

LUIZA HELENA FRANCESCUTTI MURAD

ESTUDO HISTOQUÍMICO E ULTRA-ESTRUTURAL  
DAS  
FIBRAS DO SISTEMA COLÁGENO  
NA GLÂNDULA DE VENENO DE  
*Bothrops jararaca* (WIED, 1824)  
(REPTILIA, SQUAMATA)

Banca Examinadora:

Prof. Walker Aduelo Braga  
(Presidente da Banca)

Prof. Luiz Domingos

Prof. Alcides

Rio de Janeiro, 13 de agosto 1993.

Orientador: Lycia de Brito Gitirana

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Histologia e Embriologia da UFRJ, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do Setor de Microscopia Eletrônica do Departamento de Patologia da UFF e da Divisão de Serpentes do Instituto Vital Brazil.

## Ficha Catalográfica

FRANCESCUTTI-MURAD, Luiza Helena

Estudo histoquímico e ultra-estrutural das fibras do sistema colágeno na glândula de veneno de *Bothrops jararaca* (Wied) (Reptilia, Squamata) Rio de Janeiro. UFRJ, Museu Nacional, 1993.

10,77 f.

Tese: Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia)

1. Glândula de veneno                      2. *Bothrops jararaca*

3. Fibras do sistema colágeno 4. Teses

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro - Museu Nacional

II. Teses

"A marcha da ciência é como a planície do deserto:  
o horizonte foge sempre".

**Graça Aranha**

## AGRADECIMENTOS

Ao concluir o presente trabalho, quero expressar meus agradecimentos a todas as pessoas e instituições que contribuíram, das mais diversas maneiras, para a sua realização.

À Prof. Lycia de Brito Gitirana, orientadora e amiga, pela confiança depositada, pelo incentivo profissional e estímulo permanente, assim como, por sua dedicação e constante apoio no decorrer deste trabalho.

À Prof. Nadia Vieira Rangel, pelo grande auxílio que me foi dado durante o período de realização desta fase, pelas críticas e sugestões, e pelo empenho em assistir-me nas horas de dificuldade.

Ao Prof. Gerson Cotta-Pereira, pela orientação na escolha do tema desta tese, pelos ensinamentos em Histologia e pelas oportunidades concedidas ao iniciar essa pesquisa.

Aos professores do Curso de Mestrado, pelos ensinamentos dados durante o curso.

Aos professores e funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia da UFRJ, local onde adquiri conhecimentos e realizei este trabalho.

À Divisão de Serpentes do Instituto Vital Brazil - RJ, que me forneceu os espécimens sempre que necessário, pelas facilidades e recursos materiais e científicos oferecidos.

Aos biólogos Aníbal Rafael Melgarejo Gimenez, chefe da Divisão de Serpentes do Instituto Vital Brazil, e Ana Cristina Mendonça da Cunha, por incontáveis horas dispensadas ao ensinamento do manuseio dos animais e, especialmente, pela gentil acolhida.

À Prof. Maria Lucia Ribeiro Caldas, chefe do Setor de Microscopia Eletrônica do Departamento de Patologia da UFF, pela oportunidade de uso do microscópio eletrônico.

À Prof. Diana Mussa, do Departamento de Geologia e Paleontologia do Museu Nacional da UFRJ, que amavelmente cedeu o equipamento para fotomicrografias.

À bióloga Sonia de Oliveira, do Setor de Microscopia Eletrônica do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da UFRJ, pela valiosa cooperação na confecção dos cortes untrafinos.

Ao Prof. Luiz Francisco Macedo, pela paciente revisão do manuscrito e sugestões feitas.

Aos técnicos Édio Antunes Suzano e Nancy Barroso da Silva, pela colaboração no processamento histológico do material.

Aos professores Alberto Murad e Lucia Murad, pela revisão do texto.

Henrique, Feu e Tiana, a vocês, pela paciência e compreensão nos momentos difíceis.

A todos,

muito obrigada.

## RESUMO

Fragmentos da porção principal da glândula de veneno de *Bothrops jararaca*, colhidos nos períodos de 6 horas, 4, 8 e 45 dias após a extração manual do veneno, foram estudados a nível de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de transmissão, visando à identificação de alguns componentes da matriz extracelular presente nos septos intertubulares, nos diferentes tempos pós-extração de veneno.

Os achados ao microscópio óptico foram confirmados pela microscopia eletrônica. Após a extração do veneno, o epitélio secretor se tornou alto e iniciou um ciclo de síntese. Observou-se, então, uma modificação na morfologia dos septos conjuntivos, caracterizada por alterações na quantidade e no arranjo das fibras do sistema colágeno.

Quanto à remodelação do estroma intertubular, observou-se que os feixes de fibras espessas foram substituídos por uma fina malha reticular, no período de 6 horas pós-extração do veneno. Por volta do 4º dia do ciclo, verificou-se um acréscimo na quantidade das fibras reticulares, identificadas como fibras de colágeno tipo III. Junto a estas foram detectadas fibras de colágeno tipo I (8º dia pós-extração), que se tornaram gradativamente mais abundantes, até o estágio de 45 dias quando, finalmente, observou-se aumento no número de fibras de colágeno I.

Além disso, os fibroblastos identificados nestes septos revelaram uma seqüência de alterações morfológicas durante o ciclo secretor, observando-se que elas ocorriam concomitantemente com as mudanças no tipo de fibras do sistema colágeno, observadas nos septos.

**ABSTRACT**

It was studied through optical and electronic transmission microscopy fragments of the main portion of the venom gland from *Bothrops jararaca* obtained at 6hs, 4, 8 and 45 days after manual extraction of the venom. The objective of this thesis was to identify some extracellular matrix components of the intertubular septa, in the different time setting of the cycle after venom extraction.

Electron microscopic findings have confirmed the optical ones. After milking the secretory epithelium has changed to columnar as the venom synthesis cycle has begun. There was modification in the morphology of the connective septa with alterations in quantity and arrangement of collagen fibers.

Thick collagen fibers were substituted by the fine reticular mesh in the intertubular stroma 6 hours after milking. At the 4<sup>th</sup> day of the cycle there was a rising in the number of type III fibers. Type I collagen fibers were found at the 8<sup>th</sup> after milking and their number was increased by day 45.

The fibroblasts in those septa have shown morphologic modifications during the secretory cycle concomitant with alterations presented in the septal collagen fibers.

## ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO	1
I.1 - OBJETIVO	3
II - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
II.1 - Considerações Gerais	4
II.2 - Aspectos Macroscópicos e Microscópicos da Glândula de Veneno	5
II.3 - Matriz Extracelular	11
II.3.a - Sistema Colágeno	11
II.3.a.1 - Estrutura e Função	11
II.3.a.2 - Classificação e Colágenos Fibrilares Tipo I e III	12
II.3.a.3 - Síntese e Degradação	14
II.3.a.4 - Distribuição e Propriedades	15
II.3.b - Proteoglicanas	18
II.3.b.1 - Estrutura e Classificação	18
II.3.b.2 - Síntese	20
II.3.b.3 - Distribuição, Função e Propriedades	20
II.3.b.4 - Interação Colágeno-Proteoglicana	21
III - MATERIAL E MÉTODOS	23
III.1 - Microscopia Óptica	24
III.1.a - Técnicas Rotineiras de Coloração	25
III.1.b - Técnicas Específicas	26
III.1.b.1 - Sistema Colágeno	27
III.1.b.2 - Glicosaminoglicanas	28
III.1.b.3 - Glicoproteínas neutras	29
III.2 - Microscopia Eletrônica de Transmissão	31
IV - RESULTADOS	31
IV.1 - Aspectos Gerais da Glândula de Veneno a Nível de Microscopia Óptica	31
IV.2 - Aspectos da Glândula nos Diferentes Períodos do Ciclo Secretor	32
IV.2.a - Análise do Epitélio e do Sistema Colágeno	32
IV.2.a.1 - Estágio de 45 dias pós-extração de veneno	32
IV.2.a.2 - Estágio de 6 horas pós-extração de veneno	34
IV.2.a.3 - Estágio de 4 dias pós-extração de veneno	36
IV.2.a.4 - Estágio de 8 dias pós-extração de veneno	38
IV.2.b - Evidenciação das Glicosaminoglicanas a Nível de Microscopia Óptica	40
IV.2.c - Evidenciação da Membrana Basal a Nível de Microscopia Óptica	41
V - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	52
VI - BIBLIOGRAFIA	63

## I - INTRODUÇÃO

Na classe dos répteis, alguns ofídios se destacam pela presença de glândulas de veneno, as quais se desenvolveram a partir das glândulas supra-labiais (TAUB, 1966).

As glândulas de veneno, localizadas ao longo da maxila e logo abaixo das escamas supra-labiais, são freqüentemente encontradas nas serpentes venenosas das famílias *Elapidae*, *Hydrophiidae* e *Viperidae*. Todos os membros dessas famílias possuem uma glândula de veneno típica e um eficiente aparelho inoculador.

Na sua constituição histológica, a glândula de veneno apresenta túbulos, que são as unidades secretoras da glândula, envolvidos por um estroma conjuntivo constituído por células e matriz extracelular.

Em geral, nas estruturas glandulares, as células do epitélio glandular desenvolvem a sua atividade sob a influência do tecido conjuntivo subjacente. Desde o desenvolvimento embrionário, a relação entre a célula epitelial e o mesênquima ( tecido conjuntivo embrionário), a que se associa, é marcada por uma modulação contínua e recíproca. Assim, o epitélio produz sua membrana basal, que marca o limite com o mesênquima vizinho, ao mesmo tempo que sintetiza componentes da matriz extracelular, os quais induzem o processo de diferenciação do mesênquima até atingir o estado adulto, designado como estroma.

Atingido o estado adulto, a relação de interdependência entre o epitélio e o estroma permanece, de tal modo, que a síntese epitelial é regulada, em grande parte, pela matriz extracelular produzida por células do estroma. Desta maneira, torna-se relevante o estudo da composição da matriz extracelular que está presente na glândula de veneno de *Bothrops jararaca*.

Na glândula de veneno, as relações entre o epitélio secretor e o ciclo de síntese e de secreção de veneno têm sido tema preferido de estudos morfológicos e funcionais de diversos pesquisadores, que se utilizaram das mais variadas técnicas de trabalho. Embora as modificações morfológicas observadas no epitélio secretor, que forma os túbulos glandulares, tenham sido descritas detalhadamente, poucos são os registros referentes à natureza e alterações morfo-funcionais dos septos conjuntivos situados entre tais túbulos, os quais formam uma estrutura de suporte para o epitélio glandular.

Em *Bothrops jararaca*, as funções secretoras são realizadas em diferentes regiões da glândula de veneno. As regiões da glândula acessória e dos ductos não serão consideradas neste trabalho.

Neste estudo, serão utilizadas glândulas de veneno obtidas de serpentes submetidas à extração manual de veneno em diferentes intervalos de tempo. As alterações ocorridas nos septos intertubulares serão correlacionadas com os estágios do ciclo secretor de veneno, característicos da região principal da glândula de veneno.

## I.1 - Objetivo

O objetivo desta tese é estudar as alterações morfológicas que ocorrem no estroma dos septos conjuntivos da região principal da glândula de veneno de *Bothrops jararaca*, nos intervalos de tempo de 45 dias, 6 horas, 4 dias e 8 dias após a extração manual de veneno. Estes quatro períodos do ciclo secretor de veneno foram enfatizados e correlacionados com as modificações do epitélio secretor descritas na literatura.

No estudo do conjuntivo, dedica-se especial atenção às alterações dos seguintes componentes da matriz extracelular: sistema colágeno e proteoglicanas. No sistema colágeno são considerados apenas os colágenos tipo I e tipo III. As alterações observadas foram relacionadas com a estrutura física da matriz e com as propriedades mecânicas de seus componentes.

O sistema colágeno foi evidenciado na microscopia óptica através de colorações específicas e a nível de microscopia eletrônica de transmissão.

As proteoglicanas foram evidenciadas através de método histoquímico de coloração, para estudo a nível de microscopia óptica.

## II - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### II.1 - Considerações Gerais

Conhecida popularmente como jararaca ou jararaca-preguiçosa, a *Bothrops jararaca* é uma serpente de porte médio, chegando a atingir 1,5m de comprimento na vida adulta. Animal terrestre, pode subir em arbustos devido à sua grande agilidade. Além destas características, apresenta na cabeça uma faixa pós-ocular preta e no corpo, sobre um fundo de coloração mais clara, que varia entre tons de marrom, cinza, esverdeado e amarelado, exhibe padrão de manchas escuras, as quais estão dispostas em número variável, na região dorso-lateral (HOGE e ROMANO-HOGE, 1978/1979).

Este animal tem distribuição geográfica ampla no Brasil, sendo encontrado desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, especialmente na área Atlântica. É extremamente abundante em todo estado do Rio de Janeiro, ocorrendo também na cidade do Rio de Janeiro, sendo considerada a espécie responsável pela grande maioria dos acidentes humanos em toda a região sudeste do país (HOGE e ROMANO-HOGE, 1978/1979).

Foi descrita pela primeira vez por WIED, em 1824, como *Cophias jararaca*. WAGLER, em 1830, revendo o grupo, classificou-o como sub-gênero *Bothrops* e só mais tarde, em 1925, AMARAL revalidou o nome *Bothrops jararaca* para a espécie (PETERS e OREJAS-MIRANDA, 1970), pertencente ao gênero *Bothrops*, da tribo *Crotalini*, sub-família *Crotalinae*, família *Viperidae*.

Todos os ofídios da família *Viperidae* são solenóglifos, ou seja, possuem um par de presas inoculadoras de veneno, situadas na parte anterior da mandíbula superior, as quais são dentes muito desenvolvidos, pontiagudos, móveis e com um canal central. Quando o animal está em repouso, estes dentes permanecem deitados, envolvidos por uma membrana - a **bainha da presa**, que se comunica com o ducto da glândula de veneno. No momento do

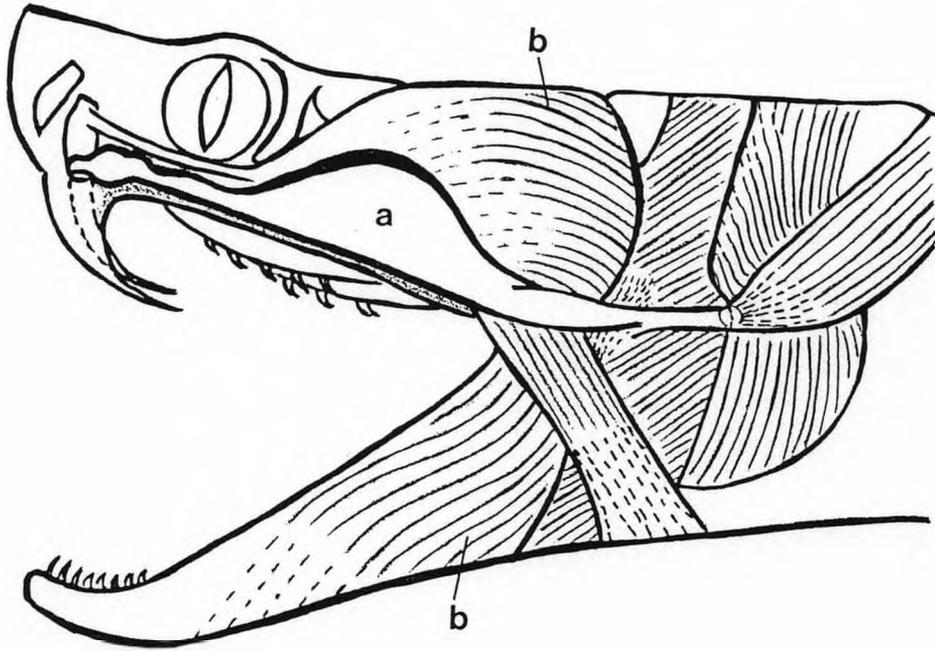
ataque, com a abertura da boca, a presa se ergue e sua bainha se retrai, ocorrendo uma contração do tecido muscular ao redor da glândula de veneno. Estes movimentos conduzem o veneno através do canal da presa (SCHAEFER, 1976).

## II.2 - Aspectos Macroscópicos e Microscópicos da Glândula de Veneno

Caracteristicamente, *Bothrops jararaca* possui um par de glândulas de veneno, situadas uma de cada lado da cabeça, na região temporal, logo abaixo da pele, posterior aos olhos. Elas têm forma alongada, grosseiramente triangular, estando um dos vértices voltado posteriormente para a articulação quadrato-maxilar. O ápice está dirigido dorsalmente para o osso parietal e a porção anterior, mais longa e fina, forma o ducto excretor da glândula de veneno (KOCHVA, 1978a) (Fig.1).

A glândula de veneno é conectada aos elementos do crânio por três principais ligamentos e músculos (KOCHVA, 1962). O músculo "compressor glandulae" circunda o terço posterior da glândula e, juntamente com outros músculos da cabeça, está envolvido no processo de inoculação do veneno durante a mordida (KOCHVA, 1958 ; KOCHVA e GANS, 1965 ; HAAS, 1973).

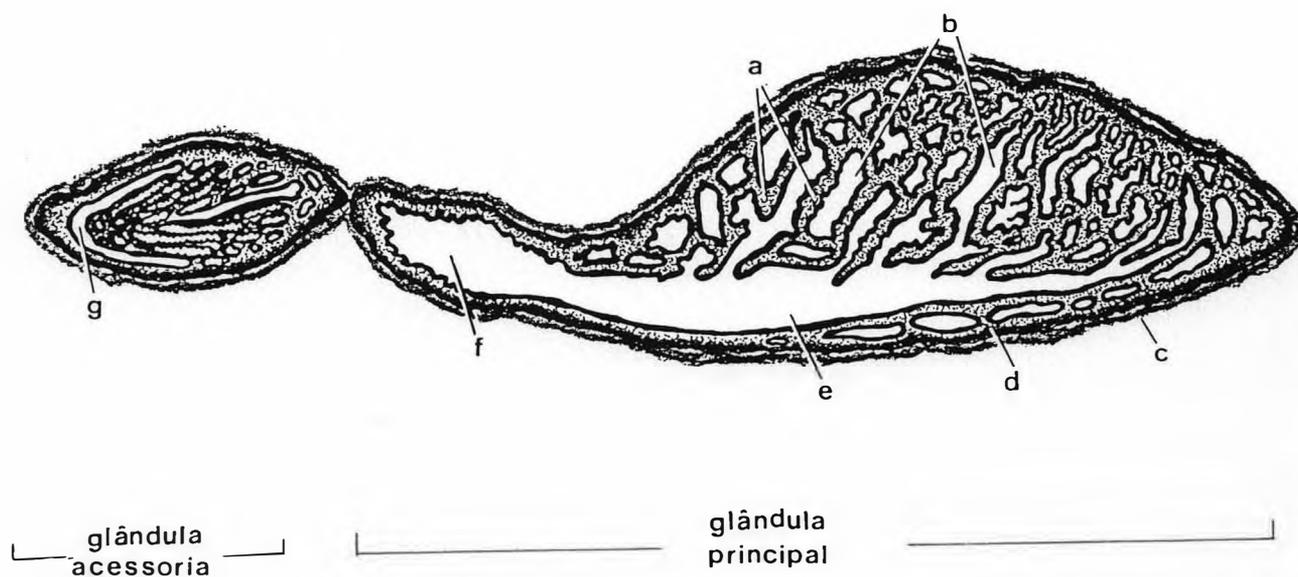
Estudos realizados em diferentes espécies de viperídeos mostraram que a glândula de veneno apresenta quatro regiões histologicamente bem definidas, assim discriminadas: a) a **glândula principal**, constitui a parte secretora principal e ocupa a porção posterior da glândula de veneno; b) o **ducto primário**, segue na direção anterior, forma uma alça na região sub-orbital e se abre na glândula acessória; c) a **glândula acessória**, é uma estrutura oval, composta de duas regiões glandulares histológica e histoquimicamente distintas, que contribuem com secreções diferentes durante a passagem do veneno (GANS e KOCHVA, 1965); d) o **ducto secundário**, parte da glândula acessória, segue ventral e anteriormente e se abre na bainha da



**Fig. 1** - Esquema com vista lateral da cabeça de *B. jararaca*, mostrando a localização da glândula de veneno e músculos associados.

a - glândula de veneno

b - músculo "compressor glandulae"



**Fig. 2** - Esquema da glândula de veneno de *B. jararaca*, em corte longitudinal. Notar as quatro regiões da glândula de veneno: glândula principal, ducto primário (f), glândula acessória e ducto secundário (g). Observar as estruturas presentes nas diferentes regiões da glândula.

- a - septos intertubulares
- b - lúmenes glandulares
- c - músculo
- d - cápsula conjuntiva
- e - lúmen ventral

presa (TAUB, 1966 ; KOCHVA e GANS, 1966, 1967 ; ZAGO, 1971 ; LOPES et al., 1974, 1979, 1987) (Fig.2).

Estudos feitos ao microscópio óptico (KOCHVA e GANS, 1965 ; GABE e ST. GIRONS, 1969) e ao microscópio eletrônico de transmissão (ODOR, 1965 ; GENARO et al., 1968 ; MACKESSY, 1988) contribuíram para identificar vários tipos de células na porção principal da glândula de veneno de serpentes (glândula principal), descrevendo, porém, a predominância de apenas um tipo celular - as **células secretoras**, responsáveis pela atividade de síntese e de secreção da glândula (WARSHAWSKY et al., 1973 ; TAYLOR, 1986).

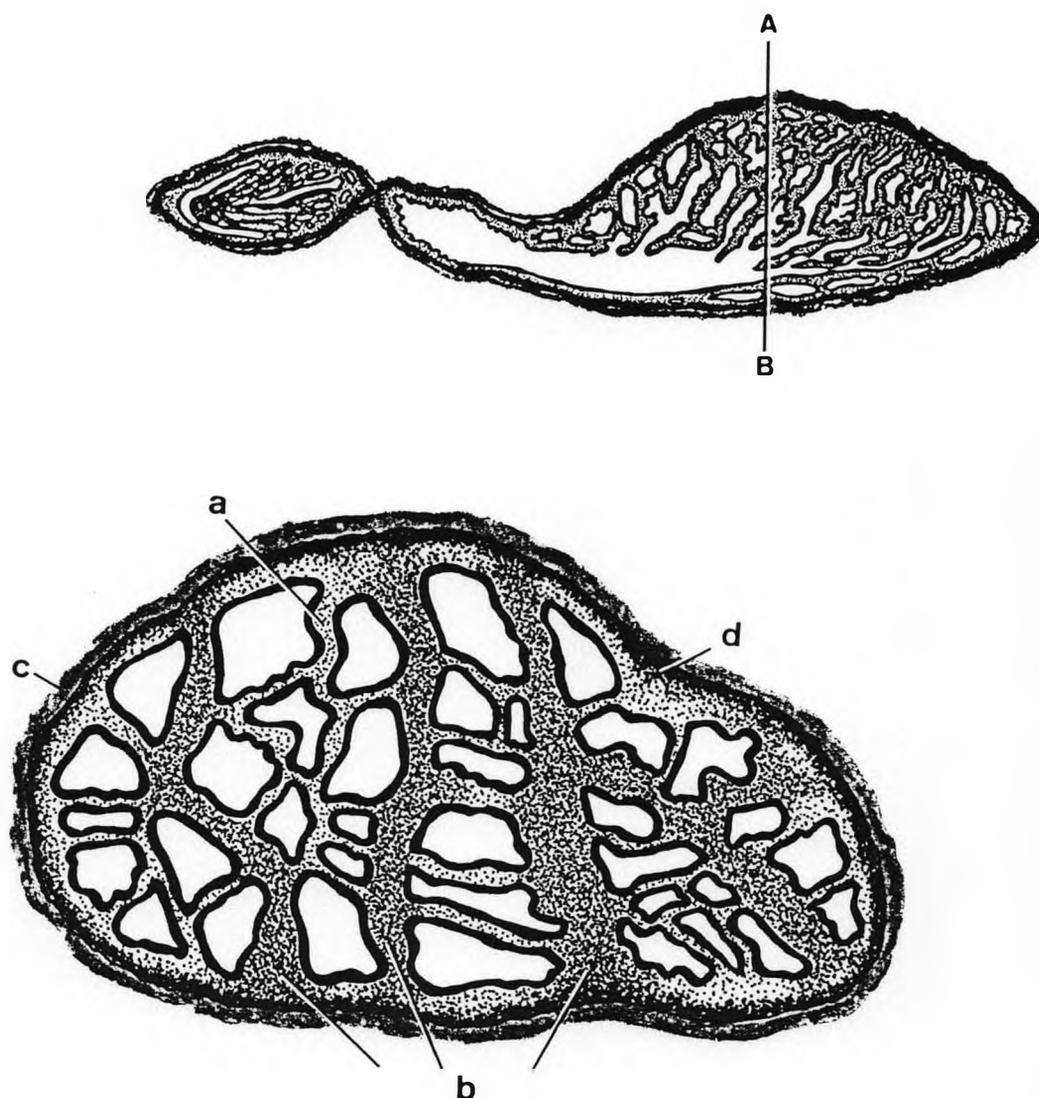
As células secretoras são as principais constituintes do epitélio das unidades secretoras da glândula e sua forma, tamanho e ultra-estrutura estão diretamente relacionados com a produção de veneno. VELIKII, em 1890, estudando *Vipera ammodytes*, observou alterações morfológicas no epitélio secretor da glândula após extração de veneno. Mais tarde, ROTEMBERG e colaboradores (1971), trabalhando com *Vipera palaestinae*, descreveram uma relação entre a atividade secretora da glândula e a altura de suas células secretoras, mostrando que tais células se apresentam nitidamente mais altas, quando em atividade de síntese, do que quando estão numa fase de repouso.

ORON e BDOLAH (1973, 1978), usando marcadores radioativos, conseguiram acompanhar o processo de síntese e secreção de proteínas na glândula de veneno, demonstrando que a quantidade de proteína sintetizada varia nos diferentes períodos após a expulsão do veneno, seja a extração feita manualmente ou durante a mordida. Após o esvaziamento da glândula, parcial ou completo, o epitélio secretor inicia um novo ciclo de síntese, durante o qual as células sofrem uma série de modificações em relação à sua forma e ultra-estrutura (KOCHVA, 1970); o processo secretor se torna mais intenso, e o veneno se acumula extracelularmente, na luz dos túbulos secretores e no lúmen ventral da glândula. Histologicamente, este acúmulo de secreção é verificado pela distensão dos túbulos e lúmenes (BEN-SHAUL et al., 1971 ; SOBOL-

BROWN et al., 1973).

