

UMA CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DA ESTRUTURA ULTRA-FINA E DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS DE FIBRILAS DO TECIDO CONJUNTIVO ANIMAL.

P. SOUZA SANTOS*, H. SOUZA SANTOS**, G. A. EDWARDS***, A. R. HOGE****
& P. SAWAYA***.

INTRODUÇÃO

Colágeno é o principal constituinte protéico dos tecidos conjuntivos compacto e frouxo. Ocorre seja como uma rede de fibrilas de aproximadamente um micro de espessura e de vários micra de comprimento, associado com a maioria dos tecidos em toda a série animal, seja como feixes grossos formando tendões (1). É insolúvel em água, em solventes orgânicos e, geralmente, em soluções diluídas de álcales e ácidos a temperaturas normais. A ação prolongada de água quente transforma o colágeno em gelatina, uma reação química de grande importância, da qual derivou o próprio termo (colágeno significa "gerador de cola").

Outra propriedade característica do colágeno é seu aumento de volume sob a ação de ácidos e álcales diluídos (3).

A composição em amino-ácidos é mais ou menos igual nos diversos colágenos de diferentes animais, mas a porcentagem relativa de sua composição varia de animal para animal (4). A maioria dos colágenos mostra um alto teor de glicina, hidroxiprolina e de ácidos aromáticos contendo enxofre (5, 6).

Estudos de fibrilas colágenas por métodos físicos, tais como difração de raios X, com ângulo alto e baixo, microscopia eletrônica e microscopia de polarização, evidenciaram a natureza fibrosa do colágeno e mostraram a existência de um período característico na média de 640 Å em colágeno de toda série

* Secção de Vírus, Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil.

** Secção de Microscopia Eletrônica, Universidade de S. Paulo, Brasil.

*** Depto. de Fisiologia Geral e Animal, Universidade de S. Paulo, Brasil.

**** Laboratório de Ofiologia, Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil.

Recebido, para publicação, em 26.I.1955.

animal (7). O período de 640 Å tem sido observado também em colágeno de animais fósseis, como, por exemplo, na prêsia desmineralizada de um mamute de 15.000 anos (4, 7). Por outro lado, a difração de raios X com ângulo alto, que revela pequenos interstícios na arquitetura molecular, mostra diferenças nos períodos dos diversos colágenos (8). De todos êsses métodos, a microscopia eletrônica fornece uma aproximação especial à estrutura ultrafina das fibrilas e a sua ordem nas células e nos tecidos pela visualização direta. Infelizmente, devido ao poder resolvente dos microscópios eletrônicos de apenas 10 Å, detalhes de arquitetura das cadeias de polipéptidos dentro das fibrilas ainda não podem ser observados.

Presentemente, há três objetivos principais nas pesquisas sôbre fibrilas colágenas:

1) a consideração da sua estrutura ultrafina, partindo do arranjo espacial das cadeias de polipéptidos formando as fibrilas, até a organização destas nas rêdes dos tecidos e dos tendões. Tais estudos estão sendo feitos intensivamente no momento, achando-se, porém, longe de completação (9, 10). A partir de tais estudos, tentativas sérias foram feitas no sentido de reconstruir modelos das cadeias de polipéptidos nas fibrilas colágenas. Dêstes os mais prometedores no momento são os modelos de Bear (4), Randall (11), Pauling (12) e Huggins (14), visto que o modelo de Astbury provou não ser satisfatório (13).

2) o estudo das propriedades químicas das fibrilas colágenas, particularmente no que diz respeito aos melhoramentos da qualidade de couro (3, 15). O colágeno é importante não só como matéria prima para a fabricação de gelatina e cola, mas de maior importância ainda na fabricação de couro. A pele, ou cório, tem como componente principal (35%) uma rêde de fibrilas colágenas que lhe dá resistência e elasticidade. Afim de manter estas propriedades e para eliminar a desvantagem da putrefação, as fibrilas colágenas são tornadas insolúveis por reação com taninos e sais de crômio. Estas reações podem ser controladas por observações no microscópio eletrônico.

3) do ponto de vista biológico, o colágeno é uma proteína estrutural intimamente associada com a organização de tecidos e órgãos. Portanto, o conhecimento da estrutura normal das fibrilas colágenas de diversos tecidos e órgãos, sob diferentes condições físico-químicas, é o ponto inicial para a compreensão das alterações que ocorrem em tecidos normais, por exemplo, a histogênese de tecidos conjuntivos e o processo de envelhecimento, bem como de alterações patológicas, tais como as produzidas por colagênase na febre reumática ou na gangrena (16, 26).

No presente estudo é nosso intento apresentar algumas observações sobre a microscopia eletrônica de fibrilas colágenas normais de vários tecidos de alguns animais, principalmente de répteis, e demonstrar a ação de certos fatores químicos e físicos sobre a estrutura fibrilar. Pareceu-nos mais conveniente apresentar os métodos, materiais, resultados e a discussão juntamente em cada secção, do que em capítulos separados.

PERÍODO E ESTRUTURA ULTRA-FINA DAS FIBRILAS

Estudámos fibrilas colágenas associadas com as miofibrilas dos seguintes músculos: oblíquo externo do sapo, *Bufo paracnemis*; do jacaré, *Cayman latirostris*; das serpentes, *Liophis miliaris* e *Constrictor constrictor amarali*; do pombo e do homem.

Da série dos répteis (serpentes, jacaré e lagarto *Tupinambis teguixin*) foi usado também colágeno dos seguintes músculos: hioglosso, rabo, lingua, temporal e coração. Observações foram feitas também em fibrilas colágenas de veias e do canal deferente das serpentes e do lagarto. Em adição, usámos tendões das patas dianteiras, do dorso e do rabo do rato albino e o tendão da glândula venenosa de *Bothrops alternata* e o seu homólogo na *Constrictor constrictor amarali*. As fibrilas foram preparadas, para microscopia eletrônica, pela técnica previamente descrita para a preparação de miofibrilas (35). Observações foram feitas em ambos os microscópios, no Siemens 100b e no microscópio eletrônico RCA, EMU. Medidas foram obtidas das micrografias eletrônicas ampliadas, feitas no microscópio eletrônico RCA, sendo os aumentos determinados dentro de 5% de erro (17).

Em todos os casos, as fibrilas colágenas aparecem como filamentos únicos, às vezes uma rede ou em feixes, apresentando uma característica estriação transversal, formada pela alternância de bandas escuras e claras denominadas respectivamente bandas *A* e *B* por Schmitt (18) e bandas *D* e *H* por Wolpers (19). As bandas escuras são regiões de alto poder dispersivo eletrônico, o que significa que têm maior densidade ou mais átomos por unidade de volume do que as bandas claras. Nas preparações sombreadas com metal, as bandas são nitidamente visíveis quando a direção do sombreamento é paralela, ou quase paralela, ao eixo longo da fibrila (fig. 1). Em tais preparações, onde o sombreamento está em ângulos retos ao eixo longo, as bandas não são nitidamente vistas nas fibrilas, mas os contornos da fibrila são visíveis na sombra. Em preparações não sombreadas, as bandas podem ser vistas somente quando as fibrilas estão bem limpas, isto é, quando a camada da substância básica, às vezes

grudada às fibrilas, não encobre e obscurece as bandas. Pode ser visto claramente, na fig. 1, que a banda *A* é mais alta do que a *B*, dando assim à fibrila o aspecto de um fio de pérolas. Não obstante, esta aparência é, na verdade, devido à perda de água da fibrila, sendo que foi demonstrado, por meio de réplicas de fibrilas colágenas úmidas, que a superfície é uniformemente lisa. Parece, portanto, razoável presumir que a banda *B* possui um teor mais alto de água do que a banda *A* (20). Por coloração seletiva como os chamados corantes eletrônicos, isto é, ácido ósmico, ácido fosfotúngstico ou acetato de urânio, uma estrutura mais fina pode ser evidenciada em preparações não sombreadas. Quatro linhas escuras aparecem na banda *A* (a, b, c, d) e uma única linha na banda *B* (e). Sob certas condições, as linhas "b" e "e" podem aparecer divididas em duas linhas cada, dando, assim, um total de sete linhas (23). Em fibrilas sombreadas, nem todas as linhas se tornam visíveis. Contudo, devido ao fato de que as linhas "b" e "c" são de diâmetro largo, as mesmas se tornam proeminentes em fibrilas limpas sombreadas paralelamente ao eixo longo (Figs. 1, 2), dando a aparência de uma estriação transversal extra na banda *A*, tendo um período de 270 Å, o assim chamado intra-período de preparações sombreadas (27). A soma dos comprimentos das bandas *A* mais *B* dá em média 640 Å, concordando, assim, com o espaçamento característico das fibrilas colágenas secas, conforme foi revelado por difração de raios X com ângulo baixo (4). Em todas as nossas experiências usamos espécimes sombreados com metal; portanto, variações das sub-linhas não foram consideradas neste estudo.

Na maior parte do trabalho prévio em microscopia de colágeno usou-se fixação com formol, visto que este não altera a refração dupla intrínseca do colágeno e, por conseguinte, não muda o arranjo das cadeias de polipéptidos nas fibrilas (28). Visto que nossos estudos incluem uma variedade de colágenos, achamos conveniente determinar a influência de diversos fixadores, antes de iniciar a experiência definitiva. Desta maneira, o período e o diâmetro das fibrilas foram determinados após o uso de formol, de soluções de Zenker e de Bouin, bem como de material não fixado. Os resultados obtidos com o tendão da glândula salivar de *Constrictor* são apresentados na Tabela 1, onde se pode ver que o período é o mesmo nos materiais fixados e nos não fixados, mas que a gama dos diâmetros varia com o fixador. O aspecto das fibrilas, após tal tratamento, é apresentado nas Figuras 1 e 2. À base destes resultados, usamos material não fixado, ou fixamos com formol a 5%, nas experiências definitivas.

As observações finais das fibrilas colágenas normais incluíram medições do período e do diâmetro de um número de fibrilas tiradas de regiões diferentes de vários animais, e estudos sobre a forma da fibrila em geral. Na *Tabela 2* são apresentadas medições do comprimento do período e do diâmetro de fibrilas de diversos órgãos de vários animais. Pode-se notar que, apesar de que o período varia levemente, entre os órgãos do mesmo animal ou de animal para animal, permanece uniformemente ao redor de $640 \text{ \AA}$, confirmando a observação de Bear obtida por meio de difração com ângulo baixo (8). Os diâmetros apresentaram maior variabilidade. Nas fibrilas de certos órgãos, por exemplo, da língua do lagarto, os diâmetros são uniformes. Em outros, porém, como por exemplo do rabo do jacaré (Fig. 3), a gama dos diâmetros pode ser extensiva, neste caso de 640 a $1400 \text{ \AA}$. A constância do período, mais a variação no diâmetro da fibrila, foi tomada por Bear (4) como base para seu modelo da fibrila colágena, para sustentar a opinião de que a fibrila é composta de unidades, as protofibrilas, cujos diâmetros são muitas vezes menores do que aquele da fibrila e cuja composição é a de poucas cadeias de péptidos, tudo alinhado de maneira a dar um período constante.

