroblastóides são observadas na superfície do gel. Alguns focos de infiltração são observados assim como numerosos grânulos metacromáticos que são depositados no interior do gel. Estes grânulos também se coravam pelo XP e

PAS. Nos tempos posteriores de incubação, a proliferação e infiltração para o interior do gel são mais proeminentes e o padrão de coloração pelos AT, XP e PAS foram mantidos. Aos 20 dias de cultivo o gel assemelha-se a um tecido conjuntivo frouxo, representado por uma grande população de células dispersas numa matriz tridimensional finamente fibrilar. Aos 25 dias de cultivo observou-se um aumento do pregueamento da superfície do gel e uma reorganização das fibras do gel de colágeno evidenciadas por XP, caracterizando o processo de contração causado pelas células Vero neste substrato. Neste tempo de cultivo, as células da superfície se apresentam com o mesmo padrão de coloração, porém as células que se infiltram no gel apresentam morfologia senescente caracterizada por fragmentação citoplasmática e picnose nuclear que podem ser observadas até 30 dias de cultivo. No experimento de contração, na presença de soro, as células Vero contraíram o gel cerca de 10% após 1 dia de cultivo. Após 5 dias foi observada uma contração de cerca de 50% , sempre em relação ao diâmetro do gel sem células. Na ausência de soro, com 1 dia de cultivo, as células contraíram o gel em cerca de 7% e aos 5 dias, apenas 15% do diâmetro superior do gel foi contraído. Nossos resultados demonstram que as células Vero aderem, proliferam e infiltram-se no substrato de colágeno, apresentando ao longo do cultivo, alterações na forma celular, caracterizando um processo de diferenciação induzido pelo substrato. As propriedades citoquímicas dos grânulos depositados entre as fibras de colágeno permitem sugerir que sejam compostos por glicoproteínas sulfatadas e/ou carboxiladas. Os resultados sugerem ainda que estes grânulos constituam-se de elementos da MEC produzidos e secretados pelas células. As células Vero são também capazes de contrair o gel de colágeno num mecanismo dependente da presença de soro fetal bovino.

SUMMARY

Collagen is widely employed as substratum for cell adhesion and proliferation. Collagen-based substrata may be prepared in different ways, as dry films, floating gel or three dimensional structures. Many cell types undergo morphophysiological alterations when placed on different collagen substrata. Not only the presence but also the organization of individual components of the extracellular matrix are important for cells to assume a given phenotype. Another aspect about the behavior of cultured cells is their ability to contract collagen gels, similarly to process occurrences in the dermis during wound healing, in fibrosis, and in connective tissue development. We have here studied the behavior of Vero cells grown on type I collagen gels. Samples were harvested after 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 days of incubation, fixed in Karnovsky's fixative and embedded in Paraplast Plus. Sections 5 μ m thick were obtained, dewaxed and stained with either hematoxinilin-eosin (HE), toluidine blue at pH 4,0 (AT), xyloidine ponceau (XP) or PAS. Parallel experiments were conducted to evaluate the effect of foetal bovine serum on the cell's ability to contract collagen gels. The cells first adhered to the gel surface and constitute a monolayer after 24 hours of culturing. The cells were initially rounded but became fibroblast-like and showed intense nuclear and cytoplasmatic metachromasy. Reactivity with XP was observed in the nuclei and cytoplasm and PAS-positive material accumulated in the cytoplasm. After 5 days, the cells were fibroblast-like and grew in multiple layers. Foci of cells invading the gel were observed at this time and numerous metachromatic granules were deposited in the gel. These granules were also XP and PAS positive. Longer periods of cell growth resulted in enhanced proliferation and invasion of the gel, but the staining characteristics were preserved. At 20 days, the cells occupied a large extension of the gel, which showed aspects of loose

connective tissue. On the 25th. day, the gel surface is highly folded and XP-stained collagen fibers were mostly aligned featuring the contraction of the gel by Vero cells. showing contraction of the gel by Vero cells. The cells inside the gel presented aspects of senescence, with cytoplasm fragmentation and nuclear picnosis. These aspects were also observed on the 30th.day. In the presence of serum, the cells contracted the gel in 10% and 50% of its previous length after 1 and 5 days, respectively. Without serum the values were 7% and 15% shorter, after 1 and 5 days, respectively. The results demonstrated that Vero cells adhere to, proliferate and invade collagen gels *in vitro* characterizes a substratum-induced differentiation process. The cytochemical characteristics of the granules entrapped in the gel indicate that they are constituted by sulphated and/or carboxylated extracellular glycoproteins produced and secreted by the cells. It was also shown that the contraction of the gel is a serum-dependent activity of Vero cells.

II - MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Preparo do substrato

Como substrato para o crescimento celular foram utilizadas partidas de gel de colágeno hidratado estéril, obtidas a partir de extração de colágeno tipo I de tendão de ratos Wistar adultos de ambos os sexos, segundo protocolo de SCHOR (1980).

Foram colocados 1,5 g de tendão em álcool 70% por 24 horas a 4°C. O material foi então transferido para 100 ml de ácido acético a 0,5N por 48 horas a 4°C. Centrifugou-se por 3 horas a 2000 g e o sobrenadante recolhido foi misturado com igual volume de NaCl a 20%. O precipitado formado foi recolhido para centrifugação a 2000 g por 3 horas e foi redissolvido em 100 ml de ácido acético 0,5 N. A solução foi dializada contra 10 vezes o volume de água destilada por 2 dias com 2 trocas diárias. Finalmente, a solução aquosa de colágeno foi novamente centrifugada a 2000 g por 24 horas de onde recolheu-se o sobrenadante. A absorbância da solução foi medida em 230 nm.

Para preparação do gel tridimensional de colágeno, utilizou-se 1,8 ml de solução de colágeno, 0,1 ml de meio EBSS (Microbiológica) 10 vezes concentrado e 0,1 ml de bicarbonato de sódio a 4,4% (SCHOR, 1980).

II.2. Manutenção das células em cultura

As células Vero foram adquiridas junto ao Instituto Adolfo Lutz (SP), na passagem 210 e foram cultivadas em frascos tipo xarope em meio Ham F-10 (Nutricell) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab). As células cresciam em monocamada, aderidas ao fundo do frasco de cultura, e assim que o tapete celular atingia a confluência eram efetivados os subcultivos. Para isso, os frascos de cultivo eram lavados e as células descoladas com solução de

tripsina 0,2% (Nutricell). Obtinha-se, assim, uma suspensão celular de onde alíquotas eram transferidas para novos frascos contendo meio fresco para continuidade do cultivo.

Para os estudos de crescimento sobre o gel de colágeno hidratado foi utilizado uma suspensão de células Vero com aproximadamente 100.000 células/ml. As células foram cultivadas sobre o gel de colágeno previamente preparado em frascos de penicilina estéreis.

Como controle foi efetuado o crescimento das células Vero sobre lamínulas em tubos de Leighton, utilizando-se o mesmo inóculo.

A contagem do número de células inoculadas foi efetuada utilizando-se hemocítmetro pelo método de exclusão com corante vital azul tripan.

Foram feitas trocas diárias do meio de cultura utilizado no cultivo das células sobre gel de colágeno e também das células cultivadas sobre lamínulas.

II.3. Coleta das amostras

Para análises morfológicas, ao nível de microscopia de luz foram colhidas amostras com 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de cultivo das células que foram mantidas sobre o gel de colágeno.

Das células que cresceram sobre lamínulas, foram coletadas as lamínulas com 1, 5, 10 e 15 dias, sendo que neste último tempo de cultivo as células já apresentavam sinais de degeneração e a cultura não prosseguiu.

Todos os experimentos foram efetuados em triplicata.

II.4. Processamento do material

II.4.1.- Fixação

As amostras de gel de colágeno onde foram cultivadas as células, assim como as lamínulas coletadas nos tempos citados, foram posteriormente fixadas em solução de Karnovsky (paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,1 M pH7,4, acrescido de glutaraldeído 2,5%) por 5 horas à temperatura ambiente e posteriormente lavadas em água corrente. (KARNOVSKY, 1965).

O gel foi preparado para inclusão e corte e as lamínulas foram secas ao ar e guardadas a temperatura ambiente.

II.4.2.- Inclusão e corte

Após a fixação, o gel de colágeno onde as células foram inoculadas, foi desidratado em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol, embebidos e incluídos em Paraplast. O material foi cortado em micrótomo R. Jung- Heidelberg com 5 µm de espessura.

II.5. Colorações

II.5.1.- Coloração com hematoxilina - eosina (HE)

Este método permite uma análise morfológica geral do material. Após desparafinização e hidratação o material foi corado por 10 minutos em hematoxilina, lavado em água corrente por 20 minutos, corado com eosina por 10 minutos, lavado rapidamente em água, desidratado em etanol, diafanizado em xilol e montado em Bálsamo do Canadá (BEHMER *et al.*, 1976).

II.5.2.- Coloração com Azul de Toluidina pH 4,0 (AT).

Após desparafinização e hidratação, o material foi corado em uma solução de azul de toluidina a 0,025% em tampão Mac Ilvaine pH 4,0 durante 15 minutos a temperatura ambiente, lavado rapidamente em água destilada, deixado secar ao ar, diafanizado em xilol e montado em Bálsamo do Canadá (MELLO & VIDAL, 1980). Este método presta-se para à detecção dos fenômenos de basofilia e de metacromasia.

II.5.3.- Coloração com Xylidine Ponceau pH 2,5 (XP)

Este método presta-se a detecção de radicais eletropositivos totais. O material após desidratação foi corado por uma solução de 0,1% de Xylidine Ponceau em ácido acético a 2% por 15 minutos, lavado em ácido acético 3% por 30 minutos, lavado em água destilada, desidratado em etanol, diafanizado em xilol e montado em Bálsamo do Canadá (MELLO & VIDAL, 1980-modificado).

II.5.4.- Coloração com PAS (Ácido periódico & Schiff)

Após a desparafinização e hidratação dos cortes, estes foram colocados numa solução de borohidreto de sódio a 1% por 30 minutos (com finalidade de bloquear os radicais aldeídos que por ventura possam ser provenientes da fixação), lavados rapidamente em água, imersos numa solução de ácido periódico a 0,5% por 8 minutos, lavados em água destilada por 40 minutos, corados com Reativo de Schiff por 15 minutos, passado por 3 banhos de água sulfurosa (metabissulfito de sódio : HCl 1 N: água destilada, 1:1:18) 5 minutos cada e lavados em água destilada. (Mello & Vidal, 1980).

Utiliza-se este método para a observação de polissacarídeos neutros e glicoproteínas.

II.6. Análise da contração do gel de colágeno tipo I por células Vero.

Para análise da contração do gel de colágeno tipo I, uma suspensão de 100.000 células/ml foi inoculada sobre o gel de colágeno que havia sido previamente preparado em frascos de penicilina estéreis. A manutenção das células foi feita utilizando-se meio HAM F-10 sem soro e meio HAM F-10 acrescido de 10% de soro fetal bovino, com trocas diárias. Como controle foi utilizado gel de colágeno sem células, incubado com os mesmos meios citados anteriormente. O material foi mantido em estufa a 37°C.

As amostras, em triplicata, de ambas situações experimentais foram coletadas com 24, 48, 72, 96 e 120 horas de cultivo. Assim que coletadas, o diâmetro superior do gel foi medido em milímetros com o uso de paquímetro. O diâmetro superior das amostras foi calculado a partir da média dos diâmetros das 3 amostras coletadas e normalizadas considerando-se a média padrão dos géis sem células como 100% (BELL *et al.*, 1978).

Os resultados foram analisados por análise de variância (Teste de Duncan de variáveis múltiplas). O nível de significância considerado foi de 5%.

II.7. Monitoramento das culturas, análise das lâminas e preparo de micrografias

As culturas celulares foram monitoradas em microscópio invertido Zeiss.

As lâminas foram observadas em fotomicroscópio Zeiss, acoplado a sistema fotográfico automático. Os filmes utilizados para documentação foram de marca Kodak- Gold-100, 135 mm.

III- RESULTADOS

III.1. Aspectos do crescimento das células cultivadas sobre lamínulas

III.1.1. Análise morfológica do material corado com H.E.

As células que cresceram sobre lamínulas, por 24 horas estavam aderidas e mostravam aspecto predominantemente poligonal com crescimento aleatório, sendo que em algumas regiões encontravam-se agrupadas e em outras isoladas (Prancha I, Fig.a). Os núcleos com cromatina frouxa e com 1 ou 2 nucléolos bem evidentes puderam ser evidenciados, além de células que apresentavam-se em divisão celular (P. I, Fig. a1)

Com 5 dias de cultivo as células já apresentavam a formação de um tapete sobre a lamínula. Observou-se a manutenção da forma poligonal. A presença de células em divisão observada nesta etapa demonstra ainda a existência de células em proliferação. As células apresentavam núcleo com cromatina frouxa e 1 ou 2 nucléolos bem evidentes (P.I, Fig b).

Aos 10 dias de cultivo, o tapete celular confluyente já apresentava sobreposição de camadas celulares em alguns locais e alguns espaços vazios deixados pelas células que descolaram. Com este tempo de cultivo observou-se células com cromatina frouxa e nucléolo evidente e outras células que apresentavam cromatina condensada e fragmentação nuclear, citoplasma muitas vezes vacuolizado e com forma irregular. Estes últimos aspectos caracterizam um processo de degeneração celular (P.I, Fig. c)

O material com 15 dias de cultivo apresentou todo o tapete celular descolado e as poucas células remanescentes apresentavam intensa vacuolização citoplasmática, morfologia nuclear alterada com picnose e fragmentação nuclear (P.I, Fig. d).

A partir de 15 dias de cultivo a cultura não prosseguiu devido ao fato das células terem descolado totalmente. Por este motivo, a coleta do material controle foi efetuado até este dia.

III.1.2. Análise citoquímica

III.2.1. Coloração com azul de toluidina pH 4,0

Da análise do material, ao longo dos dias de cultivo, corado com AT obteve-se respostas diferentes de basofilia (ortocromasia e metacromasia).

O material controle com 1 dia de cultivo apresentou citoplasma finamente granulado e metacromático, núcleo com um ou mais nucléolos intensamente corados em azul (P.II, Fig. a e a1).

Com 5 dias de cultivo os aspectos de basofilia e de basofilia metacromática são semelhantes aos obtidos com 1 dia de cultivo (P.II, Fig b e b1).

Aos 10 dias de cultivo, os núcleos e nucléolos apresentaram-se corados em azul esverdeado (ortocromáticos), e o citoplasma metacromático (P.II, Fig. c e c1).