Outra particularidade da glândula de veneno das serpentes refere-se ao mecanismo de controle envolvido na produção de veneno, o qual é dependente da quantidade de veneno presente no lúmen glandular, de tal forma que, quanto mais veneno é acumulado, menos veneno é produzido, até a síntese cessar quase completamente. O mecanismo que regula a síntese de veneno pela glândula depende da pressão do veneno armazenado na luz dos túbulos secretores. Tal mecanismo é responsável pela reposição do veneno, sempre que este é utilizado (KOCHVA, 1978 a e b). Assim, sempre que a glândula está cheia, a própria pressão do veneno acumulado diminui a atividade sintetizadora e o epitélio secretor se atrofia, porém quando o veneno é expelido a síntese é estimulada e as células secretoras se tornam colunares altas (DE LUCCA et al., 1974 ; LAKE et al., 1988 ; SELLS et al., 1989).

Os septos intertubulares da glândula de veneno de *Bothrops jararaca* são constituídos por tecido conjuntivo. O material que preenche o espaço intercelular do tecido conjuntivo forma a chamada matriz extracelular, composta por uma variedade de glicanas (polissacarídeos) e proteínas, que se reúnem formando uma rede organizada, responsável pelas propriedades físicas do tecido (fig.3).



**Fig. 3** - Esquema em corte transversal, no plano AB, da região principal da glândula de veneno de *B. jararaca*. Ao centro, observar a distribuição dos septos finos ( **a** ) e dos septos espessos ( **b** ).

**c** - músculo

**d** - cápsula conjuntiva

## **II.3 - Matriz Extracelular**

As macromoléculas que constituem a matriz extracelular podem ser agrupadas em quatro principais famílias: **a) colágenos ; b) elastina ; c) glicoproteínas estruturais ; d) glicosaminoglicanas (GAGs)**, as quais podem estar covalentemente ligadas a proteínas, formando proteoglicanas. As duas primeiras famílias formam os compostos fibrosos dos tecidos conjuntivos; as proteoglicanas e glicoproteínas preenchem os espaços e as superfícies de contato entre as células e a matriz extracelular (LABAT-ROBERT et al., 1990).

A proporção de macromoléculas presente na matriz extracelular varia de acordo com a sua localização nos diversos tecidos do corpo. As variações nas quantidades destes componentes e o modo como eles são organizados na matriz extracelular dão origem a uma diversidade de formas, que estão adaptadas às necessidades funcionais de cada tecido (ALBERTS et al., 1989).

### **II.3.a - Sistema Colágeno**

#### **II.3.a.1 - Estrutura e Função**

O colágeno, uma das proteínas mais abundantes da matriz extracelular é, na verdade, uma família de proteínas fibrosas com características e propriedades comuns, as quais se encontram largamente distribuídas nos tecidos (BURGESON, 1988). Apresenta uma multiplicidade de funções, sendo responsável pela integridade estrutural de órgãos e tecidos, além de conferir resistência ao tecido conjuntivo e de promover adesão e migração celular (HAY, 1981 ; PELTONEN et al., 1985).

Estudos realizados em diversos tecidos de vertebrados mostram que os diferentes tipos de colágeno apresentam uma estriação transversal típica, visível ao microscópio eletrônico de transmissão, e consistem em três cadeias polipeptídicas enroladas entre si sob a forma de uma hélice tríplice. Estas cadeias polipeptídicas são denominadas cadeias  $\alpha$  e são constituídas por seqüências repetitivas de três aminoácidos (VAN DER REST e GARRONE, 1991).

Estas características estruturais exclusivas conferem ao colágeno a habilidade de formar agregados supramoleculares e de ser resistente à maioria das proteinases (BERG, 1986). As moléculas de colágeno podem se reunir ordenadamente, formando estruturas cilíndricas muito longas e finas - as fibrilas colágenas, identificáveis a nível de microscopia eletrônica de transmissão. Em muitos tecidos, as fibrilas colágenas se agrupam em estruturas mais espessas, constituindo as fibras colágenas, facilmente observadas ao microscópio óptico (BIRK et al., 1990).

A morfologia e a função dos tecidos conjuntivos são determinadas pela espessura e orientação das fibrilas colágenas, cujo diâmetro varia nos diferentes tecidos. Estudos realizados têm demonstrado que a formação de fibrilas é um processo complexo, que inclui uma série de eventos bem controlados, os quais envolvem a participação direta da célula (BIRK e TRESLTAD, 1986).

### **II.3.a.2 - Classificação e Colágenos Fibrilares Tipo I e III**

Já foram, até agora, descritos quinze tipos de colágeno (HAY, 1991). Os tipos de colágeno diferem um do outro na seqüência primária dos seus aminoácidos, na combinação específica de suas cadeias  $\alpha$  e em sua distribuição nos tecidos (VAN DER REST e GARRONE, 1991).

Os colágenos tipos I e III possuem características

estruturais comuns e estão entre os tipos de colágenos mais conhecidos (MILLER, 1985). Eles se polimerizam no espaço extracelular, formando fibrilas que exibem uma estriação transversal, com uma periodicidade constante de 67nm. Este padrão é consequência do arranjo das moléculas de tropocolágeno na fibrila, onde moléculas adjacentes se agregam em arranjos escalonados, de tal modo que cada molécula de tropocolágeno estende-se além do comprimento da molécula vizinha, produzindo regiões de superposição e regiões lacunares, que dão à fibrila um padrão de estrias transversais (HAY, 1981 ; FLEISCHMAJER et al., 1990).

Estes dois tipos de colágeno se polimerizam rapidamente no espaço extracelular, formando fibrilas e fibras, que constituem a maior fonte de forças mecânicas nos tecidos conjuntivos dos vertebrados (PIEZ, 1984). É a organização diferente das fibrilas nos tecidos conjuntivos que responde pela resistência dos mesmos, permitindo aos tecidos que exerçam suporte mecânico, sirvam à transmissão de forças ou sofram tensão sistemática (BERG, 1986).

O colágeno tipo I, sendo o mais abundante colágeno do corpo, está distribuído por todo tecido conjuntivo do organismo. Suas fibrilas se agregam, formando fibras colágenas espessas, que se organizam num arranjo paralelo, formando macroagregados, tais como feixes (TRELSTAD, 1982 ; BIRK et al., 1990). As fibras de colágeno I são formadas por fibrilas que alcançam grande diâmetro, o qual pode variar intensamente de um tecido para outro (FLEISCHMAJER et al., 1990).

O colágeno tipo III, também encontrado no tecido conjuntivo em geral, forma fibras menos espessas que o colágeno I. Neste colágeno as fibrilas se organizam em fibras finas, que se ramificam intensamente, formando uma delicada rede de sustentação para capilares, músculos e órgãos hematopoéticos. Tais fibrilas apresentam variação no seu diâmetro, sendo que, segundo BIRK e SILVER (1984), o diâmetro-médio das fibrilas de colágeno III é geralmente menor que o das fibrilas formadas por colágeno I.

### II.3.a.3 - Síntese e Degradação

O colágeno é sintetizado no retículo endoplasmático granular, sob forma solúvel, a partir das cadeias  $\alpha$ , que se unem para formar uma molécula de procolágeno (PIEZ, 1984).

À medida que as cadeias  $\alpha$  se formam, ocorrem hidroxilação, glicosilação e subsequente agregação das mesmas, produzindo uma molécula de procolágeno, que é transferida para o aparelho de Golgi e, daí, para a superfície celular, sendo exocitada para o espaço extracelular, onde os domínios amino e carboxi-terminal serão enzimaticamente removidos, dando origem à molécula de tropocolágeno, proteína insolúvel que se polimeriza de forma ordenada, constituindo fibrilas colágenas com estriação transversal característica (MILLER e GAY, 1982 ; FLEISCHMAJER et al., 1985).

O colágeno pode ser degradado na matriz extracelular pela ação de uma família de collagenases, que é responsável pela renovação do colágeno nos tecidos (BERG, 1986). Diferentes tipos celulares podem produzir enzimas capazes de degradar o colágeno, tanto no espaço extracelular como no meio intracelular. A degradação intracelular do colágeno é um processo independente, que pode ocorrer simultaneamente com a degradação extracelular (RENNARD et al., 1982).

LAURENT (1987) mostrou, através de estudos realizados com ratos, que a proporção de colágeno degradado, bem como a taxa de síntese de novo colágeno, podem variar nos diferentes tecidos. Cálculos realizados demonstraram que, em alguns tecidos, o colágeno é continuamente depositado, enquanto em outros, não. Estes estudos têm revelado que a renovação do colágeno em alguns tecidos de animais adultos pode ser bastante rápida. O aumento na deposição de colágeno nos tecidos depende da relação entre as taxas de síntese e de degradação, demonstrando que a degradação desempenha papel importante na regulação da massa de colágeno nos tecidos. Assim, em tecidos de adultos o colágeno é continuamente sintetizado e degradado e, quando os níveis de colágeno são alterados, há uma intensificação de um desses

processos.

A propósito, em trabalhos realizados em camundongos e ratos, foi demonstrado o envolvimento do colágeno no processo de decidualização, quando o endométrio destes roedores sofre marcante remodelação, durante a formação e a involução da decídua (ZORN et al., 1986; 1989). Os autores mostraram que as fibrilas colágenas sofrem modificação durante este período, ocorrendo uma remodelação do material extracelular, onde são observadas alterações qualitativas e quantitativas em relação às fibrilas colágenas durante a decidualização.

#### II.3.a.4 - Distribuição e Propriedades

A distribuição do colágeno tipo I tem sido relacionada à presença de fibras espessas e de trajeto sinuoso nos tecidos conjuntivos frouxo e denso. Estas fibras têm comprimento indefinido, espessura variável e são acidófilas. Assim, empregando-se o corante tricrômico de Gomori, podem ser distinguidas claramente pela intensa coloração verde que apresentam (LILLIE e FULLMER, 1976). A microscopia eletrônica de transmissão revela que a fibra de colágeno I é formada por fibrilas paralelamente organizadas dentro de uma mesma fibra, as quais apresentam um padrão repetitivo, constituído por um segmento escuro e um claro, a cada 67nm (KÜHN, 1986).

A existência de colágeno do tipo III nos tecidos conjuntivos é atribuída à presença abundante de fibras finas, ramificadas, que formam finos elementos de sustentação dos órgãos. Estas fibras estão presentes no tecido conjuntivo, num arranjo frouxo e, não sendo identificadas através das colorações rotineiras, necessitam de técnicas específicas para sua evidenciação. Ultra-estruturalmente, mostram ser constituídas por fibrilas colágenas, com diâmetro geralmente menor e que exibem os períodos de 67nm, típicos das fibrilas do tipo I (LEBLOND e LAURIE, 1986).

Colágenos tipos I e III podem formar estruturas semelhantes. Seu padrão em bandas é visualmente idêntico e eles não podem ser distinguidos em cortes de tecido através da microscopia eletrônica, embora possam ser identificados por métodos imunohistoquímicos. Estes métodos têm demonstrado que as fibrilas colágenas podem ser do tipo I, do tipo III, ou mesmo conter ambos os tipos numa mesma fibra, independente do seu diâmetro e localização (VITELLARO-ZUCCARELLO et al., 1992); podendo ainda ocorrer a coexistência desses dois tipos de colágeno numa só fibrila (FLEISCHMAJER et al., 1990).

Através do método da impregnação argêntica as fibras grossas, não ramificadas, que são fracamente reativas e tomam a tonalidade amarela ou castanha, são histologicamente consideradas como fibras colágenas (SNODGRASS, 1977). Por outro lado, a extensa rede de fibras finas e irregulares, bastante ramificadas, que aparecem em negro nas impregnações pela prata, são identificadas como fibras reticulares (PRAS e GLYNN, 1973). As fibras reticulares evidenciam-se diferentemente das fibras colágenas quando submetidas à técnica de impregnação argêntica, fazendo com que esta diferença forneça uma das bases para a distinção entre estes dois tipos de fibras do sistema colágeno. No entanto, o mecanismo químico e a especificidade do método continuam controversos. Recentemente, técnicas imunohistoquímicas demonstraram a presença de colágeno III na composição de fibra reticular e de colágeno I na da fibra denominada fibra colágena (NOWACK et al., 1976 ; MONTES et al., 1980). Contudo, estudos bioquímicos revelaram ser a fibra reticular constituída por grande quantidade de colágeno III, juntamente com uma ou mais proteínas não-colágenas e glicosaminoglicanas (UNSWORTH et al., 1982).

Grande parte das estruturas colágenas nos vertebrados é constituída por moléculas longas, organizadas num arranjo paralelo, que apresentam uma birrefringência específica, devido à orientação dessas moléculas, quando observadas ao microscópio de polarização. Alterações na intensidade da birrefringência têm sido estudadas através da utilização de corantes, que podem ser alinhados ao longo do comprimento de tais agregados (WOLMAN e

KASTEN, 1986). O picrossírius é um corante ácido que produz um aumento sensível na birrefringência positiva do colágeno (JUNQUEIRA et al., 1979a). Estudos demonstraram que colágenos tipos I e III apresentam diferença na coloração e na intensidade de birrefringência quando corados pela técnica do picrossírius (JUNQUEIRA et al., 1978; 1982). Comparados estes resultados com a descrição bioquímica da distribuição dos tipos I e III, observou-se uma grande correspondência entre a localização destes tipos de colágeno, concluindo-se, desta forma, que estes diferentes tipos de colágeno podem ser distinguidos pelo método acima mencionado (MONTES e JUNQUEIRA, 1991).

As propriedades mecânicas dos tecidos conjuntivos variam com a localização do tecido e podem ser atribuídas às variações no conteúdo e na composição dos componentes não-colágenos presentes, às diferentes espessuras das fibrilas colágenas, à orientação das fibrilas e às interações entre o colágeno e os constituintes da matriz extracelular. Embora todos estes fatores contribuam, é o colágeno, devido ao seu alto conteúdo, que domina a maioria das propriedades mecânicas dos tecidos conjuntivos (PARRY, 1988).

LAPIÈRE e colaboradores (1977), realizando experimentos "in vitro", demonstraram que a estrutura química das moléculas de colágeno determina a estrutura física das fibras. Assim, moléculas de colágeno I formam feixes de fibras espessas, paralelas, presentes em tecidos resistentes à tensão, enquanto fibras finas isoladas, responsáveis pela distensibilidade dos tecidos, são formadas por colágeno III. Já a presença de colágenos I e III em fibras com espessuras variáveis responde pela grande extensibilidade de estruturas, como a pele. Estas demonstrações reafirmaram os resultados das investigações em tecidos "in vivo", obtidos em 1976 por NOWACK e colaboradores.

Classicamente, considera-se que a força de tensão de um material é dada pelos seus elementos fibrilares e a força de compressão, pela matriz na qual os elementos fibrilares estão mergulhados. Pesquisadores sugeriram, então, que as

glicosaminoglicanas, as quais unem as fibrilas colágenas entre si, contribuem significativamente para a estrutura física dos tecidos e, conseqüentemente, para suas propriedades mecânicas (PARRY et al., 1978).

### **II.3.b - Proteoglicanas**

#### **II.3.b.1 - Estrutura e Classificação**

Proteoglicanas constituem um grupo de glicoproteínas não fibrilares, presentes em quantidades variáveis em todos os tecidos, sendo abundantes nos tecidos conjuntivos. Devido à heterogeneidade estrutural de suas moléculas, desempenham diferentes funções nos tecidos onde ocorrem. Elas podem ser encontradas associadas à superfície celular, sob a forma de grânulos intracelulares e, principalmente, na matriz extracelular (JACKSON et al., 1991).

Cada proteoglicana consiste de uma proteína central, à qual estão covalentemente ligadas uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanas. As proteoglicanas possuem diversas formas e tamanhos e sua característica comum é a presença de glicosaminoglicanas. Apresentam grande variação em relação ao conteúdo de seu eixo proteico e de suas glicosaminoglicanas; contudo, são as propriedades comuns das glicosaminoglicanas que determinam o comportamento físico das proteoglicanas. Por esse motivo, o conteúdo em glicosaminoglicanas é utilizado para a classificação deste grupo de moléculas (RUOSLAHTI, 1988).

Glicosaminoglicanas são polímeros de polissacarídeos lineares, compostos por unidades dissacarídeas repetitivas. Cada dissacarídeo é formado por um ácido urônico (geralmente) e por uma hexosamina, sendo este açúcar aminado carboxilado ou,

mais freqüentemente, sulfatado (JACKSON et al., 1991). Quatro grupos principais de glicosaminoglicanas podem ser distinguidos pela estrutura química de suas unidades repetitivas (HEINEGARD e PAULSSON, 1984):

-**Ácido hialurônico** é uma glicosaminoglicana não sulfatada, cuja unidade repetitiva é formada por ácido glicurônico e N-acetil-glicosamina. Está presente em todos os tecidos conjuntivos, não está conjugada a uma proteína e faz a união entre várias moléculas de proteoglicanas, formando enormes complexos moleculares da matriz

-**Condroitin-sulfato** é uma glicosaminoglicana, cuja unidade repetitiva é formada por ácido glicurônico e N-acetil-galactosamina sulfato, e que está conjugada a uma proteína, presente em grande quantidade nas cartilagens

-**Dermatan-sulfato**, formada por ácido L-idurônico e N-acetil-galactosamina sulfato, se apresenta ligada a uma proteína central. Está presente no tecido conjuntivo fibroso, ainda que tenha sido observado que tecidos contendo dermatan-sulfato apresentam, em geral, um baixo conteúdo de glicosaminoglicanas

-**Heparan-sulfato** é uma glicosaminoglicana predominantemente formada por ácido glicurônico e glicosamina, que pode se apresentar sulfatada ou não. Semelhante estruturalmente à **heparina**, difere dela quanto ao teor de sulfatação. A **Heparina** é uma glicosaminoglicana formada por ácido glicurônico e idurônico mais glicosamina, sulfatados ou não, e que não está ligada a um eixo proteico, enquanto **heparan-sulfato** existe somente conjugada com proteínas

-**Ceratan-sulfato** apresenta, na sua unidade repetitiva, uma ose no lugar do ácido urônico e N-acetil-glicosamina sulfato, estando ligada a uma proteína central. É encontrada nos tecidos cartilagosos sendo, provavelmente, ausente no tecido conjuntivo fibroso.

### **II.3.b.2 - Síntese**

A síntese do eixo proteico das proteoglicanas ocorre no retículo endoplasmático granular. As proteoglicanas são formadas a partir deste precursor proteico, ao qual se liga a primeira cadeia específica de polissacarídeos. No complexo de Golgi, através da ação de enzimas específicas as demais cadeias são incorporadas, sendo que um monossacarídeo é adicionado de cada vez, promovendo o crescimento em seqüência das cadeias laterais de glicosaminoglicanas. Paralelamente, muitas unidades polissacarídicas são modificadas por uma série de reações de sulfatação (HARDINGAM, 1986 ; JACKSON et al., 1991).

### **II.3.b.3 - Distribuição, Função e Propriedades**

As proteoglicanas estão presentes nos tecidos conjuntivos, preenchendo os espaços entre as fibras colágenas, e desempenham importante papel na organização, estrutura e função da matriz extracelular. As propriedades físicas dos diversos tecidos conjuntivos dependem das diferenças na proporção de proteoglicanas e proteínas, bem como na forma como estas macromoléculas estão organizadas dentro da matriz. Suas cadeias de glicosaminoglicanas, fortemente hidrófilas, atraem grande quantidade de água, causando uma turgescência que confere rigidez e ajuda a manter a forma do tecido. Além desse suporte mecânico, permitem a rápida difusão de moléculas solúveis e a migração de células. Estudos bioquímicos indicam, ainda, que as proteoglicanas, através de suas glicosaminoglicanas, se ligam especificamente entre si e com as proteínas fibrosas da matriz extracelular (KUETTNER e KIMURA, 1985).

As interações das glicosaminoglicanas com outras moléculas da matriz são de natureza iônica e o fator decisivo nestas interações é determinado pelo grau de sulfatação das glicosaminoglicanas. Assim, quanto mais sulfatado é o complexo

polissacarídico, mais forte é a ligação com uma proteína. A heparina é a que apresenta usualmente maior teor de sulfatação e interações mais fortes; já o heparan-sulfato e o dermatan-sulfato apresentam menor teor de sulfatação, em comparação com a heparina, e se ligam, com moderada afinidade, a outras moléculas. Condroitin-sulfato é a menos sulfatada e, normalmente, interage com menos intensidade que as demais glicosaminoglicanas (RUOSLATHI, 1988, 1989).

Os grupamentos sulfatados das glicosaminoglicanas interagem com os grupos básicos do colágeno e preenchem os espaços ao redor das fibrilas colágenas, formando um gel viscoso, muito hidratado, difícil de ser observado nos preparados histológicos de rotina. Extremamente solúvel em água, o conteúdo deste gel é facilmente extraído dos tecidos, durante o processamento histológico, porque não é bem preservado pelos fixadores usuais. Uma vez processado com fixadores específicos, quando examinado ao microscópio eletrônico, é visto como estrutura filiforme, que envolve as fibrilas colágenas a intervalos regulares (SCOTT, 1986).

As glicosaminoglicanas aparecem em baixa concentração na matriz extracelular do tecido conjuntivo frouxo e só são reveladas pelo uso de corantes básicos de alta afinidade, devido a seu caráter polianiónico. O corante azul de alcian reage fortemente com os grupos ácidos das glicosaminoglicanas, sendo utilizado, com grande frequência, para demonstrar a presença de glicosaminoglicanas nos preparados incluídos em parafina (TUCKETT e MORRIS-KAY, 1988).

#### **II.3.b.4 - Interação Colágeno-Proteoglicana**

As interações entre proteoglicanas e colágeno dependem do tipo de colágeno e do tipo de glicosaminoglicanas existentes nas proteoglicanas. O colágeno tipo I, formado por fibras espessas que se ligam principalmente a dermatan-sulfato, é o que apresenta

níveis mais baixos de interações (JUNQUEIRA et al., 1980). O colágeno III, constituído por fibras finas, é caracteristicamente rico em heparan-sulfato e exhibe níveis intermediários de interações com as glicosaminoglicanas (JUNQUEIRA et al., 1980).

### III - MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho, foram utilizadas 24 serpentes da espécie *Bothrops jararaca*, todas adultas, sendo 13 do sexo feminino e 11 do sexo masculino, medindo entre 809 e 1184 mm de comprimento, fornecidas pelo Instituto Vital Brazil SA - RJ, procedentes de regiões do Estado do Rio de Janeiro e do sudeste de Minas Gerais. Estes animais foram sacrificados por decapitação, sendo as cabeças utilizadas neste trabalho e os espécimens, depositados na coleção da Divisão de Animais Peçonhentos do Instituto Vital Brazil SA - RJ. Utilizou-se esta técnica de sacrifício com a finalidade de evitar o uso de anestésicos, reduzindo-se ao mínimo a alteração da estrutura microscópica do órgão.

Exemplares de *Bothrops jararaca* doados ao Instituto Vital Brazil SA - RJ eram mantidos em caixas individuais, no Serpentário local, à temperatura de 25° a 30° C, por diferentes períodos de tempo. Cada caixa era forrada com papelão corrugado, contendo um recipiente plástico para água. Semanalmente as caixas eram limpas e a água trocada.

Foram constituídos 4 grupos de serpentes, as quais foram submetidas à extração manual de veneno e sacrificadas em diferentes intervalos de tempo, de acordo com a tabela abaixo:

Tempo após extração de veneno	Nº de serpentes sacrificadas	Sexo		Processadas Para :	
		F	M	Microscopia Óptica	Microscopia Eletrônica de Transmissão
6 horas	6	4	2	5	1
4 dias	7	4	3	6	1
8 dias	5	1	4	4	1
45 dias	6	5	1	5	1

No tempo de 45 dias após a extração de veneno, estando as atividades de síntese e de secreção mínimas, a glândula é considerada em repouso. Este estágio foi estabelecido como tempo de referência no presente estudo.

Uma vez destinadas à extração de veneno, as serpentes eram retiradas da caixa, com gancho próprio, esticadas sobre uma peça de espuma, para medição do comprimento total e, em seguida, o veneno era extraído, por pressão exercida manualmente sobre as glândulas de veneno, na região lateral da cabeça. Ambas as glândulas eram pressionadas ao mesmo tempo por movimentos suaves, efetuados da região posterior da cabeça para a anterior (em direção às presas inoculadoras de veneno), obtendo-se, desta forma, um esvaziamento mais uniforme de toda a glândula. O veneno extraído era coletado em um bécher esterilizado e armazenado, para posterior uso pela instituição. Após a extração manual do veneno, as serpentes eram devolvidas às suas caixas, onde eram mantidas sem alimentação, sendo-lhes oferecido somente água, até o momento de serem sacrificadas.

No grupo de "6 horas", o veneno era extraído na parte da manhã e, 6 horas após, as serpentes eram sacrificadas por decapitação. Nos demais grupos, após a extração do veneno os animais eram colocados de volta nas suas caixas onde eram mantidos por intervalos de 4, 8 e 45 dias, respectivamente, sendo depois sacrificados.

### **III.1 - Microscopia Óptica**

Para estudo a nível de microscopia óptica, os animais foram sacrificados e as cabeças foram imediatamente imersas em líquido de Bouim ou paraformaldeído a 3%, em tampão PBS 0,1M pH 7,3 contendo sacarose a 1% e levadas à geladeira, até que cessassem as contrações. Após mais ou menos 30 minutos, as glândulas de veneno foram dissecadas.

Depois de removidas, uma das glândulas de veneno foi mantida inteira (uma só peça contendo a glândula principal, ductos e glândula acessória) e a outra seccionada transversalmente, segundo o maior eixo da glândula, obtendo-se, dessa forma, dois fragmentos, correspondendo um à glândula principal e o outro à glândula acessória e ductos.