Acredita-se que a fibrila colágena é composta de uma série de anéis ôcos (27), e, de fato, micrografias eletrônicas de cortes transversais de tendões (9) têm sido apresentadas mostrando a sua aparência ôca. Estas observações não discordam de nenhum modo das observações feitas com o microscópio de polarização (28), indicando que as fibrilas colágenas possuem a bi-refringência intrínseca e a de forma, visto que as protofibrilas são localizadas somente na periferia. Randall (9) discorda da idéia de uma fibrila ôca, alegando que, se isto fôsse verdade, a fibrila deveria mostrar menor densidade do que de fato mostra. Como resultado dos presentes estudos, acreditamos que a fibrila é ôca, e entendemos com "ocosidade" a ausência de proteína ou outro material sólido e a presença de uma fase líquida no interior da fibrila. A fase líquida desaparece durante o processo de secagem na preparação da fibrila para o microscópio, deixando uma fibrila parcialmente achatada e com aparência de um colar de pérolas. Em cortes ultra-finos, as fibrilas aparecem ôcas devido à preservação da estrutura tridimensional e à perda de água durante a fixação. A forma geral da fibrila colágena é bem ilustrada numa série de fotografias tiradas do tendão da glândula venenosa posterior de *Bothrops* (Figs. 5 e 6). O tendão foi deixado em salina fisiológica a $4-6^{\circ}\text{C}$ durante 6 semanas para maceração; em seguida, lavado e triturado em água destilada, dessecado e sombreado com crômio. Percebe-se que algumas das fibrilas se fendem longitudinalmente, mostrando na região da fenda uma série de anéis incompletos (5A, 6A). Em outros, a orientação do corte da fibrila é de maneira que se pode observar a

extremidade ôca e quebrada (5A). E, ainda em outros, as extremidades das fibrilas são achatadas (5B) ou franjadas (6B), sugerindo que o material interno foi retirado durante o processo de secagem. Se, como acreditamos à base destas preparações, a fibrila tem um interior líquido, ou semi-líquido, os comentários de Randall não são mais válidos. Uma evidência adicional da estrutura anelar da fibrila é a sua extensibilidade. Sob a ação de tensão ao longo da fibrila única (o tendão todo não pode ser muito estendido, pois se quebra facilmente) a fibrila aumenta em comprimento, principalmente por mudança do comprimento da faixa clara, com pouca ou nenhuma alteração na faixa escura. Se a tensão for suficiente, os anéis parecem separar-se, quebrando a fibrila em pequenas unidades comparáveis aos sarcômeros de miofibrilas. Este processo pode ser observado de melhor maneira em fibrilas sob a tensão da película de parlódio quando esta última arrebenta dentro do microscópio eletrônico (compare Fig. 4 mostrando fibrilas tendinosas do rabo, não fixadas e sendo deformadas por tensão longitudinal devido à fratura da película), visto que a extensão de uma fibrila única por outros meios é extremamente difícil. Tais observações têm papel importante na visualização da disposição dos amino-ácidos nas cadeias polipeptídicas, visto que, para o colágeno, o modelo da cadeia alfa-beta de ceratina não pode ser aplicado (4, 29).

AÇÃO DA ÁGUA QUENTE SOBRE AS FIBRILAS

É bem conhecido que, sob ação prolongada de água quente, o colágeno se dissolve e se transforma em gelatina. Para o tendão existe uma temperatura característica de encolhimento, que depende do meio e do tratamento prévio do tendão (3). Para o tendão fresco em água, a temperatura é de 60° — 65° C. O tendão fresco, a esta temperatura, primeiramente sofre um encurtamento repentino acompanhado por um aumento no diâmetro e uma diminuição no período. Continuando o aquecimento, o tendão é lentamente dissolvido e toma uma estrutura amorfa, conforme foi indicado pela difração de raios X com ângulo baixo (3, 4). Extendemos estes estudos e observamos as alterações em fibrilas únicas por meio do microscópio eletrônico, usando tendão de rabo de rato. As fibrilas únicas, após 2 minutos em água destilada a 60°C, diminuem no comprimento e no período e aumentam no diâmetro, indicando, assim, que as alterações macroscópicas acima mencionadas são o resultado de alterações no nível fibrilar (Fig. 10A). A 40°C, nenhuma alteração na estrutura das fibrilas podia ser observada (Fig. 10B). A 60°C, após 2 minutos, as extremidades das fibrilas começam a perder as suas formas. Após uma exposição mais demorada, as estrias começam a desaparecer, demonstrando que a perda do espa-

ceamento longitudinal característico (revelado por difração de raios X com ângulo baixo) é acompanhada pela perda do período de 640 Å, pondo em evidência, dessa maneira, que os dois realmente são idênticos. Após exposição adicional, nesta temperatura, as fibrilas se dissolvem completamente. A 100°C, as alterações ocorrem com grande rapidez. Dentro de 2 minutos, as fibrilas são transformadas completamente em gelatina.

Nossos resultados obtidos com o tendão do rato concordam com os de Lelli (30) para o derma humana.

A ação da água quente pode ser interpretada como segue (4). As protofibrilas primeiramente são alteradas do estado ordenado, que normalmente ocorre na fibrila colágena intacta, para um estado desordenado. Com a prolongada exposição, a água quente altera as protofibrilas colágenas para moléculas livres de gelatina.

AÇÃO DA ÁCIDO ACÉTICO SOBRE O TENDÃO

Há anos, Nageotte (31) mostrou que o tendão do rabo de rato podia ser dissolvido em ácido acético diluído (10^{-4} molar), produzindo uma solução clara e muito viscosa. Esta observação foi extendida aos colágenos de diversas origens animais (compare Bear para referências) (4). O colágeno pode ser reprecipitado a partir da solução viscosa alterando-se a concentração salina por meios de diálise, ou diluindo-se com tampões adequados de pH definido (32, 34). O colágeno reprecipitado apresenta a mesma estrutura que o original, conforme demonstra a difração de raios X (33), i.e., o espaçamento de 640 Å, mas tem uma ordem interna menos regular. A compreensão do mecanismo da reprecipitação do colágeno a partir do estado solúvel, bem como o da reação de soluções colágenas com mucoproteínas (34), polisacáridos, glucoproteínas e derivados do ácido nucléico (7), que também produzem precipitados formados de fibrilas com períodos, é de maior importância para a obtenção de informações sobre o mecanismo da fibrogênese em tecidos.

Visto que as descrições na literatura das condições exatas para a dissolução e a reprecipitação do colágeno são incompletas (32), repetimos estas experiências com diversos tipos de colágeno de vários animais, variando a temperatura, a molaridade do ácido acético, o pH e a concentração iônica. Determinámos, desta maneira, as condições definidas necessárias para a precipitação de certos colágenos e descobrimos que alguns não se dissolvem, ou então se dissolvem com dificuldade, e que a temperatura desempenha papel importante no processo.

A. Tendão do rabo de rato. — Quando o tendão do rabo de rato é colocado, sob condições estéreis, em qualquer volume de ácido acético molar 10^{-4} , em frascos tampados, a $4-5^{\circ}$, ou a 37°C , somente uma pequena fração do tendão é dissolvida. Alterações macroscópicas, porém, podem ser observadas, variando conforme a temperatura. Após esforços repetidos, conseguimos obter melhor dissolução do que 95%, congelando, primeiramente, o tendão com gelo seco, cortando-o, por meio de um micrótomo, em seções de espessura de 30-40 micra e colocando-o, finalmente, no ácido acético a 37° durante 6 horas, em condições estéreis. A entrada em solução foi favorecida por agitações periódicas, com pérolas de vidro. Repetindo o processo sem fazer os cortes, obtivemos igualmente bons resultados. Desta maneira, o congelamento prévio, de algum modo, permite uma dissolução mais fácil, talvez por ação sobre a substância básica (ground substance) que envolve o colágeno. O tendão congelado não se dissolveu a $4-5^{\circ}\text{C}$. As quantidades relativas do tendão e do ácido acético não são críticas. Nas experiências finais usamos uma proporção de uma parte de tendão úmido a cinco partes de ácido acético a 10^{-4} molar, visto que proporções mais altas produzem soluções demasiadamente viscosas para serem filtradas no filtro de Seitz. A solução viscosa de colágeno assim produzida foi filtrada num filtro de Seitz, afim de eliminar qualquer material suspenso ou quaisquer fibrilas não dissolvidas e examinado o filtrado no microscópio eletrônico. Nenhuma estrutura fibrilar podia ser encontrada na solução final.

O processo de reprecipitação dependeu em grande parte da temperatura. Os melhores precipitados foram produzidos, usando-se uma parte de solução de colágeno para cinco partes de tampão de ácido cítrico-citrado de sódio a 0,1 M por volume, a pH 4,9. A $4-5^{\circ}\text{C}$, não se pode observar precipitado na mistura de tampão e colágeno nem após uma semana. Centrifugação a baixa velocidade (Servall, 5000 rpm, 2 horas) não separou qualquer precipitado fibrilar observável. Quando, porém, a solução de colágeno e a do tampão, ambos previamente colocados à temperatura do ambiente, são misturados e deixados em temperatura do ambiente, uma precipitação completa se forma dentro de duas horas. Este precipitado branco, gelatinoso, pode ser facilmente separado do líquido sobrenadante por meio de decantação ou por centrifugação. Para o exame no microscópio eletrônico, os sais foram retirados por repetidas lavagens com água destilada e recentrifugação. O precipitado final, suspenso em água destilada, em seguida foi examinado de maneira usual. Achou-se um conteúdo de fibrilas colágenas características do mesmo período como aquelas nas fibrilas originais. Em geral, as fibrilas reprecipitadas mostraram contornos nítidos, mas as extremidades apareceram um tanto franjadas. Em várias preparações apareceram diversos tipos de fibrilas, variando de fibrilas curtas, não estriadas (Fig. 7A), a fibrilas mais compridas, não estriadas (Fig. 7B), fibrilas

mais compridas estriadas (Fig. 8) e, finalmente, fibrilas definitivas (Fig. 9). É uma tentação sugerir que estas representam fases na formação da fibrila colágena estriada, i.e., que a estriação transversal ocorre somente depois que a fibrila alcança um certo comprimento e possivelmente uma certa tensão.

B. Tendão da glândula salivar. — Tentativas para repetir a experiência acima, com o tendão posterior das glândulas labiais da *Constrictor constrictor*, falharam, quando foram usados tempos de contacto mais prolongados. Esta diferença no comportamento é inexplicável, uma vez que ambos os tendões, o do rabo do rato e o da glândula, são tendões livres de outros tecidos. O tendão da glândula mostrou um certo grau de inchamento após o tratamento de 24 horas com o ácido acético. Fibrilas fixadas em formol a 5%, trituradas em água destilada e examinadas de maneira usual no microscópio eletrônico, mostraram um aumento no período de estrias transversais, com diminuição na nitidez dos seus contornos.

C. Tendões de várias partes do corpo. — As duas experiências prévias sugeriram fortemente que o poder dissolvente do ácido acético depende do animal, da região do corpo de onde o tendão é tirado e do pre-tratamento. Sem congelamento prévio do tendão, a ação do ácido acético parece estar limitada ao inchamento, cujo grau e tipo dependem da temperatura.

Para provar esta tese, tendões foram tirados do rabo, do dorso e das patas de ratos albinos. Pedacos de aproximadamente o mesmo tamanho de cada região foram colocados, sem congelamento prévio, em ácido acético a 10^{-4} molar, sob condições estéreis, a 4° e 37° C, e foram assim mantidos durante 24 horas. Subseqüentemente foram fixados em formol a 5%, triturados em água destilada e preparados para o microscópio eletrônico. Em um grupo das experiências, o ácido acético foi colocado à temperatura desejada antes de adicionar o tendão. Numa segunda série, os tendões foram colocados no ácido acético a temperatura ambiente e em seguida ajustado às temperaturas desejadas. Os resultados diferiram consideravelmente, como será demonstrado abaixo.

Na temperatura mais baixa (4°C), os tendões incham surpreendentemente e ficam transparentes, tendo a aparência de uma geléia rígida, e os tendões não perdem a sua forma nem após agitação (Fig. 11). A 37°C, de outro lado, o tendão incha menos, fica opaco e perde a sua aparência sedosa. As fibrilas dos tendões levadas gradualmente de 37° a 4°, apareceram, no microscópio eletrônico, como fibrilas em *zig-zag*, de período curto e irregular (Fig. 12). Este fenômeno foi visto principalmente nos tendões do rabo e do dorso. Em algumas das fibrilas, em *zig-zag*, o período foi mantido, em outras desapareceu. Não foram observadas fibrilas, em *zig-zag* a 37°C.