Com 15 dias de cultivo observou-se núcleos em degeneração mais intensamente corados. Algumas células em degeneração, apresentavam núcleo e citoplasma metacromáticos. Os vacúolos presentes no citoplasma em todas as observações, não estiveram corados. Nas células que apresentavam núcleos com menor grau de fragmentação, estes eram metacromáticos e apresentavam nucléolos mais intensamente corados (P.II, Fig. d e d1).

III. 1.2.2. Coloração com Xylidine Ponceau pH 2,5

A análise do material controle com 24 horas de incubação mostrou células com citoplasma levemente corado, núcleo corado mais intensamente e nucléolo pouco corado na maioria das células. Em algumas células, porém, o nucléolo era bem evidente (P.III, Fig. a e a1).

Apesar da coloração do citoplasma e do núcleo ser semelhante ao observado após 24 horas, o nucléolo apareceu intensamente corado em todas as células com 5 dias de cultivo (P.III, Fig.b) e em alguns em grupos celulares com 10 e 15 dias de incubação (P.III, Figs c e d). Vacúolos citoplasmáticos em células com 10 e 15 dias de cultivo apresentavam-se não corados (P. III, Fig. c1 e d)

III.1.2.3. Coloração com PAS

No material com 24 horas de incubação observamos citoplasma com aspecto granular PAS positivo; núcleo não corado e nucléolo levemente corado, com aspecto homogêneo (P.IV, Fig.a e a1).

Com 5 dias de cultivo temos células com reatividade diferente ao PAS. Algumas células apresentavam citoplasma granular bem corado e em outras o citoplasma estava pouco corado. Nos dois tipos celulares, o núcleo e o nucléolo não apareceram corados (P.IV, Fig b).

Aos 10 dias de incubação observamos células com citoplasma pouco corado, ao lado de células com citoplasma fortemente reativo ao PAS com núcleo e nucléolo pouco evidente (P.IV, Fig. c e c1).

Após 15 dias de cultivo, as poucas células remanescentes apresentaram reatividade menor ao PAS (P.IV, Fig. d). Os vacúolos citoplasmáticos destas células não se apresentavam corados (P.IV, Fig. d1).

III.2. Aspectos do crescimento das células cultivadas sobre o gel de colágeno tipo I.

III.2.1- Análise morfológica do material corado com H. E.

A suspensão celular inoculada sobre o substrato colagênico com um dia de cultivo, apresentou-se sobre a superfície do gel formando uma monocamada de células com morfologia predominantemente alongada, sendo que algumas células apresentaram formas arredondadas. Núcleos acompanhando a forma das células e apresentando cromatina bem corada foram observados (P.V, Fig. a).

Aos 5 dias de cultivo observou-se regiões com estratificação devido a proliferação celular. A morfologia agora observada é principalmente arredondada com núcleos bem evidentes. As células da camada mais superficial apresentavam predominância do aspecto fibroblastóide. Algumas células multinucleadas foram observadas. Neste tempo de cultivo a superfície do gel se contraiu formando algumas dobras. Nestas dobras, mesmo as células mais superficiais tinham formas arredondadas. Observou-se grande número de divisões celulares, algumas células apresentavam núcleos com formas irregulares e outras apresentavam o citoplasma finamente granulado (P.V, Fig.b). Alguns pontos de migração celular para o interior do gel foram observados.

A manutenção de uma camada celular, com morfologia fibroblastóide, na parte mais superficial do gel foi observado aos 10 dias de cultivo. As células que migravam para o interior do gel apresentavam formas mais arredondadas,

citoplasma vacuolizado e núcleos com formas irregulares(P.V, Fig. c). A deposição de material granular no interior do gel foi observada. Alguns desses grânulos se coram pela hematoxilina e outros pela eosina. Esses últimos se assemelham a fragmentados citoplasmáticos (P.V, Fig. c).

A manutenção da forma tipo fibroblastóide das células que estão na superfície do gel foi observada nas amostras subsequentes, porém o grau de migração celular aumentou progressivamente de acordo com os dias de cultivo e atingindo grau máximo de migração no 20º dia (P.V, Figs. d , e, e1). Devido a penetração e migração das células no interior do substrato colagênico, no 20º dia de cultivo observou-se uma formação muito semelhante a uma estrutura de tecido conjuntivo frouxo(P.V, Figs. e, e1). Com a contração do gel e seu descolamento do frasco de cultura, ficando desta forma flutuante, as células superficiais migraram e recobriram a superfície inferior do gel (P.V, Figs e, f), o que diferiu dos primeiros dias de cultivo onde apenas a superfície superior do gel apresentou-se recoberta por células.

Poucas diferenças ocorreram nos tempos de 25 e 30 dias de cultivo. Um grande número de regiões de penetração celular foi observado e as células apresentavam formas irregulares com núcleos também irregulares, porém aos 30 dias de cultivo uma grande quantidade de material corado levemente com eosina foi observado por todo o substrato (PV, Fig. f, f1, f2 e g)

As células que se apresentavam com núcleos com cromatina bem corada e citoplasma bastante vacuolizado (P.V, Figs. f1, f2, g) são muito semelhantes às células em degeneração observadas no material controle com 15 dias de cultivo (P.I, Fig. d).

O gel sem o inóculo celular mostrou aspecto homogêneo levemente corado com eosina .

III.2.2- Análise citoquímica

III.2.2.1. Reação com azul de toluidina pH 4,0

As células Vero cultivadas sobre o substrato colagênico após 24 horas de cultivo e que foram coradas com azul de toluidina pH 4,0 mostraram citoplasma levemente metacromático (violáceos). Algumas destas células apresentavam núcleos intensa e homogeneamente corados em azul, outras com menor frequência, apresentavam núcleos ortocromáticos (corados em verde), e nucléolos bem evidentes. O gel não estava corado (P.VI, Fig. a).

Aos 5 dias de cultivo, as células que recobrem a superfície do gel se apresentaram com núcleos e citoplasma intensamente corados e metacromáticos e as células que proliferaram e penetraram no gel em alguns pontos apresentaram núcleos intensamente corados ou ortocromáticos e citoplasma metacromáticos. Foram observadas granulações metacromáticas que se depositavam na matriz colagênica (P. VI, Fig.b e b1).

Aos 10, 15, 20, 25 e 30 dias de cultivo (P.VI, Figs. c, d, e, f, g) as células que recobriam a camada superior do gel apresentaram citoplasma metacromático e núcleo mais intensamente corado, enquanto as células que penetraram para o interior do gel apresentaram o mesmo aspecto das células da superfície com relação a coloração. A forma destas células é bem variada e irregular, assim como a dos núcleos. Os nucléolos não eram evidentes.

Alguns grânulos que foram observados depositados na matriz e os grânulos presentes no citoplasma das células apresentavam metacromasia (P. VI, Figs e1 e f1).

Nas regiões em que não houve penetração no gel as células apresentaram-se com citoplasma metacromático, núcleo intensamente corado com forma regular e nucléolo bem evidente. Nestas regiões estavam presentes 3 ou 4 camadas celulares que se mantiveram durante o cultivo.

Em todos os tempos de cultivo, o gel de colágeno inoculado com células mostrou-se não corado nas regiões onde não havia infiltração celular (P.VI, Figs. a, b, c, d, e, f e g). O gel controle, também, não apresentou coloração pelo A.T.

III.2.2.2 Coloração com Xylidine ponceau pH 2,5

Com 24 horas de cultivo, o material exibiu a matriz colagênica levemente corada, as células que recobriam a superfície do gel apresentaram citoplasma menos corado e núcleo mais intensamente corado. As fibras de colágeno do gel se dispunham paralelamente à superfície do gel (P.VII, Fig.a e a1).

Aos 5 dias de cultivo, as células que estavam na superfície do gel e as que migraram para o interior do gel ainda apresentavam núcleos intensamente corado e citoplasma menos corado. Observaram-se grânulos tanto na matriz colagênica como no citoplasma das células corados pelo XP. O gel logo abaixo das camadas celulares estava mais corado do que com 24 horas e as fibras de colágeno estavam dispostas com orientação perpendicular à superfície do gel, portanto, com uma orientação diferente a que ocorreu, com 24 horas de cultivo (P.VII, Fig. b).

Aos 10, 15 e 20 dias de cultivo, as células apresentaram a mesma coloração de núcleo e citoplasma já citada para os tempos anteriores, porém com este tempo de cultivo observamos células com citoplasma bastante granular e grânulos depositados na matriz corados (P.VII, Figs. c, d e e).

Aos 25 dias de cultivo, observaram-se as células coradas pelo XP tal como descrita para os outros tempos. O gel de colágeno mostrava uma coloração mais intensa próxima às regiões onde as células recobriam as superfícies que se mostravam com dobra (P.VII., Fig. f e f1).

Aos 30 dias de cultivo, os núcleos estavam intensamente corados e os citoplasmas levemente corado com vacúolos não corados. A matriz colagênica, entre as células, se mostrou levemente corada pelo XP (P.VII, Fig.g). Pequenos grânulos observados próximas as células que migraram para o interior do gel são também positivos ao XP

III.2.2.3. Coloração com PAS

Com um dia de cultivo as células Vero coradas com PAS exibiram núcleo pouco corado e citoplasma intensamente corado. A matriz colagênica se mostrou levemente corada(P.VIII, Figs.a e a1).

Aos 5 e 10 dias de cultivo as células mostraram colorações semelhantes àquelas observadas as 24 horas de cultivo, entretanto, algumas células exibiram núcleos PAS negativos (P.VIII, Fig.b). Alguns grânulos que se encontravam entre as células nestes tempos eram PAS positivos.

Aos 15 e 20 dias de cultivo notou-se a presença de um grande volume de material depositado entre as células que era reativo ao PAS (P.VIII, Figs. c e d). As células aos 20 e 25 dias de cultivo apresentaram vesículas citoplasmáticas coradas pelo PAS. Aos 25 dias observou-se uma intensa coloração do gel de colágeno nas proximidades das camadas superficiais e ao longo dos locais para onde as células migraram (P.VIII, Fig. e, e1, f, f1).

Aos 30 dias de cultivo observou-se que as células que se encontravam nas camadas superficiais do gel apresentaram citoplasma corado pelo PAS e núcleos mantendo o mesmo padrão de coloração observado nos outros tempos. Algumas células que se encontravam isoladas na matriz colagênica se mostravam com núcleo PAS negativo e citoplasma PAS positivo. O gel de colágeno e os grânulos depositados na matriz mostraram-se levemente corados (P.VIII, Fig.g).

III.3. Análise da contração do gel de colágeno tipo I pelas células Vero: efeito do soro fetal bovino.

Duas condições de cultura foram empregadas para analisar o efeito da contração no gel de colágeno gerada pelas células Vero. Numas delas, onde foi utilizado meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino, observou-se maior contração quando comparado à outra condição na qual o soro fetal bovino não foi acrescido ao meio. Como padrão utilizou-se gel de colágeno sem células .

No meio contendo soro fetal bovino o diâmetro inicial do gel foi reduzido cerca de 10% em 24 horas, seguiu-se por 28% de redução em 48 e 72 horas, 36% em 96 horas e 48% em 120 horas de cultivo.

O gel de colágeno mostrou-se muito menos contraído na ausência de S.F.B. apresentando 7% de redução do diâmetro inicial em 24 horas, seguindo-se por 8% em 48 horas, 12% em 72 e 96 horas e atingindo 15% em 120 horas de cultivo.

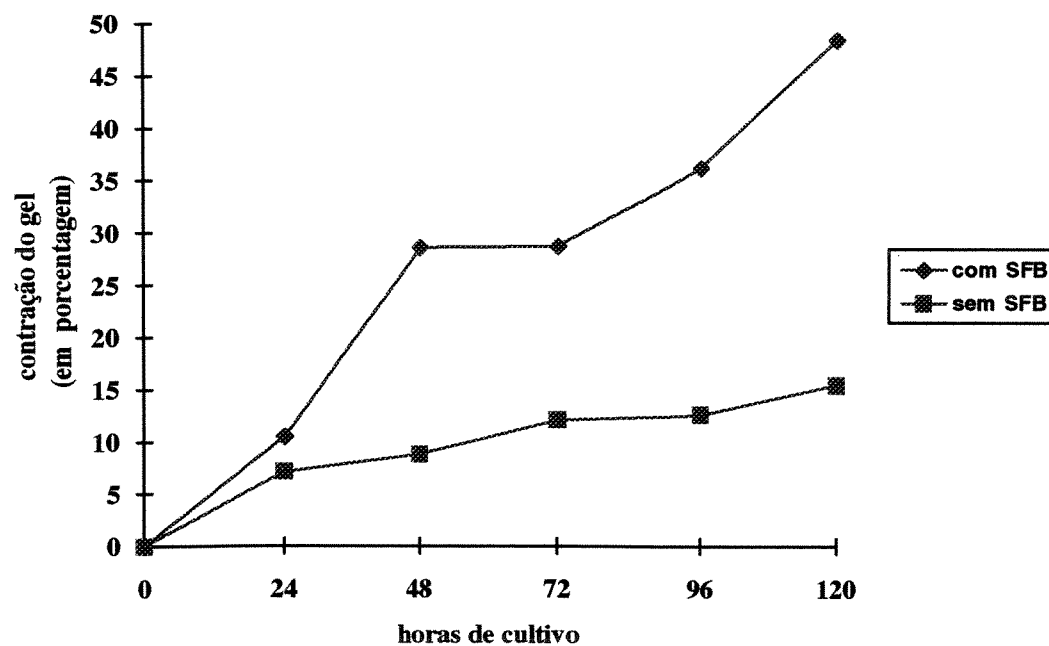
Os dados relativos à contração do gel de colágeno estão expressos na tabela I e no gráfico I.

Tabela I. Valores da contração do gel de colágeno I pelas células Vero em diferentes tempos de cultivo.

Tempo de cultivo (h)	X $\pm$ S (mm) com SFB	% com SFB	X $\pm$ S (mm) sem SFB	% sem SFB
24	17,4 $\pm$ 0,2	10,5	18,0 $\pm$ 0,6	7,1
48	13,9 $\pm$ 1,4	28,6	17,7 $\pm$ 1,1	8,8
72	13,9 $\pm$ 3,6	28,7	17,1 $\pm$ 0,1	12,0
96	12,4 $\pm$ 0,5	36,2	17,0 $\pm$ 0,7	12,6
120	10,0 $\pm$ 0,1	48,4	16,4 $\pm$ 0,2	15,5

Gel sem células	19,5 $\pm$ 0,9
-----------------	----------------

Gráfico I. Contração da superfície do gel de colágeno na presença e ausência de SFB em diferentes tempos de cultivo.