O material, colhido e fixado por imersão em líquido de Bouim durante 24 horas, após fixação, foi lavado em álcool a 50% (PANTIM, 1948). Quando fixados em paraformaldeído a 3% em tampão PBS contendo sacarose a 1%, os fragmentos foram seccionados e colocados na mesma solução fixadora por mais 1 hora, e a glândula de veneno inteira, por mais 1 hora e 30 minutos. Ambos foram mantidos em refrigerador a 4° C e, a seguir, foram lavados em 3 banhos sucessivos de tampão PBS.

O material, uma vez retirado do fixador e lavado, foi desidratado, utilizando-se soluções de concentração crescente de álcool etílico (álcool 70%, álcool 80%, álcool 90% e álcool absoluto). Após desidratação, foi clarificado em 3 banhos sucessivos de xilol, impregnado em 3 banhos de parafina líquida em estufa a 60° C e, finalmente, incluído em parafina. Na inclusão em parafina, fragmentos contendo a glândula principal foram dispostos de modo a serem obtidos cortes transversais.

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo "American Optical", modelo Spencer, obtendo-se cortes histológicos com 5 micrômetros de espessura, que foram colocados sobre lâminas e guardados em estufa a 37° C, durante 24 horas, para secagem. Estes cortes foram, então, submetidos a técnicas rotineiras de coloração, bem como a técnicas específicas para cada estrutura a ser estudada.

### **III.1.a- Técnicas Rotineiras de Coloração**

As técnicas rotineiras de coloração foram realizadas, com a finalidade de possibilitar a identificação da forma e da

estrutura da glândula, bem como o estudo dos septos intertubulares, nos diferentes intervalos de tempo após a extração de veneno.

A) Técnica da hematoxilina-eosina (LILLIE e FULLMER, 1976)

Os cortes foram desparafinados em 3 banhos sucessivos de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico (álcool 100%, 90%, 80%, 70%) e lavados em água destilada. Foram, então, submetidos a coloração nuclear pela hematoxilina de Delafield, durante 3 minutos, seguida de lavagem em água corrente, por 5 minutos. Posteriormente, foram submetidos a coloração citoplasmática pela eosina, durante 1 minuto. Após lavagem rápida em água, foram desidratados em soluções de concentrações crescentes de álcool etílico (álcool 70%, 80%, 90%, e 100%), clarificados em 3 banhos de xilol e montados com lamínulas, usando-se bálsamo do Canadá.

B) Técnica do tricrômico de Gomori (LILLIE e FULLMER, 1976)

Os cortes foram desparafinados em 3 banhos sucessivos de xilol, hidratados pela série de concentrações decrescentes de álcoois e levados até água destilada. Procedeu-se à coloração dos núcleos pela hematoxilina de Delafield, durante 3 minutos, seguida de lavagem dos cortes em água corrente durante 5 minutos, e, em seguida, foram corados por 15 minutos pela mistura tricrômica. A diferenciação foi feita em ácido acético glacial a 0,2 %. Logo após, os cortes foram desidratados pela série de soluções de concentrações crescentes de álcoois, clarificados em xilol e montados com lamínula, usando-se bálsamo do Canadá.

### III.1.b- Técnicas Específicas

Para o estudo dos componentes do tecido conjuntivo foram empregadas técnicas seletivas para observação das fibras do sistema colágeno, e métodos histoquímicos de coloração para

evidenciaçã de glicoproteínas e glicosaminoglicanas da matriz extracelular.

### III.1.b.1- Sistema Colágeno

#### A) Técnica da impregnação argêntica (GOMORI, 1937)

Depois de desparafinados e hidratados, os cortes foram oxidados com solução aquosa de permanganato de potássio a 2%, durante 1 minuto. Em seguida, foram lavados em água corrente e descorados por solução aquosa de ácido oxálico a 3%. Após serem lavados 2 vezes com água destilada, tratados com solução de alúmem de ferro a 2% por 1 minuto e novamente lavados 3 ou 4 vezes com água destilada, procedeu-se à impregnação, submergindo os cortes durante 1 minuto, em solução de prata amoniacal (misturar 30ml de solução aquosa de nitrato de prata a 10% com 7,5ml de solução de hidróxido de potássio a 10%; agitar e dissolver o precipitado, adicionando, gota a gota, amônia, misturando bem até que o precipitado formado se dissolva. Diluir essa solução ao dobro do seu volume, com água destilada e filtrar). Os cortes foram lavados rapidamente com água destilada, revelados com formol a 10%, durante 1 minuto e lavados em água corrente, por 5 minutos. A seguir, foram mergulhados em solução de cloreto de ouro a 0,2% por 1 minuto, lavados em água destilada, fixados em solução de hipossulfito de sódio a 3%, durante 2 minutos e lavados em água corrente. Posteriormente, os cortes foram submetidos a desidratação, clarificação e montagem em lamínula, usando-se bálsamo do Canadá.

#### B) Método do picrossírius (JUNQUEIRA, 1979a)

Os cortes, após serem desparafinados e hidratados, foram corados durante 1 hora pelo picrossírius (solução 0,1% de Sirius Red F3BA em solução aquosa saturada de ácido pícrico). Posteriormente, foram mergulhados em solução de ácido clorídrico 0,1N por 2 minutos, para retirada do excesso de corante, e lavados em água destilada. Foram desidratados pela série de soluções de

concentrações crescentes de álcoois, clarificados em xilol e montados em lamínula, usando-se bálsamo do Canadá.

### III.1.b.2- Glicosaminoglicanas

As glicosaminoglicanas, devido à presença de grupos dissacarídeos sulfatados ou carboxilados, possuem numerosos grupos negativos em sua molécula, constituindo polianions, que favorecem a associação com cationtes livres ou com grupamentos básicos de proteínas. A porção glicídica sulfatada ou carboxilada, reage com o corante azul de alcian, que é um corante básico (SCOTT, 1972).

Foram utilizadas soluções de azul de alcian em pH 1,0 e pH 2,5, visando a evidenciar as formas sulfatadas das glicosaminoglicanas e as formas sulfatadas e carboxiladas, respectivamente.

#### A) Técnica do azul de alcian (AB) pH 2,5 (MOWRY, 1963)

Os cortes foram desparafinados, hidratados e lavados em água destilada. Em seguida, foram lavados com uma solução de ácido acético a 3%, durante 3 minutos e corados pela solução aquosa de azul de alcian a 1%, contendo ácido acético a 3%, durante 2 horas. Uma vez corados, os cortes foram novamente lavados com solução de ácido acético a 3% e, depois de lavados em água destilada, desidratados, clarificados e montados com bálsamo do Canadá.

#### B) Técnica do azul de alcian (AB) pH 1,0 (PEARSE, 1968)

Após hidratados, os cortes foram corados por uma solução aquosa de azul de alcian a 1% em HCl 0,1N, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, foram lavados em HCl 0,1N, secos com papel de filtro, desidratados em álcool etílico, clarificados e montados em lamínulas, usando-se bálsamo do Canadá.

### III.1.b.3- Glicoproteínas neutras

A maior parte dos polissacarídeos que permanece no meio tissular, após o uso de solventes durante o processamento do material, se mantém ligada a proteínas, formando glicoproteínas. Algumas destas glicoproteínas não possuem grupos reativos ácidos, são ditas neutras e podem ser observadas pela reação positiva ao PAS. São os grupamentos glicídicos das glicoproteínas neutras, que são evidenciados em magenta pelo PAS. Sendo assim, este método de coloração é utilizado para revelar membranas basais, estruturas ricas em glicídeos (PEARSE, 1968).

#### A) Técnica do ácido periódico - Schiff (PAS) (MOWRY, 1963)

Os cortes foram desparafinados, hidratados e oxidados durante 10 minutos em solução de ácido periódico a 1%. Depois, foram lavados em água corrente por 5 minutos e, rapidamente, em água destilada. Foram, então, imersos no reativo de Schiff, durante 10 minutos, mergulhados em ácido clorídrico 3N e lavados em água corrente, durante 5 minutos. A seguir, os cortes foram desidratados, clarificados e montados com bálsamo do Canadá.

Fotomicrografias das lâminas coradas pelas técnicas acima foram obtidas no microscópio Zeiss D-7082, com filme Kodak Gold de 100 ASA.

### III.2- Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os espécimens destinados para estudo a nível de microscopia eletrônica de transmissão foram sacrificados, tendo suas cabeças, após decapitação, imediatamente imersas no fixador, durante 20 minutos, para que cessassem as contrações. Após

excisão de suas glândulas de veneno, estas foram seccionadas em fragmentos de cerca de 2 mm, que foram colocados em solução fixadora de glutaraldeído a 2,5%, em tampão PBS 0,1M em pH 7,3 e mantidos na solução fixadora durante 2 horas. Em seguida realizou-se a lavagem do material, com tampão cacodilato de sódio 0,1M em pH 7,2, durante 10 minutos (2 passagens de 5 minutos cada). Após, realizou-se a pós-fixação em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio a 3% (REYNOLDS, 1963), por 1 hora.

Seguiu-se a lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, e, depois, em tampão maleato 0,05M. Os fragmentos foram, então, contrastados "en-bloc" com acetato de uranila a 1% em tampão maleato, por 1 hora.

Após este procedimento, as amostras foram desidratadas em série de concentrações crescentes de álcoois. Posteriormente, iniciou-se a impregnação e inclusão em Spurr (SPURR, 1965). A seguir, os cortes foram levados à estufa a 60° C, durante 48 horas, para a polimerização. Durante a inclusão, os fragmentos foram orientados de modo a fornecer cortes longitudinais e transversais da região principal da glândula de veneno.

Os blocos incluídos em Spurr foram aparados em piramítomo LKB e cortados em ultramicrotomo LKB V, sendo obtidos cortes semi-finos de 1 $\mu$ m de espessura, que foram corados com solução aquosa de azul de toluidina a 1%, em carbonato de sódio a 2,5% e examinados ao microscópio óptico, para orientação dos cortes ultrafinos. Os blocos foram novamente aparados e cortados no ultramicrotomo, com navalha de diamante, obtendo-se, assim, cortes ultrafinos. Estes cortes, colhidos em grelhas de 300 malhas ("mesh"), foram contrastados com solução de citrato de chumbo a 1%, durante 4 minutos.

Uma vez contrastados, os cortes foram examinados ao microscópio eletrônico Zeiss EM-109 a uma voltagem de 80 kV, do setor de Microscopia Eletrônica do Hospital Universitário Antônio Pedro da UFF, para a obtenção de eletromicrografias, utilizando-se filme Kodalith Ortho Film (6556), tipo 3.

## IV - RESULTADOS

O exame de cortes longitudinais da glândula de veneno de *Bothrops jararaca*, corados pela técnica da hematoxilina-eosina, permitiu comprovar alguns aspectos histológicos e morfológicos já descritos na literatura e despertou nosso interesse para alguns elementos da matriz extracelular.

### IV.1 - Aspectos Gerais da Glândula de Veneno ao Nível de Microscopia Óptica

A glândula de veneno, em qualquer período de seu ciclo secretor, apresentou forma alongada, ligeiramente triangular, sendo revestida por uma cápsula espessa de tecido conjuntivo denso modelado, na qual se inseriam os músculos associados à glândula. A maior e principal parte da glândula de veneno consistia de uma estrutura tubular ramificada e ocupava mais de dois terços da sua região posterior. Esta glândula principal era formada por túbulos longos e ramificados, que convergiam para amplo lúmen ventral (fig. 2). Partindo da parede interna da cápsula observaram-se septos de tecido conjuntivo, que se projetavam para o interior da glândula, separando os túbulos (fig. 2). Alguns destes septos apresentavam-se mais largos nos cortes e, por isto, foram aqui identificados como **septos espessos**. À medida que estes septos conjuntivos se ramificavam, tornavam-se mais delgados, podendo ser observados como estruturas mais estreitas, denominadas **septos finos** (figs. 3 e 4).

Os septos intertubulares, espessos e finos, continham nervos, muitos vasos sanguíneos e inúmeros melanócitos distribuídos irregularmente (figs. 4 e 6).

Os túbulos que constituíam as unidades secretoras da glândula eram revestidos por epitélio simples, que variava de cúbico a prismático, segundo o tempo após a extração de veneno. Este epitélio secretor repousava sobre uma membrana basal, a qual foi bem visualizada pela técnica do PAS (figs. 7a e 7b). Entre os túbulos havia septos de tecido conjuntivo, separando uma unidade secretora da outra (fig. 4).

A cápsula que envolve externamente a glândula, bem como a septação interna, se coraram em verde pela técnica do tricrômico de Gomori, demonstrando serem constituídas por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas. Estas fibras formaram uma camada compacta e contínua ao redor da glândula, e apareceram num arranjo circular. Nos septos intertubulares elas se apresentaram dispostas ao longo do comprimento dos mesmos (figs. 5 e 6).

## **IV.2- Aspectos da Glândula nos Diferentes Períodos do Ciclo Secretor**

### **IV.2.a- Análise do Epitélio e do Sistema Colágeno**

#### **IV.2.a.1- Estágio de 45 dias após a extração de veneno**

##### **A) A Nível de Microscopia Óptica**

Cortes transversais e longitudinais de fragmentos da glândula mostraram o epitélio secretor formado por células cúbicas, com núcleo esférico ocupando quase todo citoplasma (fig. 8). O lúmen de cada túbulo se apresentou dilatado e repleto de secreção. Os septos intertubulares se mostraram estreitados e intensamente corados em verde pelo tricrômico de Gomori, demonstrando a presença de feixes de fibras do sistema colágeno,

de trajeto sinuoso, estando compactamente agrupadas e orientadas longitudinalmente, preenchendo todo o septo (fig. 9). Entre estas fibras observou-se grande número de fibroblastos (fig. 8).

Através da técnica da impregnação argêntica, observou-se a presença de fibras delgadas, reveladas em negro (fig. 10), situadas na região de membrana basal. Nos septos espessos, pôde-se verificar a presença destas fibras, evidenciadas em preto, localizadas imediatamente abaixo do epitélio secretor e a ausência das mesmas na porção central dos septos (fig. 10), onde foram observadas fibras colágenas, reveladas em castanho. Este fato indica, além da presença de fibras colágenas espessas nos septos da glândula de veneno, a existência de fibras delgadas, com as características das fibras reticulares, na região de membrana basal.

A técnica de coloração pelo picrossírius, se baseia na diferença de cor e de intensidade de birrefringência que os diferentes tipos de colágenos apresentam quando corados pela solução de sirius red-ácido pícrico e examinados à luz polarizada. Com o emprego desta técnica, aos 45 dias após a extração de veneno observou-se nos septos a presença de agregados de fibras fortemente birrefringentes, com coloração predominantemente vermelha (fig. 11), sugerindo serem fibras de colágeno tipo I.

#### B) À Nível de Microscopia Eletrônica

Nos septos da glândula, observou-se que o espaço intercelular era preenchido por grande quantidade de fibrilas compactamente agrupadas (figs. 12 e 14). Estas fibrilas não apresentaram contrastação uniforme em nenhum dos períodos do ciclo secretor da glândula de veneno de *B. jararaca*. Embora algumas fibrilas observadas tenham apresentado contrastação fraca, a maioria delas não se apresentou eletrôn-densa. Examinadas em cortes longitudinais, no entanto, exibiram um padrão de estriação transversal característico das fibrilas de colágeno (fig. 12).

Em cortes transversais, observaram-se populações de fibrilas com diâmetro heterogêneo e, em algumas áreas, ocorria

marcante variação do diâmetro das mesmas nos espaços entre as células e seus prolongamentos e em regiões próximas a vasos sanguíneos. As fibrilas de menor diâmetro foram observadas, preferencialmente, nas proximidades do epitélio (fig. 15).

Células fusiformes, com prolongamentos citoplasmáticos longos e delgados, foram visualizadas nestes septos, tendo sido identificadas como fibroblastos. Em geral, o citoplasma era escasso e o seu núcleo apresentava-se alongado, ocupando extensa área do citoplasma, com predomínio de cromatina densa (fig. 13).

Neste período, os septos intertubulares se apresentaram estreitos, contendo numerosos prolongamentos irregulares de fibroblastos presentes, entre as fibrilas colágenas, que estavam regularmente distribuídas (fig. 12).

Os resultados obtidos com a microscopia óptica foram confirmados pela microscopia eletrônica. Assim, no período de 45 dias após a extração de veneno, os septos da glândula de veneno eram constituídos de fibroblastos, vasos sanguíneos, feixes de fibras colágenas e fibras reticulares na região da membrana basal.

#### **IV.2.a.2- Estágio de 6 horas após a extração de veneno**

##### **A) A Nível de Microscopia Óptica**

Através da análise dos cortes da glândula, pôde-se verificar que as células epiteliais que revestiam os túbulos tornavam-se mais alta. Seus núcleos eram arredondados e situados na porção basal da célula. Os túbulos apresentaram luz irregular, diâmetro reduzido e ausência de secreção. Os septos finos e espessos, situados entre os túbulos, mostraram-se dilatados, exibindo um aumento do espaço entre os feixes de colágeno (fig. 16). Pela técnica do tricrômico de Gomori foi possível observar

que as fibras de colágeno, densamente agrupadas, foram substituídas por uma malha de delicadas fibras frouxas, dispostas em todas as direções, apresentando-se bastante dispersas, principalmente nos septos finos. Contudo, nos septos espessos foram encontrados alguns feixes espessos de fibras colágenas (fig. 17).

Nos septos, entre as fibras do sistema colágeno, verificou-se a presença de numerosos vasos sanguíneos e de células identificadas como fibroblastos (fig. 17).

Pelo estudo dos cortes após o emprego da técnica da impregnação argêntica, foi possível a visualização de muitas fibras reticulares, evidenciadas em preto, localizadas na região central dos septos finos. Nos septos espessos, estas fibras se apresentaram num arranjo frouxo e ocorreram em menor quantidade (fig. 18).

Utilizando-se o método do picrossírius, com 6 horas após a extração de veneno foi possível distinguir fibras finas, fracamente birrefringentes, de cor esverdeada ou alaranjada, nos septos finos e fibras vermelhas birrefringentes, associadas a fibras de coloração verde, nos septos espessos (fig. 19). Estes resultados demonstraram que, além das fibras colágenas (colágeno tipo I) exibindo coloração vermelha, foi visualizado outro tipo de fibra, de cor esverdeada ou alaranjada, identificada como fibra reticular (colágeno tipo III), coexistindo com as primeiras. Esta observação, feita ao microscópio de polarização, explica a diferença de coloração e birrefringência entre os septos finos e espessos.

#### B) A Nível de Microscopia Eletrônica

No período de 6 horas pós-extração de veneno, os septos finos encontraram-se bastante alargados, exibindo, na sua região central, amplos espaços, contendo material de aspecto granular ou filamentar, entremeados com as fibrilas colágenas (fig. 20). Estas fibrilas, apresentavam a estriação típica do colágeno, não apareciam em arranjo uniforme e formavam vários agregados no meio extracelular (fig. 21). Estes agregados eram constituídos por

fibrilas com diâmetro mais homogêneo que aquelas observadas no estágio anterior. Entretanto, pôde-se notar a presença de grupos de fibrilas finas, com diâmetro homogêneo, preferencialmente localizadas próximas ao epitélio (fig. 22).

As células visualizadas nos septos apresentaram morfologia típica dos fibroblastos, exibindo prolongamentos finos e longos, distribuídos entre as fibrilas colágenas. Algumas destas fibrilas se localizavam em reentrâncias citoplasmáticas destas células (figs. 23 e 24).

Muitos fibroblastos examinados neste período apresentaram citoplasma abundante, núcleo oval e central, com cromatina frouxa. No citoplasma destas células verificou-se a presença de grande número de vesículas, muitas das quais continham material fracamente eletron-denso no seu interior (fig. 23).

Uma apreciável modificação do espaço extracelular ocorreu neste estágio, caracterizada pela troca na quantidade e no arranjo das fibras do sistema colágeno. Fibras irregulares finas passaram a predominar sobre fibras espessas. O aumento da quantidade de fibras reticulares está relacionado com a dilatação dos septos intertubulares.

#### **IV.2.a.3- Estágio de 4 dias após a extração de veneno**

##### **A) A Nível de Microscopia Óptica**

No quarto dia após a extração do veneno, as células epiteliais atingiram sua altura máxima, tornando-se colunares, com núcleo situado no terço basal (fig. 25). O lúmen tubular menos estreito, de contorno ainda irregular, apresentou pouca secreção acumulada no seu interior. Os septos finos entre os túbulos apresentaram-se menos alargados e com diminuição dos espaços entre as fibras do sistema colágeno. Quando observados após a

coloração pelo tricrômico de Gomori, revelaram a presença de uma trama de fibras finas e irregulares. Nos septos espessos foi observada a presença de feixes de fibras mais densos (fig. 26).

Neste período, através da técnica da impregnação argêntica, foram visualizadas fibras reticulares, na região de membrana basal dos septos. Contudo, pôde-se observar grande quantidade destas fibras, distribuídas na parte central dos septos finos (fig. 27).

Em relação ao período anterior, o método do picrossírius evidenciou um aumento na quantidade de fibras de cor verde e alaranjada (colágeno III), preenchendo os septos finos (fig. 28).

#### B) A Nível de Microscopia Eletrônica

Aos 4 dias do ciclo secretor, observou-se nos septos finos a existência de grupos de fibrilas colágenas, localizados próximos ao epitélio (fig. 29). Estes grupos foram vistos, em íntimo contacto com a membrana celular, em reentrâncias da superfície celular dos fibroblastos (fig. 30).

Na porção mais central dos septos, notaram-se espaços onde foram observadas fibrilas colágenas isoladas, que apresentavam periodicidade típica. (fig. 32). Em cortes transversais, foi observada uma homogeneidade quanto ao diâmetro das fibrilas nos vários grupos (fig. 31).

Os fibroblastos, com prolongamentos citoplasmáticos irregulares, apresentavam o núcleo oval com cromatina frouxa e o citoplasma mais volumoso em relação aos tempos anteriores. Neles se observou aparelho de Golgi e retículo endoplasmático rugoso desenvolvidos (fig. 32).

As cisternas do retículo endoplasmático apareceram dilatadas, pela presença de material fracamente eletrôn-denso no seu interior. Mitocôndrias e uma grande quantidade de vesículas foram observadas no citoplasma e prolongamentos celulares (fig. 34). Muitas dessas vesículas, abundantes na região do aparelho de Golgi, apresentaram superfície lisa e pareciam estar

transportando seu conteúdo para o espaço extracelular (fig. 33).

Neste material, as técnicas empregadas revelaram nos septos finos a existência de grande quantidade de fibras reticulares, juntamente com algumas fibras de colágeno I. Nos septos espessos foi observado o mesmo aspecto visto no estágio de 6 horas.

#### **IV.2.a.4- Estágio de 8 dias após a extração de veneno**

##### **A) A Nível de Microscopia Óptica**

Neste período, as células secretoras apresentaram-se menos altas, com núcleo localizado na porção basal (fig. 35). Os lúmenes dos túbulos mostraram-se expandidos e com secreção acumulada no seu interior. Os septos intertubulares não se mostraram alargados e, quando corados pela técnica do tricrômico de Gomori, revelaram feixes de fibras sinuosas, com sentido longitudinal predominante, nos septos finos. Nos septos espessos verificou-se a presença de fibras arranjadas em feixes espessos (fig. 36).

Após a técnica da impregnação argêntica observaram-se fibras reticulares na região de membrana basal dos septos, bem como, pequena quantidade destas fibras na porção central dos septos finos (fig. 37).

As lâminas examinadas pelo método do picrossírius apresentaram padrão semelhante àquele encontrado nos septos do material colhido aos 45 dias do ciclo, exceto pelo fato de exibirem, nos septos finos, algumas fibras alaranjadas e verdes (colágeno III), fracamente birrefringentes, de permeio com as vermelhas (colágeno I) (fig. 38).

## B) A Nível de Microscopia Eletrônica

Os septos intertubulares apresentaram-se estreitados e preenchidos por fibrilas colágenas, exibindo as estriações transversais características (fig. 39).

As células apresentaram características morfológicas semelhantes às dos fibroblastos descritos no estágio de 45 dias pós-extração do veneno, isto é, o núcleo encontrava-se alongado, com cromatina mais densa e o citoplasma mais escasso (fig. 39). Em contraste ao estágio de 45 dias, observaram-se algumas estruturas vesiculares presentes nos prolongamentos citoplasmáticos, nas quais se observou material fracamente eletron-denso (fig. 41).

Em íntimo contacto com os prolongamentos dos fibroblastos foram notados grupos de fibrilas colágenas, com diâmetro menor se comparadas àquelas do estágio de 45 dias (fig.40b e 42).

Em comparação com os estágios de 6 horas e de 4 dias, as fibrilas colágenas se encontravam num arranjo mais compacto (fig. 40a).

A partir do estágio de 45 dias após a extração de veneno, quando a glândula está em repouso, até o estágio de 8 dias, quando a atividade secretora é máxima, ocorreu uma modificação gradativa na espessura e no arranjo das fibras do sistema colágeno. Esta modificação parece estar associada com as transformações que o epitélio secretor sofre durante o ciclo de síntese.

A cápsula conjuntiva que circunda a glândula, observada nos diferentes intervalos (45 dias, 6 horas, 4 e 8 dias) após a extração de veneno, não apresentou alterações quanto à coloração ou à arrumação das fibras do sistema colágeno. Com o uso da impregnação argêntica, não foram evidenciadas fibras reticulares

em nenhum dos períodos estudados. Ao picrossírius, a cápsula se apresentou sempre composta por fibras vermelhas (colágeno I), fortemente birrefringentes.

#### IV.2.b - Evidenciação das Glicosaminoglicanas a Nível de Microscópio Óptico

O método do azul de alcian foi utilizado em duas soluções de diferentes pH. A solução AB pH 2,5 revelou positividade para as glicosaminoglicanas sulfatadas e carboxiladas da matriz conjuntiva dos septos (figs. 44a, 45a, 46a). No material obtido 45 dias após a extração de veneno, pôde-se notar menor intensidade de coloração em relação aos outros períodos pós-extração de veneno (fig. 43a).

Com AB pH 1,0, as glicosaminoglicanas sulfatadas foram fracamente coradas (figs. 44b, 45b, 46b), enquanto os septos dos cortes com material de 45 dias pós-extração, apresentaram-se descorados (fig. 43b). Foi, no entanto, observada certa irregularidade quanto à coloração dos cortes deste estágio.