O significado da formação do tipo *zig-zag* irregular de fibrila não fica esclarecido por estes estudos. Parece estar relacionado com o efeito da tem-

peratura na mesma, uma vez que os tendões colocados diretamente em ácido acético previamente resfriado a 4°C, não mostram a formação de *zig-zag*. Assim, é evidente que é causada pelo decréscimo gradual da temperatura. Notável era também o fato de que somente à temperatura baixa perderam-se as estrias transversais, enquanto à temperatura mais alta as estrias continuaram observáveis, mesmo quando a fibrila aparentemente se estava desintegrando ao longo do eixo longitudinal. De fato, o aspecto das fibrilas após o tratamento com ácido acético a 37°C é semelhante àquele após o tratamento com água a 60°C.

AÇÃO DE ÁLCALE DILUIDO SOBRE O TENDÃO

Outrora se acreditava que álcale diluído não ataca o colágeno. Não obstante, Gross (16) mostrou que uma solução de hidróxido de sódio a 0,1 N causa uma fragmentação das fibrilas colágenas na direção transversal e, eventualmente, a redução de algumas fibrilas a massa amorfa. Tentativas de repetir as experiências de Gross, com o tendão das glândulas labiais de *C. constrictor*, não tiveram sucesso. As fibrilas colágenas foram isoladas, como previamente descrito, e suspensas em solução de hidróxido de sódio a 10⁻⁴N. Testemunhos foram feitos por suspender outros tendões em água destilada. Deixaram-se ambos a 37°C e a 0°C durante 24 horas e em seguida examinaram-se no microscópio eletrônico. Quanto podia ser determinado pela micrografias, não houve alterações. Estas experiências mostram, pois, que (1) o álcale não tem efeito sobre o tendão, como previamente se acreditava, ou (2) que, como se encontra em outras experiências acima mencionadas, o efeito de um agente sobre o colágeno depende em grande parte do animal e da região de onde o tendão é tirado. Para o esclarecimento deste ponto, novos trabalhos experimentais estão em andamento.

RESUMO

Fibrilas colágenas de vários órgãos do sapo, de répteis, do pombo, do rato e do homem, foram estudadas, com auxílio do microscópio eletrônico. Observações foram feitas sobre a influência de extensão, de fixadores, sais, ácidos, álcales e de temperatura sobre a estrutura da fibrila. Igualmente, foram estudadas as condições necessárias para a dissolução e reprecipitação de colágeno.

As fibrilas normais de vários órgãos de diversos animais mostraram um período idêntico, mas variaram consideravelmente nos diâmetros. A variação

era mais acentuada em certos animais e órgãos do que em outros; por exemplo, as fibrilas da língua do lagarto eram extremamente uniformes, enquanto aquelas do rabo do jacaré variavam muito.

As fibrilas foram observadas em estado fresco ou fixadas em formol, ou nos líquidos de Bouin e de Zenker. Em todos os casos, o período permaneceu uniforme, mas o diâmetro das fibrilas pareceu variar com o fixador. A maior uniformidade foi obtida com formol a 5%.

Quando sujeita a tensão, a fibrila aumenta no comprimento, principalmente na faixa clara. Com tensão contínua, a fibrila parte-se em unidades individuais com comprimento de apenas duas faixas.

Tendões expostos a salina fisiológica por longos períodos de tempo, fendem-se facilmente em direção longitudinal, durante a *trituração*, e mostram um achatamento considerável quando secados nas grades. Em muitas fibrilas assim tratadas podem ser vistos anéis incompletos na periferia da fibrila, ou um interior ôco nas extremidades. Acreditamos, porisso, que a fibrila, normalmente, possui um interior líquido, ou semi-líquido.

A 40°C, as fibrilas não mostram alterações em água. Dentro de 2 minutos de exposição à água a 60°C, as fibrilas começam a perder a sua forma. Continuando a exposição, as fibrilas ficam mais curtas, aumentam no diâmetro, com encurtamento conseqüente do período, dissolvem-se lentamente e se transformam, finalmente, em massa gelatinosa, amorfa. A 100°C, estas alterações ocorrem dentro de 2 minutos. A água quente parece alterar as protofibrilas coígenas a moléculas livres de gelatina, passando a fases nas quais as protofibrilas são alteradas do estado ordenado a um estado desordenado.

A temperatura desempenha papel importante na dissolução e na reprecipitação das fibrilas. Um congelamento prévio dos tendões era necessário para causar sua dissolução no ácido acético. A 4-5°, a dissolução é extremamente lenta; a 37°C, bem rápida. A 4-5°, a reprecipitação não ocorre dentro de uma semana, enquanto a 37°C é completa dentro de 2 horas.

Fibrilas dissolvidas em ácido acético e reprecipitadas em tampão de citrato mostraram diversas fases de reformação. Acredita-se que a sequência é (1) fibrilas curtas, não estriadas, (2) fibrilas compridas, não estriadas, (3) fibrilas compridos, estriadas. Desta maneira, parece que um certo comprimento da fibrila e uma certa tensão são necessários para a formação das estrias nas fibrilas reprecipitadas.

Tendões do rabo, do dorso e das patas do rato branco mostraram diferentes respostas ao mesmo tratamento. Tentativas de dissolver e reprecipitar o tendão posterior das glândulas labiais de *Constrictor constrictor*, não foram bem sucedidas. Desta maneira, achamos que as condições necessárias para a dissolução

e a reprecipitação de fibrilas colágenas variam com o animal e o órgão de origem.

Tendões não previamente congelados, quando adicionados a ácido acético previamente resfriado a 4°C, incham e ficam transparentes, mas permanecem lineares em forma. Aquêles colocados em ácido acético a 37°C e em seguida resfriados a 4°C, mostram uma forma de *sig-zag*. A 37°C, não são formados *sig--zags*.

Álcale diluído pareceu não ter efeito sobre o tendão de *Constrictor constrictor*, nem a 4° nem a 37°C.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o auxílio técnico de Sr. Adolpho Brunner, Jr. e Srta. Cecilia Doneux. O trabalho foi favorecido, em parte, por subsídios da Fundação de Rockefeller e do Conselho Nacional de Pesquisas.

TABELA I

INFLUÊNCIA DE VARIOS FIXADORES SOBRE O TENDÃO DA GLANDULA DE VENENO DA SERPENTE.

Fixador	Não-fixado	Formol 5%	Bouin	Zenker
Período (Å)	660	660	660	660
Comprimento (A)	1000-1600	1400-2000	830-2600	1100-1300

TABELA II
PERÍODOS E DIÂMETROS DE FIBRILAS COLÁGENAS DE VÁRIOS
ANIMAIS (em Å)

Orgão animal	Serpente	Lagarto	Jacaré	Sapo	Pombo	Ser Humano
Obliquo externo				d=798 p=630	d=798 p=600	d=798 p=570
Coração	d=1100 p=600					
Temporalis	d=630 p=590					
Hioglosso	d=600 p=600	d=640-900 p=640				
Tendão da glan- dula de ve- neno	d=1400-2000 p=660					
Veia	d=800 p=630					
Vas deferens	d=630 p=600					
Retrator do hemipenis	d=900 p=600					
Cauda			d=640-1400 p=640			
Lingua		d=600 p=590				

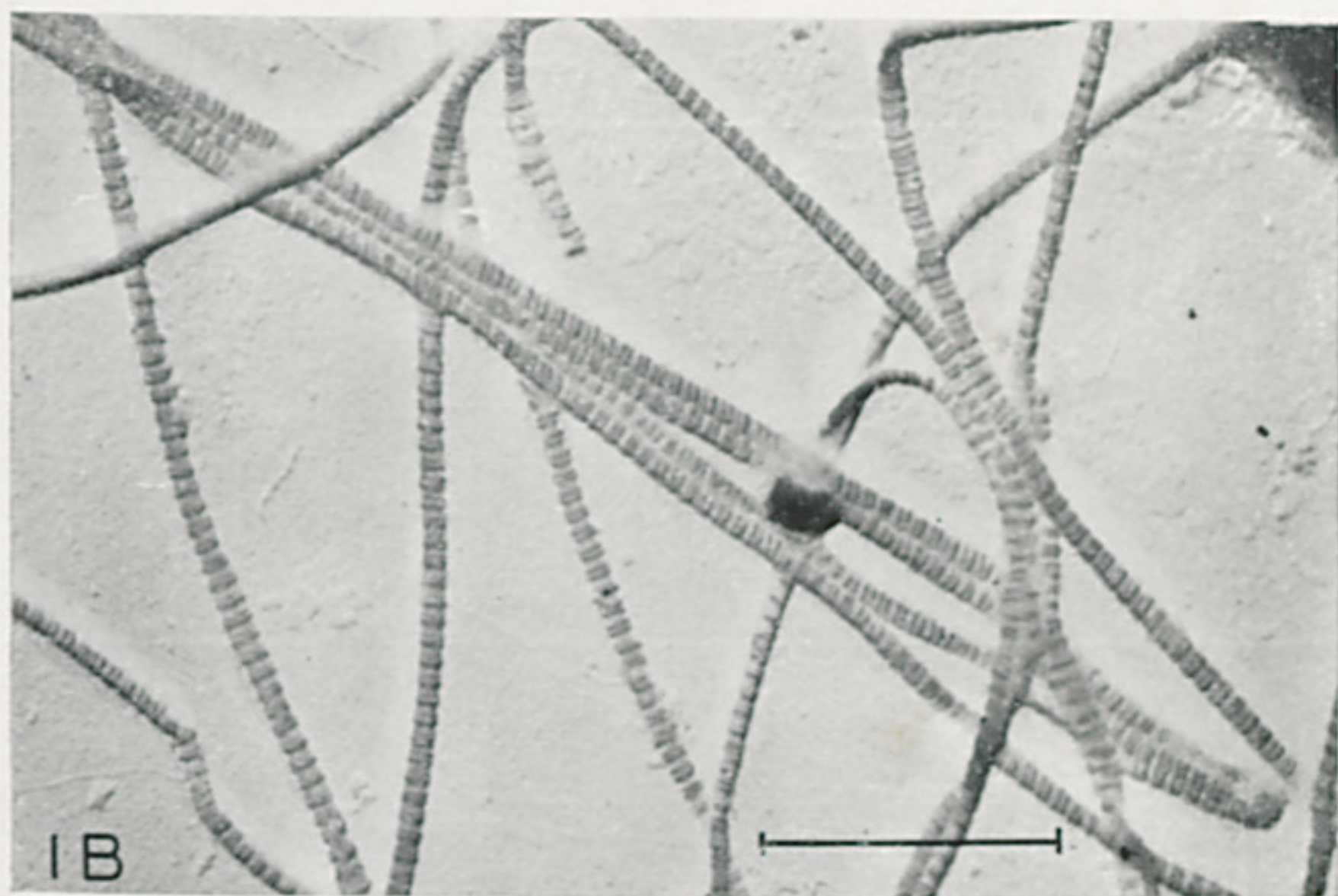
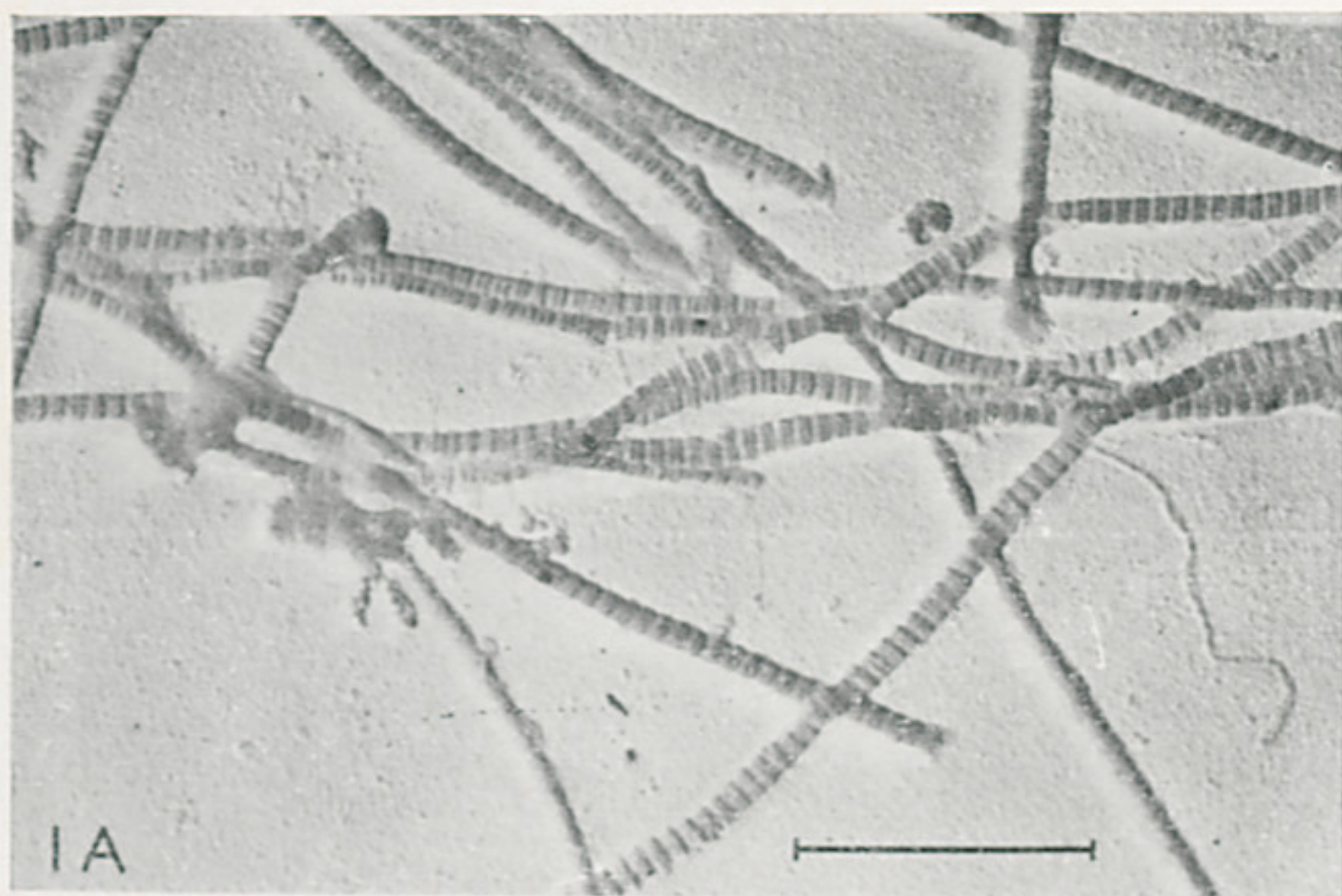