Prancha I- Aspecto geral das células Vero cultivadas sobre lamínula em tubos de Leighton. Coloração com hematoxilina-eosina.

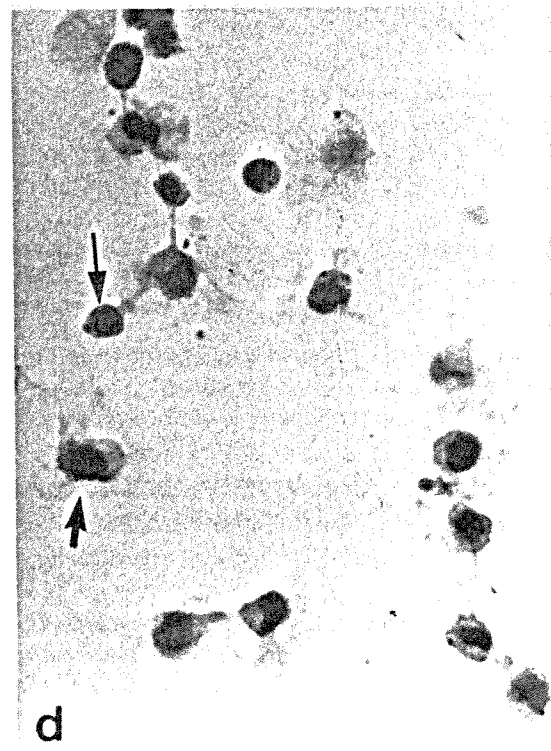
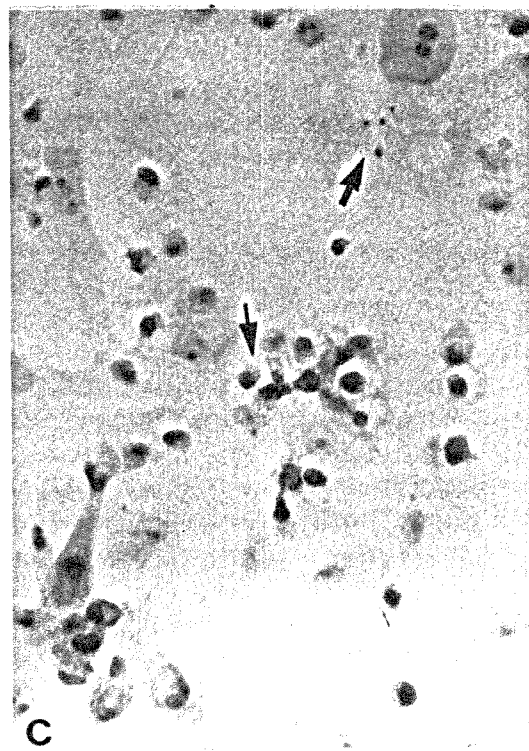
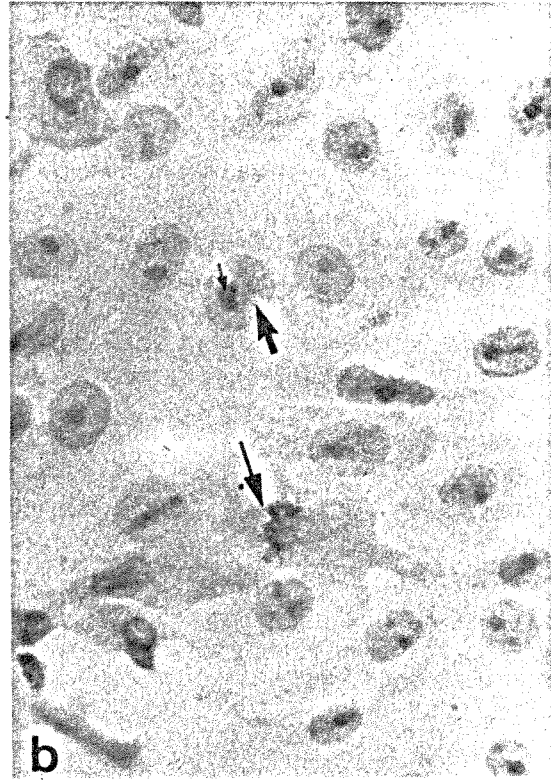
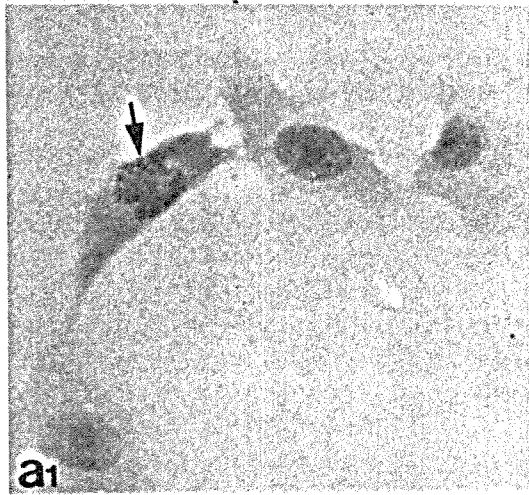
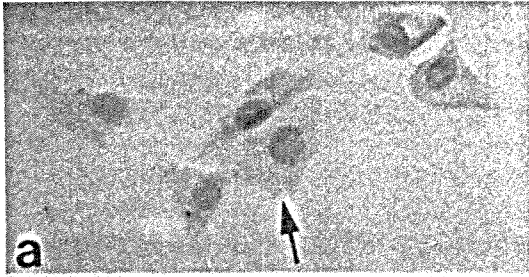
Fig.a.Cultura com 24 horas de incubação, presença de células com aspecto poligonal (→). 320 vezes.

Fig.a1.Aumento maior das célula Vero com 24h de cultivo. Pode-se observar células em divisão (→). 640 vezes.

Fig.b.Cultura com 5 dias de incubação, início da formação do tapete celular. Células em divisão (→). As células apresentam núcleo com cromatina frouxa (→) e nucléolos evidente (→) 640 vezes.

Fig.c.Cultura com 10 dias de cultivo, tapete celular confluyente já com descolamento celular. Observam-se células com citoplasma vacuolizado (→) e células em degeneração (→). 640 vezes.

Fig.d.Cultura com 15 de incubação.Células em degeneração apresentam alterações citoplasmáticas (→) e nucleares (→).640 vezes.



Prancha II. Células Vero cultivadas em lamínulas coradas com azul de toluidina pH 4,0.

Fig.a.Aspecto geral do material com 1 dia de cultivo. Citoplasma (c), núcleo (→) e nucléolo(→).apresentam-se corados. 320 X.

Fig.a1.Células com citoplasma metacromático e núcleos com nucléolos bem evidentes(→). 1280X.

Fig.b.Material com 5 dias de cultivo.Podemos observar o tapete celular já confluyente mas ainda com células em divisão (→). 320 x.

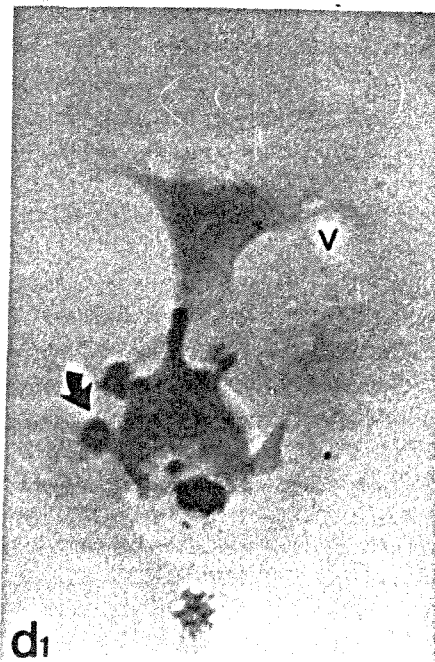
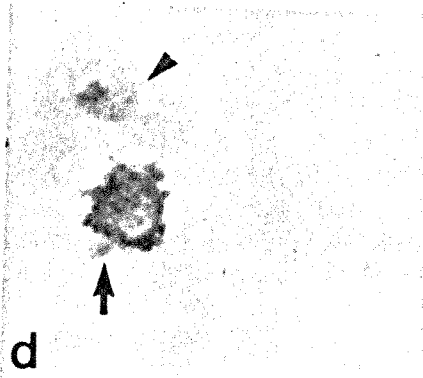
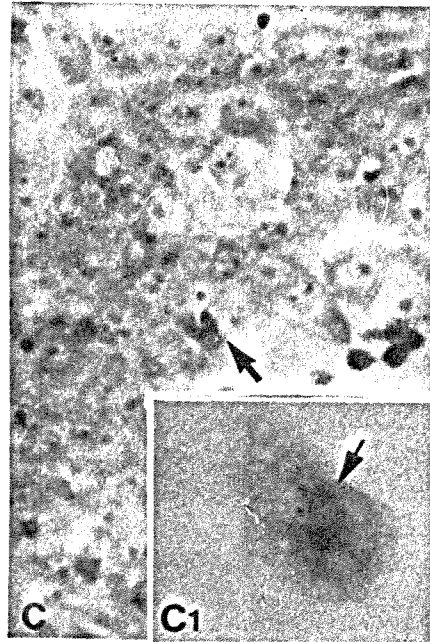
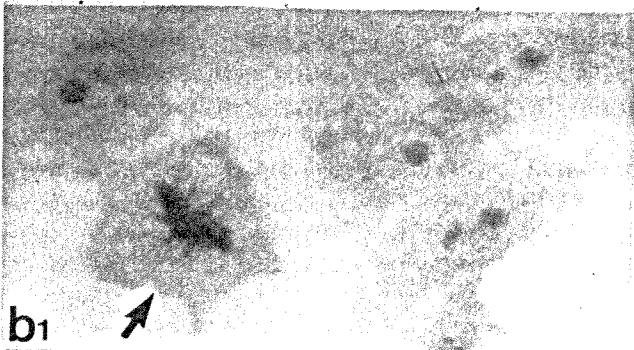
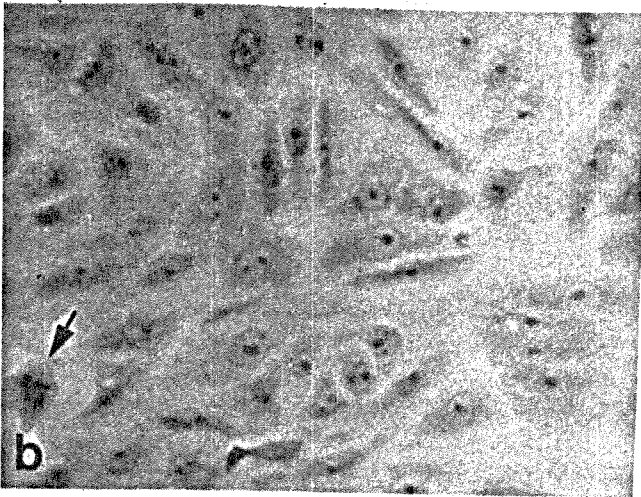
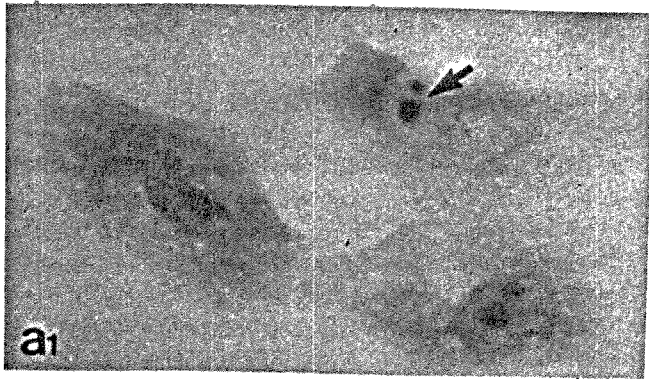
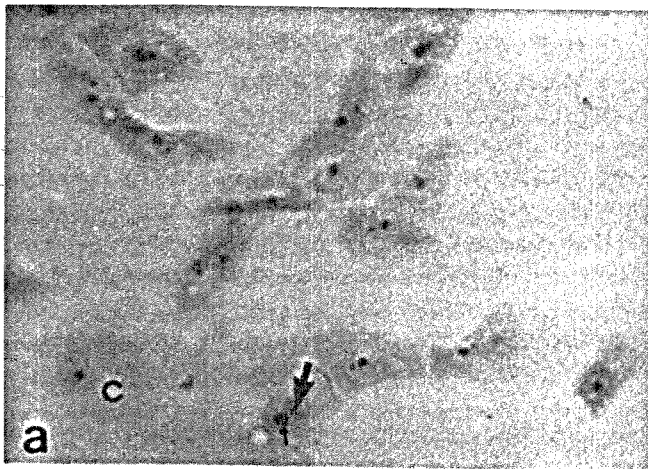
Fig.b1.Célula em divisão (→).1280 x.

Fig.c.Material com 10 dias de cultivo.Células com citoplasma metacromático com núcleos ortocromáticos e nucléolos ortocromáticos (→) 320 x.

Fig.c1.Célula com núcleo ortocromático (→). 1280 x.

Fig.d.Material com 15 dias de cultivo. Célula em degeneração com núcleo e citoplasma metacromático (►). Célula com citoplasma reduzido e vesiculado intimamente associado ao núcleo (→). 1280 x.

Fig.d1.Célula em degeneração com núcleo fragmentado (➡) e com vacuolização citoplasmática (v). 1280 x.



Prancha III- Células cultivadas sobre lamínula e coradas com Xylidine Ponceau pH 2,5.