As proteoglicanas, evidenciadas pelo azul de alcian, foram visualizadas como um material irregular, difusamente distribuído entre as fibras do sistema colágeno, não apresentando um padrão constante nos resultados encontrados. Não foi detectada diferença sensível quanto à intensidade de coloração entre os septos finos e espessos. As observações feitas sugerem haver um discreto aumento no conteúdo de proteoglicanas durante o ciclo de síntese (tabela abaixo).

	45 d	6 h	4 d	8 d
AB pH2,5	+	++	++	++
AB pH1,0	o/+	+	+	+

++ - positivo  
 + - fracamente positivo  
 o - ausência de coloração

Torna-se difícil interpretar a coloração das glicosaminoglicanas observadas nos septos da glândula de veneno, face à inconstância dos resultados obtidos. Isto, provavelmente, é devido à ação dos fixadores histológicos, que podem remover total ou parcialmente estes componentes da matriz extracelular.

#### **IV.2.c - Evidenciação da Membrana Basal a Nível de Microscopia Óptica**

Com a técnica do PAS, que evidencia as glicoproteínas neutras em magenta, observou-se, no tecido conjuntivo dos septos, a presença de delgada faixa fortemente corada, logo abaixo do epitélio secretor. Esta faixa mostrou-se homogênea e intensamente positiva ao PAS, indicando, desta forma, a presença de membrana basal em todos os tempos do ciclo secretor (figs. 7a e 7b).

Através das técnicas empregadas a nível de microscopia óptica, as fibras do sistema colágeno puderam ser observadas nos septos intertubulares da glândula de veneno, durante o ciclo secretor. No entanto, com o uso das técnicas específicas de coloração, foi possível identificar, nos septos finos, uma mudança gradativa quanto ao tipo de fibra do sistema colágeno. Pouca ou nenhuma modificação foi observada nos septos espessos, sugerindo não estarem estes sujeitos a alterações marcantes.

As observações realizadas a nível de microscopia eletrônica de transmissão confirmaram os resultados obtidos pela microscopia óptica, quando se observaram variações no diâmetro e na arrumação das fibrilas colágenas, nos septos finos da glândula de veneno.

Observou-se, junto às células e às fibrilas colágenas, a presença de uma matriz não fibrilar, a qual variou durante o ciclo.

Figura 4 - Diagrama de fluxo do processo de avaliação de impacto ambiental



Figuras 4 a 7

Fotomicrografias da região principal da glândula de veneno de *B. jararaca*.

**Fig. 4 - Coloração: hematoxilina-eosina**

Aspecto histológico da glândula de veneno, mostrando epitélio secretor ( **E** ) e luz glandular. Diferença pode ser notada entre septo fino ( **SF** ) e septo espesso ( **SE** ). Observar a presença de vasos sanguíneos ( **★** ) e fibroblastos ( **seta** ).

Aumento: 1.800x

**Fig. 5 - Coloração: tricrômico de Gomori**

Corte histológico da glândula de veneno, demonstrando em verde a presença de fibras do sistema colágeno nos septos intertubulares ( **seta** ) e na cápsula ( **\*** ).

Aumento: 300x

**Fig. 6 - Coloração: tricrômico de Gomori**

No tecido conjuntivo dos septos intertubulares, observar melanócitos ( **ponta de seta** ) e fibroblastos ( **seta** ). Luz ampla e repleta de secreção.

Aumento: 1.800x

**Fig. 7 a e b - Técnica: PAS**

Demonstração da membrana basal ( **seta** ).

Aumento: 1.800x

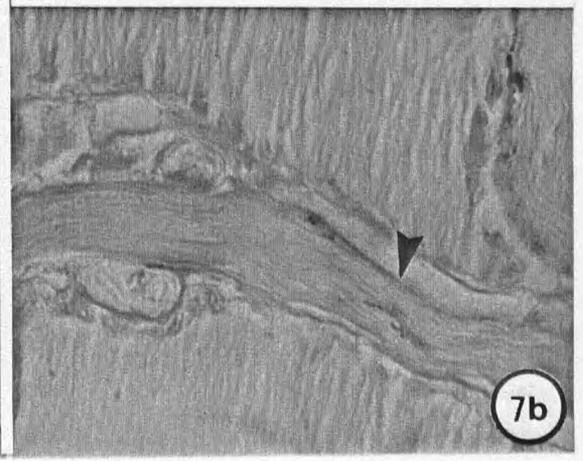
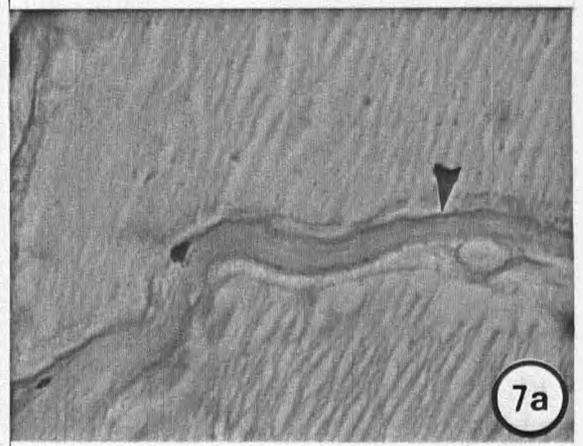
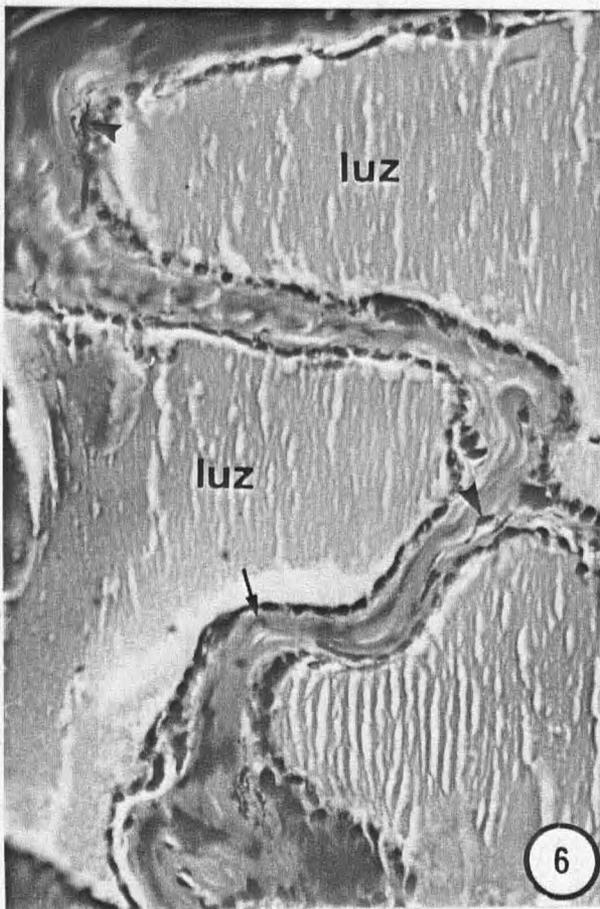
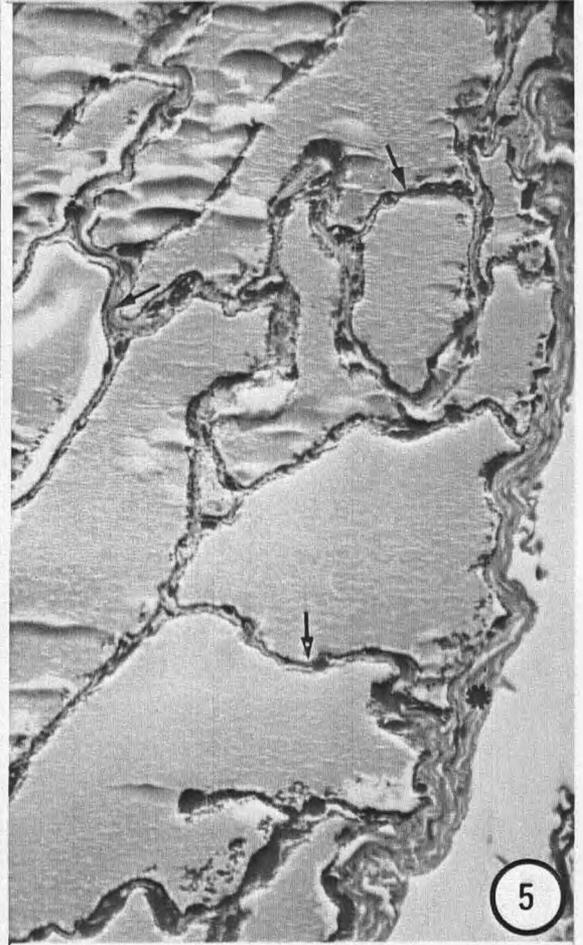
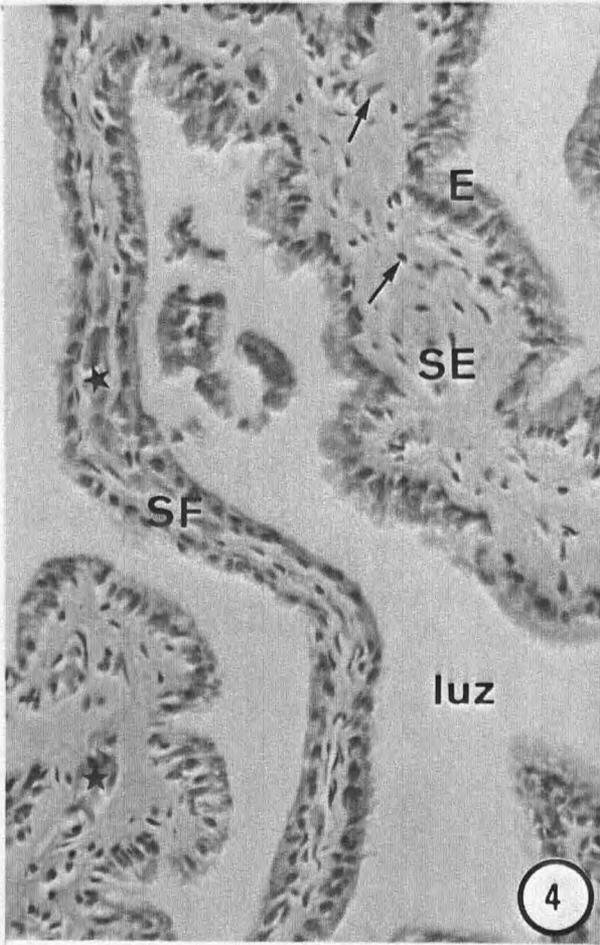


Fig. 8 - Diagrama de fluxo de dados para o sistema de controle de temperatura. O sistema é composto por um controlador de temperatura, um sensor de temperatura e um atuador de temperatura. O controlador recebe o sinal do sensor e envia o sinal para o atuador.

Fig. 9 - Diagrama de fluxo de dados para o sistema de controle de velocidade.

Fig. 9 - Diagrama de fluxo de dados para o sistema de controle de velocidade. O sistema é composto por um controlador de velocidade, um sensor de velocidade e um atuador de velocidade. O controlador recebe o sinal do sensor e envia o sinal para o atuador.

Fig. 10 - Diagrama de fluxo de dados para o sistema de controle de posição.

Fig. 10 - Diagrama de fluxo de dados para o sistema de controle de posição. O sistema é composto por um controlador de posição, um sensor de posição e um atuador de posição. O controlador recebe o sinal do sensor e envia o sinal para o atuador.

Fig. 11 - Diagrama de fluxo de dados para o sistema de controle de torque.

Fig. 12 - Diagrama de fluxo de dados para o sistema de controle de corrente.

Fig. 12 - Diagrama de fluxo de dados para o sistema de controle de corrente. O sistema é composto por um controlador de corrente, um sensor de corrente e um atuador de corrente. O controlador recebe o sinal do sensor e envia o sinal para o atuador.

Fig. 13 - Diagrama de fluxo de dados para o sistema de controle de tensão.

**Figuras 8 a 11**

Fig. 14 - Diagrama de fluxo de dados para o sistema de controle de potência.

Fotomicrografias de cortes transversais da região principal da glândula de veneno de *B. jararaca*, 45 dias após a extração de veneno. Na glândula em repouso, o epitélio secretor encontra-se com mínima atividade de síntese e de secreção.

**Fig. 8 - Coloração: hematoxilina-eosina**

Verificar o epitélio cúbico dos túbulos secretores, que apresentam luz ampla, contendo abundante secreção. Nos septos intertubulares encontram-se fibroblastos ( **seta** ) e vasos sanguíneos ( ★ ).

Aumento: 1.100x

No inset, observar detalhe do epitélio secretor.

Aumento: 4.350x

**Fig. 9 - Coloração: tricrômico de Gomori**

Observar feixes de fibras do sistema colágeno ( **seta** ), ocupando os septos. Entre estas fibras notar a presença de melanócitos ( **seta branca** ).

Aumento: 1.100x

No inset, em grande aumento, detalhe de um septo onde se visualizam fibras do sistema colágeno num arranjo compacto.

Aumento: 4.350x

**Fig. 10 - Técnica: impregnação argêntica**

Fibras reticulares evidenciadas em negro ( **seta** ), logo abaixo do epitélio.

Aumento: 1.100x

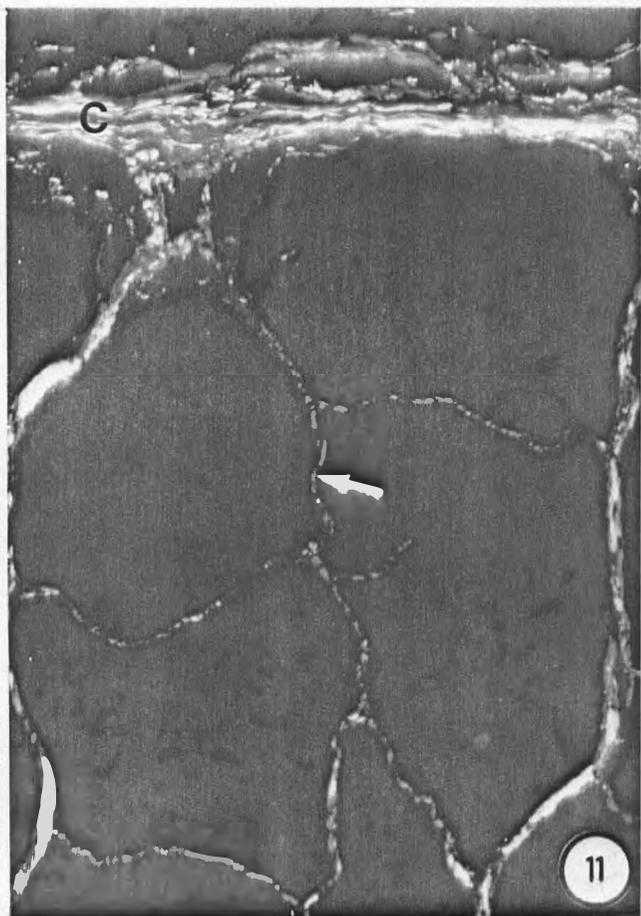
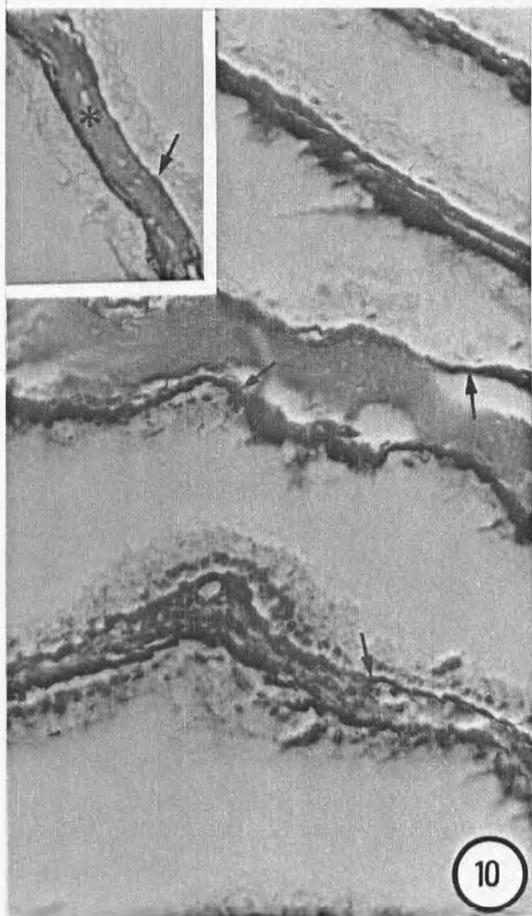
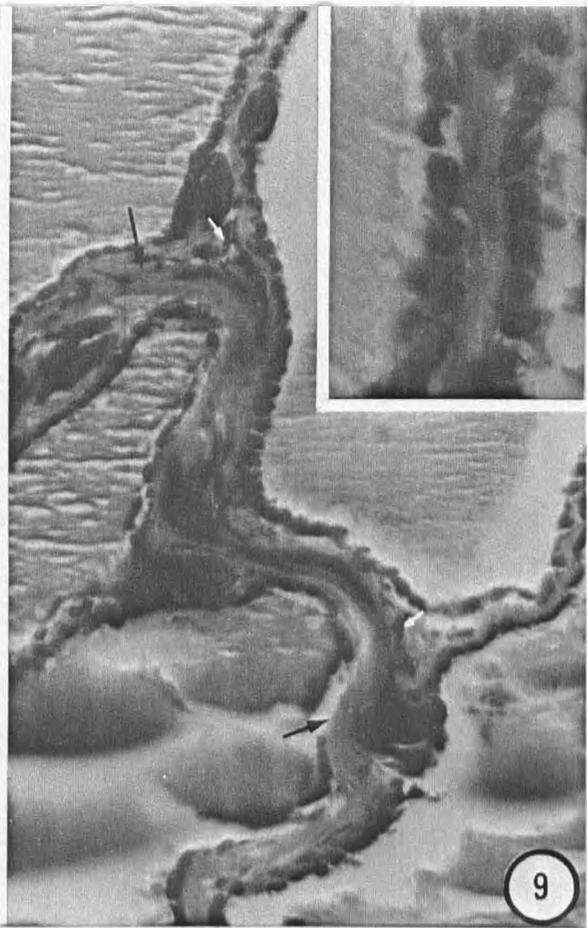
No inset, verificar a presença de fibras colágenas ( \* ) na parte central de um septo espesso.

Aumento: 1.100x

**Fig. 11 - Técnica: picrossírius com exposição à luz polarizada**

Observar colágeno tipo I, em vermelho, nos septos ( **seta** ) e na cápsula ( **C** ).

Aumento: 380x



... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

Figuras 12 a 15

Eletromicrografias dos septos da região principal da glândula de veneno de *B. jararaca*, 45 dias após a extração de veneno.

**Fig. 12** - Septo intertubular estreito, preenchido por fibrilas colágenas, observadas entre os prolongamentos dos fibroblastos ( **F** ). Em corte logitudinal, notar a estriação transversal das fibrilas colágenas ( **seta** ).

**E** - epitélio

Aumento: 12.000x

**Fig. 13** - No septo, verificar a presença de fibroblastos alongados, exibindo núcleo ( **N** ) com cromatina densa. Entre seus prolongamentos observar fibrilas colágenas em corte transversal ( **\*** ) e em corte longitudinal ( **seta** ).

Aumento: 12.000x

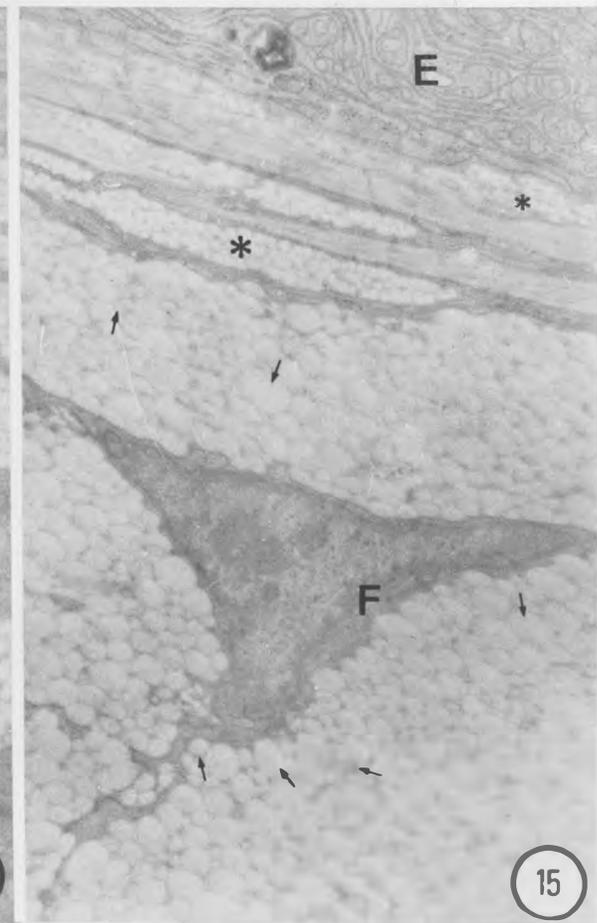
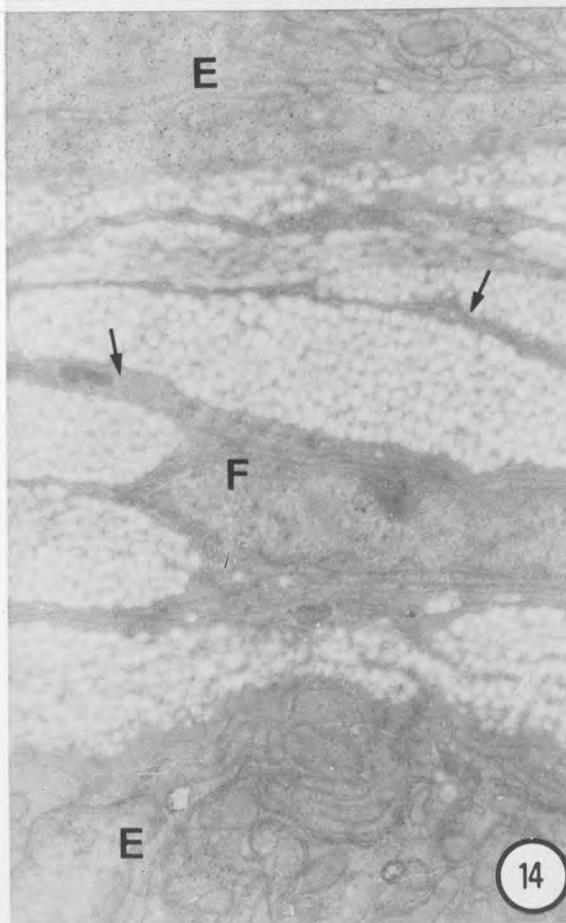
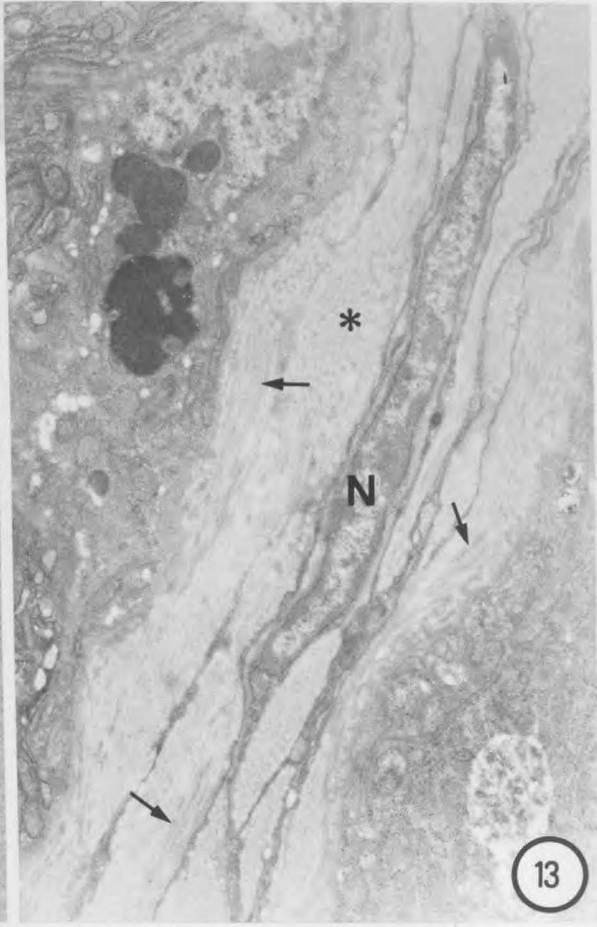
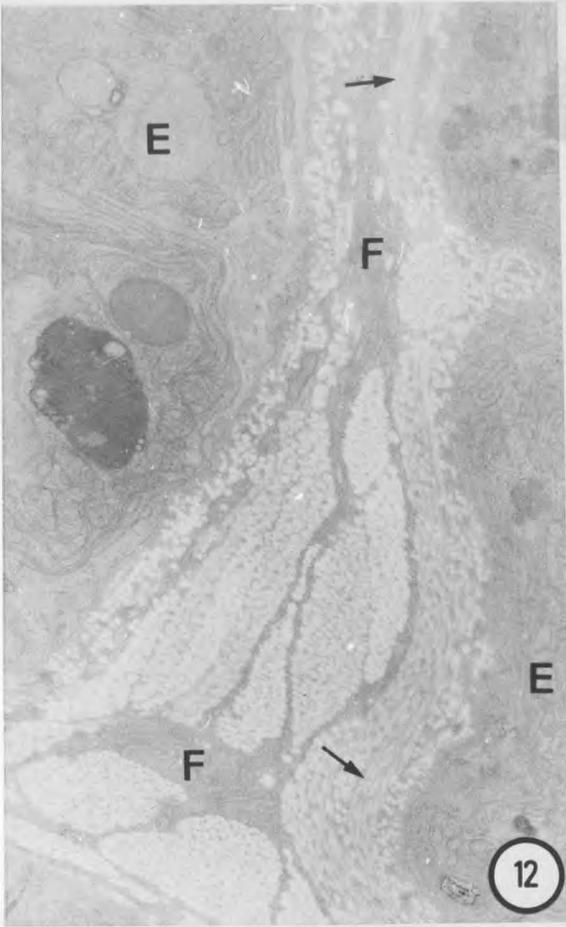
**Fig. 14** - Detalhe de fibrilas colágenas em corte transversal, em íntimo contacto com os fibroblastos ( **F** ) e seus prolongamentos ( **seta** ).