FIG. 1 A, B. — Fibrilas colágenas normais do retrator do hemipenis de *Constrictor constrictor amarali*. Fixadas em formol.

FIG. 1 A, B. — Normal collagen fibrils from retractor of hemipenis of *Constrictor constrictor amarali*. Formalin fixed.

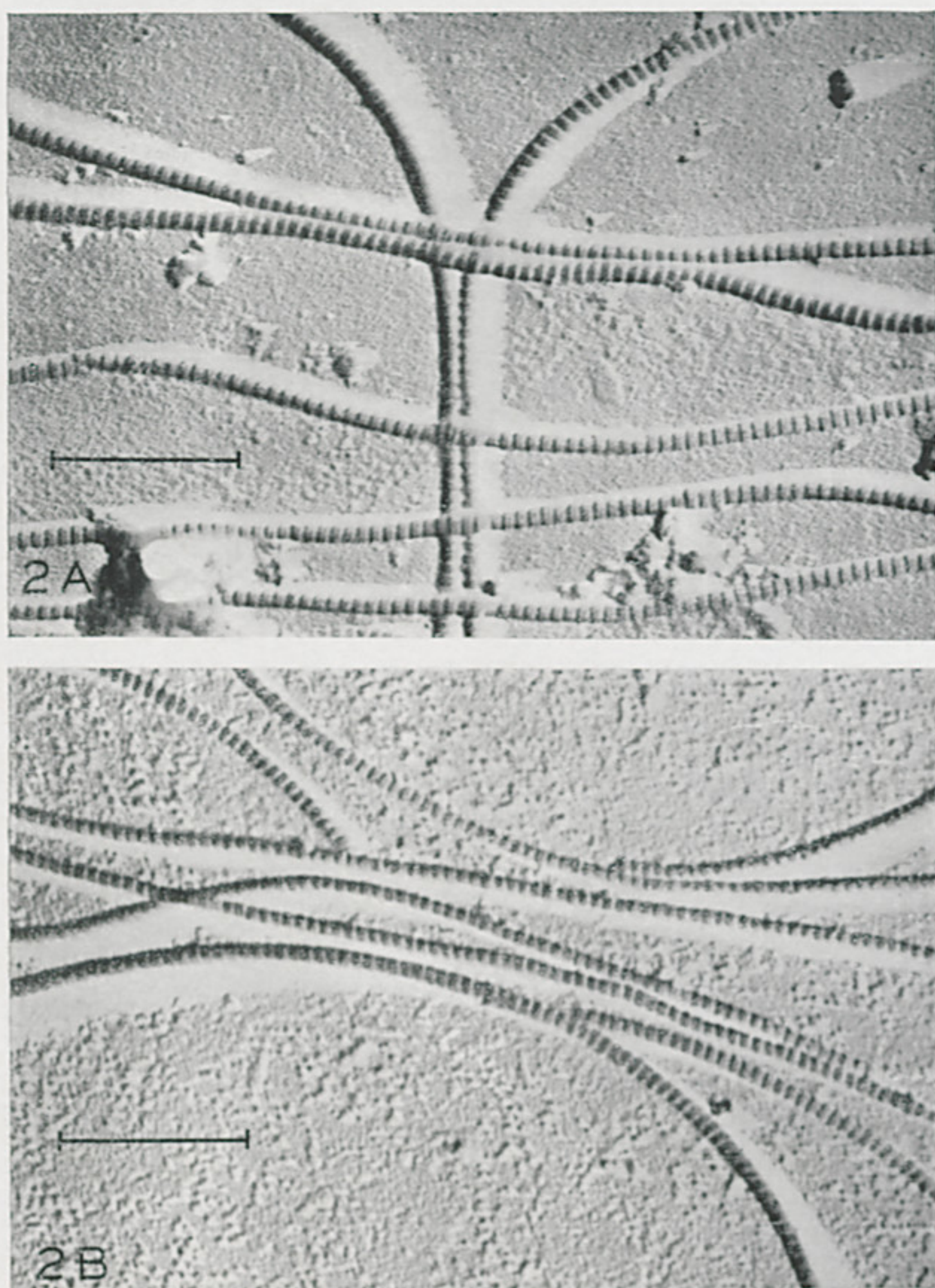


FIG. 2. — A. Fibrilas colágenas normais de retractor do hemipenis de *Constrictor*, fixadas no líquido de Zenker. — B. Fibrilas colágenas normais do retractor do hemipenis de *Constrictor*, fixadas no líquido de Bouin.

FIG. 2 — A. Normal collagen fibrils from *Constrictor* hemipenis retractor, fixed in Zenker's fluid. — B. Normal collagen fibrils from *Constrictor* hemipenis retractor, fixed in Bouin's fluid.

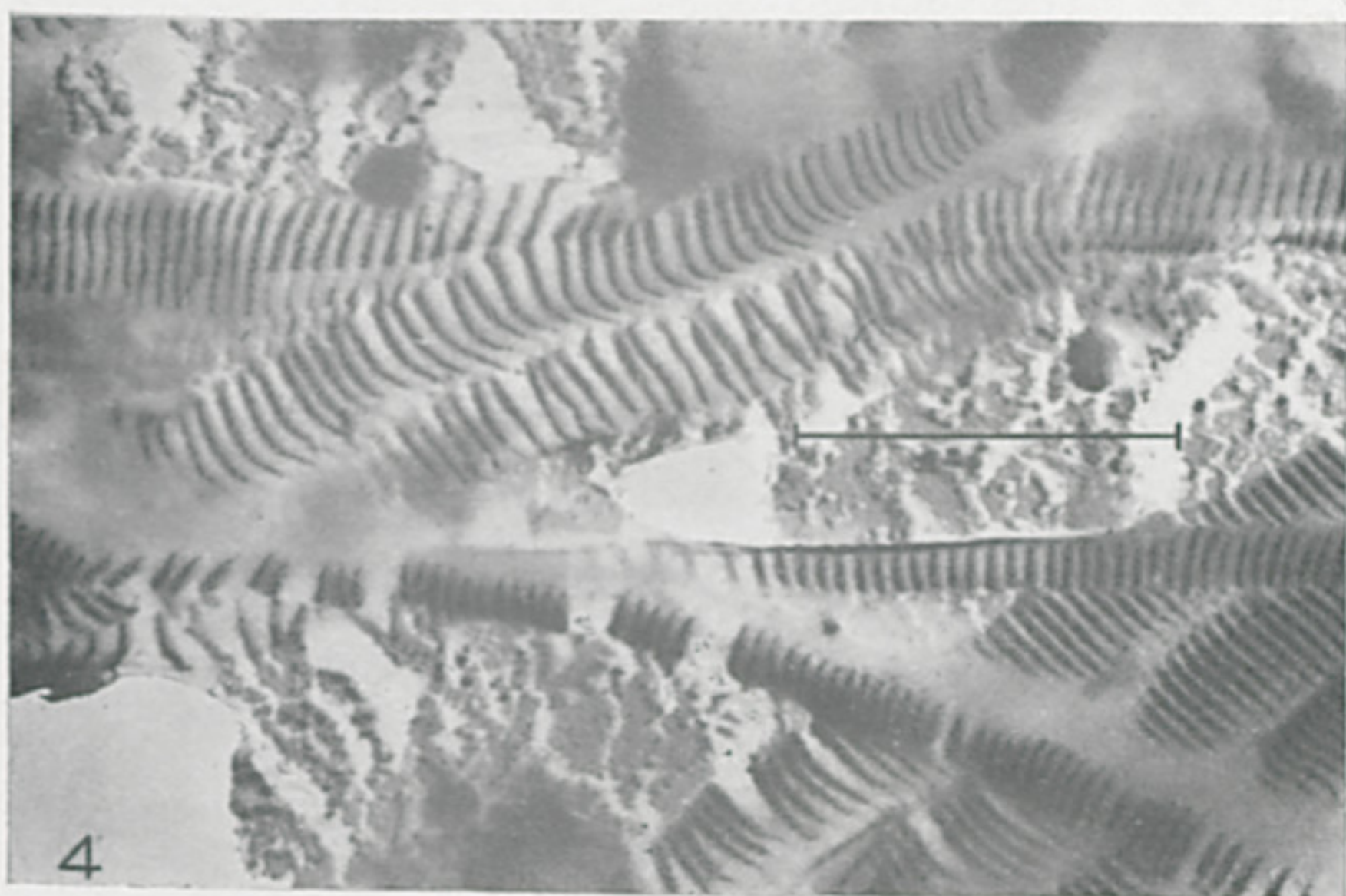
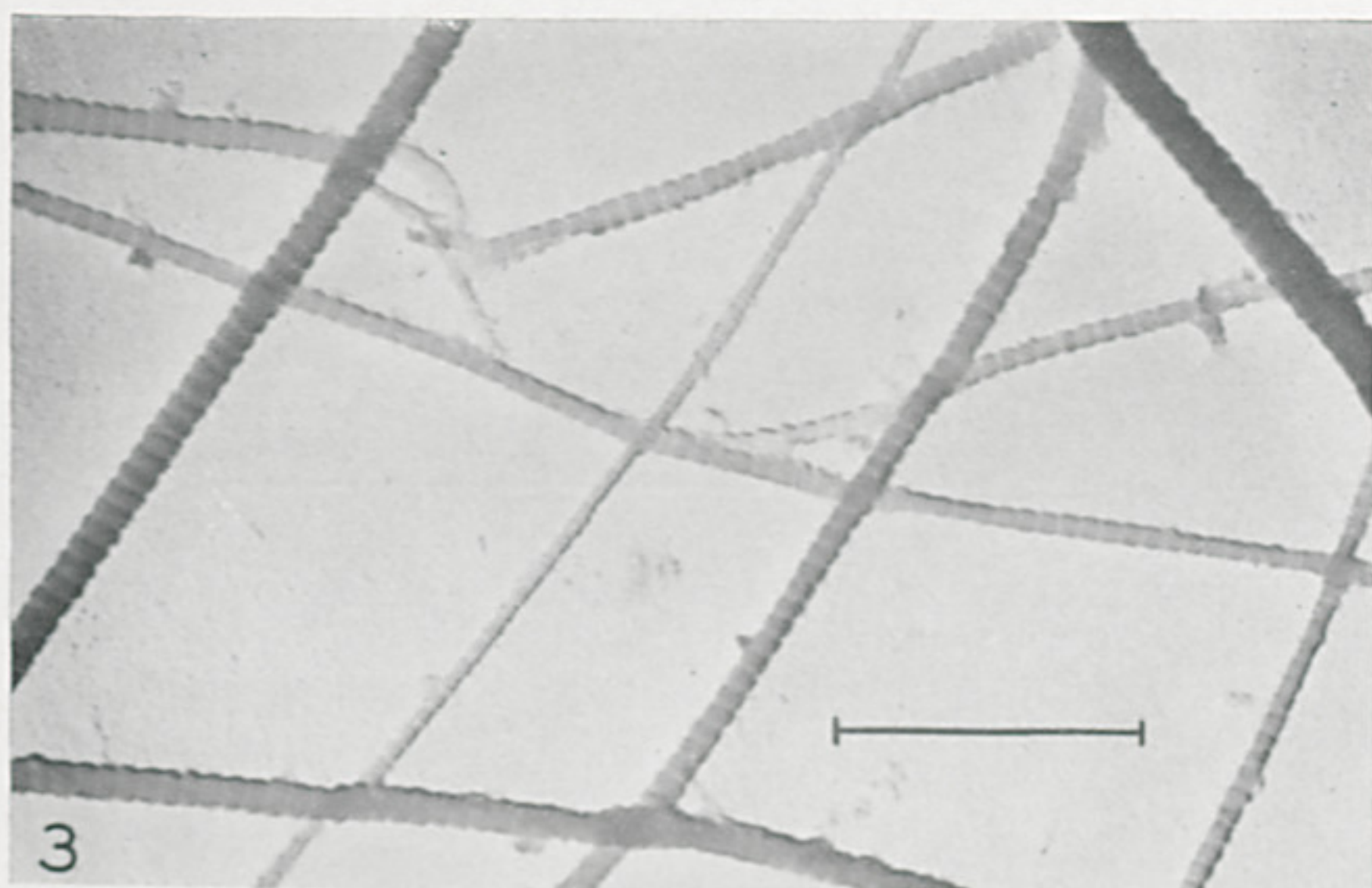