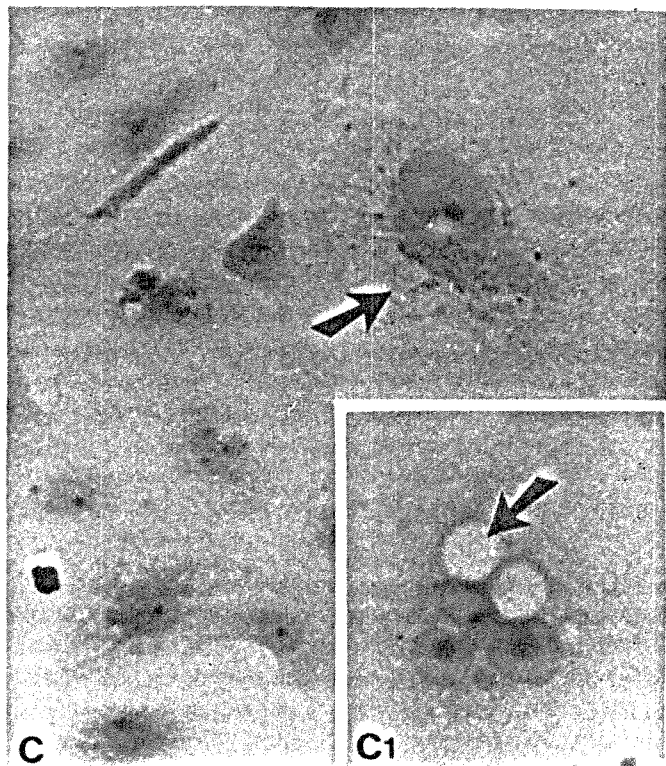
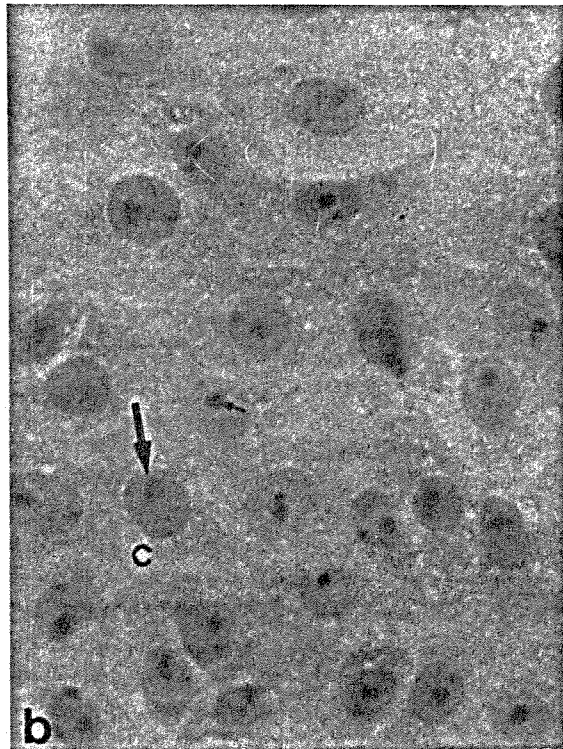
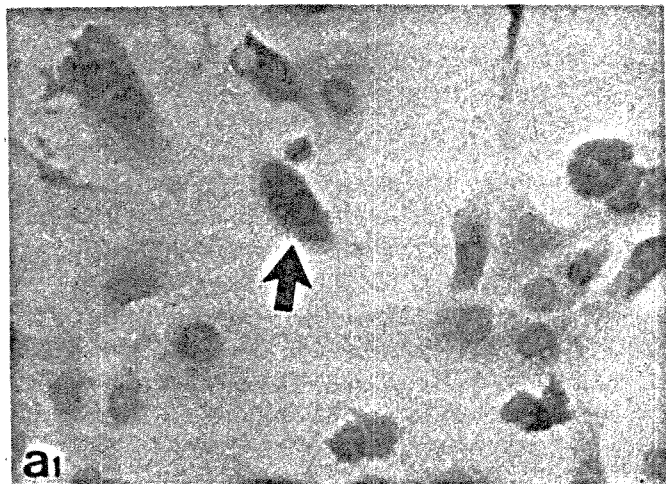
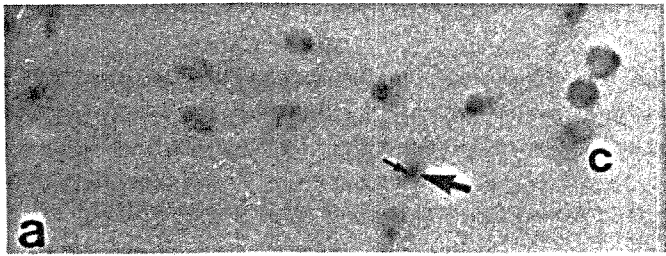
Fig.a. Aspectos gerais de células com 24 horas de cultivo celular. Citoplasma pouco evidente de difícil visualização (C), núcleo (→) e nucléolo (→) 160x.

Fig.a1. Células com citoplasma corado e núcleo intensamente corado (→).

Fig.b. 5 dias de cultivo. Aspecto geral do tapete celular formado. Citoplasma (C), núcleo (→) e nucléolo (→). 640 x.

Fig.c e c1. 10 dias de cultivo. As células que não descolaram do tapete apresentam citoplasma vacuolizado (→). 1280 x.

Figs.d. 15 dias de cultivo. Células em degeneração com citoplasma vacuolizado levemente corado (→) nucléolos intensamente corados e aparentemente fragmentado (→). 1280 x.



Prancha IV. Células cultivadas sobre lamínula coradas com PAS.

Fig.a e a1. Células com 1 dia de cultivo apresentam citoplasma finamente granular corado intensamente com PAS (C). Núcleos PAS negativos(→) e nucléolos levemente corados(→). **a**= 320 e **a1**= 640 x

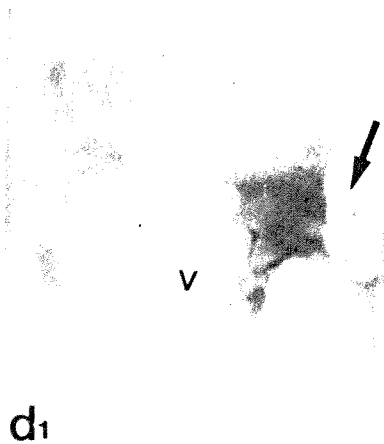
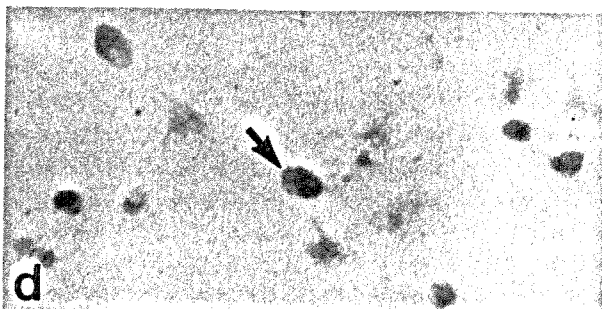
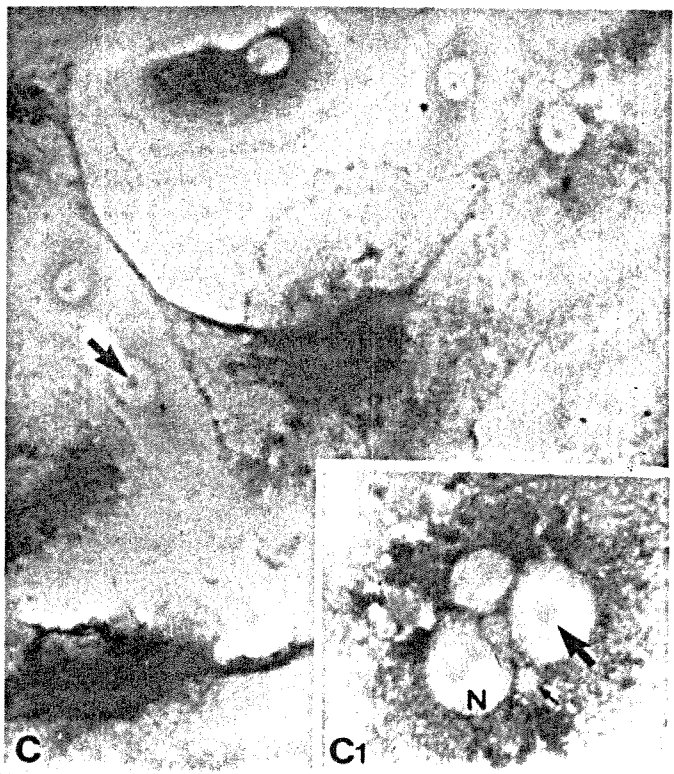
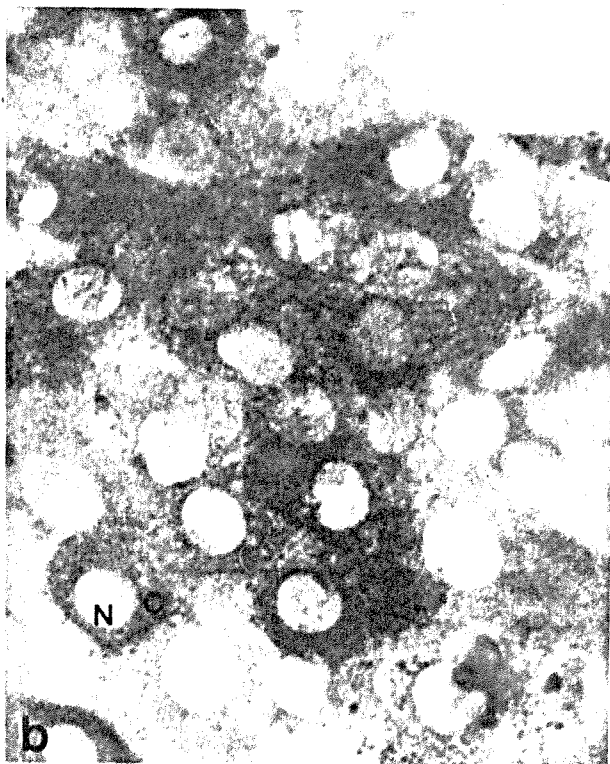
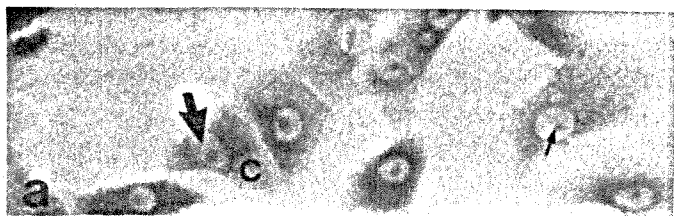
Fig.b.5 dias de cultivo. As células apresentam citoplasma granular intensamente corado (C) e núcleos e nucléolos não corados (N). 640 x.

Fig.c.10 dias de cultivo celular. As células em início de degeneração com citoplasma intensamente corado (C), e nucléolos levemente corados (→).320 x.

Fig.c.1.Célula multinucleada com citoplasma intensamente vacuolizado. Um dos núcleos é apontado por (N) e nucléolos (→) e material PAS positivo (→) 640x.

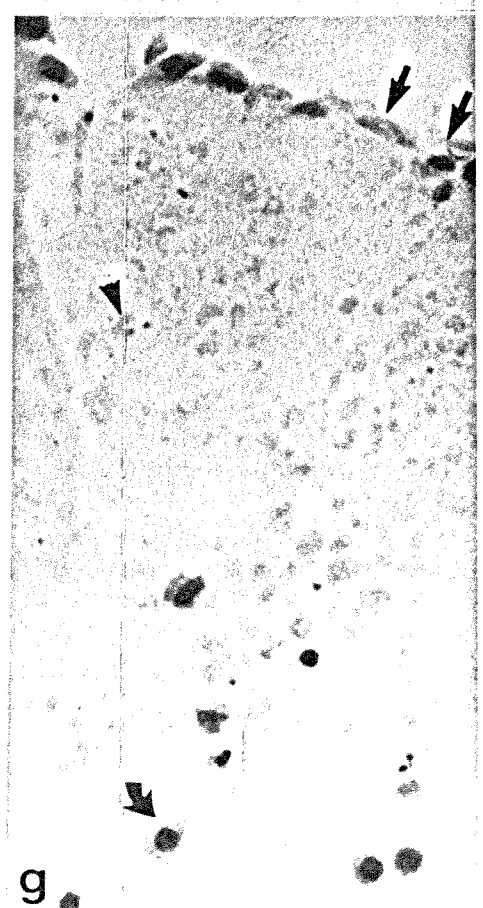
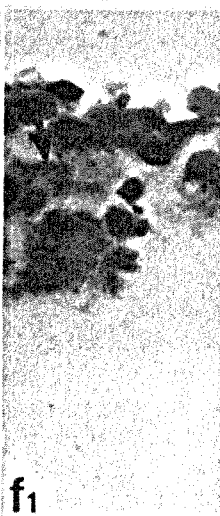
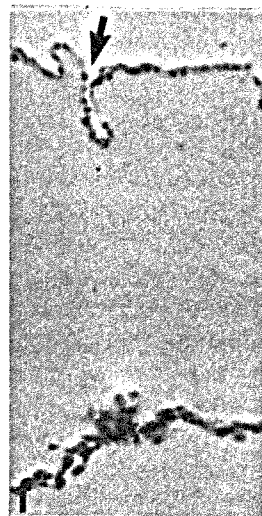
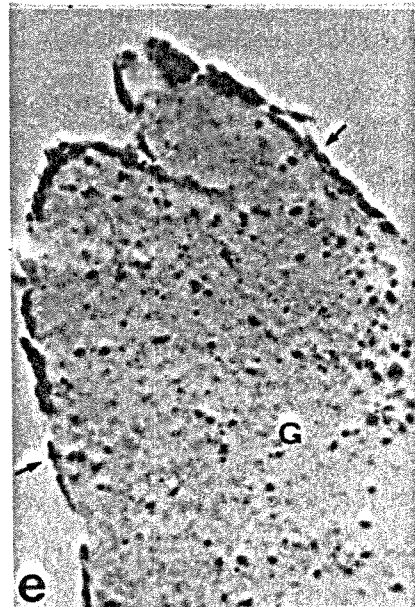
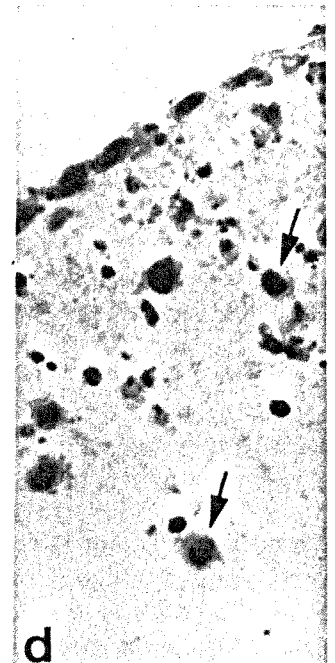
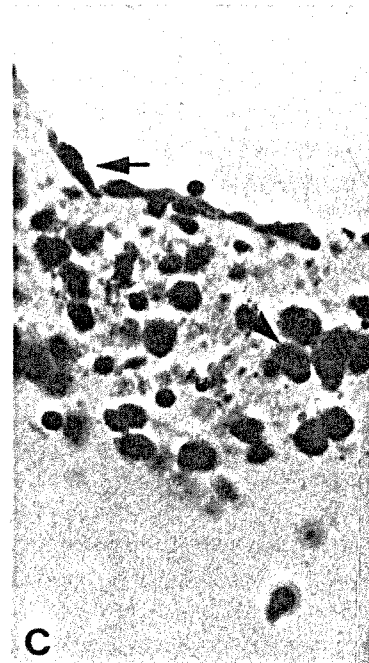
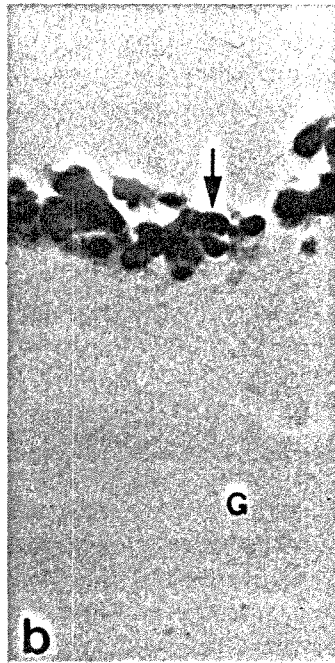
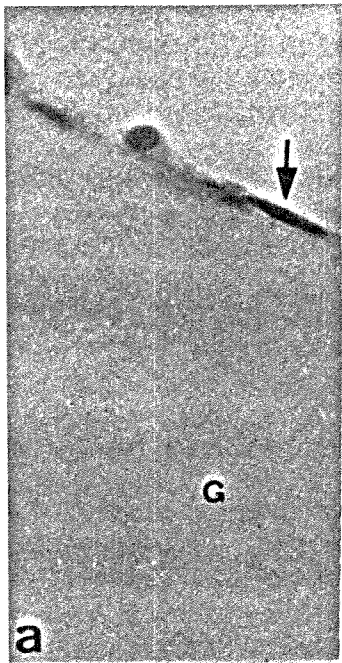
Fig.d.15 dias de cultivo. Células remanescentes coradas com menor intensidade(→) 160 x.