**E** - epitélio secretor

Aumento: 20.000x

**Fig. 15** - Entre fibroblastos ( **F** ), observar fibrilas colágenas com diâmetro heterogêneo. Próximo ao epitélio ( **E** ) verificar a presença de fibrilas com menor diâmetro ( **\*** ).

Aumento: 20.000x





Figuras 16 a 19

Fotomicrografias de cortes transversais da região principal da glândula de veneno de *B. jararaca*, 6 horas após a extração de veneno. A glândula encontra-se no início do período de síntese.

**Fig. 16** - Coloração: hematoxilina-eosina

Na luz dos túbulos glandulares, verificar a ausência de secreção. Observar os septos finos ( **SF** ) e espessos ( **SE** ), ambos distendidos.

Aumento: 450x

No inset, células colunares do epitélio secretor ( **E** ). A **seta** indica hemácias em vasos sanguíneos.

Aumento: 3.000x

**Fig. 17** - Coloração: tricrômico de Gomori

Aspecto histológico dos septos finos, revelando em verde uma malha frouxa de fibras finas. Observar a presença de fibroblastos ( **ponta de seta** ) e vasos sanguíneos ( **★** ).

Aumento: 1.750x

No inset, detalhe do septo revelando feixes de fibras do sistema colágeno.

Aumento: 500x

**Fig. 18** - Técnica: impregnação argêntica

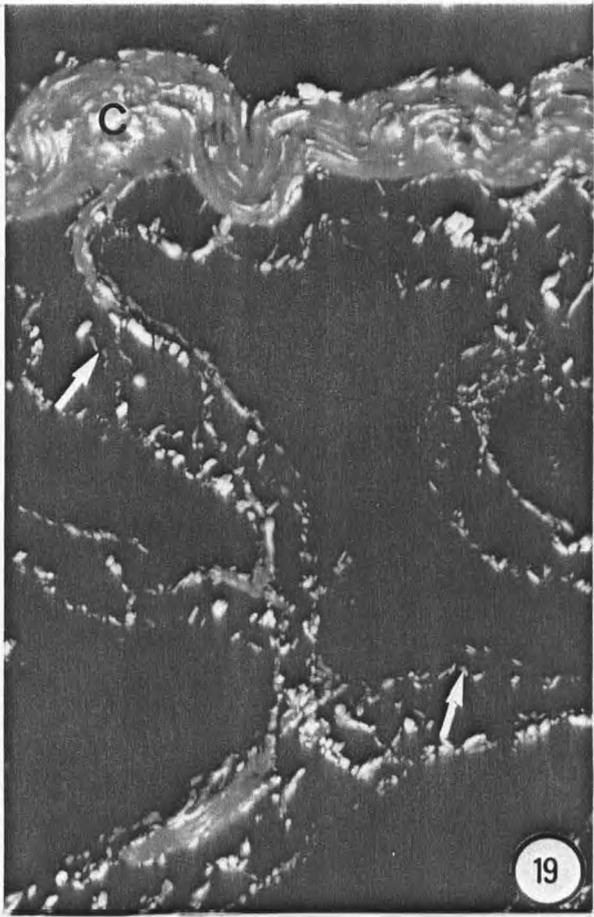
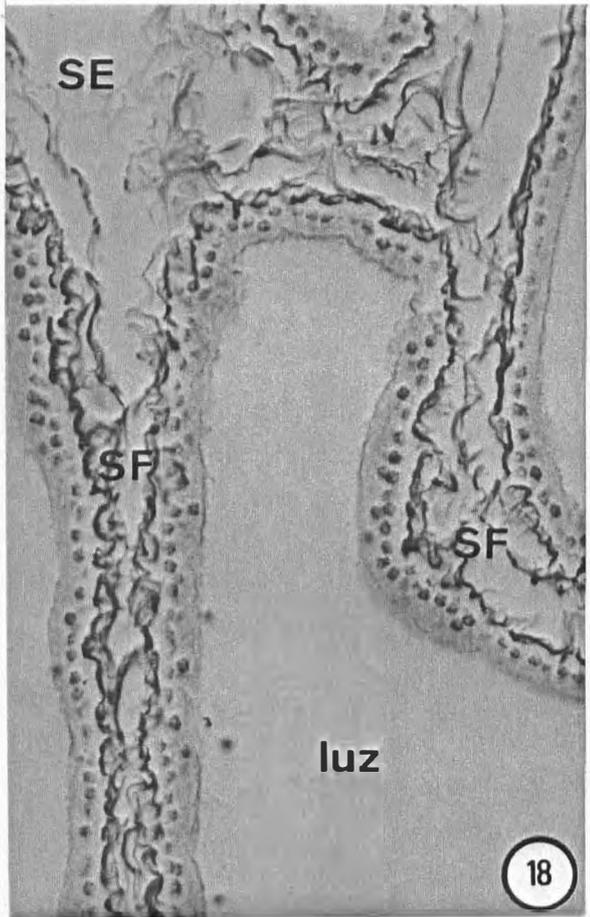
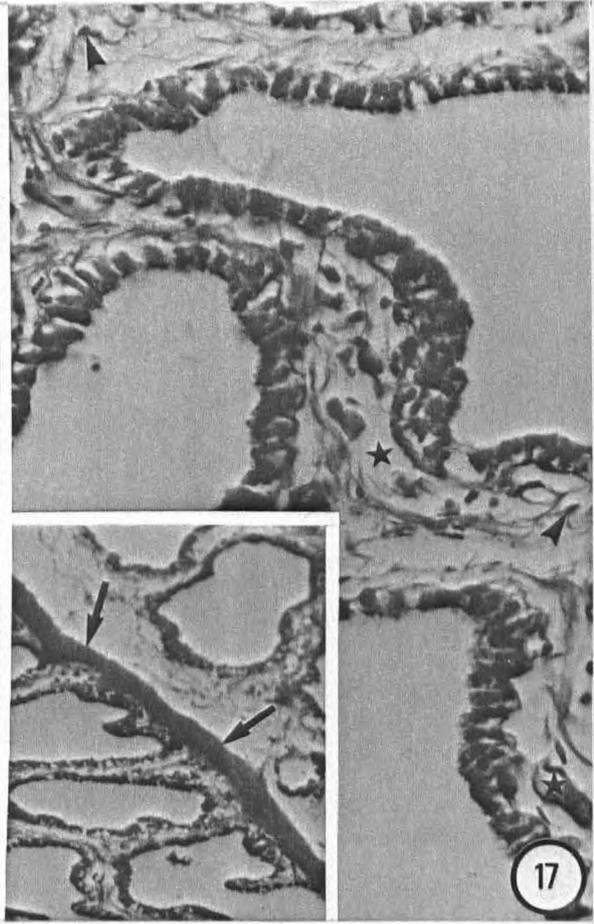
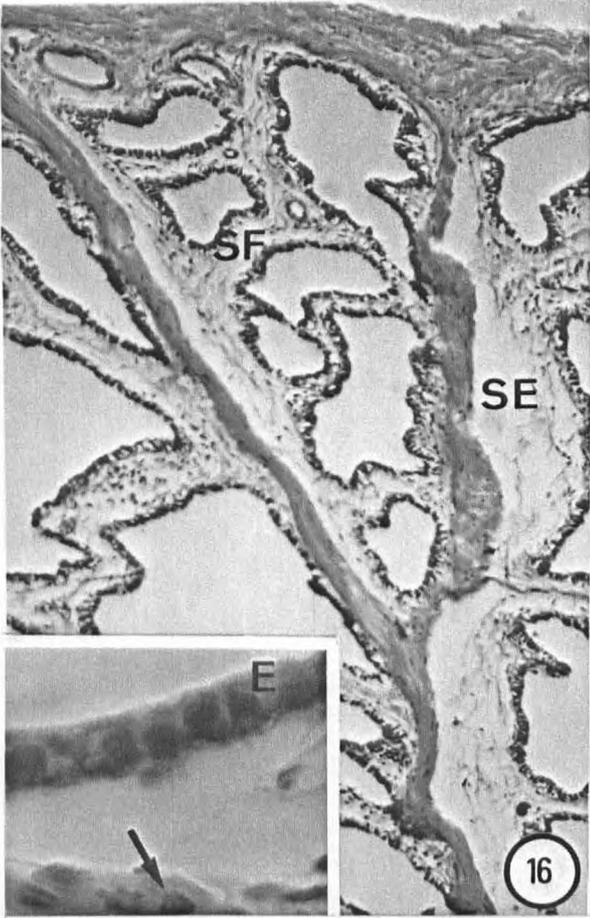
Em negro, observar malha de fibras reticulares nos septos finos ( **SF** ) e algumas destas fibras nos septos espessos ( **SE** ).

Aumento: 1.750x

**Fig. 19** - Técnica: picrossírius com exposição à luz polarizada

Em cor vermelha, observar fibras de colágeno tipo I na cápsula ( **C** ), contrastando com a cor esverdeada do colágeno tipo III ( **seta** ), localizado nos septos finos.

Aumento: 380x



[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page. The text is too light to transcribe accurately.]

Figuras 20 a 24

Eletromicrografias dos septos da região principal da glândula de veneno de *B. jararaca*, 6 horas após a extração de veneno.

**Fig. 20** - Septo distendido, apresentando espaços com material de aspecto granular (★) entre as fibrilas colágenas ( seta ), que aparecem formando grupos no espaço extracelular.

E = epitélio

F = fibroblasto

Aumento: 4.500x

**Fig. 21** - Observar estriação transversal das fibrilas ( seta ). Em corte transversal, verificar a presença de grupos de fibrilas com diâmetro homogêneo ( \* ).

Aumento: 18.000x

**Fig. 22** - Observar grupos de fibrilas com diâmetro homogêneo ( \* ) próximas ao epitélio ( E ).

Aumento: 18.000x

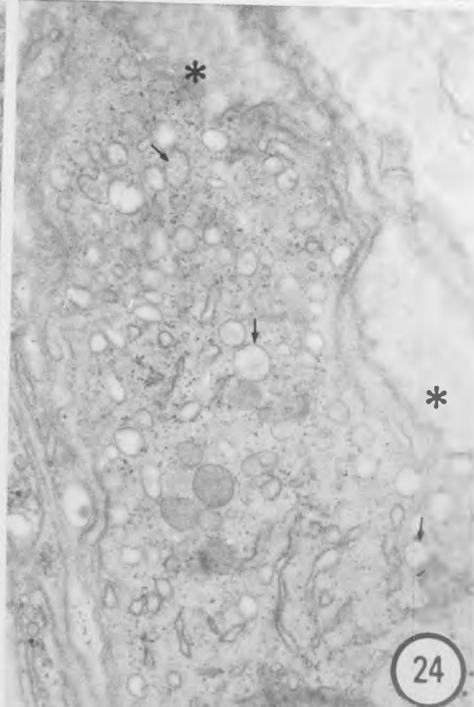
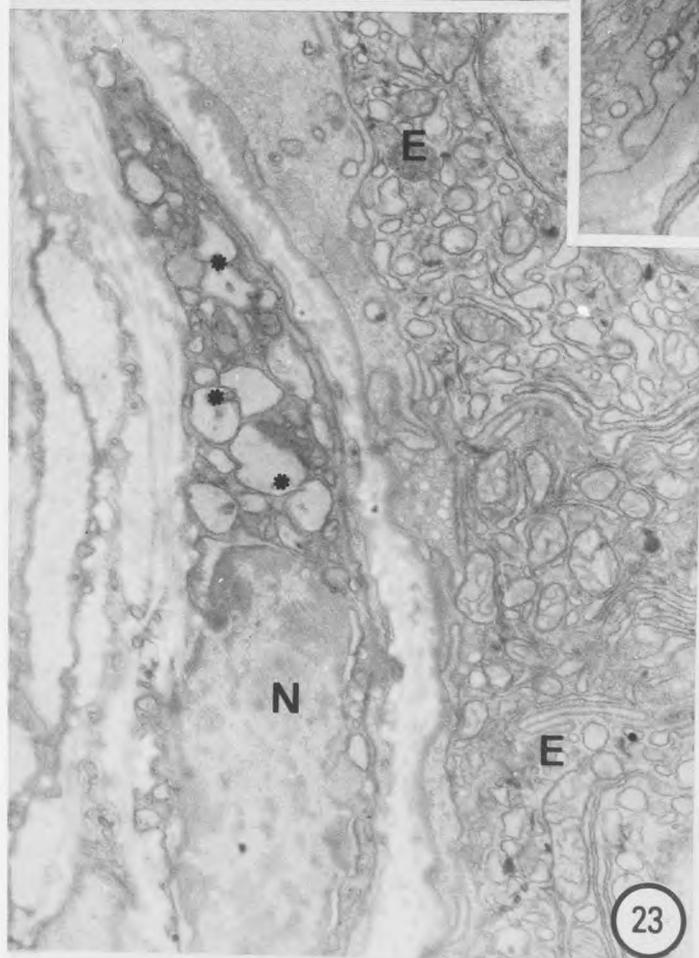
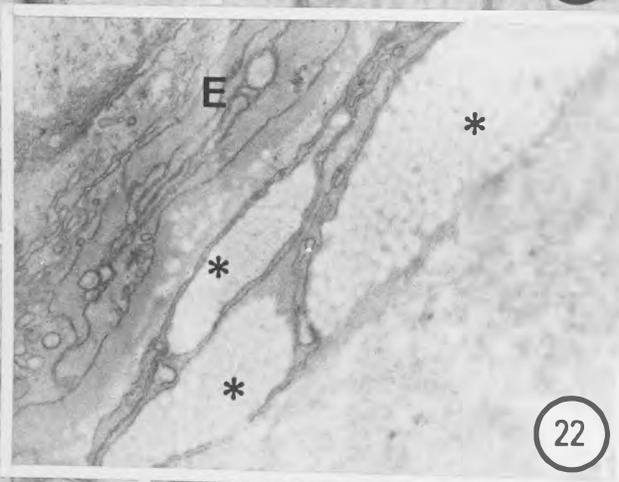
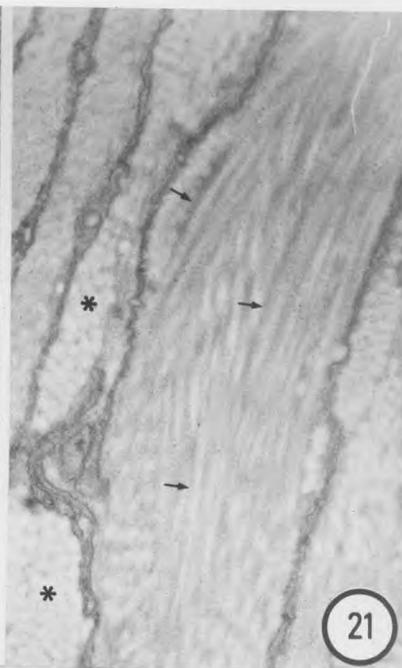
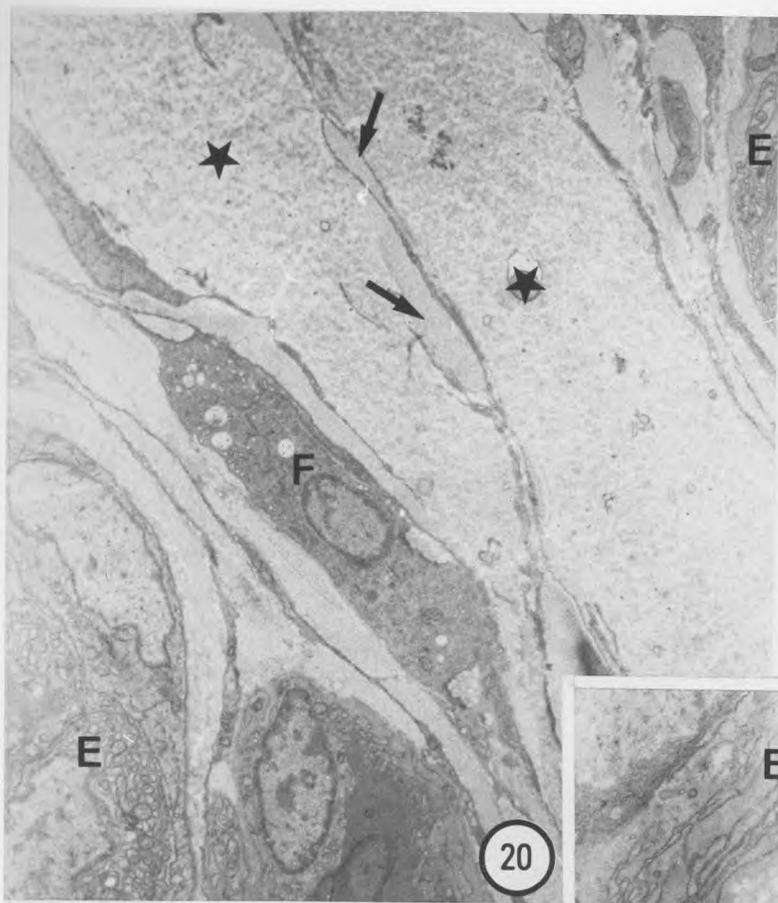
**Fig. 23** - Fibroblasto apresentando núcleo ( N ) com cromatina frouxa. No citoplasma encontram-se estruturas vesiculares dilatadas ( \* ).

E = epitélio

Aumento: 18.000x

**Fig. 24** - Observar fibrilas colágenas ( \* ) em reentrâncias citoplasmáticas do fibroblasto. Verificar, no citoplasma, a presença de estruturas vesiculares ( seta ), contendo material fracamente eletron-denso.

Aumento: 18.000x





Figuras 25 a 28

Fotomicrografias de cortes transversais da região principal da glândula de veneno de *B. jararaca*, 4 dias após a extração de veneno. A glândula encontra-se em fase de atividade máxima de síntese.

**Fig. 25** - Coloração: hematoxilina-eosina

Epitélio secretor apresenta-se colunar ( **E** ), a luz glandular contém pouca secreção, estando os septos dilatados ( **S** ).

Aumento: 1.900x

**Fig. 26** - Coloração: tricrômico de Gomori

Observar trama de fibras finas e irregulares ( **seta** ), ocupando os septos intertubulares.

Aumento: 1.900x

No inset, notar feixes de fibras ( \* ) nos septos espessos.

Aumento: 470x

**Fig. 27** - Técnica: impregnação argêntica

a) - Observar, em negro, fibras reticulares restritas à região de membrana basal dos septos espessos ( **seta** ) e no interior dos septos finos ( **seta branca** ).

Aumento: 1.200x

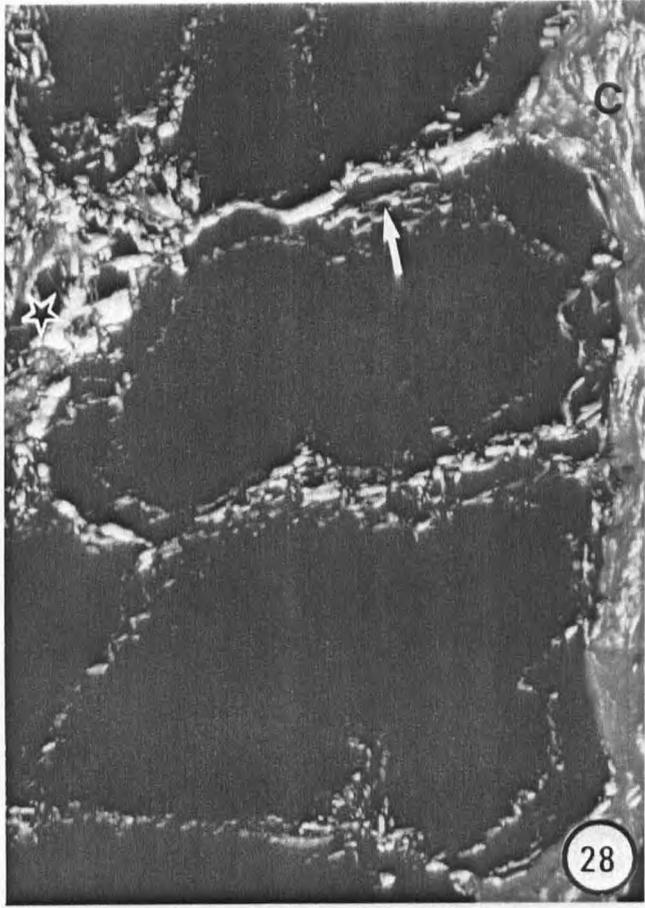
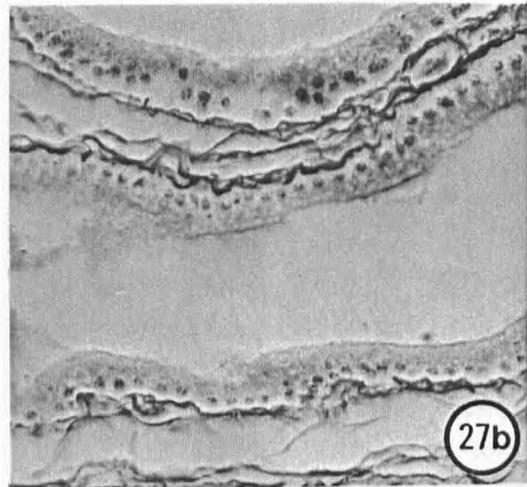
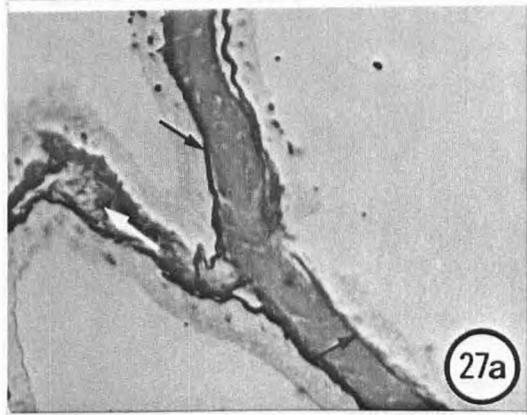
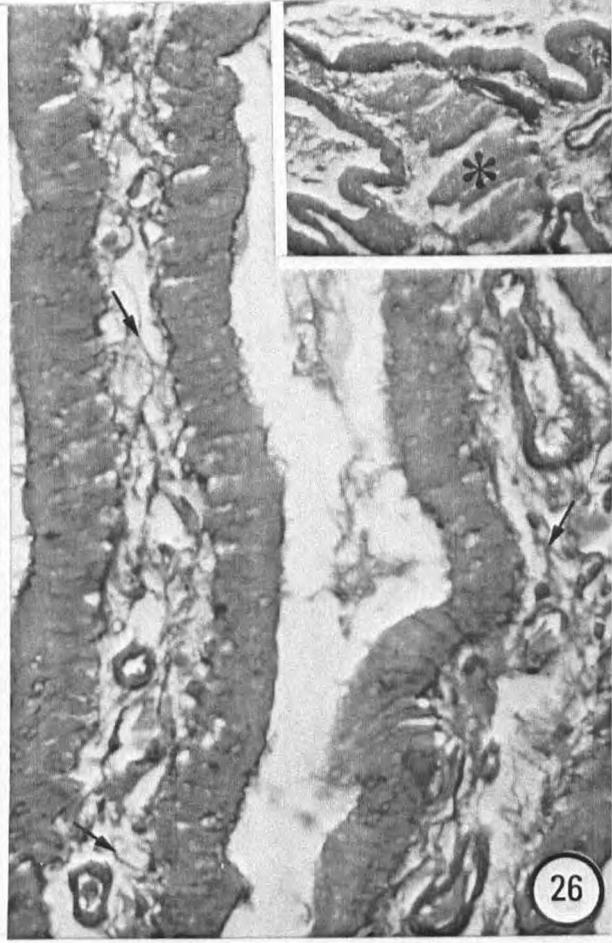
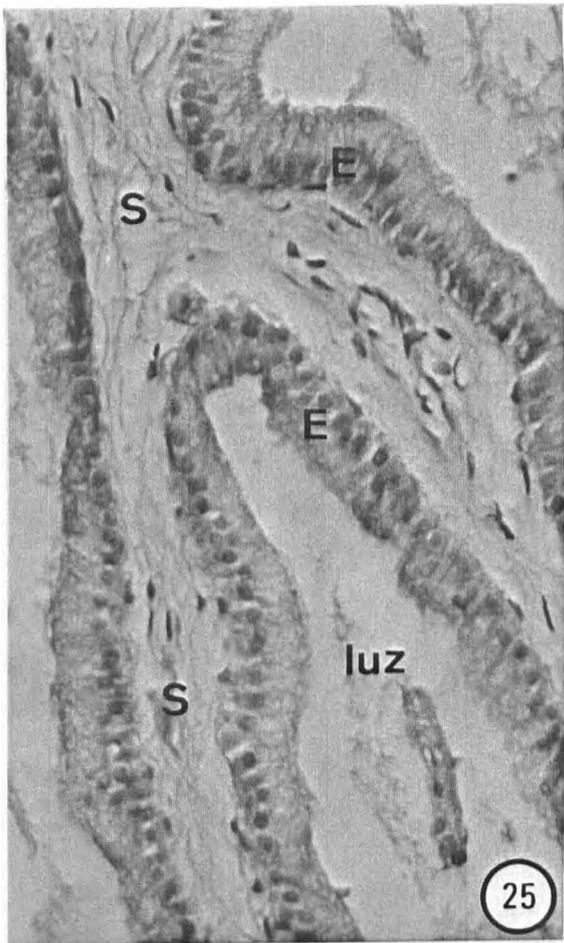
b) - Verificar a presença destas fibras na porção central dos septos finos.

Aumento: 1.400x

**Fig. 28** - Técnica: picrossírius com exposição à luz polarizada

Observar, em vermelho, fibras de colágeno I na cápsula ( **C** ) e no septo espesso ( ☆ ). Nos septos finos, notar fibras de colágeno III, que aparecem em verde ( **seta** ).

Aumento: 550x



Figuras 29 a 34

Eletromicrografias dos septos intertubulares da glândula de veneno de *B. jararaca*, 4 dias após a extração de veneno.

**Fig. 29** - Na região central do septo, observar amplos espaços, nos quais se visualizam grupos de fibrilas colágenas ( **seta** ).