FIG. 3 — Fibrilas colágenas do rabo de jacaré, mostrando variação no diâmetro.

FIG. 4 — Fibrilas colágenas do tendão dorsal do rato, mostrando a influência de extensão.
Não fixadas.

FIG. 3. — Collagen fibrils from tail of caiman, showing variation in diameter.

FIG. 4. — Collagen fibrils from dorsal tendon of rat, showing influence of stretch.
Unfixed.

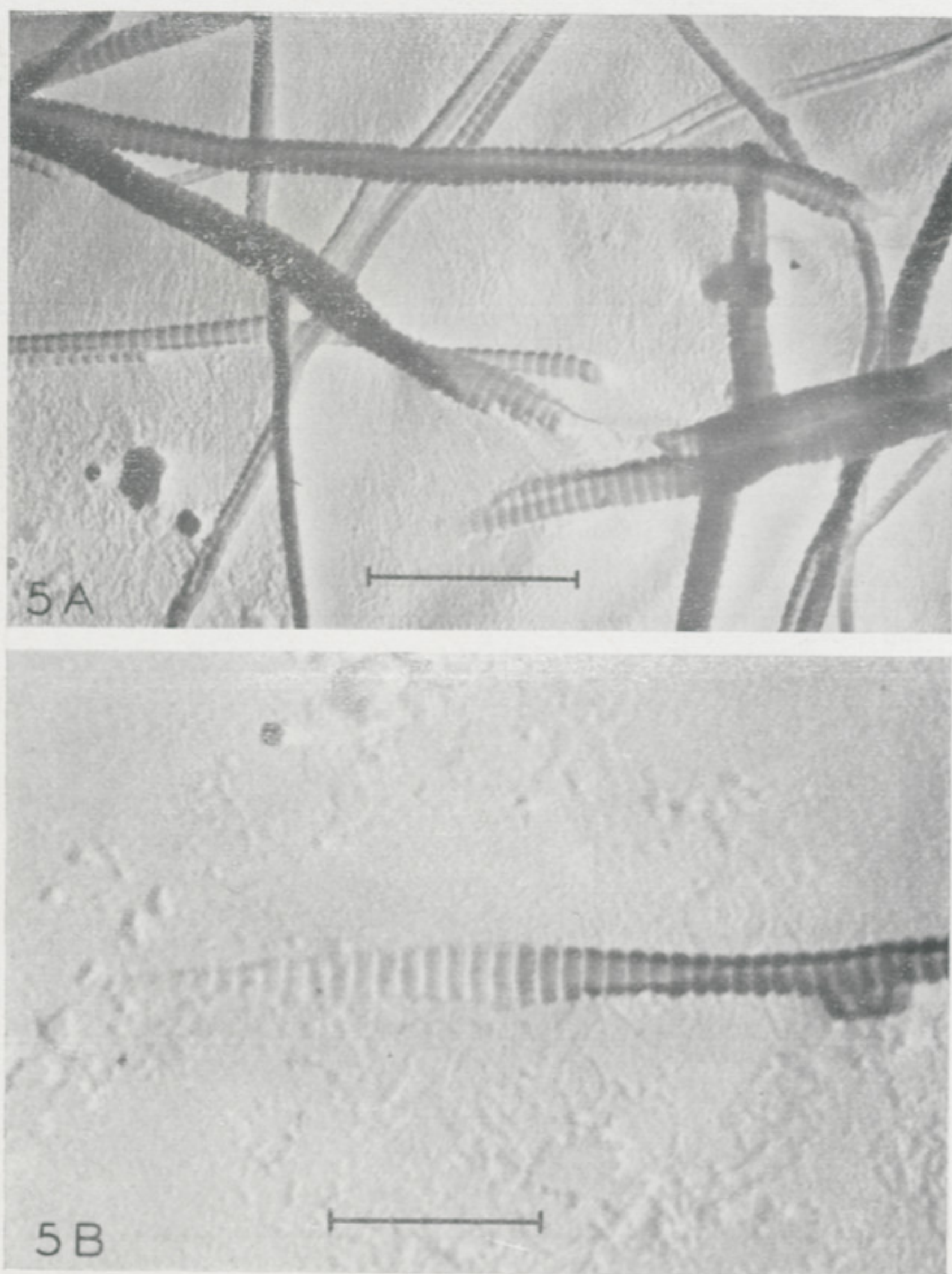


FIG. 5 A e B. — Fibrilas do tendão posterior da glândula venenosa de *Bothrops alternata* após 1 1/2 meses em salina a 4-5°C.

FIG. 5 A and B. — Fibrils from posterior tendon of poison gland of *Bothrops alternata* after 1 1/2 months in saline at 4-5.° C.

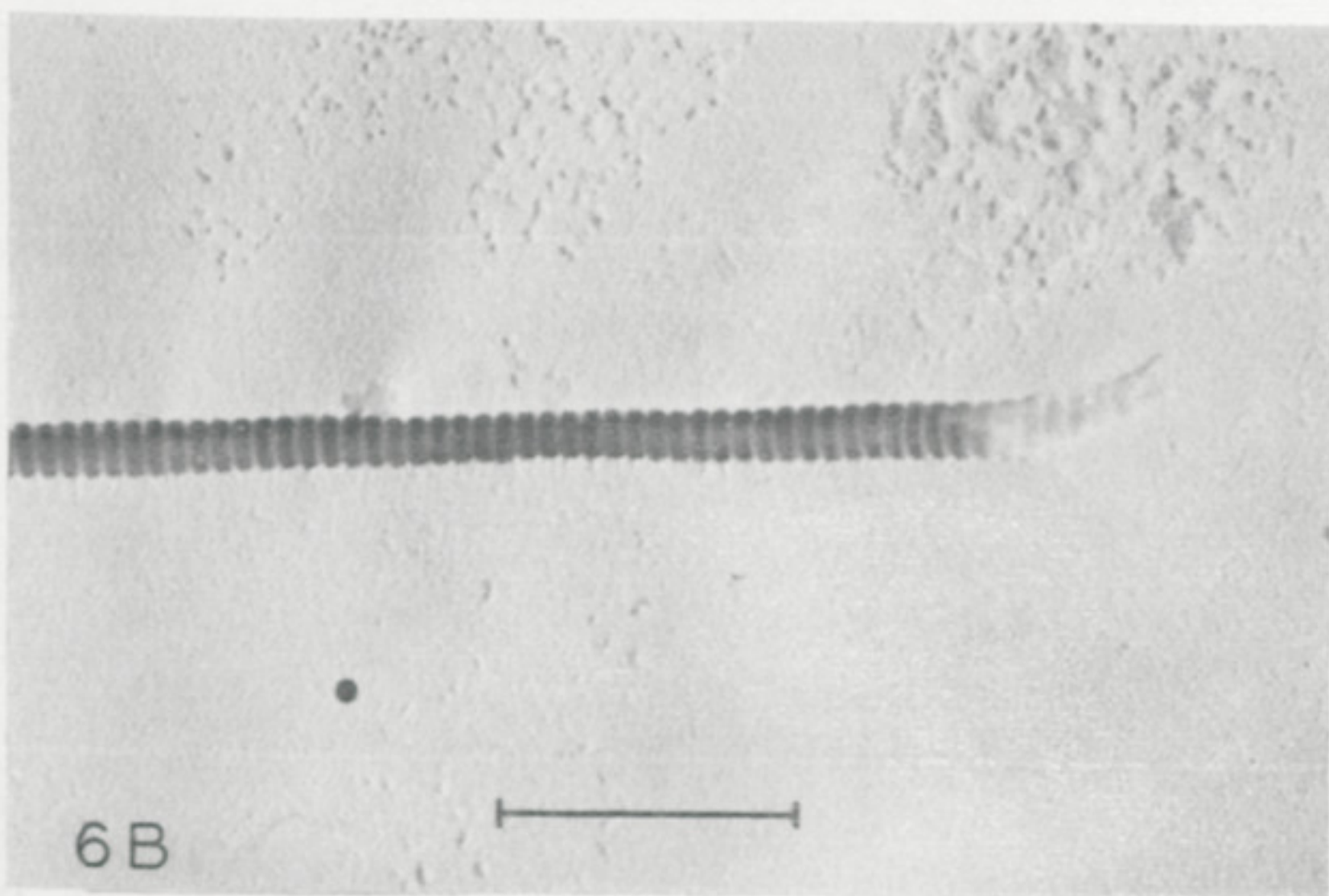
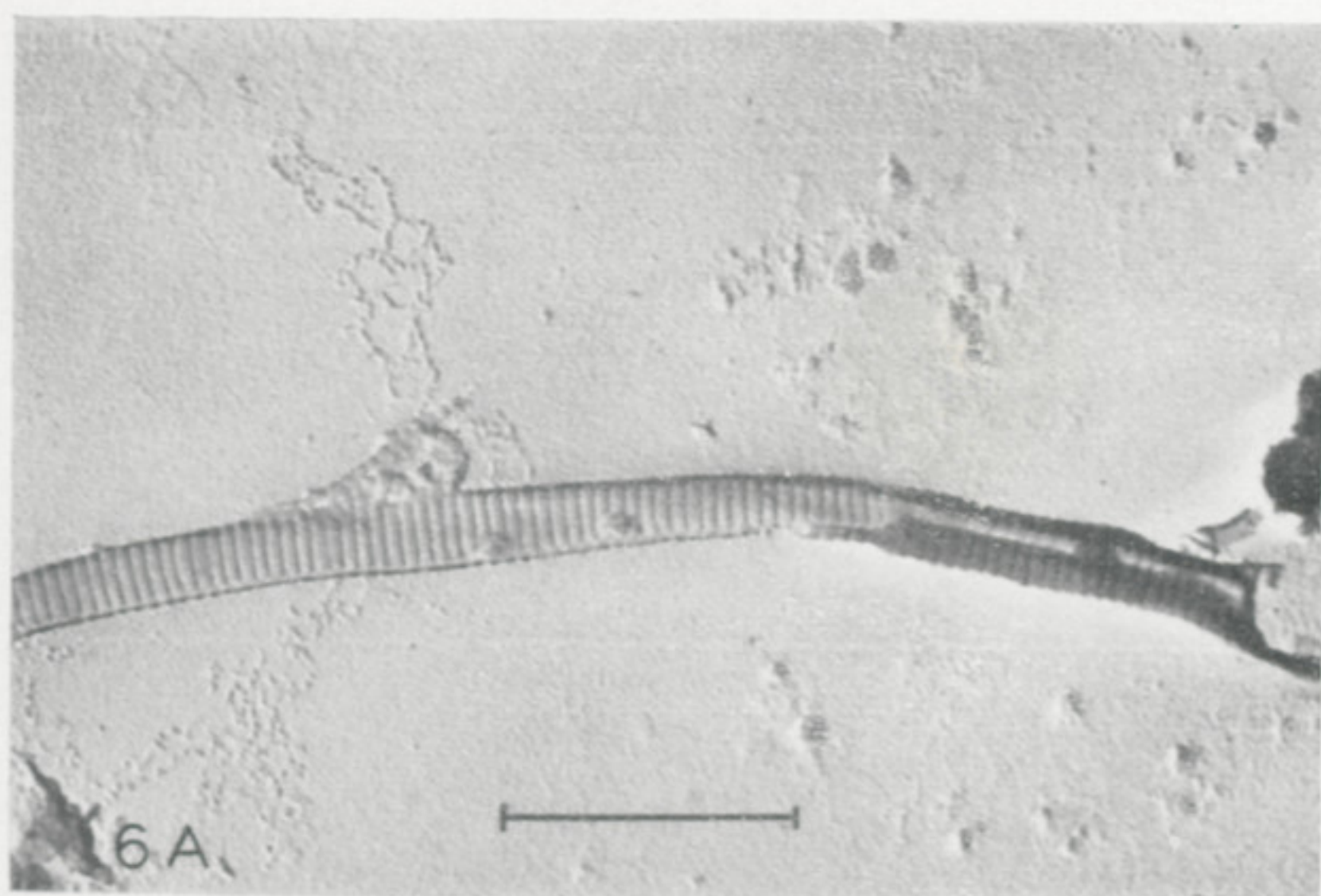