Fig.d1.Aspectos de uma célula remanescente aos 15 dias de cultura. Notar a grande vacuolização citoplasmática (V) demonstrando a degeneração celular neste tempo. 1280 x.



Prancha V- Aspecto geral das células Vero cultivadas sobre o gel de colágeno. Coloração com hematoxilina-eosina.

- Fig.a.** Células Vero cultivadas em gel de colágeno tipo I coletadas com 24 horas de cultivo. Morfologia celular predominantemente alongada (→) e gel com aspecto homogêneo (G). 640 x.
- Fig.b.** Material coletado com 5 dias de cultivo. Células arredondadas e núcleos bem evidentes (→) em início de estratificação celular. Gel com aspecto homogêneo (G) 640 x.
- Fig.c.** 10 dias de cultivo celular. Migração celular para o interior do gel (→). A forma celular predominante sobre a superfície do gel é do tipo fibroblasto (→) 640 x.
- Fig.d.** 15 dias de cultivo celular. Células no interior do gel apresentando citoplasma vacuolizado e núcleo com forma irregular (→). 640 x.
- Fig.e.** 20 dias de cultivo celular. Recobrimento da superfície superior e inferior do gel (→) e grande penetração das células para o interior do gel (G). 160 x.
- Fig.e1.** Aumento maior das células cultivadas com 20 dias de cultivo, mostrando a deposição de material na matriz colagênica (→). 640 x.
- Fig.f** 25 dias de cultivo celular. Pregueamento da superfície indicando a contração do gel (→). 160 x.
- Fig.f1.** Grânulos depositados no interior do gel (). 640 x.
- Fig.f2.** Células revestindo as pregas da superfície colagênica (→). 640 x.
- Fig.g.** 30 dias de cultivo celular. Monocamada celular circundando a matriz colagênica (→). Deposição de material levemente corado pela eosina (→). Acentuado grau de migração celular (↔). 640 x.



Prancha VI. Células Vero cultivadas sobre o gel de colágeno tipo I coradas com azul de toluidina pH 4,0.

Fig.a. Material coletado com 1 dia de cultivo celular. As células apresentavam citoplasma levemente metacromático, núcleos basófilos (➡) e gel não corado (G). 640 x.

Fig.b. Material coletado com 5 dias de cultivo celular. Granulações metacromáticas depositadas na matriz colagênica podem ser observadas (➡). 640 x.

Fig.b1. Várias camadas de células com citoplasma levemente metacromático e núcleos intensamente corados podem ser observados (➡). 1280 x.

Fig.c. Material coletado com 10 dias de cultivo celular. Células com citoplasma metacromático e núcleo basófilo (➡). Região de penetração celular no gel (➡). 640 x.

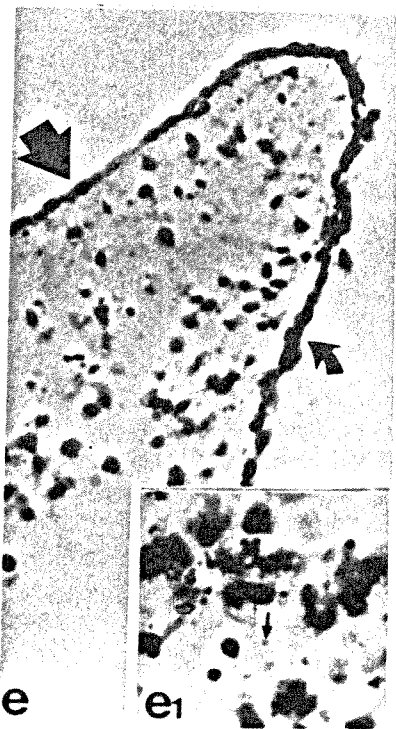
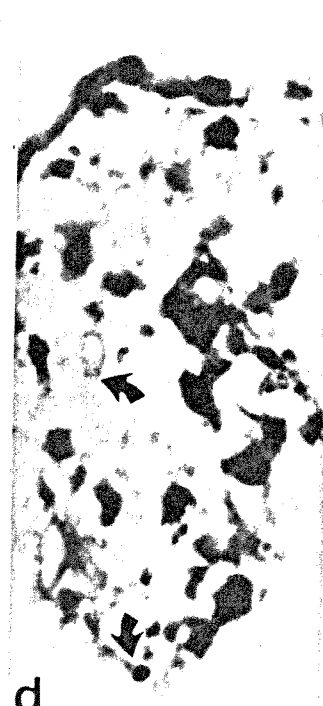
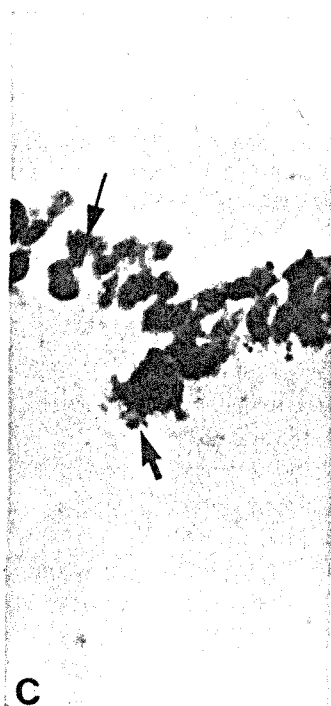
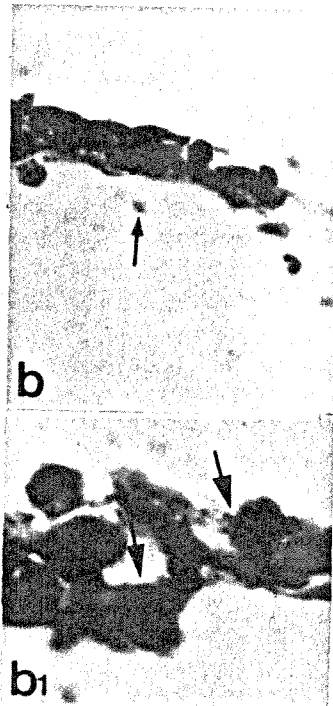
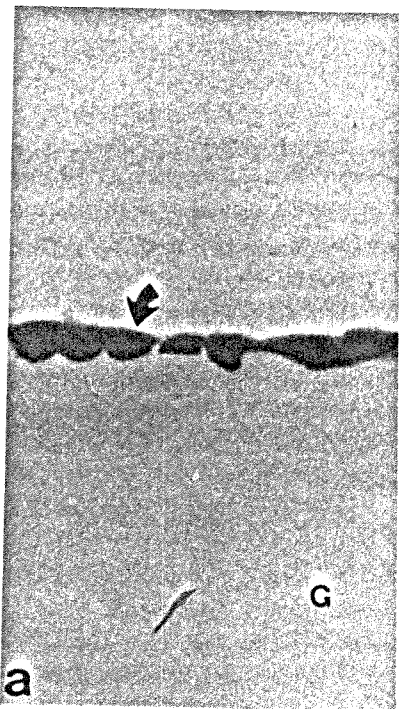
Fig.d. Material coletado aos 15 dias de cultivo celular. As células que penetraram para o interior do gel apresentavam os mesmos padrões de coloração dos outros tempos. Material depositado no interior se mostra metacromático. (➡). 640 x.

Fig.e. 20 dias de cultivo celular. Células das superfícies superior (➡) e inferior do gel (➡) apresentavam citoplasma metacromático e núcleo basófilo. 320 x.

Fig.e1. Células no interior do gel de colágeno com 20 dias de cultura, granulações metacromáticas na matriz evidentes (➡) 640 x.

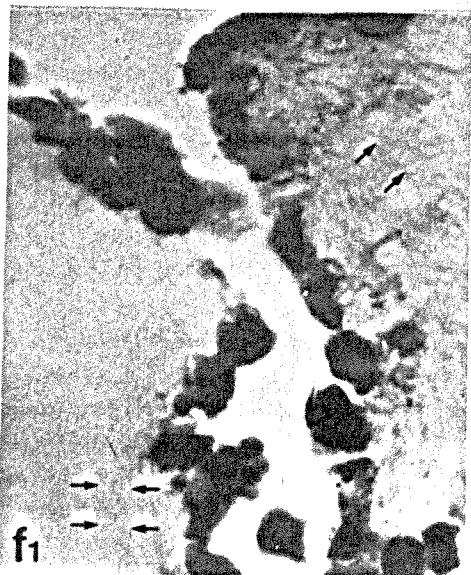
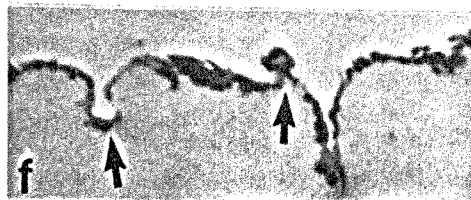
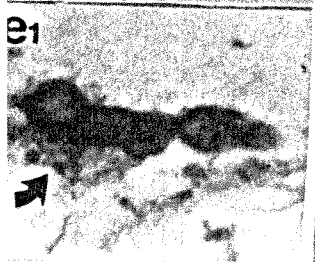
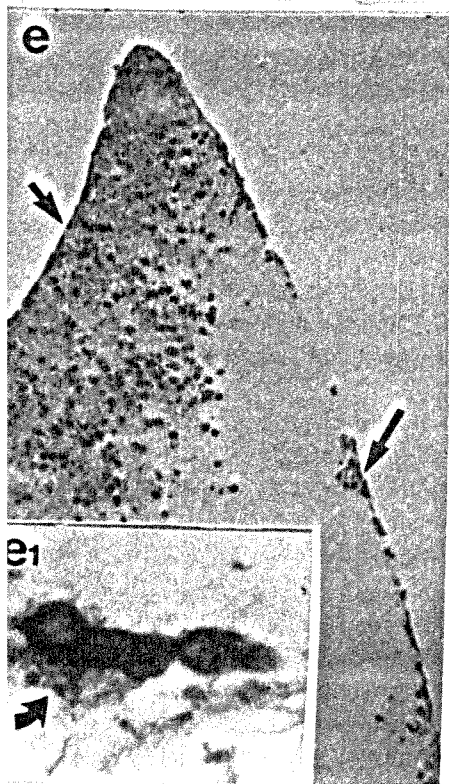
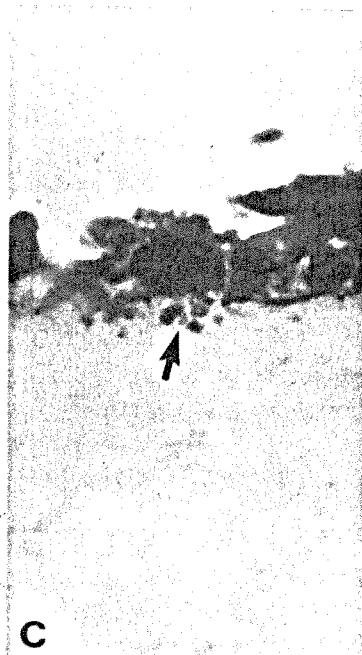
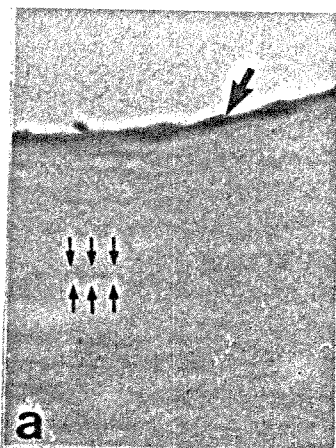
Figs.f e f1. 25 dias de cultivo celular. Células arredondadas na superfície do gel que se apresentava contraída (➡). As células do interior do gel apresentam-se com citoplasma vacuolizado metacromático (➡) e núcleos basófilos (➡). f= 320 x e f1= 1280 x.

Fig. g. Aspecto geral das células com 30 dias de cultivo. Manutenção do padrão de coloração do citoplasma e núcleo (➡). 1280 x.