**E** = epitélio

Aumento: 4.500x

**Fig. 30** - Detalhe das fibrilas colágenas ( \* ), situadas próximas ao epitélio ( **E** ).

Aumento: 18.000x

**Fig. 31** - Observar grupos de fibrilas colágenas ( **seta** ), apresentando diâmetro homogêneo.

**F** = fibroblasto

Aumento: 18.000x

**Fig. 32** - Fibroblasto apresentando núcleo ( **N** ) com cromatina frouxa e citoplasma com reentrâncias, onde se observam fibrilas colágenas ( **seta** ). Verificar presença de fibrilas no espaço extracelular ( **ponta de seta** ).

**m** = mitocôndrias

Aumento: 18.000x

**Fig. 33** - Verificar, no citoplasma do fibroblasto, aparelho de Golgi desenvolvido ( **G** ), contendo ao redor numerosas vesículas ( **seta** ) com material fracamente eletrôn-denso.

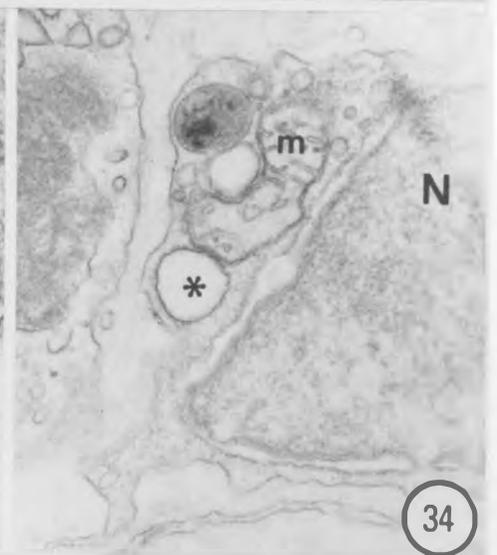
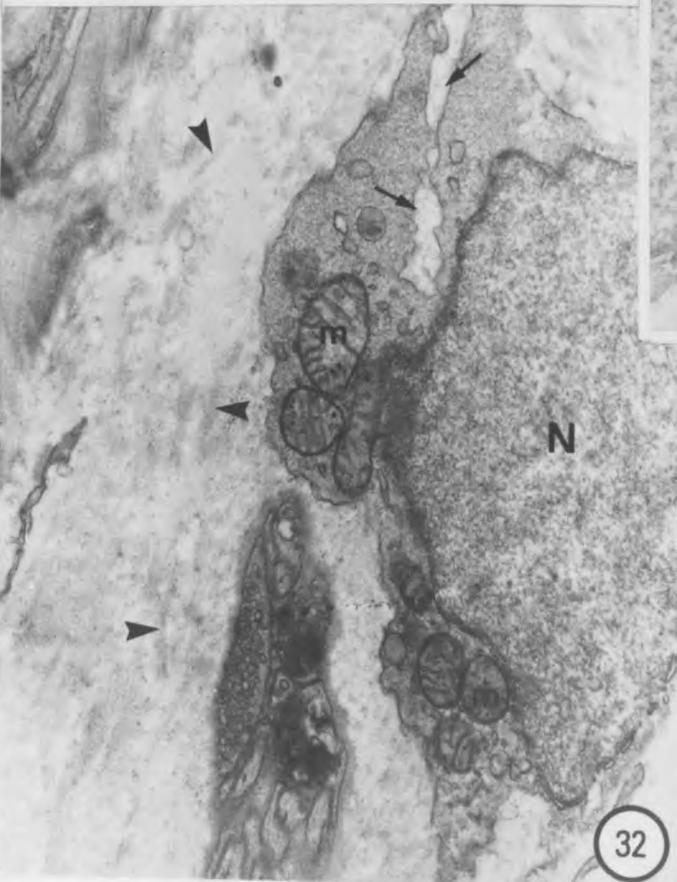
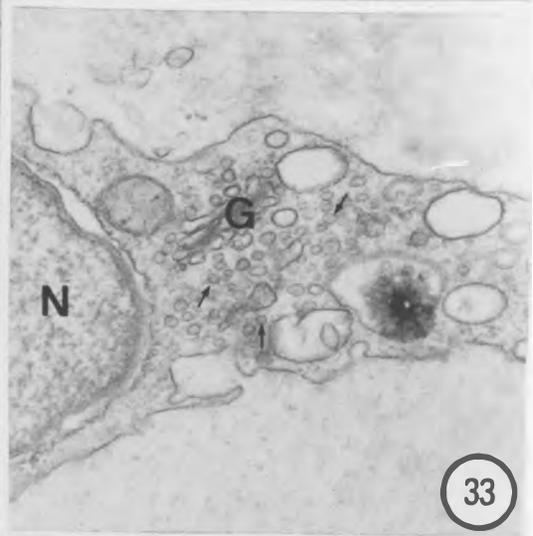
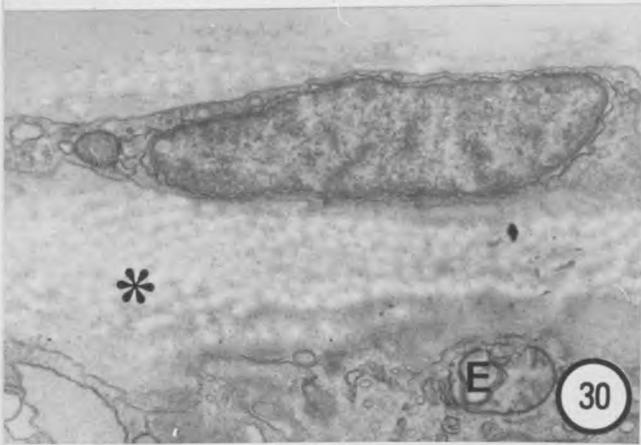
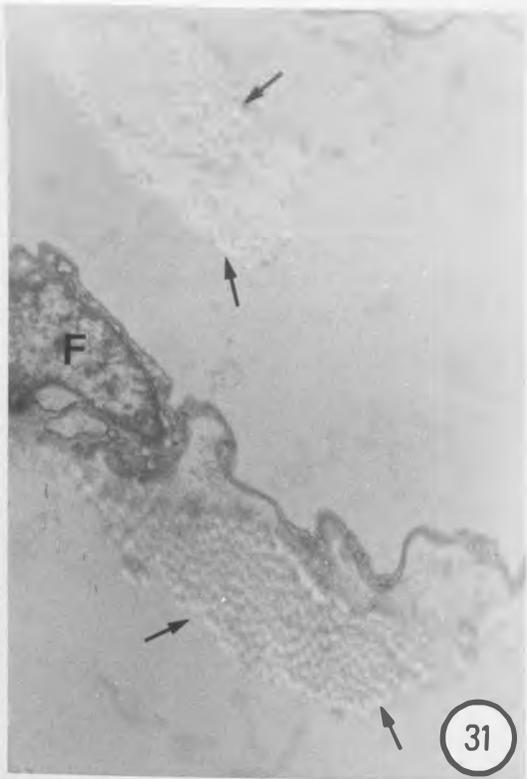
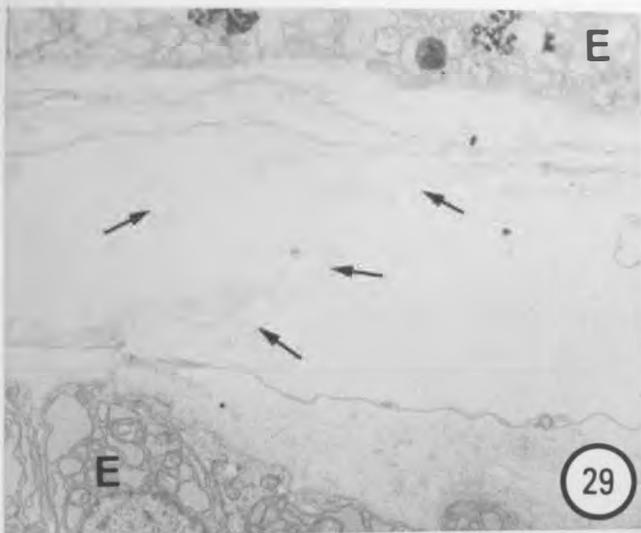
**N** = núcleo do fibroblasto

Aumento: 30.000x

**Fig. 34** - Observar cisternas do retículo endoplasmático granular dilatadas ( \* ), em íntima associação com mitocôndria ( **m** ).

**N** = núcleo do fibroblasto

Aumento: 30.000x





Figuras 35 a 38

Fotomicrografias de cortes transversais da região principal da glândula de veneno de *B. jararaca*, 8 dias após a extração de veneno. A glândula encontra-se em período de atividade máxima de secreção.

**Fig. 35** - Coloração: hematoxilina-eosina

Os túbulos secretores apresentam células epiteliais com núcleo basal ( **E** ) e luz com secreção.

Aumento: 1.900x

**Fig. 36** - Coloração: tricrômico de Gomori

Observar fibras do sistema colágeno ( **seta** ) nos septos finos.

Aumento: 1.400x

No inset, detalhe de um septo espesso mostrando fibras agrupadas em arranjo compacto ( \* ).

Aumento: 1.400x

**Fig. 37** - Técnica: impregnação argêntica

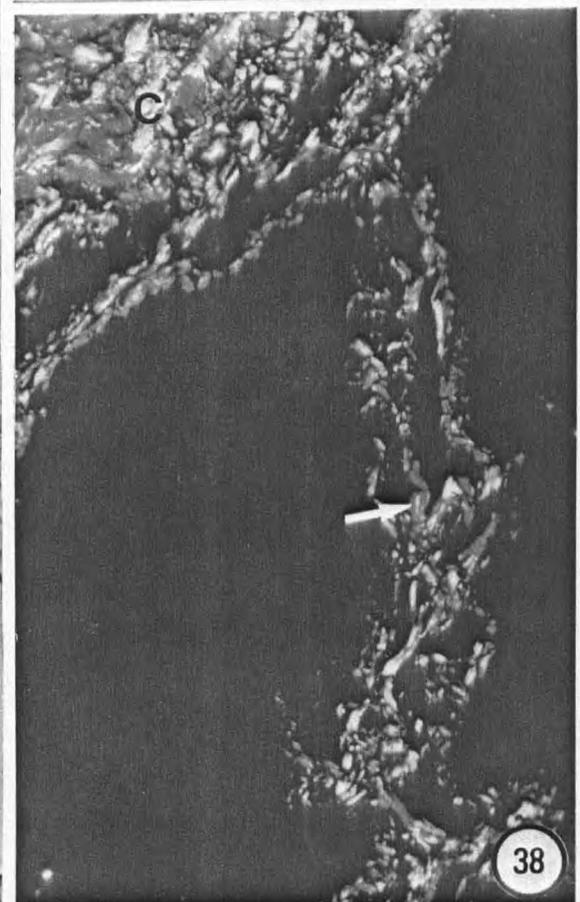
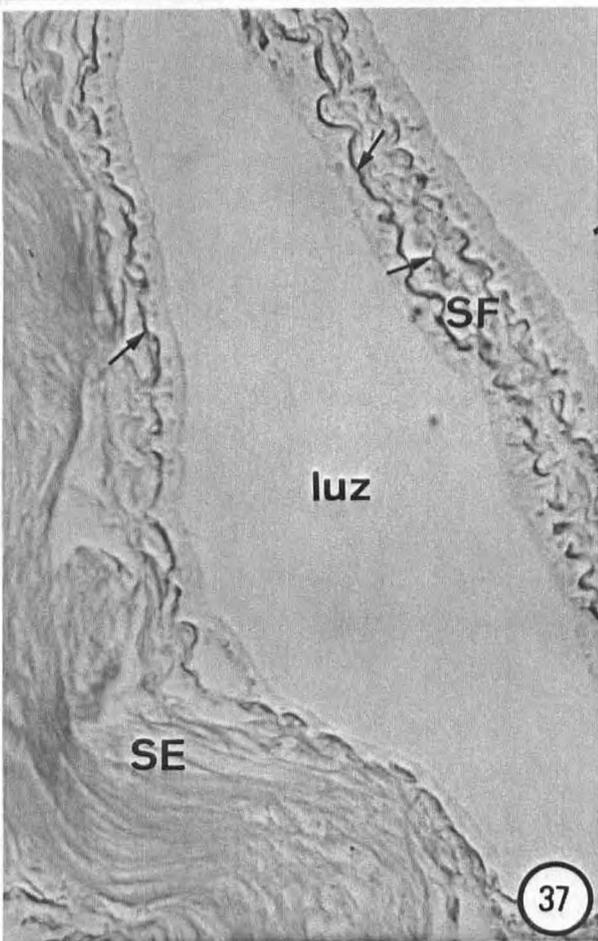
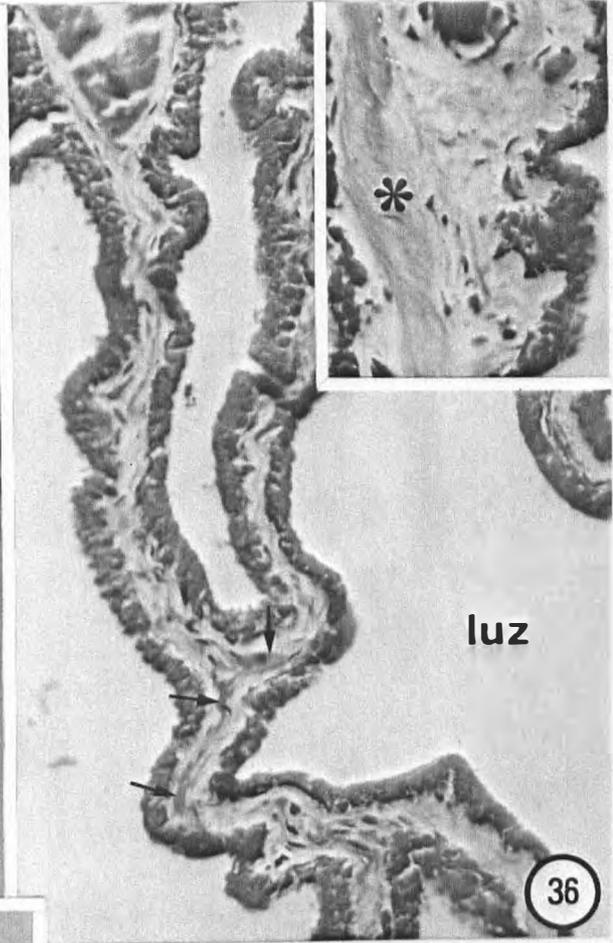
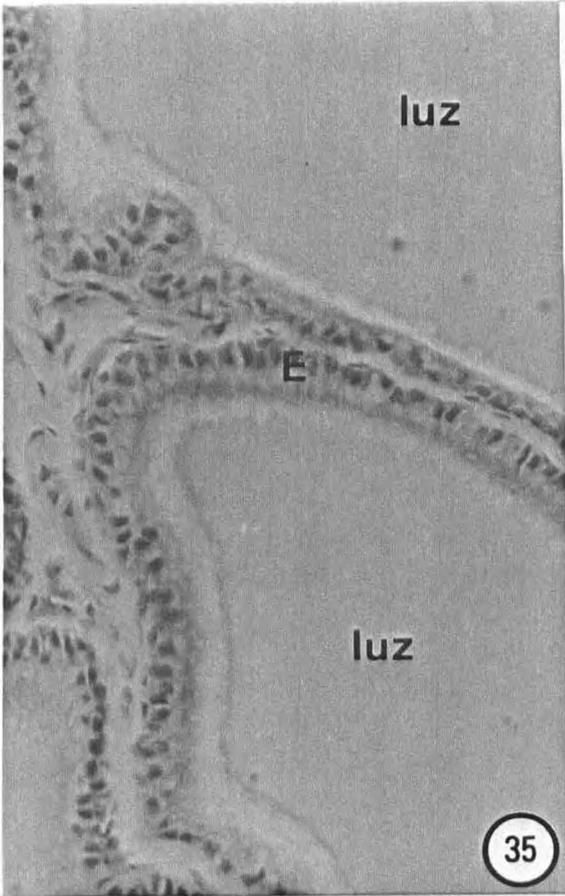
Verificar a presença de fibras reticulares ( **seta** ) na região de membrana basal. Observar poucas fibras reticulares na porção central dos septos finos ( **SF** ) e a ausência das mesmas no interior dos septos espessos ( **SE** ).

Aumento: 1.400x

**Fig. 38** - Técnica: picrossírius com exposição à luz polarizada

Observar, em vermelho, fibras de colágeno tipo I ( **seta** ) no septo fino e na cápsula ( **C** ).

Aumento: 550x





Eletromicrografias dos septos da região principal da glândula de veneno de *B. jararaca*, 8 dias após a extração de veneno.

**Fig. 39** - Septo reduzido, preenchido por fibrilas colágenas ( \* ). Fibroblasto com núcleo alongado ( **N** ) e cromatina densa, apresentando estruturas vesiculares ( **seta** ) nos seus prolongamentos.

**E** = epitélio

Aumento: 10.500x

**Fig. 40a** - Observar o arranjo compacto das fibrilas colágenas no septo.

**E** = epitélio

Aumento: 18.000x

**Fig. 40b** - Em corte transversal, notar o diâmetro homogêneo das fibrilas colágenas ( \* ).

**E** = epitélio

Aumento: 18.000x

**Fig. 41** - Fibroblasto apresentando estruturas vesiculares ( \* ), com material fracamente eletrôn-denso no interior, e cisternas do retículo endoplasmático dilatadas

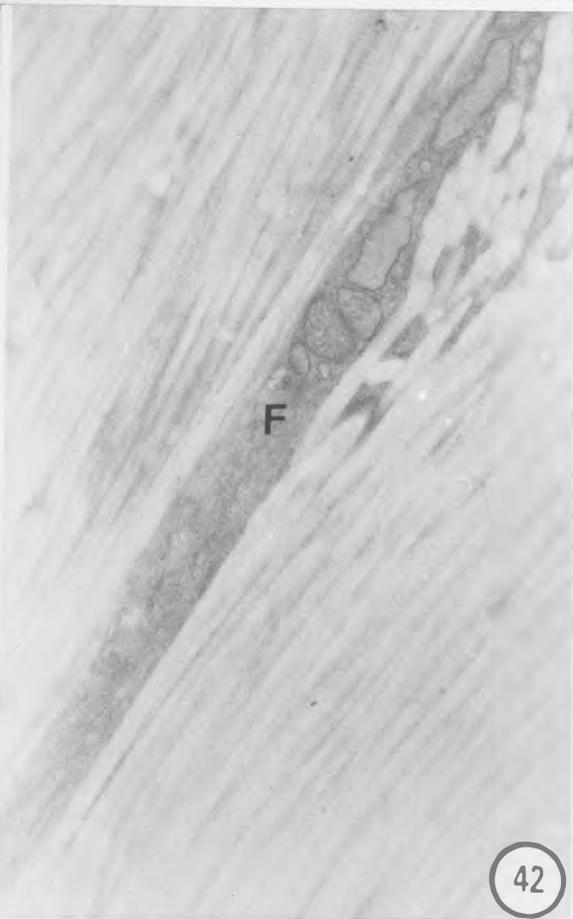
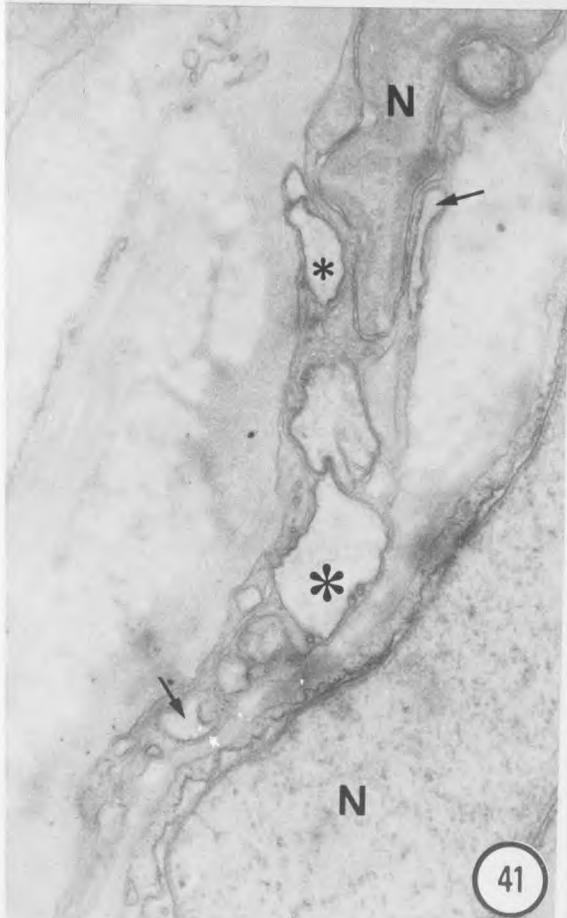
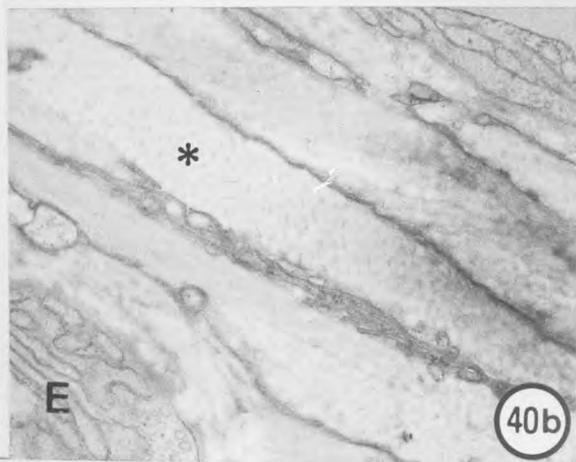
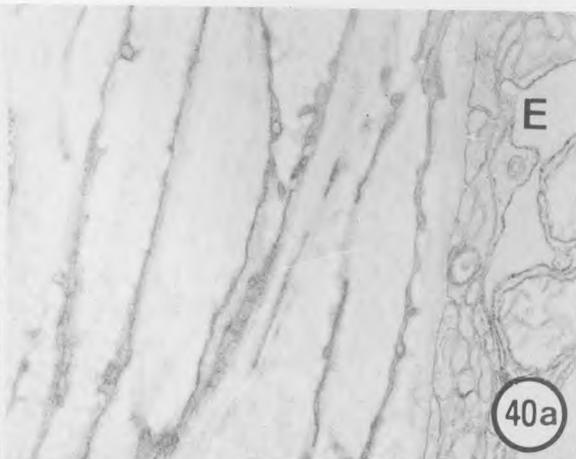
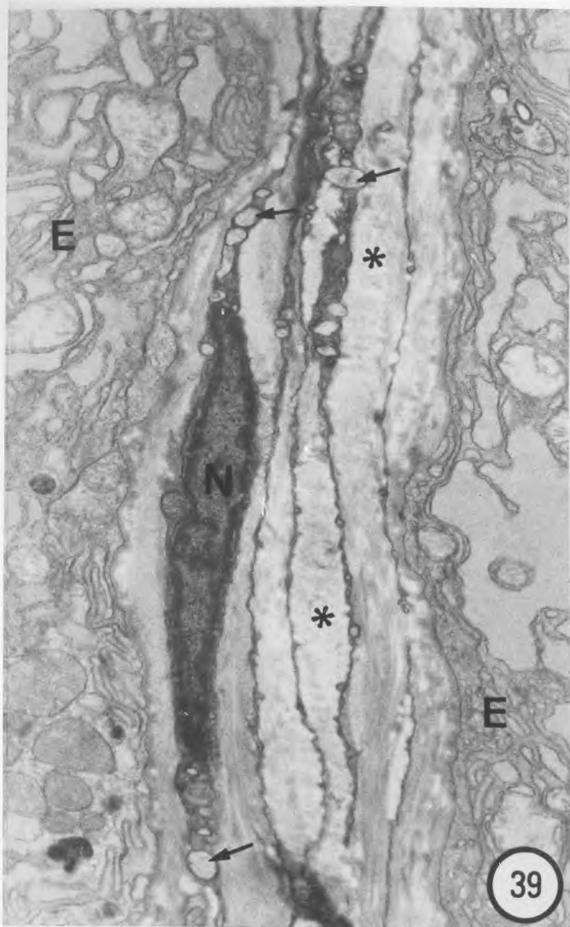
( **seta** ).

**N** = núcleo

Aumento: 30.000x

**Fig. 42** - Fibrilas colágenas compactamente agrupadas ao redor de prolongamento citoplasmático de um fibroblasto ( **F** ).

Aumento: 18.000x





Figuras 43 a 46

Fotomicrografias de cortes transversais da região principal da glândula de veneno de *B. jararaca*, coradas em azul pelo método do azul de alcian, para evidenciação de glicosaminoglicanas presentes nos septos intertubulares

**Fig. 43** - Glândula aos 45 dias pós-extração de veneno.

a) As glicosaminoglicanas sulfatadas e carboxiladas presentes nos septos, apresentam fraca positividade em pH 2,5.

Aumento: 1.800x

b) Em pH 1,0, os septos aparecem descorados.

Aumento: 1.800x

**Fig. 44** - Glândula às 6 horas pós-extração de veneno.

a) Os septos exibem positividade em pH 2,5, revelando as glicosaminoglicanas, distribuídas entre as fibras do sistema colágeno.

Aumento: 1.600x

b) Observa-se fraca positividade em pH 1,0, indicando a presença de glicosaminoglicanas sulfatadas.