FIG. 6 A e B. — Fibrilas do tendão posterior da glandula venenosa de *Bothrops alternata* após 1 1/2 meses em salina a 4-5°C.

FIG. 6 A and B. — Fibrils from posterior tendon of poison gland of *Bothrops alternata* after 1 1/2 months in saline at 4-5°C.

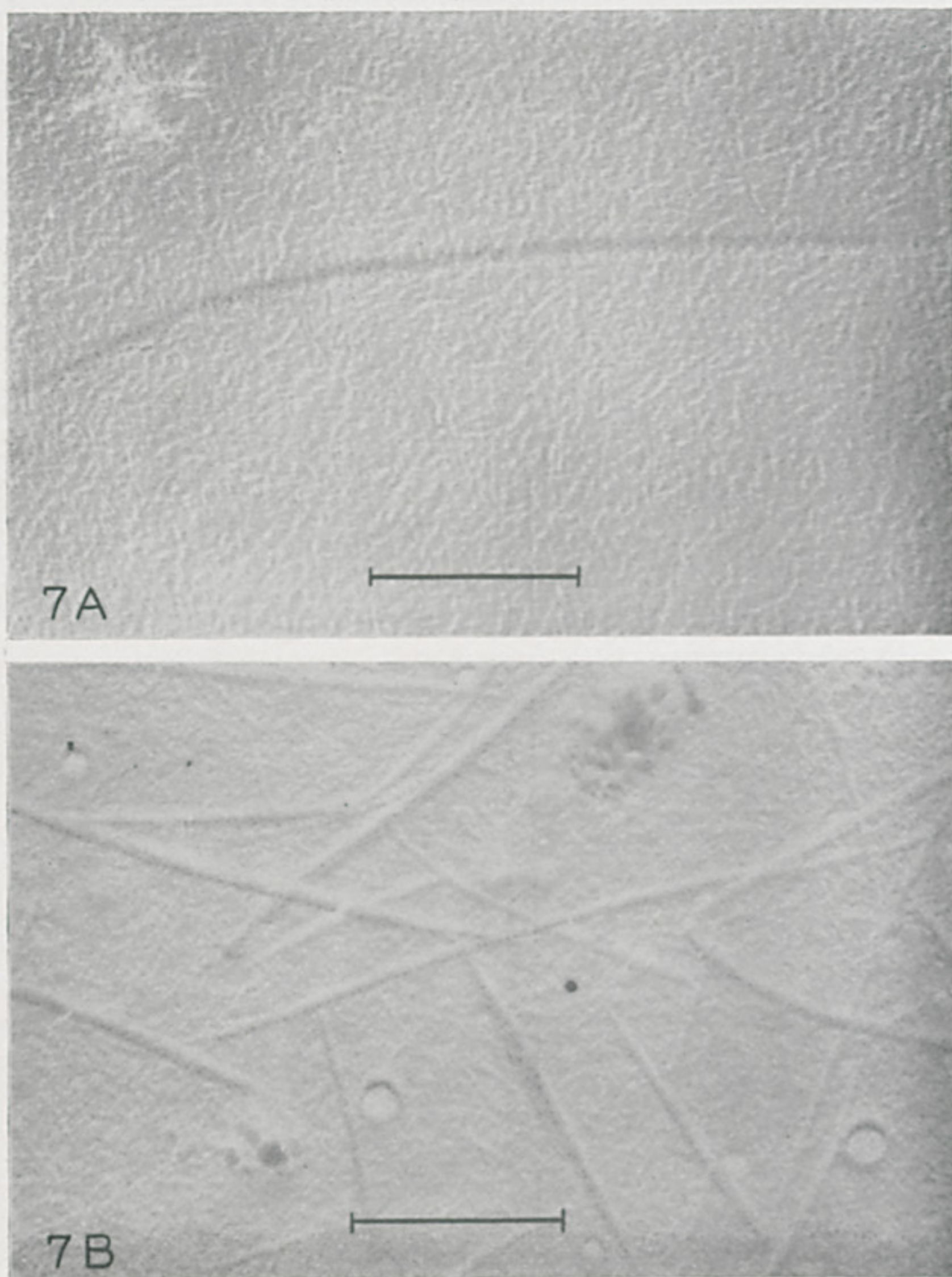


FIG. 7. — A. Fase inicial na formação de fibrilas reprecipitadas; na maioria fibrilas curtas, não estriadas. — B. Fase mais adiantada, mostrando fibrilas mais compridas, não estriadas.

FIG. 7 — A. Early stage in formation of reprecipitated fibrils; mostly short, non-striated fibrils. — B. Later stage showing longer, non-striated fibrils.

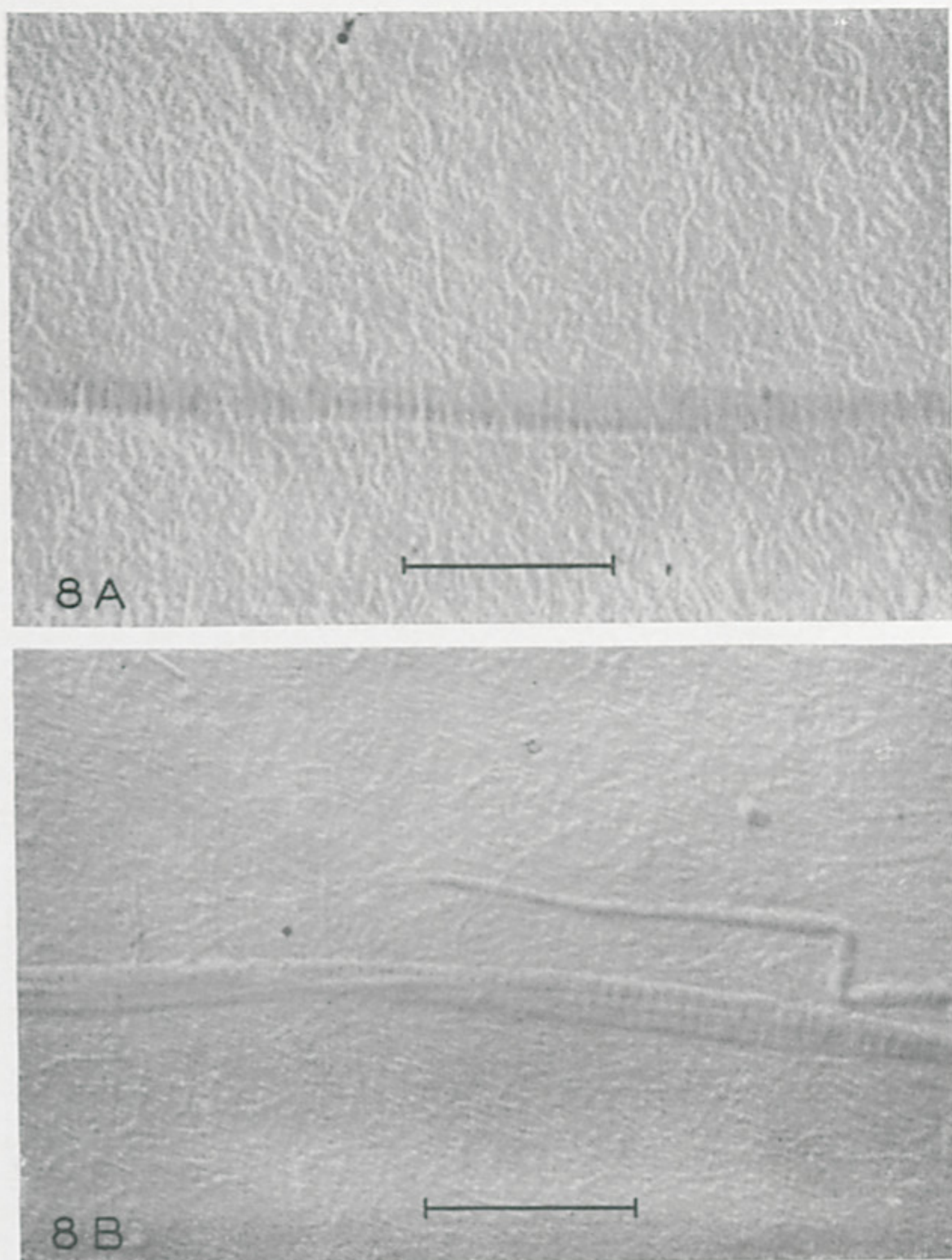


FIG. 8 A e B. — Fases intermediárias da formação de fibrilas reprecipitadas, mostrando algumas fibrilas compridas, estriadas.

FIG. 8 — A and B. — Intermediate stages of formation of reprecipitated fibrils, showing several, long, striated fibrils.