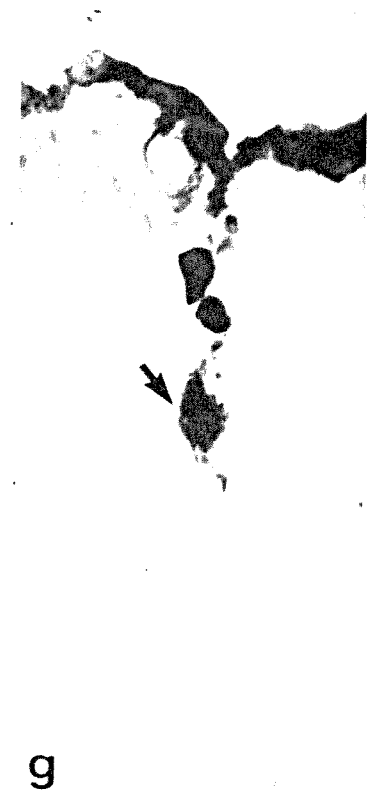
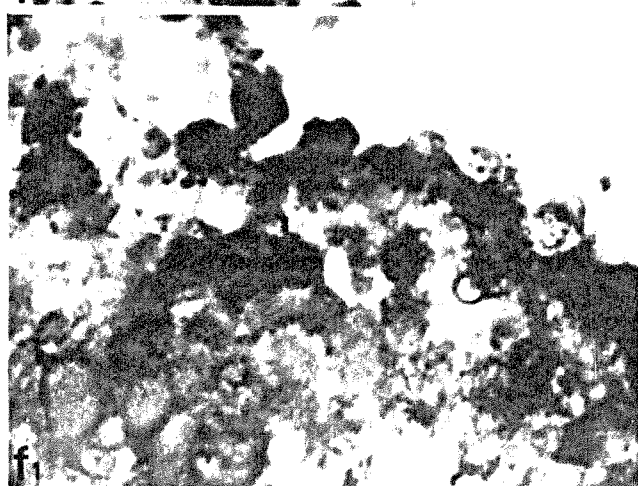
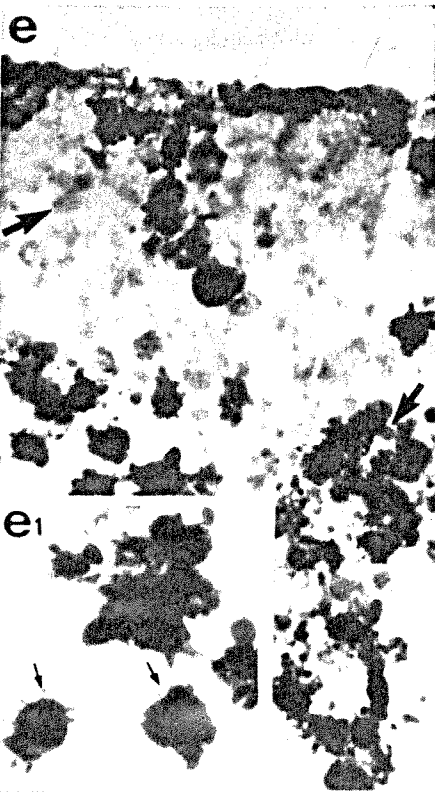
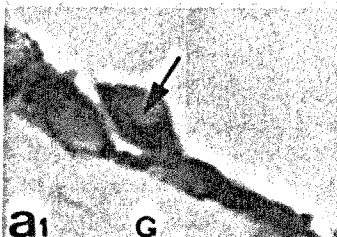
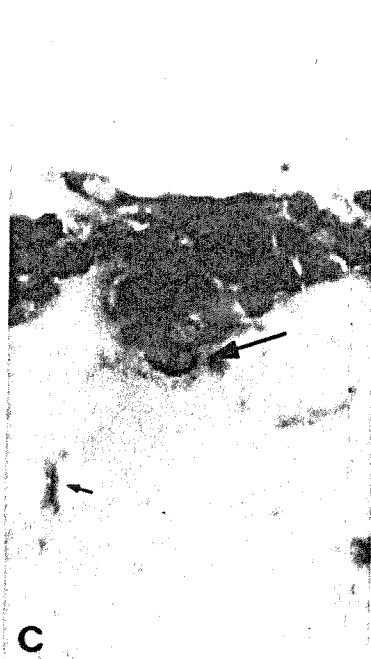
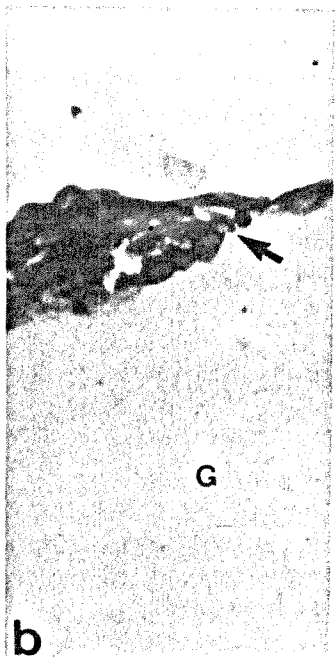
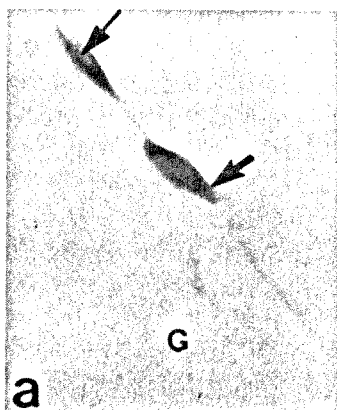
Prancha VII. Células Vero cultivadas sobre o gel de colágeno tipo I coradas com xylidine ponceau pH 2,5.

- Fig.a e a1.** 1 dia de cultivo celular. Células na superfície do gel com citoplasma corado e núcleo intensamente corado (→). Matriz colagênica levemente corada podendo-se observar as fibras com orientação paralela à superfície do gel (→).a=320x e a1= 640x.
- Fig.b.**5 dias de cultivo.Início da estratificação celular. Células arredondadas da superfície apresentam núcleos intensamente corados (→).O sentido das fibras na região próxima às células é perpendicular à superfície do gel (→). 640 x.
- Fig.c.** 10 dias de cultivo celular. Grânulos depositados na matriz colagênica são reativos a este corante (→).640 x.
- Fig.d.** 15 dias de cultivo celular. Presença de uma grande quantidade de material corado pelo X.P. depositado na matriz colagênica (→). Orientação preferencial das fibras em direção perpendicular à superfície do gel (→). 640 x.
- Fig.e.** 20 dias de cultivo celular. Aspecto geral da migração celular para o interior do gel. Superfície superior (→) e superfície inferior (→) do gel. 160 x.
- Fig. e1.** Células que migraram para o interior do gel. Pode ser observada a granulação depositada na matriz colagênica (→). 640 x.
- Fig.f.** 25 dias de cultivo.O pregueamento da superfície celular é evidente (→).160 x.
- Fig. f1.** Detalhe da região de prega da matriz colagênica, mostrando a direção diferente das fibras de colágeno quando próximos às células(→).1280x.
- Fig.g.** 30 dias de cultivo celular. Células no interior do gel com citoplasma vacuolizado e núcleos picnóticos intensamente corados (→). Grande quantidade de material depositado na matriz colagênica na região superior (→)1280 x.



Prancha VIII. Células Vero cultivadas sobre o gel de colágeno tipo I, submetidas ao PAS.

- Fig.a e a1.** Material coletado com 1 dia de cultivo. Células na superfície do gel exibem citoplasma corado (➡) e núcleos não corados(➡). Matriz colagênica (G) levemente corada. a=640 x e a1=1280 x.
- Fig.b.** 5 dias de cultivo celular. Células em várias camadas apresentam citoplasma corado intensamente (➡). 640 x.
- Fig.c.** 10 dias de cultivo celular. Aspecto geral de células proliferando e migrando para o interior da matriz colagênica (➡). Matriz colagênica com algumas regiões intensamente coradas (➡). 640 x.
- Fig.d.** 15 dias de cultivo celular. A migração celular para interior do gel pode ser observada (➡). Material PAS positivo depositado na matriz colagênica (➡). 640 x.
- Fig.e.** 20 dias de cultivo celular. Grande quantidade de material PAS positivo no interior do gel (➡) e entre as células (➡). 1280 x.
- Fig.e1.** Aumento maior das células no interior do gel. Podemos observar estruturas semelhantes à vesículas contornando o citoplasma das células (➡). 1280 x .
- Fig.f.**Material com 25 dias de cultivo. Vista geral de uma região contraída que apresenta pregas na superfície da matriz colagênica(➡) 640 x.
- Fig.f1.** Aumento de uma região próxima a prega da matriz colagênica. Pode-se observar um grande número de células no interior da matriz. 1280 x .
- Fig.g.** Material coletado com 30 dias de cultivo, onde observa-se o grau de migração celular para o interior do gel (➡) 640 x.



IV - DISCUSSÃO

Vários tipos de colágeno têm sido identificados *in vivo* e caracterizados por parâmetros bioquímicos e de distribuição em tecidos (VAN DER REST, 1991).

Alguns destes tipos de colágeno, em especial o colágeno tipo I, tem sido utilizado para experimentos *in vitro* como substratos que são constituídos de complexos supramoleculares desta proteína (EHRMANN & GEY, 1965; KLEBE, 1975; RUBIN *et alii*, 1978; ELSDALE & BARD, 1972; SCHOR & COURT, 1979; SCHOR, 1980; GALLÃO, 1991; WADA & VIDAL, 1991). Portanto, a natureza do substrato colagênico é particularmente importante e deve ser considerada nos estudos em que se utilizam esta proteína como substrato.

Sabe-se que a adesão e o crescimento de células sobre ou no substrato colagênico podem afetar o fenótipo celular, incluindo a forma e a polaridade (GOSPODAROWICZ *et alii*, 1978; MADRI *et alii*, 1988; ZUK *et alii*, 1989; NORRIS *et alii*, 1990), a morfogênese e a diferenciação celular (CHAMBARD *et alii*, 1981; HAY, 1982; ANDUJAR *et alii*, 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 macromolecularmente para formar o substrato (MURRAY *et alii*, 1979; SCHOR & COURT, 1979; GRINNELL & MINTER, 1978).

A análise do cultivo das células Vero sobre o gel de colágeno tipo I nos permitiu-nos verificar o comportamento celular diferenciado desta cultura quando comparado às células cultivadas sobre lamínula, no que se refere aos aspectos de proliferação, migração e infiltração associados às características morfofuncionais.

As células Vero quando cultivadas em lamínulas de vidro apresentam forma predominantemente poligonal e crescem em monocamadas, até atingirem

a confluência. A partir daí, se não for efetivado o subcultivo entram em senescência e morrem.

Quando esta linhagem foi cultivada sobre o gel de colágeno tipo I, as células mostraram-se ora alongada (tipo fibroblasto) e ora arredondada no primeiro dia de cultura e a cultura prosseguiu.

A morfologia arredondada foi observada quando as células iniciaram o processo de adesão ao substrato colagênico. Numa etapa posterior, quando a adesão foi completada, as células passam a exibir um fenótipo tipo fibroblasto, o que indica o espalhamento da célula sobre o substrato, recobrimdo toda a superfície do gel.

A adesão e o espalhamento das células em um substrato são necessários para a proliferação e a diferenciação de células em cultura (NAGAOKA *et alii*, 1990). Segundo RAJAMARAM (1974), a morfologia de uma célula fibroblástica durante a adesão e o crescimento sobre um substrato *in vitro* atravessa 4 estágios que são a adesão, o crescimento por expansão de filopódios, o aumento citoplasmático e o achatamento.

Observamos que as células que se mantiveram na superfície do gel apresentaram ao longo dos 30 dias de cultivo a morfologia tipo fibroblasto. Porém, a partir do 5º dia de cultivo iniciou-se a infiltração e a proliferação das células para o interior do gel.

Uma vez iniciada a infiltração para o interior do gel, observou-se a mudança morfológica. As células que eram inicialmente fibroblastóides tornaram-se arredondadas.

SCHOR (1980), através de estudos com fibroblastos dérmicos cultivados sobre gel de colágeno, relata um crescimento mais lento das células no interior do gel e também a ocorrência de uma mudança morfológica. O autor sugere que estas alterações possam resultar de fatores que incluem a deficiência de nutrientes, justamente pela localização das células no interior do gel, as quais

estão circundadas por um meio mais homogêneo e tridimensional, enquanto que as células na superfície do gel (ou sobre filmes de colágeno ou mesmo em superfícies de placas de cultura) estão crescendo em uma superfície plana.

A infiltração celular para o interior do gel se iniciou aos 5 dias de cultivo e permaneceu até o 30º dia, e provavelmente aconteceu devido à necessidade de um substrato para adesão das células que estavam proliferando.

Outras linhagens celulares tais como HeLa crescem na superfície, porém não migram para o interior do gel de colágeno e eventualmente formam camadas de células que cobrem toda a superfície (SCHOR, 1980). As células HeLa são incapazes de se moverem para o interior do gel apesar do aumento de mobilidade dessas células neste substrato comparado à placa de cultura e mesmo em situações onde o inóculo celular é feito quando da preparação do gel, ficando as células no interior do substrato.

Resultados diferentes são obtidos com células BHK (baby hamster kidney fibroblast) e fibroblastos de pele humana. Nestes casos, as células crescem na superfície do gel de colágeno formando uma monocamada e com o passar do tempo de cultivo movem-se para o interior da matriz de gel de colágeno (ELSDALE & BARD, 1972).

Distingue-se então o comportamento de migração que fica reservado para os movimentos celulares que ocorrem apenas na superfície do gel, do movimento das células da superfície para o interior da matriz, que fica referido como infiltração (SCHOR, 1980).

Vários tipos celulares têm sido examinados no que tange às características de infiltração e nestes incluem-se os fibroblastos (normais e viralmente transformados) e células tumorais de origem não epitelial. As células que não infiltram no gel incluem as linhagens celulares epiteliais e endoteliais ambas normais ou tumorais (TICKLE *et alii*, 1978)

A remodelação do substrato ocasionando o rearranjo posicional das células que proliferam e infiltram foi por nós observada. Vários autores relatam que fibroblastos cultivados em gel de colágeno são capazes de reorganizar as fibras colagênicas e de contrair o gel, processos que precedem a mudança fenotípica dos fibroblastos em cultura (BELL *et alii*, 1979; HARRIS *et alii*, 1981; GUIDRY & GRINNELL, 1985)

Este processo de remodelação pode ser , provavelmente, acompanhado por produção de algum tipo de collagenase .A produção de collagenase em cultura tem sido descrita para vários tipos celulares, incluindo fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, osteócitos e condrócitos. As collagenases produzidas por estas células são enzimas extracelulares com um pH ótimo próximo a 7,0, e atuam na degradação da tripla hélice do colágeno (WOOLEY, 1984).

Os processos de crescimento e infiltração das células Vero sobre o gel de colágeno tipo I aos 20 dias de cultivo culminaram numa estrutura com características de tecido conjuntivo frouxo.