Aumento: 1.600x

**Fig. 45** - Glândula aos 4 dias pós-extração de veneno.

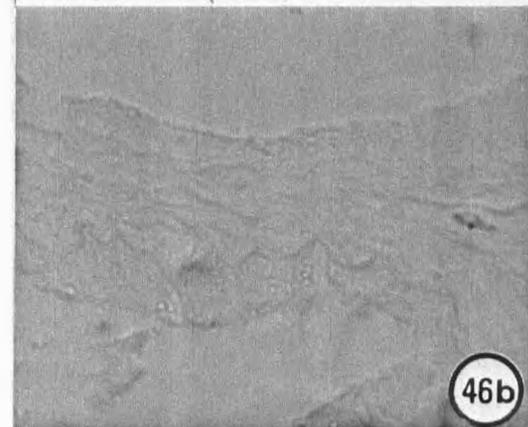
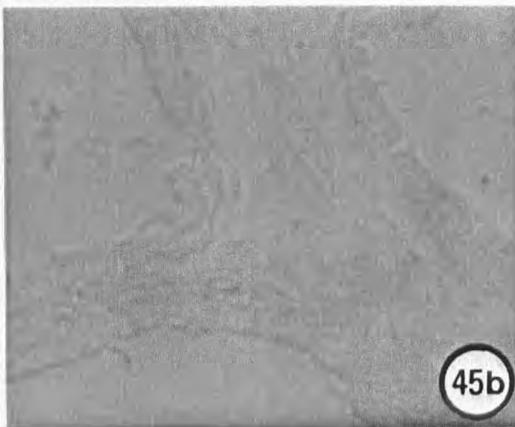
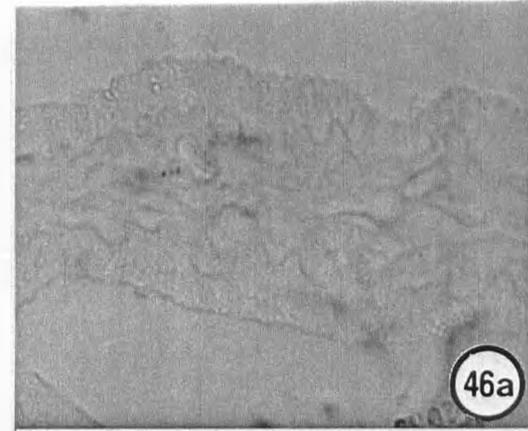
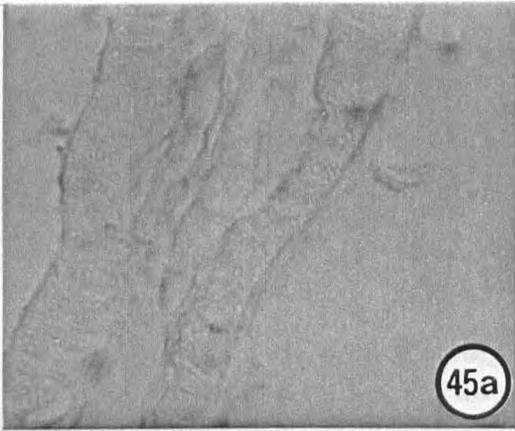
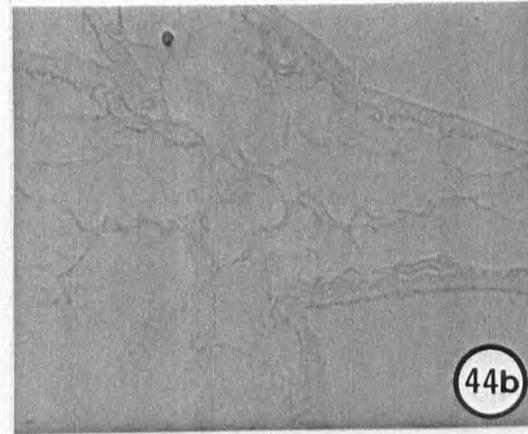
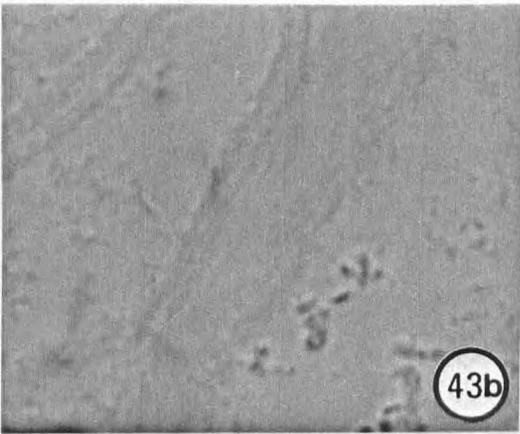
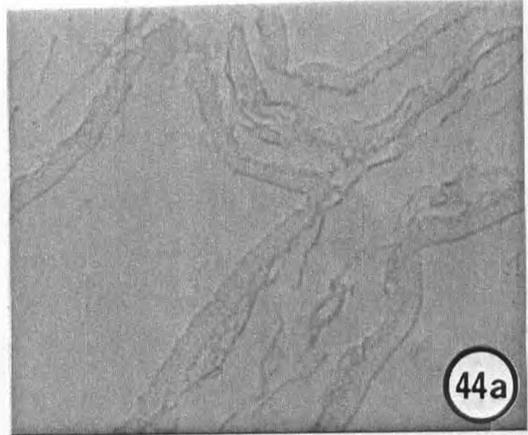
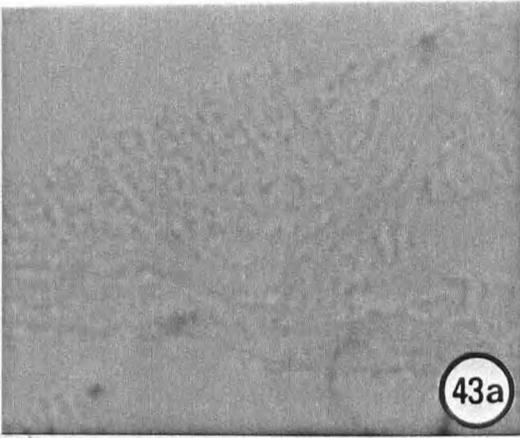
As glicosaminoglicanas apresentam positividade em pH 2,5. Notar a diferença de intensidade de coloração dos septos em pH 2,5 ( **fig. a** ) e em pH 1,0 ( **fig. b** ).

Aumento: 1.800x

**Fig. 46** - Glândula aos 8 dias pós-extração de veneno.

Em pH 2,5 ( **fig. a** ), observar a presença de material alcianofílico distribuído nos septos, apresentando menor intensidade em pH ( **fig. b** ).

Aumento: 1.800x



## V - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que, em *Bothrops jararaca*, a estrutura histológica da porção principal da glândula de veneno, quando corada pelas técnicas rotineiras de coloração, apresentou uma organização semelhante àquela descrita por KOCHVA e GANS (1966), ZAGO (1971), WARSHAWSKY e cols. (1973) e KOCHVA (1978a) em outras espécies de crotalíneos e em várias espécies de viperíneos (KOCHVA e GANS, 1965). Em corte longitudinal, a glândula de veneno dos viperíneos apresentou um lúmen central, no qual se abriam os túbulos secretores. KOCHVA e GANS, em 1966, descreveram como diferença entre os dois grupos, a presença de um lúmen ventral e de septos intertubulares de maior tamanho nos crotalíneos.

Com o estudo da glândula de veneno de *Bothrops jararaca* ao microscópio óptico, verificou-se, que após a extração de veneno, o epitélio secretor é estimulado, iniciando um ciclo secretor de veneno. Entre 6 horas e 4 dias após a extração de veneno, o epitélio sofreu alterações acentuadas e os septos conjuntivos entre os túbulos se apresentaram ampliados. Os feixes de fibras colágenas densamente agrupadas foram substituídos por fibras finas, num arranjo frouxo. Resultados semelhantes foram descritos por SHAHAM e KOCHVA (1969) e BEN-SHAUL e cols. (1971) ao estudarem a seqüência de modificações das células secretoras da glândula de veneno de *Vipera palaestinae*. Em glândulas de *Crotalus durissus terrificus* (DE LUCCA et al., 1974) e de *Bothrops jararacussu* (CARNEIRO et al., 1991), a altura máxima das células secretoras também foi correlacionada com a intensificação da síntese de veneno, porém nenhum desses autores relatou qualquer alteração na estrutura morfológica dos septos intertubulares durante o ciclo secretor.

WARSHAWSKY e cols. (1973), ao examinarem a estrutura histológica da glândula de crotalíneos, mencionaram a presença de um tecido conjuntivo denso, separando os túbulos secretores. Segundo LOPES e cols. (1974), na glândula de *Bothrops jararaca* os septos entre os túbulos eram formados por delicadas fibras de tecido conjuntivo. Em 1978, LIMPUS descreveu os septos intertubulares, em *Hydrophiidae elegans*, como sendo constituídos por tecido conjuntivo frouxo e, utilizando a técnica do tricrômico de Mallory, observou que tais septos não se coravam em azul, como ocorria na região da cápsula glandular. KOCHVA (1978a), GOPALAKRISHNAKONE (1985) e LAKE e cols. (1988), estudando a glândula de veneno de outras espécies de serpentes, citaram apenas a existência de septos conjuntivos, os quais sustentavam o epitélio secretor. WARSHAWSKY e cols. (1973), consideraram a presença de um conjuntivo denso nos septos, enquanto LOPES e cols. (1974) e LIMPUS (1978) se referem a um tecido conjuntivo frouxo. No entanto, nenhum destes autores estabeleceu uma relação entre o ciclo secretor e o período em que se encontrava a glândula, quando examinada.

Os achados do presente trabalho permitem, no entanto, inferir que os septos intertubulares se apresentam histologicamente modificados nos diferentes períodos do ciclo secretor. O aspecto destes septos, observados aos 45 dias após a extração de veneno, quando a glândula está em repouso, é compatível com aquele visto por WARSHAWSKY e cols. (1973) em crotalíneos. Segundo as observações feitas neste estudo, uma característica marcante dos septos, neste período, é a de possuírem fibras colágenas espessas, compactamente agrupadas. No entanto, nos períodos de 6 horas e de 4 dias após a extração de veneno verificou-se nestes septos a presença de fibras finas e irregulares. Estes resultados estão de acordo com a descrição dos septos feita por LOPES e cols. (1973) e LIMPUS (1974) e sugerem que os septos sofreram alteração durante o ciclo secretor.

Segundo LIMPUS (1978), o tecido conjuntivo dos septos intertubulares não se corou em azul, após o emprego da técnica do tricrômico de Mallory. No presente trabalho, estes septos, quando corados pela técnica do tricrômico de Gomori, também

utilizada para evidenciar as fibras do tecido conjuntivo, apareceram intensamente corados em verde, em qualquer fase do ciclo secretor, revelando a presença de fibras do sistema colágeno.

Neste estudo, mostrou-se que as fibras que constituem os septos intertubulares da glândula de veneno, obtida 45 dias pós-extração, a nível de microscopia óptica e eletrônica, correspondem ao padrão das fibras de colágeno I. Estas foram identificadas, ao microscópio óptico, por se apresentarem coradas especificamente pelo método do picrossírius e pela fraca reação com a técnica da impregnação argêntica. Ao microscópio eletrônico foi observado que essas fibras são formadas por fibrilas de diâmetro variável, com uma estriação transversal típica, estando compactamente agrupadas. O aspecto destas fibras é semelhante ao das fibras de colágeno tipo I descrito por LEBLOND e LAURIE (1986), no tecido conjuntivo frouxo e no denso. Segundo estes autores, tais fibras possuem as mesmas propriedades tintoriais atribuídas às fibras colágenas estudadas por PEARSE (1968), através do método da impregnação argêntica, e correspondem ao padrão ultra-estrutural proposto por MILLER e GAY (1982).

O fato de alguns pesquisadores não considerarem satisfatória a coloração pelo uso de corantes tricrômicos para distinguir colágeno tipo I de outros colágenos fibrilares, geneticamente distintos, não é de todo discrepante, uma vez que estruturas colágenas, como as fibras reticulares, não são seletivamente coradas pelos métodos dos tricrômicos. Segundo MONTES e cols. (1980), a técnica da impregnação argêntica também não fornece informação suficiente, pois, apesar de corar as fibras de colágeno I, não as distingue dos outros componentes do tecido. No entanto, JUNQUEIRA e cols. (1978, 1979a, 1979b), realizando estudos comparativos dos órgãos de vertebrados, demonstraram que a coloração e o aumento da intensidade de birrefringência, promovidos pela técnica do picrossírius quando expostos à luz polarizada, são específicos para estruturas colágenas constituídas por agregados fibrilares orientados. Ao microscópio eletrônico, as fibras identificadas como colágeno I são vistas como fibrilas organizadas compactamente. Ao analisar esses conceitos, MONTES

e JUNQUEIRA (1991), examinando a distribuição das fibras de colágeno I em diferentes tecidos, mostraram que os resultados histoquímicos obtidos coincidiam com as observações ultra-estruturais e com os achados imuno-histoquímicos (NOWACK et al., 1976). De acordo com esses dados, pôde-se concluir que as fibras existentes nos septos finos e espessos da glândula em repouso são fibras de colágeno tipo I.

Com a seqüência do ciclo de síntese, observou-se ao microscópio óptico que, por volta de 6 horas e de 4 dias após a extração de veneno, foi detectada nos septos finos da glândula uma quantidade de fibras finas e irregulares. Estas fibras, fortemente reativas com a técnica da impregnação argêntica, foram evidenciadas em preto. Verificou-se, também, que a quantidade de fibras finas aumentou até o 4º dia do ciclo.

Nos septos espessos não foram identificadas histologicamente alterações nas fibras do sistema colágeno, durante o ciclo secretor.

Ainda nestes períodos, entre 6 horas e 4 dias do ciclo, pôde-se notar que, nos septos finos, as fibras finas e irregulares que, ao picrossírius, se coraram em verde, eram as mesmas que apareceram em negro, quando impregnadas pela prata na reticulina de Gomori. Esta afirmação baseia-se na freqüente superposição de imagens entre as fibras reticulares reveladas em preto e as fibras exibindo coloração verde, observadas em cortes histológicos seriados, alternadamente evidenciados por estes dois métodos de coloração. As características ultra-estruturais das fibras encontradas nos septos finos vêm confirmar os dados obtidos através da microscopia óptica, sugerindo serem as fibras reticulares constituídas por colágeno tipo III. Essas observações estão de acordo com os trabalhos publicados por NOWACK (1976), JUNQUEIRA e cols. (1979a), MONTES e cols. (1980), UNSWORTH e cols. (1982), MILLER e GAY (1982), LEBLOND e LAURIE (1986) e MONTES e JUNQUEIRA (1991), que afirmaram serem as fibras reticulares constituídas principalmente por colágeno III.

Por volta do oitavo dia após a extração de veneno, foram identificadas poucas fibras nos septos finos, pela técnica da

impregnação argêntica. Estas fibras exibiram fraca birrefringência e se coraram em verde e alaranjado pela técnica do picrossírius, o que indicou serem fibras reticulares, classicamente consideradas fibras de colágeno tipo III (SNODGRAS, 1977 ; JUNQUEIRA et al., 1978, 1979b ; WOLMAN e KASTEN, 1986). Porém observou-se que, nesta mesma etapa do ciclo, além das fibras de colágeno III haviam surgido fibras de colágeno I nos septos finos. Nos septos espessos só foram detectadas fibras de colágeno tipo I. Esses resultados foram analisados com base naqueles obtidos previamente por PEARSE (1968), NOWACK e cols. (1976), JUNQUEIRA e cols. (1978, 1979b), MONTES e cols. (1980), MILLER e GAY (1982) e MONTES e JUNQUEIRA (1991), no estabelecimento do diagnóstico diferencial entre fibras colágenas e reticulares.

A interpretação das técnicas histológicas utilizadas para distinguir fibras colágenas de fibras reticulares tem sido objeto de muitas discussões. PRAS e GLYNN (1973), demonstraram que as fibras reticulares possuem, na sua constituição, um componente não colágeno, que é evidenciado em negro quando impregnado pela prata. Estudos histoquímicos e ultra-estruturais, realizados por SNODGRASS (1977), mostraram que as fibras reticulares e as colágenas diferem entre si em relação à composição da matriz situada entre suas fibrilas, a qual contém carboidratos (PEARSE, 1968), que respondem pela argirofilia das fibras reticulares. PUCHTLER e WALDROP (1978) demonstraram que, nas fibras reticulares, a prata não reage com o colágeno das fibrilas e, sim com os carboidratos da matriz entre as fibrilas; logo, a impregnação pela prata não poderia ser considerada específica para fibra reticular ou colágeno III. Por outro lado, NOWACK (1976), através de imuno-histoquímica, demonstrou que as fibras reticulares eram constituídas por colágeno III. UNSWORTH e cols. (1982), afirmaram que a fibra reticular é composta principalmente de colágeno tipo III, proteoglicanas e proteínas não colágenas. Apesar dessas opiniões, MONTES e cols. (1980) relataram que as fibras reticulares correspondiam ao colágeno tipo III, caracterizado pela fraca birrefringência e pela cor esverdeada das fibras, quando coradas pelo picrossírius e expostas à luz polarizada (JUNQUEIRA et al., 1978). Ultra-

estruturalmente, tem sido relatado que o colágeno I está geralmente envolvido na formação de fibrilas espessas, enquanto o colágeno III forma uma fina malha reticular (MILLER e GAY, 1982 ; PARRY et al., 1982 ; BIRK e SILVER, 1984 ; SCOTT et al., 1986 ; MERRILEES et al., 1987). Embora tenha sido verificada a presença de colágeno III em fibrilas colágenas, independente do diâmetro das mesmas (KEENE et al., 1987), a quantidade de glicosaminoglicanas associadas às fibrilas, o diâmetro e a organização frouxa ou compacta destas, são critérios que permitem a caracterização ultra-estrutural das fibras colágenas (tipo I) e das fibras reticulares (tipo III) (MONTES et al., 1980). Assim, esses dados, juntamente com os resultados histoquímicos, fornecem informações para a identificação das fibras colágenas e reticulares nos diversos tecidos (MONTES e JUNQUEIRA, 1991). Estudos imuno-histoquímicos (NOWACK, 1976) e bioquímicos (SEYER et al., 1977 ; UNSWORTH et al., 1982) corroboram essas informações.

Considerações devem ser feitas quanto à presença de fibras, evidenciadas em preto através da impregnação pela prata, localizadas logo abaixo das células epiteliais, tanto nos septos finos quanto nos espessos da glândula. De fato, em qualquer período do ciclo secretor foi observada uma camada delgada, evidenciada pela prata, que separa o epitélio do conjuntivo subjacente, denominada membrana basal (SNODGRASS, 1977; PIEZ, 1984; TIMPL e DZIADEK, 1986). Diferenças significativas entre membrana basal e fibra reticular foram estabelecidas, através de estudos histoquímicos (LILLIE e FULLMER, 1976) e imunológicos (SCOTT, 1957). Além disso, a membrana basal foi caracterizada histoquimicamente por seu conteúdo rico em glicoproteínas neutras, detectáveis pela técnica do PAS (PUCHTLER e WALDROP, 1978). No presente trabalho, a membrana basal foi evidenciada pela reação positiva com o PAS, em todos estágios do ciclo. Atualmente, considera-se que a membrana basal é constituída por glicoproteínas, proteoglicanas e colágeno IV ( HAY, 1981 ; LEBLOND e LAURIE, 1986 ; VITELLARO-ZUCCARELO et al., 1992).

As características ultra-estruturais observadas confirmam os resultados obtidos à microscopia óptica, no que se refere à seqüência de aparecimento das fibras do sistema colágeno nos

septos finos, durante o ciclo de síntese e de secreção de veneno. Assim, as fibras reticulares constituídas por colágeno III tornaram-se abundantes na primeira etapa do ciclo, quando as células epiteliais colunares estão em intensa síntese. Ao microscópio eletrônico, estas fibras foram identificadas como grupos de fibrilas de diâmetro homogêneo, próximos a áreas preenchidas por material não fibrilar. Com o acúmulo de secreção nos lúmenes tubulares, o epitélio passou gradativamente a cúbico, entrando em repouso e os septos sofreram uma alteração, tendo sido observado neles fibras de colágeno I. Este colágeno foi caracterizado ultra-estruturalmente pela presença de fibrilas com diâmetro heterogêneo, organizadas compactamente. Assim, as fibras reticulares (colágeno III) puderam ser identificadas numa fase anterior ao aparecimento das fibras de colágeno I, as quais foram observadas mais tarde, quando cessa a intensa atividade sintetizadora.

A interpretação desses dados pode sugerir que a presença de fibras reticulares (colágeno III) nos septos da glândula de *B. jararaca*, nos períodos entre 6 horas e 4 dias, quando a glândula está em intensa atividade de síntese, é compatível com a identificação de uma matriz frouxa, que sofreu alteração ou, provavelmente, remodelação.

As alterações morfológicas observadas nas fibras do sistema colágeno, identificadas nos septos da glândula de veneno, são compatíveis com aquelas citadas por ZORN e colaboradores (1986), os quais demonstraram que, durante a gestação, ocorre uma remodelação na matriz extracelular do endométrio de camundongos, sendo observada uma alteração na quantidade e na organização das fibrilas colágenas. Paralelamente, ALBERTO-RINCON e cols. (1989) observaram que ocorre uma alteração gradativa no diâmetro e na organização das fibrilas colágenas, durante o curso da gestação em camundongos. De fato, os trabalhos de ZORN e cols. (1989) mostraram que no início da gestação ocorreu degradação das fibrilas colágenas pelos fibroblastos, processo este relacionado com a reorganização do endométrio.

Segundo TEN CATE e DEPORTER (1975), os fibroblastos podem liberar enzimas, responsáveis pela degradação e síntese de

colágenos, caracterizando, assim, uma remodelação da matriz extracelular.

Neste trabalho, os fibroblastos observados nos septos da glândula de veneno são, possivelmente, estruturas capazes de sintetizar e degradar as fibras do sistema colágeno. No estágio de 6 horas pós-extração de veneno, essas células apresentaram cromatina frouxa e citoplasma abundante, com grande quantidade de vesículas, no lugar de cromatina mais condensada e citoplasma escasso descritos nas células da glândula em repouso. A essas observações pode-se acrescentar a presença de material fracamente eletrôn-denso no interior das vesículas citoplasmáticas e a ocorrência de fibrilas em recessos celulares. Esta ocorrência tem sido também registrada por outros autores (TEN CATE, 1972 ; BIRK e TRELSTAD, 1986, 1990).

Esses achados sugerem que as modificações observadas nos fibroblastos podem estar relacionadas com o processo de degradação e síntese do colágeno, o que seria compatível com as alterações marcantes que ocorrem nos septos durante este período, quando as espessas fibras de colágeno são substituídas por uma malha frouxa de fibras.

Aos 4 dias do ciclo, ao lado da cromatina frouxa e citoplasma abundante, as células apresentaram mitocôndrias próximas às cisternas dilatadas do retículo endoplasmático granular. Foram observadas imagens de fibrilas em reentrâncias de fibroblastos, que são similares àquelas mostradas por ALBERTO-RINCON e cols. (1989). Estas observações, juntamente com a identificação de grupos de fibrilas associadas à superfície celular, são consideradas, por FLEISCHMAJER e cols. (1985), como indícios da atividade de síntese celular. De acordo com esses dados, o aumento no número de fibras, descrito neste período, é compatível com a presença de células sintetizando ativamente.

No período de 8 dias pós-extração, os fibroblastos eram semelhantes às células fusiformes descritas no estágio de 45 dias, porém foram, ainda, detectadas estruturas vesiculares no seu citoplasma. Material fracamente eletrôn-denso foi visto no

interior destas vesículas e junto à superfície celular, sugerindo estarem estas células envolvidas na síntese de colágeno. Embora as observações ultra-estruturais mostrem células em atividade de síntese, as características morfológicas encontradas neste período sugerem que os fibroblastos tornaram-se menos ativos, em comparação com os dos períodos anteriores, de 6 horas e de 4 dias.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que houve um aumento no número de fibras até o 8º dia do ciclo, após o que se registrou uma diminuição gradativa, no ritmo até o 45º dia, quando esta atividade foi reduzida ao mínimo. Esses dados coincidem com o aspecto de redução da atividade de síntese dos fibroblastos descritos neste período do ciclo.

Esses achados estão de acordo com os resultados apresentados por TEN CATE e DEPORTER (1975), ZORN e cols. (1986, 1989), LAURENT (1987) e ALBERTO-RINCON (1989).

No presente trabalho, foi usada a técnica de coloração pelo azul de alcian, para o estudo das glicosaminoglicanas presentes na matriz extracelular dos septos intertubulares da glândula de veneno. Este método permitiu observar, a nível de microscopia óptica, a presença ou ausência de glicosaminoglicanas sulfatadas e carboxiladas, durante o ciclo secretor.

A análise dos resultados revelou que as glicosaminoglicanas, evidenciadas pelo azul de alcian, foram visualizadas como material difuso, irregularmente distribuído pelos septos em todas as fases do ciclo. Em pH 1,0, esse material alcianofílico apresentou uma coloração menos intensa do que em pH 2,5. No entanto, nos septos da glândula de 45 dias pós-extração de veneno, após a coloração pelo azul de alcian em pH 1,0 o material não se corou. Esses resultados demonstraram que o azul de alcian corou seletivamente as glicosaminoglicanas existentes no estroma intertubular, sendo os mesmos compatíveis com os achados de MOWRY (1963). Contudo, não foi observado um padrão constante de coloração das glicosaminoglicanas em todas as lâminas examinadas. TUCKETT e MORRISS-KAY (1988) chamaram a atenção para o fato de que, durante a fixação em meio aquoso, as proteoglicanas

podem se difundir para fora do tecido, em conseqüência das características químicas das glicosaminoglicanas, sendo, assim, extraídas do tecido durante o processamento. No estágio de 45 dias pós-extração, a reação ao azul de alcian (pH 2,5 e pH 1,0) foi menos intensa que nos demais períodos do ciclo, demonstrando a presença de menor quantidade de glicosaminoglicanas neste período do ciclo secretor.

JUNQUEIRA e cols. (1980), utilizando métodos de quantificação bioquímica, correlacionaram a quantidade de interações colágeno-glicosaminoglicanas com o tipo de colágeno presente no tecido. Em 1981, JUNQUEIRA e cols., analisando diferentes tipos de tecido de vertebrados, detectaram grande quantidade de heparan-sulfato nos tecidos contendo somente fibras reticulares (colágeno III) e constataram a presença de pequena quantidade de glicosaminoglicanas, predominando dermatan-sulfato, nos tecidos contendo essencialmente colágeno tipo I

As propriedades mecânicas dos tecidos conjuntivos podem estar correlacionadas com a organização das fibrilas colágenas e com a quantidade de glicosaminoglicanas. A propriedade das fibras colágenas tipo I de formar agregados é atribuída ao seu conteúdo de glicosaminoglicanas (JUNQUEIRA et al., 1981); portanto, pode-se supor que as fibras reticulares, possuindo glicosaminoglicanas em maior quantidade (MONTES et al., 1980; JUNQUEIRA et al., 1981), não apresentem as mesmas propriedades mecânicas que as fibras de colágeno I. Assim sendo, fibras espessas de colágeno tipo I, densamente agrupadas e contendo pequena quantidade de glicosaminoglicanas, principalmente dermatan-sulfato, são características de tecidos submetidos a forças de tensão (MERRILEES et al., 1987), ao passo que, as fibras reticulares de colágeno III, com arranjo frouxo e grande quantidade de heparan-sulfato (JUNQUEIRA et al., 1981), admitem maior distensibilidade (WOLMAN e KASTEN, 1986; MERRILEES et al., 1987).