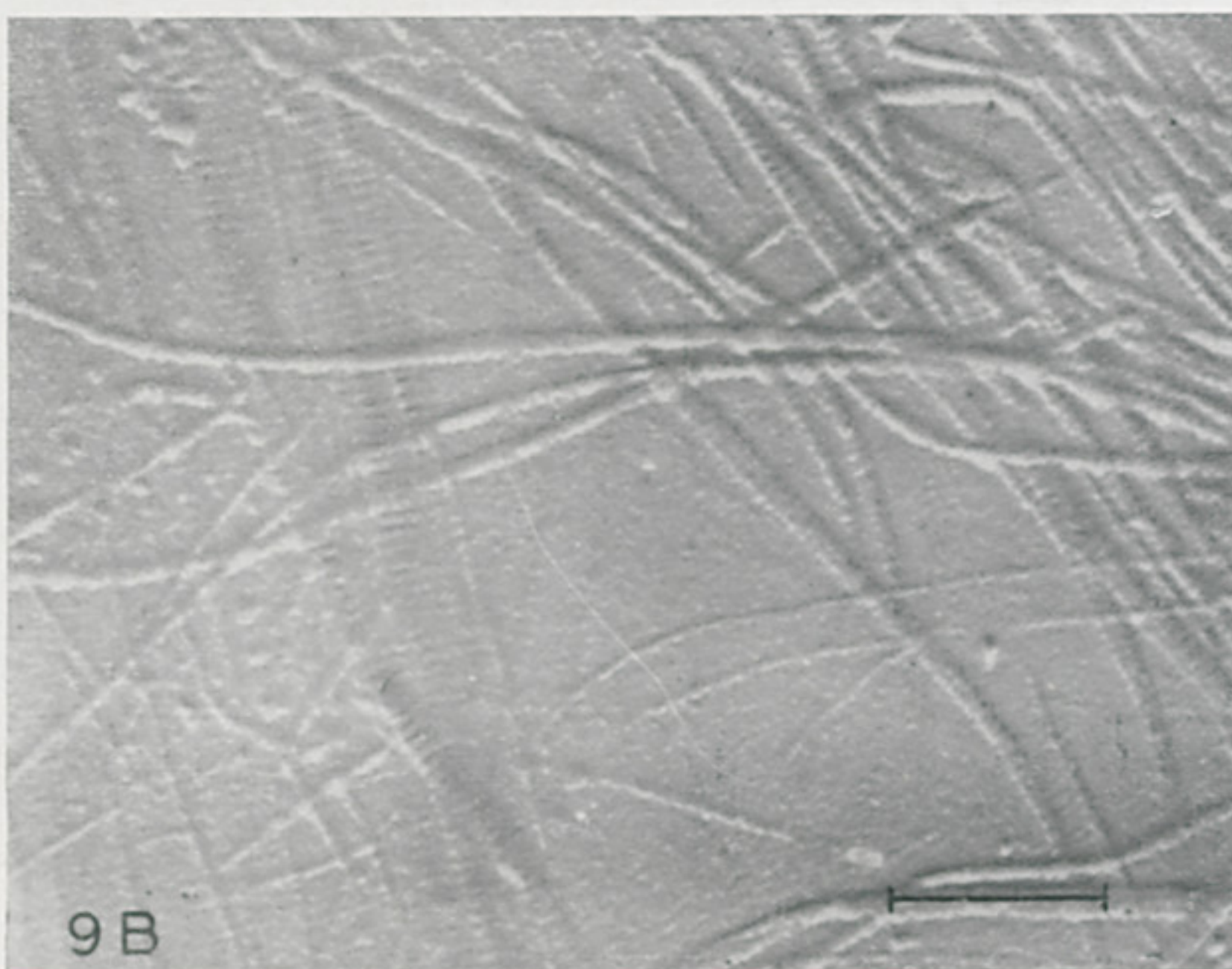
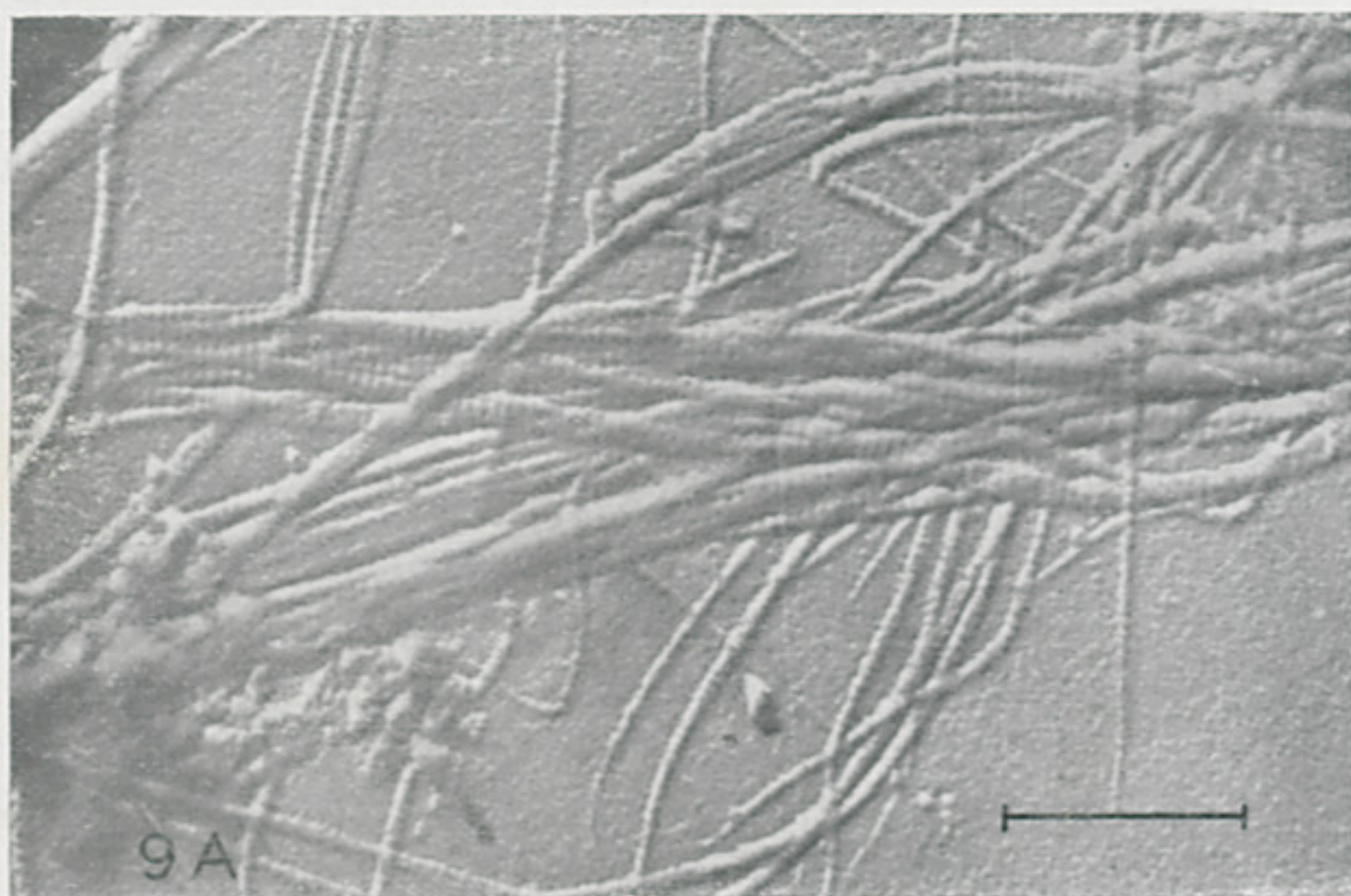


FIG. 9 A e B. — Fases finais na formação de fibrilas reprecipitadas; essencialmente fibrilas todas compridas, estriadas, possuindo período igual àquele das fibrilas originais antes do tratamento.

FIG. 9 — A and B — Final stages in formation of reprecipitated fibrils; essentially all long, striated fibrils, having period equal to that of the original fibrils before treatment.

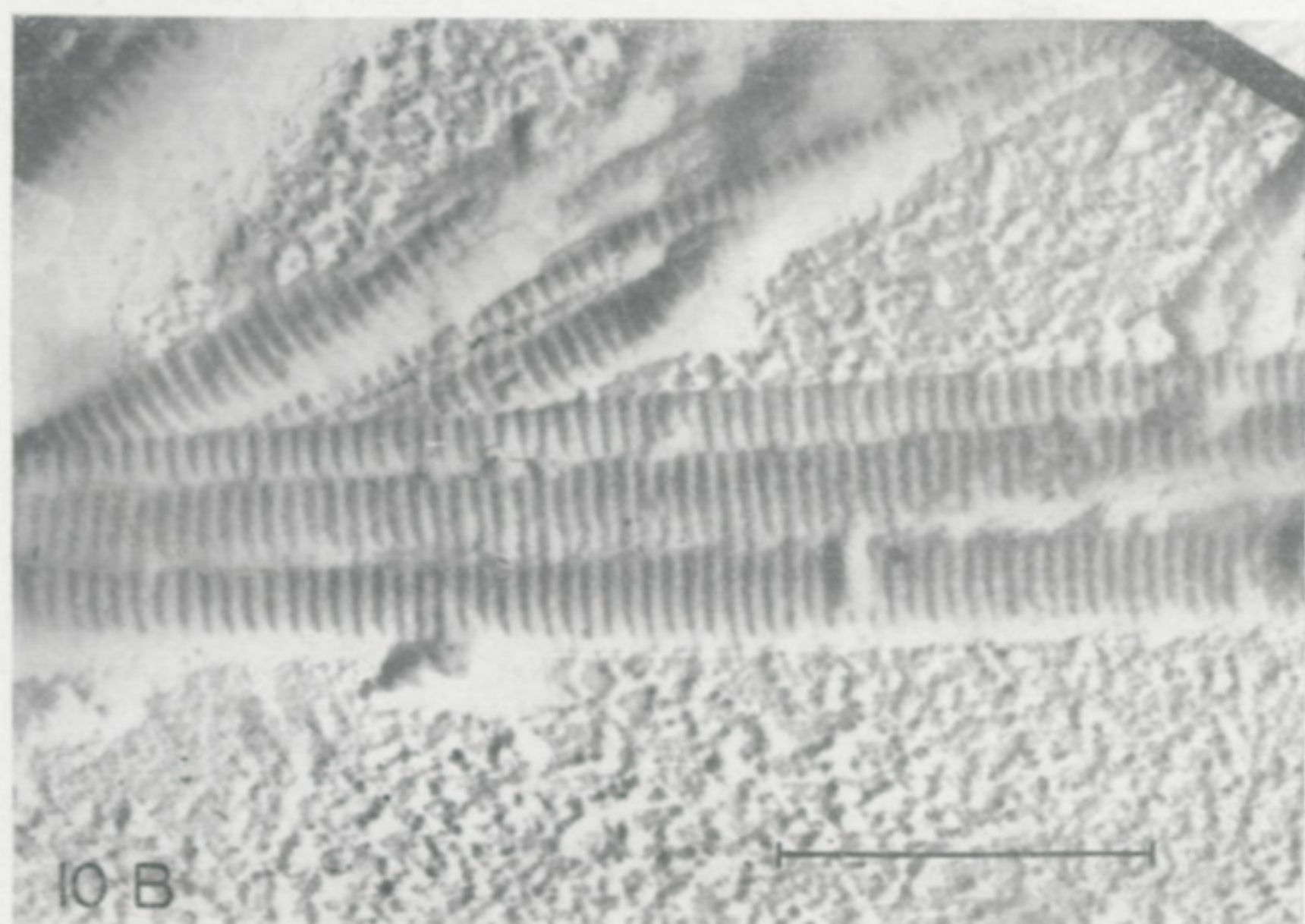
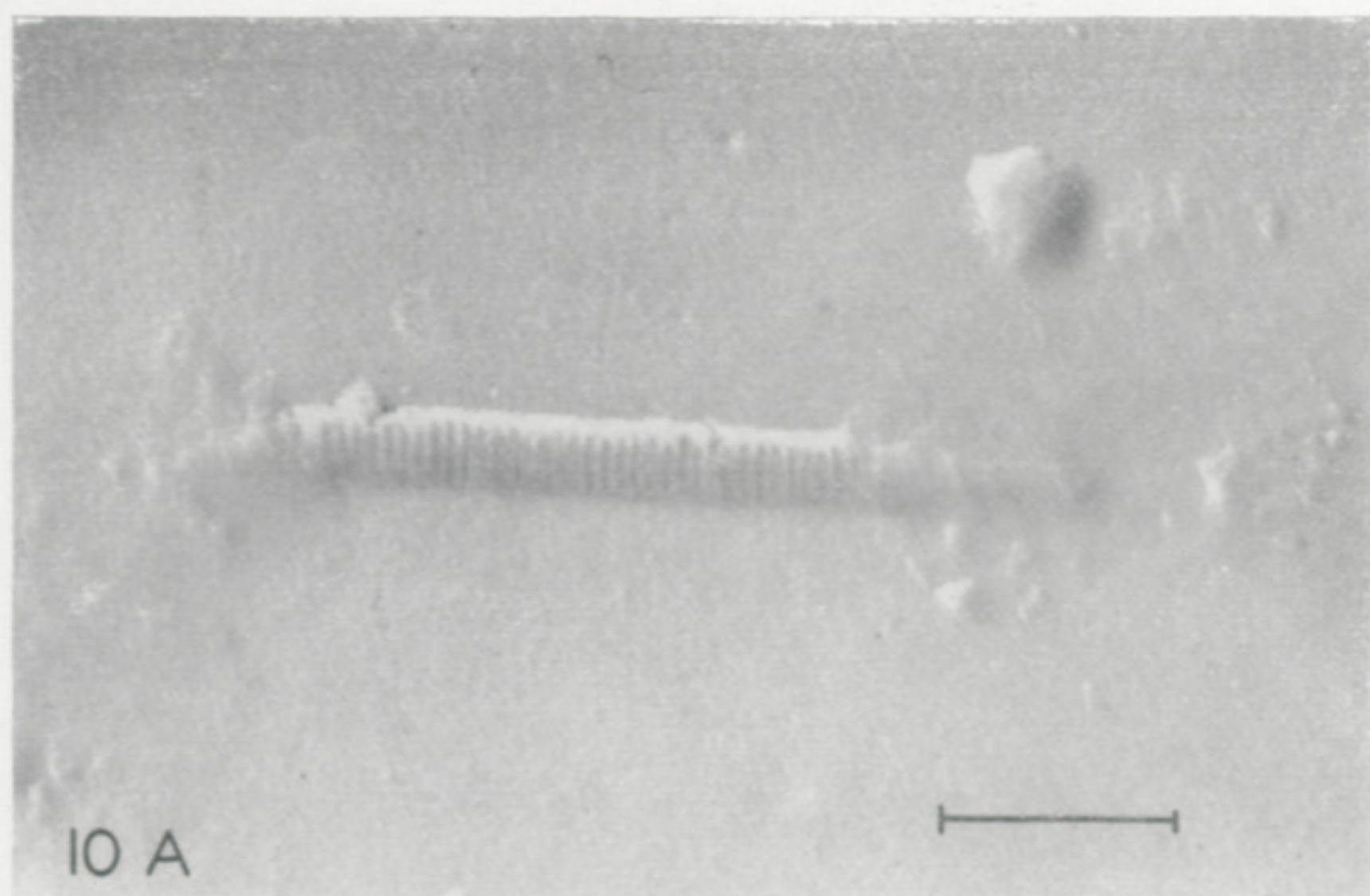