Vários autores atribuem ao substrato de gel de colágeno tridimensional capacidade de simular uma estrutura semelhante a tecido conjuntivo (ANDUJAR *et alii*, 1992). As características que garantem essa semelhança são relativas à presença de fibras de colágeno com orientação definida e ao grande número de células presentes, além dessa estrutura ser de consistência delicada, flexível e pouco resistente às trações tal como no tecido conjuntivo frouxo. Entretanto, existem algumas diferenças relevantes entre o tecido conjuntivo frouxo de diferentes origens encontrado em regiões da pele, mucosa e glândulas e aquela estrutura por nós relatada que devem ser resguardadas.

Cabe ressaltar que neste tecido *in vivo*, além das fibras colagênicas, estão presentes as fibras elásticas e reticulares sem predomínio absoluto de qualquer um dos elementos tissulares, além da variação dos tipos celulares

característicos do órgão no qual ocorrem (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1985).

Com o progredir da cultura, as células que infiltraram para o interior do gel apresentaram sinais de degeneração, não pela ausência do substrato como acontecia nas células cultivadas sobre lamínula, mas possivelmente pela falta de nutrientes, que vai se tornando insuficiente de acordo com a profundidade que a célula atinge no gel, uma vez que a simples difusão do meio de cultura utilizado para manutenção das células não é suficiente para nutri-las. A partir de 15 dias de cultivo, no material em gel de colágeno e também no material controle foi observada a presença de células em degeneração que apresentavam vesículas citoplasmáticas e núcleo fragmentado, demonstrando o colapso dessas células em degeneração.

As células cultivadas *in vitro* apresentam 3 fases no seu ciclo de vida. Crescem até a confluência (fase I), se for efetivado o subcultivo na fase confluenta podem crescer indefinidamente (fase II) e caso contrário ocorrem uma progressiva diminuição da taxa de crescimento, acompanhada de mudanças morfológicas e funcionais, redução da capacidade de resposta a fatores de crescimento e de decréscimo da síntese de DNA (fase III). Esta última fase caracteriza células senescentes, sem divisão celular e com degeneração espontânea resultando em morte da cultura (BAYREUTHER *et alii*, 1993; MONTI *et alii*, 1992).

Duas teorias têm sido propostas para explicar o fenômeno de degeneração celular. MONTI e col. (1992) propõe que a senescência celular é um processo ao acaso causado por progressivo acúmulo de danos que é consequência da síntese protéica deficiente e/ou alterações à exposição de agentes tóxicos endógenos ou exógenos. Já para SMITH e col. (1990), a senescência celular é um fenômeno geneticamente controlado e ativo, muito similar ao processo dinâmico da diferenciação celular.

Dados experimentais corroboram a segunda teoria. Sumariamente são descritos pela dominância do fenótipo senescente sobre o fenótipo imortalizado, e foram obtidos através de fusão de células de ciclo de vida curto com células imortalizadas através de vírus SV 40, tendo como resultado células híbridas que mostravam fenótipos senescentes com alta redução de capacidade proliferativa (menor que 6-7 subcultivos), o que sugere a recessividade do fenótipo imortal (PEREIRA-SMITH *et alii*, 1983).

PEREIRA-SMITH *et alii*, (1988 e 1990) em estudos sistemáticos, demonstraram que fusão de linhagens tumorais resultavam em híbridos de ciclo de vida curto. Esses resultados são compatíveis com a hipótese de que no mínimo 4 genes são responsáveis para o fenótipo imortal. Portanto, a imortalização pode ser ocasionada por mudanças em um desses 4 genes que são complementares, favorecendo o fenótipo de vida curta.(PEREIRA-SMITH, 1990)

Considerando estes aspectos sugerimos que o evento por nós observado nas culturas celulares em lamínulas até 15 dias e naquelas em gel a partir de 15 dias como fenômeno de degeneração celular.

A exemplo de outros autores (WADA & VIDAL, 1991; GALLÃO, 1991) além de alterações morfológicas, os substratos à base de colágeno induziram alterações na fisiologia da célula.

As observações efetuadas após coloração com AT pH 4,0 mostraram que as células Vero cultivadas sobre o gel de colágeno em todos os tempos de cultivo exibem metacromasia citoplasmática. Interessantemente, a partir dos 5 dias de cultivo, os grânulos que se apresentam próximos às células ou mesmo na matriz colagênica são também metacromáticos.

Diz-se que substratos corados com AT exibem basofilia metacromática quando o pico principal de sua curva espectral de absorção aparece deslocado para comprimentos de onda mais curtos, 580 a 546 nm (hipsocromismo). Ao

mesmo tempo os valores de absorbância na região de $\lambda = 635$ nm se encontram sensivelmente diminuídos (hipocromismo) (LISON, 1960; MELLO, 1976; VIDAL, 1987).

O fenômeno de basofilia metacromática depende diretamente do número e grau de empilhamento das moléculas do azul de toluidina ligadas ao substrato. Quanto mais próximas estiverem as moléculas entre si, maior será a interação de seus elétrons e mais acentuado será o hipsocromismo e o hipocromismo em $\lambda=625$ nm. Desta forma, curvas de absorção espectral com picos máximos localizados em torno de 550-570 nm indicam maior proximidade dos sítios de ligação no substrato, disponíveis para se ligarem às moléculas do corante (MELLO, 1976; VIDAL, 1987).

A metacromasia pode revelar visualmente, mesmo sem a utilização de medidas microespectrofotométricas, um aumento na disponibilidade de radicais aniônicos em diferentes estágios fisiológicos de um mesmo tecido, ou tecidos diferentes, pela simples análise da cor obtida, que em função destas alterações passa de verde para azul, azul arroxeado e até róseo (VIDAL, 1987).

A basofilia metacromática do núcleo indica a ligação das moléculas do corante com os grupos fosfatos disponíveis no DNA e RNA (MELLO, 1976; VIDAL, 1987) e até mesmo pode revelar, diferenças na supraorganização dos complexos DNA-proteínas, RNA-proteínas nos diferentes estágios fisiológicos (MONTEIRO, 1993). As diferenças no padrão de basofilia metacromática podem ser decorrentes dos diferentes níveis de complexação entre DNA e proteínas e/ou RNA e proteínas, bem como da concentração desses componentes.

Quanto ao material controle observam-se os nucléolos basófilos (1 e 5 dias) demonstrando os grupamentos fosfatos disponíveis do RNA. Diferenças dos níveis de padrão de basofilia metacromática do núcleo e ortocromasia nuclear observada após 10 dias de cultivo, indicam alterações nos complexos

DNA/proteínas e aos 15 dias de cultivo, os fragmentos nucleares metacromáticos podem indicar a dissociação dos referidos complexos. Esta dissociação, evidenciada com azul de toluidina juntamente com as características morfológicas já descritas para as células neste tempo de cultivo, nos leva a correlacioná-las com os acontecimentos descritos para o fenômeno de senescência.

Os grânulos depositados entre as células, na matriz colagênica, e que exibem basofilia metacromática, podem provavelmente ser moléculas de glicosaminoglicanos ligados aos proteoglicanos, elementos de matriz extracelular produzidos pelas células em cultura.

Dados semelhantes foram obtidos por GALLÃO (1990) quando cultivou células Vero em feltro de colágeno microcristalino com e sem tratamentos químicos. Nestas condições, as células apresentaram deposição de MEC corada metacromaticamente com AT pH 4,0.

Os grânulos que se apresentam depositados na matriz colagênica ou mesmo entre as células, que se mostraram metacromáticos quando corados com azul de toluidina pH 4,0, são também reativos ao Xylidine Ponceau, indicando a natureza protéica deste material. Com os dados relativos à coloração com PAS pudemos evidenciar a coloração de todo o material depositado na matriz colagênica e confirmamos a natureza glicoprotéica destes.

As análises citoquímicas com Xylidine Ponceau pH 2,5 revelaram sempre núcleos e nucléolos mais intensamente corados em vermelho - alaranjado, tanto nas células cultivadas sobre lamínula quanto nas células crescidas sobre o gel de colágeno tipo I. Neste último caso porém, a coloração sempre apresentou maior intensidade que no controle. As áreas coradas pelo XP representam regiões de concentração de proteínas (MELLO & VIDAL, 1980). Possivelmente esta coloração mais intensa das células Vero quando cultivadas sobre o gel de colágeno esteja relacionada a atividade de síntese protéica

aumentada. No caso das células Vero sobre o gel de colágeno tipo I, a síntese protéica aumentada pode estar relacionada aos processos de diferenciação fenotípica e no caso do controle aos fenômenos de adesão e proliferação, uma vez que a intensidade de coloração diminui em células cultivadas com 15 dias em lamínulas e em células infiltradas no interior do gel.

A partir do 5º dia de cultivo detectamos a contração do gel de colágeno. A contração das fibras do gel de colágeno pode ser observada pelo pregueamento da superfície do gel e pelo rearranjo das fibras de colágeno, identificadas pela coloração com Xylidine Ponceau pH 2,5.

Os géis de colágeno em placas convencionais de cultura ou em vidros de penicilina, como por nós utilizado, permanecem firmemente aderidos à parede da placa de cultura, porém o descolamento e posterior flutuação deste no meio de cultura foi por nós observado. O descolamento é aparentemente originado pela contração ocorrida no gel de colágeno pelas células Vero.

A contração é observada visualmente através da formação de um disco colagênico de diâmetro reduzido na superfície superior do gel, o que inicialmente tinha uma forma cilíndrica, apresentou após a contração uma forma de cone seccionado transversalmente.

A contração é um fenômeno observado quando células são cultivadas em ou sobre gel de colágeno. Sabe-se que a eficiência da contração do gel depende de fatores como o tipo celular e a integridade do citoesqueleto, além de fatores extracelulares presentes no soro, que é acrescido ao meio de cultura (GUIDRY *et alii*, 1990; TINGSTROM, 1992).

O fenômeno de contração do gel de colágeno *in vitro* é visto como um modelo experimental que reflete o mecanismo de contração que ocorre nos processos de desenvolvimento e reparo dos tecidos (BELL *et alii*, 1979; EHRLICH & WYLER, 1983; GUIDRY & HOOK, 1990). Entretanto, a característica deste fenômeno depende de variantes como o tipo e a

concentração do gel utilizado como substrato e também do tipo celular cultivado (BELL *et alii*, 1979; STEINBERG *et alii*, 1980; EHRLICH, 1988; TINGSTROM *et alii*, 1992).

De fato, em nossa análise foi constatado que a contração do gel era muito mais intensa na presença de soro fetal bovino, que chegou a aproximadamente 50% da diminuição do diâmetro superior quando comparado ao material cultivado na ausência de soro fetal bovino, que contraiu cerca de 15% em 5 dias de cultivo.

ANDUJAR *et alii* (1992) reportaram a importância do soro neste processo, ressaltando que a contração do gel é proporcional à concentração de soro no meio de cultura, pois este contém promotores de contração.

GILLERY *et alii* (1986) identificou a fibronectina como fator do soro responsável pela contração do substrato. Esta glicoproteína é encontrada no plasma sanguíneo e nas células. A forma celular é organizada em estruturas fibrilares e representa um importante componente da MEC. A fibronectina é também uma das proteínas do soro que promovem adesão ao substrato em cultura de tecidos (HYNES & YAMADA, 1982).

A fibronectina apresenta sítios de ligações específicos para as células, para outros componentes da MEC, para a actina e várias macromoléculas. A interação fibronectina/célula é mediada por receptores de membrana específicos, e esta interação constitui o maior sistema de adesão de células ao substrato, o qual pode mediar interações entre as células e a MEC desempenhando um papel chave na adesão, no espalhamento, na morfologia e na mobilidade celular (HAY, 1981; DUFOUR *et alii*, 1986).

A contração pode ser promovida na ausência de soro através de outros fatores como o fator de transformação do tipo β (TGF- β) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Por outro lado, a heparina é citada como inibidora da contração do gel por diminuir a polimerização das fibrilas de

colágeno (GUIDRY & GRINNELL, 1987) ou por induzir mudanças no citoesqueleto (EHRlich *et alii*, 1986).

BELL *et alii*, (1979) relataram que a citocalasina B e a colchicina inibem a contração do gel, sugerindo que a integridade funcional do citoesqueleto é necessária para a ocorrência deste fenômeno.

Nós interpretamos o alinhamento das fibrilas do gel de colágeno evidenciadas através da coloração com X.P. como resultado da tensão exercida pelos movimentos celulares ocorridos nos processos de migração e infiltração, Aspecto semelhante foi detectado por BELL *et alii* (1979) que relataram a reorganização do substrato, com aproximação das fibras de colágeno após a saída de água da matriz.

Segundo GUIDRY & GRINNELL (1985), a contração do colágeno por fibroblastos envolve uma pequena síntese ou degradação de colágeno, sem envolver alterações enzimáticas ou nas ligações cruzadas pré-existentes no colágeno. Segundo estes autores a contração ocorre somente em uma matriz capaz de propagar a força contrátil gerada pelos fibroblastos, o que faz do gel de colágeno tridimensional um excelente substrato para experimentos em cultura, onde investiga-se a contração.

Adicionalmente, durante a cultura de fibroblastos sobre o gel de colágeno BELL *et alii* (1979) descreveram a formação de uma estrutura semelhante à derme, após a contração do substrato

Substratos colagênicos contraído por fibroblastos foram transplantados e reintegrados com sucesso como equivalentes dérmicos (HULL *et alii*, 1983).

GUIDRY *et alii* (1990) consideram a contração do substrato colagênico por fibroblastos *in vitro* como um sistema modelo para o estudo de desenvolvimento do tecido conjuntivo, cicatrização e fibrose.

V- Conclusões

1. O gel de colágeno tipo I induz processo de diferenciação de células Vero em cultura, que se caracteriza inicialmente por alterações na forma celular.
2. Células Vero cultivadas em gel de colágeno tipo I, produzem elementos de MEC na forma de grânulos metacromáticos, que são também reativos ao Xylidine pH 2,5 e ao PAS, o que indica a natureza glicoprotéica deste material secretado pelas células..
3. Características morfológicas de senescência são observadas, em células que crescem sobre lamínulas, a partir de 10 dias de cultivo e nas que se infiltram para o interior do gel, a partir dos 20 dias de cultivo.
4. As células Vero cultivadas em gel de colágeno tipo I são capazes de contrair o gel de colágeno, num processo dependente da presença do soro fetal bovino e que ocorre principalmente pela reorganização das fibras de colágeno.
5. Através dos processos de infiltração e contração produzidos pelas células Vero, o gel de colágeno aos 20 dias de cultivo apresenta a formação de uma estrutura muito semelhante a de um tecido conjuntivo frouxo.