Nos septos, após a extração do veneno, constatou-se a presença de glicosaminoglicanas e de uma rede frouxa de fibras finas, nos estágios de 6 horas e de 4 dias. Nestes períodos, com o esvaziamento dos lúmenes glandulares, a pressão dentro dos

mesmos decresce rapidamente e o volume total da glândula diminui. Os septos, não estando tensionados, tornam-se dilatados, exibindo uma matriz frouxa, onde ocorrem grandes modificações morfológicas. Essas observações são compatíveis com os relatos de PARRY e cols. (1978, 1982), MERRILEES e FLINT (1980) e PARRY (1988).

Neste estudo, no qual foram analisados os septos intertubulares da glândula de veneno de *Bothrops jararaca*, podemos concluir que:

- O estroma dos septos intertubulares da glândula de veneno apresenta, na sua constituição, fibras do sistema colágeno e proteoglicanas.
- Os septos espessos e a cápsula glandular são constituídos principalmente por fibras de colágeno tipo I.
- Os septos finos apresentam heterogeneidade de constituintes do sistema colágeno (tipo I e III).
- O estroma dos septos finos apresenta variação quanto ao seu conteúdo de fibras do sistema colágeno, durante o ciclo secretor.

## VI - BIBLIOGRAFIA

- ALBERTO-RINCON, M.C. ; ZORN, T.M.T. & ABRAHAMSOHN, P.A. - Diameter Increase of Collagen Fibrils of the Mouse Endometrium During Decidualization. **Ann. J. Anat.**, 186:417-429, 1989.
- ALBERTS, B. ; BRAY, D. ; LEURS, J. ; RAFF, M. ; ROBERTS, K. & WATSON, J.D. - **Molecular Biology of the Cell**. 2<sup>nd</sup> ed., Garland Publishing Inc., N. York, 1989.
- BEN-SHAUL, Y. ; LIFSHITZ, S.H. & KOCHVA, E. - Ultrastructural Aspects of Secretion in the Venom Glands of *Vipera palaestinae*. **In: Toxin of Animal and Plant Origin** (edited by A. de Vries & E. Kochva) Tel-Aviv Univ., Israel, London, vol 1, Gordon & Breach Science Publishers, 1971.
- BERG, R.A. - Intracellular Turnover of Collagen. **In: Regulation of Matrix Accumulation** (R.P. Macham ed.), Academic Press Inc., New York, 1986.
- BIRK, D.E. & SILVER, F.H. - Collagen Fibrillogenesis "in vitro": Comparison of Types I, II and III. **Arch. Biochem. Biophys.**, 235(1):178-185, 1984.
- BIRK, D.E. & TRELSTAD, R.L. - Extracellular Compartments in Tendon Morphogenesis: Collagen Fibril, Bundle and Macroaggregate Formation. **J. Cell. Biol.**, 103:231-240, 1986.

- BIRK, D.E. ; ZYCBAND, E.I. ; WINKELMANN, D.A. & TRELSTAD, R.L. - Collagen Fibrillogenesis "in situ". *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 580:176-194, 1990.
- BURGESSON, R.E. - New Collagens, New Concepts. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 4:551-577, 1988.
- CARNEIRO, S.M. ; PINTO, V.R. ; JARED, C. ; LULA, L.A.B.M. ; FARIA, F.P. & SESSO, A. - Morphometric Studies on Venom Secretory Cells from *Bothrops jararacussu* Before and After Venom Extraction. *Toxicon*, 29(6):569-580, 1991.
- CULLING, C.F.A. - *Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques*. 3rd ed, London, Butterworth & Co. Publishers Ltd, 1974.
- DE LUCCA, F.L. ; HADDAD, A. ; KOCHVA, E. ; ROTHSCHILD, A.M. & Valere, V. - Protein Synthesis and Morphological Changes in the Secretory Epithelium of the Venom Gland of *Crotalus durissus terrificus* at Different Times After Manual Extraction of Venom. *Toxicon*, 12:361-368, 1974.
- FLEISCHMAJER, R. ; PERLISH, J.S. & TIMPL, R. - Collagen Fibrillogenesis in Human Skin. *Ann. Rev. N.Y. Acad. Sci.*, 460:246-257, 1985.
- FLEISCHMAJER, R. ; PERLISH, J.S. ; BURGESSON, R.E. ; SHAIKH-BAHAI, F. & TIMPL, R. - Type I and Type III Collagen Interactions During Fibrillogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 580:161-175, 1990.

- FLEISCHMAJER, R. ; PERLISH, J.S. ; BURGESSON, R.E. ; SHAIKH-BAHAI, F. & TIMPL, R. - Type I and Type III Collagen Interactions During Fibrillogenesis. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 580:161-175, 1990.
- GABE, M. & SAINT-GIRONS, H. - Données Histologiques Sur Les Glandes Salivaires des Lépidosauriens. **Mém. Mus. Nat. Hist. Nat., Paris, Zool.**, (A) 58(1):1-112, 1969.
- GANS, C. & KOCHVA, E. - The Accessory Gland in the Venom Apparatus of Viperid Snakes. **Toxicon**, 3(1):61-63, 1965.
- GENARO, J.F. ; ANTON, A.H. & SAYER, D.F. - The Fine Structure of Pit Viper Venom and Additional Observations on the Role of Aromatic in the Physiology of the Pit Viper. **Comp. Biochem. Physiol.**, 25:285-293, 1968.
- GOMORI, G. - Silver Impregnation of Reticulum in Paraffin Sections. **Am. J. Pathol.**, 13:993-1002, 1937.
- GOPALAKRISHNAKONE, P. - Light and Electron Microscopic Study of the Venom Apparatus of the Saw Scaled Viper *Echis Carinatus*. **The Snake**, 17(1):10-14, 1985.
- GORDON, H.K. & OLSEN, B.R. - The Contribution of Collagenous Proteins to Tissue-Specific Matrix Assemblies. **Current Opinion in Cell Biology**, 2:833-838, 1990.
- HAAS, G. - Jaw Muscles In Squamata. **In: Biology Of Reptiles** (edited by Calr Gans). University Of Michigan, USA, New York, Academic Press, 1973.

- GABE, M. & SAINT-GIRONS, H. - Données Histologiques Sur Les Glandes Salivaires des Lépidosauriens. **Mém. Mus. Nat. Hist. Nat., Paris, Zool.**, (A) 58(1):1-112, 1969.
- GANS, C. & KOCHVA, E. - The Accessory Gland in the Venom Apparatus of Viperid Snakes. **Toxicon**, 3(1):61-63, 1965.
- GENARO, J.F. ; ANTON, A.H. & SAYER, D.F. - The Fine Structure of Pit Viper Venom and Additional Observations on the Role of Aromatic in the Physiology of the Pit Viper. **Comp. Biochem. Physiol.**, 25:285-293, 1968.
- GOMORI, G. - Silver Impregnation of Reticulum in Paraffin Sections. **Am. J. Pathol.**, 13:993-1002, 1937.
- GOPALAKRISHNAKONE, P. - Light and Electron Microscopic Study of the Venom Apparatus of the Saw Scaled Viper *Echis Carinatus*. **The Snake**, 17(1):10-14, 1985.
- GORDON, H.K. & OLSEN, B.R. - The Contribution of Collagenous Proteins to Tissue-Specific Matrix Assemblies. **Current Opinion in Cell Biology**, 2:833-838, 1990.
- HAAS, G. - Jaw Muscles In Squamata. **In: Biology Of Reptiles** (edited by Calr Gans). University Of Michigan, USA, New York, Academic Press, 1973.
- HAY, E.D. - Extracellular Matrix. **J. Cell Biol.**, 91(3):205s-223s, 1981.
- HAY, E.D. - **Cell Biology of Extracellular Matrix**. 2<sup>nd</sup> ed., New York, Plenum Publishing Corp., 1991.

- HARDINGHAM, T.E. - Structure and Biosynthesis of Proteoglycans. **Rheumatol.**, 10:143-183, 1986.
- HEINEGARD, D. & PAULSSON, M. - Structure and Metabolism of Proteoglycans. **In: Extracellular Matrix Biochemistry** (Karl A. Piez & A.H. Reddi ed.). New York, 1984.
- HOGUE, A.R. & ROMANO-HOGUE - Sinopse das Serpentes peçonhentas do Brasil. **Mem. Inst. Butantan**, 42/43:373-496, 1978/1979.
- JACKSON, R.L. ; BUSCH, S.J. & CARDIN, A.D. - Glycosaminoglycans: Molecular Properties, Protein Interactions and Role in Physiological Processes. **Physiol. Rev.**, 71(2):481-539, 1991.
- JUNQUEIRA, L.C.U. ; COSSERMELLI, W. & BRENTANI, R. - Differential Staining of Collagens Type I, II and III by Sirius Red and Polarization Microscopy. **Arch. Histol. Jpn.**, 41:267, 1978.
- JUNQUEIRA, L.C.U. ; BIGNOLAS, G. & BRENTANI, R.R. - Picrosirius Staining Plus Polarization Microscopy, a Specific Method for Collagen Detection in Tissues Sections. **Histochem. J.**, 11:447-455, 1979a.
- JUNQUEIRA, L.C.U. ; MONTES, G.S. & KRISZTÁN, R.M. - The Collagen of the Vertebrate Peripheral Nervous System. **Cell Tiss. Res.**, 202:453, 1979b.
- JUNQUEIRA, L.C.U. ; BIGNOLAS, G. ; MOURÃO, P.A.S. & BONETTI, S.S. - Quantitation of Collagen-proteoglycan interaction in Tissue Sections. **Connect. Tiss. Res.**, 7(2):91-96, 1980.

- JUNQUEIRA, L.C.U. ; TOLEDO, O.M.S. & MONTES, G.S. - Correlation of Specific Sulfated Glycosaminoglycans with Collagen Types I, II and III. *Cell Tiss. Res.*, 217:171-175, 1981.
- JUNQUEIRA, L.C.U. ; MONTES, G.S. & SANCHEZ, E.M. - The Influence of Tissue Section Thickness on the Study of Collagen by Picrosirius-Polarization Method. *Histochem.*, 74:153, 1982.
- KEENE, D.R. ; SAKAI, L.Y. ; BÄCHINGER, H.P. & BURGESSON, R.E. - Type III Collagen Can Be Present on Banded Collagen Fibrils Regardless of Fibril Diameter. *J. Cell Biol.*, 105:2393-2402, 1987.
- KOCHVA, E. - The Head Muscles of *Vipera Palaestinae* and Their Relation to the Venom Gland. *J. Morph.*, 102:23-53, 1958.
- KOCHVA, E. - On the Lateral Jaw Musculature of the Solenoglypha with Remarks on Some Other Snakes. *J. Morphol.*, 110(2):227-284, 1962.
- KOCHVA, E. - The Structure of the Venom Gland and Secretion of Venom in Viperid Snakes. *In: Animal Toxins* (Int. Symposium on Animal Toxins, USA). Oxford & New York, Pergamont Press, 1967.
- KOCHVA, E. - Oral Glands of Reptilia. *In: Biology of the Reptilia* (Gans C. Ed.), London & N. York, vol. III, Academic Press, 1978a.
- KOCHVA, E. - Evolution and Secretion of Venom and Its Antidotes in Snakes. *Period. Biol.*, 80(suppl.1):11-23, 1978b.

- KOCHVA,E. - The Origin of Snakes and Evolution of the Venom Apparatus. **Toxicon**, 25(1):65-106, 1987.
- KOCHVA,E. & GANS,C. - The Venom Gland of *Vipera palaestinae* with Comments on the Glands of Some Other Viperines. **Acta. Anat.**, 62(3):365-401, 1965.
- KOCHVA,E. & GANS,C. - Histology and Histochemistry of Venom Gland of Some Crotaline Snakes. **Copeia**, 3:506-515, 1966.
- KOCHVA,E. & GANS,C. - Salivary Glands of Snakes. **Clin. Toxicol.**, 3(3):363-387, 1970
- KUETTNER,K.E. & KIMURA,J.H. - Proteoglycans: An Overview. **J. Cell Biochem.**, 27:327-336, 1985.
- KÜHN,K. - The Collagen Family - Variations in the Molecular and Supermolecular Structure. **Rheumatol.**, 10:26-69, 1986.
- LABAT-ROBERT,J. ; BIHARI-VARGA,M. & ROBERT,L. - Extracelular Matrix. **FEBS**, 268(2):386-393, 1990.
- LAKE,A.R. ; TREVOR-JONES,T.R. ; ROUX,C.G.J. & HATTINGH,J. - Histology of the Venom Apparatus of the Puff Adder, *Bitis arietans*. **S. Afr. J. Sci.**, 84:150-152, 1988.
- LAPIERE,C.M. ; NUSGENS,B. and PIERARD,G.E. - Interaction Between Collagen Type I and Type III in Conditioning Bundles Organization. **Conn. Tiss. Res.**, 5:21-29, 1977.

- LAURENT, G.J. - Dynamic State of Collagen. **Ann. J. Physiol.**, 252:C1-C9, 1987.
- LEBLOND, C.P. & LAURIE, G.W. - Morphological Features of Connective Tissue. **Rheumatol.**, 10:1-28, 1986.
- LEV, R. & SPICER, S.S. - Specific Staining of Sulphate Groups with Alcian Blue at Low pH. **J. Histochem.**, 12:309, 1964.
- LILLIE, R.D. & FULLMER, H.M. - **Histopathological Technic and Pratical Histochemistry**. 4th ed, New York, McGraw Hill Book Co., 1976.
- LIMPUS, C.J. - The Venom Apparatus and Venom Yields of Sub-Tropical Queensland *Hydrophüidae*. **In: Toxins Animal, Plant and Microbial** (Rosenberg P. ed.), Oxford and New York, Pergamont Press, 1978.
- LOPES, A.R. ; OLIVEIRA, C. ; CAMPOS, M.N.M. ; Campos, S.M. & Birman, E.G. - Morphological and Histochemical Study of Cephalic Glands of *B. jararaca*. **Acta Zool.**, 55:17-24, 1974.
- LOPES, R.A. ; DA COSTA, J.R.V. ; CAMPOS, S.M. & CAMPOS, M.N.M. - Estudo Histoquímico de Proteínas nas Glândulas Venenífera e Acessória de *Bothrops jararaca*. **Mem. Inst. Butantan**, 42/43:41-48, 1979.
- LOPES, R.A. ; CONTRERA, M.G.D. ; DA COSTA, J.R.V. ; CAMPOS, G.M. & PETENUSCI, S.O. - The Cephalic Glands of Brazilian Reptilia and Amphibia. IV. Histology of Labial, Premaxillary and Duvernoy's Glands in the Colubrid Snakes. **Gegenbaurs Morphol. Jahrb.**, Leipzig, 133(1):91-97, 1987.

- MACKESSY, S.P. - Ultrastructure of the Venom Gland of *Crotalus viridis oreganus*. *Am. Zool.*, 28(4):77A, 1988.
- MERRILEES, M.J. & FLINT, M.H. - Ultrastructural Study of Tension and Pressure Zones in a Rabbit Flexor Tendon. *Am. J. Anat.*, 157:87-106, 1980.
- MERRILEES, M.J. ; TIANG, K.M. & SCOTT, L. - Changes in Collagen Fibril Diameters across Artery Walls Including a Correlation with Glycosaminoglycans Content. *Conn. Tiss. Res.*, 16:237-257, 1987.
- MILLER, E.J. - The Structure of Fibril-Forming Collagens. *Ann. Rev. N.Y. Acad. Sci.*, 46:1-13, 1985.
- MILLER, E.J. & GAY, S. - Collagen: An Overview. *Meth. Enzym.*, 82:3-32, 1982.
- MONTES, G.S. ; KRISZTÁN, R.M. ; SHIGIHARA, K.M. ; TOKORO, R. ; MOURÃO, P.A.S. & JUNQUEIRA, L.C.U. - Histochemical and Morphological Characterization of Reticular Fibers. *Histochem.*, 65:131-141, 1980.
- MONTES, G.S. & JUNQUEIRA, L.C.U. - The Use of the Picrosirius-Polarization Method for the Study of the Biopathology of Collagen. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 86, (Suppl. III):1-11, 1991.

- MOWRY, R.W. - The Special Value of Methods that Color both Acidic and Vicinal Hydroxyl Groups in the Histochemical Study of Mucins. With Revised Directions for the Coloidal Iron Stain, the Use of Alcian Blue G8X and Their Combinations with the Periodic Acid-Schiff Reaction. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 106(2):402-423, 1963.
- NOWACK, H. ; GAY, S. ; WICK, G. ; BECKER, U. & TIMPL, R. - Preparation and Use in Immunohistology of Antibodies Specific for Type I and Type III Collagen and Procollagen. **J. Immunol. Methods**, 12:117-124, 1976.
- ODOR, L. - The Poison Gland of the Cottonmouth Moccasin *Ancistrodon P. piscivorus* as Observed with the Electron Microscope. **J. Morph.**, 117:115-122, 1965.
- ORON, L. ; BDOLAH, A. - Regulation of Protein Synthesis in the Venom Gland of Viperid Snakes. **J. Cell Biol.**, 56(1):177-190, 1973.
- ORON, V. & BDOLAH, A. - Intracellular Transport of Proteins in Active and Resting Secretory Cells of the Venom Gland of *Vipera Palaestinae*. **J. Cell Biol.**, 78(2):488-502, 1978.
- PANTIN, C.F.A. - **Notes on Microscopical Technique for Zoologists**. 2nd ed, Cambridge, The University Press, 1948.
- PARRY, D.A.D. ; BARNES, G.R.G. & CRAIG, A.S. - A Comparison of the Size Distribution of Collagen Fibrils in Connective Tissues as a Function of Age and a Possible Relation Between Fibril Size Distribution and Mechanical Properties. **Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)**, 203:305-321, 1978.

- PARRY,D.A.D. ; FLINT,M.H. ; GILLARD,G.C. & CRAIG,A.S. - A Role for Glycosaminoglycans in the Development of Collagen Fibrils. **FEBS**, 149(1):1-7, 1982.
- PARRY,D.A.D. - The Molecular and Fibrillar Structure of Collagen and its Relationship to the Mechanical Properties of Connective Tissue. **Biophys. Chem.**, 29:195-209, 1988.
- PEARSE,A.G.E. - **Histochemistry, Theoretical and Applied**. 3rd ed, London, J. & A. Churchill Ltd, vol I, 1968.
- PELTONEN,L. ; HALILA,R. & RYHÄNEN,L. - Enzymes Converting Procollagens to Collagens. **J. Cell Biochem.**, 28:15-21, 1985.
- PETERS,J.A. & OREJAS-MIRANDA,B. - Catalogue of the Neotropical Squamata: part I - Snakes. **Smithsonian Inst. Bull.**, 297:46, 1970.
- PIEZ,K.S. - Molecular and Aggregate Structures of the Collagen. **In: Extracellular Matrix Biochemistry** (edited by K.A. Piez & A.H. Reddi). New York, Elsevier, 1984.
- POUGH,F.H. ; KURECINSKI,G. & BEMIS,W. - Melanin Deposits Associated with the Venom Glands Of Snake. **J. Morphol.**, 155:63-72, 1978
- PRAS,M. & GLYNN,L.E. - Isolation of a Non-collagenous Reticulin Component and Its Primary Characterization. **Br. J. Exp. Path.**, 54:449-456, 1973.

- PUCHTLER, H. & WALDROP, F.S. - Silver Impregnation Methods for Reticulum Fibers and Reticulin. *Histochem.*, 57:177-187, 1978.
- RENNARD, S.I. ; STIER, L.E. & CRYSTAL, R.G. - Intracellular Degradation of Newly Synthesized Collagen. *J. Invest. Derm.*, 79 (Supplement 1):77-82, 1982.
- REYNOLDS, E.S. - The Use of Lead Citrate at High pH as an Electron-opaque Stain in Electron Microscopy. *J. Cell Biol.*, 17:208-212, 1963.
- ROTENBERG, D. ; BAMBERGER, E.S. & KOCHVA, E. - Studies on Ribonucleic Acid Synthesis in the Venom Glands of *Vipera palaestinae*. *Biochem. J.*, 121:609-612, 1971.
- RUOSLAHTI, E. - Structure and Biology of Proteoglycans. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 4:229-255, 1988.
- RUOSLAHTI, E. - Proteoglycans in Cell Regulation. *J. Biol. Chem.*, 264(23):13369-13372, 1989.
- SCHAEFER, N. - The Mechanism of Venom Transfer from the Venom Duct to the Fang in Snakes. *Herpetol.*, 32:71-76, 1976.
- SCOTT, D.G. - A Study of the Antigenicity of Basement Membrane and Reticulin. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 38:178-185, 1957.
- SCOTT, J.E. - Histochemistry of Alcian Blue. III. The Molecular Biological Basis of Staining By Alcian Blue 8GX and Analogous Phtihalocyanins. *Histochem.*, 32:191-212, 1972.

- SCOTT, J.E. - Proteoglycan-Collagen Interactions. **In: Functions of the Proteoglycans**, Ciba Foundation Symposium 124 (D. Evered, J. Whelan, eds.), New York, 1986.
- SELLS, P.G. ; HOMMEL, M. & THEAKSTON, R.D.G. - Venom Production in Snake Venom Gland Cells Cultured "in vitro". **Toxicon**, 27(11):1245-1249, 1989.
- SEYER, J.M. ; KANG, A.H. & WHITAKER, J.N. - The Characterization of Type I and Type III collagens from human peripheral nerves. **Biochem. Biophys. Acta**, 492:415, 1977.
- SHAHAM, N. & KOCHVA, E. - Localization of Venom Antigens in the Venom Gland of *Vipera palestinae* Using a Fluorescent-Antibody Technique. **Toxicon**, 6(2):263-268, 1969.
- SNODGRASS, M.J. - Ultrastructural Distinction Between Reticular and Collagenous Fibers with an Ammoniacal Silver Stain. **Anat. Rec.**, 187:191-206, 1977.
- SOBOL-BROWN, R. ; BROWN, M.B. ; BDOLAH, A. & KOCHVA, E. - Accumulation of Some Secretory Enzymes in Venom Glands of *Vipera palaestinae*. **Am. J. Physiol.**, 229(6):1675-1679, 1973.
- SPURR, A.R. - Improvements in Epoxy Resin Embedding Methods. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, 9:409-414, 1961.
- TAUB, A.M. - Ophidian Cephalic Glands. **J. Morph.**, 118:529-542, 1966.

- TAYLOR, C.R. - Fixation, Processing, Special Applications. In: (Taylor, C.R.) **Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool For The Surgical Pathologist**. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1986.
- TAYLOR, D. ; IDDON, D. ; SELLS, P. ; SEMORFF, S. & Theakston, R.D.G. - An Investigation of Venom Secretion by the Venom Gland Cells of the Carpet Viper (*Echis Carinatus*). **Toxicon**, 24(7):651-659, 1986.
- TEN CATE, A.R. - Morphological Studies of Fibrocytes in Connective Tissue Undergoing Rapid Remodelling. **J. Anat.**, 112:401-413, 1972.
- TEN CATE, A.R. & DEPORTER, D.A. - The Degradative Role of the Fibroblast in the Remodelling and Turnover of Collagen in Soft Connective Tissue. **Anat. Rec.**, 182:1-4, 1975.
- TIMPLE, R. & DZIADEK, M. - Structure, Development and Molecular Pathology of Basement Membranes. **Inter. Rev. Exp. Pathol.**, 29:1-112, 1986.
- TRELSTAD, R.L. - Multistep Assembly of Type I Collagen Fibrils. **Cell**, 28:197-198, 1982.
- TUCKETT, F. & MORRIS-KAY, G. - Alcian-Blue Staining of Glycosaminoglycans in Embryonic Material: Effect of Different Fixatives. **Histochem. J.**, 20:174-182, 1988.
- UNSWORTH, D.J. ; SCOTT, D.L. ; ALMOND, T.J. ; BEARD, H.K. ; HOLBOROW, E.J. & WALTON, K.W. - Studies on Reticulin. **Br. J. Exp. Pathol.**, 63:154-166, 1982.

VAN DER REST, M. & GARRONE, R. - Collagen Family of Proteins. **FASEB J.**, 5:2814-2823, 1991.

VELIKII, V.N. - Obshchesva estestvoisphytatelei Otdelenie Zoologii i Fiziologii. In: Regulation of Protein Synthesis in the Venom Gland of Viperid Snake (ORON & BDOLAH). **J. Cell Biol.**, 56(1):177-190, 1973.

VITELLARO-ZUCCARELLO, L. ; GARBELLI, R. & DAL POZZO ROSSI, V. - Immunocytochemical Localization of Collagen Types I, III, IV and Fibronectin in the Human Dermis. **Cell Tiss. Res.**, 268:505-511, 1992.

WARSHAWSKY, H. ; HADDAD, A. ; GONÇALVES, R.P. ; VALERI, V. & DE LUCCA, F.L. - Fine Structure of the Venom Gland Epithelium of the South American Rattlesnake and Radioautographic Studies of Protein Formation by the Secretory Cells. **Am. J. Anat.**, 138:79-120, 1973.

WOLMAN, M. & KASTEN, F.H. - Polarized Light Microscopy in the Study of the Molecular Structure of Collagen and Reticulin. **Histochem.**, 85:41-49, 1986.

ZAGO, D.A. - Estudo Morfológico e Histoquímico de Glândulas Salivares Relacionadas com a Evolução da Função Venenosa nos Ofídios. **Tese de Doutorado**. Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 1971.

ZORN, T.M.T ; BEVILACQUA, E.M.A.F. & ABRAHAMSOHN, P.A. - Collagen Remodeling During Decidualization in the Mouse. **All. Tiss. Res.**, 244:443-448, 1986.

ZORN, T.M.T ; BIJOVSKY, A.T. ; BEVILACQUA, E.M.A.F. & ABRAHAMSOHN, P.A.  
- Phagocytosis of Collagen by Mouse Decidual Cells. **Anat.**  
**Rec.**, 225:96-100, 1989.