FIG. 10 — A. Fibrila do tendão do rato exposta a 60.°C durante 2 minutos.
B. Fibrila do tendão do rato exposta a 40.°C durante 2 minutos.

FIG 10 — A. Fibril from rat tendon exposed to 60.° C for 2 minutes.
B. Fibril from rat tendon exposed to 40.° C for 2 minutes.

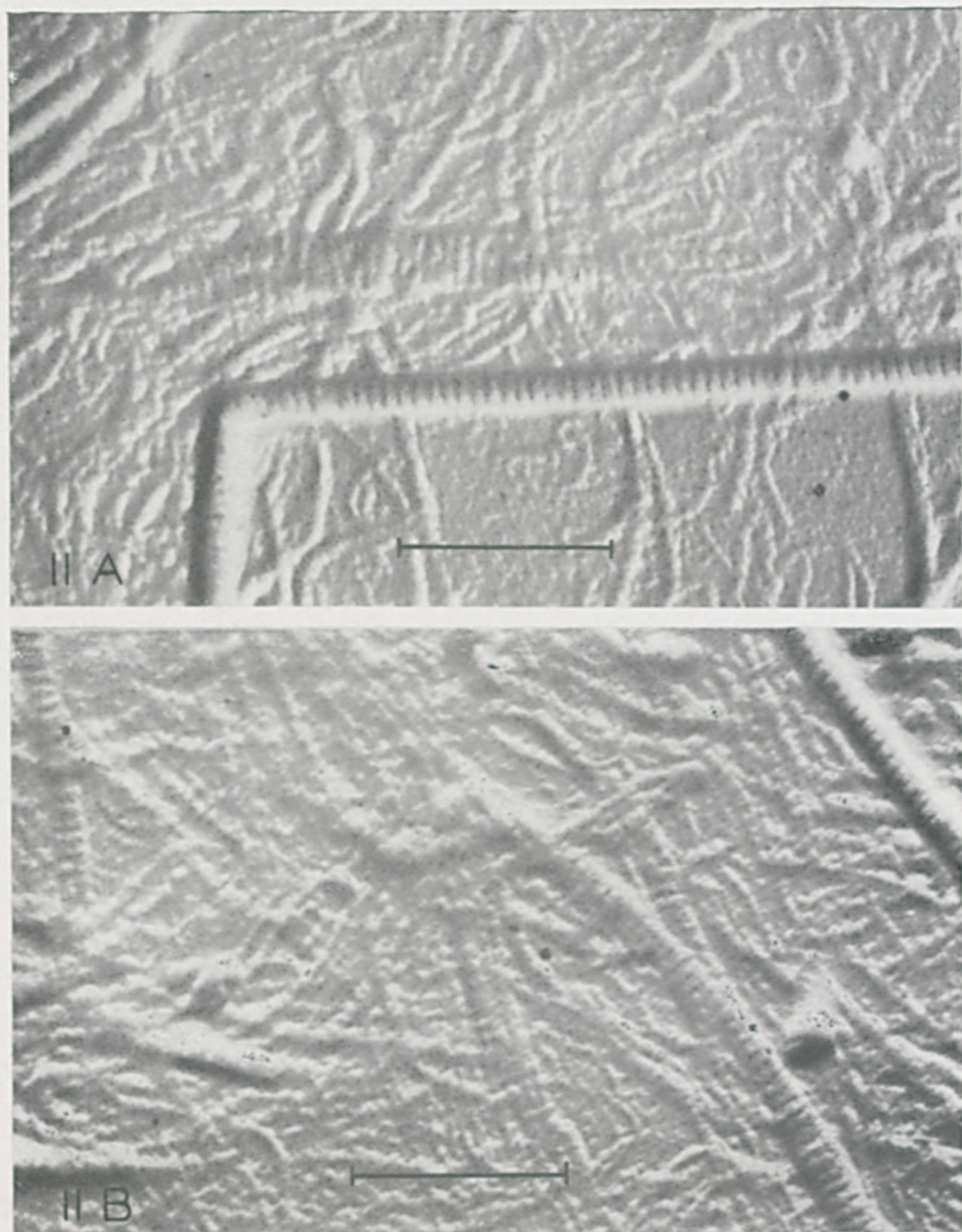


FIG. 11 A e B. — Fibrilas do tendão posterior da glândula labial de *Constrictor* após exposição do ácido acético a 10^{-4} M previamente resfriado a $4-5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

FIG. 11 — A and B. — Fibrils from posterior tendon of labial gland of *Constrictor* after exposure to precooled 10^{-4} molar acetic acid at $4-5^{\circ}\text{C}$ for 24 hours.

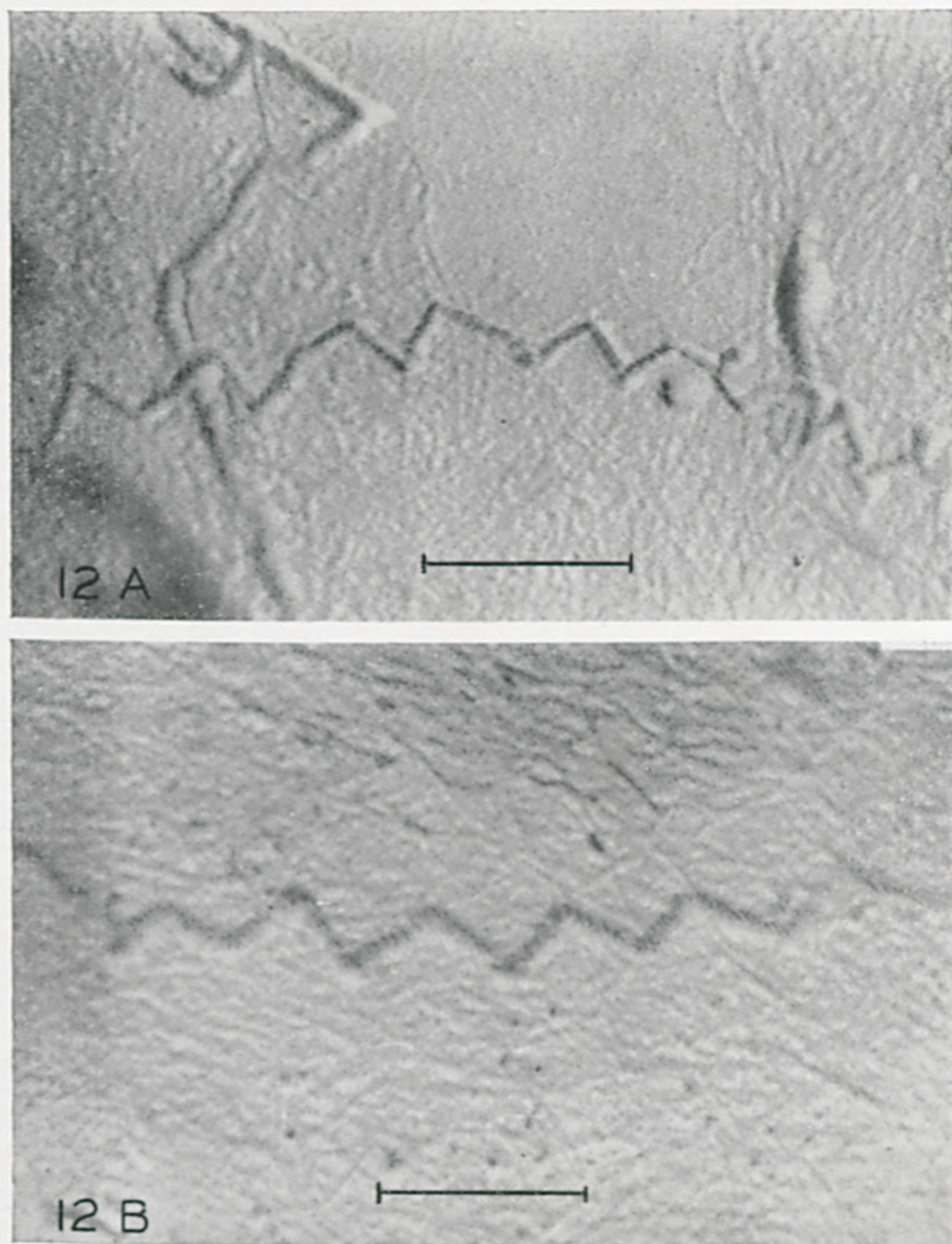


Fig. 12 A e B. — Fibrilas do dorso do rato depois de levados gradualmente, em ácido acético, de 37° a 4°C.

FIG. 12 — A and B. — Fibrils from dorsum of rat after being dropped gradually from 37.° to 4.° C in acetic acid.