VI- Referências bibliográficas

- ADAMS, J.C. & WATT, F.M. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. **Development**, **117**: 1183-1198, 1993.
- ANDUJAR, M.B.; MELIN, M.; GUERRET, S. & GRIMAUD, J.A. Cell migration influences collagen gel contraction. **J. Submicrosc. Cytol.Pathol.**, **24**(2): 145-154, 1992.
- ALBELBA, S.M. & BUCK, C.A. Integrins and other cell adhesion molecules. **Faseb J.**, **4**: 2868-2880, 1990.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular Biology of the cell**. Third Edition. Garland Publishing. New York & London. 1994.
- ALLEN, T.D. & SCHOR, S.L. The contraction of collagen matrices by dermal fibroblasts. **J. Ultrastructure Res.**, **83**: 205-219, 1983
- ALI, I.V.; MAUTNER, V.; LANZA, R. & HYNES, R.O. Restoration of normal morphology, adhesion and cytoskeleton in transformed cells by addition of transformation-sensitive surface protein. **Cell** **11**: 115-126, 1977.
- ASAGA, H.; KIKUCHI, S. & YOSHIZATO, K. Collagen gel contraction by fibroblasts requires cellular fibronectin but not plasma fibronectin. **Exp. Cell Res.** **193**: 167-174, 1991.
- BAYREUTHER, K.; FRAN CZ, P.L.; GOGOL, J. & KONTERMAN, K. Terminal differentiation, aging, apoptosis, and spontaneous transformation in fibroblast stem cell systems *in vivo* and *in vitro*. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** **663**: 167-196, 1992.
- BEHMER, O.T.; TOLOSA, E.M.C. & FREITAS-NETO, A, G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Edusp, SP, 329 pp., 1976.
- BELL, E., IVARSSON, B. & MERRIL, C. Production of tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potencial *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **76**: 1274-1278, 1979.
- BISSEL, M.J.; HALL, H.G.; & PARRY, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? **J. Theor. Biol.**, **99**: 31-68, 1982.

- BORNSTEIN, P. & SAGE, H. Regulation of collagen gene expression. **Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.**, **37**: 67-106, 1989.
- CHAMBARD, M., GABRION, J. & MAUCHAMP, J. Influence of collagen gel on the orientation of epithelial cell polarity: Follicle formation from isolated thyroid cells and from preformed monolayers. **J. Cell Biol.**, **91**: 157-166, 1981.
- CHEN, W.T. Transmembrane interactions at cell adhesion and invasion sites. **Cell Diff. Devel.**, **32**: 329-336, 1990.
- CHVAPIL, M., KRONENTHAL, R.L. & VAN WINKLE, W. Medical and surgical applications of collagen. **Int. Rev. Connect. Tissue Res.**, **6**: 1, 1973.
- CUCIN, R.L. The effects of reconstituted collagen gels on the healing of experimental bony defects. **J. Sur. Res.**, **12**: 318, 1972.
- DUFOUR, S.; DUBAND, J.L. & THIÉRY, J.P. Role of major cell-substratum adhesion system in cell behavior and morphogenesis. **Biol. Cell** **58**: 1-14, 1986.
- EHRMANN, R.L. & GEY, G.O. The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat tail collagen. **J. Natn. Cancer Inst.** **16**: 1375-1390, 1956.
- EMERMAN, J. J. & PITELKA, D.R. Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. **In Vitro**, **13**: 316-328, 1977.
- ELSDALE, T. & BARD, J. Collagen substrata for studies on cell behavior. **J. Cell Biol.**, **54**: 626-637, 1972.
- EHRlich, H.P. & WYLER, D.W. Fibroblast contraction of collagen lattices *in vitro*: Inhibition by chronic inflammatory cell mediators. **J. Cell. Phys.** **116**: 345-351, 1983.
- EHRlich, H.P. The modulation of contraction of fibroblast populated collagen lattices by types I, II, and III collagen. **Tissue & Cell**, **20**(1): 47-50, 1987.
- EXPOSITO, J. Y.; LE GUELLEC, D.; LU, Q. & GARRONE, R. Short chain collagens in sponges are encoded by closely related genes. **J. Biol. Chem.**, **266**(32): 21923-21928, 1991.

- GALLÃO, M.I. Ação de agentes químicos no processo de diferenciação celular induzida pelo feltro de colágeno microcristalino *in vitro*. Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas, 1990.
- GOSPODAROWICZ, D.; GREENBURG, G. & BIRDWELL, C.R. Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. **Cancer Res.** **38**: 4155-4171, 1978.
- GROBSTEIN, C. Epithelio-mesenchymal specificity in the morphogenesis of mouse sub-mandibular rudiments *in vitro*. **J. Exp. Zool.** **124**: 383-414, 1953.
- GILLERY, P. MAQUART, F.X. & BOREL, J.P. Fibronectin dependence of the contraction of collagen lattices by human skin fibroblasts. **Exp. Cell Res.** **167**: 29-37, 1986.
- GUIDRY, C. & GRINNELL, F. Studies on the mechanism of hydrated collagen gel reorganization by human skin fibroblasts. **J. Cell Sci.** **79**: 67-81, 1985.
- GUIDRY, C. & HOOK, M. Endothelins produced by endothelial cells promote collagen gel contraction by fibroblasts. **J. Cell Biol.** **115**(3):873-880, 1991.
- GRINNELL, F. & MINTER, D. Attachment and spreading of baby hamster kidney cells to collagen substrata: effects of cold insoluble globulin. **Proc. Natn. Acad. Sci. USA** **75**: 4408-4412, 1978.
- HASHIMOTO, K.; HATAI, M. & YAOI, Y. Inhibition of cell adhesion by type V collagen. **Cell Struct. Funct.** **16**: 391-397, 1991.
- HAY, E.D. **Cell biology of extracellular matrix**. Plenum Press, New York, 2nd. ed. 1981.
- HAY, E.D. Role of cell-matrix in cell migration and epithelial-mesenchymal transformations. **Cell Diff. Develop.** **32**: 367-376, 1990
- HYNES, R.O. & YAMADA, K.M. Fibronectin: multifunctional modular glycoproteins. **J. Cell. Biol.** **95**: 369-377, 1982
- HULL, B.E.; SHER, S.E.; ROSEN, S.; CHURCH, D.; BELL, E. Structural integration of skin equivalents grafted to Lewis and Sprague-Dawley rats. **J. Invest. Dermatol.** **81**: 429-436, 1983.

- HUMPHRIES, M. J. The molecular basis and specificity of integrin- ligand interactions. **J. Cell Sci.** **97**: 585-592, 1990.
- JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Ed. Guanabara, 6 ed., 512 pp., 1987.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.** **27**: 136a, 1965.
- KIRKLAND, S.C. Polarity and differentiation of human rectal adenocarcinoma cells in suspension and collagen gel cultures. **J. Cell Sci.** **91**: 615-621, 1988
- KLEBE, R.J. Cell attachment to collagen: the requirement for energy. **J. Cell Physiol.** **86**: 231-236, 1975.
- KLEINMAN, H.K.; KLEBE, R. J. & MARTIN, G.R. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. **J. Cell Biol.** **88**: 473-485, 1981.
- LEE, M. Structure and functional significance of cell adhesion molecules. **Med. Sci. Res.** **20**: 539-542, 1990.
- LISON, L. Acides nucléiques, nucleoprotéines, nucleotides. In: **Histochimie et citochimie animales**. Paris, Gauthier Villars, V. 1cap. 12p. 355-397, 1960.
- LIN, C. Q. & BISSEL, M.. J. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. **Faseb J.** **7**: 737-742, 1993.
- MADRI, J.A., PRATT, B.M. & TUCKER, A.M. Phenotypic modulation of endotelial cells by transforming growth factor β depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. **J. Cell Biol.** **106**: 1375-1384, 1988.
- MELLO, M.L.S. Estudo citoquímico e citofísico quantitativo de algumas hetero- e eucromatinas. Dissertação (Livre docência), Depto. Biologia celular. I.B. UNICAMP, 211p., 1976.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. **Práticas de Biologia Celular**. Ed. Edgard Blucher Ltda. 1980.

- MONTEIRO, A.L.P. Concentração crítica de eletrólitos (CEC) em cromossomos politênicos de *Trichosia pubescens* (Diptera: Sciaridae). Tese de Mestrado, UNICAMP, 1993.
- MONTI, D.; GRASSILLI, E.; TROIANO, L.; CONNARIZZA, A.; SALVIOLI, S.; BARBIERI, D.; AGNESINI, C.; BETUZZI, S.; INGLETI, M.C.; CORTE, A.; FRANCESCHI, C. Senescence, immortalization and apoptosis: An intriguing relationship. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** **673**: 70-82, 1992.
- MURRAY, J. C., STINGL, G. KLEINMAN, H.K., MARTIN, G.R. & KATS, S.I. Epidermal cells adhere preferentially to type IV (basement membrane) collagen. **J.Cell Biol.** **80**: 197-202, 1979.
- NAGAOKA, S.; TANZAWA, H. & SUZUKI, J. Cell proliferation on hydrogels. **In vitro Cell Dev. Biol.** **25**: 51-56, 1990.
- NORRIS, W.D.; STEELE, J.G.; JOHSON, G. & UNDERWOOD, P.A. 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, 1990.
- OLSEN, B.R. The next frontier: molecular biology of extracellular matrix. **Connect. Tiss. Res.** **23**: 115-121, 1989.
- PEREIRA-SMITH, O.M. & SMITH, J.R. Evidence for the recessive nature of cellular immortality. **Science** **221**: 946-966, 1983.
- PEREIRA-SMITH, O.M. & SMITH, J.R. Genetic analysis of indefinite division in human cells: Identification of four complementation groups. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** **85**: 6042-6046, 1988.
- RAJAMARAN, R. The morphology of a fibroblast adhered on substrats. **Exp. Cell Res.** **88**: 327, 1974.
- RILEY, R. W. & LEAKE, D.L. Cancellous bone grafting with collagen stents. **Int. J. Oral Surg.** **5**: 29, 1976.
- ROONEY, P. & KUMAR, S. Inverse relationship between hyaluronan and collagens in development and angiogenesis. **Differentiation** **54**: 1-9, 1993.
- RUOSLAHTI, E. & PIERSCHBACHER, M.D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. **Science** **238**: 491-497, 1987.

- RUBIN, K., OLDBERG, A., HOOK, M. & OBRINK, B. Adhesion of rat hepatocytes to collagen. **Expl. Cell Res.** **117**: 165-177, 1978.
- RULLI, M.A. Efeito do colágeno microcristalino no processo de reparo em feridas de extração dental, estudo histológico em ratos. **Rev. Odont. UNESP**, **13**(1/2); 5-11, 1984.
- SANGUINETTI, D.F.A. Empleo de colágeno heterólogo liofilizado en cirugía. **E.D.M.** 291-295, 1973.
- SCHOR, S. L. Cell proliferation and migration on collagen substrata in vitro. **J. Cell Sci.** **41**: 159-175, 1980.
- SCHOR, S. L. & COURT, M. Different mechanisms in the attachment of cells to native and denatured collagen. **J. Cell Sci.** **38**: 267-281, 1979.
- SINGER, I.I.; SCOTT, S.; KAWKA, D.W.; KAZAZIS, D.M.; GAILIT, J. & RUOSLAHTI, E. Cell surface distribution of fibronectin and vitronectin receptors depends on substrate composition and extracellular matrix accumulation. **J. Cell Biol.**, **106**: 2171-2182, 1988.
- SMITH, J. R. & PEREIRA-SMITH, O.M. Genetic and molecular studies of cellular immortalization. **Adv. Cancer Res.**, **54** : 63-71, 1990.
- SPIELGELMAN, B.M. & GINTY, C.A. Fibronectin modulation of cell shape and lipogenic gene expression in 3T3-adipocytes. **Cell** **35**: 657-666, 1983.
- STREULI, C.H. & BISSEL, M. J. Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum. **J. Cell Biol.** **110**: 1405-1415, 1990.
- THOMA, K. H. **Oral Surgery**. ed 5. St. Louis, The C.V. Mosby CO., 1969.
- TICKLE, C.; CRAWLEY, A. & GOODMAN, M. Mechanisms of invasiveness of epithelial tumours: ultrastructure of the interactions of carcinoma cells with embryonic mesenchyme and epithelium. **J. Cell Sci.** **33**: 133-155, 1978.
- TINGSTRON, A.; HELDIN, C. H.; RUBIN, K. Regulation of fibroblast-mediated collagen gel contraction by platelet-derived growth factor, interleukin 1 α and transforming growth factor β . **J. Cell Sci.** **102**: 315-322, 1992.

- VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. **Biologia Celular**. Livraria Atheneu 347 pp., 1987.
- VIDAL, B.C. Interações células-matriz extracelular: uma unidade estrutural e sistemática. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp** 1: 33-40, 1989.
- VIDAL, B. C. Cell and extracellular matrix interaction: a feedback theory based on molecular order recognition-adhesion events. **Revista Unicamp**. IV: 1-11, 1993.
- VAN DER REST, M. & GARRONE, R. Collagen family of proteins. **Faseb J.** 5: 2814-2823, 1991.
- VUORIO, E. & CROMBRUGGHE, B. The family of collagen genes. **Ann. Rev. Biochem.** 59: 837-872, 1990.
- WEST, C.M.; LANZA, R; ROSEBLOOM, J., LOWE, M., HOLTZER, H. & AUDALOCIC, N. Fibronectin alters the phenotypic properties of cultured chick embryo condroblasts. **Cell** 17: 491-501, 1979.
- WADA, M. L. F. Alterações fenotípicas induzidas por matriz óssea desmineralizada (MOD), em cultura de células de uma linhagem celular estabelecida. Tese de Doutorado. Unicamp, 1985.
- WADA, M.L.F. & VIDAL,B.C. Growth and differentiation of Vero cells cultivated in three dimensional type I collagen. **Cytobios** 67:101-109, 1991.
- WATT, F.M. The extracellular matrix and cell shape. **TIBS** 11: 482- 485, 1986
- WOOLEY, D. E. Mammalian collagenases. In: **Extracellular Matrix Biochemistry**. Edited by D.R.Pitelka and A. H. Reddi. Elsevier, New York, USA., 1984.
- YANG, J. NANDI, S. Growth of cultured cells using collagen as substrate. **Int. Rev. Cytol.** 81: 249-286, 1983.
- ZUK, A.; MATLIN, K. & HAY, E.D. Type I collagen gel induces Madin-Darby canine kidney cells to become fusiform in shape and lose apical-basal polarity. **J. Cell Biol.** 108: 903-920, 1989.